

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

Bestrahlung hypoxischer Tumorzellen mit Alpha-Radioimmunkonjugaten: Nachweis der sauerstoffunabhängigen Wirkung

Christian Jens Wulbrand

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. Dr. R. Senekowitsch-Schmidke
2. Univ.-Prof. Dr. M. Molls

Die Dissertation wurde am 16.09.2013 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.06.2014
angenommen.

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die sauerstoffunabhängige zytotoxische Wirkung von Alphastrahlung, verabreicht in Form von Alphapartikel emittierenden Radioimmunkonjugaten, zu beweisen. Hierfür wurde der Effekt einer Bestrahlung mit Photonen bzw. einer Behandlung mit ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten auf das klonogene Überleben und die Vitalität von Tumorzellen unter Normoxie und Hypoxie verglichen. Der Effekt der Photonenbestrahlung war unter Hypoxie signifikant niedriger als unter Normoxie. Dagegen war die Wirkung der Alphastrahlung unabhängig von der zellulären Oxygenierung. Daher stellt die Alpha-Radioimmuntherapie ein Erfolg versprechendes Therapiekonzept für Tumore dar, die durch Hypoxie radioresistent gegenüber der konventionellen Strahlentherapie sind.

Abstract

The aim of this study was to prove the oxygen independent effect of alpha radiation for the first time. For that purpose tumor cells were incubated with alpha particle emitting ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb or irradiated with photons both under hypoxic and normoxic conditions. The effect of photon irradiation under hypoxia was significantly lower than under normoxia. In contrast, impact of ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb turned out to be independent of cellular oxygenation. Therefore, alpha-radioimmunotherapy seems to be a promising strategy for treatment of tumors, especially those affected by hypoxia induced radioresistance against conventional radiotherapy.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	2
Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	7
Physikalische Abkürzungen.....	11
Verzeichnis von Radionukliden	12
1 Einleitung.....	13
1.1 Allgemeine Einführung	13
1.2 Definition der Hypoxie	14
1.3 Ursachen der Hypoxie in Tumoren	15
1.4 Pathophysiologie der Hypoxie in Tumoren.....	17
1.4.1 Physiologische Anpassung von (Tumor-) Zellen an Hypoxie	17
1.4.2 Hypoxie als Trigger der Tumorphogenese	19
1.5 Resistenzen gegen Chemotherapeutika durch Hypoxie	21
1.6 Radioresistenz durch Hypoxie	21
1.6.1 Chemische Ursachen der Radioresistenz	22
1.6.2 Biologische Ursachen der Radioresistenz.....	23
1.6.3 Linearer Energietransfer – LET	25
1.6.4 Sauerstoffverstärkungsfaktor – OER.....	25
1.6.5 Relative biologische Wirksamkeit – RBE	26
1.7 Tumorhypoxie und klinisches Outcome bzw. klinische Bedeutung	26
1.8 Strategien gegen Radioresistenz	27
1.9 Radionuklid-, Radiopeptid bzw. Radioimmuntherapie.....	30
2 Rationale und Zielsetzung der Arbeit.....	34
3 Material und Methoden	35
3.1 Material	35
3.1.1 Zellkulturmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	35
3.1.2 Chemikalien, Kits und Antikörper	36
3.1.3 Verbrauchsmaterial	38
3.1.4 Geräte	39
3.1.5 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem	40
3.1.6 Software.....	40

3.2	Zellkultur.....	41
3.2.1	Zellen.....	41
3.2.2	Morphologie.....	41
3.2.3	Kultivierung der Zellen unter Normoxie – Normale Zellkulturbedingungen	43
3.2.4	Teilen, Ablösen und Zählen der Zellen.....	43
3.2.5	Kryokonservierung – Einfrieren und Auftauen der Zellen	43
3.2.6	Kultivierung der Zellen unter Hypoxie.....	44
3.3	Bestimmung der Verdopplungszeit und der optimalen Proliferationsbedingungen anhand mikroskopischer Beobachtung unter Normoxie ...	45
3.4	Evaluation der Proliferationsbedingungen unter Hypoxie und möglicher Einflussfaktoren anhand mikroskopischer Beobachtung.....	45
3.4.1	Dauer der Hypoxie.....	45
3.4.2	Ausgangszellzahl.....	45
3.4.3	Schädigung durch Stoffwechselprodukte im Medium	46
3.5	Detektion des Hypoxiemarkers HIF1 α mittels Western Blot	47
3.5.1	Negativ- und Positivkontrolle	47
3.5.2	Proteinextraktion.....	47
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
3.5.4	Sodium Dodecyl Sulfat - Poly Acrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.5.5	Western Blot.....	50
3.6	Klonogener-Test zur Bestimmung des klonogenen Zellüberlebens	51
3.7	WST-Test zur Bestimmung der Zellvitalität	52
3.8	Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie	53
3.9	$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem	54
3.9.1	Aufbau	54
3.9.2	Elution von ^{213}Bi	55
3.9.3	Markierung des Antikörpers Matuzumab mit ^{213}Bi	55
3.9.4	Markierungsausbeute und Bestimmung der Aktivitätskonzentration	56
3.10	Bindung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen.....	57
3.11	Bestrahlung der CAL33 Zellen mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	57
3.12	Bestrahlung der CAL33 Zellen mit Photonen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	58
3.12.1	Konstruktion des Holzgestells mit Bleiplatten	60
3.12.2	Dosimetrie und Einstellung des Linearbeschleunigers	61
3.13	Statistik.....	62
3.13.1	Berechnung der OER	64

4	Ergebnisse	65
4.1	Mikroskopische Beobachtungen der Zellproliferationsbedingungen und der Verdopplungszeit unter Normoxie	65
4.2	Mikroskopische Beobachtungen der Proliferationsbedingungen unter Hypoxie und mögliche Einflussfaktoren	65
4.2.1	Dauer der Hypoxie	65
4.2.2	Ausgangszellzahl	66
4.2.3	Schädigung durch Stoffwechselprodukte im Medium	67
4.3	Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie	68
4.4	Detektion des Hypoxiemarkers HIF-1 α	70
4.5	Markierung von Anti-EGFR-MAb und Bindung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen	72
4.6	Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie	72
4.7	Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie	77
4.8	Statistische Analyse der Strahlenwirkung unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen hinsichtlich des klonogenen Gesamtüberlebens und der Gesamtvitalität	81
4.9	OER für die Bestrahlung mit Photonen und ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb	84
5	Diskussion	86
5.1	Proliferationsbedingungen unter Hypoxie und Normoxie entsprechend den mikroskopischen Beobachtungen.....	86
5.2	Bewertung der Ergebnisse für den quantitativen Vergleich des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie sowie der Ergebnisse für die unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche.....	87
5.2.1	Vergleich der Ergebnisse	87
5.2.2	Diskrepanz der Ergebnisse für das klonogene Zellüberleben und die Zellvitalität.....	90
5.3	Verwendung des Radionuklids ^{213}Bi	91
5.4	Markierung von Anti-EGFR-MAb und Bindung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen	91
5.5	Ergebnisse der Bestrahlungsversuche und statistische Analyse	92
5.5.1	Anmerkungen zur statistischen Analyse	92
5.5.2	Klonogenes Zellüberleben bzw. Klonzahl im Klonogenen-Test nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie.....	93
5.5.3	Zellvitalität bzw. Extinktion im WST-Test nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie	95

5.5.4	Statistische Analyse des klonogenen Gesamtüberlebens und der Gesamtvitalität.....	96
5.5.5	Berechnung und Ergebnisse für den OER	97
5.6	Versuchsprotokolle	98
5.6.1	Versuchsprotokolle im Hinblick auf die Pathophysiologie der Tumorhypoxie	98
5.6.2	Versuchsprotokolle im Hinblick auf die ursächlichen Mechanismen der Radioresistenz.....	99
5.6.3	Vergleichbarkeit der Versuchsprotokolle	101
5.7	Alpha- bzw. Hoch-LET-Strahlung unter Hypoxie – Bewertung der bisherigen Forschung.....	103
5.8	Mechanismus der Radioresistenzentwicklung gegenüber Niedrig-LET- und Hoch-LET-Strahlung	104
5.8.1	Verständnis der Radioresistenzentwicklung gegenüber Niedrig-LET-Strahlung unter Hypoxie	105
5.8.2	Erklärungsansätze für die sauerstoffunabhängige Wirkung von Hoch-LET-Strahlung	108
5.9	Diskussion der bisherigen Strategien gegen Radioresistenz in hypoxischen Tumoren	113
5.10	Therapie solider Tumore mit hypoxischen Gewebearealen durch Hoch-LET-Strahlung.....	117
5.10.1	Weitere Therapieansätze zur Behandlung hypoxischer Tumore mit Hoch-LET-Strahlung (neben der Alphastrahlung)	117
5.10.2	Therapie solider Tumore mit hypoxischen Gewebearealen durch Alphastrahlung emittierende Radioimmunkonjugate	119
6	Zusammenfassung.....	129
7	Anhang	131
7.1	Tabellen und Abbildungen.....	131
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	148
7.3	Tabellenverzeichnis.....	150
7.4	Literaturverzeichnis	152
	Danksagung	173

Abkürzungsverzeichnis

²¹¹ At-ch81C6	Radioimmunkonjugat von Astat 211 mit dem chimären Antitenascin Antikörper 81C6
²¹¹ At-MX35 F(ab')(2)	Radioimmunkonjugat von Astat 211 mit dem antigenbindenden Antikörperfragment MX35
²¹³ Bi-Anti-EGFR-MAb	Radioimmunkonjugat von Bismut 213 mit einem monoklonalen Antikörper gegen den epithelialen Wachstumsfaktorrezeptor
²¹³ Bi-cDTPA-9.2.27 MAb	Radioimmunkonjugat von Bismut 213 mit dem Chelator cDTPA und dem monoklonalen Antikörper 9.2.27
²¹³ Bi-DOTA-Substanz P	Radioimmunkonjugat von Bismut 213 mit dem Chelator DOTA und der Substanz P
²¹³ Bi-Lintuzumab	Radioimmunkonjugat von Bismut 213 mit dem Antikörper Lintuzumab
²²⁵ Ac-DOTA-F3	Radioimmunkonjugat von Actinium 225 mit dem Chelator DOTA und dem Peptid F3
5-FU	5-Fluoruracil
5HREp	5-hypoxia-responsive-element promotor
AGMP-50	Analytical Grade Macroporous 50
ANGPT	Angiopoetin
AP-Puffer	alkaline phosphatase buffer
APS	Ammoniumpersulfat
AQ4N	1,4-bis([2-(dimethylamino-N-oxide)ethyl]amino)5,8-dihydroxy- anthracene-9,10-dione
ARCON	Akzelerierte Strahlentherapie, Carbogen und Nikotinamid
ATP	Adenosintriphosphat
ATSM	Diacetyl-bis-N(4)-methylthiosemicarbazon
AZA	Azomycinarabinofuranosid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat

bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Rinderserumalbumin
c[A]	Aktivitätskonzentration
CEA	carcinoembryonales Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTATOC	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid D-Phe ¹ -Tyr ³ -Octreotide
DTPA	diethylene triamine pentaacetic acid
E-Cadherin	endotheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epithelial growth factor receptor
ELISA-Reader	Enzyme Linked Immunosorbent Assay Reader (Multiwell-Spektrophotometer)
EPO	Erythropoetin
Fab	antigen-binding fragment
FIH-1	factor inhibiting HIF-1
FKS	fetales Kälberserum
GLMM	generalisiertes lineares gemischtes Modell
GLUT-1	Glukosetransporter-1
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	hypoxia-inducible factor
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HR	homologe Rekombination
Ig	Immunglobulin
IGF2	insulin-like growth factor-2
IMRT	intensitätsmodulierte Strahlentherapie
ITLC	instant thin-layer chromatography
KHK	koronare Herzkrankheit

KI	Konfidenzintervall
KNK437	N-formyl-3,4-methylenedioxy-benzylidene- γ -butyrolactam
LET	linearer Energietransfer
MAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD	mittlere Differenz zwischen Hypoxie und Normoxie
MISO	Misonidazol
MMP	Magermilchpulver
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
OER	Sauerstoffverstärkungsfaktor
p[O ₂]	Sauerstoffpartialdruck
PAGE	Poly Acrylamid Gel Elektrophorese
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphat bufferd saline
PDGFB	platelet-derived growth factor B
PHD2	prolyl hydroxylase domain protein 2
p-SCN-Bn-DOTA- ²²⁵ Ac-anti-HER-2/neu	Radioimmunkonjugat aus Actinium 225, dem Chelator p-SCN-Bn-DOTA und einem Antikörper gegen HER-2/neu
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBE	relativen biologischen Wirksamkeit
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RR	relatives Risiko; Faktor, um den eine Messgröße unter Hypoxie größer ist als unter Normoxie
scFv	single chain variable fragment

SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SH-Gruppen	Thiolgruppen
T _{1/2}	Halbwertszeit
TBS-Puffer	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGFA	transforming growth factor- α
TTBS-Puffer	Tris-buffered saline with Tween
UPR	Unfolded Protein Response
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
WST	water soluble tetrazolium
YC-1	3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole

Physikalische Abkürzungen

mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule [1 mmHg = 133.322 Pascal] ¹
m	Meter
M	Molar (Molarität) [1 M = 10 ³ mol/m ³] ¹
l	Liter [1 l = 0,001 m ³] ¹
°C	Grad Celsius
g	Erdschwerebeschleunigung [1 g = 9.81 m/s ²] ¹
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) [1 rpm = 1 /min] ¹
g	Gramm
Bq	Becquerel
Gy	Gray
a	Jahr
d	Tag
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde
eV	Elektronenvolt [1 eV = 1.602 × 10 ⁻¹⁹ Joule] ¹

¹ Umrechnung in SI-Einheiten

Verzeichnis von Radionukliden

Zeichen	Isotop	Halbwertszeit	für die Therapie relevanter Zerfall	Zerfallsenergie [MeV]
²²⁵ Ac	Actinium	10 d	α	5.8
²¹¹ At	Astat	7.2 h	α	6.0
²¹⁷ At	Astat	32 ms	α	7.1
²⁰⁹ Pb	Blei	3.3 h	β	0.6
²¹² Pb	Blei	10.6 h	β	2.1
²²¹ Fr	Francium	4.8 min	α	6.3
¹³¹ I	Iod	8.0 d	β	1.0
⁶⁴ Cu	Kupfer	12.7 h	Augerelektronen	1.7
¹⁷⁷ Lu	Lutetium	6.7 d	β	0.5
²³⁸ Pu	Plutonium	87.7 a	α	5.6
²¹⁰ Po	Polonium	138.4 d	α	5.3
²¹³ Po	Polonium	4.2 μs	α	8.4
²²³ Ra	Radium	11.4 d	α	6.0
²⁰⁹ Tl	Thallium	2.2 min	β	1.8
²²⁷ Th	Thorium	18.7 d	α	6.1
²³² Th	Thorium	14×10 ⁹ a	α	4.1
²⁰⁹ Bi	Bismut	stabil	stabil	stabil
²¹² Bi	Bismut	60.6 min	α (36 %) β (64 %)	6.1 2.3
²¹³ Bi	Bismut	45.6 min	α	5.9 (2 %) 8.4 (98 %)
⁹⁰ Y	Yttrium	64.1 h	β	2.3

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Viele Studien zeigen, dass hypoxische Bereiche – Regionen niedriger Sauerstoffkonzentrationen – charakteristisch für die Pathophysiologie solider Tumore sind. Heterogen verteilte, hypoxische oder anoxische Zellbereiche sind in 50 % - 60 % der soliden Tumore vorhanden. Hypoxie tritt unabhängig von Tumorentität, klinischer Größe, Stadium, Histologie, Grading, Lymphknotenstatus und anderen klinischen Tumorcharakteristiken auf (Vaupel und Mayer, 2007).

Tumorhypoxie verursacht ein schlechteres klinisches Outcome und mindert die klinische Prognose. Hypoxie beeinflusst die Zellproliferation, das Zellüberleben und den Zellmetabolismus. Sie steigert die Angiogenese, die Tumorinvasivität sowie die Metastasierung. Dadurch beeinflusst die Hypoxie den chirurgischen Therapieerfolg und verursacht Resistenzen gegen Strahlen- und Chemotherapie (Ruan et al., 2009).

Seit der Erstbeschreibung der Radioresistenz hypoxischer Zellen durch Thomlinson und Gray vor ca. 55 Jahren (Thomlinson und Gray, 1955) und der Feststellung, dass die Hypoxie zelluläre Funktionen verändert, ist eine immense Anzahl an Studien zu diesem Thema durchgeführt worden. Ziel dieser Studien war es, die physiologischen Mechanismen, die zu Tumorhypoxie führen, und die pathophysiologischen Vorgänge, die durch die Hypoxie ausgelöst werden, zu verstehen, um so Strategien zu entwickeln, die hypoxiebedingte Radioresistenz zu überwinden. Bis heute ist keine zufrieden stellende Therapie im Einsatz.

Da angenommen wird, dass die Wirkung von Alphastrahlung nicht durch die Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst wird, stellt die Behandlung mit Alphastrahlung einen Erfolg versprechenden Ansatz dar, die Radioresistenz zu überwinden. Daher wird in dieser Arbeit die Bestrahlung von hypoxischen Tumorzellen mit Alphapartikel emittierenden Radioimmunkonjugaten untersucht, mit dem Ziel, die sauerstoffunabhängige Wirkung zu bestätigen und zugleich einen Therapieansatz aufzuzeigen, der in vivo anwendbar ist.

Im Folgenden werden zunächst die Pathophysiologie der Tumorphoxie und die chemischbiologischen Ursachen der Radioresistenz beschrieben. Des Weiteren wird ein Überblick über bisherige therapeutische Strategien zur Behandlung hypoxischer Tumore, sowie die Radioimmuntherapie gegeben, um ein grundlegendes Verständnis für das Thema dieser Arbeit zu vermitteln. Vorausgesetzt werden generelle medizinische Hintergründe, grundlegende Kenntnisse zur konventionellen Strahlentherapie und zur nuklearmedizinischen Therapie sowie zu chirurgischen und medikamentösen Behandlungsmethoden von Tumorerkrankungen.

1.2 Definition der Hypoxie

In der Biochemie ist Hypoxie als sauerstofflimitierter Elektronentransport definiert. In der Physiologie und Klinik wird Hypoxie als ein Zustand reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit bzw. Gewebeoxygenierung oder als ein Zustand verringerter Sauerstoffpartialdrucke unterhalb kritischer Grenzwerte definiert, bei dem bestimmte Zellfunktionen und -eigenschaften (z. B. Radiosensibilität) verändert bzw. eingeschränkt sind. Anoxie beschreibt einen Zustand, bei dem kein Sauerstoff messbar ist (Höckel und Vaupel, 2001).

Ab welcher Sauerstoffverfügbarkeit von Hypoxie gesprochen wird, ist demnach von der betrachteten physiologischen Eigenschaft der Zelle abhängig. Als Maßeinheiten zur Quantifizierung der Sauerstoffverfügbarkeit wird in der Regel der Sauerstoffpartialdruck $p[\text{O}_2]$ oder der prozentuale Anteil ($\% \text{O}_2$) von Sauerstoff am Gesamtgasgemisch bezogen auf den Gesamtdruck $p[\text{ges}]$ oder das Volumen verwendet ($\% \text{O}_2 = p[\text{O}_2]/p[\text{ges}]$).

Tabelle 1.1 zeigt mittlere Sauerstoffpartialdrucke in Tumoren und Normalgewebe entsprechend den Angaben in verschiedenen Studien. Hieraus lässt sich entnehmen, dass die mittlere Sauerstoffverfügbarkeit in Normalgewebe bei ca. 40 mmHg (5.3 %), die in Tumorgewebe bei ca. 10 mmHg (1.3 %) liegt. Zu beachten ist, dass die Oxygenierung innerhalb der Tumore sehr heterogen ist. Es treten Bereiche mit deutlich niedrigeren und auch Bereiche mit höheren Sauerstoffpartialdrucken als die angegebenen Mittelwerte auf.

Tabelle 1.1: Mittlere Sauerstoffpartialdrucke $p[O_2]$ in mmHg bzw. Volumenprozent von Sauerstoff (% O_2) in Tumoren und Normalgewebe.

Mittlerer $p[O_2]$ in mmHg (% O_2) in Normalgewebe	Mittlerer $p[O_2]$ in mmHg (% O_2) in Tumoren	Tumortyp	Referenz
45 (5.9)	14 (1.8)	HNSCC	Brown und Wilson (2004)
39 (5.1)	8 (1.1)	Lungenkarzinom	Brown und Wilson (2004)
52 (6.8)	3 (0.4)	Pankreaskarzinom	Brown und Wilson (2004)
30 (3.9)	2 (0.3)	Prostatakarzinom	Brown und Wilson (2004)
40 (5.3)	<10 (1.3)	allgemein	Jordan und Sonveaux (2012)
24-66 (3.1-8.7)	10-30 (1.3-3.9)	allgemein	Kizaka-Kondoh et al. (2003)
40-60 (5.3-7.9)	10 (1.3)	allgemein	Brown (1999)
40 (5.3)	nicht definiert	allgemein	Bertout et al. (2008)

In der Literatur wird von Hypoxie im Allgemeinen ab Sauerstoffpartialdrucken von ≤ 15 mmHg (2 %) gesprochen. Klinisch spricht man von Anoxie ab einer Gewebeoxygenierung von $\leq 0,15$ mmHg (0.02 %) (Bertout et al., 2008). Für Sauerstoffpartialdrucke < 10 mmHg (1.3 %) sind Zellen weniger sensibel gegenüber Strahlung mit einem niedrigen linearen Energietransfer (LET) (vergleiche Kap. 1.6.3), d.h. sie sind radiobiologisch hypoxisch (Jordan und Sonveaux, 2012; Bristow und Hill, 2008; Chaundary and Hill, 2007; Brown, 1999).

1.3 Ursachen der Hypoxie in Tumoren

Prinzipiell ist Hypoxie durch ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffverbrauch und -versorgung bedingt (Secomb et al., 1995). Hypoxie in Tumoren wird durch eine hohe Proliferationsrate und metabolische Aktivität der Tumorzellen bei einer niedrigen Sauerstoffversorgung hervorgerufen (Jordan und Sonveaux, 2012; Harada, 2011;). Nach der Ursache und Dauer der Hypoxie unterscheidet man folgende Arten von Hypoxie (Jordan und Sonveaux, 2011; Bristow and Hill, 2008; Vaupel und Mayer, 2007):

- a) perfusionslimitierte bzw. akute oder zyklische Hypoxie,
- b) diffusionslimitierte bzw. chronische Hypoxie.

Perfusionslimitierte Hypoxie ist gleichbedeutend mit den Begriffen akuter und zyklischer Hypoxie. Akute Hypoxie beschreibt niedrige Sauerstoffkonzentrationen für Minuten bis Stunden bzw. bis 24 h. Sie kann auch als zyklische Hypoxie

auftreten, d. h. mit schwankenden Sauerstoffkonzentrationen bei Zykluszeiten von Minuten bis Stunden (Bristow und Hill, 2008). Ursächlich ist die Blutversorgung (Perfusion) der Tumore. Durch eine geringe Gefäßversorgung wird die Menge des oxygenierten Blutes, das den Tumor erreicht, reduziert. Dies führt zu niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in Tumorkapillaren, die weiter von den zuführenden Arteriolen entfernt sind (Dewhirst et al., 1999). Zudem ist die Vaskularisierung in den Tumoren in der Peripherie geringer ausgeprägt als in der Tumormitte (Dewhirst, 2009).

Des Weiteren beeinflussen strukturelle und funktionelle Abnormalitäten von Tumorgefäßen die Sauerstoffversorgung (Vaupel, 2007). Strukturelle Besonderheiten von Tumorgefäßen sind gewundene Verläufe, blind endende, dilatierete Gefäße und Gefäßwandinstabilitäten (Brown und Wilson, 2004). Eine uneinheitliche Ausrichtung von Blutgefäßen in Tumoren führt zu Regionen mit Über- und Untervaskularisierung (Secomb et al., 1993). Arteriovenöse Shunts transportieren oxygeniertes Blut vom Tumor weg (Eddy und Casarett, 1973) und führen zu niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen in den arteriellen Gefäßen des Tumors. Funktionelle Einschränkungen im Gefäßsystem von Tumorgewebe sind ein stagnierender (Brown und Wilson, 2004) und schwankender Fluss von Erythrozyten in Kapillaren und damit ein inkonstanter Sauerstofftransport. In einigen Kapillaren fließen keine Erythrozyten (Dewhirst et al., 1996; Vaupel, 2004). Zudem schrumpfen Erythrozyten unter reduzierten Sauerstoffkonzentrationen und werden dadurch starrer bzw. unbeweglicher. Infolgedessen steigt die Blutviskosität, der Blutfluss sinkt und die Verteilung der Erythrozyten wird verändert (Kavanagh et al., 1993).

Die Summe dieser Mechanismen führt zu einer sehr heterogenen Oxygenierung bzw. Sauerstoffversorgung in Tumoren mit im Mittel niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen im Vergleich zu Normalgewebe (Brown und Wilson, 2004).

Diffusionslimitierte bzw. chronische Hypoxie beschreibt niedrige Sauerstoffkonzentrationen von Stunden bis Tagen. Neben der niedrigen Sauerstoffkonzentration im Tumorgefäßsystem, bedingt durch oben genannte Mechanismen, ist die eingeschränkte Diffusionsweite von Sauerstoff der Grund für chronische Hypoxie. Eine chronisch eingeschränkte Sauerstoffverfügbarkeit tritt ab einer Diffusionsstrecke von 100 μm - 180 μm entfernt von Blutgefäßen auf (Harada, 2011; Ruan et al., 2009; Bertout et al., 2008). Zudem kann durch eine tumorassoziiert-

te oder therapieinduzierte Anämie, die zu einer geringeren Sauerstofftransportkapazität im Blut führt, die Gesamtsauerstoffkonzentration im Gefäßsystem weiter gesenkt werden (Vaupel, 2007).

1.4 Pathophysiologie der Hypoxie in Tumoren

1.4.1 Physiologische Anpassung von (Tumor-) Zellen an Hypoxie

Hypoxie führt zu Apoptose und nekrotischem Zelltod. Zellen reagieren auf eine niedrige Sauerstoffverfügbarkeit durch verschiedene Anpassungsmechanismen wie eine reduzierte Proliferation, Veränderungen des Zellzyklus und des Zellmetabolismus (Vaupel und Mayer, 2007). Die Proteinexpression wird verändert, wodurch Energie eingespart und die Zellen vor dem Zelltod geschützt werden (Bristow und Hill, 2008). Die Signalwege der Hypoxie induzierten Faktoren (Hypoxia-inducible factors, HIFs) und die HIF-unabhängigen Signalwege von mTOR (mammalian target of rapamycin) und der UPR (Unfolded Protein Response) sind hierbei beteiligt und interagieren miteinander (Wouters und Koritzinsky, 2008).

1.4.1.1 Hypoxia-inducible factors (HIFs)

Die Anpassung der Zellen an die Hypoxie wird hauptsächlich durch HIFs vermittelt (Wang et al., 1995). HIFs regulieren die Genexpression von mehr als 800 Zielgenen über die Bindung an HREs (hypoxia responsive elements) (Schödel et al., 2011). HIF-1 ist ein ubiquitär exprimiertes Heterodimer aus HIF-1 α und HIF-1 β . Manche Zelltypen exprimieren auch HIF-2, das aus den Untereinheiten HIF-2 α und HIF-2 β besteht (Semenza, 2012b). Unter normoxischen Bedingungen werden HIF-1 α und HIF-2 α sauerstoffabhängig hydroxyliert (Kaelin und Ratcliffe, 2008). Die Hydroxylierung durch das PHD2 (prolyl hydroxylase domain protein 2) führt zur Bindung des VHL Proteins (von Hippel-Lindau Proteins), zur Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation (Salceda und Caro, 1997). Die Hydroxylierung durch den FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) blockiert die Bindung des Coaktivators p300, was zu einer verringerten transkriptionalen Aktivität führt. Zudem sind an der Regulation der HIF-1-Aktivität zahlreiche Onkoproteine (z.B.: BCR-ABL, AKT, EGFR, HER2) und Tumorsuppressorproteine (z.B.: p53, VHL) beteiligt (Semenza, 2012b). Auch oxidativer Stress durch Ra-

dikale führt zur Akkumulation von HIF-1. Physiologisch haben HIFs entscheidende Funktionen in der embryonalen Entwicklung u.a. des Herz-Kreislaufsystems und der Hämatopoese, die unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ablaufen. HIF-1 hat protektive Eigenschaften bei Krankheiten wie der koronaren Herzkrankheit (KHK), der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) oder der Wundheilung (Semenza, 2012a). Als Anpassungsreaktion an die Hypoxie wird durch HIFs ein glykolytischer Zellmetabolismus gefördert, der eine Energiegewinnung unter eingeschränkter Sauerstoffverfügbarkeit ermöglicht. Zudem wird die Sauerstoffversorgung durch eine Steigerung der Angiogenese verbessert (Semenza, 2012a; Semenza, 2012b) (vergleiche Kap. 1.4.2). Je nachdem wie hoch der Hypoxie bedingte Stress auf die Zellen und wie effektiv die Anpassung an die Hypoxie ist, kann HIF-1 pro- und antiapoptische Prozesse fördern (Moeller und Dewhirst, 2006).

1.4.1.2 HIF-unabhängige Signalwege: mTOR und Unfolded Protein Response (UPR)

mTOR ist Teil des mTOR-Komplexes, der oxidativen Stress und Veränderungen des Nährstoff- und Energiestatus registriert. Hypoxie inhibiert die mTOR-Aktivität. Nachfolgend wird über die Regulation von Proteinsynthesen und Gentranskriptionen eine Reduktion der Zellproliferation und des Zellwachstums und somit eine Anpassung an hypoxische Bedingungen bewirkt (Dewhirst, 2009; Wouters und Koritzinsky, 2008).

Extreme Hypoxie oder Anoxie können zu einer schnellen reversiblen Herunterregulierung der Proteinsynthese führen. Dies wird über die UPR vermittelt. Durch die Phosphorylierung des eukariotischen Initiationsfaktors 2 α wird die Translation der mRNA inhibiert. Durch diesen Mechanismus wird ein Großteil der Energieeinsparung während der Hypoxie erreicht (Bristow und Hill, 2008; Wouters und Koritzinsky, 2008).

Diese zellulären Anpassungsvorgänge, die durch die Hypoxie verursacht werden, triggern die Tumorphathogenese. Sie fördern die Progredienz und Aggressivität, verändern die Voraussetzungen für eine chirurgische Therapie und verursachen Resistenzen gegen Radio- und Chemotherapie. Ferner werden das Outcome und die Prognose der Tumorerkrankung negativ beeinflusst. Im Folgenden wird auf diese Punkte näher eingegangen.

1.4.2 Hypoxie als Trigger der Tumorphathogenese

Der Zellmetabolismus in Tumoren ist durch die sauerstoffunabhängige Energiegewinnung der aeroben Glykolyse gekennzeichnet. Auch bei einer ausreichenden Sauerstoffversorgung wird statt der sauerstoffabhängigen effektiveren oxydativen Phosphorylierung die sauerstoffunabhängige aerobe Glykolyse zur Herstellung von ATP verwendet. Dieses Phänomen wird nach dem Erstbeschreiber Otto Warburg, Warburg-Effekt genannt (Warburg, 1956; Warburg et al., 1924). Der Warburg-Effekt wird durch eine gesteigerte Expression von Enzymen für die aerobe Glykolyse verursacht. Hieran sind neben einer Überexpression des MYC-Onkogens oder einer Deaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 Signalwege der HIFs beteiligt (Bensinger und Christofk, 2012; Semenza, 2012b). Die Anpassung des Zellmetabolismus an die Hypoxie ermöglicht somit eine ausreichende Energiegewinnung und damit den Erhalt der Zellfunktionen während der Tumorphathogenese.

Die Tumorphathogenese wird vor allem durch die Hypoxie induzierte Hochregulierung von HIFs verstärkt:

HIFs regulieren Gene, die Wachstumsfaktoren wie den TGFA (transforming growth factor- α), den IGF2 (insulin-like growth factor-2), den VEGF (vascular endothelial growth factor) oder das EPO (Erythropoetin) kodieren. Dadurch wird die Zellproliferation gesteigert und der Zelltod vermieden (Semenza, 2012b). Zudem können Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen unabhängig von exogenen Wachstums- oder Antiproliferationssignalen wachsen (Harris, 2002). HIFs steigern die Expression von VEGF, des PDGFB (platelet-derived growth factor B), des bFGF (basic fibroblast growth factor) und des ANGPT (Angiopoeitin), fördern so die Angiogenese, verbessern die Sauerstoffversorgung und ermöglichen Tumorwachstum (Semenza, 2012b).

HIFs blockieren die Expression von E-Cadherin und anderen Proteinen, die die Zelladhäsion gewährleisten. Die Transkription von Proteasen der extrazellulären Matrix, Motilitätsfaktoren, Permeabilitätsfaktoren (VEGF, ANGPT) und Proteinen, die für die Extravasation zuständig sind, wird gesteigert. Folglich werden Invasivität und Metastasierungspotential des Tumors erhöht (Semenza, 2012b), wodurch die Kurabilität der chirurgischen Therapie beeinträchtigt wird (Brizel et al., 1996; Höckel et al., 1996).

Tumorzellen entziehen sich unter Hypoxie der Immunantwort durch HIF-1-

abhängige und unabhängige Signalwege sowie durch den Umstand, dass die Immunzellen sich selber an hypoxische Bedingungen anpassen müssen (Ruan et al., 2009).

Ferner fördert Hypoxie die genetische Instabilität in Tumorzellen. Zyklische Hypoxie führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), die DNA-Schäden verursachen. Chronische Hypoxie senkt die Translationsrate von DNA-Reparaturproteinen. Infolgedessen wird die Mutationsrate erhöht (Bristow und Hill, 2008; Bindra et al., 2007). Unter anderem können Mutationen eine De-regulation des mTOR-Signalweges bewirken und so dessen proliferations- und wachstumshemmende Wirkung unter Hypoxie aufheben (Wouters und Koritzinsky, 2008). Durch Selektion aggressiver Tumorzellen unter Hypoxie wird die klinische Prognose weiter verschlechtert (Bristow und Hill, 2008).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch Tumorphypoxie Prozesse ausgelöst werden, die die Malignität der Tumore steigern (Abbildung 1.1).

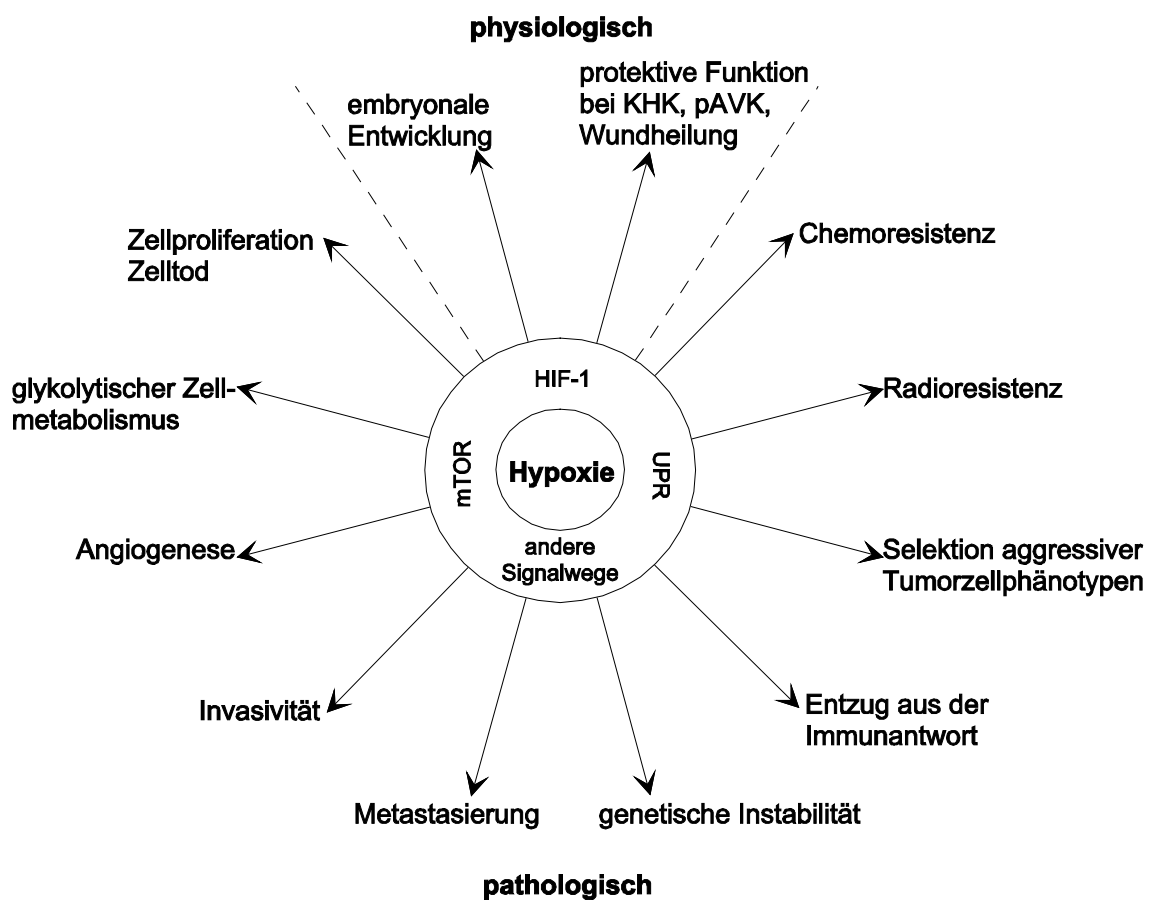


Abbildung 1.1: Physiologische und Pathologische Auswirkungen der Hypoxie (modifiziert nach Ruan et al. (2009)).

1.5 Resistenzen gegen Chemotherapeutika durch Hypoxie

Ein Hauptproblem der Chemotherapie in hypoxischen Tumoren ist die geringe Bioverfügbarkeit von Medikamenten in Zellen mit schlechter vaskulärer Versorgung (Minchinton und Tannock, 2006). Beispiele sind interkalierende Substanzen oder Melphalan (Brown, 1999). Andere Substanzen wie Bleomycin benötigen Sauerstoff um DNA-Schäden zu verursachen (Wilson und Hay, 2011; Cosse und Michiels, 2008). Eine verringerte Proliferation unter Hypoxie mindert die Wirkung von Antimetaboliten und alkylierenden Substanzen, die auf eine hohe Proliferationsrate angewiesen sind (Shannon et al., 2003). Zellzyklusveränderungen bewirken beispielsweise eine Resistenz gegen Antimetaboliten wie 5-Fluoruracil (Bristow und Hill, 2008). Durch einen herabgesetzten extrazellulären pH-Wert, bedingt durch die Akkumulation von Laktat unter hypoxischen Bedingungen, gelangen schwach basische Medikamente wie Adriamycin und Doxorubicin nicht an ihren Wirkort (Wilson und Hay, 2011; Brown, 1999). Multi-Drug-Resistenzen entstehen durch genetische Instabilität und Selektion von p53-Loss-of-Function-Mutationen (Shannon et al., 2003). Die genannten Beispiele belegen, dass Hypoxie ein entscheidender Faktor in der Entstehung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika ist.

1.6 Radioresistenz durch Hypoxie

Der Einfluss von Sauerstoff bzw. der Einfluss der Blutversorgung auf die Radioempfindlichkeit wurde 1912 von Schwartz und 1936 von Mottram postuliert (Bernier, 2004). 1947 zeigten Thoday und Read, dass die Anzahl chromosomaler Aberrationen und die Reduktion des Zellwachstums verursacht durch Röntgenstrahlung vom Vorhandensein von Sauerstoff abhängen. 1953 wurde erstmals in Studien von Gray et al. eine geringere Strahlenwirkung auf Zellen mit reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit quantifiziert. Dieses Phänomen wurde Sauerstoff Effekt (oxygen effect) genannt. Thomlinson und Gray zeigten 1955, dass Tumore aus normoxischen und hypoxischen Bereichen bestehen. Die ursächlichen Mechanismen der Radioresistenz sind bis heute Gegenstand der Forschung. Chemische und biologische Mechanismen spielen eine Rolle.

1.6.1 Chemische Ursachen der Radioresistenz

Ionisierende Strahlung erzeugt DNA-Schäden auf direkte und indirekte Weise. Bei der direkten Strahlenwirkung laufen Energieabsorption und resultierende Schädigung am selben Molekül ab. Bei der indirekten Strahlenwirkung entstehen durch die Energieabsorption Radikale, die eine sekundäre chemische Schädigung von biologischen Strukturen verursachen. Die DNA-Schäden, darunter besonders DNA-Doppelstrangbrüche, führen zum Zelltod. Sauerstoff ist an den chemischen Prozessen der DNA-Schädigung durch Radikale und an der Fixierung dieser Schäden beteiligt.

Ionisierende Strahlung bewirkt die Bildung von reaktiven Radikalen aus Wasser (Radiolyse des Wassers). Diese reagieren unter anderem mit Sauerstoff und bilden reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Menge der erzeugten ROS ist sauerstoffabhängig. Ein reversibler DNA-Schaden durch Bildung von DNA-Radikalen wird direkt durch die ionisierende Strahlung und indirekt durch ROS (vor allem Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$)), die in der Nähe der DNA entstehen, induziert. Unter Normoxie werden die DNA-Radikale mittels Sauerstoff zu DNA-Peroxiden oxidiert. Dadurch wird der DNA-Schaden fixiert (Sauerstoff-Fixierungs-Theorie) (Bertout et al., 2008; Jordan und Sonveaux, 2012). Ist kein Sauerstoff vorhanden, reduzieren Moleküle, die Thiolgruppen (SH-Gruppen) enthalten, die DNA-Radikale und reparieren so die DNA. Der DNA-Schaden, vor allem die Bildung von irreparablen DNA-Doppelstrangbrüchen, ist somit unter hypoxischen Bedingungen geringer als unter normoxischen (Brown und Wilson, 2004) (Abbildung 1.2).

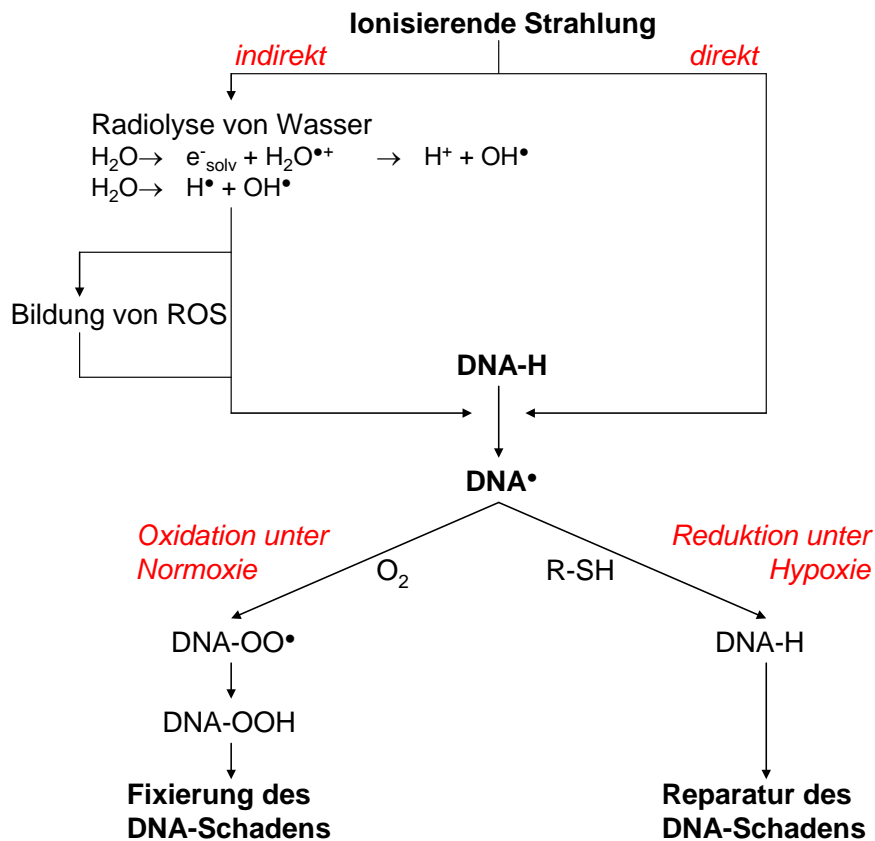


Abbildung 1.2: Chemischer Mechanismus der strahleninduzierten DNA-Schädigung (modifiziert nach Jordan und Sonveaux (2012), Brown und Wilson (2004) und Brown (1999)).

1.6.2 Biologische Ursachen der Radioresistenz

Neben den chemischen Mechanismen der Radioresistenz beeinflussen auch biologische Signalwege die Strahlensensibilität hypoxischer Zellen. Das Verständnis und die Bedeutung der biologischen Ursachen der Radioresistenz sind noch nicht ausreichend geklärt. Im Folgenden werden einige Mechanismen genannt.

HIF-1 moduliert die Anpassung der Zelle an Hypoxie. Dabei werden Mechanismen ausgelöst, die sowohl radioprotektive als auch radiosensitivierende Wirkungen haben:

HIF-1 beeinflusst pro- und ebenso antiapoptotische Signaltransduktionskaskaden. In bestrahlten Zellen hat HIF-1 einen in der Summe proapoptotischen Effekt und erhöht so die Strahlenwirkung.

Zellen mit hohen Proliferationsraten sind empfindlicher gegenüber Strahlung

(Bergonié-Tribondeau-Gesetz (Reiser et al. 2006)). HIF-1 gewährleistet einerseits durch die Förderung der Glykolyse in nährstoffarmen Regionen eine konstante Proliferation und hält die zelluläre Energieversorgung auf einem Niveau, das für eine hohe Radiosensitivität nötig ist (Moeller et al., 2005). Andererseits kann HIF-1 den Zellzyklus abhängig von den Eigenschaften der lokalen Zellumgebung stoppen und so die Strahlenwirkung reduzieren (Moeller und Dewhirst, 2006).

Die Förderung der Angiogenese durch Faktoren wie VEGF und bFGF, die radioprotektiv auf Endothelzellen wirken, steigert die Radioresistenz (Moeller et al., 2004).

Insgesamt wirken die HIF-1-vermittelten Effekte radioprotektiv (Moeller und Dewhirst, 2006). Diese Aussage wird durch Studien belegt, in denen gezeigt wurde, dass HIF-1-defiziente Tumore radiosensitiver als Wildtyp-Tumore sind (Moeller et al., 2005; Williams et al., 2005; Zhang et al., 2004).

Ein weiteres beobachtetes Phänomen ist die Hochregulierung von HIF-1 nach Bestrahlung mit Photonen (Viola et al., 2008). Durch die Bestrahlung des Tumors kommt es zu einer Reoxygenierung, da (i) der Sauerstoffverbrauch durch eine verringerte Zellzahl gesenkt wird und (ii) in Bereichen abgestorbener Zellen Platz für neue Gefäße entsteht, die den Tumor mit Sauerstoff versorgen können. Die Reoxygenierung bewirkt (i) die Bildung von freien Radikalen, die eine HIF-1-Akkumulation fördern und (ii) die Depolymerisation von Stressgranulaten, wodurch eine partielle Blockade der Proteinsynthese im HIF-1-Signalweg aufgehoben wird. Die erhöhten HIF-1-Level bleiben bis zu einer Woche bestehen und steigern wiederum die Radioresistenz, die Tumorphagenese und die Rückfallraten nach Strahlentherapie (Harada et al., 2012; Moeller et al., 2004).

Die Art und Dauer der Hypoxie beeinflusst ebenfalls die Radioresistenz von Tumorzellen (Pettersen und Wang, 1996). Die Radioresistenz ist unter chronischer Hypoxie geringer als unter akuter bzw. zyklischer Hypoxie (Shrieve und Harris, 1985; Shrieve et al., 1983). Dies lässt sich durch eine gesteigerte HIF-1-Aktivität unter zyklischer Hypoxie erklären. Unter anderem wird durch intermittierende Reoxygenierung die Anzahl freier Radikale erhöht, was die Akkumulation von HIF-1 fördert (Dewhirst et al., 2008).

Die Auswirkungen anderer Signalwege, wie die von mTOR und der UPR auf die Radioresistenz sind noch nicht beschrieben.

1.6.3 Linearer Energietransfer – LET

Für Sauerstoffpartialdrucke unter 10 mmHg sind Zellen weniger sensibel gegenüber ionisierender Strahlung (Bristow und Hill 2008). Es wird angenommen, dass sich dieser Effekt mit steigendem linearem Energietransfer (LET) der Strahlung verringert (Wenzl und Wilkens, 2011). Der LET ist ein Maß für die Energie, die ein ionisierendes Teilchen pro Längeneinheit des zu durchdringenden Materials abgibt und wird in Kiloelektronenvolt pro Mikrometer angegeben ($\text{keV}/\mu\text{m}$). Vereinfachend unterscheidet man in der Literatur zwischen locker ionisierender bzw. Niedrig-LET-Strahlung und dicht ionisierender bzw. Hoch-LET-Strahlung. Krieger (2012) gibt als Grenzwert einen LET von $3,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ an. Somit sind i. d. R. Röntgen-, Photonen- und Elektronenstrahlung als Niedrig-LET-Strahlung und Protonen-, Alpha- und Ionenstrahlung als Hoch-LET-Strahlung anzusehen (Reiser et al., 2006; Wenzl und Wilkens, 2011).

1.6.4 Sauerstoffverstärkungsfaktor – OER

Die Auswirkung von Sauerstoff bzw. Hypoxie auf die Wirkung von ionisierender Strahlung wird mit dem Sauerstoffverstärkungsfaktor (oxygen enhancement ratio; OER) quantifiziert. Der OER ist definiert als das Verhältnis der Strahldosen, die unter Hypoxie und Normoxie denselben biologischen Effekt hervorrufen (Wenzl und Wilkens, 2011):

$$\text{OER} = \frac{D_{\text{H}} [\text{Gy}]}{D_{\text{N}} [\text{Gy}]} \quad (\text{Gl. 1})$$

mit den Bezeichnungen:

D_{H} : Dosis unter Hypoxie in Gray (Gy),

D_{N} : Dosis unter Normoxie in Gray,

wobei gilt:

biologischer Effekt von D_{H} = biologischer Effekt von D_{N} .

Der OER ist abhängig vom $p[\text{O}_2]$. Mit steigendem $p[\text{O}_2]$ nimmt der OER ab. Die gängigen Werte des OER für Zellüberleben unter Niedrig-LET-Strahlung liegen in vitro bei etwa 2.5 bis 3. Hierbei liegt der Dosis unter Hypoxie ein $p[\text{O}_2]$ von

0.01 mmHg zugrunde, der definitionsgemäß Anoxie entspricht. In vivo treten unterschiedliche $p[\text{O}_2]$ auf. Dementsprechend ist der OER für Zellüberleben in vivo gemäß den Daten verschiedener Studien geringer.

Es wird beobachtet, dass sich der Effekt von Sauerstoff auf die Strahlenwirkung mit steigendem LET verringert. Der OER nimmt mit steigendem LET ab (Wenzl und Wilkens, 2011).

1.6.5 Relative biologische Wirksamkeit – RBE

Der biologische Effekt verschiedener Strahlenarten wird mit der relativen biologischen Wirksamkeit (relative biological effectiveness; RBE) quantifiziert und macht sie so im Hinblick auf den LET vergleichbar. Teilweise wird die RBE auch verwendet, um die biologische Wirkung unter Anoxie und Hypoxie zu vergleichen. Die RBE ist definiert als der Quotient aus den Energiedosen einer 250keV-Röntgen-Referenzstrahlung und der zu quantifizierenden Strahlung, die den gleichen biologischen Effekt aufweisen:

$$\text{RBE} = \frac{D_{\text{Ref}} [\text{Gy}]}{D_{\text{Test}} [\text{Gy}]} \quad (\text{Gl. 2})$$

mit den Bezeichnungen:

D_{Ref} : Dosis der 250-keV-Röntgen-Referenzstrahlung,

D_{Test} : Dosis der zu untersuchenden Strahlung,

wobei gilt:

biologischer Effekt von D_{Ref} = biologischer Effekt von D_{Test} .

Die RBE ist abhängig von der Art des beobachteten biologischen Effekts und der Höhe des LET-Wertes. Die RBE nimmt bis zu einem LET-Wert von ca. 100 keV/ μm zu. Jenseits dieses LET-Wertes wird mehr Energie aufgewendet als zum Abtöten einer Zelle notwendig ist (Reiser et al., 2006).

1.7 Tumorhypoxie und klinisches Outcome bzw. klinische Bedeutung

Hypoxie ist ein generelles Phänomen in Tumoren und tritt unabhängig von klinischen Tumorcharakteristiken wie dem Stadium oder dem Grading auf. Sie kommt in Tumoren der Brust, des Uterus, der Zervix, des Rektum, des Pan-

kreas, der Lunge, des Gehirns, der Niere, in HNSCC, bei Weichteilsarkomen, Non-Hodgkin-Lymphomen, malignen Melanomen sowie metastasierten Lebertumoren vor (Vaupel und Mayer, 2007). Die klinische Prognose und das Outcome von Tumoren mit hypoxischen Gewebearealen sind aufgrund der Förderung der Tumorpathogenese, der Chemo- und Radioresistenz verschlechtert (Wilson und Hay, 2011; Ruan et al., 2009; Bertout 2008). Einige Beispiele werden hier genannt.

Hypoxie bedingt ein schlechteres Gesamt- und rezidivfreies Überleben bei Patientinnen mit Zervixtumoren (Vaupel und Mayer, 2007; Höckel et al., 1996). In Tumoren der Lunge steigert Hypoxie die Metastasierungsrate und verschlechtert das Outcome (Graves et al., 2010). Bei HNSCC bewirkt Hypoxie ein verringertes Überleben und eine reduzierte lokale Tumorkontrolle aufgrund der Radioresistenz (Nordsmark et al., 2005). Nach einer Strahlentherapie in fortgeschrittenen Tumorstadien überleben nur 30% der Patienten länger als 5 Jahre (Leemans et al. 2011). Bei der Strahlentherapie des Prostatakarzinoms ist das Vorhandensein von Hypoxie mit einem früheren Wiederanstieg des prostata-spezifischen Antigens (PSA), sowie mit Lokalrezidiven assoziiert (Milosevic et al., 2012). Insgesamt mindert Hypoxie in einer Vielzahl von Tumoren die Wirkung der konventionellen Strahlentherapie (Brown und Wilson, 2004; Harrison et al., 2002). Die Aktivität hypoxieinduzierter Signalwege geht ebenfalls mit einer schlechteren Prognose einher. Eine gesteigerte Expression von HIF-1 α sowie dessen Zielgenen, wie GLUT-1, korreliert mit einem verringerten Überleben bei HNSCC, Brust-, Ösophagus-, Magen- und Lungenkarzinomen (Vaupel und Mayer, 2007).

1.8 Strategien gegen Radioresistenz

Um der Radioresistenz durch Hypoxie in Tumoren zu begegnen, wurde eine Reihe von Strategien und Medikamenten entwickelt, die auf unterschiedlichen Ansatzpunkten beruhen. Im Folgenden wird ein Überblick anhand von ausgewählten Beispielen gegeben. Es ist nicht möglich die gesamte Palette an Substanzen darzustellen.

Steigerung der Sauerstoffverfügbarkeit

Frühere Ansätze, die Radioresistenz zu verringern, hatten das Ziel, die Hypoxie selbst zu reduzieren. Hierzu zählen die Beatmung mit hyperbarem Sauerstoff, Erythrozytentransfusionen, die Stimulation der Erythropoese (z. B. mit Erythropoetin) und die Inhalation von hyperoxischen Gasen wie Carbogen (5 % CO₂ und 95 % O₂) in Kombination mit vasodilatierenden Medikamenten (z. B. Nikotinamid). Die Anwendung dieser Methoden in der Klinik ist weitestgehend ungeeignet und unzufriedenstellend (Moeller et al., 2007; Harrison et al., 2002). Allerdings zeigen klinische Studien zum ARCON-Protokoll (Akzelerierte Strahlentherapie, Carbogen und Nikotinamid) Erfolg versprechende Ergebnisse für HNSCC und Blasenkarzinome (Jordan und Sonveaux, 2012).

Klassische und hypoxiespezifische Zytotoxine

Ein Teil der Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil (5-FU) oder Gemcitabin, die momentan in Protokollen zur kombinierten Radiochemotherapie verwendet werden, bewirken neben ihrer zytotoxischen Wirkung auch eine Steigerung der Radiosensitivität. Beispielsweise steigert 5-FU die Sensitivität gegenüber Strahlentherapie durch Beeinträchtigung der DNA-Reparatur. Hypoxie spezifische Zytotoxine (z. B. Triapazamin, Nitrobenzindole und AQ4N) werden intrazellulär bei niedrigen p[O₂] reduziert und aktiviert und bewirken eine DNA-Schädigung (Bischoff et al., 2009). Die am weitesten entwickelte Substanz, Tirapazamin, zeigt in klinischen Studien Erfolge bei Patienten mit HNSCC (Rischin et al., 2005).

Steigerung der Strahlenempfindlichkeit durch Radiosensitizer

Radiosensitizer werden wie Hypoxie spezifische Zytotoxine bei niedrigen p[O₂] reduziert. Daraufhin reagieren sie, gewissermaßen als Sauerstoffimitat, mit den strahleninduzierten DNA-Radikalen und fixieren die Schäden (Bischoff et al., 2009). Die klassischen Radiosensitizer, Nitroimidazolderivate wie Misonidazol, finden aufgrund der dosislimitierenden Nebenwirkungen keine weit reichende Anwendung in der Klinik. Neuere Substanzen wie Doranidazol (Bischoff et al., 2009), C-1027 (Beerman et al., 2009) und KNK437 (Oomen und Prise, 2012) haben geringere Nebenwirkungen und zeigen Erfolge, die zytotoxischen Effekte von ionisierender Strahlung unter Hypoxie zu verstärken.

Steigerung der Strahlenempfindlichkeit durch Inhibition von HIF-1, UPR und mTOR

In neueren Ansätzen werden die molekularen Anpassungsprozesse, die durch Hypoxie ausgelöst werden und die die Radioresistenz steigern, gezielt inhibiert (Harada, 2011). Dazu zählen Stoffe, die die HIF-1-Aktivität auf unterschiedlichste Art und Weise blockieren. Ziele sind Effektormoleküle der Expression, der Transkription, der Synthese, der Stabilisierung und des Abbaus von HIF-1 (Semenza, 2012b). Die Substanz YC-1 verursacht eine Degradation von HIF-1 α und beeinflusst zusätzlich den mTOR-Signalweg (Semenza, 2012b; Moon et al., 2009). Die UPR wird beispielsweise durch Salicylaldehyde inaktiviert (Wilson und Hay, 2011). Bisher wird keines dieser neuen Medikamente klinisch angewendet.

Gentherapie

Die Gentherapie hypoxischer Tumorzellen mit dem Gentherapiesystem für die bakterielle Cytosindeaminase und für 5-Fluorocytosin unter der Kontrolle des HIF-1-abhängigen Promotors 5HREp (5-hypoxia-responsive-element) steigert die Wirkung einer Strahlentherapie (Liu et al., 2007).

Modifizierte Strahlentherapie

Durch Modifikation der normalen Strahlentherapie kann man der Radioresistenz entgegenwirken. Nach der Strahlentherapie werden hypoxische Tumorbereiche zum Teil reoxygeniert (vergleiche Kap. 1.6.2). Durch Fraktionierung der Gesamtdosis wird Schritt für Schritt ein hypoxischer Teil des Tumors reoxygeniert (Yaromina et al., 2011) und ist so bei der nächsten Bestrahlung potentiell strahlenempfindlicher. Neben der Steigerung des therapeutischen Effekts, nehmen zudem die Nebenwirkungen im Normalgewebe ab. Diese Vorteile lassen sich durch Hyperfraktionierung weiter steigern, da diese eine Steigerung der Gesamtdosis ermöglicht. Akzelerierte Fraktionierung bietet Vorteile bei schnell wachsenden Tumoren, da die Gesamtdauer der Behandlung kürzer ist. Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren zur Darstellung von hypoxischen Tumorregionen (z.B. CuATSM, ¹⁸F-MISO) und einer dreidimensionalen Planung der Dosisverteilung bei der intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) kann man versuchen, hypoxische Regionen durch erhöhte Dosen verstärkt zu schädigen (Gaertner et al., 2012; Harada, 2011).

Hoch-LET-Strahlung

Da der OER mit steigendem LET abnimmt (Wenzl und Wilkens 2011), wird angenommen, dass Strahlung mit einem hohen LET eine sauerstoffunabhängige Wirkung besitzt. Die Bestrahlung hypoxischer Tumore mit Hoch-LET-Strahlung ist somit eine weitere therapeutische Option. Wie vor kurzem gezeigt, werden hypoxische MCF-7 Tumorzellen selektiv und effektiv durch Augerelektronen emittierendes ^{64}Cu abgetötet, das an den Hypoxietracer Diacetyl-bis-N(4)-methylthiosemicarbazon (ATSM) gekoppelt ist (Weeks et al., 2010). In einer klinischen Studie wurde demonstriert, dass die Bestrahlung mit Hoch-LET-Kohlenstoffionen geeignet ist, die hypoxiebedingte Radioresistenz in Tumoren der Zervix zu überwinden (Nakano et al., 2006). Daneben ist unter den Strahlungen mit einem hohen LET vor allem die Alphastrahlung besonders viel versprechend, um Tumoren unabhängig von der zellulären Oxygenierung abzutöten. Die Radioimmuntherapie mit Alphastrahlern stellt hierbei einen möglichen Therapieansatz dar (vergleiche Kap. 1.9 und Kap. 2).

1.9 Radionuklid-, Radiopeptid bzw. Radioimmuntherapie

Grundlegender Gedanke der Malignomtherapie mit radioaktiven Nukliden ist, Strahlenschäden an Normalgewebe durch eine hohe Spezifität gegenüber dem Zielgewebe zu verringern und disseminierte Ziele zu erreichen. Dies erfolgt durch Nuklide, die selbst gewebespezifisch sind (wie bei der Radionuklidtherapie mit Iod) oder durch Kopplung der Nuklide an einen geeigneten Träger, der möglichst spezifisch an Zielstrukturen auf Tumorzellen bindet, z. B. ein Peptid oder einen Antikörper (wie bei der Radiopeptid- oder Radioimmuntherapie). Durch Verwendung von β - und α -Strahlern, die in Gewebe eine sehr geringe Reichweite besitzen (maximal 10 mm für β -Strahler mit Energien bis ca. 2 MeV und 0.1 mm für α -Strahler mit Energien bis ca. 8 MeV (Milenic et al., 2004)), wird ein starker Dosisabfall außerhalb des Zielgewebes erreicht und Normalgewebe geschont. Die hohe RBE von Alphastrahlung gewährleistet eine effizientere Zerstörung des Tumorgewebes im Vergleich zur konventionellen Strahlentherapie. Mit Hilfe der γ -Komponente einiger Nuklide ist zudem eine Lokalisation des Radionuklidkonjugates im Körper mittels Szintigraphie und somit eine Dosimetrie möglich.

Die gängigste Radionuklidtherapie ist die Radioiodtherapie mit ^{131}I . Die Strahlung ist durch einen γ - (10 %) und einen β -Anteil (90 %) charakterisiert, wobei letzterer für die zytotoxische Wirkung verantwortlich ist und durch seine maximale Reichweite im Gewebe von ca. 2 mm eine Schonung der umliegenden Strukturen gewährleistet. Aufgrund der spezifischen Anreicherung von Iod im Schilddrüsengewebe ist die Radioiodtherapie unter anderem für die Behandlung immunogener Hyperthyreosen, autonomer Adenome, Metastasen des Schilddrüsenkarzinoms sowie der adjuvanten Therapie nach chirurgischer Resektion von Schilddrüsenkarzinomen geeignet (Robbins und Schlumberger, 2005).

Klinische Anwendung findet die Therapie mit Radiopeptiden beispielsweise bei somatostatinrezeptor-positiven neuroendokrinen Tumoren. Die Bestrahlung mit β -Emitter-markierten glykosylierten Peptidrezeptorliganden, wie z.B. ^{90}Y - und ^{177}Lu -DOTATOC (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic acid D-Phe¹-Tyr³-Octreotide (Otte et al., 1997)), wird vor allem in fortgeschrittenen Stadien eingesetzt (Ambrosini et al., 2011). Die Radioimmunkonjugate ^{90}Y -Ibritumomab-Tioxetan (Zevalin®) und ^{131}I -Tositumomab (Bexxar®) werden erfolgreich in der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen angewendet (Tomblyn, 2012).

Die Radionuklid-, Radiopeptid- und Radioimmuntherapie mit Alphaemittern, wie ^{225}Ac , ^{213}Bi , $^{212}\text{Bi}/^{212}\text{Pb}$, ^{211}At , ^{223}Ra oder ^{227}Th , wird in einer steigenden Anzahl experimenteller und klinischer Studien auf die Effektivität und Durchführbarkeit untersucht (Kim und Brechbiel, 2012).

Alphastrahler haben eine höhere zytotoxische Wirkung bzw. eine höhere RBE (3-7 (McDevitt et al., 1998)), da durch ihren hohen LET von ca. 100 keV/ μm (zum Vergleich: der LET von ^{90}Y beträgt 0.2 keV/ μm) eine ausgeprägtere und komplexere DNA-Schädigung hervorgerufen wird und diese nur unzureichend repariert werden kann. Durch eine Reichweite der Alphastrahlung von maximal 100 μm ist dieser Effekt fast nur auf das Zielgewebe beschränkt.

Als wichtiges Beispiel für eine Radionuklidtherapie mit Alphastrahlung ist das Alphapartikel emittierende Kalziumanalogon ^{223}Ra -Dichlorid (Alpharadin®) zu nennen, das zur Therapie von Knochenmetastasen bei hormonresistenten Prostatakarzinomen eingesetzt wird. ^{223}Ra -Dichlorid erwies sich in einer vor

Kurzem beendeten Phase-III-Studie als geeignet, um Krankheitssymptome am Skelettsystem herauszuzögern und das Gesamtüberleben um 30% zu verlängern (Parker et al., 2013). Daraufhin wurde Alpharadin im Mai 2013 in den USA zur klinischen Anwendung zugelassen.

Die bisherigen klinischen Studien zur Therapie mit Alphaemitter-Antikörper- bzw. Alphaemitter-Peptidkonjugaten verdeutlichen ebenfalls deren Potential für eine erfolgreiche und verbesserte Behandlung verschiedener Tumore. Hierbei werden Radionuklide an Antikörper bzw. Peptide gekoppelt, die selektiv an Tumorantigene binden. Metallische Alpha-Radionuklide werden durch geeignete Chelate, ^{211}At (ein Halogen) mittels Halogenierung an die Antikörper gebunden (Kim und Brechbiel, 2012; Mirzadeh et al., 1990).

Die Therapie mit dem Radioimmunkonjugat ^{213}Bi -cDTPA-9.2.27 MAb beim metastasierten Melanom erwies sich als nebenwirkungsarm und effektiv (Raja et al., 2007). Für die Behandlung von Gliomen zeigten Zalutsky et al. (2008), dass die Verabreichung von ^{211}At -markierten chimären 81C6 anti-Tenascin-Antikörpern in die Resektionszone von Gliomen praktikabel und sicher ist und einen viel versprechenden Antitumoreffekt erzeugt. Zudem wurde in einer klinischen Studie von Cordier et al. (2010) herausgefunden, dass die Injektion von ^{213}Bi -DOTA-Substanz P Radioimmunkonjugaten in kritisch lokalisierte, primär nicht resektable Gliome eine effektive Tumorreduktion bewirkt, wodurch diese resektabel werden und ihre Prognose verbessert wird. Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie erzeugte die kombinierte Gabe von Cytarabin und ^{213}Bi -Lintuzumab Remissionen bei akzeptablen Nebenwirkungen (Rosenblatt et al., 2010). Des Weiteren zeigten Andersson et al. (2009), dass durch die intraperitoneale Gabe von ^{211}At -MX35 F(ab')(2) bei Patienten mit Ovarialkarzinom eine ausreichende therapeutische Strahlendosis in Mikrometastasen ohne signifikante Gesamttoxizität erreicht werden kann (Andersson et al., 2009).

Aus den genannten klinischen Studien wird deutlich, dass bisher vor allem weit fortgeschrittene und disseminierte Erkrankungen mit der Alpha-Radioimmuntherapie behandelt werden. In Deutschland ist nach wie vor keine der bereits am Patienten untersuchten Alpha-Radioimmuntherapien für die klinische Routine zugelassen. Viele präklinische Studien zu anderen Tumorentitäten wie z.B. dem Magenkarzinom (Bloechl et al., 2005) oder dem Blasenkarzinom (Fazel et

al., 2011; Pfof et al., 2009) mit dem Ziel einer weiter reichenden Anwendung beispielsweise in soliden Tumoren (Dahle et al., 2007) wurden und werden aktuell durchgeführt.

2 Rationale und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung, verabreicht in Form von Alpha-Radioimmunkonjugaten, zu beweisen bzw. zu bestätigen. Dabei soll ein Ansatz gefunden werden, der die Mechanismen der Radioresistenzentwicklung berücksichtigt und potenziell klinisch anwendbar ist. Als Alphastrahler wurde ^{213}Bi eingesetzt, das bereits in verschiedenen klinischen Studien erfolgreich genutzt wurde (vergleiche 1.9), das eine kurze Halbwertszeit ($T_{1/2}$) besitzt und aufgrund seiner Photonenemission eine Szintigraphie am Patienten und eine einfache Aktivitätsmessung am γ -Counter ermöglicht. Als Zellentität für die experimentelle Arbeit eignen sich CAL33-HNSCC-Zellen, da bei Patienten mit HNSCC der Erfolg der Strahlentherapie durch Hypoxie beeinträchtigt wird (Nordsmark et al., 2005). Zudem sind HNSCC-Zellen durch eine Überexpression des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) charakterisiert (Tejani et al., 2010). Daher scheint hier eine Therapie mit Radioimmunkonjugaten, die den EGFR als Zielmolekül ansteuern, ein mögliches Therapiekonzept. Aus diesem Grund wurde die biologische Wirkung der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-Immunkonjugaten bzw. mit Photonen auf CAL33-Zellen von HNSCC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen verglichen, um die sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung zu bestätigen.

Des Weiteren sollen die Wirkmechanismen von Hoch- bzw. Niedrig-LET-Strahlung im Hinblick auf die Sauerstoffabhängigkeit, Strategien für die Therapie von hypoxischen Tumoren sowie die mögliche Anwendung einer gezielten Radionuklidtherapie mit Alphastrahlern bei hypoxischen soliden Tumoren diskutiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkulturmedien und Lösungen für die Zellkultur

RPMI 1640 Medium (w 2.0 g/l NaHCO ₃ , w 0.532 g/l Gluta- min)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom
PBS (phosphat bufferd saline)	Biochrom
Trypsin/EDTA-Lösung (0.05 % / 0.02 % (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom
Gefriermedium	Gibco BRL Invitrogen, Carlsbad, USA
Isotone Salzlösung (CASYton)	Schärfe System, Reutlingen, Deutsch- land
HEPES-Puffer	Biochrom
Zellproliferationsreagenz WST-1 (water soluble tetrazolium 1)	Roche, Mannheim, Deutschland
Stickstoff-Gasgemisch (95 % N ₂ , 5 % CO ₂)	SWF, Friedrichshafen, Deutschland

Zusammensetzung des Mediums für die CAL33 Zellen:

RPMI-Medium, 10 % FKS, 1 % NEA

3.1.2 Chemikalien, Kits und Antikörper

Nachweis von HIF-1 α :

Proteaseinhibitoren (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
Zellysepuffer MPER	Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA
CoCl ₂	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay (DYE Reagent Concentrate)	Bio-Rad Laboratories Incorporation, Hercules, USA
Rinderserumalbumin-(BSA-)Lösung (0.144 μ g/ μ l)	Sigma

Sodium Dodecyl Sulfat - Poly Acrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot:

Acrylamid (30%ig)	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS, 10%ig)	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	BioRad Laboratories Incorporation
TBS-Puffer (10x)	Biochrom
Tris-Glycin-SDS-Puffer (10x)	Carl Roth GmbH u. Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Puffer	Sigma
Tween® 20 (Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck
Farbmarker für das Molekulargewicht (Full Range Rainbow Molecular Weight Marker RPN800)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Probenpuffer (Roti-Load1)	Carl Roth GmbH u. Co. KG
Magermilchpulver (MMP)	Carl Roth GmbH u. Co. KG

PVDF-Membran	Millipore, Billerica, USA
Monoklonaler Anti-Human HIF-1- α IgG1 Antikörper von der Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fc-spezifischer Anti-Maus IgG von der Ziege gekoppelt mit einer alkalischen Phosphatase	Sigma
NBT (Nitro Blue Tetrazolium)	Sigma
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)	Sigma

Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE und den Western-Blot:

Probenpuffer:	100 mM Tris/HCl (pH 6.8) 4 % SDS 20 % Glycerin 2 % DTT 0.002 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	1.5 M Tris/HCl (pH 8.8) 0.4 % SDS
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris/HCl (pH 6.8) 0.4% SDS
Elektrophoresepuffer: (Tris-Glycin-SDS-Puffer)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.1 % SDS pH 8.3 - 8.4
Blottingpuffer:	20 mM Tris 150 mM Glycin 20 % Methanol pH 8.3 - 8.4
TBS-Puffer: (Tris buffered saline)	10 mM Tris/HCl (pH 7.5) 154 mM NaCl
TTBS-Puffer: (Tris buffered saline with Tween)	10 mM Tris/HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl 0.1 % Tween
AP-Puffer: (alkaline phosphatase buffer)	100 mM Tris/HCl (pH 9.5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂

Herstellung der ^{213}Bi -Radioimmunkonjugate:

PD-10 Säule (PD-10 columns)	GE Healthcare Europe GmbH
SCN-CHX-A"-DTPA	Macrocyclics, Inc., Dallas, USA
L-Ascorbinsäure (50 mg/ml; pH 5.5)	Sigma
Suprapur® 30%ige HCl (zur Herstellung von 0.1 M HCl / 0.1 M NaI Lösung und 0.01 M HCl Lösung)	Merck
Natrium-Iodid ACS Reagent (zur Herstellung von 0.1 M NaI Lö- sung)	Sigma
3 M Ammoniumacetat	Sigma
Chelatierungsharz Chelex 100 (Chelating-Resin (Iminodiacetic Acid) Chelex 100)	Sigma
Anti-EGFR-Antikörper (Matuzumab)	Merck
ITLC-Papier (ITLC™-SG Papier)	GE Healthcare Europe GmbH

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Zellkulturflaschen aus Polystyren, be- schichtet, steril verpackt (175 cm ² , 25 cm ²)	Cellstar greiner bio-one GmbH, Fri- ckenhausen, Deutschland
Well-Zellkulturplatten, beschichtet, ste- ril verpackt (24-Well, 96-Well)	Cellstar greiner bio-one GmbH
2ml Eppendorf-Schraubröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutsch- land
Messröhrchen für das Photometer (Küvetten)	VWR International bvba, Leuven, Bel- gien
Kunststoffröhrchen zur Messung der Aktivitätskonzentration	Eppendorf AG
Amicon Ultra-4 10K Filter	Millipore

3.1.4 Geräte

Brutschrank (Heraeus 6000)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop (Auflichtmikroskop Axiovert 10)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.2 S	Heraeus
Zellzählgerät (CASY-1)	Schärfe System
LaminAir® Flow Bank (HB 2472 Flow Bank)	Heraeus
Vakuumpumpe	Busch GmbH, Maulburg, Deutschland
Hypoxiekammer	Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München, Deutschland
Photometer (UVIKON 931)	Kontron Instruments, Mailand, Italien
ELISA-Reader	Behring Diagnostika, Frankfurt am Main, Deutschland
Kammer zur Gelherstellung	Hoefer Inc., Holliston, USA
Thermomixer (comfort)	Eppendorf AG
Elektrophorese-Kammer	Hoefer Inc.
Netzgerät (Model 1000/500)	Bio-Rad Laboratories Incorporation
Kühlungspumpe (MultiTemp 2)	Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden
Blottingapparatur	Hoefer Inc.
Gamma-Counter (1480 Wizard™ 3)	Wallac, Turku, Finnland
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Linearbeschleuniger (Varian Clinac DHX)	Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA

Milli-Q UF-Plus Membrapure (zur Herstellung von entionisiertem Wasser)	Millipore
Fotoapparat Canon Power Shot A80	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland

3.1.5 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem

$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem zur Gewinnung von ^{213}Bi (Institut für Transurane, Europäische Kommission, Karlsruhe)

3.1.6 Software

Tinn R Editor, Version 2.3.7.1 (GNU General Public Licence – GPL)

R, Version 2.12.2 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich)

Micrografx Designer, Version 7 (Micrografx Inc., Richardson, USA)

CoralDRAW Graphics Suite X6 (Coral Corporation, Ottawa, Kanada)

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zellen

Die HNSCC-Zelllinie CAL33 wurde vom Leibniz Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen. Sie entstammt einem vor der Therapie entfernten Fragment eines mäßig differenzierten squamösen Plattenepithelkarzinoms der Zunge eines neunundsechzigjährigen männlichen Patienten (Gioanni et al, 1988).

3.2.2 Morphologie

Die Morphologie, die bewachsene Fläche, die Dichte des Zellrasens und die Vitalität der Zellen wurden regelmäßig mikroskopisch überprüft und beurteilt. Die Abbildung 3.1 zeigt adhärente CAL33 Zellen in Kultur, die einen Tag zuvor ausgesät wurden und daher nur vereinzelt sichtbar sind. Abbildung 3.2 zeigt dieselben Zellen 2 Tage nach Aussaat. Die Zellen sind vital und bilden einen zunehmend dichteren Zellrasen. In Abbildung 3.3 nach 6 Tagen, ist die komplette Fläche bewachsen.

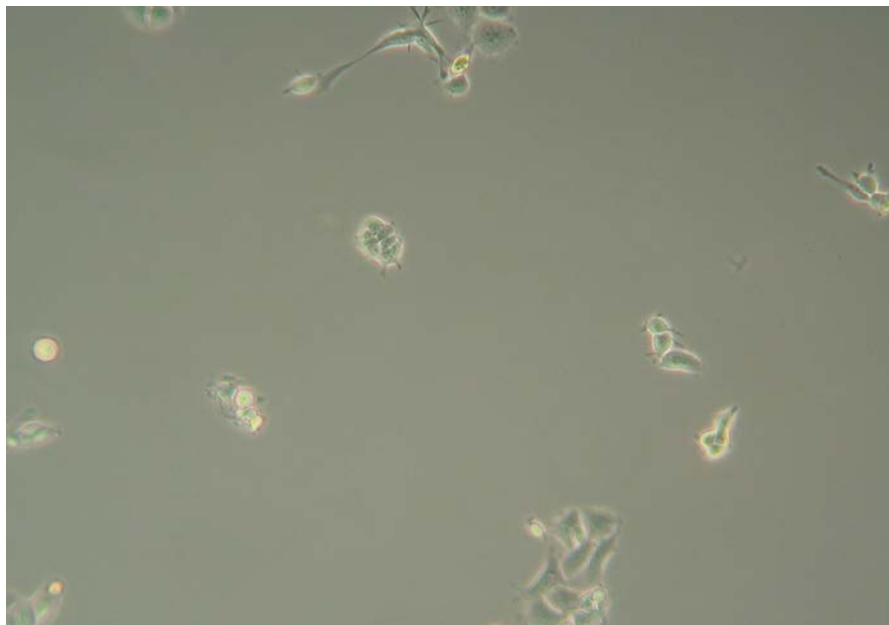


Abbildung 3.1: CAL33 Zellen einen Tag nach Aussaat, *Vergrößerung 200-fach*.

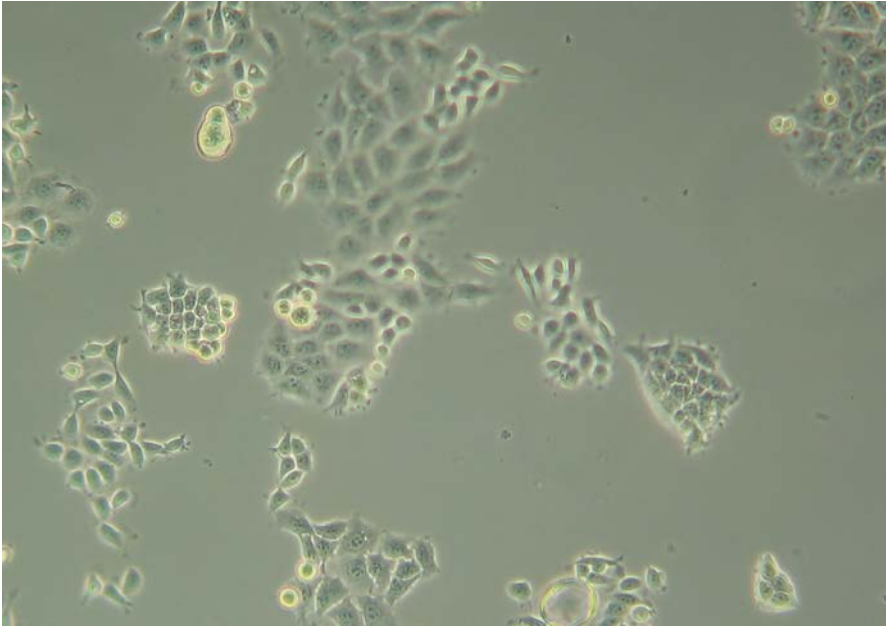


Abbildung 3.2: CAL33 Zellen 2 Tage nach Aussaat, *Vergrößerung 200-fach*.

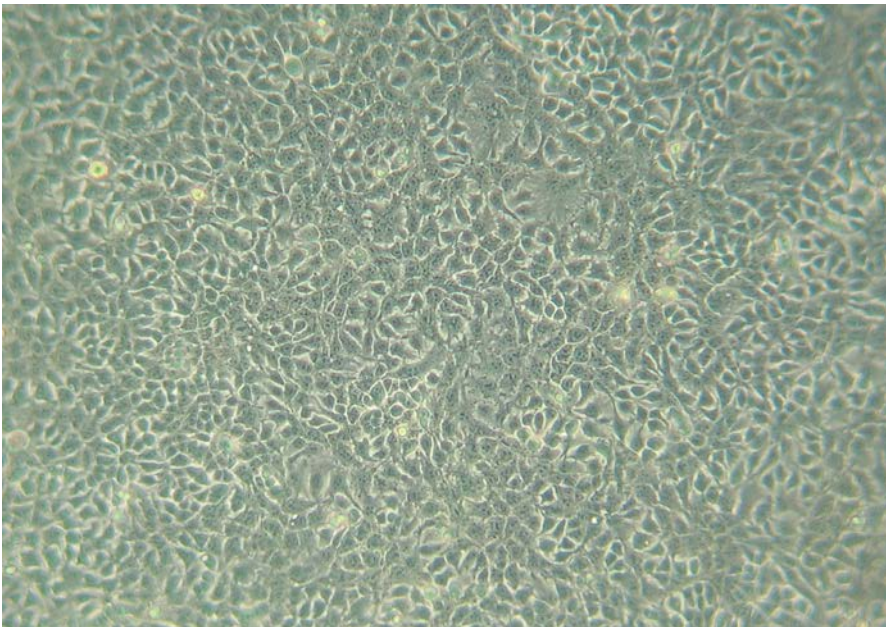


Abbildung 3.3: CAL33 Zellen 6 Tage nach Aussaat, *Vergrößerung 200-fach*.

3.2.3 Kultivierung der Zellen unter Normoxie – Normale Zellkulturbedingungen

Die normale Kultivierung der CAL33 Zellen erfolgte in RPMI-Nährmedium mit einem Zusatz von 10 % FKS und 1 % NEA im Brutschrank bei 37 °C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 95 % Luft und 5 % CO₂. Diese Bedingungen entsprechen der Normoxie bei den verschiedenen Experimenten.

3.2.4 Teilen, Ablösen und Zählen der Zellen

Alle Arbeitsschritte mit den CAL33 Zellen wurden unter einer LaminAir® Flow Bank, nach vorheriger Desinfektion mit Alkohol durchgeführt. Das Nährmedium und die verwendeten Lösungen wurden auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gespült, um altes Medium und Detritus zu entfernen. Danach wurden die Zellen je nach Größe der Zellkulturflasche (175 cm² bzw. 25 cm²) mit unterschiedlichen Mengen Trypsin/EDTA-Lösung (8 ml bzw. 1 ml) für 5 min - 10 min bei 37 °C inkubiert und mittels Klopfen abgelöst. Im Anschluss an den Ablösevorgang wurde Medium (8 ml bzw. 1 ml) zu den Zellen hinzugegeben, um die Trypsin/EDTA-Reaktion zu stoppen. Die Suspension wurde für 3 min bei 240 g (1200 rpm, Megafuge 1.0) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen im Pellet entsprechend der gewünschten Verdünnung resuspendiert. Für die unterschiedlichen Flaschen bzw. Well-Größen (175 cm²- bzw. 25 cm-Flasche und 24- bzw. 96-Well-Platte) wurden unterschiedliche Mengen an Medium (25 ml bzw. 4 ml und 1 ml bzw. 0.2 ml) verwendet. Bei gelblicher Verfärbung des Mediums aufgrund von Substratmangel bzw. Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte wurde das Medium gewechselt bzw. die Zellen wurden abgelöst und in neue Zellkulturgefäße umgesetzt. Der Zeitpunkt hierfür variierte entsprechend der ausgesäten Zellmenge.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Aliquots der Zellsuspension in isotoner Salzlösung verdünnt und die Zellzahl im Zellzählgerät ermittelt.

3.2.5 Kryokonservierung – Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um die CAL33 Zellen für einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurden die Zellen nach dem Ablösen und Zentrifugieren (240 g, 1200 rpm, Megafuge 1.0)

in 3 ml Gefriermedium resuspendiert und in 2 ml Eppendorf-Schraubröhrchen in einem Tank mit Flüssigstickstoff bei minus 196 °C tiefgefroren.

Zum Auftauen wurden die Eppendorf-Schraubröhrchen in einem 37 °C Wasserbad erwärmt. Nach Suspension in 24 ml Medium wurden die Zellen in eine 175 cm²-Zellkulturflasche gegeben. Nach 24 h waren die Zellen adhärent und das Medium wurde gewechselt. Abgestorbene Zellen und Gefriermedium wurden so entfernt. Das Wachstum der Zellen war bei regelmäßigem Mediumwechsel nach ca. 2 Passagen wieder normal.

3.2.6 Kultivierung der Zellen unter Hypoxie

Zunächst wurden die CAL33 Zellen in Zellkulturflaschen oder Multiwell-Kulturplatten ausgesät und über Nacht unter Normoxie inkubiert, um Adhärenz zu gewährleisten. Zur Anpassung an hypoxische Bedingungen wurden die Zellen in luftdichte Aluminium-Hypoxiekammern eingebracht. Die Hypoxiekammern wurden von der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München konstruiert und auf Dichtigkeit getestet. In 11 Zyklen, mit einer Dauer von je 2 min, wurden über eine Gasleitung, durch Absaugen der Raumluft mit einer Vakuumpumpe und Einleitung eines Gasgemisches aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ hypoxische Bedingungen erzeugt (Abbildung 3.7). Dabei wurde der Druck in der Kammer mit Hilfe eines Barometers kontinuierlich gemessen. Durch einen Überdruck von 1.3 bar wurde ein Eindringen von Sauerstoff von außen verhindert. Mögliche Lecks in der Kammer wären an fallendem Innendruck bemerkbar gewesen. Somit war sichergestellt, dass sich die Zellen tatsächlich unter Hypoxie befanden.

Der Sauerstoffpartialdruck im Medium betrug nach 9 min weniger als 10 mmHg (1 %), nach 22 min weniger als 5 mmHg (0.66 %) (Schilling et al., 2009; Schilling, 2009). Anschließend wurden die Zellen entsprechend den Experimenten für unterschiedliche Zeiten (bis zu 24 h) unter diesen Bedingungen bei 37 °C belassen. Der Beginn der Luftevakuierung wird nachfolgend als Zeitpunkt nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen bezeichnet.

3.3 Bestimmung der Verdopplungszeit und der optimalen Proliferationsbedingungen anhand mikroskopischer Beobachtung unter Normoxie

Um ideale Voraussetzungen für die Bestrahlungsexperimente zu schaffen, wurden zunächst in Vorversuchen die optimalen Proliferationsbedingungen für die CAL33 Zellen untersucht. Die Proliferationsgeschwindigkeit und Verdopplungszeit sind zelllinienspezifisch. Sie wurden mikroskopisch anhand der bewachsenen Fläche und Dichte des Zellrasens in den 175cm²-Zellkulturflaschen bestimmt.

3.4 Evaluation der Proliferationsbedingungen unter Hypoxie und möglicher Einflussfaktoren anhand mikroskopischer Beobachtung

Der Einfluss der Hypoxiedauer, der Ausgangszellzahl und der möglichen Schädigung der CAL33 Zellen durch Stoffwechselprodukte im Medium wurde unter dem Mikroskop in Vorversuchen untersucht. Hierfür wurden dicht bewachsenen (volle) 175cm²-Zellkulturflaschen mit insgesamt 20×10^6 Zellen gesplittet und in 25cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen unter Hypoxie und zur Kontrolle unter Normoxie inkubiert. Die verschiedenen Einflussfaktoren wurden wie folgt variiert.

3.4.1 Dauer der Hypoxie

Das Zellwachstum wurde nach Inkubation für unterschiedliche Zeiten unter hypoxischen Bedingungen (3 h, 6 h und 24 h sowie 2 × 3 h und 2 × 24 h) unter dem Mikroskop, direkt nach Entnahme aus der Hypoxiekammer und in den folgenden Tagen beobachtet.

3.4.2 Ausgangszellzahl

Weil das Proliferationspotenzial nach Inkubation unter Hypoxie von der ausgesäten Zellzahl pro Fläche abhängen kann, wurden verschiedene Verdünnungsstufen (1:10, 1:20, 1:40) der Gesamtzellmenge von 20×10^6 Zellen untersucht.

3.4.3 Schädigung durch Stoffwechselprodukte im Medium

Um eine Schädigung der Zellen durch eine Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte bzw. durch Laktat aus der anaeroben Glykolyse unter Hypoxie auszuschließen, wurde das Zellwachstum mit und ohne Mediumwechsel beobachtet. Dabei wurde das Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vor bzw. nach der Hypoxie) ausgetauscht. Durch einen pH-abhängigen Indikator im Medium war eine Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte durch einen Farbumschlag von rot nach gelb sichtbar.

Zudem wurden die Auswirkungen einer Zugabe von HEPES-Puffer, der eine pH-Änderung durch saure Stoffwechselprodukte verhindern soll, analysiert. HEPES ist ein organischer Puffer und besitzt im physiologischen Bereich eine Pufferkapazität in einem pH-Bereich von 7.2 bis 7.6. HEPES eignet sich für Zellkultursysteme mit hoher Proliferation und hoher Zelldichte. Vor der Zugabe zum Medium wurde der Puffer mit NaOH auf einen pH von 7.2 eingestellt. Die Konzentration von HEPES-Puffer betrug nach Vermischung von 10 ml HEPES und 500 ml Medium 20 mM.

3.5 Detektion des Hypoxiemarkers HIF1 α mittels Western Blot

Sowohl die hypoxischen Bedingungen als auch die Anpassung des Zellmetabolismus an diese Bedingungen wurden anhand der Stärke des HIF-1 α -Signals im Western Blot zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation unter Hypoxie nachgewiesen. Um die zunehmende Anpassung der Zellen an die Hypoxie zu beobachten, wurde das HIF-1 α -Signal direkt nach Inkubation von 2×10^6 CAL33 Zellen in 25cm²-Zellkulturflaschen für 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h und 24 h unter hypoxischen Bedingungen analysiert. Zudem wurde das HIF-1 α -Signal direkt nach 2×3 -stündiger Hypoxie, unterbrochen von einer 10-minütigen Phase unter normoxischen Bedingungen, ausgewertet, um den Hypoxiestatus der CAL33 Zellen entsprechend dem Bestrahlungsprotokoll für ²¹³Bi-Anti-EGFR-MAb (vergleiche Kap. 3.11) zu bestimmen. Die Geschwindigkeit der HIF-1 α -Degradation bzw. die Normalisierung des Zellmetabolismus in CAL33 Zellen, die für 3 h unter Hypoxie inkubiert worden waren, wurde 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min und 180 min nach Beendigung der Hypoxie und Inkubation unter normoxischen Bedingungen ermittelt.

3.5.1 Negativ- und Positivkontrolle

Als Negativkontrolle wurde das HIF-1 α -Signal von CAL33 Zellen verwendet, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Um eine Positivkontrolle zu erhalten, wurden 2×10^6 CAL33 Zellen in 25cm²-Zellkulturflaschen für 5 h mit 4 ml Medium mit einem Zusatz von 200 μ M CoCl₂ inkubiert. Es ist dokumentiert, dass CoCl₂ die HIF-1 α -Expression induziert. Dabei beeinflusst Co²⁺ die Produktion von ROS, die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase und den MAPK-Signalweg und steigert auf diese Weise die HIF-1 α -Expression (Triantafyllou et al., 2006).

3.5.2 Proteinextraktion

Zu den jeweiligen Analysezeiten wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die verbliebenen Überreste durch zweimaliges Spülen mit 4 ml PBS entfernt. Die 2×10^6 CAL33 Zellen wurden durch Zugabe von 857 μ l des Zelllysepuffers M-PER lysiert. Der Zusatz von 143 μ l Proteaseinhibitoren verhinderte eine Degradation der Proteine. Bei einer Gesamtflüssigkeitsmenge von 1000 μ l war der Zellrasen ausreichend bedeckt und eine Verdünnung von 1:7

der Stammlösung der Proteaseinhibitoren gewährleistet. Unter Klopfen wurden die Zellen innerhalb von 5 min lysiert und vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurde das Lyseprodukt auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 g (15000 rpm, Rotor 22.50, Varifuge 3.2 S, Temp. 4 °C) für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugieren bei 2970 g (3200 rpm, Rotor 4.500, Varifuge 3.2 S, Temp. 4 °C) für 18 min mit Amicon Ultra-4 10K Filtern konzentriert.

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten wurden nach dem Prinzip von Bradford (1976) bestimmt. Um eine Standardgerade für die Extinktion im Photometer in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu erstellen, wurden PBS, eine Rinderserumalbumin-Lösung (BSA-Lösung), der M-PER Puffer und der Bio-Rad Protein Assay in unterschiedlichen Anteilen, wie in Tabelle 3.1 angegeben, in 7 verschiedenen Messröhrchen zusammengefügt. Die BSA-Lösung diente als Standard. Mit verschiedenen Mengen der BSA-Lösung (Proteinkonzentration von 0.144 µg/µl) wurden steigende Proteinkonzentrationen je Messröhrchen in einem Bereich von 0 µg/µl bis 11.52 µg/µl hergestellt. Dabei korreliert die Extinktion im Photometer mit der Farbänderung, die mit dem Bio-Rad Protein Assay abhängig von der Proteinkonzentration hervorgerufen wird. Die Beimischung des M-PER Puffers erfolgte, um eine entsprechende Konzentration in den Zelllysaten zu berücksichtigen.

Für die Proteinbestimmung wurden die Zelllysate in einem Verhältnis von 1:10 in PBS verdünnt. 0.005 ml dieser Verdünnung wurden mit 0.795 ml PBS und 0.2 ml Bio-Rad Protein Assay in je 2 Probenröhrchen vermischt. Die Extinktion der Probenröhrchen wurde im Photometer zweimalig nach 10 min und 15 min gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten erfolgte unter Verwendung der Gleichung für die Standardgerade und unter Berücksichtigung der Verdünnung der Zelllysate.

Tabelle 3.1: Volumina der Substanzen zur Erstellung einer Standardgeraden für die Bestimmung der Proteinkonzentration.

		Messröhrchen						
		1 (Leerwert)	2	3	4	5	6	7
Substanz [ml]	Bio-Rad Protein Assay	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
	M-PER	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
	PBS	0,78	0,775	0,77	0,76	0,74	0,72	0,70
	BSA	0,00	0,005	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08
Gesamtvolumen [ml]		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Proteinmenge [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]		0,00	0,72	1,44	2,88	5,76	8,64	11,52

Bei jeder Messung der Zelllysate wurde eine neue Standardgerade erstellt, um mögliche externe Einflüsse auszuschließen. Die Ergebnisse einer exemplarischen Proteinbestimmung aller Proben und die zugehörige Standardgerade sind im Anhang dargestellt (Kap. 7.1, Tabelle 7.2, Tabelle 7.3 und Abbildung 7.1).

3.5.4 Natrium Dodecyl Sulfat - Poly Acrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Zelllysate erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) in einer Elektrophorese-Kammer (Kühlung auf 10 °C) mit einem 4%igen Sammelgel und einem 8%igen Trenngel bei 20 mA und 400 V.

Aus den Zelllysaten wurden Proben mit einem Gesamtvolumen von 25 μl und einer Proteinmenge von insgesamt 47,47 μg hergestellt. Hierzu wurden 6,25 μl Probenpuffer mit verschiedenen Volumina der einzelnen Zelllysate, entsprechend ihrer Proteinkonzentration, gemischt. Die fehlende Flüssigkeitsmenge wurde durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ergänzt. Die Proben wurden im Thermomixer bei 95 °C für 6 min denaturiert. Nach 5-minütiger Abkühlung wurden die Proben für 2 min bei 6340 g (9000 rpm, Biofuge 13) zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Elektrophoresegels aufgetragen und aufgetrennt. Zur Erkennung des Molekulargewichts der einzelnen Banden wurde zudem in jedem Elektrophoreseegel eine Lösung aufgetragen, die aus 5 μl eines Farbmärkers für das Molekulargewicht, 15 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und 5 μl Probenpuffer bestand.

Die Gele für die SDS-PAGE wurden in einer Kammer zur Gelherstellung gegossen und konnten nach 24 h verwendet werden. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels ist der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.

10 ml Sammelgel:	30 ml Trenngel:
1.33 ml Acrylamid (30%ig)	8 ml Acrylamid (30%ig)
2.5 ml Sammelgelpuffer	7.5 ml Trenngelpuffer
6.1 ml H ₂ O _{dest.}	14.2 ml H ₂ O _{dest.}
0.1 ml APS (10%ig)	0.3 ml APS (10%ig)
0.01 ml TEMED	0.03 ml TEMED

3.5.5 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden im Western Blot in einer Blottingapparatur (Kühlung auf 10 °C) mit Blottingpuffer bei 200 mA und 200 V über 2 h auf eine PVDF-Membran transferiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der PVDF-Membran für 1 h in 100 ml TTBS-Puffer mit 5 % MMP blockiert. Für den HIF-1 α -Nachweis wurde die Membran zunächst mit dem primären Antikörper (monoklonaler Anti-Human HIF-1- α IgG1 Antikörper von der Maus) in einer Verdünnung von 1:500 in TTBS-Puffer mit 0.1 % MMP für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 30 ml TTBS-Puffer mit 0.1 % MMP für je 10 min wurde die PVDF-Membran mit dem sekundären Antikörper (Fc-spezifisches Anti-Maus IgG von der Ziege gekoppelt mit einer alkalischen Phosphatase) in einer Verdünnung von 1:5000 in 30 ml TTBS-Puffer mit 0.1 % MMP für 1 h inkubiert. Danach wurde die PVDF-Membran nochmals dreimalig mit 30 ml TTBS-Puffer für je 10 min gewaschen. Die kolorimetrische Darstellung der HIF-1 α -Bande erfolgte nach Inkubation mit 30 ml AP-Puffer für 3 min durch eine Farbreaktion mit 66 μ l NBT, 33 μ l BCIP und 10 ml AP-Puffer über 24 h unter Lichtausschluss.

Die nachfolgend beschriebenen Tests, der Klonogene-Test zur Bestimmung des klonogenen Überlebens und der WST-Test zur Bestimmung der Zellvitalität, sind die entscheidenden Verfahren zur Quantifizierung der Strahlenwirkung. Ihre Beschreibung ist den Kapiteln 3.9 bis 3.12, die die Bestrahlungsversuche erläutern, vorangestellt, da diese Verfahren auch zur Messung des Einflusses der Hypoxie (Kap. 3.8) verwendet wurden.

3.6 Klonogener-Test zur Bestimmung des klonogenen Zellüberlebens

Der Klonogene-Test nach Puck und Markus (1956) misst das klonogene Überleben bzw. die Klonogenität, d. h. die Fähigkeit der Zellen sich zu teilen. Dabei werden apoptotische Zelluntergänge, die bis zum Zeitpunkt der Messung auftreten, mit einbezogen (Franken et al., 2006; Brown und Attardi, 2005). Obwohl ein Verlust der Teilungsfähigkeit nicht bedeutet, dass die Zelle abgestorben ist (Held, 1997), wird klonogenes Überleben in der Literatur i. d. R. mit allgemeinem Überleben gleichgesetzt, d. h. dass eine Zelle, die keine Klone mehr produziert, als abgestorben angesehen wird (Munshi et al., 2005). Der Klonogene-Test hat sich in der Forschung als einer der grundlegenden in vitro Tests zur Evaluation der Wirkung einer Bestrahlung oder eines Chemotherapeutikums etabliert (Hoffman, 1991).

In dieser Arbeit wurde der Klonogene-Test herangezogen, um die Zytotoxizität der Bestrahlung zu quantifizieren und um die Auswirkungen der Normoxie und der Hypoxie zu vergleichen.

Für den Test wurden je Well einer 24-Well-Platte 100 bzw. 200 CAL33 Zellen und 1 ml Medium aufgetragen. Klone bestehend aus ca. 50 Zellen wurden nach 4.5 d mikroskopisch mit einem Raster ausgezählt.

Die geeignete Zellzahl pro Well wurde in Vorversuchen ermittelt. Dabei mussten bei der Auswertung folgende Bedingungen beachtet werden: Die Klone sollten aus ca. 50 Zellen bestehen. Die Zuordnung der Zellen zu den Klonen sollte eindeutig möglich sein. Die Klone sollten untereinander nicht konfluieren. Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen wurden verschiedene Zellzahlen getestet, um nach 4.5 d in 24-Well-Platten entsprechende Klone auszählen zu können. Als geeignet erwies sich eine Zellzahl von 100 oder 200 Zellen pro Well sowohl für normoxische als auch für hypoxische Bedingungen. Als Beispiel ist die mikroskopische Aufnahme eines Klones 4.5 d nach Aussaat von 100 Zellen pro Well in Abbildung 3.4 dargestellt.



Abbildung 3.4: Mikroskopisches Bild eines Klons 4.5 d nach Aussaat von 100 Zellen pro Well.

3.7 WST-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

Für die kolorimetrische Bestimmung der Zellvitalität bzw. metabolischen Aktivität wurde der WST-Test mit dem Zellproliferationsreagenz WST-1 verwendet. Der Farbstoff WST-1, ein Tetrazoliumsalz wird von der mitochondrialen Dehydrogenase in vitalen Zellen in Formazan umgewandelt. Die Farbänderung kann mit Hilfe eines Multiwell-Spektrophotometers (ELISA-Reader) bei 440 nm quantifiziert werden und spiegelt die Zellvitalität bzw. metabolische Aktivität der Zellen wieder.

Je Well einer 96-Well-Platte wurden 10000 Zellen und 0.2 ml Medium aufgetragen. 3.5 d nach der Bestrahlung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und durch 0.1 ml frisches Medium ersetzt. 10 μ l des Zellproliferationsreagenzes WST-1 wurden dazugegeben. Für die Leerwertbestimmung wurden dieselben Flüssigkeitsmengen ohne Zellen verwendet. Nach 1.5 h Inkubationszeit wurde die Absorption bzw. Extinktion, die mit der Zahl vitaler Zellen korreliert, mit dem ELISA-Reader bei 440 nm gemessen.

Die geeignete Zellzahl pro Well wurde ebenfalls in Vorversuchen ermittelt. Der Messbereich, in dem zuverlässige Ergebnisse mit dem ELISA-Reader erzielt werden können, liegt zwischen Extinktionswerten von 0 und 2. Um die Strahlenwirkung auf die Zellen adäquat zu erfassen, wurde daher eine Extinktion von

etwa 1.5 als optimal für die nicht bestrahlten Kontrollen angesehen. Die Auswertung sollte aus arbeitszeitlichen Gründen nach 3.5 d erfolgen. Eine Zellzahl von 10000 Zellen pro Well erfüllte diese Vorgaben sowohl für normoxische als auch für hypoxische Bedingungen am besten. Die Ergebnisse sind tabellarisch im Anhang dargestellt (Kap. 7.1, Tabelle 7.1).

3.8 Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie

Der Einfluss der Hypoxie auf das klonogene Zellüberleben bzw. die Zellvitalität wurde mit dem Klonogenen- bzw. dem WST-Test (vergleiche Kap. 3.6 und 3.7) quantitativ evaluiert. Die CAL33 Zellen wurden entsprechend der Dauer der Normoxie und Hypoxie in den Bestrahlungsprotokollen (vergleiche Kap. 3.11 und 3.12) inkubiert. Es ergaben sich 3 Versuchsarme:

	<u>gemäß:</u>
- 2 × 3 h Hypoxie, unterbrochen von einer 10-minütigen Phase unter normoxischen Bedingungen	Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb
- 6 h Hypoxie	Bestrahlung mit Photonen
- 6 h Normoxie	Kontrollen beider Bestrahlungsprotokolle

Für den Klonogenen-Test wurden 100 Zellen pro Well ausgesät, für den WST-Test 10000 Zellen pro Well. Die Auswertung erfolgte nach 4.5 d für den Klonogenen- und nach 3.5 d für den WST-Test. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsarme wurden untereinander auf der Basis verschiedener statistischer Tests verglichen (vergleiche Kap. 3.13).

3.9 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem

Das für die Herstellung der Alpha-Radioimmunkonjugate zur nachfolgenden Bestrahlung verwendete ^{213}Bi wurde aus einem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem gewonnen.

3.9.1 Aufbau

Das $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem wurde vom Institut für Transurane des Joint Research Center der Europäischen Kommission bezogen. Es besteht aus einer Fluorpolymer-Säule (5.5 cm x 0.64 cm), in der im sauren Milieu (1.5 M HCl) ^{225}Ac an das Kationen-Austauschharz AGMP-50 gebunden ist. Über einen Polyethylenschlauch kann ^{213}Bi aus dem Generatorsystem eluiert werden. Dabei befindet sich das gebundene ^{225}Ac im Bereich des zuführenden Schlauchs der Säule. Darüber liegendes nicht radioaktives AGMP-50, an das abgelöstes ^{225}Ac binden kann, verhindert die Auswaschung von ^{225}Ac bei der Elution von ^{213}Bi (vergleiche Abbildung 3.5) (Apostolidis et al., 2005; Zielinska et al., 2007). Die Zerfallsschema von ^{225}Ac und ^{213}Bi ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

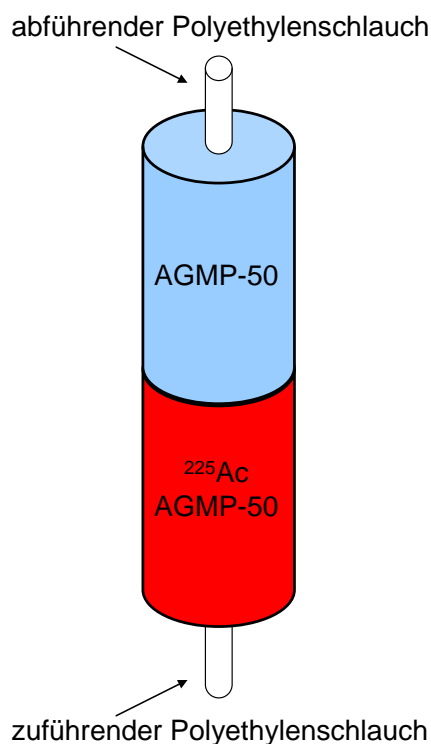


Abbildung 3.5: Aufbau des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystems.

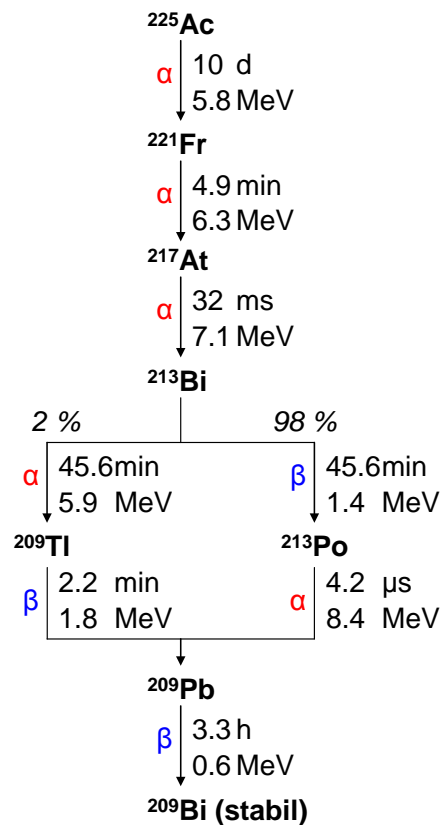


Abbildung 3.6: Zerfallsschema von ^{225}Ac und ^{213}Bi (angegeben sind Zerfallsart, Halbwertszeit und Energie).

3.9.2 Elution von ^{213}Bi

Die Reagenzien wurden für jeden Generator neu hergestellt und mit dem Chelatierungsharz Chelex 100 von Metallen gereinigt, um eine Fehlchelatisierung zu vermeiden. 2 h vor der Elution wurde der Generator mit 0.01 M HCl gespült. Zur Elution von ^{213}Bi als $(\text{BiI}_4)^-$ / $(\text{BiI}_5)^{2-}$ wurden über den zuführenden Polyethylen-schlauch 600 μl einer 0.1 M HCl / 0.1 M NaI Lösung mit einer Durchflusszeit von 2 min durch die Säule gepumpt (Zielinska et al., 2007; Apostolidis et al., 2005).

3.9.3 Markierung des Antikörpers Matuzumab mit ^{213}Bi

Um die ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb-Radioimmunkonjugate zur Bestrahlung der Zellen herzustellen, wurde ^{213}Bi mit einem Chelator an den Antikörper Matuzumab konjugiert, der spezifisch an den EGFR auf der Zelloberfläche der Tumorzellen bindet (Anti-EGFR-MAb).

Der ^{213}Bi -Chelator SCN-CHX-A"-DTPA wurde gemäß Mirzadeh et al. (1990) mit Hilfe von metallfreien Pufferlösungen an den Anti-EGFR-MAb konjugiert. Zum Elutionsprodukt wurden 100 μl L-Ascorbinsäure (50 mg/ml; pH 5.5) zur Radioprotektion des Antikörpers und 100 μl 3 M Ammoniumacetat zum Puffern des pH bei ca. 5.3 hinzugegeben. Dieser ^{213}Bi -Lösung (800 μl) wurden 100 μg des Anti-EGFR-MAb-SCN-CHX-A"-DTPA-Konjugats beigefügt. Die resultierende Lösung wurde für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei lagerte sich ^{213}Bi in Form des Bi^{3+} -Ions in das an den Antikörper gekoppelte SCN-CHX-A"-DTPA Chelat ein. Um die Reinheit des ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb-Produkts zu erhöhen, wurde freies ^{213}Bi mittels Größentrennungs-Chromatographie (Gelfiltration) über eine PD-10 Säule entfernt. Hierzu wurde das Volumen des Markierungsansatzes mit 1.7 ml PBS auf 2.5 ml erhöht und auf die PD-10 Säule pipettiert. Anschließend wurden die ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb-Immunkonjugate mit 2 ml PBS aus der PD-10 Säule von freiem ^{213}Bi abgetrennt (Zielinska et al., 2007; Apostolidis et al., 2005).

3.9.4 Markierungsausbeute und Bestimmung der Aktivitätskonzentration

Die Markierungsausbeute der Anti-EGFR-MAb wurde mittels ITLC (instant thin-layer chromatography) vor und nach der Reinigung über die PD-10 Säule bestimmt (Nikula et al., 1995). Vor der Zugabe von 1.7 ml PBS in den Markierungsansatz wurden hierzu 10 μl aus dem Ansatz entnommen und in 990 μl PBS verdünnt (1:100). Je 2 μl der Verdünnung wurden in ein Kunststoffröhrchen mit 500 μl PBS (Messprobe E_{γ}) bzw. auf ITLC-Papier pipettiert. Darauf folgend wurde bei der ITLC mit 0.05 M Trinatriumcitrat-Laufpuffer (pH 5.5) freies ^{213}Bi (mobile Phase, Messprobe E_E) von gebundenem ^{213}Bi (stationäre Phase, Messprobe E_A) getrennt. Analog wurden nach der Reinigung ebenfalls 10 μl aus dem Ansatz entnommen und die Messproben E_{γ} , E_A und E_E hergestellt. Die Aktivitäten von E_{γ} , E_A , E_E , P_{γ} , P_A und P_E wurden mit Hilfe des γ -Counters bestimmt.

Mit den Aktivitäten ließen sich die Markierungseffizienz nach der Markierung ($M = E_A/(E_A+E_E) \times 100$ [%]), die radiochemische Reinheit nach Gelfiltration ($R = P_A/(P_A+P_E) \times 100$ [%]) und der AK-Verlust bei der Gelfiltration ($V = (1 - P_A/P_E) \times 100$ [%]) berechnen.-

Die Aktivitätskonzentration ($c[A]$ in kBq/ml) ergab sich aus P_γ und dem Gesamtvolumen des Ansatzes. Die Veränderung der Aktivitätskonzentration in Abhängigkeit von der Zeit (t) ließ sich mit Hilfe des Zerfallsgesetzes und der Halbwertszeit von ^{213}Bi ($T_{1/2} = 45.6$) bestimmen ($c[A](t) = c[A]_0 \times \exp(-\ln 2 \times t/T_{1/2})$).

3.10 Bindung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen

Um die Bindung der ^{213}Bi -Anti-EGFR-Immunkonjugate an die CAL33 Zellen zu untersuchen, wurden 3×10^6 Zellen in 0.5 ml Medium mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (ca. 37 kBq, 40 ng Anti-EGFR-MAb) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 0.5 ml PBS wurden die Zellen durch Zentrifugieren bei 240 g (1200 rpm, Megafuge 1.0) vom Überstand getrennt. Danach wurde das Zellpellet erneut mit 0.5 ml PBS gewaschen. Die Aktivitäten der Überstände (ungebundene ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb) und des Pellet (gebundene ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb) wurden im γ -Counter gemessen. Die Aktivität des Zellpellet, d.h. die Aktivität der gebundenen ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb wurde in Prozent der zugegebenen Gesamtaktivität berechnet. Die verwendete Methode wurde von Nikula et al. (1999) beschrieben und nach Huber et al. (2003b) modifiziert.

3.11 Bestrahlung der CAL33 Zellen mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Die CAL33 Zellen wurden in 24-Well-Platten (200 Zellen pro Well) bzw. in 96-Well-Platten (10000 Zellen pro Well) für die Verwendung im Klonogenen-Test bzw. im WST-Test ausgesät (vergleiche Kap. 3.6 und 3.7). Zunächst konnten sie über Nacht unter normoxischen Bedingungen adhären. Um den Stoffwechsel der Zellen an die Hypoxie anzupassen, wurden die Zellen vor der Bestrahlung für 3 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Innerhalb von 10 min nach Entnahme der Zellen aus der Hypoxiekammer wurde ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb in Konzentrationen von 9.25 kBq/ml bis 1480 kBq/ml hinzugegeben. Zellen, die nicht mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb behandelt wurden, dienten als Kontrollen. Anschließend wurden die Zellen nochmals für 3 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Bis zur Messung der Zellvitalität und des klonogenen Zellüberlebens wurden die Zellen unter normoxischen Bedingungen gelagert. Die Behandlung der CAL33 Zellen mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Normoxie

wurde, abgesehen von der Verwendung der Hypoxiekammer, analog durchgeführt.

In allen Bestrahlungsexperimenten wurden für jede Aktivitätskonzentration von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb und ebenso für die unbehandelten Kontrollen je 6 Ansätze, d.h. 6 Wells für den Klonogenen-Test, und je 12 Ansätze, d.h. 12 Wells für den WST-Test, hergestellt.

Der geeignete Bereich der Aktivitätskonzentrationen von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb wurde in Vorversuchen bestimmt. Dabei wurde die Aktivitätskonzentration ermittelt, bei der im Klonogenen-Test keine Klone mehr auszählbar waren und ab der im WST-Test keine Absorptionsänderung mehr feststellbar war. Entsprechend den Ergebnissen, die im Anhang (Kap. 7.1) in Tabelle 7.4 und Tabelle 7.5 dargestellt sind, wurden für den Klonogenen-Test die Aktivitätskonzentrationen 9.25 kBq/ml, 18.5 kBq/ml, 37 kBq/ml, 74 kBq/ml, 185 kBq/ml und 370 kBq/ml gewählt. Im WST-Test wurden die Aktivitätskonzentrationen 37 kBq/ml, 92.5 kBq/ml, 185 kBq/ml, 370 kBq/ml, 740 kBq/ml, 1110 kBq/ml und 1480 kBq/ml eingesetzt.

3.12 Bestrahlung der CAL33 Zellen mit Photonen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

4.5×10^6 CAL33 Zellen wurden in 25cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät und konnten über Nacht adhären. Die 25cm^2 -Zellkulturflaschen wurden in die Aluminiumkammern eingebracht und unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Nach 3h wurden die hypoxischen Zellen in der Kammer von außen mit Photonen aus einem Linearbeschleuniger (Varian Clinac DHX) mit Dosen von 0.5 Gy bis 12 Gy (nominelle Photonenenergie 6 MeV) bestrahlt. Die Einstellungen des Linearbeschleunigers wurden gemäß der Dosimetrie (Kap. 3.12.2) konfiguriert. Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, wurden die 25cm^2 -Zellkulturflaschen in 3 Ebenen auf einem Holzgestell, getrennt durch Bleiplatten mit einer Dicke von 1.3 cm angeordnet. Mit Hilfe der Bleiplatten wurden die Bestrahlungsdosen jeweils um die Hälfte reduziert. Die Zellen konnten so während eines Bestrahlungsexperimentes mit 3 verschiedenen Dosen bestrahlt werden (0.5 Gy, 1 Gy und 2 Gy oder 3 Gy, 6 Gy und 12 Gy). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 3 h in der Aluminiumkammer unter hypoxischen Bedingungen belas-

sen. Die Kontrollen, d. h. hypoxische Zellen, die nicht bestrahlt wurden, befanden sich parallel zu den bestrahlten Zellen ebenfalls für 6 h unter Hypoxie. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und in 96-Well-Platten (10000 Zellen pro Well) bzw. in 24-Well-Platten (100 Zellen pro Well) transferiert und unter normoxischen Bedingungen bis zur Messung im WST-Test bzw. Klonogenen-Test belassen.

Um gleichartige Bedingungen zu schaffen, wurde die Bestrahlung normoxischer CAL33 Zellen mit Photonen ebenso in der Aluminiumkammer durchgeführt, allerdings ohne hypoxische Bedingungen zu erzeugen. Die zeitliche Abfolge der Zellbehandlung und die Prozessierung der normoxischen Zellen erfolgten analog zu den hypoxischen.

In allen Bestrahlungsexperimenten wurden für jede Dosis und für die unbestrahlten Kontrollen je 6 Ansätze, d. h. 6 Wells für den Klonogenen-Test, und je 12 Ansätze, d. h. 12 Wells für den WST-Test, hergestellt.

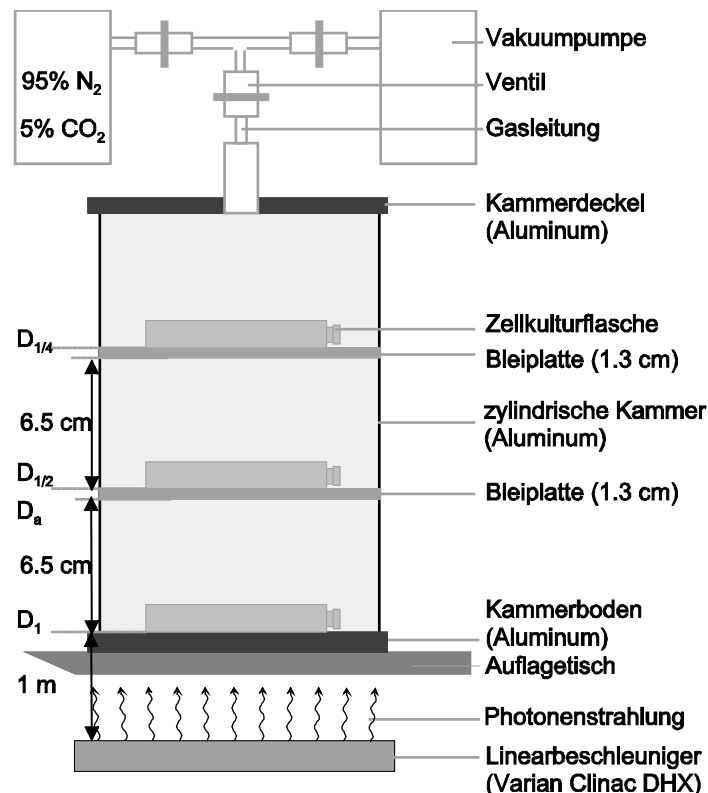


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Vorrichtung zur Photonenbestrahlung der CAL33 Zellen in der Aluminium-Hypoxiekammer.

3.12.1 Konstruktion des Holzgestells mit Bleiplatten

Der Linearbeschleuniger der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologischen Onkologie der Technischen Universität München war aufgrund des klinischen Einsatzes in der Patiententherapie nur eingeschränkt nutzbar. Da zudem nur 3 Hypoxiekammern zur Verfügung standen, wurde ein Holzgestell mit Bleiplatten konstruiert, mit dem eine gleichzeitige Bestrahlung der Zellen mit 3, jeweils um die Hälfte reduzierten Dosen durchgeführt werden konnte. Vergleiche hierzu Abbildung 3.7.

Die Details des Aufbaus ergeben sich aus folgenden Überlegungen. Bei einer Gesamthöhe der Hypoxiekammer von ca. 25 cm und dem Ziel, die Kammer in drei Bereiche etwa gleicher Größe aufzuteilen, wird eine erste Bleiplatte zur Minderung der Strahlendosis in einem Abstand von 6.5 cm von der Bodenplatte der Kammer entfernt platziert. Wird auf der Bodenplatte eine Dosis D_1 gemessen, so bestimmt sich die Strahlendosis D_a unterhalb der genannten Bleiplatte gemäß dem folgenden Abstandsgesetz:

$$D_a = D_1 \times (r_1/r_a)^2 \quad . \quad (\text{Gl. 3})$$

Im vorliegenden Fall sind r_1 und r_a durch die Abstände des Kammerbodens bzw. der Unterseite der ersten Bleiplatte von der Photonenquelle des Linearbeschleunigers gegeben. Bei der vorliegenden Konfiguration gilt $r_1=1$ m und demzufolge $r_a=1.065$ m.

Die Dosis $D_{1/2}$, die oberhalb der ersten Bleiplatte herrscht, ergibt sich aus der Dosis D_a gemäß dem folgenden Absorptionsgesetz:

$$D_{1/2} = D_a \times \exp(-\mu \cdot d) \quad , \quad (\text{Gl. 4})$$

wobei μ den Absorptionskoeffizienten und d die Dicke der Bleiplatte bezeichnet. Eine Minderung der Dosis $D_{1/2}$, die sich aus dem um die Dicke der Bleiplatte erhöhten Abstand von der Quelle ergibt, kann unter den gegebenen Voraussetzungen gegenüber der Reduktion der Dosis durch Absorption vernachlässigt werden. Der Absorptionskoeffizient μ ist mit der so genannten Halbwertsdicke $d_{1/2}$ der Bleiplatte wie folgt verknüpft:

$$\mu = \frac{\ln 2}{d_{1/2}} \quad . \quad (\text{Gl. 5})$$

Setzt man die Gleichungen 3 und 5 in Gleichung 4 ein und löst die resultierende Beziehung nach der Dicke d der Bleiplatte auf, so ergibt sich

$$d = d_{1/2} / \ln 2 \times \ln \left(D_1 / D_{1/2} \times (r_1 / r_a)^2 \right) \quad . \quad (\text{Gl. 6})$$

Verlangt man, dass die Dosis $D_{1/2}$, die auf die zweite Zellkulturflasche wirkt, halb so groß ist wie die Dosis D_1 , die auf die erste Zellkulturflasche trifft, muss gelten:

$$D_{1/2} / D_1 = 0.5 \quad . \quad (\text{Gl. 7})$$

Berücksichtigt man, dass die Halbwertsdicke $d_{1/2}$ des verwendeten Bleis 1.6 cm beträgt, so ergibt sich für die Dicke d , mit der die Beziehung 6 erfüllt wird:

$$d = 1.3 \text{ cm} \quad . \quad (\text{Gl. 8})$$

Die zweite Bleiplatte wird ihrerseits im Abstand von 6.5 cm von der ersten Bleiplatte entfernt platziert. Sie soll die Dosis $D_{1/4}$, die auf die dritte Zellkultur einwirkt, auf ein Viertel der ursprünglichen Dosis D_1 reduzieren. Aus dieser Forderung ergibt sich analog zur obigen Rechnung für die zweite Bleiplatte eine Dicke von ca. 1.3 cm.

3.12.2 Dosimetrie und Einstellung des Linearbeschleunigers

Die Dosimetrie und Einstellung des Linearbeschleunigers wurde unter Anleitung von Herrn Dipl.-Phys. Benjamin Terjung durchgeführt. Entsprechend dem kreisförmigen Boden der Hypoxiekammer wurde ein rundes Bestrahlungsfeld mit einem Durchmesser von 14 cm festgelegt. Die Entfernung des Bodens der Hypoxiekammer zur Photonenquelle wurde auf 1 m eingestellt. Bei einer Dosisrate von 600 Monitor Units/min und einer nominellen Photonenenergie von 6 MeV wurde das Gerät auf Dosen von 2 Gy bzw. 12 Gy am Boden der Hypoxiekammer kalibriert. Hierzu wurde ein Dosimeter am Boden der Hypoxiekammer befestigt. Die Einstellungen wurden gespeichert und konnten bei folgenden Bestrahlungsversuchen abgerufen und verwendet werden. Die Dosisreduktion mit Hilfe der Bleiplatten wurde für jede Bestrahlung ebenfalls mit dem Dosimeter überprüft und bestätigt.

3.13 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Programme Tinn R Editor und R verwendet. In die statistischen Berechnungen zu den Bestrahlungsversuchen sind mindestens je 5 unabhängige Experimente eingegangen. Für den Klonogenen-Test wurden je Dosis- bzw. Aktivitätskonzentrationsstufe 6 Einzelwerte pro Experiment gemessen. Beim WST-Test wurden je 12 Einzelwerte erhoben.

Um die Ergebnisse der Experimente unter Normoxie und Hypoxie zu vergleichen, wurden ein klassischer t-Test nach Welsh (Fahrmeir, 2004; Rüger, 2002), sowie ein Parameterstest auf den Regressionsparameter $\beta = 0$ in einem generalisierten linearen gemischten Modell (GLMM) (McCullagh und Neuhaus, 2005) verwendet. Der t-Test nach Welsh untersucht, ob sich die Mittelwerte in zwei unabhängigen Experimentalgruppen statistisch signifikant unterscheiden. Dabei geht man davon aus, dass die Varianzen in beiden Gruppen unbekannt sind. Hier wurden die Mittelwerte von klonogenem Zellüberleben und Zellvitalität unter Normoxie und Hypoxie verglichen. Als Nullhypothese wurde der Fall angenommen, dass die Mittelwerte in beiden Gruppen gleich sind. Um diese Hypothese entweder annehmen oder zugunsten der Alternativhypothese (Mittelwert unter Normoxie ungleich Mittelwert unter Hypoxie) verwerfen zu können, wurde als Prüfgröße eine standardisierte Differenz der Mittelwerte (mittlere Differenz; MD) herangezogen. Für den Vergleich der Kontrollen wurde zudem eine Varianzanalyse (Fahrmeir, 2004; Rüger, 2002) durchgeführt, da hier ein Mittelwertvergleich in drei Gruppen erforderlich ist. Damit lässt sich ermitteln, ob sich die Gruppen untereinander, in diesem Fall das klonogene Zellüberleben bzw. die Zellvitalität unter 6 h Normoxie, 2 × 3 h Hypoxie (unterbrochen von einer 10-minütigen normoxischen Pause; Hypoxie 3 h + 3 h) und 6 h Hypoxie, statistisch signifikant unterscheiden. Insofern stellt die Varianzanalyse eine Generalisierung des t-Tests dar. Das GLMM berücksichtigt zudem unterschiedliche äußere Bedingungen, die unter Umständen bei den verschiedenen Experimenten auftreten können, durch die Aufnahme der Experimentnummer als zufälligen Effekt. Durch die Zuordnung der in einem Experiment erhaltenen Messwerte zu einer Experimentnummer ist die Berücksichtigung externer Einflüsse, die möglicherweise zu veränderten Messergebnissen zwischen den Experimenten führen, gewährleistet. Um den verschiedenen Eigenschaften der Zielgrößen gerecht zu werden, wurden verschiedene Verteilungsannahmen für das klonogene

Zellüberleben und die -vitalität getroffen. Für die Anzahl der Klone wurde eine Quasi-Poisson-Verteilung, eine Erweiterung der Poisson-Verteilung als klassische Zähldatenverteilung, angenommen. Der Unterschied zur Poisson-Verteilung besteht darin, dass der bedingte Erwartungswert der Zielgröße nicht gleich der entsprechenden bedingten Varianz sein muss. In der Praxis ist die Varianz meist größer (man spricht hier von Überdispersion), so dass die Annahme einer Quasi-Poisson-Verteilung eine realistischere Varianzschätzung und damit adäquate Konfidenzintervalle liefert (McCullagh und Nelder, 1989). Für die Zellvitalität, die eine kontinuierliche Variable ist, wurde dem Standard entsprechend eine Normalverteilung angenommen. In beiden Fällen wurde eine logarithmische Linkfunktion verwendet, um den bedingten Erwartungswert der Zielgröße mit den Kovariablen (genauer gesagt dem linearen Prädiktor, einer Linearkombination aus Kovariablen und Regressionskoeffizienten) zu verbinden und zudem der Nicht-Negativität der Antwortvariablen Rechnung zu tragen. Dementsprechend kann der Exponent desjenigen Modellkoeffizienten, der die Sauerstoffkonzentration repräsentiert, als relatives Risiko (RR) zwischen Normoxie und Hypoxie interpretiert werden (Das klonogene Überleben ist unter Normoxie $\exp(\beta)$ - bzw. RR-fach höher als unter Hypoxie). Das Signifikanzniveau wurde gemäß der allgemein anerkannten Konvention auf $\alpha = 0.05$ festgesetzt.

Für die Beurteilung der Signifikanz wurde geprüft, ob der so genannte p-Wert kleiner ist als das vorgegebene Signifikanzniveau. Ist dies der Fall, sind die Ergebnisse signifikant. Der p-Wert ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, unter Gültigkeit der Nullhypothese einen in Richtung der Alternative extremen Prüfgrößenwert als den beobachteten zu erhalten. Der bei der Varianzanalyse angegebene $\Pr(>F)$ entspricht dem p-Wert. Zusätzlich wurden 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) berechnet. Das 95%-Konfidenzintervall gibt ein Vertrauensintervall an, das einen Bereich um den geschätzten Wert eines Parameters einschließt, in dem zu 95%iger Wahrscheinlichkeit der Parameter liegt. Ist in den Konfidenzintervallen der mittleren Differenz der Wert 0 nicht enthalten, so ist der Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie signifikant. Für das relative Risiko im GLMM wurden das approximative Konfidenzintervall und das Konfidenzintervall nach der Delta-Methode bestimmt (Held, 2008). Das approximative Konfidenzintervall berücksichtigt nicht die Verzerrung die durch die Exponential-

transformation entsteht. Man nutzt jedoch aus, dass die Exponentialfunktion in der Nähe des Funktionswertes 1 annähernd linear verläuft, sodass sich trotz der Verzerrung eine gute Näherung ergibt. Das Konfidenzintervall nach der Δ -Methode berücksichtigt die Exponentialtransformation, indem ein korrigierter Standardfehler berechnet wird. Ist in diesen Konfidenzintervallen für das relative Risiko der Wert 1 nicht enthalten, so ist der Unterscheid zwischen Normoxie und Hypoxie signifikant.

3.13.1 Berechnung der OER

Der OER für das klonogene Zellüberleben und die Zellvitalität wurde entsprechend Gleichung 1 berechnet. Hierfür wurden die Mittelwerte der ausgezählten Klone im Klonogenen-Test bzw. der Absorptionswerte im WST-Test aus allen Bestrahlungsexperimenten herangezogen. Da gemäß der Definition des OER der gleiche biologische Effekt (d. h. die gleiche Klonzahl bzw. der gleiche Extinktionswert) vorausgesetzt wird, ist für seine Berechnung aus den gemittelten diskreten Messwerten eine Interpolation erforderlich. Der Einfachheit halber wurde eine lineare Interpolation zwischen den vorliegenden Mittelwerten vorgenommen. Anhand der so interpolierten Funktionsverläufe wurden die Strahlungsdosen bestimmt, die unter Normoxie und Hypoxie auf einem diskreten Stützstellenraster dieselben Klonzahlen bzw. Absorptionswerte hervorrufen. Aus den resultierenden Werten für den OER wurden sein Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Mikroskopische Beobachtungen der Zellproliferationsbedingungen und der Verdopplungszeit unter Normoxie

Nach dem Ablösen, Teilen und der neuen Aussaat waren die Zellen nach 1 d adhären. Ein Wachstum konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht beobachtet werden. Anhand der bewachsenen Fläche der 175cm²-Zellkulturflaschen und der Dichte der Zellen, die während der standardmäßigen Kultivierung der Zellen mikroskopisch beobachtet wurden, wurde ab dem ersten Tag nach Zellsplittung eine Verdopplungszeit von ca. 24 h festgestellt.

4.2 Mikroskopische Beobachtungen der Proliferationsbedingungen unter Hypoxie und mögliche Einflussfaktoren

4.2.1 Dauer der Hypoxie

Eine Inkubation von 2×10^6 Zellen pro 25cm²-Zellkulturflasche (Verdünnung 1:10) für 24 h bzw. 2×24 h unter Hypoxie bewirkte ein Absterben der CAL33 Zellen. Direkt nach der Hypoxie waren die Zellen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle geschrumpft und teilweise vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst (Abbildung 4.1). Nach einem Tag hatten sich weitere Zellen gelöst. Nach 2 Tagen waren praktisch keine adhärenen bzw. lebenden Zellen mehr vorhanden.

Nach 3-, 2×3 - und 6-stündiger Hypoxie konnten im Mikroskop zu keinem Beobachtungszeitpunkt Unterschiede im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen beobachtet werden (Abbildung 4.2).

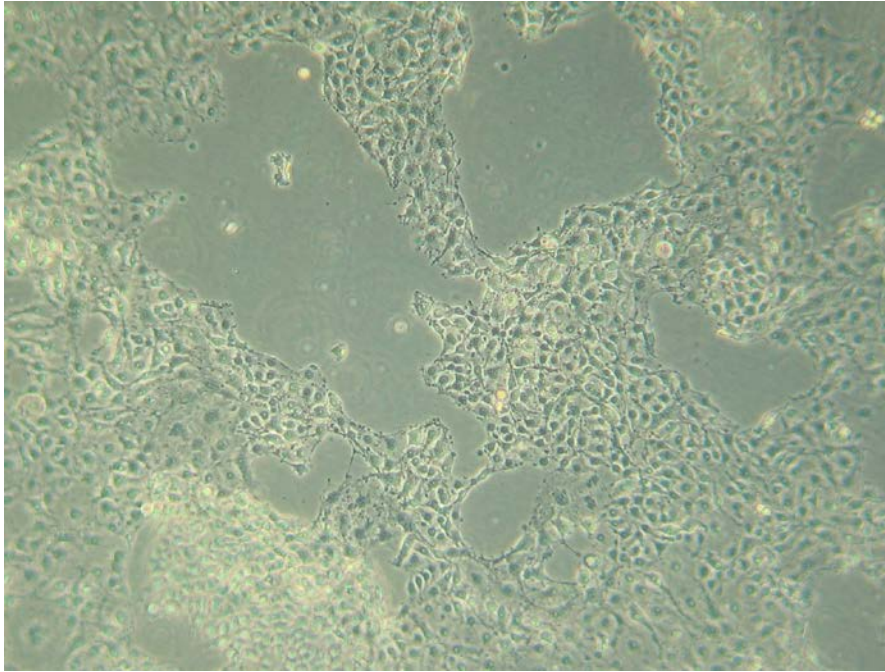


Abbildung 4.1: Mikroskopisches Bild der CAL33 Zellen direkt nach 24 h Hypoxie (Anmerkung: Im unteren linken Bildrand sind abgelöste Zellen deutlich zu erkennen).

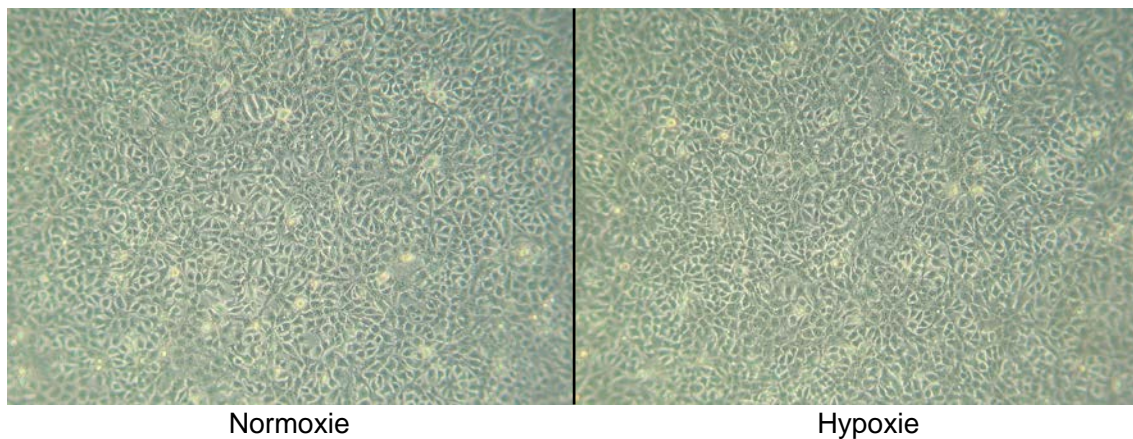


Abbildung 4.2: Mikroskopisches Bild der CAL33 Zellen nach 6 h Hypoxie bzw. Normoxie.

4.2.2 Ausgangszellzahl

Die Veränderung der Ausgangszellzahl pro 25cm^2 -Zellkulturflasche machte sich folgendermaßen bemerkbar: Nach einer Dauer von 24 h bzw. 2×24 h Hypoxie starben bei einer Verdünnung von 1:10 (2×10^6 Zellen pro 25cm^2 -

Zellkulturflasche) alle Zellen. Mit zunehmender Verdünnungsstufe, d.h. mit einer geringeren Zellzahl pro Zellkulturflasche bzw. Mediumvolumen stieg die Überlebensrate der Zellen. Bei der niedrigsten Verdünnung von 1:40 (0.5×10^6 Zellen pro 25cm^2 -Zellkulturflasche) wurden am wenigsten abgelöste Zellen beobachtet. Trotzdem waren die Überlebens- und Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle sichtbar reduziert.

Bei Zellen, die für 3 h, 2 × 3 h und 6 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden, war weder zwischen den Verdünnungsstufen untereinander noch zwischen den Verdünnungsstufen und deren normoxischen Kontrollen ein mikroskopischer Unterschied hinsichtlich Überlebens- und Wachstumsrate feststellbar.

4.2.3 Schädigung durch Stoffwechselprodukte im Medium

Nach 24-stündiger Hypoxie war ein deutlicher Farbumschlag von rot nach gelb, als Zeichen eine Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte, sichtbar. Für kürzere Inkubationszeiten (3 h, 2 × 3 h und 6 h) unter hypoxischen Bedingungen war dies nicht der Fall.

Durch einen regelmäßigen Wechsel des Mediums konnten bei einer 24-stündigen bzw. 2 × 24-stündigen Hypoxiedauer höhere Zellüberlebensraten erzielt werden als ohne Mediumwechsel. Nach der Hypoxie war zwar ein Großteil der Zellen abgelöst, trotzdem waren noch adhärente Zellen vorhanden. Für die 2 × 24-stündige Hypoxie war die zeitliche Abfolge: Mediumwechsel – Hypoxie – Mediumwechsel – Hypoxie – Mediumwechsel, am effektivsten, um höhere Zellüberlebensraten zu erzielen.

Bei den kürzeren Inkubationszeiten von 3 h, 2 × 3 h und 6 h unter Hypoxie konnte durch einen regelmäßigen Mediumwechsel kein Vorteil hinsichtlich einer höheren Zellproliferationsrate und einem höheren Zellüberleben beobachtet werden.

Die Zugabe des HEPES-Puffers zu hypoxischen Zellen erwies sich nicht als vorteilhaft. Eine Farbänderung des Mediums, als Indikator einer Ansäuerung, trat trotz HEPES-Zusatz auf. Im Mikroskop zeigten sich nach Inkubation unter Hypoxie (6 h bzw. 24 h) mehr abgelöste, d. h. abgestorbene Zellen als bei Zel-

len ohne HEPES-Zusatz. Für normoxische Zellen, die mit bzw. ohne HEPES-Puffer inkubiert wurden, waren keine Unterschiede feststellbar.

4.3 Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie

Um die Konsequenzen einer Inkubation unter hypoxischen Bedingungen auf das klonogene Zellüberleben (Klonogener-Test) bzw. die Zellvitalität (WST-Test) zu evaluieren, wurden die CAL33 Zellen entsprechend der Dauer der Hypoxie bei der Bestrahlung mit Photonen (Hypoxie 6 h) und der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (Hypoxie 3 h + 3 h) inkubiert. Die Ergebnisse wurden dem klonogenen Zellüberleben und der Zellvitalität von Zellen, die sich für 6 h unter Normoxie befanden, gegenübergestellt (vergleiche Kap. 3.8). Mittels Varianzanalyse, t-Test und GLMM wurden die Ergebnisse für die 3 Versuchsarme statistisch verglichen.

Die Mittelwerte für die Zahl der Klone im Klonogenen-Test betragen nach 4.5 d für Normoxie ca. 64 Klone (Standardabweichung (SD) = 8,13), für 6-stündige Hypoxie ca. 61 Klone (SD = 8,31) und für 2 × 3-stündige Hypoxie, unterbrochen von einer 10-minütigen Phase unter normoxischen Bedingungen (3 h + 3 h), ca. 63 Klone (SD = 10,26). Hinsichtlich des klonogenen Zellüberlebens war in allen statistischen Tests kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsarmen festzustellen. Die Hypoxie hatte, verglichen mit der Normoxie, keinen Effekt auf das klonogene Zellüberleben. Die Inkubation unter den beiden verschiedenen hypoxischen Bedingungen, entsprechend den Bestrahlungsprotokollen, ergab ebenfalls keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse im Klonogenen-Test (Tabelle 4.1, Einzelmesswerte siehe Anhang Kap. 7.1, Tabelle 7.6).

Dagegen war die Zellvitalität zum Analysezeitpunkt nach 3.5 d zwischen allen 3 Versuchsarmen unterschiedlich. Sowohl zwischen den 2 Versuchsarmen für die Inkubation unter Hypoxie und dem Versuchsarm unter Normoxie als auch zwischen den beiden Versuchsarmen unter Hypoxie war ein signifikanter Unterschied ($\text{Pr}(>F) = 0.000$) für die gemessene Extinktion im WST-Test feststellbar. Nach Inkubation für 2 × 3 h unter Hypoxie, unterbrochen von einer 10-minütigen Phase unter normoxischen Bedingungen, war der Extinktionswert im Mittel um

0.22 ($p = 0.000$), nach Inkubation für 6 h unter Hypoxie um 0.09 ($p = 0.043$) im Vergleich zur Inkubation unter Normoxie verringert. Das heißt, dass die Zellvitalität zum Messzeitpunkt nach 3.5 d durch die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen verglichen mit der Inkubation unter normoxischen Bedingungen reduziert war. Zwischen den beiden Versuchsarmen unter Hypoxie betrug der Unterschied der Extinktionswerte im Mittel 0.13 ($p = 0.000$), mit höheren Werten bei dem Versuchsarm für 6-stündige Hypoxie (Tabelle 4.2, Einzelmesswerte siehe Anhang Kap. 7.1, Tabelle 7.7).

Tabelle 4.1: Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie. Dargestellt sind die Ergebnisse des Klonogenen-Tests in Form von Mittelwerten der Klonzahl, deren SD und der statistische Vergleich (Varianzanalyse, T-Test und GLMM).

	Normoxie	Hypoxie 3 h + 3 h	Hypoxie 6 h
Mittelwert der Klonzahl (SD)	64,22 (8,13)	60,69 (8,31)	62,50 (10,26)

		Vergleich Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h
Varianzanalyse	Pr (>F)	0,2615

		Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h	Normoxie vs. Hypoxie 6 h	Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h
t-Test	95%-CI	-0,3916 ; 7,4472	-2,6957 ; 6,1402	-6,2604 ; 2,6493
	MD	3,5278	1,7222	1,8056
	p-Wert	0,0769	0,4392	0,4214

		Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h	Normoxie vs. Hypoxie 6 h	Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h
GLMM	95%-CI	0,8958; 0,9989	0,9224; 1,0277	0,9744; 1,0873
	RR	0,9459	0,9736	1,0293
	p-Wert	0,0585	0,3388	0,3093

Tabelle 4.2: Quantitativer Vergleich der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie. Dargestellt sind die Ergebnisse des WST-Tests in Form von Mittelwerten der Extinktion, deren SD und der statistische Vergleich (Varianzanalyse, T-Test und GLMM). Signifikante Unterschiede sind farblich hervorgehoben.

	Normoxie	Hypoxie 3 h + 3 h	Hypoxie 6 h
Mittelwert der Extinktion (SD)	1,32 (0,33)	1,10 (0,21)	1,23 (0,18)

		Vergleich Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h
Varianzanalyse	Pr (>F)	0,0000

		Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h	Normoxie vs. Hypoxie 6 h	Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h
t-Test	95%-CI	0,1279 ; 0,30944	0,0027 ; 0,1786	-0,1927 ; -0,0633
	MD	-0,2186	-0,0906	0,128
	p-Wert	0,0000	0,0434	0,0001

		Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h	Normoxie vs. Hypoxie 6 h	Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h
GLMM	95%-CI	0,8857; 0,9185	0,9390; 0,9728	1,0401; 1,0795
	RR	0,9020	0,9558	1,0596
	p-Wert	0,0000	0,0000	0,0000

4.4 Detektion des Hypoxiemarkers HIF-1 α

Um den Hypoxiestatus der CAL33 Zellen und deren Anpassung an die Hypoxie zu beobachten, wurde die Stärke des HIF-1 α -Signals nach Western-Blot und kolorimetrischer Darstellung auf einer PVDF-Membran zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen analysiert.

Nach einer Zeit von 30 min unter Hypoxie war HIF-1 α erstmals detektierbar. Mit zunehmender Hypoxiedauer nahm die Stärke des HIF-1 α -Signals bis zu einem Maximum nach 3 h unter Hypoxie zu. Nach 6 h Hypoxie (entsprechend der Bestrahlung mit Photonen) und nach 2 \times 3 h Hypoxie, unterbrochen von einer 10-minütigen Phase unter normoxischen Bedingungen (entsprechend der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAB; Spur 3 h + 3 h in Abbildung 4.3) war jeweils ein ähnlich starkes HIF-1 α -Signal feststellbar. Demnach war der Stoffwechsel der Zellen zu diesen Zeitpunkten an die Hypoxie angepasst. Nach 24 h waren die Zellen abgestorben und HIF-1 α konnte nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 4.3).

In normoxischen Zellen, der Negativkontrolle, war das HIF-1 α -Signal im Western Blot nicht detektierbar (Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4, Spur Kontrolle). Nach Inkubation von CAL33 Zellen mit CoCl₂, der Positivkontrolle, war ein deutliches HIF-1 α -Signal sichtbar (Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4, Spur CoCl₂).

Das HIF-1 α -Signal nahm in CAL33 Zellen, die für 3 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden, nach Beendigung der Hypoxie und Inkubation unter normoxischen Bedingungen stetig ab. 5 min nach Beendigung der Hypoxie war das Signal bereits reduziert. Nach 15 min war noch ein schwaches HIF-1 α -Signal sichtbar. Nach 30-minütiger Inkubation unter Normoxie war im Western Blot fast kein HIF-1 α -Signal mehr zu sehen. Nach 180 min war es verschwunden (Abbildung 4.4).

Die Ergebnisse zur Detektion des Hypoxiemarkers HIF-1 α belegen, dass die Bestrahlung unter hypoxischen Bedingungen erfolgte (vergleiche Kap. 5.6).

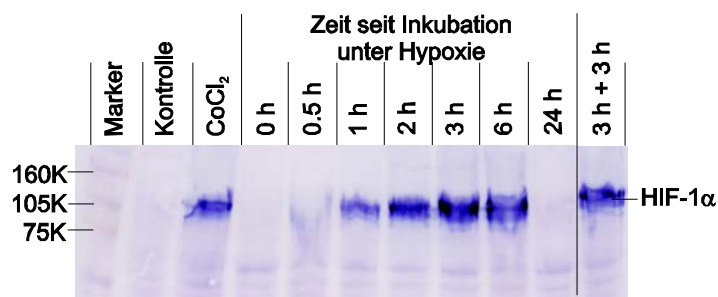


Abbildung 4.3: HIF-1 α -Signal in CAL33 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten seit Beginn der Inkubation unter Hypoxie.

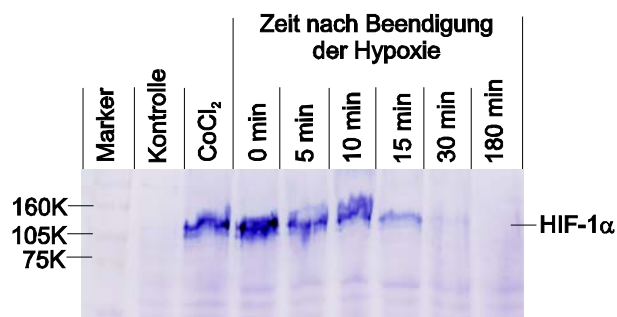


Abbildung 4.4: HIF-1 α -Signal in CAL33 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beendigung einer 3-stündigen Hypoxie und Inkubation unter normoxischen Bedingungen.

4.5 Markierung von Anti-EGFR-MAb und Bindung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen

Die Markierungseffizienz nach der Markierung der Anti-EGFR-MAb mit ^{213}Bi betrug im Mittel ca. 96 % (SD = 1). Durch die Reinigung über die PD-10 Säule konnte die radiochemische Reinheit, d. h. der prozentuale Anteil des an den Anti-EGFR-MAb gebundenen ^{213}Bi , auf ca. 98 % (SD = 0.5) erhöht werden. Der Antikörperverlust bei der Reinigung betrug im Mittel ca. 10.3 % (SD = 5.2). Es war durchschnittlich jeder 1099te Antikörper mit ^{213}Bi markiert (SD = 295) (vergleiche Anhang, Kap. 7.1, Tabelle 7.8).

74.0 % (SD = 4.7) der ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb banden an die CAL33 Zellen (Zellzahl: 3×10^6 Zellen; Aktivität ca. 37 kBq; 40 ng Anti-EGFR-MAb) (vergleiche Anhang, Kap. 7.1, Tabelle 7.9).

4.6 Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie

Die Anzahl der Klone, die das klonogene Zellüberleben widerspiegeln, nahm mit steigenden Dosen der Photonenstrahlung sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen ab (Abbildung 4.5 B). Jedoch war das klonogene Überleben von CAL33 Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen bestrahlt wurden, nach dem GLMM bei jeder Strahlendosis signifikant größer als das klonogene Überleben von CAL33 Zellen, die unter normoxischen Bedingungen bestrahlt wurden (Abbildung 4.6 B). Schon bei der niedrigsten Dosis von 0.5 Gy war das klonogene Zellüberleben unter Normoxie mit im Mittel 71.15 Klonen (SD = 18.92) geringer als das unter Hypoxie mit 76.17 Klonen (SD = 22.51). Bei einer Dosis von 6 Gy konnten unter Hypoxie (36.23 Klone; SD = 13.83) mehr als doppelt so viele Klone ausgezählt werden wie unter Normoxie (14.31 Klone; SD = 9.31). Bei der höchsten Photonendosis (12 Gy) waren unter normoxischen Bedingungen praktisch alle Zellen abgestorben. Die mittlere Zahl der Klone betrug 0.08 (SD = 0.28). Dagegen konnten unter hypoxischen Bedingungen im Mittel noch 12.26 Klone (SD = 5.84) ausgezählt werden (Abbildung 4.5 B, Tabelle 4.3 B).

Entsprechend der Bestrahlung mit Photonen nahm die Zahl der Klone mit steigender ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb Aktivitätskonzentration für Zellen, die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen bestrahlt wurden, ab. Im Gegensatz zur Photonenbestrahlung war dabei die Zahl der Klone unter Normoxie und Hypoxie nicht signifikant unterschiedlich. Bei den niedrigen Aktivitätskonzentrationen bis 37 kBq/ml nahm das klonogene Überleben rapide ab. Die mittlere Klonzahl von 154.33 (SD = 34.05) bzw. 157.83 (SD = 38.02) für die unbestrahlten Kontrollen unter Normoxie bzw. Hypoxie sank auf 15.80 (SD = 6.16) bzw. 18.75 (SD = 7.93) bei einer Aktivitätskonzentration von 37 kBq/ml. Nach einer Behandlung mit einer Aktivitätskonzentration von 74 kBq/ml bzw. 185 kBq/ml betrug die Zahl der Klone 5.31 (SD = 3.13) bzw. 0.97 (SD = 1.08) für Normoxie und 5.83 (SD = 4.24) bzw. 1.28 (SD = 1.03) für Hypoxie. Bei 370 kBq/ml waren sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen alle Zellen abgestorben (Klonzahl = 0; SD = 0; d. h. keine Klone mehr vorhanden) (Abbildung 4.5 A und Tabelle 4.3 A).

Die unterschiedlichen Werte für die Klonzahlen der unbestrahlten Kontrollen (Aktivitätskonzentration 0 kBq/ml bzw. Dosis 0 Gy) bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (Normoxie: 154.33 Klone, Hypoxie: 157.83 Klone) bzw. der Bestrahlung mit Photonen (Normoxie: 78.62 Klone, Hypoxie: 66.52 Klone) sind den unterschiedlichen Ausgangszellzahlen von 200 bzw. 100 Zellen pro Well geschuldet (Abbildung 4.5 und Tabelle 4.3). Diese waren aufgrund der beobachteten Proliferation für die mikroskopische Auszählung im Klonogenen-Test nach der jeweiligen Bestrahlung zweckmäßig (vergleiche Kap.5.6.3).

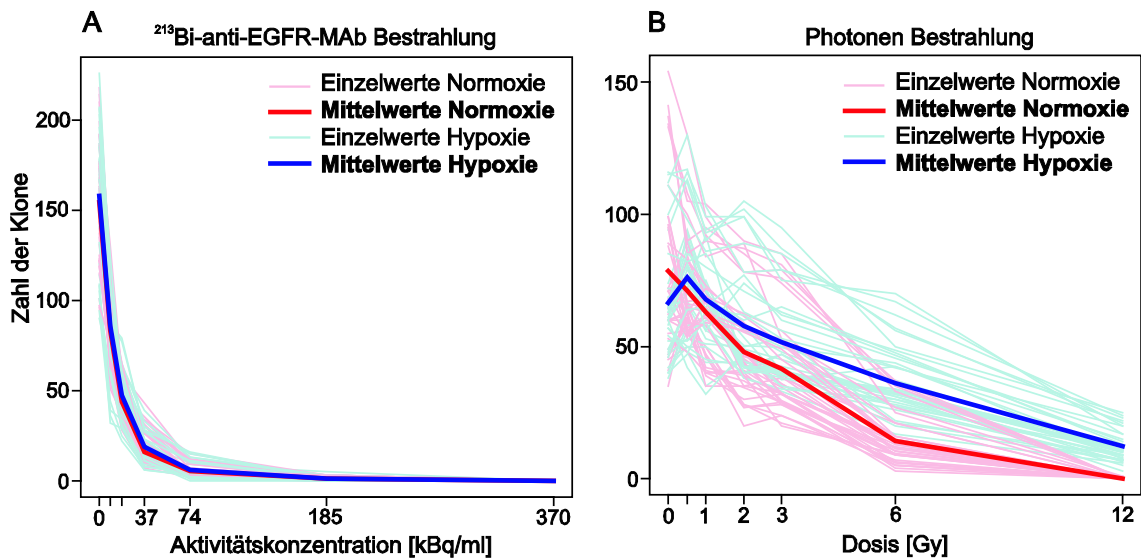


Abbildung 4.5: Klonogenes Zellüberleben in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen (rot) und hypoxischen Bedingungen (blau). Das klonogene Zellüberleben wird anhand der Klonzahl im Klonogenen-Test quantifiziert.

Tabelle 4.3: Klonogenes Zellüberleben in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Angegeben sind die mittleren Klonzahlen sowie die SD, die sich aus den Einzelmesswerten des Klonogenen-Tests ergeben.

A

Aktivität [kBq/ml]		0	9,25	18,5	37	74	185	370
Normoxie	Mittelwert	154,33	83,25	43,87	15,80	5,31	0,97	0,00
	SD	34,05	19,80	10,28	6,16	3,13	1,08	0,00
Hypoxie	Mittelwert	157,83	85,83	47,31	18,75	5,83	1,28	0,00
	SD	38,02	23,64	14,16	7,93	4,24	1,03	0,00

B

Dosis [Gy]		0	0,5	1	2	3	6	12
Normoxie	Mittelwert	78,62	71,15	62,92	47,92	41,71	14,31	0,08
	SD	30,60	18,92	18,11	20,49	17,82	9,31	0,28
Hypoxie	Mittelwert	66,52	76,17	67,89	57,78	51,55	36,23	12,26
	SD	21,57	22,51	17,22	20,01	16,82	13,83	5,84

Gemäß dem GLMM war das klonogene Überleben der CAL33 Zellen nach Bestrahlung mit Photonen bei allen eingesetzten Dosen unter Hypoxie signifikant höher als unter Normoxie. Dabei stieg das RR, d. h. der Faktor, um den das klonogene Überleben unter Hypoxie größer ist als unter Normoxie, mit zunehmender Dosis an. Bei der niedrigsten Dosis (0.5 Gy) betrug das RR 1.07 ($p = 0.026$). Bis zur Dosis von 3 Gy stieg das RR auf 1.23 ($p = 0.000$) an. Bei 6 Gy war das klonogene Überleben unter Hypoxie bereits 2.47-fach ($p = 0.000$) und bei 12 Gy, der höchsten Dosis, 12.24-fach ($p = 0.000$) gegenüber Normoxie erhöht (Abbildung 4.6 B).

Nach dem t-Test war das klonogene Überleben unter hypoxischen Bedingungen erst ab einer Dosis von 3 Gy signifikant größer als das unter normoxischen Bedingungen. Die MD (mittlere Differenz der Klonzahl unter Hypoxie und Normoxie) betrug hier 9.84 bei einem p-Wert von 0.019. Bei niedrigeren Dosen war der p-Wert größer als 0.05, d. h. die Klonzahlen für Normoxie und Hypoxie waren nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings zeigten die Werte für die MD (5.02, 4.97 und 9.86) bei den Dosen 0.5 Gy, 1 Gy und 2 Gy ein tendenziell höheres klonogenes Überleben nach Bestrahlung unter hypoxischen Bedingungen an. Bei einer Dosis von 6 Gy betrug die MD 21.91 ($p = 0.000$) und bei 12 Gy 12.17 ($p = 0.000$) (Abbildung 4.7 B).

Diese statistischen Resultate bestätigen eindeutig, dass hypoxische Zellen weniger sensibel gegenüber Photonenbestrahlung sind als normoxische Zellen.

Für die Behandlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb ergaben beide statistischen Tests, das GLMM und der t-Test, dass das klonogene Überleben unter Hypoxie und Normoxie nicht signifikant unterschiedlich ist. Wie man aus den Abbildung 4.6 A und Abbildung 4.7 A entnehmen kann, ist in den Konfidenzintervallen für das RR bzw. die MD bei jeder Aktivitätskonzentration der Wert 1 bzw. 0 enthalten (rote Linie). Dementsprechend ist der p-Wert größer als 0.05. Daher war das klonogene Überleben bei allen eingesetzten Aktivitätskonzentrationen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gleich.

Demnach zeigt dieses Ergebnis, dass die Radioimmuntherapie mit dem α -Emitter ^{213}Bi normoxische und hypoxische Zellen gleichermaßen abtötet.

Eine tabellarisches Verzeichnis der Werte für das RR, die MD, die Konfidenzintervalle sowie die zugehörigen p-Werte findet sich im Anhang (Kap. 7.1, Tabelle 7.10 und Tabelle 7.11).

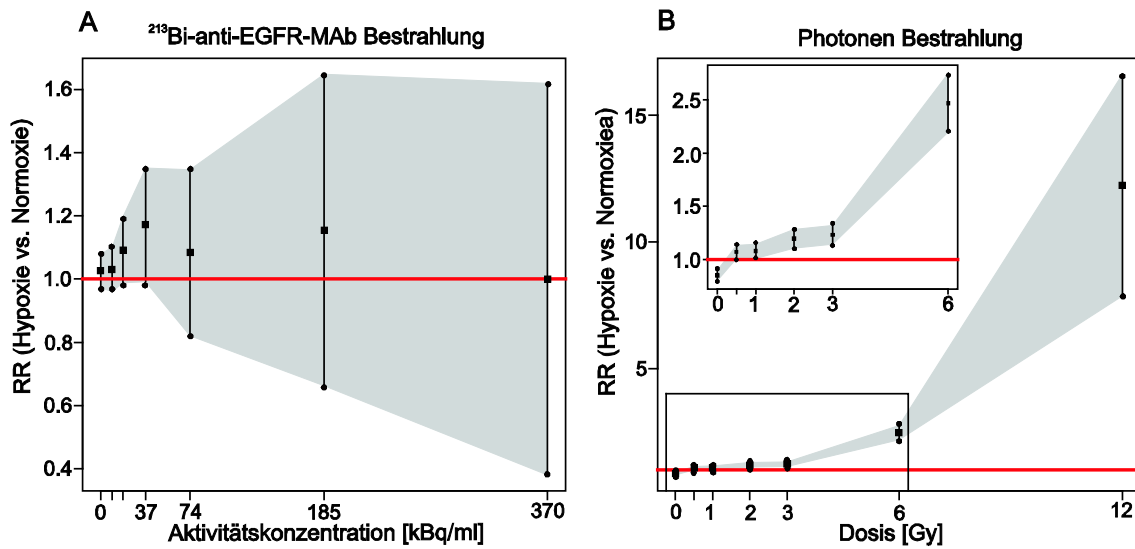


Abbildung 4.6: Statistische Auswertung des klonogenen Zellüberlebens, entsprechend dem Klonogenen-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des GLMM.

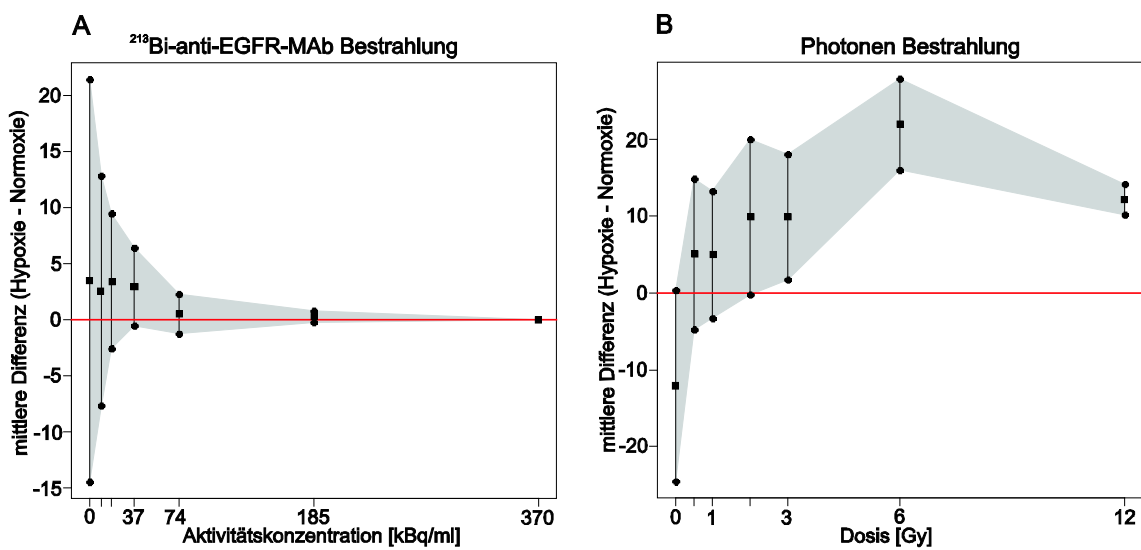


Abbildung 4.7: Statistische Auswertung des klonogenen Zellüberlebens, entsprechend dem Klonogenen-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des t-Tests.

4.7 Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie

Die Zellvitalität, die mit Hilfe der Extinktion im WST-Test quantifiziert wurde, nahm mit steigenden Photonendosen ab. Dabei waren die Extinktionswerte für Zellen, die unter Hypoxie bestrahlt wurden, höher als für Zellen, die unter Normoxie bestrahlt wurden. Bei der kleinsten Dosis (0.5 Gy) betrug die Extinktion unter normoxischen Bedingungen 0.88 (SD = 0.17) und nahm bei einem relativ gleichmäßigen Kurvenverlauf bis zu einer Dosis von 6 Gy mit einem Extinktionswert von 0.44 (SD = 0.06) ab. Der Kurvenverlauf zwischen 6 Gy (0.44; SD = 0.06) und 12 Gy (0.29; SD = 0.05) war vergleichsweise flacher. Unter hypoxischen Bedingungen betrug die Extinktion bei 0.5 Gy 0.96 (SD = 0.23). Die Extinktion nahm mit zunehmender Dosis bis zu einem Wert von 0.40 (SD = 0.06) bei 12 Gy ab. Die Extinktionswerte waren bei jeder Photonendosis unter Hypoxie höher als unter Normoxie (Abbildung 4.8 B und Tabelle 4.4 B).

Nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb ergab sich für die Zellvitalität das in Abbildung 4.8 A dargestellte Verhalten. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, war die Extinktion im WST-Test nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen identisch. Bei den unbestrahlten Kontrollen wurde eine mittlere Extinktion von 1.16 (SD = 0.30) unter Hypoxie und 1.31 (SD = 0.15) unter Normoxie gemessen. Die Extinktion nahm bis zu einer Aktivitätskonzentration von 370 kBq/ml (Hypoxie: 0.48, SD = 0.12; Normoxie: 0.47, SD = 0.09) stark ab. Zwischen den Aktivitätskonzentrationen 370 kBq/ml und 1480 kBq/ml war nur eine geringe Extinktionsabnahme unter Hypoxie und Normoxie zu beobachten. Die Werte lagen für Hypoxie zwischen 0.48 (SD = 0.12) bei 370 kBq/ml und 0.30 (SD = 0.07) bei 1480 kBq/ml. Unter Normoxie wurden Extinktionswerte zwischen 0.47 (SD = 0.09) bei 370 kBq/ml und 0.33 (SD = 0.08) bei 1480 kBq/ml gemessen (Tabelle 4.4 A).

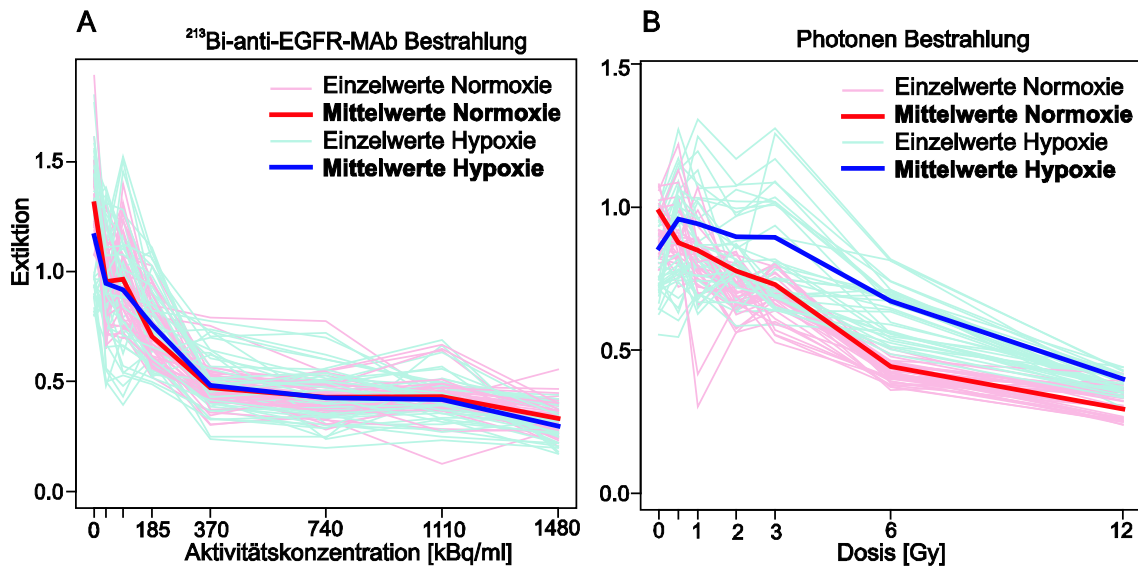


Abbildung 4.8: Extinktion als Maß für die Zellvitalität in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen (rot) und hypoxischen Bedingungen (blau). Die Zellvitalität wird anhand der Extinktion im WST-Test quantifiziert.

Tabelle 4.4: Extinktion als Maß der Zellvitalität in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Angegeben sind die mittlere Extinktion sowie die SD, die sich aus den Einzelmesswerten des WST-Tests ergeben.

A

Aktivität [kBq/ml]		0	37	93	185	370	740	1110	1480
Normoxie	Mittelwert	1,31	0,95	0,96	0,71	0,47	0,43	0,43	0,33
	SD	0,15	0,18	0,19	0,12	0,09	0,08	0,09	0,08
Hypoxie	Mittelwert	1,16	0,95	0,92	0,76	0,48	0,42	0,42	0,30
	SD	0,30	0,24	0,28	0,19	0,12	0,12	0,10	0,07

B

Dosis [Gy]		0	0,5	1	2	3	6	12
Normoxie	Mittelwert	0,98	0,88	0,85	0,78	0,73	0,44	0,29
	SD	0,18	0,17	0,15	0,13	0,10	0,06	0,05
Hypoxie	Mittelwert	0,86	0,96	0,94	0,90	0,89	0,67	0,40
	SD	0,19	0,23	0,20	0,18	0,19	0,10	0,06

Übereinstimmend mit der Feststellung in Kapitel 4.3, war die Zellvitalität in den unbestrahlten hypoxischen Kontrollen signifikant niedriger als in den normoxischen Kontrollen. Trotzdem war gemäß dem GLMM für alle untersuchten Photonendosen eine signifikant höhere Zellvitalität unter Hypoxie als unter Normoxie festzustellen. Dabei stieg das RR mit zunehmender Dosis von 1.05 ($p = 0.000$) bei 0.5 Gy auf 1.15 ($p = 0.000$) bei 6 Gy an. Für 12 Gy war die Zellvitalität unter Hypoxie um den Faktor 1.08 ($p = 0.000$) gegenüber Normoxie erhöht (Abbildung 4.9 B; Tabelle 7.10 D im Anhang 7.1).

Diese Ergebnisse wurden im t-Test bestätigt. Die Analyse ergab ebenfalls, dass die metabolische Aktivität der Zellen nach Bestrahlung mit Photonen unter hypoxischen Bedingungen signifikant gegenüber normoxischen Bedingungen erhöht war. Die Extinktion unter Hypoxie war bei 0.5 Gy im Mittel um einen Wert von 0.08 ($p = 0.029$) größer als unter Normoxie. Der Unterschied stieg bis zur Dosis 6 Gy auf 0.23 ($p = 0.000$) an. Bei 12 Gy war die MD mit 0.11 ($p = 0.000$) etwas geringer (Abbildung 4.10 B; Tabelle 7.11 D im Anhang 7.1).

Folglich ist festzustellen, dass die Ergebnisse für die Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen sehr gut mit denen für das klonogene Zellüberleben übereinstimmen. Für beide Messparameter ergeben sich unter Hypoxie signifikant höhere Werte als unter Normoxie.

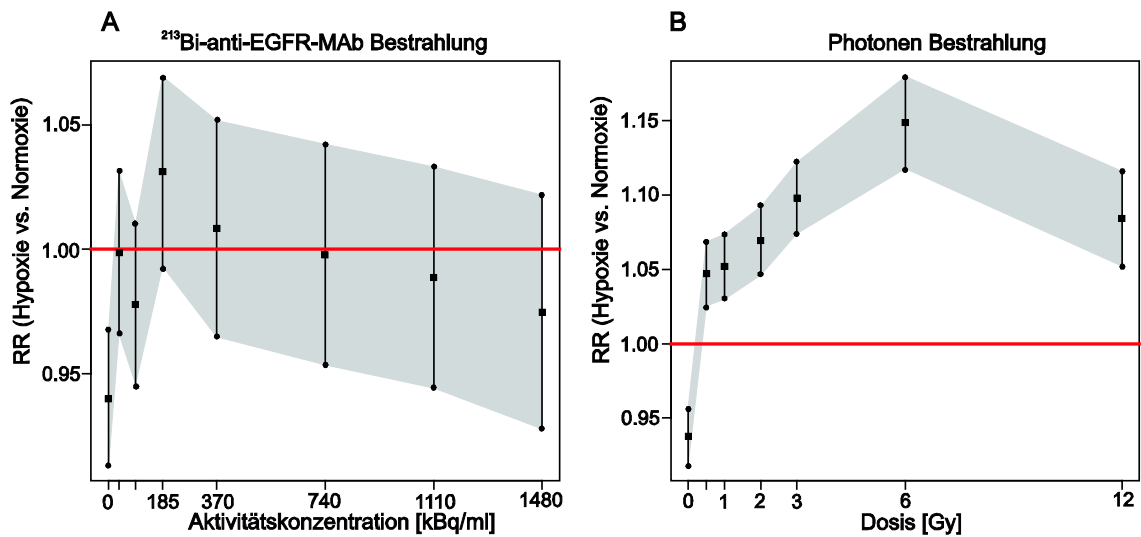


Abbildung 4.9: Statistische Auswertung der Zellvitalität, entsprechend dem WST-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des GLMM.

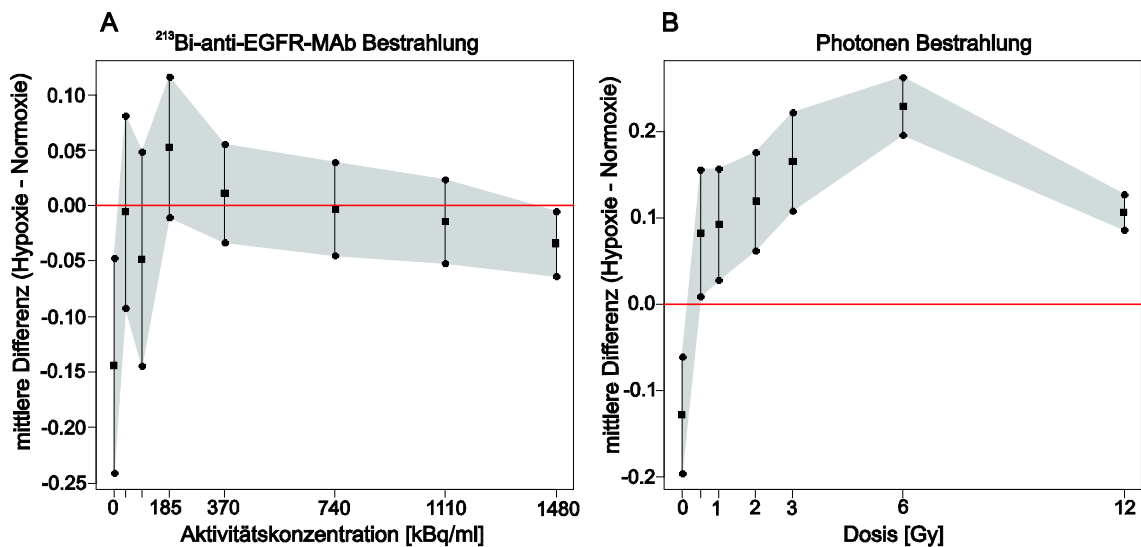


Abbildung 4.10: Statistische Auswertung der Zellvitalität, entsprechend dem WST-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des t-Tests.

Im Gegensatz zur Photonenbestrahlung war die Zellvitalität nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für alle Aktivitätskonzentrationen gemäß dem t-Test und dem GLMM nicht signifikant unterschiedlich. Eine Ausnahme bildet das Ergebnis des t-Tests für die Aktivitätskonzentration 1480 kBq/ml. Hier war die Vitalität unter Hypoxie geringfügig, aber signifikant reduziert (MD = 0.03; $p = 0.022$). Entsprechend den Ergebnissen in Kapitel 4.3, war die Zellvitalität der unbestrahlten Kontrollen unter hypoxischen Bedingungen nach den Ergebnissen beider statistischer Tests geringer als unter normoxischen (RR = 0.94; MD = -0.14) (Abbildung 4.9 A und Abbildung 4.10 A; Tabelle 7.10 C und Tabelle 7.11 C im Anhang).

Insgesamt sind diese Resultate in Übereinstimmung mit denen des Klonogenen-Tests nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb und gegenteilig zu den Effekten der Photonenbestrahlung. Nach der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb ist die Zellvitalität unter Normoxie und Hypoxie gleich.

Die Ergebnisse und Analysen aus Kapitel 4.6 und 4.7 belegen eindeutig, dass die Wirkung der Strahlung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb sauerstoffunabhängig ist.

4.8 Statistische Analyse der Strahlenwirkung unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen hinsichtlich des klonogenen Gesamtüberlebens und der Gesamtvitalität

Für einen weiteren statistischen Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie wurden alle Messergebnisse bezüglich des klonogenen Überlebens und der Vitalität zusammengefasst und mit dem GLMM und dem t-Test ausgewertet. Das klonogene Gesamtüberleben und die Gesamtvitalität über den vollständigen Dosis- bzw. Aktivitätskonzentrationsbereich sind in der Abbildung 4.11 und der Abbildung 4.12 dargestellt. Eine tabellarische Auflistung der Werte für das RR, die MD, die Konfidenzintervalle sowie die zugehörigen p-Werte findet sich im Anhang (Kap. 7.1, Tabelle 7.10 und Tabelle 7.11).

Beide statistischen Tests ergaben in Bezug auf das klonogene Gesamtüberleben, dass die Zahl der Klone nach Bestrahlung mit Photonen unter Hypoxie signifikant höher war als nach Bestrahlung unter Normoxie. Für beide Tests errechnete sich ein p-Wert von 0.000. Nach dem GLMM war das klonogene Gesamtüberleben nach Bestrahlung mit Photonen unter Hypoxie um den Faktor

1.28, d.h. um 28 % erhöht (Abbildung 4.11 A). Nach dem t-Test betrug die MD der Klonzahlen zwischen Hypoxie und Normoxie 11.31 Klone (Abbildung 4.12 A).

Die Gesamtvitalität nach Bestrahlung mit Photonen war ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen höher als unter normoxischen. Für die Gesamtvitalität nach Photonenbestrahlung war das RR mit 1.08 ($p = 0.000$) geringer als das RR für das klonogene Gesamtüberleben (Abbildung 4.11). Die Extinktionswerte im WST-Test waren unter Hypoxie im Mittel um 0.14 ($p = 0.000$) höher als unter Normoxie (Abbildung 4.12 B).

Im Gegensatz zur Bestrahlung mit Photonen unterschied sich das klonogene Gesamtüberleben der CAL33 Zellen nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen im GLMM nicht signifikant ($\text{RR} = 1.07$; $p = 0.547$). Auch die Extinktionswerte für die Gesamtvitalität waren unter Hypoxie und Normoxie gleich ($\text{RR} = 1.00$; $p = 0.950$) (Abbildung 4.11).

Die Evaluation der Ergebnisse mit dem t-Test bestätigte dieses Ergebnis. Für das klonogene Gesamtüberleben errechnete sich eine MD von 1.93 Klonen zwischen Hypoxie und Normoxie, wobei dieser Unterschied bei einem p-Wert von 0.547 nicht signifikant war. Ebenso war für die Extinktion im WST-Test kein Unterschied festzustellen ($\text{MD} = 0.00$; $p = 0.933$) (Abbildung 4.12).

Demnach ergaben sich auch aus der gemeinsamen Betrachtung aller Messwerte, sowohl für das klonogene Zellüberleben als auch für die Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen, signifikant höhere Werte für hypoxische Zellen im Vergleich zu normoxischen.

Bei einer Behandlung mit den α -Teilchen emittierenden ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb Radioimmunkonjugaten war kein Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie festzustellen. Die Zellvitalität war unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen identisch. Mit den ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb wurde das klonogene Überleben von normoxischen und hypoxischen Zellen gleichermaßen reduziert.

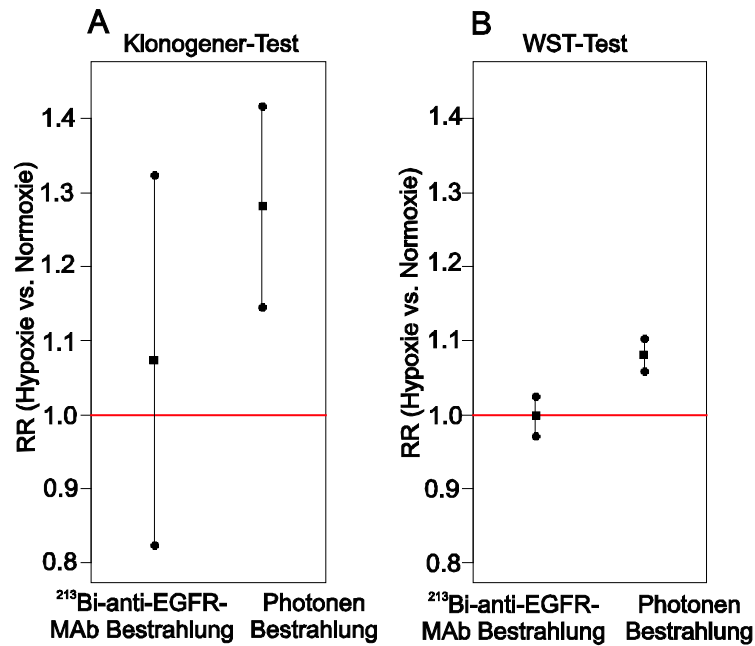


Abbildung 4.11: RR gemäß dem GLMM für das klonogene Gesamtüberleben im Klonogenen-Test (A) und die Gesamtvitalität im WST-Test (B) nach Bestrahlung mit Photonen und ²¹³Bi-Anti-EGFR-MAb unter Normoxie und Hypoxie.

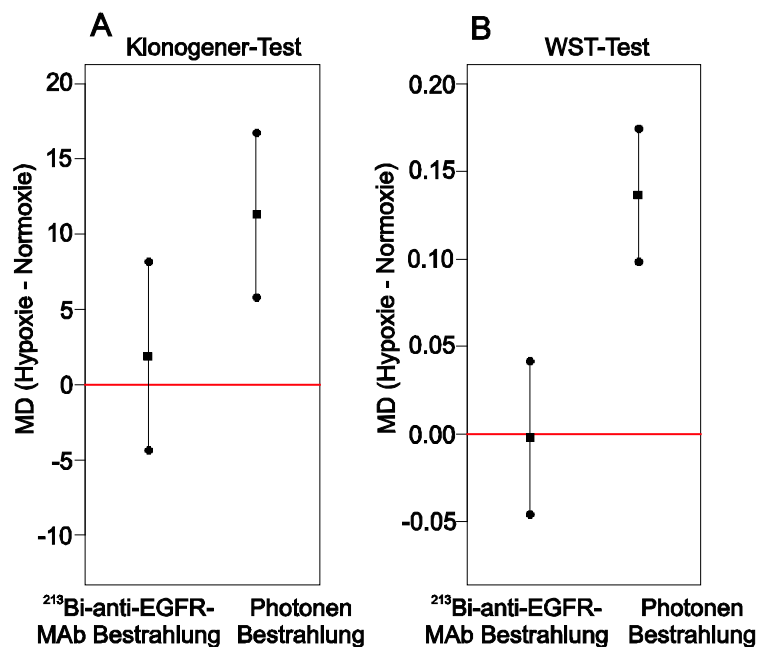


Abbildung 4.12: MD gemäß dem t-Test für das klonogene Gesamtüberleben im Klonogenen-Test (A) und die Gesamtvitalität im WST-Test (B) nach Bestrahlung mit Photonen und ²¹³Bi-Anti-EGFR-MAb unter Normoxie und Hypoxie.

4.9 OER für die Bestrahlung mit Photonen und ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb

Wie in Kapitel 3.13.1 beschrieben, wurde der OER für verschiedene Klonzahlen und Extinktionen berechnet. Dabei wurden die Bereiche der Klonzahlen und der Extinktionen, wie in Tabelle 4.5 dargestellt, gewählt, sodass eine Interpolation und Berechnung des OER möglich war.

Für das klonogene Zellüberleben unter Photonenstrahlung schwankte der OER zwischen 1.5 und 1.9, bei einem Mittelwert von 1.69 (SD = 0.15) (Tabelle 4.5 A). Entsprechend variierte der OER für die Zellvitalität zwischen 1.6 und 2.5. Der Mittelwert des OER für Zellvitalität unter Photonenstrahlung betrug 1.83 (SD = 0.20) (Tabelle 4.5 B).

Dagegen beträgt der OER für das klonogene Zellüberleben bei Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb im Mittel nur 1.08 (SD = 0.04). Der Wertebereich des OER für klonogenes Zellüberleben belief sich auf 1.05 bis 1.20 (Tabelle 4.5 C). Für die Zellvitalität nach Behandlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb errechneten sich für den OER Werte zwischen 0.96 und 1.18. Der Mittelwert betrug 1.07 (SD = 1.07) (Tabelle 4.5 D).

Diese Ergebnisse demonstrieren erneut, dass bei der Behandlung mit Alphastrahlung (emittiert von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb) im Gegensatz zur Photonenstrahlung keine Erhöhung der Aktivitätskonzentration nötig ist, um unter Hypoxie denselben biologischen Effekt zu erzielen wie unter Normoxie.

Tabelle 4.5: OER für das klonogene Zellüberleben (A) und die Zellvitalität (B) nach Bestrahlung mit Photonen sowie für das klonogene Zellüberleben (C) und die Zellvitalität (D) nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb. Angegeben sind die OER für verschiedene Klonzahlen bzw. Extinktionen, deren Mittelwert und die SD. c[A] bezeichnet die Aktivitätskonzentration.

A						B					
Klonzahl	Dosis unter Normoxie [Gy]	Dosis unter Hypoxie [Gy]	OER	Mittelwert der OER	SD	Extinktion	Dosis unter Normoxie [Gy]	Dosis unter Hypoxie [Gy]	OER	Mittelwert der OER	SD
70	0,57	0,87	1,53	1,69	0,15	0,80	1,71	4,23	2,47	1,83	0,20
65	0,87	1,29	1,47			0,75	2,60	4,91	1,89		
60	1,19	1,78	1,49			0,70	3,31	5,59	1,69		
55	1,53	2,45	1,60			0,65	3,83	6,44	1,68		
50	1,86	3,30	1,77			0,60	4,34	7,56	1,74		
45	2,47	4,28	1,73			0,55	4,86	8,67	1,78		
40	3,19	5,26	1,65			0,50	5,38	9,78	1,82		
35	3,73	6,31	1,69			0,45	5,90	10,89	1,85		
30	4,28	7,56	1,77			0,40	7,60	12,00	1,58		
25	4,83	8,81	1,82								
20	5,38	10,06	1,87								
15	5,92	11,31	1,91								

C						D					
Klonzahl	c[A] unter Normoxie [kBq/ml]	c[A] unter Hypoxie [kBq/ml]	OER	Mittelwert der OER	SD	Extinktion	c[A] unter Normoxie [kBq/ml]	c[A] unter Hypoxie [kBq/ml]	OER	Mittelwert der OER	SD
70	12,36	13,05	1,06	1,08	0,04	0,80	151,70	161,88	1,07	1,07	0,07
65	13,54	14,25	1,05			0,75	170,20	191,61	1,13		
60	14,71	15,45	1,05			0,70	192,71	226,67	1,18		
55	15,89	16,65	1,05			0,65	231,25	260,00	1,12		
50	17,06	17,85	1,05			0,60	269,79	293,33	1,09		
45	18,23	20,00	1,10			0,55	308,33	326,67	1,06		
40	21,05	23,23	1,10			0,50	346,88	360,00	1,04		
35	24,35	26,47	1,09			0,45	555,00	555,00	1,00		
30	27,64	29,71	1,07			0,40	1221,00	1171,67	0,96		
25	30,94	32,95	1,07								
20	34,23	36,19	1,06								
15	39,82	47,74	1,20								

5 Diskussion

5.1 Proliferationsbedingungen unter Hypoxie und Normoxie entsprechend den mikroskopischen Beobachtungen

Gemäß den mikroskopischen Beobachtungen starben bei einer Ausgangszellzahl von 2×10^6 Zellen pro 25cm^2 -Zellkulturflasche alle CAL33 Zellen nach einer Inkubation für 24 h unter hypoxischen Bedingungen. Durch eine Reduktion der Zellzahl pro Kulturflasche ließ sich das Überleben von CAL33 Zellen, die sich 24 h unter Hypoxie befanden, steigern.

Dieses Ergebnis lässt sich wie folgt erklären: Im Vergleich zur Normoxie war nach 24-stündiger Hypoxie eine deutliche Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich anhand der Farbänderung des Mediums zu beobachten. Dies ist durch eine vermehrte Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte bzw. Laktat aus der anaeroben Glykolyse bedingt. Ein saures Milieu beeinträchtigt das Zellwachstum bzw. schädigt die Zellen (Schmitz, 2011) und verursacht so das Absterben der Zellen. Durch eine reduzierte Ausgangszellzahl fallen weniger dieser Stoffwechselprodukte an. Entsprechend ist die Zellschädigung geringer und die Überlebensrate höher.

Bestätigt wird diese Erklärung durch den Umstand, dass sich durch einen regelmäßigen Wechsel des Mediums die Überlebens- und Wachstumsrate der CAL33 Zellen nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen für 24 h weiter steigern ließ.

Trotz Mediumwechsel und reduzierter Ausgangszellzahl waren die Überlebens- und Wachstumsraten der CAL33 Zellen nach 24-stündiger Hypoxie im Vergleich zur Normoxie sichtbar reduziert.

Die Zugabe des HEPES-Puffers, der eine pH-Änderung abfangen sollte, schädete hypoxischen Zellen zusätzlich. Die Ursache ist unklar. Eine Schädigung durch zytotoxische Stoffe, die während der Exposition von RPMI-Medium mit HEPES-Puffer-Zusatz gegenüber sichtbarem Licht entstehen, ist denkbar

(Zigler et al., 1985). Weitere Erklärungsmöglichkeiten aus der Literatur liegen nicht vor.

Bei kürzeren Inkubationszeiten von 3 h, 2 × 3 h und 6 h (entsprechend den Bestrahlungsversuchen) konnten mikroskopisch keine Veränderungen der Überlebens- und Wachstumsraten der CAL33 Zellen nach Mediumwechsel oder veränderter Ausgangszellzahl festgestellt werden. Auch die Hypoxie selbst hatte gemäß den mikroskopischen Beobachtungen keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Daher wurde eine Hypoxiedauer von insgesamt maximal 6 h für die weiteren Experimente gewählt.

5.2 Bewertung der Ergebnisse für den quantitativen Vergleich des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie sowie der Ergebnisse für die unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche

5.2.1 Vergleich der Ergebnisse

Die Versuche zum quantitativen Vergleich des klonogenen Zellüberlebens und der Zellvitalität zeigten, dass die Inkubation von CAL33 Zellen unter hypoxischen Bedingungen für eine Dauer von 6 h bzw. 2 × 3 h, unterbrochen von einer 10-minütigen Phase unter normoxischen Bedingungen (3 h + 3 h), keinen Einfluss auf das klonogene Zellüberleben hatte. Das klonogene Überleben, das 4.5 d nach der Hypoxie gemessen wurde, glich dem von Zellen, die sich 6 h unter Normoxie befanden. Dagegen war die Zellvitalität, die 3.5 d nach der Hypoxie mit dem WST-Test gemessen wurde, signifikant niedriger als die Zellvitalität normoxischer Zellen (vergleiche Kap. 4.3).

Es wurde erwartet, dass die Ergebnisse dieser Versuche mit den Ergebnissen der unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche übereinstimmen. Die statistische Auswertung hierzu ist in Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2 vergleichend dargestellt.

Für das klonogene Überleben in den Kontrollen der Bestrahlungsversuche sollte kein Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie bestehen. Bei den Kontrollen der Bestrahlungsversuche mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb ist dies der Fall.

Sowohl das GLMM ($p = 0.340$) als auch der t-Test ($p = 0.698$) ergaben, dass das klonogene Zellüberleben unter Hypoxie und Normoxie gleich war. Für die Kontrollen bei der Bestrahlung mit Photonen errechnete sich im GLMM ein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie mit einem RR von 0.85 ($p = 0.000$). Der t-Test lieferte für dieselben Werte jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0.057$) (Tabelle 5.1). Da zudem im quantitativen Vergleich kein signifikanter Unterschied feststellbar war, kann man davon ausgehen, dass die widersprüchlichen Resultate der statistischen Tests durch einzelne Extremwerte, die stark vom Mittelwert abweichen, bedingt sind. Daher bleibt dieser Ausreißer in Bezug auf die Interpretation der restlichen Ergebnisse unbedeutsam.

Tabelle 5.1: Statistische Auswertung des klonogenen Zellüberlebens für die unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche und des quantitativen Vergleichs des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie. Signifikante Unterschiede sind farblich hervorgehoben. Hypoxie 3 h + 3 h entspricht den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb, Hypoxie 6 h den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit Photonen.

Versuchsgruppe	Statistischer Test	Statistischer Wert	Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h	Normoxie vs. Hypoxie 6 h	Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h	
unbestrahlte Kontrollen der Bestrahlungsversuche	t-Test	MD	3,5	-12,0972	nicht vergleichbar	
		p-Wert	0,6977	0,057		
	GLMM	RR	1,0259	0,8481	nicht vergleichbar	
		p-Wert	0,3403	0,0000		
quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie	t-Test	MD	-3,5278	-1,7222	1,8056	
		p-Wert	0,0769	0,4392	0,4214	
	GLMM	RR	0,9459	0,9736	1,0293	
		p-Wert	0,0585	0,3388	0,3093	
				Vergleich Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h		
	Varianzanalyse	Pr (>F)	0,2615			

Die Zellvitalität war in den unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche unter Hypoxie erwartungsgemäß signifikant reduziert. Nach dem t-Test war die Extinktion unter Hypoxie bei den unbestrahlten Kontrollen für Photonenstrahlung um 0.12 ($p = 0.000$), bei den Kontrollen für die Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb um 0.14 ($p = 0.004$) reduziert. Im GLMM berechnete sich für die unbestrahlten Kontrollen unter Hypoxie sowohl bei der Bestrahlung mit Photonen als auch bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb eine ca. 0.94-fach niedrigere Zellvitalität (für beide ist $p = 0.000$). Die unbestrahlten Kontrollen der beiden Bestrahlungsprotokolle waren untereinander nicht vergleichbar, da sie nicht gleichzeitig erstellt wurden und eine unterschiedliche Zellzahl (100 bzw. 200 Zellen pro Well) eingesetzt wurde (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Statistische Auswertung der Zellvitalität für die unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche und des quantitativen Vergleichs der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie. Signifikante Unterschiede sind farblich hervorgehoben. Hypoxie 3 h + 3 h entspricht den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb, Hypoxie 6 h den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit Photonen.

Versuchsgruppe	Statistischer Test	Statistischer Wert	Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h	Normoxie vs. Hypoxie 6 h	Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h	
unbestrahlte Kontrollen der Bestrahlungsversuche	t-Test	MD	-0,144	-0,1284	nicht vergleichbar	
		p-Wert	0,0042	0,0003	nicht vergleichbar	
	GLMM	RR	0,9399	0,9376	nicht vergleichbar	
		p-Wert	0,0000	0,0000	nicht vergleichbar	
quantitativer Vergleich der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie	t-Test	MD	-0,2186	-0,0906	0,128	
		p-Wert	0,0000	0,0434	0,0001	
	GLMM	RR	0,9020	0,9558	1,0596	
		p-Wert	0,0000	0,0000	0,0000	
				Vergleich Normoxie vs. Hypoxie 3 h + 3 h vs. Hypoxie 6 h		
	Varianzanalyse	Pr (>F)	0,0000			

5.2.2 Diskrepanz der Ergebnisse für das klonogene Zellüberleben und die Zellvitalität

Es ist festzuhalten, dass die Hypoxie die Zellvitalität reduziert, das klonogene Zellüberleben aber nicht beeinflusst. Dieser Sachverhalt kann auf eine andauernde Veränderung des Zellmetabolismus durch die Hypoxie hindeuten. Weiter fällt das RR, das sich in den Bestrahlungsversuchen mit Photonen für die Zellvitalität errechnet niedriger aus als das RR für das klonogene Zellüberleben (vergleiche Abbildung 4.11). Folgende Gründe sind hierfür zu nennen: Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Zellvitalität sind durch die verschiedenen Zeitpunkte der Messung beim Klonogenen-Test (4.5 d nach Hypoxie) und beim WST-Test (3.5 d nach Hypoxie) erklärbar (vergleiche Kap. 3.6 und 3.7). Es ist nicht gesichert, dass sich zum Messzeitpunkt des WST-Tests der Zellmetabolismus nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen bereits normalisiert hat. Wahrscheinlicher ist, dass die unterschiedlichen Resultate durch die verschiedenen Endpunkte der beiden Tests bedingt sind. Der Klonogene-Test misst das klonogene Zellüberleben, der WST-Test die Zellvitalität bzw. die metabolische Aktivität. Diese Messgrößen können unterschiedlich stark von der Hypoxie beeinflusst werden. Daher ist ein Vergleich der RR der beiden verschiedenen Tests, die sich aus den jeweiligen Endpunkten für Normoxie und Hypoxie ergeben, als problematisch anzusehen.

Es stellt sich allerdings die Frage, inwieweit eine Berücksichtigung der Reduktion der Zellvitalität durch die Hypoxie in der statistischen Analyse der bestrahlten Zellen (im Sinne einer Korrektur der Extinktionswerte für Hypoxie) nötig ist. Da nicht evaluierbar war, wie sich der Einfluss der Hypoxie auf die Vitalität bei zusätzlicher Bestrahlung auswirkt, erfolgte eine solche Korrektur nicht. Zur Veranschaulichung dient folgendes Beispiel: Bei einer Aktivitätskonzentration von 370 kBq/ml waren sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie nahezu alle Zellen abgestorben (im Mittel 0.08 Klone). Die Zellvitalität ist dementsprechend auf ein Minimum reduziert und unter Normoxie und Hypoxie ebenfalls gleich. Eine Berücksichtigung der Vitalitätsreduktion durch die Hypoxie würde die Extinktionswerte unter Hypoxie fälschlicherweise erhöhen, obwohl alle Zellen abgestorben sind.

Daher werden die Ergebnisse der statistischen Analyse für die Zellvitalität nach Bestrahlung als valide angesehen.

5.3 Verwendung des Radionuklids ^{213}Bi

^{213}Bi emittiert α - und β -Teilchen mit einer Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von 45.6 min. Es zerfällt unter Emission eines β^- -Partikels ($E_\beta = 1.4 \text{ MeV}$) zu 97.8 % in den kurzlebigen, reinen α -Emitter ^{213}Po ($T_{1/2} = 4.2 \mu\text{s}$, $E_\alpha \approx 8.4 \text{ MeV}$). Die anderen 2.2 % zerfallen unter Emission eines α -Partikels ($E_\alpha \approx 5.8 \text{ MeV}$) in den β -Emitter ^{209}Tl ($T_{1/2} = 2.2 \text{ min}$, $E_\beta = 1.8 \text{ MeV}$). ^{213}Po und ^{209}Tl zerfallen über ^{209}Pb ($T_{1/2} = 3.3 \text{ h}$, $E_\beta = 0.6 \text{ MeV}$) in stabiles ^{209}Bi . Mehr als 98 % der Energie der α -Partikel beim Zerfall von ^{213}Bi entfallen auf die Alphastrahlung von ^{213}Po , die damit hauptverantwortlich für die zytotoxischen Effekte ist. Da zudem 92.7 % der gesamten Partikelenergie durch den Alpha- und nur 7.3 % durch den Betazerfall bedingt sind (Morgenstern et al., 2011), ist ^{213}Bi geeignet, die sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung zu bestätigen.

Eine weitere positive Eigenschaft von ^{213}Bi ist die Möglichkeit einer einfachen Detektion bzw. Aktivitätsmessung in vitro mittels γ -Kamera und einer Bestimmung der Biodistribution und Dosimetrie in vivo aufgrund der begleitenden Emission von Photonen mit einer Energie von 440 keV. Außerdem hat das stabile Zerfallsprodukt ^{209}Bi in der Menge, in der es bei der Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi anfällt, keine schädigende Wirkung (Huber, 2003a).

5.4 Markierung von Anti-EGFR-MAb und Bindung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen

Bei einer maximalen Reichweite der von ^{213}Bi emittierten α -Partikel von 85 μm in organischem Material bzw. in Wasser (Akabani et al., 2003), müssen die ^{213}Bi -Atome für eine hohe zytotoxische Wirkung möglichst nah an die Zelle gebracht werden. Dies geschieht durch die Bindung der mit ^{213}Bi markierten Anti-EGFR-MAb an die EGFR-Antigene der Zelloberfläche. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren 98 % (SD = 0.5) der ^{213}Bi -Moleküle an die Anti-EGFR-MAb gebunden. Allerdings waren von allen zugegebenen Antikörpern nur jeder 1099te (SD = 295) mit ^{213}Bi gekoppelt. Da aber 74 % (SD = 4.7) der mit ^{213}Bi markier-

ten Anti-EGFR-MAb an die CAL33 Zellen banden, war ein ausreichend geringer Abstand zwischen ^{213}Bi und den Zellen gewährleistet.

Ferner ist zu berücksichtigen, dass sich die Tochternuklide durch die beim α -Zerfall freiwerdende Energie oder durch ihre veränderte chemische Eigenschaft unter Umständen aus dem Chelatkomplex lösen. Eine Freisetzung des unter einem α -Zerfall entstehenden, β -Teilchen emittierenden ^{213}Bi -Tochternuklids ^{209}Tl aus der Chelatierung ist unbedeutend, da dieser Zerfall nur 2.2 % des Zerfalls von ^{213}Bi ausmacht (vergleiche Kap. 5.3 und Abbildung 3.6). Für das unter einem β -Zerfall entstehende ^{213}Bi -Tochternuklids ^{213}Po , das 98 % der Energie des Alphazerfalls ausmacht, ist eine mögliche Lösung der Chelatierung durch veränderte chemische Eigenschaften ebenfalls unbedeutend, da sich das Nuklid aufgrund der sehr kurzen $T_{1/2}$ (4.2 μs) nicht entscheidend weit von der Zelloberfläche entfernen kann (Hamacher et al., 2001). Einschließlich der Tatsache, dass 92.7 % der gesamten Partikelenergie durch den Alphazerfall bedingt sind (vergleiche Kap. 5.3), ist die hohe zytotoxische Wirkung der ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb-Radioimmunkonjugate folglich durch die Alphastrahlung bedingt. Dieser Sachverhalt stellt die Grundlage für die Validität des Nachweises der sauerstoffunabhängigen Wirkung von Alphastrahlung dar.

5.5 Ergebnisse der Bestrahlungsversuche und statistische Analyse

5.5.1 Anmerkungen zur statistischen Analyse

Es ist darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse des GLMM aufgrund der Berücksichtigung unterschiedlicher äußerer Bedingungen, die bei den verschiedenen Experimenten auftreten können, durch die Aufnahme der Experimentnummer als zufälligen Effekt (vergleiche Kap. 3.13) gegenüber den Ergebnissen des t-Tests als belastbarer anzusehen sind. Da die Aussagen bezüglich der Signifikanz, die sich aus den Berechnungen im GLMM und im t-Test ergeben, nahezu übereinstimmend sind, wird die Aussagekraft der statistischen Analyse zusätzlich bestärkt. Es zeigt zudem, dass die äußeren Bedingungen keine starken Schwankungen zwischen den Ergebnissen der Experimente hervorrufen.

Anhand der Ergebnisse der statistischen Tests ist festzustellen, dass die Streuung der Messwerte im Klonogenen-Test größer ist als im WST-Test. Dies ist an größeren Konfidenzintervallen für das RR und die MD im Klonogenen-Test ersichtlich. Besonders in Abbildung 4.11 (Kap. 4.8) wird dieser Unterschied deutlich. Zwei Gründe sind hierfür zu nennen: Zum einen kann die ungleiche Werteverfassung im Klonogenen-Test und im WST-Test ursächlich sein. Die manuelle Auswertung beim Klonogenen-Test (mikroskopische Zählung der Klone anhand eines Rasters) kann zu einer größeren Streuung der Messwerte führen als die maschinelle Auswertung beim WST-Test (Extinktionsmessung mit dem ELISA-Reader). Zum anderen kann die unterschiedliche Varianz durch die verschiedenen Messparameter bzw. Endpunkte der beiden Tests bedingt sein. Für das klonogene Überleben der Zellen gibt es nur zwei Messausgänge: teilungsfähig oder nicht teilungsfähig bzw. abgestorben. Dagegen erfolgt die Messung der metabolischen Aktivität anhand der Umsetzung von WST-1 in Formazan kontinuierlich.

Des Weiteren ist in den Abbildungen 4.6, 4.7 (Kap. 4.6), 4.9 und 4.10 (Kap. 4.7) zu beobachten, dass mit steigender Strahlendosis bzw. Aktivitätskonzentration die Konfidenzintervalle für das RR zu- und die Konfidenzintervalle für die MD abnehmen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei kleineren Absolutwerten die Schwankung der MD (ein Absolutwert) durch Ausreißer entsprechend kleiner, die Schwankung des relativen Unterschieds (RR) dagegen größer ist. Dementsprechend sind die Konfidenzintervalle für die MD kleiner und für das RR größer.

5.5.2 Klonogenes Zellüberleben bzw. Klonzahl im Klonogenen-Test nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie

Bereits aus der Darstellung in Abbildung 4.5 ist ersichtlich, dass sich das klonogene Überleben unter Normoxie und Hypoxie nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb nicht unterscheidet. Dagegen ist für die Photonenstrahlung ein Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie festzustellen. Dies geht aus den Kurven für die Mittelwerte der Klonzahlen sowie den Kurven für die Einzelmessungen hervor (die ein tendenziell höheres klonogenes Zellüberleben nach Photonenbestrahlung unter hypoxischen Bedingungen aufzeigen).

Die vermutete sauerstoffunabhängige Wirkung der Alphastrahlung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb und die sauerstoffabhängige Wirkung von Photonenstrahlung wurden mit der statistische Analyse bestätigt. Bei der Bestrahlung mit Photonen nahm der Faktor (das RR), um den das klonogene Überleben unter Hypoxie größer ist als unter Normoxie mit steigender Dosis zu (vergleiche Abbildung 4.6 B). Diese Resultate zeigen, dass der Effekt der Radioresistenz auf das klonogene Zellüberleben mit steigender Dosis zunimmt. Erklärbar ist dies durch den chemischen Mechanismus der DNA-Schädigung durch Photonenstrahlung: Unter Normoxie wird mit steigender Strahlendosis eine steigende Anzahl DNA-schädigender Radikale gebildet. Zudem ist eine Fixierung des DNA-Schadens durch Sauerstoff möglich. Unter Hypoxie kann die Radikalbildung und Schadensfixierung auch bei hohen Dosen nicht ablaufen. Daher wird der Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie hinsichtlich des klonogenen Zellüberlebens mit steigender Dosis größer.

Dementsprechend nahm die MD zwischen Hypoxie und Normoxie bis zu einer Dosis von 6 Gy zu (Abbildung 4.7 B). Bei 12 Gy war die MD zwischen Hypoxie und Normoxie geringer als bei 6 Gy. Da bei 12 Gy unter Normoxie schon alle Zellen abgestorben bzw. nicht mehr teilungsfähig waren (0.08 Klone) und sich das klonogene Überleben unter Hypoxie weiter verringerte, konnte die MD nicht mehr steigen (vergleiche Abbildung 4.5 B).

Im Gegensatz dazu ist das klonogene Zellüberleben nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie gemäß dem GLMM und dem t-Test nicht signifikant unterschiedlich. Bei allen Aktivitätskonzentrationen ist das klonogene Zellüberleben unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen gleich (Abbildung 4.6 A und Abbildung 4.7 A). Das Resultat zeigt, dass der Effekt von Alphastrahlung unabhängig von einer sauerstoffvermittelten Radikalbildung und DNA-Schadensfixierung ist. Dicht ionisierende, Hoch-LET Alphateilchen schädigen die Zellen unabhängig von der zellulären Oxygenierung.

5.5.3 Zellvitalität bzw. Extinktion im WST-Test nach Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Hypoxie und Normoxie

Wie aus den Abbildungen 4.5 und 4.8 ersichtlich, stimmen die Ergebnisse für die Zellvitalität sehr gut mit denen für das klonogene Zellüberleben überein.

Sowohl die Graphen für die Einzelextinktionswerte als auch die Graphen für die Mittelwerte der Extinktionen zeigen unter Hypoxie eine höhere Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen als unter Normoxie (Abbildung 4.8 B). Demgegenüber ist der Verlauf der Kurven für die Zellvitalität nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nahezu gleich. Die mittlere Extinktion nahm von 1.31 unter Normoxie bzw. 1.16 unter Hypoxie für unbestrahlte Zellen bis zu einer Aktivitätskonzentration von 370 kBq/ml mit einer mittleren Extinktion von 0.47 bzw. 0.48 stark ab. Da bei einer Aktivitätskonzentration von 370 kBq/ml schon nahezu alle Zellen abgestorben waren, war die Extinktionsabnahme zwischen 370 kBq/ml und 1480 kBq/ml (mittlere Extinktion 0.33 bzw. 0.30) nur gering. Aufgrund der verbliebenen Zelltrümmer der abgestorbenen Zellen in den Wells erreichte die Extinktion nicht den Wert 0, sondern näherte sich mit steigenden Aktivitätskonzentrationen einem Wert von ca. 0.3 (Abbildung 4.8 A).

Entsprechend dem klonogenen Zellüberleben wurde in der statistischen Analyse bestätigt, dass auch die Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen unter Hypoxie gegenüber Normoxie signifikant erhöht ist. Das RR und die MD nahmen mit steigender Dosis zu. Der größte Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie wurde bei 6 Gy beobachtet (RR = 1.15, MD = 0.23). Bei 12 Gy war der Unterschied mit einem RR von 1.08 und einer MD von 0.11 geringer (Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10). Dieses Ergebnis entspricht der Annäherung der Graphen für Hypoxie und Normoxie im Bereich von 6 Gy bis 12 Gy in Abbildung 4.8 B. Unter Normoxie war die minimale Extinktion bereits bei 6 Gy (0.44) fast erreicht, die Abnahme bis 12 Gy (0.29) war nur noch gering. Indessen ist die Extinktionsabnahme unter Hypoxie von 0.67 auf 0.40 zwischen 6 Gy und 12 Gy vergleichsweise groß. Daher nimmt der Unterschied hinsichtlich der Zellvitalität zwischen Hypoxie und Normoxie (RR und MD) von 6 Gy auf 12 Gy ab.

Nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb war für die Zellvitalität kein signifikanter Unterschied zwischen Hypoxie und Normoxie festzustellen. Die Zellvitalität war bei den verschiedenen Aktivitätskonzentrationen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen gleich. Damit stimmen die Ergebnisse für die Zellvitalität mit denen für das klonogene Zellüberleben überein.

Die Zellvitalität bzw. die gemessene Extinktion wird durch die Strahlung auf zwei Weisen reduziert: Einerseits ist in geschädigten Zellen die metabolische Aktivität und damit die Umwandlung von WST-1 in Formazan durch die mitochondriale Dehydrogenase eingeschränkt. Andererseits korreliert die gemessene Extinktion neben der metabolischen Aktivität auch mit dem Überleben der Zellen. Desto weniger Zellen vorhanden sind, desto weniger WST-1 wird insgesamt umgesetzt und desto geringer ist die Extinktion.

Daher wird die Extinktion unter Photonenstrahlung durch denselben Wirkungsmechanismus wie das Zellüberleben reduziert: Bei der Bestrahlung mit Photonen kommt es unter normoxischen Bedingungen zu einer sauerstoffabhängigen Radikalbildung und DNA-Schadensfixierung. Diese Vorgänge können unter Hypoxie nicht stattfinden. Für die Schädigung anderer zellulärer Strukturen wie der mitochondrialen DNA, den Mitochondrien selbst oder den Enzymen gilt dieser Mechanismus ebenfalls und erklärt damit auch die unterschiedliche Reduktion der metabolischen Aktivität unter Hypoxie und Normoxie. Folglich wird die Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen unter hypoxischen Bedingungen weniger stark verringert als unter normoxischen Bedingungen.

Dagegen ist die Zellvitalität nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Normoxie und Hypoxie gleich. Die Zellschädigung bzw. Reduktion der Zellvitalität durch ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb wird somit unabhängig von der zellulären Oxygenierung hervorgerufen.

5.5.4 Statistische Analyse des klonogenen Gesamtüberlebens und der Gesamtvitalität

Die Betrachtung des klonogenen Gesamtüberlebens und der Gesamtvitalität stellt eine Analyse dar, die die Feststellung der vorliegenden Arbeit zusätzlich verifiziert. Durch die Zusammenfassung aller Daten für das klonogene Zellüberleben bzw. die Zellvitalität wird der generelle Effekt der verschiedenen Strah-

lenqualitäten demonstriert. Es wird hervorgehoben, dass bei der Bestrahlung mit Photonen das klonogene Überleben bzw. die Vitalität unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie über einen Dosisbereich von 0.5 Gy bis 12 Gy signifikant erhöht war. Die Bestrahlung mit α -Teilchen von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb über einen Aktivitätskonzentrationsbereich von 9.25 kBq/ml bis 1480 kBq/ml bewirkte dagegen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen das gleiche klonogene Zellüberleben und die gleiche Zellvitalität.

Daher ergänzt diese Analyse die vorherigen Untersuchungen und unterstreicht die sauerstoffunabhängige Wirkung der Alphastrahlung gegenüber der sauerstoffabhängigen Wirkung von Photonenstrahlung.

5.5.5 Berechnung und Ergebnisse für den OER

Die Ergebnisse für den OER bestätigen die Ergebnisse der statistischen Analyse hinsichtlich des klonogenen Zellüberlebens und der Zellvitalität unter Normoxie und Hypoxie.

Das klonogene Gesamtüberleben nach Bestrahlung mit Photonen war unter Hypoxie gemäß dem GLMM um den Faktor 1.28 (RR) größer als unter Normoxie. Dementsprechend musste bei einem mittleren OER von 1.69 eine 1.69-fache Photonendosis eingesetzt werden, um unter Hypoxie das klonogene Zellüberleben genauso stark zu reduzieren wie unter Normoxie. Übereinstimmend errechneten sich für die Zellvitalität nach Bestrahlung mit Photonen ein RR von 1.08, d. h. die Zellvitalität war unter Hypoxie um den Faktor 1.08 höher als unter Normoxie. Der OER betrug für die Zellvitalität 1.83.

Dagegen wurde anhand der Daten des GLMM und des t-Tests bewiesen, dass die Alphastrahlung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Normoxie und Hypoxie gleiche Werte für das klonogene Zellüberleben und die Zellvitalität bewirkt. Demnach ist eine Berechnung des OER für die Alphastrahlung eigentlich nicht nötig, da durch die statistischen Analysen bestätigt wurde, dass für das klonogene Zellüberleben und die Zellvitalität kein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie besteht. Demzufolge beträgt der OER 1. Die Berechnung des OER unter Alphastrahlung lieferte einen mittleren Wert von 1.08 für das klonogene Zellüberleben bzw. 1.07 für die Zellvitalität und bestätigt damit obige

Feststellung. Die sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung wurde daher eindeutig nachgewiesen.

Des Weiteren stimmen die OER-Werte für klonogenes Zellüberleben unter Photonenstrahlung mit den in der Literatur angegebenen Werten des OER für zehnpromzentiges Überleben, gemessen mit dem Klonogenen-Test (bei demselben $p[O_2]$) (Wenzl und Wilkens, 2011), sehr gut überein. Dabei liefert die in vorliegender Arbeit durchgeführte Berechnung des OER für verschiedene Raten klonogenen Überlebens entscheidende zusätzliche Erkenntnisse. Es wurde gezeigt, dass der OER für alle betrachteten Klonzahlen bzw. Überlebensraten ähnlich ist und damit für den ganzen Dosisbereich (bzw. Aktivitätskonzentrationsbereich) gültig ist (vergleiche Tabelle 4.5). Dagegen wurde der OER in früheren Publikationen nach Wenzl und Wilkens (2011) i. d. R. nur bei zehnpromzentigem klonogenen Überleben bestimmt. Zudem wurde in dieser Arbeit neben dem klonogenen Zellüberleben ein zusätzlicher Messparameter, die Zellvitalität, zur Bewertung des biologischen Effektes der Strahlung herangezogen. Für beide Parameter waren die Werte des OER ähnlich. Dadurch wird die Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung weiter erhärtet.

5.6 Versuchsprotokolle

5.6.1 Versuchsprotokolle im Hinblick auf die Pathophysiologie der Tumorhypoxie

Wie eingangs erwähnt führen strukturelle und funktionelle Veränderungen des Tumorgefäßsystems zu einer perfusionslimitierten akuten bzw. zyklischen Hypoxie. Die beschränkte Diffusionsweite von Sauerstoff resultiert in einer diffusionslimitierten chronischen Hypoxie (Vaupel und Mayer, 2007). Dies bewirkt eine stark heterogene Sauerstoffverteilung innerhalb von Tumoren (Brown und Wilson, 2004).

Die komplexen physiologischen Mechanismen der Tumorhypoxie konnten in vitro nicht adäquat simuliert werden. Die Dauer der hypoxischen Bedingungen bei den Bestrahlungsversuchen entspricht dem Zeitraum, der die akute Hypoxie definiert (< 24 h). Die Zellen waren für eine Gesamtdauer von 6 h hypoxisch. Mit Ausnahme des Zeitraumes zur Herstellung der Hypoxie und während der

Unterbrechung der Hypoxie zur Zugabe von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb war die Sauerstoffkonzentration konstant bei einem $p[\text{O}_2]$ von < 5 mmHg. Diese Verhältnisse spiegeln eher die Eigenschaften der chronischen Hypoxie mit einem konstant niedrigen $p[\text{O}_2]$ ohne zyklische Schwankungen wieder. Eine längere Kultivierung der CAL33 Zellen unter hypoxischen Bedingungen war nicht möglich, da die Zellen nach einer gewissen Zeit durch den niedrigen $p[\text{O}_2]$ geschädigt wurden und abstarben. Nach einer Dauer von 6 h bzw. 2×3 h unter Hypoxie (unterbrochen von einer 10-minütigen Phase unter normoxischen Bedingungen) war das klonogene Überleben noch nicht signifikant unterschiedlich zu dem unter Normoxie. Die Zellvitalität der Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, war hingegen signifikant reduziert. Nach 24 h unter Hypoxie waren bei einer Ausgangszellzahl von 2×10^6 Zellen pro 25cm^2 -Zellkulturflasche alle Zellen abgestorben (dementsprechend war auch keine erhöhte HIF-1 α Expression nachweisbar). Schwankungen des $p[\text{O}_2]$, wie sie bei der akuten bzw. zyklischen Hypoxie auftreten, wurden nicht simuliert.

In Ergänzung zu der hier bewiesenen sauerstoffunabhängigen Wirkung von α -Teilchen emittierenden Radioimmunkonjugaten auf Zellen wird vorgeschlagen, abschließende Untersuchungen in vivo durchzuführen, um die komplexe Sauerstoffversorgung in Tumoren zu berücksichtigen. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sind auch ohne diese Untersuchungen valide, da die Mechanismen, die die Radioresistenz verursachen, berücksichtigt wurden.

5.6.2 Versuchsprotokolle im Hinblick auf die ursächlichen Mechanismen der Radioresistenz

Hypoxie verringert die Radiosensitivität über zwei verschiedene Prozesse. Für die chemisch vermittelte zellschädigende Wirkung ionisierender Strahlung mit einem niedrigen LET ist Sauerstoff als entscheidendes Substrat notwendig. Unter Hypoxie ist die sauerstoffabhängige Radikalbildung und damit die DNA-Schädigung reduziert. Zudem wird die oxidative Fixierung des DNA-Schadens durch Sauerstoff verhindert. Radioresistenz von Tumorzellen gegenüber Photonenstrahlung tritt ab einem $p[\text{O}_2]$ unter 10 mmHg auf, d.h. sie sind ab diesem $p[\text{O}_2]$ radiobiologisch und -chemisch hypoxisch (Jordan und Sonveaux, 2012; Chaundary and Hill, 2007; Brown, 1999).

Vor der Bestrahlung mit Photonen bzw. mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb wurden die Zellen zunächst für 180 min unter Hypoxie inkubiert. 9 min nach dem Start der Sauerstoffevakuierung aus den Hypoxiekammern war der $p[\text{O}_2]$ im Kulturmedium unter 10 mmHg, nach 22 min war der $p[\text{O}_2]$ unter 5 mmHg.

Beim Versuchsprotokoll für die Bestrahlung mit Photonen wurde die Hypoxiekammer für 360 min nicht geöffnet. Die Bestrahlung erfolgte nach 180 min. Danach wurden die Zellen für weitere 180 min unter Hypoxie inkubiert. Somit lag der $p[\text{O}_2]$ zum Zeitpunkt der Bestrahlung bei unter 5 mmHg. Die Zellen waren dementsprechend für 171 min vor der Bestrahlung, zum Zeitpunkt der Bestrahlung und für 180 min nach der Bestrahlung radiobiologisch und -chemisch hypoxisch.

^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb wurde 180 min nach Inkubation unter Hypoxie zu den Zellen hinzugegeben. Hierfür musste die Hypoxiekammer geöffnet werden. Anschließend wurde der Sauerstoff erneut evakuiert und die Zellen für 180 min unter Hypoxie belassen. Ein $p[\text{O}_2]$ von unter 10 mmHg, ab dem die Zellen radiobiologisch und -chemisch hypoxisch sind, wurde nach 9 min erreicht. Unter dieser Annahme ergibt sich bei einer Gesamtzeit von 180 min ab dem Start der Sauerstoffevakuierung bzw. Zugabe von ^{213}Bi -Anti-EGFR-Mab, ein Zeitraum von 171 min, in dem die Zellen radiobiologisch und -chemisch hypoxisch waren. Gemäß dem Zerfallsgesetz:

$$A(t) = A_0 \exp(-\ln 2 \times t/T_{1/2}) \quad , \quad (\text{Gl. 9})$$

wirken in dieser Zeit 80.7 % der insgesamt möglichen Energiedosis. Dabei bezeichnen A_0 die Anfangsaktivität und $T_{1/2}$ die Halbwertszeit, die für ^{213}Bi 45.6 min beträgt.

Biologisch wird die Radiosensitivität durch physiologische Veränderungen in hypoxischen Tumorzellen beeinflusst. Als zelluläre Reaktion auf eine verringerte Sauerstoffverfügbarkeit bewirkt HIF-1 Anpassungsreaktionen, die in der Summe die Radioresistenz gegenüber Photonenstrahlung steigern. Die HIF-1-Aktivität wird zudem von der Art und Dauer der Hypoxie beeinflusst (Moeller und Dewhirst, 2006). Durch die Bestrahlung selbst wird HIF-1 ebenfalls hochreguliert (Viola et al., 2008). Es ist zu vermuten, dass auch andere zelluläre Signalwege, wie die von mTOR und der UPR Auswirkungen auf die Radioresistenz haben. Das bedeutet, dass die Entwicklung der Radioresistenz unter Hyp-

oxie abhängig von der Anpassung des Zellmetabolismus an hypoxische Bedingungen ist.

Um dies zu berücksichtigen, wurden die CAL33 Zellen vor der Bestrahlung für 180 min unter Hypoxie inkubiert. Die Signalstärke der HIF-1 α -Bande nach Western-Blot und kolorimetrischer Darstellung auf einer PVDF-Membran, die ein Maß für die in der Zelle vorhandene HIF-1 α Menge ist, wurde als Kriterium für die Anpassung des Zellmetabolismus an die Hypoxie verwendet. HIF-1 α war erstmals 30 min nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen nachweisbar. Nach 3 h war das stärkste HIF-1 α -Signal nachweisbar. Nach den Zeiträumen, für die die CAL33 Zellen bei der Bestrahlung mit Photonen (6 h) und der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (3 h + 3 h) unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden, war das HIF-1 α -Signal ähnlich stark, wie nach 3 h Hypoxie (Abbildung 4.3). Das HIF-1 α Signal nahm nach dreistündiger Hypoxie und anschließender Inkubation unter normoxischen Bedingungen ab. HIF-1 α war nach dreistündiger Hypoxie und anschließender dreißigminütiger Inkubation unter Normoxie in annähernd gleichen Mengen wie in durchgehend normoxischen Zellen vorhanden. Entsprechend war das HIF-1 α Signal kaum mehr nachweisbar (Abbildung 4.4). Zwischen der jeweils dreistündigen Hypoxie dauerte die Zugabe von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb zu den Zellen 10 min. Demnach war der Zellmetabolismus bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb bis auf einen Zeitraum von ca. 10 min an die Hypoxie angepasst. Bei der Bestrahlung mit Photonen war der Zellmetabolismus durchgehend an die Hypoxie angepasst.

Sowohl die chemischen als auch die biologischen Ursachen der Radioresistenz wurden somit berücksichtigt. Damit ist gezeigt, dass die Protokolle, die für die Bestrahlung der CAL33 Zellen unter hypoxischen Bedingungen verwendet wurden adäquat sind.

5.6.3 Vergleichbarkeit der Versuchsprotokolle

Die Protokolle für Photonen- und ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb-Bestrahlung unterscheiden sich in folgenden Punkten. Die verwendete Zellzahl, die für den Klonogenen-Test in 24-Well-Platten ausgesät wurde, betrug für die Photonenbestrahlung 100 und für die ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb-Bestrahlung 200 Zellen pro Well. Diese Zellzahlen waren aufgrund der beobachteten Proliferation für die mikroskopische Auszählung im Klonogenen-Test zweckmäßig. Einen Einfluss

auf den Vergleich des klonogenen Zellüberlebens zwischen Normoxie und Hypoxie hat diese Wahl jedoch nicht. Für den Wst-Test wurden für beide Bestrahlungsprotokolle gleiche Zellmengen in 96-Well-Platten ausgesät.

Bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb wurden die CAL33-Zellen bereits vor der Inkubation unter Hypoxie und der Bestrahlung in die 24- bzw. 96-Well-Platten ausgesät. Dagegen erfolgte bei der Photonenbestrahlung die Inkubation unter Hypoxie und die Bestrahlung in 25cm²-Zellkulturflaschen. Die CAL33-Zellen wurden erst anschließend auf die 24- bzw. 96-Well-Platten für die Auswertung im WST- bzw. Klonogenen-Test transferiert. Die unterschiedliche Abfolge der Aussaat der Zellen in den beiden Bestrahlungsprotokollen hatte folgende Gründe: (i) Die Bestrahlung mit Photonen war in 24- bzw. 96-Well-Platten nicht möglich. Die Well-Platten konnten aus Platzgründen nur in horizontal liegende Hypoxiekammern eingebracht werden. Aufgrund der zylindrischen Form der Kammern, hätte eine gleichmäßige Dosisverteilung in horizontal liegenden Kammern nicht gewährleistet werden können. (ii) Die Zugabe von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb in 25cm²-Zellkulturflaschen und eine anschließende Umsiedlung der CAL33-Zellen in 24- bzw. 96-Well-Platten war nicht praktikabel, da die für die Umsiedlung nötigen Arbeitsschritte aufgrund der Radioaktivität zu zeitintensiv und zu aufwendig gewesen wären.

Die Reihenfolge der Aussaat hat jedoch keinen Einfluss auf den Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie, da sie innerhalb der Bestrahlungsexperimente mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb bzw. mit Photonen gleich ist.

Des Weiteren stimmen die Zeiten überein, für die die CAL33 Zellen bei den jeweiligen Bestrahlungsprotokollen hypoxisch waren. Da die Hypoxiekammer für die Zugabe von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb geöffnet werden musste, waren die CAL33-Zellen für ca. 10 min unter normoxischen Bedingungen. Eine entsprechende Öffnung der Hypoxiekammer vor der Photonenbestrahlung wäre nicht sinnvoll gewesen, da dann eine Bestrahlung unter hypoxischen Bedingungen in gleichen Zeiträumen wie bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb nicht möglich gewesen wäre. Es wird als entscheidend angesehen, dass – wie oben diskutiert – für beide Bestrahlungsprotokolle die ursächlichen Mechanismen der Radioresistenz berücksichtigt wurden.

Damit stimmen die Versuchsprotokolle für die Bestrahlung mit Photonen und mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb in den entscheidenden Punkten überein. Das Ergebnis der Photonenbestrahlung, das die in der Literatur angegebenen Werte für den OER bestätigt (vergleiche Kap. 5.5.5), rechtfertigt somit die Durchführung der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb in der beschriebenen Art und Weise.

5.7 Alpha- bzw. Hoch-LET-Strahlung unter Hypoxie – Bewertung der bisherigen Forschung

In früheren Arbeiten wurden bereits Versuche mit Hoch-LET-Strahlung unter Hypoxie durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten einen abnehmenden OER mit zunehmendem LET. Die am häufigsten verwendete Quelle für Alphastrahlung war eine externe ^{210}Po Quelle (Todd et al, 1967; Barendsen et al., 1966; Barendsen und Walter 1964). Später wurde zudem ^{238}Pu , ebenfalls in Form einer externen Quelle, eingesetzt (Jenner et al. 1993, Prise et al. 1990). Beide Nuklide waren in mit Helium gefüllten Kammern eingebracht, aus denen die Alphapartikel im Falle von ^{210}Po durch ein Mica-Fenster (Barendsen und Beusker, 1960) und im Falle von ^{238}Pu durch ein Hostaphan-Fenster (Goodhead et al., 1991) emittiert wurden. Daneben fanden Bestrahlungsexperimente mit Heliumionen, Deuteronen oder Alphateilchen statt, die in Zyklotrons oder Synchrotrons beschleunigt wurden (Guichard et al., 1977; Todd et al., 1974; Berry 1970; Feola et al., 1969; Todd et al., 1967, Barendsen et al., 1966).

In den genannten Untersuchungen erfolgte die Bestrahlung somit durch eine externe Quelle, d. h. die Strahlung musste eine Materialschicht durchdringen, um die Zellen in den Hypoxiekammern zu erreichen. Diese Vorgehensweise verursacht methodische Probleme aufgrund der geringen Reichweite von Hoch-LET- bzw. Alphastrahlung (beispielsweise beträgt die Reichweite für ^{210}Po mit einer Zerfallsenergie von 5.3 MeV maximal 37 μm in organischem Material bzw. Wasser). Die Zellen mussten auf dünne Membranen wie Melinex, mit einer Dicke von einigen Mikrometern, aufgebracht werden, um eine zu starke Abschirmung der Strahlung zu verhindern. Trotzdem war eine Bestrahlung der ganzen Zellen, mit einem Durchmesser von ca. 20 μm sowie eine homogene Dosisverteilung nicht gewährleistet (Barendsen und Beusker, 1960). Darüber hinaus kann Sauerstoff durch diese Membranen diffundieren. Deswegen ist es nicht möglich, konstante hypoxische Bedingungen zu erzeugen (Vergroesen et al.,

1962). Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Gründe für die Radioresistenz unter Hypoxie weitestgehend unbekannt. Die Zellen wurden direkt nach dem Erreichen hypoxischer Bedingungen bestrahlt. Biologische Effekte, die Einfluss auf die Radiosensitivität haben, wurden somit nicht berücksichtigt.

Die methodischen Probleme spiegeln sich in einer starken Schwankung des OER wieder. Es ergaben sich Werte in einem Bereich von etwa 1.0 (Prise et al. 1990) über 2.1 (Feola et al., 1969) bis 3.0 (Guichard et al., 1977) für Hoch-LET-Strahlung. Die Werte zeigen einerseits eine sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung, andererseits entsprechen sie dem OER von Niedrig-LET-Strahlung. Die Sammlung von OER-Daten für Alphastrahlung in der Literatur, von Wenzl und Wilkens (2011), dokumentiert dies ebenfalls.

Des Weiteren werden die genannten externen Bestrahlungsmethoden mit Alphateilchen und auch die meisten anderen der Hoch-LET-Strahlungen in der Klinik aufgrund technischer Limitationen und aufgrund von Nebenwirkungen nicht angewendet.

Aufgrund der beschriebenen Einschränkungen dieser Studien, wurde es als notwendig erachtet, die Wirkung von Alphastrahlung unter Hypoxie erneut zu überprüfen. Der hier verwendete Ansatz vermeidet die dargelegten Probleme und berücksichtigt chemische und biologische Mechanismen der Radioresistenzentwicklung. Daher bestätigt diese Arbeit erstmals eindeutig, dass Alphastrahlung, in diesem Fall als zellgebundene ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb Radioimmunkonjugate, Tumorzellen unabhängig von Sauerstoff abtötet. Ferner wird eine Erfolg versprechende Methode aufgezeigt, die potentiell klinisch anwendbar ist (vergleiche Kapitel 5.10.2).

5.8 Mechanismus der Radioresistenzentwicklung gegenüber Niedrig-LET- und Hoch-LET-Strahlung

Die chemischen Ursachen der Radioresistenz gegenüber ionisierender Strahlung mit einem niedrigen LET sind detailliert und einheitlich in der Literatur beschrieben. 1985 wurde erstmals von Shrieve und Harris gezeigt, dass auch biologischen Mechanismen die Radioresistenz beeinflussen. Welche Signalwege daran beteiligt sind, ist bis heute nicht ausreichend erforscht. Es gibt eine Vielzahl an Studien, die unterschiedlichste radiobiologische Prozesse untersuchen,

die die Resistenzentwicklung fördern. Außerdem ist die Gewichtung der Wirkung von chemischen und biologischen Mechanismen im Hinblick auf die Resistenzentwicklung unter Hypoxie nicht geklärt. Da die klinische Strahlentherapie von Tumoren bisher mit Photonen erfolgt, liegt der Fokus der Forschung zur Radioresistenzentwicklung unter Hypoxie vor allem auf Niedrig-LET-Strahlung. Die bisher beschriebenen biologischen Prozesse gelten daher vornehmlich für Strahlung mit einem niedrigen LET.

In der Literatur wird angenommen, dass Alphastrahlung eine sauerstoffunabhängige Wirkung auf Zellen hat. Diese Annahme beruht auf oben beschriebenen Versuchen mit externen Strahlenquellen und den dadurch bedingten Einschränkungen. Es ist nicht geklärt, weshalb Sauerstoff die Wirkung von Alphastrahlung nicht beeinflusst.

Im Folgenden werden sowohl die Mechanismen der hypoxiebedingten Radioresistenzentwicklung gegenüber Niedrig-LET-Strahlung und deren Bedeutung für Hoch-LET-Strahlung als auch Erklärungsansätze für die sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung diskutiert.

5.8.1 Verständnis der Radioresistenzentwicklung gegenüber Niedrig-LET-Strahlung unter Hypoxie

Niedrig-LET-Strahlung schädigt die DNA vor allem indirekt durch Radikalbildung. Dieser Vorgang und die Fixierung des DNA-Schadens sind sauerstoffabhängig (vergleiche Kap. 1.6.1, Abbildung 1.2). Der chemische Prozess ist genau beschrieben und erklärt. Dagegen sind die biologischen Mechanismen der Radioresistenz hypoxischer Zellen gegenüber Niedrig-LET-Strahlung unzureichend untersucht.

Die Beobachtung, dass die Art und Dauer der Hypoxie die Radioresistenz beeinflusst (Pettersen und Wang, 1996), belegt die Bedeutung von biologisch vermittelter Resistenz gegenüber Strahlung mit einem niedrigen LET. Die Radioresistenz ist unter chronischer Hypoxie geringer als unter akuter bzw. zyklischer Hypoxie (Moeller et al., 2007; Shrieve et al., 1983). Zudem bleibt der Effekt der chronischen und akuten Hypoxie auf die Radioresistenz auch nach Reoxygenierung der Zellen zunächst bestehen (Moeller et al., 2007; Shrieve und Harris, 1985). Diese Erkenntnis lässt sich nicht durch die chemischen Me-

chanismen der Radioresistenz erklären. Wäre die Radioresistenz nur durch die in Kapitel 1.6.1 genannten chemischen Reaktionen bedingt, würde die Art und Dauer der Hypoxie vor der Bestrahlung keine Rolle spielen. Das Fortwähren der hypoxieinduzierten Radioresistenz unter Normoxie bestätigt, dass zellbiologische Veränderungen stattgefunden haben.

Der am besten beschriebene Signalweg, der Einfluss auf die Radiosensibilität hypoxischer Zellen hat, ist der HIF-1-Signalweg. HIF-1 hat sowohl radioprotektive als auch radiosensitivierende Eigenschaften. Durch die Förderung der Apoptose, des Zellmetabolismus und der Zellproliferation wirkt HIF-1 radiosensitivierend auf Tumorzellen. HIF-1 wirkt radioprotektiv, indem Gefäße bzw. Endothelien vor Strahlung durch die Induktion von proangiogenetischen Zytokinen, wie VEGF und bFGF, geschützt werden. Es wurde in verschiedenen Studien belegt, dass HIF-1 in der Summe die Radioresistenz von Tumoren steigert (Moeller et al., 2005; Williams et al., 2005; Zhang et al., 2004). Die Begründung hierfür ist eher spekulativ. Nach Garcia-Barros et al. (2003) und Moeller und Dewhirst (2006) ist für die Gesamtwirkung der Strahlung auf einen Tumor die Schädigung des Gefäßsystems ein entscheidender Faktor. Denkbar ist, dass die radioprotektive Wirkung auf das Gefäßsystem eine größere Bedeutung für die gesamte Strahlenempfindlichkeit eines Tumors hat als die genannten radiosensitivierenden Wirkungen auf Tumorzellen (Moeller und Dewhirst 2006). Zudem ist es möglich, dass HIF-1 durch andere, noch nicht erforschte Effekte, die Radioresistenz von Tumoren steigert.

Die Tatsache, dass chronisch hypoxische Zellen sensibler gegenüber Strahlung sind als akut bzw. zyklisch hypoxische Zellen (Moeller et al., 2007; Shrieve et al., 1983), lässt sich durch eine gesteigerte HIF-1-Aktivität unter zyklischer Hypoxie erklären und belegt die radioprotektive Wirkung von HIF-1. Der HIF-1-Signalweg wird neben einem reduzierten $p[O_2]$ auch durch Radikale und Depolymerisation von Stressgranulaten aktiviert. Durch intermittierende Reoxygenierung, wie sie bei der zyklischen Hypoxie auftritt, wird die Anzahl freier Radikale erhöht, was die Akkumulation von HIF-1 fördert und somit die Radioresistenz steigert (Dewhirst et al., 2008).

Ebenso beeinflussen andere biologische Effekte die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit chronischer und akut hypoxischer Zellen. Chronische Hypoxie bewirkt einen Zellzyklusarrest durch Verhinderung des Übergangs von der G_1 in

die S-Phase (Box und Demetrick, 2004; Gardner et al. 2001; Shrieve und Harris, 1985). Dabei sind Zellen je nach Phase des Zellzyklus unterschiedlich sensibel gegenüber Strahlung. Die G₁-Phase ist neben der S-Phase am resistentesten gegenüber Strahlung. Langsam bzw. nicht proliferierende Zellen sind darüber hinaus strahlenresistenter als proliferierende Zellen (Reiser et al., 2006). Damit wirkt der Zellzyklusarrest unter chronischer Hypoxie auf der einen Seite radioprotektiv. Auf der anderen Seite kommt es nach Box und Demetrick (2004) durch den Arrest zu einer Herunterregulierung von HIF-1, wodurch die Radiosensitivität potentiell gesteigert wird. Des Weiteren ist unter chronischer Hypoxie die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eingeschränkt (Kumareswaran et al., 2012). Die Anzahl von Molekülen mit Thiol-Gruppen, die normalerweise DNA-Radikale reduzieren, ist vermindert (Shrieve und Harris, 1985). Zusätzlich wird die Mismatch-Reparatur sowie die homologe Rekombination (HR) HIF-1-unabhängig reduziert (Bindra et al., 2007). Dadurch ist einerseits die genetische Instabilität erhöht, andererseits ist die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden verringert, weshalb chronisch hypoxische Zellen sensitiver gegenüber Bestrahlung werden. Entsprechend wurde gezeigt, dass Zellen, in denen die DNA-Reparatur durch HR ausgeschaltet ist, signifikant strahlensensitiver sind als deren Wildtypform (Sprong et al., 2006). Unter akuter bzw. zyklischer Hypoxie wird dagegen durch die Kinasen ATM und ATR, die Zellzykluskontrollpunkte kontrollieren, die Fähigkeit zur HR gesteigert (Bindra et al., 2007).

Mögliche Auswirkungen der Signalwege von mTOR und der UPR auf die Radioresistenz sind noch nicht beschrieben. Es ist anzunehmen, dass mTOR durch seine proliferations- und wachstumshemmende Wirkung radioprotektiv wirkt, da Zellen mit niedrigen Proliferationsraten unempfindlicher gegenüber Strahlung sind als Zellen mit hohen Proliferationsraten (Bergonié-Tribondeau-Gesetz (Reiser et al. 2006)). Die UPR reduziert die Zellaktivität, indem die Proteinsynthese limitiert wird. Dies könnte ebenfalls radioprotektiv wirken.

Ein weiterer biologischer Vorgang, der die Radioresistenz steigert, ist die Hochregulierung von HIF-1 nach Bestrahlung (Viola et al., 2008). Durch strahleninduzierte Reoxygenierung und damit verbundener Radikalbildung und Depolymerisation von Stressgranulaten wird HIF-1 aktiviert und steigert die Radioresistenz (Harada et al., 2012; Moeller et al., 2004). Diese Feststellung steht im Wi-

derspruch zu der Tatsache, dass durch fraktionierte Bestrahlungsmethoden und der damit verbundenen Reoxygenierung die Wirksamkeit der Bestrahlung erhöht wird (Harada, 2011). Neben der Radikalbildung nach Reoxygenierung wäre es eine weitere plausible Möglichkeit, dass HIF-1 durch die strahleninduzierte Radikalbildung, also über den Weg der indirekten Strahlenwirkung, aktiviert wird.

Insgesamt zeigt sich, dass die biologischen Mechanismen, die zur Radioresistenz unter Hypoxie führen, durch eine komplexe Interaktion von verschiedenen Signalwegen charakterisiert sind. Diese sind noch nicht ausreichend untersucht und verstanden. Ein entscheidender Kritikpunkt an fast allen Studien ist, dass nicht geklärt wird, welchen Anteil die untersuchten biologischen Mechanismen an der gesamten Radioresistenz ausmachen. Es fehlt eine Angabe, wie beispielsweise die Veränderung des OER, mit der die Auswirkungen der biologischen Prozesse im Vergleich zu den chemischen Vorgängen quantifizierbar und vergleichbar werden. Nur Sprong et al. (2006) beziffern in ihrer Arbeit zum Einfluss der HR auf die Radioresistenz unter Hypoxie die Auswirkungen mit Hilfe des OER. Dabei ist der OER im Bezug auf zelluläres Überleben nach Bestrahlung von HR-defizienten Zellen unter Hypoxie um einen Wert von etwa 0.7 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen reduziert. Harada et al. (2012) beschreiben ein Studiendesign, bei dem die Auswirkungen von chemischen und biologischen Mechanismen unter Umständen besser getrennt werden können, indem Marker für HIF-1 (Anti-HIF-1 α -Antikörper) und für reduzierte Sauerstoffpartialdrucke (Pimonidazol) verwendet werden. Folglich sind weitere Untersuchungen zu diesem komplexen Wirksystem notwendig.

5.8.2 Erklärungsansätze für die sauerstoffunabhängige Wirkung von Hoch-LET-Strahlung

Einen ersten Erklärungsansatz für die sauerstoffunabhängige Wirkung von Hoch-LET-Strahlung lieferten Thoday und Read (1949) in ihren Experimenten mit pflanzlichen Zellen. Ihre Versuche ergaben einen OER für die Wachstumsrate von *Vicia faba* Wurzelspitzen nach Röntgen- bzw. Alphastrahlung von 2.5 bzw. 1.3. Hierbei war die Anzahl der chromosomalen Aberrationen in der Anaphase von *Vicia faba* Wurzelspitzen durch Röntgenstrahlung unter Anoxie, im Vergleich zu Normoxie, reduziert. Für Alphastrahlung war die Anzahl chromo-

somaler Aberrationen unter Anoxie und Normoxie nahezu gleich. Sie vermuteten daher, dass die Induktion von chromosomalen Aberrationen durch Alphastrahlung in *Vicia faba* Wurzelspitzen nicht durch die Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst wird.

Die Schädigung der DNA nimmt eine entscheidende Rolle beim strahlenbedingten Zelltod ein. Strahlung verursacht eine Vielzahl verschiedener DNA-Schäden. Dazu gehören DNA-Einzelstrangbrüche, Schädigungen der DNA-Basen (beispielsweise durch Hydroxylierung), Basenverluste, DNA-Doppelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Protein-Vernetzungen (Goodhead, 1993; Ward, 1988). Diese Schädigungen werden unterschiedlich effektiv repariert und haben so einen unterschiedlichen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit der Strahlung. Es wird angenommen, dass Doppelstrangbrüche und Quervernetzungen schlechter repariert werden können und deshalb hauptsächlich für die strahlenbedingte Apoptose verantwortlich sind (Goodhead, 1994). Aufgrund der höheren Ionisationsdichte von Hoch-LET-Strahlung ist die Wahrscheinlichkeit für einen irreparablen Schaden bei einer gegebenen Dosis größer als bei Strahlung mit einem niedrigen LET. Es wird angenommen, dass mit steigendem LET ein geklusterter bzw. komplexerer DNA-Schaden auftritt (Haro et al., 2012; Ward 1994; Goodhead, 1993, 1994). Als geklusterter DNA-Schaden wird das Vorhandensein von Doppelstrangbrüchen, Quervernetzungen und anderen Schäden auf engem Raum bezeichnet. Folglich ist es zu einfach, nur zwischen Doppelstrang-DNA-Brüchen und anderen Schäden zu unterscheiden. Desto komplexer und ausgeprägter der DNA-Schaden, desto schwieriger ist es für die Zelle diesen zu reparieren (Goodhead, 1994; Ward, 1988). Blöcher (1988), Jenner et al. (1993) und Haro et al. (2012) zeigten, dass die Reparaturrate von DNA-Schäden durch Alphastrahlung geringer ist, als die durch Photonenstrahlung. Die genannten Beobachtungen bezüglich des DNA-Schadens werden zudem als Grund für die hohe RBE von Alphastrahlung herangezogen (Ward 1994; Blöcher, 1988). Zusammenfassend impliziert dieses Modell, dass die Wirkung von Alphastrahlung bzw. Hoch-LET-Strahlung aufgrund der höheren Komplexität und geringeren Reparaturfähigkeit der verursachten DNA-Schäden unabhängig vom Vorhandensein von Sauerstoff ist.

In Fortführung dieser Arbeit wird deshalb vorgeschlagen zu untersuchen, ob die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb sauer-

stoffabhängig ist und ob sich deren Reparaturfähigkeit unterscheidet. Hierfür wäre eine Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche direkt nach Bestrahlung (Sauerstoffabhängigkeit) sowie zum Zeitpunkt der Auswertung des Klonogenen-Tests (Reparaturfähigkeit) mithilfe der von Seidl et al. (2011) vorgeschlagenen Methode durch immunologische Detektion von γ H2AX geeignet.

Die chemischen Reaktionen, die zu DNA-Schäden führen, werden direkt durch die ionisierende Strahlung oder indirekt durch Sauerstoffradikale, die in der Nähe der DNA entstehen, induziert (vergleiche Kap. 1.6.1). Die jeweilige Bedeutung der direkten und indirekten Schädigung der DNA und die Änderung ihres Anteils an der Schädigung mit steigendem LET ist eine weitere Erklärung für die sauerstoffunabhängige Wirkung von Hoch-LET-Strahlung:

Bei Niedrig-LET-Strahlung ist der Anteil der indirekten Strahlenwirkung auf die biologischen Effekte größer als der Anteil der direkten Strahlenwirkung. Roots und Okada (1972, 1975) beziffern den Anteil der indirekten Strahlenwirkung für Niedrig-LET-Strahlung auf 71 % bzw. 65 %. Mit steigendem LET nimmt der Anteil der indirekten Strahlenwirkung ab. Er beträgt 50 % bei einem LET von 180 keV/ μ m (Chapman et al., 1979) und 20 % - 25 % bei einem LET von 682 keV/ μ m (Roots et al., 1985; Hirayama et al., 2009). In einer der ausführlichsten Arbeiten hierzu, bestätigten Hirayama et al. (2009), dass der Anteil der indirekten Strahlenwirkung auf die Zelltötung mit steigendem LET abnimmt, indem sie die Reduktion der Strahlenwirkung durch Dimethylsulfoxid (DMSO) analysierten, das die indirekte Strahlenwirkung unterdrückt. Der indirekte Anteil nahm von 76 % bei einem LET von 9.4 keV/ μ m bis zu einem Minimum von 32 % bei einem LET von 2106 keV/ μ m ab. Darüber hinaus war die RBE für zehnpromotiges Zellüberleben bei einem LET von 200 keV/ μ m mit einem Wert von 2.88 maximal. Auch die getrennt errechnete RBE für indirekte und direkte Strahlenwirkung erreichte jeweils bei einem LET von 200 keV/ μ m einen maximalen Wert, wobei die RBE für die direkte Strahlenwirkung mit 5.99 deutlich über der RBE für die indirekte Strahlenwirkung mit 1.89 lag. Diese Beobachtung zeigt, dass die direkte Strahlenwirkung einen größeren Anteil an der hohen RBE von Hoch-LET-Strahlung trägt als die indirekte.

Zudem liefern die genannten Beobachtungen eine plausible Erklärung für die Abnahme des OER mit steigendem LET. Da der Mechanismus der indirekten Strahlenwirkung auf das Vorhandensein von Sauerstoff angewiesen ist (verglei-

che Kap. 1.5.1) und der Anteil der indirekten Strahlenwirkung mit steigendem LET abnimmt, reduzieren sich folglich die hypoxiebedingte Radioresistenz und damit der OER mit steigendem LET.

Aufgrund der hohen Reaktivität der Zellumgebung, die nur eine Diffusion der Radiolyseprodukte des Wassers im Nanometerbereich zulässt, sind die molekulare Veränderung nahe der Partikelflugbahn und deren stochastisches Verhalten für die Entstehung von DNA-Schäden wichtig (Goodhead 1994).

Die „Oxygen in the Track“-Hypothese, die schon vor Jahren durch Daniels et al. (1959) und Swallow und Velandia (1962) aufgestellt wurde, gründet ebenfalls auf diesem Sachverhalt und liefert eine weitere Erklärung für die Abnahme des OER mit steigendem LET. Meesungnoen und Jay-Gerin (2009) haben nachgewiesen, dass die Konzentration von Sauerstoff, der als Produkt bei der Radiolyse des Wassers durch Hoch-LET-Strahlung entsteht, in der Mikroumgebung der Flugbahn dicht ionisierender Partikel ausreicht, um den OER entsprechend zu reduzieren. Dieses Ergebnis besagt, dass Hoch-LET-Partikel auf ihrer Flugbahn eine Mikroumgebung erzeugen, die normoxischen Bedingungen entspricht und so den niedrigeren OER im Vergleich zu Niedrig-LET-Strahlung verursacht. Einschränkend ist hinzuzufügen, dass ihre Ergebnisse für reines Wasser gelten und nicht für das komplexe Milieu einer Zelle.

Die weniger erforschte Gegenhypothese, dass unter normoxischen Bedingungen Sauerstoff in der Umgebung der Flugbahn dicht ionisierender Partikel verbraucht wird, kann ebenfalls die gleiche biologische Wirksamkeit der Hoch-LET-Strahlung unter Normoxie und Hypoxie erklären. Sie beruht auf den thermoakustischen Effekten von Hoch-LET-Strahlung in Flüssigkeiten (Stuglik 1995).

Das „Multiple Radical“-Modell von Michael und Prise (1996) liefert eine ähnliche Erklärung wie die erstgenannte von Ward und Goodhead. Das Modell stellt eine Weiterentwicklung der Thesen von Alper und Howard-Flanders (1956) dar, auf denen die für Niedrig-LET-Strahlung gültige Sauerstoff-Fixierungs-Theorie basiert. Sie nahmen an, dass Sauerstoff durch die Interaktion mit den ionisierten Biomolekülen, d. h. den Radikalen, die Chancen für eine Reparatur reduziert. Ferner vermuten Michael und Prise, dass mit steigendem LET bzw. steigender Ionisationsdichte die Radikalvielfalt zunimmt. Die Anzahl und die Dichte der Radikale in DNA-Nähe nehmen zu. Dadurch treten Strangbrüche in geringerem Abstand voneinander auf. Durch Radikalinteraktionen werden Querverbindun-

gen innerhalb der DNA erzeugt. Wegen des komplexeren DNA-Schadens wird die Wahrscheinlichkeit einer sauerstoffunabhängigen Schadensfixierung größer. Entsprechend nimmt mit steigendem LET der OER ab.

Daneben gibt es weitere Gründe für eine sauerstoffunabhängige Wirkung von Hoch-LET-Strahlung, die nicht die DNA betreffen. Hoch-LET-Strahlung kann zu einer vermehrten Störung der Proteinsynthese und Schädigung von Proteinen bzw. Enzymen führen, welche im Vergleich zur DNA strahlenunempfindlicher sind. Strukturen außerhalb des Zellkerns, wie Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum, die erst bei hohen Dosen von Niedrig-LET-Strahlung einen Schaden erleiden, werden aufgrund der höheren RBE der Hoch-LET-Strahlung stärker geschädigt. Des Weiteren wird die Strahlenwirkung durch die Akkumulation von subletalen Zellschäden beeinflusst, die abhängig vom Gewebe mehr oder weniger gut repariert werden können. Mit steigendem LET nimmt die Fähigkeit der Zelle zur Reparatur des subletalen Schadens ab (Reiser et al. 2006).

Insgesamt findet man eine Reihe verschiedener Erklärungsansätze, die experimentell belegt aber mit verschiedenen Einschränkungen verbunden sind. Die sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung bzw. Hoch-LET-Strahlung kommt wahrscheinlich durch eine Interaktion der beschriebenen Prozesse zustande. Diese Vermutung muss durch weiterführende Untersuchungen belegt werden.

Weiter stellt sich die Frage, ob die biologischen Mechanismen, die die Radiosensitivität gegenüber Photonenstrahlung beeinflussen, auch für Hoch-LET- bzw. Alphastrahlung eine Rolle spielen: Wird HIF-1 α beispielsweise auch durch Alphastrahlung induziert? Kann Alphastrahlung die radioprotektive Wirkung von HIF-1 auf Endothelzellen überwinden? Welche Rolle haben die enzymatischen Reparaturprozesse der Zelle an den komplexen DNA-Schäden, die durch Hoch-LET-Strahlung verursacht werden? Die mögliche Bedeutung biologischer Prozesse für die Wirkung von Hoch-LET-Strahlung muss vor allem noch in vivo untersucht werden. Die Experimente vorliegender Arbeit zeigen, dass die Wirkung von Hoch-LET-Alphastrahlung in vitro unabhängig von Sauerstoff ist und dass sowohl biologische als auch chemische Mechanismen der Radioresistenz

hypoxischer Zellen, die gegenüber Niedrig-LET-Strahlung auftreten, keine Rolle spielen.

5.9 Diskussion der bisherigen Strategien gegen Radioresistenz in hypoxischen Tumoren

Die eingangs erwähnten Strategien, Radioresistenz in hypoxischen Tumoren zu begegnen, sind nur teilweise Erfolg versprechend und finden nur begrenzte klinische Anwendung. Sie sind mit Nebenwirkungen behaftet, die einen uneingeschränkten Einsatz in Frage stellen. Die Verwendung einiger repräsentativer Substanzen wird folgend diskutiert.

Die Steigerung der Sauerstoffverfügbarkeit in Tumoren mit in Kapitel 1.8 genannten Mechanismen führt zu einer erhöhten Toxizität der Strahlung gegenüber Normalgewebe (Moeller et al., 2007) und zeigt nicht den gewünschten Erfolg. Diese Strategie wird daher in der Klinik nicht angewendet. Dennoch heben Jordan und Sonveaux (2012) hervor, dass eine gesteigerte Sauerstoffversorgung, kombiniert mit einer gleichzeitigen Senkung des Sauerstoffverbrauchs der Tumorzellen, sehr effektiv ist, um die Sauerstoffkonzentration im Tumor zu erhöhen. Hyperthermie bewirkt diese Kombination und zeigt in klinischen Studien eine Verbesserung des Outcomes. Zudem könnte die Bioverfügbarkeit von Chemotherapeutika verbessert werden. Allerdings ist zu bedenken, dass ebenfalls die Toxizität der Strahlung gegenüber Normalgewebe erhöht werden kann und dass Hyperthermie HIF-1 induziert (Moon et al., 2010).

Klassische Zytotoxine und hypoxiespezifische Zytotoxine sind aufgrund der Schädigung von Normalgewebe und der Steigerung von strahlentherapiebedingten Nebenwirkungen (Bischoff et al., 2009) noch nicht ausreichend entwickelt. Tirapazamin schädigt Normalgewebe, das Regionen milder Hypoxie enthält, und wirkt deshalb okulo- und myelotoxisch. Daher werden Substanzen (Dinitrobenzamid-Mustards) entwickelt, die nur bei sehr niedrigen $p[O_2]$ aktiviert werden, und dann durch Diffusion umliegende, weniger hypoxische Zellen abtöten (Brown und Wilson, 2004). Eine weitere nebenwirkungsärmere Substanzgruppe, die Dinitroazetidine, werden aktuell in einer Phase-I-Studie klinisch getestet (Ning et al., 2012). Allerdings stellt die geringe Bioverfügbarkeit all dieser Substanzen in hypoxischen Regionen ein entscheidendes Problem dar.

Neben den in der Einleitung erwähnten Radiosensitizern, wird auch Stickstoffmonoxid (NO) in klinischen Studien auf seine Wirksamkeit untersucht. NO steigert das Ausmaß des DNA-Schadens nach Strahlentherapie effektiver als Sauerstoff (Bischoff et al., 2009). Problematisch ist aber, dass NO HIF-1 hochreguliert und so wiederum die Radioresistenz steigert (Mateo et al., 2003; Li et al. 2007). Dementsprechend demonstrierten Saleem et al. (2011), dass eine Reduktion der NO-Level die Radiosensitivität von Lungenkarzinomen erhöht. Eine weitere interessante Möglichkeit, den Tumor gegenüber Strahlentherapie zu sensibilisieren und gleichzeitig eine toxische Wirkung zu erzeugen, ist der Einsatz von Prodrugs, die durch Strahlung aktiviert werden. Diese Substanzen werden durch Elektronen aktiviert, die bei der Radiolyse des Wassers entstehen. Bisher findet aber keiner dieser Stoffe klinische Anwendung (Brown und Wilson, 2004).

Der Vorteil die Signalwege, die zur Anpassung an die Hypoxie führen, zu inhibieren, besteht nicht nur in der radiosensitivierenden Wirkung, sondern auch in der Limitation der Tumorphagenese, die durch sie vermittelt wird. Da für die meisten in der Entwicklung befindlichen Substanzen, wie auch für YC-1, das Zielmolekül unbekannt ist, durch das der Signalweg gehemmt wird, sind mögliche Nebenwirkungen noch nicht absehbar. HIF-1 wird ubiquitär exprimiert. Eine Blockade des Signalweges, der auch durch eine Reihe anderer Faktoren beeinflusst wird, könnte im Normalgewebe unerwünschte Wirkungen verursachen. Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, in denen HIF-1 eine protektive Rolle zukommt, wären für eine solche Therapie nicht geeignet. Andere molekulare Ziele zur Erhöhung der Radiosensitivität sind DNA-Reparaturenzyme. Die Kinasen ATM und ATR steigern unter akuter Hypoxie die HR, wodurch Zellen radioresistenter werden (Bindra et al., 2007; Sprong et al., 2006). Beispielsweise erhöhte der neuartige ATM-Inhibitor KU-55933 *in vitro* die strahleninduzierte Toxizität signifikant (Dumont et al., 2009). Indes wird durch eine generelle Blockade von DNA-Reparaturmechanismen das Risiko von sekundären malignen Erkrankungen erhöht. Eine Inhibition der DNA-Reparatur müsste selektiv im Tumor erfolgen.

Bei der HIF-1-kontrollierten Gentherapie ist eine sichere Tumorspezifität ebenfalls nicht gegeben, da HIF ubiquitär vorkommt. Eine Genexpression der zytotoxischen Substanzen wäre auch in normalem Gewebe denkbar. Bei einer loka-

len Verabreichung der Vektoren für die Gentherapie würde dieses Problem nicht auftreten, der Einsatz würde sich aber auf wenige, erreichbare Tumore beschränken. Die Verwendung apathogener Formen von Clostridien als Vektoren stellt eine zusätzliche, spezifischere Methode dar, um vor allem anoxische bzw. nekrotische Regionen mit der Gentherapie zu erreichen. Die obligat anaeroben Clostridien können nur unter Anoxie überleben und garantieren so eine hohe Tumorspezifität (Brown und Wilson, 2004; Lemmon et al., 1997).

Es ist zu verzeichnen, dass die medikamentösen Strategien gegen hypoxiebedingte Radioresistenz noch mit zahlreichen Problemen behaftet sind. Zytotoxine besitzen bei einer hohen Wirksamkeit ausgeprägte Nebenwirkungen. Substanzen gegen molekulare Ziele zeigen eine höhere Spezifität bei einem milderem Nebenwirkungsprofil und sind deshalb mit aktuellen Standardtherapien besser kombinierbar (Wilson und Hay, 2011). Allerdings ist es wegen der komplexen Interaktion vieler Signalwege schwierig, geeignete Zielstrukturen zu identifizieren. Aufgrund der schlechten vaskulären Versorgung des Tumorgewebes ist eine unzureichende Bioverfügbarkeit ein zentrales Problem aller Stoffe. Für eine erfolgreiche Anwendung sollte die nächste Generation dieser Medikamente eine verbesserte Pharmakokinetik und ein kleineres Nebenwirkungsprofil aufweisen. Zudem wäre es wichtig, Patienten, die von einer hypoxiespezifischen Therapie profitieren könnten, vor der Behandlung zu identifizieren, um zusätzliche Nebenwirkungen zu vermeiden.

Fraktionierte Bestrahlungsmethoden reduzieren durch Reoxygenierung nach jeder Behandlung die Zahl der hypoxischen Zellen. So wird die Wirksamkeit gegenüber hypoxischen Tumoren erhöht (Harada, 2011). Allerdings wird durch eine Reoxygenierung auch HIF-1 aktiviert (Viola et al., 2008). Da HIF-1 radio- protektiv wirkt (Moeller und Dewhirst, 2006) und die Tumorphathogenese fördert, ergibt sich hieraus ein Widerspruch. Welcher Einfluss der fraktionierten Bestrahlung auf die Faktoren Reoxygenierung, Redistribution des Zellzyklus, Reparaturfähigkeit und Repopulation (4 R's der Strahlenbiologie) (Pajonk et al., 2010) für eine bessere biologische Wirksamkeit verantwortlich ist, bleibt daher ungeklärt.

Bei der IMRT sollen radioresistentere Tumorregionen mit bildgebenden Verfahren erkannt und durch eine gezielte Bestrahlung mit einer höheren Dosis ähn-

lich stark geschädigt werden wie umliegende Tumorareale. Hierbei werden hypoxische Gewebeareale beispielsweise mit hypoxiespezifischen Tracern (z. B. Nitroimidazole wie Misonidazol), die mit Positronen emittierenden Radionukliden (^{18}F oder ^{11}C) markiert sind, in der Positronenemissionstomographie (PET) dargestellt. Mit Hilfe einer simultanen Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) lassen sich die hypoxischen Bereiche anatomischen Strukturen zuordnen. Mit diesen Informationen wird nachfolgend eine gezielte Bestrahlung der hypoxischen Regionen bewerkstelligt. Informationen, ob eine Berücksichtigung im Behandlungsplan sinnvoll ist und ob ein besseres Outcome erzielt werden kann, stehen noch aus. Einschränkungen ergeben sich durch die Diskrepanz zwischen der räumlichen Auflösung der bildgebenden Verfahren im Millimeterbereich und der Größe hypoxischer Tumorgebiete im Mikrometerbereich. Die Tracerakkumulation kann in sehr kleinen Regionen aufgrund der eingeschränkten Auflösung unterschätzt werden. Zudem ist das Signal-Rausch-Verhältnis der Hypoxietracer im Vergleich zu den Tracern schlechter, die bereits in der klinischen Routine verwendet werden (Gaertner et al., 2012). Ein weiteres Problem für eine adäquate Bildgebung von radioresistenten Tumorregionen besteht darin, dass hypoxische Areale nicht zwangsläufig mit HIF-1-positiven Arealen (die in der Bildgebung nicht dargestellt werden) übereinstimmen. HIF-1 wird nicht nur durch niedrige $p[\text{O}_2]$, sondern auch durch andere Faktoren hochreguliert (Semenza, 2012b; Harada, 2011) und kann dementsprechend in normoxischen Tumorregionen auftreten. Diese Bereiche werden durch die vorhandenen Bildgebungsverfahren für Hypoxie nicht erfasst, zeigen aber eine erhöhte Radioresistenz. Deshalb wäre es wichtig, sowohl hypoxische als auch HIF-1-positivere Bereiche bildgebend darzustellen, um alle radioresistenten Tumorregionen bei der IMRT zu erfassen. Dies müsste wegen der starken Variabilität der $p[\text{O}_2]$ innerhalb des Tumors im Bereich von Minuten (Bristow und Hill, 2008) simultan erfolgen. Wie bereits gezeigt, ist die Bildgebung hypoxischer Tumorareale in einem klinischen Setting nach drei Tagen nicht mehr reproduzierbar (Gaertner et al., 2012; Lin et al., 2008; Nehmeh et al., 2008).

Es ist nicht sicher, inwieweit die Probleme der konventionellen Strahlentherapie hypoxischer Tumore sowie die oben diskutierten Probleme der Strategien

gegen Radioresistenz überwunden werden können. Deshalb ist es notwendig, für hypoxische Tumore alternative Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

5.10 Therapie solider Tumore mit hypoxischen Gewebearealen durch Hoch-LET-Strahlung

Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Studien zeigen, dass Hoch-LET-Strahlung geeignet und Erfolg versprechend für die Therapie hypoxischer Tumore ist. Die Forschung hierzu befindet sich noch in den Anfangsstadien. Dementsprechend muss noch eine Vielzahl an Hindernissen bewältigt werden. Die Vor- und Nachteile der Therapie mit Hoch-LET-Strahlung sollen im Folgenden vor allem im Hinblick auf die Alpha-Radioimmuntherapie und mögliche weiterführende Modifikationen des Ansatzes mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb erörtert werden.

5.10.1 Weitere Therapieansätze zur Behandlung hypoxischer Tumore mit Hoch-LET-Strahlung (neben der Alphastrahlung)

Einen Ansatz zur Therapie hypoxischer Tumore mit einem Radionuklid untersuchten Weeks et al. (2010). Sie koppelten ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12.7$ h), das u.a. Hoch-LET-Augererelektronen emittiert (44 % Augerelektronen, 36 % β^- -Partikel, 18 % β^+ -Partikel), an den Hypoxietracer ATSM. Sie zeigten, dass der ^{64}Cu -ATSM-Komplex hypoxische MCF-7 Tumorzellen in vitro selektiv und effektiv abtötet. Allerdings ist ^{64}Cu -ATSM damit eher als hypoxiespezifisches Zytotoxin anzusehen. Ob die Strahlung von ^{64}C hypoxische Zellen genauso wirksam abtötet wie normoxische und damit die Radioresistenz überwindet, wird nicht eindeutig belegt.

Studien einer japanischen Forschungsgruppe des Nationalen Instituts für radiologische Wissenschaften in Chiba zeigen, dass die Strahlentherapie mittels Zyklotron mit Hoch-LET-Kohlenstoffionen (^{12}C) geeignet sein kann, hypoxische Tumore zu behandeln. Furusawa et al. (2000) errechneten einen abnehmenden OER mit zunehmendem LET der ^{12}C -Ionenstrahlung. Ab einem LET von über 300 keV/ μm betrug der OER 1.2. Für therapeutische ^{12}C -Ionenstrahlung wird ein OER von 1.6 angenommen, da sie aus einem Gemisch aus Hoch- und Niedrig-LET-Strahlung besteht. In einer ersten klinischen Studie wurde bestätigt,

dass die Hoch-LET- ^{12}C -Ionen-Strahlentherapie geeignet ist, hypoxiebedingte Radioresistenz zu reduzieren. Bei Patienten mit Zervixkarzinomen wurden gleiche lokale Tumorkontrollraten für hypoxische und normoxische Tumore erreicht. Die 4-Jahresüberlebensrate betrug allerdings für Patienten mit hypoxischen Tumoren 21 %, für Patienten mit normoxischen 39 %. Nach der statistischen Analyse war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (Nakano et al., 2006). Zu Nebenwirkungen der Strahlung wurden keine Angaben gemacht. Es ist anzunehmen, dass diese vor allem lokal stark ausgeprägt waren, weil die externe hochenergetische Strahlung zunächst das Normalgewebe durchdringen muss. Da die therapeutische ^{12}C -Ionenstrahlung aus einem Gemisch aus Hoch- und Niedrig-LET-Strahlung besteht, ist nach Antonovic et al. (2012) eine Berücksichtigung der LET- und Hypoxie-Verteilung erforderlich, um eine optimale Therapie zu erreichen. Hierfür ist eine Messung des $p[\text{O}_2]$ nötig. Diese müsste aus denselben Gründen wie bei der IMRT simultan erfolgen (vergleiche Kap. 5.9) und wäre nach aktuellem Entwicklungsstand schwer zu realisieren.

Ein entscheidender Vorteil der Alpha-Radioimmuntherapie gegenüber den beiden genannten Therapieansätzen und der IMRT, der sich aus der sauerstoffunabhängigen Wirkung ergibt, besteht darin, dass ein „Hypoxie-targeting“ prinzipiell nicht nötig ist. Im Gegensatz zur Behandlung mit Niedrig-LET-Strahlung, im Sinne einer IMRT, müssen hypoxische Bereiche nicht mit höheren Dosen bestrahlt werden, um dort eine entsprechende zytotoxische Wirkung zu erzielen wie in normoxischen Bereichen. Eine Messung des $p[\text{O}_2]$, wie bei der IMRT und ^{12}C -Ionen-Bestrahlung, ist nicht notwendig. Zudem ist die Verabreichung von Substanzen wie ^{64}Cu -ATSM, die gezielt hypoxisches Gewebe schädigen und damit eine hohe Tumorspezifität erreichen sollen, generell in Frage zu stellen. Da beispielsweise Thymus und Leber im Mittel hypoxische Areale aufweisen (Moeller 2006) und andere Normalgewebe wie Knochenmark, Haut, Testis, Retina und Knorpel ebenfalls Regionen milder Hypoxie enthalten (Brown und Wilson, 2004), können diese Gewebe bei einer entsprechenden Behandlung verstärkt geschädigt werden. Fraglich ist auch, ob die Bioverfügbarkeit in hypoxischen Regionen ausreichend ist (vergleiche Kap.5.10.2).

5.10.2 Therapie solider Tumore mit hypoxischen Gewebearealen durch Alphastrahlung emittierende Radioimmunkonjugate

Abgesehen von den genannten Hoch-LET-Strahlungen ist vor allem die Alphastrahlung für die Therapie hypoxischer Tumore vielversprechend. Neben der sauerstoffunabhängigen Wirkung ist die Radionuklidtherapie mit Alphastrahlern aufgrund der höheren RBE, einer durch geeignete Trägersubstanzen erzielten hohen Tumorspezifität, einer geringen Reichweite, der damit verbundenen potentiellen Schonung von Normalgewebe und der Erreichbarkeit von disseminierten Metastasen gegenüber der Behandlung mit Niedrig-LET-Strahlung vorteilhaft. Die Nebenwirkungen werden vor allem durch die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Radionuklide und die Pharmakokinetik der Trägermoleküle beeinflusst. Aufbauend auf den Vor- und Nachteilen einer Alpha-Radioimmuntherapie werden im Folgenden Vorschläge für weiterführende Veränderungen des in dieser Arbeit verwendeten ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb Radioimmunkonjugats im Hinblick auf den Einsatz in der Therapie von soliden hypoxischen Tumoren entwickelt.

Nebenwirkungen:

Nebenwirkungen der Therapie mit Radioimmunkonjugaten treten vor allem in der Niere und im Knochenmark auf. Die Niere ist in der ^{213}Bi -Radioimmuntherapie einer erhöhten Strahlenbelastung ausgesetzt, da freies Bi in Einschlusskörperchen der Nieren gespeichert wird und niedermolekulare Proteine (d.h. auch die Trägermoleküle) von den Nieren selektiv reabsorbiert werden. Letzteres kann durch die Gabe von kationischen Aminosäuren wie D-Lysin abgeschwächt werden (Huber, 2003a; Behr et al., 1997).

Wie bei allen Strahlentherapien können auch nach Therapie mit Alphastrahlung sekundäre Tumorerkrankungen auftreten (Reiser et al., 2006). Nach Gabe des ^{232}Th -haltigen Kontrastmittels Thorotrast, das zwischen 1930 und 1955 eingesetzt wurde, sind sekundäre maligne Entartungen durch verzögert auftretende Mutationen dokumentiert. Das Alphastrahlung emittierende ^{232}Th besitzt eine $T_{1/2}$ von 14×10^6 Jahren und wird nur langsam ausgeschieden (Ishikawa et al., 2001). Für Nuklide wie ^{213}Bi mit einer deutlich kürzeren $T_{1/2}$ und einer schnellen Elimination aus dem Körper sind bisher keine Langzeitfolgen beschrieben.

Eine Schädigung von Normalgewebe lässt sich bei der Radioimmuntherapie mit Alphaemittern nicht vermeiden. Sawant et al. (2002) zeigten für Alphastrahlung, dass unbestrahlte Zellen in direkter Nachbarschaft von bestrahlten Zellen ebenfalls geschädigt werden (Bystander-Effekt). Allerdings ist aufgrund der geringen Reichweite von Alphastrahlung nur ein wesentlich kleinerer Bereich des normalen Gewebes von der Strahlung selbst und dem Bystander-Effekt betroffen als bei anderen Strahlenarten.

Die bisher durchgeführten klinischen Studien bestätigen, dass bei der Alpha-Radioimmuntherapie kaum Nebenwirkungen auftreten. Eine lokale Verabreichung von Alpha-Radioimmunkonjugaten ist besonders unkritisch. In der intrakavitären Therapie von Glioblastomen konnten Zalutsky et al. (2007) (^{211}At -ch81C6) keine dosislimitierende Toxizität feststellen. Sie beobachteten nur eine geringe Hämatotoxizität aber keine Neurotoxizität. Cordier et al. (2010) (^{213}Bi -DOTA-Substanz P) sahen in ihrer Studie zu Glioblastomen weder eine lokale noch eine systemische Toxizität. Bei der lokalen Radioimmuntherapie (^{211}At -MX35) der Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinomen traten keine Nebenwirkungen auf (Andersson et al., 2009). In der Phase-I-Studie zur systemischen ^{213}Bi -Lintuzumab-Therapie der akuten myeloischen Leukämie wurde keine extramedulläre Toxizität registriert (Jurcic et al., 2002). In der folgenden Phase-I/II-Studie zur Determinierung der maximal tolerierbaren Dosis traten neben den zu erwartenden Komplikationen durch die Myelosuppression transiente Leberfunktionsstörungen auf. Ansonsten war die Behandlung nebenwirkungsarm (Rosenblatt et al., 2010). Bei einer systemischen Gabe von Radioimmunkonjugaten (^{213}Bi -cDTPA-9.2.27) zur Behandlung vom metastasierten Melanom verursachte keine der verabreichten Dosen toxische Nebenwirkungen (Raja et al., 2007).

Auch die mit 921 Patienten sehr umfangreiche Phase-III-Studie zur systemischen Radionuklidtherapie des metastasierten Prostatakarzinoms mit ^{223}Ra -Dichlorid, bei der im Vergleich zur Placebo-Gruppe keine vermehrten unerwünschten Ereignisse in der ^{223}Ra -Dichlorid-Studiengruppe auftraten (Parker et al., 2013), zeigt, dass eine Therapie mit Alphastrahlern ohne unerwünschte Nebenwirkungen möglich ist.

Die Studien zum Melanom, der akuten myeloischen Leukämie und dem Prostatakarzinom, bei denen auch hypoxische Tumorzellen vorhanden sein können

(Vaupel und Mayer, 2007), lassen vermuten, dass sich ebenfalls eine nebenwirkungsarme systemische Therapie von hypoxischen Tumoren durchführen lässt.

Tumorgröße und -lokalisierung:

Oben genannte klinische und auch präklinische Studien zeigen, dass die Alpha-Radioimmuntherapie nach dem momentanen Entwicklungsstand ideal für leicht erreichbare Tumorzellen, Mikrometastasen und disseminierte Tumorerkrankungen geeignet ist. Solide Tumore sprechen bisher weniger auf die Radioimmuntherapie an (Goldenberg, 2002). Beispielsweise stellten Rosenblatt et al. (2010) fest, dass die Remissionsrate bei Patienten mit größeren Leukämiezellaggregaten geringer ist. Die Begründung ergibt sich aus der geringen Reichweite von Alphapartikeln, verbunden mit einer schlechteren Bioverfügbarkeit der Radioimmunkonjugate mit zunehmender Tumorgröße. Behr et al. (1997) stellten bezüglich der Bioverfügbarkeit eine inverse Beziehung zwischen Tumorgröße und Antikörperuptake für Anti-CEA-Antikörper fest. Dabei wird die Bioverfügbarkeit durch die schlechte Vaskularisierung, die auch für die Hypoxie verantwortlich ist, verringert. Eine abnormale Gefäßstruktur und ein inadäquater Lymphabfluss steigern den interstitiellen Druck und senken damit die Diffusionsfähigkeit der Trägermoleküle (Huang et al., 2012).

Die Vor- und Nachteile der kurzen Reichweite sollen am nächsten Beispiel veranschaulicht werden. Wegen der geringeren Reichweite von ^{213}Bi im Vergleich zum β -Emitter ^{90}Y waren die beiden Nuklide in einem Lungenmetastasenmodell bei Mäusen nur bis zu einer Zellverbandsgröße von 2000 Zellen ähnlich effektiv. Bei größeren Metastasen erzielte ^{90}Y einen besseren Therapieerfolg als ^{213}Bi . Allerdings waren nach Bestrahlung mit ^{90}Y die pneumotoxischen Nebenwirkungen deutlich ausgeprägter (Kennel et al., 1999). Dieses Ergebnis demonstriert zwar, dass sich mit größerer Reichweite größere Tumoren leichter und effektiver bestrahlen lassen, dass aber die Schwere der Nebenwirkungen durch eine gesteigerte Bestrahlung von Normalgewebe zunimmt. Dementsprechend ist mit α -Emittern bei disseminierten Tumorerkrankungen ein 1000-faches Tumor-zu-Ganzkörper-Bestrahlungsverhältnis zu erreichen (Sgouros et al., 1999). Daher ist es erstrebenswert, die Bioverfügbarkeit der Radioimmun-

konjugate für solide Tumore zu verbessern (vergleiche folgenden Abschnitt „Weiterführende Modifikationen“ in diesem Kapitel).

Daneben zeigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Dahle, dass mit dem langlebigen Alpha-Radionuklid ^{227}Th ($T_{1/2} = 18.7$ d) mit niedriger Dosisleistung auch makroskopische Tumore effektiv bestrahlbar sind. Das ^{227}Th -Rituximab Konjugat erzielte in der Therapie makroskopischer Lymphome bei Mäusen einen um den Faktor 2.5 bis 7.2 besseren therapeutischen Erfolg als das klinisch geprüfte ^{90}Y -Tiuxetan-Ibritumomab und als externe Strahlentherapie. Therapeutisch relevante Strahlendosen wurden in Untersuchung zu Langzeitnebenwirkungen gut toleriert. (Dahle et al., 2007, 2008, 2010)

Halbwertszeit:

Die $T_{1/2}$ stellt ein wichtiges Kriterium für die Auswahl des Radionuklids dar. Sie muss einerseits ausreichend lang für die Dauer des Kopplungsverfahrens an den Antikörper, die Bioverteilung und die Wirkung im Zielgewebe sein und andererseits kurz genug, um Nebenwirkungen durch eine übermäßige Strahlenexposition zu vermeiden. Die relativ kurze $T_{1/2}$ von ^{213}Bi schränkt die Anwendung bisher auf leicht erreichbare Tumorzellen, wie Leukämiezellen und kleine Tumorzellverbände, sowie die direkte intratumorale Injektion ein. Adams et al. (2000) vermuten aufgrund gleicher Überlebensraten von Mäusen mit Ovarialkarzinom nach systemischer Gabe von einem spezifischen und unspezifischen ^{213}Bi -Radioimmunkonjugat, dass die $T_{1/2}$ von ^{213}Bi zu kurz für eine systemische Therapie von soliden Tumoren ist. Allerdings ist eine unzureichende Tumorpenetration des ^{213}Bi -Radioimmunkonjugats eine weitere denkbare Ursache für dieses Ergebnis. Eine ausreichende Tumorpenetration war zwar in der Arbeit von Kennel et al. (2002) zur Behandlung eines Trachealkarzinoms mit ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten gegeben, trotzdem konnte kein therapeutischer Effekt erzielt werden.

Daher müssen die Verteilungskinetik und die Halbwertszeit eines Radionuklids für eine effektive Therapie aufeinander abgestimmt sein. Wegen der schlechten Erreichbarkeit ist vor allem bei der Therapie von soliden Tumoren eine längere $T_{1/2}$ nötig, um einen ausreichenden therapeutischen Effekt zu erzielen.

^{211}At scheint aufgrund der längeren $T_{1/2}$ von 7.2 h besser mit der Pharmakokinetik der Trägermoleküle übereinzustimmen, allerdings ist sein Einsatz durch

eine geringe Verfügbarkeit und limitierte radiochemische Reinheit eingeschränkt (Kim und Brechbiel, 2012).

Eine weitere Lösung, der relativ kurzen $T_{1/2}$ von ^{213}Bi zu begegnen, ist die Verwendung eines ^{225}Ac -Radioimmunkonjugates mit einer $T_{1/2}$ von 10 d. Da ^{213}Bi aus ^{225}Ac durch 3 Alphazerfälle über ^{221}Fr und ^{217}At entsteht (Abbildung 3.6), kann ^{225}Ac als „in vivo Generator“ oder „Nanogenerator“ betrachtet werden (Kim und Brechbiel, 2012). Problematisch ist hierbei die Chelatierung des instabilen ^{225}Ac und seiner Tochternuklide aufgrund veränderter chemischer Eigenschaften. Zudem ist die Rückstoßenergie einer α -Partikelemission höher als die Bindungsenergie des Chelatkomplexes. Eine suffiziente Bindung der Radionuklide ist demnach nicht zwingend gewährleistet und eine höhere Toxizität gegenüber Normalgewebe zu befürchten. Sofou et al. (2007) versuchten in vitro durch den Einschluss von ^{225}Ac in multivesikulären Liposomen eine hohe Retention von ^{225}Ac und den Tochternukliden am Tumor zu erreichen. 98 % des ^{225}Ac und 31 % des Tochternuklids ^{213}Bi konnten hierbei in den Liposomen gehalten werden. Essler et al. (2012) vergleichen in ihrer Arbeit die Effektivität von ^{213}Bi -DTPA und ^{225}Ac -DOTA gekoppelt an das Tumor-homing Peptid F3 in der Behandlung einer Peritonealkarzinose im Mausmodell. Sie errechneten für ^{225}Ac einen um den Faktor 1000 höheren Antitumoreffekt als für ^{213}Bi . Der Einsatz von äquivalenten Aktivitäten (die in vitro dasselbe klonogene Überleben verursachen) von ^{213}Bi -DTPA und ^{225}Ac -DOTA-F3 zeigte für beide Radionuklide gleiche Überlebensraten. Dabei war die nephrotoxische Wirkung durch freie Radionuklide in einem Beobachtungszeitraum von 100 d nur gering. Mögliche Ursachen hierfür sind eine Internalisierung des ^{225}Ac -DOTA-F3-Komplexes und damit auch der Tochternuklide von den Tumorzellen, eine schnelle Ausscheidung der freien Tochterradionuklide oder ein erst verzögert auftretender Effekt auf die Nieren. Eine Langzeit-Nierentoxizität, verursacht durch die Akkumulation von ^{221}Fr und ^{213}Bi in den Nieren, konnten Song et al. (2009) beobachten. Beim Einsatz des Radioimmunkonjugats p-SCN-Bn-DOTA- ^{225}Ac -anti-HER-2/neu gegen Mammakarzinome im Mausmodell löste sich zwar nur ein kleiner Teil der ^{225}Ac -Tochternuklide vom Tumor, dieser war aber für die Nephrotoxizität verantwortlich.

Sofern die Akkumulation der Tochternuklide von ^{225}Ac in der Niere durch geeignete Methoden, wie forcierte Diurese, kompetitive Blockade oder Chelatierung

der Tochternuklide reduziert wird (Jaggi et al., 2005), scheint auch die Verwendung von ^{225}Ac für die Radioimmuntherapie geeignet. Dies ist für solide Tumore besonders interessant, da die Radioimmunkonjugate hier einen längeren Zeitraum benötigen, um die Zielstrukturen zu erreichen.

Weiterführende Modifikationen:

Wie bereits erwähnt, ist die Verwendung von ^{213}Bi wegen seiner kurzen $T_{1/2}$ vor allem bei Erkrankungen einsetzbar, in denen die Zielzellen schnell erreicht werden können. In Kombination mit gut diffundierenden Trägermolekülen wie niedermolekularen Peptiden, Antikörperfragmenten oder Prätargeting-Ansätzen, wird eventuell auch ein Einsatz bei soliden Tumoren möglich. Anforderungen an die Trägersubstanzen sind dabei eine hohe Tumorspezifität, eine geeignete Pharmakokinetik mit ausreichender Bioverfügbarkeit und geringe Nebenwirkungen (z.B. potentielle Immunogenität der Trägersubstanz). Radiomarkierte Antikörper gegen solide Tumore erfüllen diese Kriterien bisher nicht ausreichend und erzielten daher nur eingeschränkte Erfolge. Dagegen zeigen einige nicht markierte Antikörper, wie Cetuximab (Anti-EGFR-Antikörper) oder Bevacizumab (Anti-VEGF-Antikörper) einen klinischen Nutzen in der Therapie solider Tumore (Song und Sgouros, 2011). Die additive Verabreichung von Anti-EGFR-Antikörpern erwies sich beispielsweise in der Therapie von Patienten mit Kolorektaltumoren (Papa et al., 2012) oder HNSCC (Reeves et al., 2011) als vorteilhaft. Da der EGFR auch in Tumoren der Blase (Pfof et al., 2009), der Lunge (Carillo et al. 2012) oder der Haut (Wollina, 2012) überexprimiert wird, ist die gezielte Therapie gegen den EGFR für viele solide Tumore ein attraktiver Ansatz. Von Bedeutung ist ferner, dass die Behandlung von HNSCC-Zellen mit Cetuximab die Hochregulation von HIF-1 α verhindert (Reeves et al., 2011). Daher sind für die Alpha-Radioimmuntherapie solider Tumore Antikörper gegen den EGFR geeignet. Allerdings ist zu beachten, dass der Anti-EGFR-Antikörper in den Mengen, in denen er bei der Alpha-Radioimmuntherapie eingesetzt wird, nur einen, verglichen mit der reinen Antikörpertherapie, minimalen Therapieeffekt erzielt (Pfof et al., 2009). Um die Tumorzellen sowohl durch die Strahlung als auch durch die Wirkung des Antikörpers signifikant zu schädigen, müssten zusätzlich nicht markierte Antikörper verabreicht werden. Als weiterer positiver Effekt könnten Resistenzen gegen eine Anti-EGFR-Therapie, die vor allem in Tumoren mit einer hohen EGFR-Expression auftreten (Tenaja et al., 2010),

durch die Alphastrahlung überwunden werden. Zudem werden hypoxische Zellen innerhalb der soliden Tumore durch die sauerstoffunabhängige Wirkung der Alphastrahlung effektiv abgetötet. Diese Ausführungen belegen erneut die Zweckmäßigkeit, ^{213}Bi an den Anti-EGFR-Antikörper Matuzumab zu koppeln. Pfost et al. (2009) haben bereits in einem Mausmodell zum Blasen-tumor demonstriert, dass ^{213}Bi -Anti-EGFR-Matuzumab eine sehr gute Wirkung nach intravesikaler Applikation erzielt.

Die Erreichbarkeit hypoxischer Zellen mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb Konjugaten könnte jedoch aus bereits genannten Gründen eingeschränkt sein. Daher sollten andere Substanzen mit einer besseren Gewebepenetration untersucht werden, um hypoxisches Tumorgewebe zu erreichen. Dazu zählen Fragmente ($\text{F}(\text{ab}')_2$, Fab' , Diabodies und scFv) von ganzen Antikörpern (MAb) (Goldenberg, 2002). Lane et al. (1994) zeigten in einer klinischen Phase-I/II-Studie, dass ^{131}I gekoppelt an das $\text{F}(\text{ab}')_2$ -Fragment eines Anti-CEA-Antikörpers schneller und effektiver in metastasierten kolorektalen Tumoren aufgenommen wird als ein ^{131}I -Konjugat mit demselben intakten Antikörper. Folglich können höhere Tumordosen bei gleich bleibender Gesamtkörperdosis erreicht werden. Neben der besseren Bioverfügbarkeit werden die Antikörperfragmente schneller aus dem Körper ausgeschieden und erreichen so höhere Tumorkonzentrationen in Relation zum restlichen Gewebe als intakte Antikörper. Sie zeigen außerdem eine geringere Immunogenität (Goldenberg, 2002). Zu bedenken ist, dass die Fragmente kürzer im Tumor verbleiben, die Gefäßwände von Normalgewebe leichter passieren können und in den Nieren akkumulieren (Huang et al., 2012). Trotz der verbesserten Pharmakokinetik ist die $T_{1/2}$ von ^{213}Bi nach Adams et al. (2000) unter Umständen zu kurz für eine Therapie mit Radioimmunokonjugaten aus ^{213}Bi und einem Antikörperfragment (vergleiche den Abschnitt „Halbwertszeit“ in diesem Kapitel).

Eine höhere Bioverfügbarkeit könnte sich auch mit Prätargeting-Strategien erreichen lassen. Hierbei wird zunächst ein unmarkierter bispezifischer Antikörper verabreicht. Dieser bispezifische Antikörper besitzt eine Bindungsstelle für das Tumorantigen und eine weitere Bindungsstelle für ein radiomarkiertes niedermolekulares Molekül. Zum Zeitpunkt der maximalen Tumorbindung des bispezifischen Antikörpers und der maximalen Clearance aus dem restlichen Gewebe wird das radiomarkierte Molekül injiziert (Goldenberg, 2002). Aufgrund der ge-

ringen Größe und besseren Diffusionsfähigkeit gelangt es schnell in den Tumor, wobei ungebundene Moleküle rasch ausgeschieden werden. Park et al. (2010) verabreichten in einem Prätargeting-Ansatz Mäusen mit Non-Hodgkin-Lymphomen Anti-CD20 1F5(scFv)₄Streptavidin, woran ²¹³Bi-DOTA-Biotin bindet, das im Anschluss injiziert wurde. Diese Prätargeting-Therapie wurde gut toleriert, bestätigte die vorteilhafte Bioverteilung und erzielte einen sehr guten therapeutischen Erfolg. Zudem erscheint hier ein Radionuklid mit einer kurzen T_{1/2} wie ²¹³Bi optimal geeignet zu sein.

Die Verwendung hypoxiespezifischer Substanzen ist trotz der beschriebenen Einwände (vergleiche S.116 und S.118) unter Umständen sinnvoll, da diese Substanzen möglicherweise eine ausreichende Bioverfügbarkeit in hypoxischem Gewebe erreichen. Eine Markierung mit ²¹³Bi ist denkbar. Beispielsweise könnte die Kopplung von ²¹³Bi an ATSM (wie für ⁶⁴Cu bereits geschehen) oder an Nitroimidazole wie Misonidazol (MISO) und Azomycinarabinofuranoside (AZA) mit geeigneten Chelaten eine erfolgreiche Therapiestrategie darstellen. In der Positronenemissionstomographie (PET) konnten mit ¹⁸F markiertem MISO (F-MISO) und AZA (FAZA) hypoxische Tumoreareale bei Patienten detektiert werden (Carlin und Humm, 2012; Gaertner et al., 2012).

Weitere Zielstrukturen neben dem EGFR sind ebenfalls in Betracht zu ziehen. Infrage kommt der klinisch bereits für verschiedene Tumorerkrankungen zugelassene Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab. Das komplexe Wirkungsmuster von Bevacizumab lässt sich wie folgt zusammenfassen: Durch seine antiangiogenetische Eigenschaft bewirkt der Antikörper paradoxerweise einerseits eine temporäre Normalisierung der Blutversorgung in Tumoren indem das Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren aufgehoben wird und sich die in Kap. 1.3 beschriebenen Veränderungen der Tumorgefäße normalisieren. Dieser Vorgang reduziert die Hypoxie und verbessert die Bioverfügbarkeit von Zytostatika. Andererseits werden Tumorendothelien bzw. Blutgefäße durch Bevacizumab zerstört. Die Folge ist eine Deprivation von Nährstoffen, eine Wachstumshemmung und Apoptose der Tumorzellen, aber auch eine Zunahme der Hypoxie (Masunaga et al., 2011; Jain, 2005). Insgesamt hat sich herausgestellt, dass Bevacizumab aufgrund seines Wirkmechanismus vor allem für eine Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika oder mit einer Bestrahlung geeignet ist (Jain, 2005).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass ^{131}I -markiertes Bevacizumab selektiv in Tumorzellen, die VEGF überexprimieren, aufgenommen wird (Ashrafi et al., 2012). Aus den genannten Tatsachen lässt sich daher schließen, dass Alpha-Radioimmunkonjugate mit Bevacizumab aufgrund einer selektiven Zerstörung von Tumorendothelien und Tumorzellen, einer gesteigerten Bioverfügbarkeit und einer sauerstoffunabhängigen Wirkung möglicherweise für eine systemische Therapie hypoxischer Tumore geeignet sind. Die Verwendung von unmarkiertem Bevacizumab für eine adäquate Antikörperwirkung muss hier – wie für Cetuximab bereits beschrieben (vergleiche S.124) – ebenfalls berücksichtigt werden.

Passend hierzu wurde kürzlich bewiesen, dass die orthotope Applikation des Radioimmunkonjugats ^{213}Bi -Bevacizumab die Progression eines Prostatatumors im Mausmodell inhibiert (Rizvi et al., 2012). Ein anderes Radioimmunkonjugat mit einem antiangiogenetischen Antikörper, ^{225}Ac -E4G10 gegen vaskuläres endotheliales Cadherin, bewirkte durch eine systemische Gabe bei Mäusen mit Prostatakarzinom ebenfalls eine Hemmung des Tumorwachstums und verlängerte das Überleben der Mäuse. Studien zur Bioverteilung zeigten keine Aufnahme in Normalgewebe (Singh Jaggi et al., 2007).

Die Fraktionierung der Gesamtdosis stellt ebenso eine Möglichkeit dar, um die Radioimmuntherapie mit Alphastrahlern für solide bzw. größere Tumore zu verbessern. Hier könnte die Wirkung nicht wie bei der konventionellen Strahlentherapie durch eine Reoxygenierung und Redistribution des Zellzyklus, sondern durch eine verbesserte Erreichbarkeit hypoxischer Tumorzellen mit jeder Fraktionierung der Aktivität gesteigert werden. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die fraktionierte intravesikale Therapie mit ^{213}Bi -Anti-EGFR bei Mäusen mit Blasen Tumoren das Tumolvolumen reduziert und das Überleben ohne Schädigung des normalen Urothels verlängert (Fazel et al., 2011).

Auch eine Kombination verschiedener Strahlenqualitäten könnte für den Therapieerfolg von hypoxischen soliden Tumoren gewinnbringend sein. Die Vorteile der einzelnen Strahlenarten lassen sich so summieren, Nebenwirkungen können reduziert und der therapeutische Erfolg verbessert werden. Studien zu einer kombinierten Therapie von Alpha-Radioimmunkonjugaten und externer Bestrahlung sind nicht bekannt. Die Radioimmuntherapie mit β -Emitttern wie ^{131}I in Verbindung mit einer externen Strahlentherapie wurde bereits in einigen prä-

klinischen Studien getestet. Hierbei zeigte sich der erwartete gesteigerte Erfolg gegenüber der Behandlung mit nur einer Strahlenart (Eriksson et al., 2003; Buchegger et al., 1995). Während sich beispielsweise mit einer externen Strahlentherapie der ganze Tumor bestrahlen lässt, können mittels Alpha-Radioimmuntherapie die radioresistenten Tumorendothelzellen abgetötet werden. Die lokale Tumorkontrollrate ließe sich so möglicherweise steigern. Zudem können mit der Alpha-Radioimmuntherapie Tumorzellen, die bereits den Kontakt zum Primärtumor verloren haben, gezielt eliminiert werden. Eine Heilung der Tumorerkrankung scheint so wahrscheinlicher. Auch die Verwendung eines Gemisches aus Alpha- und Beta-Radioimmunkonjugaten könnte aufgrund der unterschiedlichen Reichweiten für solide Tumore vorteilhaft sein. Mit β -Emittern sind Tumorzellen in größeren Verbänden und auch Antigen-negative Tumorzellen erreichbar. α -Strahler überwinden Resistenzen aufgrund der hohen RBE. Mit einer zusätzlichen Chemotherapie ergeben sich entsprechend den Ergebnissen von präklinischen (Sharkey et al., 2011) und klinischen (Wong et al., 2003) Studien weitere Möglichkeiten, den Therapieerfolg zu steigern, auf die hier nicht näher eingegangen wird.

Aufgrund des breiten Spektrums zur Weiterentwicklung der Alpha-Radioimmuntherapie scheint eine Anwendung in soliden Tumoren als durchaus realistisch. Die in dieser Arbeit bestätigte sauerstoffunabhängige Wirkung von Alphastrahlung liefert neben den bekannten Vorteilen einen weiteren Grund, die Forschung in der Alpha-Radioimmuntherapie voran zu treiben. Vor allem in hypoxischen Tumoren versagen die aktuell verfügbaren Therapien. In der Wahl der Isotope, der Chelatierung, der Antikörperentwicklung und der Pharmakokinetik der Radioimmunkonjugate sind Verbesserungen notwendig. Zudem sind Studien zur Behandlung von Patienten mit weniger fortgeschrittenen Krankheiten sowie zum Vergleich der Alpha-Radioimmuntherapie mit aktuellen Standardbehandlungen erforderlich, um das Anwendungspotential besser zu definieren und um eine Therapie von hypoxischen soliden Tumoren möglich und erfolgreich zu machen.

6 Zusammenfassung

Heterogen verteilte Regionen mit hypoxischen Zellen treten in nahezu allen soliden Tumorentitäten auf. Sie werden durch eine anormale Vaskularisierung aufgrund des malignen Wachstums hervorgerufen. Die Hypoxie verursacht pathophysiologische Veränderungen, die eine weitere Entartung fördern und Resistenzen gegen Strahlen- und Chemotherapie bedingen. Dementsprechend sind die Therapieeffizienz und die Prognose der Tumorerkrankung stark verschlechtert.

Gegen Strahlung mit einem niedrigen LET treten Resistenzen ab einem Sauerstoffpartialdruck von 10 mmHg auf. Mit abnehmender Sauerstoffverfügbarkeit werden die chemisch-physikalischen Reaktionen, die zu einer DNA-Schädigung führen, eingeschränkt. Zugleich vermitteln vor allem HIFs biologische Anpassungsvorgänge, durch die die Tumorphagenese und die Resistenzentwicklung vorangetrieben werden. Die bisherige Annahme, dass die Radioresistenz mit steigendem LET abnimmt und dass damit Alphastrahlung eine sauerstoffunabhängige Wirkung erzeugt, wurde in dieser Arbeit erstmals beim Einsatz von Alpha-Radioimmunkonjugaten, die selektiv an Tumorzellen binden, bewiesen. Ältere Arbeiten hierzu waren aufgrund methodischer Einschränkungen nicht valide. Gründe für die sauerstoffunabhängige Wirkung sind eine komplexere DNA-Schädigung, eine relative Abnahme der sauerstoffabhängigen indirekten Strahlenwirkung und die Erzeugung von Sauerstoff in der Mikroumgebung der Flugbahn eines Alphateilchens. Biologische Einflüsse sind bisher nicht bekannt.

Die Untersuchungen wurden mit der HNSCC-Zelllinie CAL33 durchgeführt, die den epithelialen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR überexprimiert. Zur Kultivierung der CAL33 Zellen unter Hypoxie wurde eine Kammer verwendet, in der mit Hilfe einer Vakuumpumpe und Einleitung eines Stickstoff-Gasgemisches hypoxische Bedingungen (Sauerstoffpartialdruck $p[\text{O}_2] < 10\text{mmHg}$ (1.3 %)) innerhalb von ca. 9 min erzeugt werden konnten. Der Oxygenierungsgrad der CAL33 Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kultivierung in der Hypoxiekammer anhand des Hypoxiemarkers HIF-1 α mittels Western-Blot bestimmt. Die

CAL33 Zellen wurden jeweils unter Normoxie und Hypoxie mit unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen (0 MBq/ml - 1,48 MBq/ml) von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb oder Photonenstrahlung mit Dosen von 0 Gy - 12 Gy und einer nominellen Photonenenergie von 6 MeV behandelt. Zur Quantifizierung der Strahlenwirkung wurden die Vitalität und das klonogene Überleben der Zellen anschließend mittels WST-Photometrie bzw. Klonogenem-Test ermittelt.

Die erhöhte Signalstärke des Hypoxiemarkers HIF-1 α während der Bestrahlungsversuche bestätigte einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck. Zudem indizierte sie eine Anpassung des Zellmetabolismus an die Hypoxie und damit eine Berücksichtigung biologischer Radioresistenzmechanismen. Nach Inkubation der CAL33 Zellen mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb sowie nach Photonen-Bestrahlung zeigte sich hinsichtlich des klonogenen Überlebens und der Vitalität jeweils eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung. Mit zunehmender Aktivitätskonzentration bzw. Strahlendosis nahmen klonogenes Zellüberleben und -vitalität ab. Gegenüber Photonenstrahlung erwiesen sich normoxische Zellen bei allen untersuchten Dosen in Bezug auf klonogenes Überleben und Vitalität signifikant sensitiver als hypoxische Zellen. Dagegen war für das klonogene Überleben bzw. die Vitalität normoxischer und hypoxischer Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb bei allen verwendeten Aktivitätskonzentrationen kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Die Alpha-Radioimmuntherapie erweist sich klinisch bis dato vor allem für disseminierte und weit fortgeschrittene Malignomerkrankungen als gewinnbringend. Für solide Tumore sind die Erfolge wegen einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit bisher nur gering. Durch den Einsatz anderer Isotope, die Weiterentwicklungen der Trägersubstanzen und der Targeting-Strategien sowie die Kombination mit etablierten Therapien erscheint die Verwendung von Alpha-Radioimmunkonjugaten zur Überwindung der hypoxiebedingten Radioresistenz in soliden Tumoren als überaus vielversprechend. Der begrenzte Erfolg anderer Therapien gegen Radioresistenz, aber vor allem die hier eindeutig bewiesene sauerstoffunabhängige Wirkung von ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb, gibt Grund dafür und liefert einen Ansatz, auf dem man in künftigen Studien aufbauen kann.

7 Anhang

7.1 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 7.1: Ergebnisse der Vorversuche zur Bestimmung der geeigneten Zellzahl pro Well für den WST-Test (a.M.: Messwerte außerhalb des Messbereichs).

		Zellzahl pro Well						
Messreihe		100000	50000	25000	10000	5000	2500	1000
Extinktion	1	a.M.	a.M.	2,32	0,99	0,52	0,33	0,13
	2	a.M.	a.M.	2,04	0,83	0,37	0,32	0,13
	3	a.M.	a.M.	1,95	0,89	0,75	0,32	0,12
	4	a.M.	a.M.	2,20	0,96	0,69	0,23	0,14
	5	a.M.	a.M.	2,26	0,95	0,45	0,24	0,16
	6	a.M.	a.M.	2,31	1,02	0,54	0,36	0,13
	7	a.M.	a.M.	2,62	0,83	0,65	0,27	0,13
	8	a.M.	a.M.	2,10	0,95	0,55	0,24	0,10
	9	a.M.	a.M.	2,29	0,86	0,59	0,32	0,13
	10	a.M.	a.M.	2,79	1,06	0,64	0,48	0,23
	11	a.M.	a.M.	2,26	1,00	0,55	0,30	0,09
	12	a.M.	a.M.	2,21	0,91	0,46	0,30	0,15
Mittelwert				2,19	0,93	0,56	0,29	0,13

Tabelle 7.2: Exemplarische Messergebnisse der Extinktion und berechnete Proteinmengen der Zelllysate für die HIF-1 α -Bestimmung

Proben		Zeit seit Inkubation unter Hypoxie							
		0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h	6 h	24 h	3 h+3 h
Extinktion	Probe 1, Messung a	0,1543	0,2994	0,1729	0,1665	0,1510	0,3371	0,0795	0,1078
	Probe 1, Messung b	0,1514	0,2969	0,1720	0,1637	0,1502	0,3356	0,0800	0,1120
	Probe 2, Messung a	0,1244	0,2982	0,1422	0,1771	0,1223	0,3319	0,0945	0,1133
	Probe 2, Messung b	0,1235	0,3008	0,1438	0,1787	0,1228	0,3298	0,0938	0,1186
	Mittelwert	0,1384	0,2988	0,1577	0,1715	0,1366	0,3336	0,0870	0,1129
Proteinmenge [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]		5,18	11,14	5,9	6,41	5,12	12,43	3,27	4,24

Proben		Kontrolle	CoCl	Zeit nach Beendigung der Hypoxie					
				0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	180 min
Extinktion	Probe 1, Messung a	0,0705	0,0880	0,1874	0,1846	0,1311	0,1506	0,2347	0,1367
	Probe 1, Messung b	0,0655	0,0864	0,1858	0,1806	0,1352	0,1479	0,2375	0,1356
	Probe 2, Messung a	0,0667	0,0878	0,1635	0,1882	0,1493	0,1436	0,2269	0,1339
	Probe 2, Messung b	0,0650	0,0839	0,1646	0,1947	0,1479	0,1427	0,2270	0,1348
	Mittelwert	0,0669	0,0865	0,1753	0,1870	0,1409	0,1462	0,2315	0,1353
Proteinmenge [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]		2,53	3,26	6,55	6,99	5,28	5,47	8,64	5,07

Tabelle 7.3: Exemplarische Ergebnisse der Extinktionsmessungen zur Erstellung einer Standardgeraden für die Proteinbestimmung.

Proteinmenge [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]		0,72	1,44	2,88	5,67	8,64	11,52
Extinktion	1. Probe, Messung a	0,0208	0,0750	0,1560	0,3164	0,4739	0,5868
	1. Probe, Messung b	0,0248	0,0720	0,1632	0,3121	0,4775	0,6114
	2. Probe, Messung a	0,0298	0,0877	0,1484	0,3048	0,4825	0,6091
	2. Probe, Messung b	0,0302	0,0876	0,1464	0,3084	0,4857	0,6142
Mittelwert		0,0264	0,0806	0,1535	0,3104	0,4799	0,6054

Abbildung 7.1: Exemplarische Standardgrade für die Proteinbestimmung.

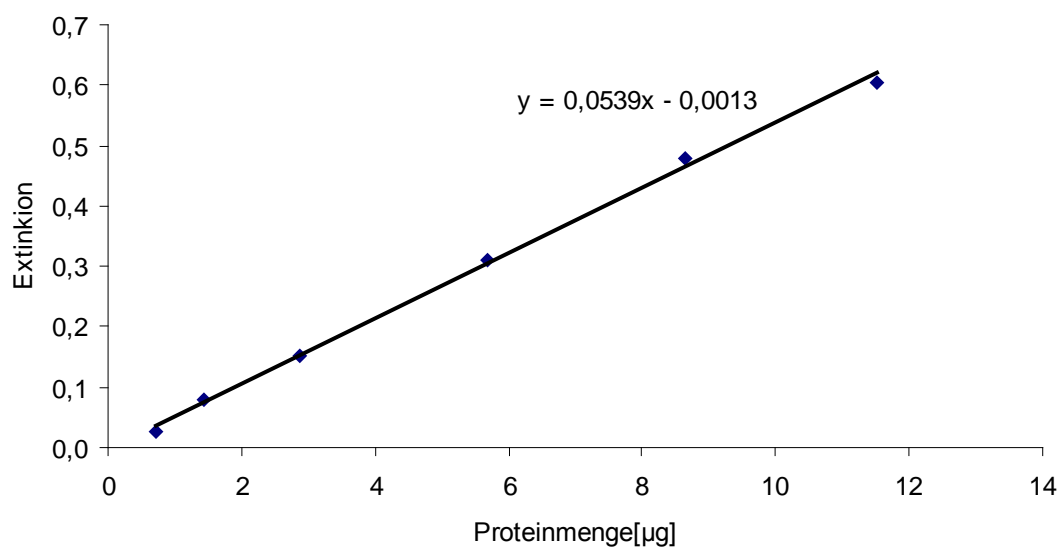


Tabelle 7.4: Ergebnisse des WST-Tests in Vorversuchen, zur Definition des Bereichs der Aktivitätskonzentrationen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb.

Normoxie

Aktivität [kBq/ml]	1480	1110	740	370	185	92,5	0
Messwerte	0,25	0,27	0,28	0,37	0,41	0,39	0,74
	0,29	0,36	0,43	0,46	0,49	0,47	0,70
	0,36	0,43	0,42	0,47	0,57	0,78	0,68
	0,32	0,41	0,56	0,62	0,91	0,79	0,88
	0,26	0,50	0,53	0,57	0,75	0,88	0,73
	0,30	0,36	0,43	0,49	0,63	0,65	0,78
	0,34	0,38	0,46		0,57	0,59	0,75
Mittelwert	0,30	0,39	0,44	0,50	0,62	0,65	0,75

Hypoxie

Aktivität [kBq/ml]	1480	1110	740	370	185	92,5	0
Messwerte	0,35	0,38	0,37	0,48	0,55	0,68	0,89
	0,33	0,30	0,31	0,38	0,35	0,48	0,78
	0,29	0,25	0,36	0,38	0,34	0,37	0,69
	0,28	0,32	0,33	0,51	0,49	0,49	0,67
	0,42	0,37	0,40	0,50	0,44	0,52	0,67
	0,33	0,41	0,40	0,79	0,58	0,58	0,79
	0,37	0,34	0,36	0,41	0,48	0,55	0,81
Mittelwert	0,34	0,34	0,36	0,49	0,46	0,52	0,76

Tabelle 7.5: Ergebnisse des Klonogenen-Tests in Vorversuchen, zur Definition des Bereichs der Aktivitätskonzentrationen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb.

Normoxie

Aktivität [kBq/ml]	640	370	185	74	37	18,5	0
Messwerte	0	0	0	10	26	51	143
	0	0	0	6	18	47	162
	0	0	0	10	39	40	147
	0	0	0	8	22	35	130
	0	0	0	8	32	44	142
	0	0	0	7	25	41	132
Mittelwert	0	0	0	8	27	43	143

Tabelle 7.6: Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie im Klonogenen-Test (V.Nr.: Versuchsnummer).

V.Nr.	Versuchsarm	Klone je Well											
1	Normoxie	72	73	60	82	73	54	54	69	69	75	65	59
	Hypoxie 3 h + 3 h	56	61	71	68	63	61	57	63	67	65	75	60
	Hypoxie 6 h	59	69	58	68	62	62	73	65	77	82	68	72
2	Normoxie	66	59	66	57	58	64	51	57	60	56	53	58
	Hypoxie 3 h + 3 h	50	51	61	51	62	46	60	57	44	61	41	64
	Hypoxie 6 h	56	40	58	46	65	49	51	51	64	61	56	42
3	Normoxie	69	79	69	80	64	56	71	53	66	69	68	58
	Hypoxie 3 h+3h	67	69	65	60	61	65	60	73	80	63	57	50
	Hypoxie 6 h	61	60	71	74	52	68	60	70	70	86	68	56

Tabelle 7.7: Quantitativer Vergleich der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie im WST-Test (V.Nr.: Versuchsnummer).

V.Nr.	Versuchsarm	Extinktion je Well											
1	Normoxie	1,41	1,41	1,43	1,52	1,54	1,46	1,62	1,58	1,55	1,59	1,46	1,59
		1,34	1,67	1,79	1,72	1,71	1,74	1,85	1,85	1,71	1,91	1,73	1,64
	3 h +3 h Hypoxie	1,14	1,23	1,14	1,17	1,12	1,30	1,21	1,10	1,16	1,10	1,00	1,06
		1,29	1,33	1,47	1,30	1,40	1,31	1,28	1,34	1,38	1,39	1,11	1,05
	6 h Hypoxie	1,24	1,27	1,26	1,34	1,33	1,41	1,40	1,36	1,29	1,27	1,13	1,29
2	Normoxie	1,27	1,33	1,34	1,32	1,40	1,43	1,43	1,41	1,43	1,43	1,37	1,41
		1,47	1,38	1,42	1,44	1,39	1,51	1,55	1,51	1,64	1,56	1,46	1,40
	3 h + 3 h Hypoxie	0,98	1,21	1,13	1,20	1,24	1,15	1,26	1,21	1,17	1,15	1,15	1,19
		1,19	1,33	1,40	1,35	1,29	1,30	1,28	1,28	1,30	1,31	1,20	1,23
	6h Hypoxie	1,19	1,35	1,35	1,43	1,43	1,43	1,39	1,43	1,37	1,32	1,36	1,35
3	Normoxie	1,27	1,39	1,33	1,45	1,28	1,17	1,30	1,46	1,46	1,54	1,35	1,29
		0,76	0,79	0,79	0,81	0,82	0,81	0,85	0,80	0,90	0,90	0,72	0,82
	3 h + 3 h Hypoxie	0,77	0,92	1,07	1,22	1,18	0,92	1,12	0,96	1,04	0,96	0,94	0,86
		0,68	0,70	0,78	0,82	0,76	0,81	0,86	0,80	0,79	0,76	0,88	0,87
	6h Hypoxie	0,69	0,93	0,82	0,91	0,90	0,94	0,93	1,00	0,93	0,94	0,86	0,88
		0,84	0,93	0,91	1,04	0,99	0,95	0,94	0,95	1,11	0,96	0,92	0,92
		0,98	0,96	0,99	0,98	1,08	1,13	1,15	1,04	1,05	1,02	1,02	1,03

Tabelle 7.8: Markierungseffizienz nach Markierung (M), radiochemische Reinheit (R) und Antikörperverlust durch Gelfiltration (V) (V.Nr.: Versuchsnummer; ges.Ak/mark.Ak: Gesamtantikörperzahl dividiert durch die Anzahl markierter Antikörper).

V.Nr.	E _V [CPM]	E _A [CPM]	E _E [CPM]	P _V [CPM]	P _A [CPM]	P _E [CPM]	M [%]	R [%]	V [%]	ges. Ak/ mark.Ak
1	18800,0	17429,1	467,0	6339,7	6116,9	70,9	97,4	98,9	14,0	782,9
2	16116,0	13653,0	661,6	4715,7	5297,1	131,8	95,4	97,6	4,9	999,4
3	15217,3	14318,3	653,8	5371,0	5412,2	102,3	95,6	98,1	7,4	953,0
4	12079,9	12233,2	643,2	4805,3	4683,5	109,7	95,0	97,7	6,2	1115,4
5	12367,1	12355,3	707,0	4093,9	4038,3	94,0	94,6	97,7	19,9	1104,4
6	8490,4	8328,7	250,3	3212,7	3066,8	34,3	97,1	98,9	9,7	1638,4
Mittelwert							95,8	98,2	10,3	1098,9
SD							1,0	0,5	5,2	295,3

Tabelle 7.9: Bindungseffizienz der ²¹³Bi-Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen (V.Nr.: Versuchsnummer).

V.Nr.	Zellgebundene Aktivität [CPM]	Ungebundene Aktivität [CPM]	Gesamt- aktivität [CPM]	Bindungs- effizienz [%]	Mittelwert der Bindungseffizienz [%]	SD
1	59385,9	26766,7	86152,6	68,9	74,0	4,7
2	49859,6	20480,9	70340,5	70,9		
3	83758,0	34166,0	117924,0	71,0		
4	116055,8	31518,4	147574,2	78,6		
5	131002,0	31371,0	162373,0	80,7		

Tabelle 7.12: Einzelmesswerte der Klonzahlen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (V.Nr.: Versuchsnummer).

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]						
		0	9,25	18,5	37	74	185	370
1 (ak)	Normoxie	168	89	42	10	6	0	0
		155	91	32	11	9	1	0
		167	111	38	12	5	0	0
		167	97	38	18	7	1	0
		177	71	35	14	5	2	0
		140	74	33	11	4	0	0
	Hypoxie	141	113	36	22	4	1	0
		148	88	46	26	9	5	0
		170	78	37	30	11	2	0
		156	71	40	28	10	2	0
		167	121	35	19	10	1	0
		172	71	34	16	6	3	0

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]						
		0	9,25	18,5	37	74	185	370
2 (ak)	Normoxie	137	67	29	13	4	1	0
		173	68	38	10	3	1	0
		122	66	29	14	3	1	0
		101	54	34	8	5	0	0
		96	51	37	9	2	1	0
		144	59	28	7	2	0	0
	Hypoxie	90	62	31	8	4	2	0
		101	59	29	12	4	0	0
		108	44	25	8	4	1	0
		105	39	34	9	6	1	0
		94	36	22	6	3	0	0
		109	32	29	6	3	1	0

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]						
		0	9,25	18,5	37	74	185	370
3 (ak)	Normoxie	162	72		22	4	1	0
		122	80		27	5	3	0
		151	63		26	3	0	0
		122	64		27	4	0	0
		135	67		31	3	0	0
		131	66		20	5	2	0
	Hypoxie	162	89	42	20	3	1	0
		173	96	52	20	2	2	0
		120	74	39	20	6	1	0
		132	69	36	23	5	1	0
		114	75	50	12	2	2	0
		163	92	65	23	5	3	0

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]							
		0	9,25	18,5	37	74	185	370	
4 (ak)	Normoxie	119	73	48		10	1	0	
		123	70	43		7	2	0	
		97	77	59		11	3	0	
		119	67	39		12	3	0	
		115	84	43		15	3	0	
		125	66	45		9	2	0	
	Hypoxie			93	63	39	13	2	0
				97	60	30	15	1	0
				97	65	33	13	3	0
				88	77	28	16	1	0
				87	79	27	10	1	0
				98	63	23	11	1	0

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]							
		0	9,25	18,5	37	74	185	370	
5 (ak)	Normoxie	187	88	46	14	4	0	0	
		186	94	38	17	7	1	0	
		199	104	52	15	4	2	0	
		174	104	53	16	6	3	0	
		177	94	55	20	7	0	0	
		163	101	43	10	5	0	0	
	Hypoxie		185	113	57	16	2	1	0
			167	109	47	14	4	1	0
			191	99	39	16	6	1	0
			178	100	48	17	4	1	0
			187	112	48	20	6	1	0
			185	90	40	16	6	1	0

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]							
		0	9,25	18,5	37	74	185	370	
6 (ak)	Normoxie	214	118	56	12	2	0	0	
		192	130	59	15	5	0	0	
		218	115	47	11	3	1	0	
		176	102	65	15	2	0	0	
		210	95	62	18	1	0	0	
		192	105	50	21	2	0	0	
	Hypoxie		179	91	51	13	1	1	0
			226	109	54	15	2	0	0
			206	110	60	17	2	0	0
			196	95	61	11	1	1	0
			207	124	56	11	0	0	0
			203	69	53	21	1	0	0

Tabelle 7.13: Einzelmesswerte der Klonzahlen bei der Bestrahlung mit Photonen (V.Nr.: Versuchsnummer).

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
7 (pk)	Normoxie	45	50	50	28	24	5	0
		47	59	50	27	28	6	0
		35	66	46	27	29	3	0
		60	60	47	28	21	9	0
		41	65	47	20	24	7	0
		49	57	40		29	5	0
	Hypoxie	47	53	51	50	53	22	7
		42	50	50	40	47	21	9
		54	48	44	44	41	31	3
		48	67	56	49	45	31	8
		38	56	59	38	33	17	6
		57	48	35	45	35	28	9

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
8 (pk)	Normoxie	68	91	67	47	40	12	0
		72	90	66	48	36	12	0
		71	80	68	46	43	10	0
		62	83	71	42	35	9	0
		68	73	63	45	36	12	0
		64	85	64	45	39	9	0
	Hypoxie	60	93	74	48	40	34	10
		66	87	71	54	38	43	11
		69	74	64	50	50	37	11
		58	79	68	56	50	44	8
		60	70	62	58	41	32	10
		64	81	68	45	40	34	9

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
9 (pk)	Normoxie	55	56	41	37	29	9	1
		60	62	35	35	38	21	0
		60	63	42	39	32	13	0
		53	48	40	41	32	15	0
		60	56	40	40	28	12	1
		46	61	39	30	32	14	0
	Hypoxie	40	47	64	42	47	27	7
		46	66	53	48	39	33	12
		52	52	60	56	48	32	10
		40	58	58	38	34	30	12
		60	42	32	48	35	26	7
		57	50	45	43	40	30	5

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
10 (pk)	Normoxie	71	56	61	44	30	10	0
		79	55	68	44	29	11	0
		66	54	68	39	20	10	0
		72	66	65	48	33	7	0
		71	62	68	49	32	5	0
		79	59	58	35	33	4	0
	Hypoxie	66	67	68	40	41	28	11
		60	72	92	42	38	29	9
		74	94	72	43	42	20	7
		66	91	72	40	43	33	11
		61	76	69	42	41	32	13
		72	71	75	43	40	33	7

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
11 (pk)	Normoxie	134	108	92	78	79	36	0
		137	90	95	85	74	35	0
		154	130	99	78	76	37	0
		133	105	104	90	85	25	0
		141	85	90	87	81	33	0
		111	100	84	89	53	27	1
		Hypoxie	111	98	86	89	85	57
	94		113	94	102	87	56	23
	116		112	90	105	95	50	25
	112		130	103	78	79	62	24
	100		116	99	99	79	67	20
	115		117	93	99	75	70	17

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
12 (pk)	Normoxie	95	54	59		53	13	0
		89	83	73		45	16	0
		99	67	69		56	16	0
		88	63	72		51	21	0
		96	57	62		49	14	0
		99	65	63		51	15	0
		Hypoxie	49	64	65	77	60	
	63		75	68	60	65		13
	65		81	56	74	62		22
	85		82	85	63	56		15
	65		76	64	62	53		20
	63		85	80	71	63		14

Tabelle 7.14: Einzelmesswerte der Extinktion bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (V.Nr.: Versuchsnummer).

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]							
		0	37	92,5	185	370	740	1110	1480
13 (aw)	Normoxie	1,4347	1,0637	0,8647	0,7627	0,4287	0,3287	0,1267	0,2837
		1,2587	1,1407	1,0657	0,5937	0,3027	0,3547	0,3667	0,2787
		1,2557	1,1427	1,3007	0,7507	0,5297	0,3287	0,4767	0,2677
		1,2267	1,2757	1,2277		0,4257	0,5467	0,6397	0,2447
		1,2947	1,0117	1,1887	0,7777	0,4537	0,3467	0,3997	0,2597
		1,2977	1,0767	0,9487	0,6557	0,4267	0,4167	0,4117	0,2717
		1,6107	1,0857	0,7787	0,6697	0,4497	0,3697	0,3907	0,2987
		1,2097	1,2237	0,9877		0,5227	0,5037	0,4027	0,2587
		1,2137	1,2937	1,0697	0,8067	0,5067	0,4867	0,4507	0,2407
		1,0767	1,3177	1,0667	1,0277	0,5337	0,5277	0,4127	0,2517
		1,0747	1,0297	0,9197	0,7517	0,4017	0,4127	0,4807	0,2457
		1,1567	0,7407	0,7597	0,6497	0,3057	0,3397	0,4937	0,2497
		Hypoxie	1,2467	1,0667	0,7917	0,9117	0,3687	0,2877	0,3357
	1,2897		0,9367	1,1607	0,9077	0,4237	0,4027	0,3747	0,3257
	1,4647		1,2607	1,1527	1,0277	0,4467	0,3947	0,3867	0,2957
	1,8007		1,1897	1,5217	1,0897	0,4887	0,3827	0,3857	0,3127
	1,3337		1,1207	1,5037	0,8987		0,3937	0,3817	0,2857
	0,9757		1,0207	1,1067	0,8707	0,4737	0,3727	0,3827	0,3107
	1,5027		1,3677	1,1587	0,7797	0,4477	0,3457	0,4087	0,2757
	0,9777		1,3477	1,1267	0,8917	0,4337	0,3827	0,4187	0,2697
1,6127	1,1297		1,2357	0,7407	0,4557	0,3637	0,3697	0,2587	
0,9657	0,9657		1,0157	1,0937	0,4387	0,4277	0,4077	0,2617	
1,7657	1,1417		1,2627	1,1087	0,4287	0,4117	0,3947	0,2617	
1,5047	0,5607		0,4797	0,6027	0,3287	0,3057	0,3047	0,3607	

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]							
		0	37	92,5	185	370	740	1110	1480
14 (aw)	Normoxie	1,4598	1,0218	0,7828	0,6508	0,4248	0,3898	0,4568	0,2068
		1,0768	0,9818	0,7238	0,5198	0,3598	0,3248	0,2838	0,2728
		1,1998	1,1288	0,8808	0,8408	0,4178	0,3308	0,4558	0,2688
		1,3158	0,6488	1,3998	0,8548	0,4688	0,3788	0,3898	0,2928
		1,3328	1,2298	0,8728	0,8308	0,4928	0,2798	0,4318	0,3288
		1,4528	0,6538	1,3138	0,7968	0,7518	0,5408	0,4418	0,3078
		1,4338	0,7748	1,0718	0,7058	0,5638	0,4958	0,3678	0,2208
		1,1438	1,0958	1,2588	0,9508	0,5688	0,4448	0,4058	0,2798
		1,1478	0,7758	1,2368	0,8468	0,7908	0,7748	0,4158	0,5548
		1,1318	0,8478	0,8648	0,8068	0,4958	0,4858	0,4648	0,2318
		1,8898	1,0148	0,7088	0,5688	0,4428	0,3558	0,4068	0,3198
		1,4598	1,0738	0,7408	0,6878	0,5018	0,3868	0,4018	0,2758
		Hypoxie	0,8708	0,4998	0,3948	0,5878	0,2368	0,1968	0,2328
	0,9728		0,7468	0,7138	0,5958	0,4018	0,3008	0,2818	0,2068
	0,8338		0,4798	0,7158	0,5528	0,4378	0,5278	0,3298	0,2598
	0,8948		0,9958	0,8328	0,8078	0,3848	0,3338	0,3558	0,2188
	0,9828		0,7058	0,9308	0,7628	0,6438	0,3088	0,2488	0,2188
	0,8978		0,8368	0,7808	0,5408	0,4518	0,4838	0,5688	0,1998
	0,9948		1,1588	0,7148	0,8738	0,4438	0,3998	0,4488	0,2228
	0,9378		0,8768	1,0718	0,6088	0,3858	0,5608	0,6888	0,1818
0,9658	0,7278		0,6588	0,5758	0,4168	0,2448	0,6638	0,1728	
1,4498	0,6568		0,6648	0,5678	0,4538	0,3498	0,4798	0,2498	
0,8178	0,6728		0,5398	0,6438	0,6298	0,2378	0,3298	0,1708	
1,5228	0,5518		0,4308	0,7158	0,2488	0,2498	0,4358	0,2498	

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]								
		0	37	92,5	185	370	740	1110	1480	
15 (aw)	Normoxie	1,5051	0,7101	0,7211	0,5901	0,4171	0,3671	0,3701	0,3491	
		1,3281	0,8711	0,9791	0,5611	0,4291	0,4291	0,2741	0,2821	
		1,3501	0,8131	0,9211	0,6061	0,5501	0,4481	0,4101	0,3541	
		1,4081	0,7871	1,0711	0,6731	0,4811	0,4751	0,5091	0,3031	
		1,3501	0,7081	0,8431	0,6521	0,3441	0,4531	0,4491	0,3681	
		1,4271	1,0251	0,8791	0,5671	0,4431	0,4361	0,4581	0,4011	
		1,4141	0,6651	0,7411	0,6971	0,4231	0,4351	0,4721	0,4481	
		1,3181	0,7611	0,7501	0,6531	0,5271	0,4551	0,4901	0,3671	
		1,3281	0,7951	0,8531	0,7031	0,4791	0,5101		0,3431	
		1,4301	1,1561	0,7771	0,7741	0,4701	0,5481	0,6661	0,4021	
		1,3871	1,0761	1,1811	0,6421	0,5441	0,4771	0,6481	0,3731	
		1,4551	0,8591	0,9321	0,5981	0,4071	0,3891	0,4891	0,3681	
		Hypoxie	1,5571	0,8951	0,7721	0,6051	0,3981	0,3441	0,2701	0,3201
			1,5821	1,2421	0,9551	0,7261	0,5131	0,4731	0,3691	0,3221
	1,3651		1,3381	0,8381	0,7401	0,4931	0,4951	0,3521	0,3351	
	1,3231		1,3821	1,1261	0,7461	0,4521	0,5091	0,5571	0,3491	
	1,5481		1,1981	1,0121	0,9321	0,5141	0,5391	0,4121	0,3021	
	1,4801		1,1111	1,1181	0,8221	0,4281	0,4611	0,4361	0,2911	
	1,2641		1,3111	1,2821	0,9091	0,5681	0,5541	0,4171	0,3011	
	1,2531		0,9871	1,1251	1,0631	0,4741	0,5371	0,3971	0,3181	
	1,4411		1,0711	1,0771	0,9811	0,5081	0,3961	0,4301	0,2611	
	1,3311		0,8991	0,8841	0,8501	0,6051	0,5011	0,4471	0,2881	
	1,2831		0,9771	0,7091	0,6561	0,5571	0,4261	0,3151	0,2651	
	1,4371		0,7911	0,5701	0,5171	0,4151	0,3501	0,3901	0,2691	

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]								
		0	37	92,5	185	370	740	1110	1480	
16 (aw)	Normoxie	1,2703	0,7213	0,6973	0,7333	0,4533	0,4033	0,4203	0,3903	
		1,1873	0,9023	0,8303	0,6123	0,4323	0,4323	0,4773	0,4153	
		1,1593	0,9483	0,8863	0,5993	0,4533	0,4083	0,4773	0,4653	
		1,2083	0,9273	0,8993	0,6973	0,5253	0,4883	0,4493	0,4193	
		1,1263	0,9013	0,9823	0,5923	0,4153	0,3813	0,3883	0,4343	
		1,3013		1,0603	0,6113	0,4043	0,4353	0,4253	0,3603	
		1,3973	0,8833		0,6173	0,5353	0,4023	0,3893	0,4183	
		1,2173	0,9763		0,5733	0,4883	0,4003	0,3773	0,4033	
		1,3063	0,9073	1,0273	0,6893	0,4733	0,3053	0,3863	0,4033	
			1,0813	0,9833	0,9463	0,4903	0,4433	0,4203	0,3943	
		1,2243	0,9223	1,2833	0,9013	0,3713	0,3763	0,4273	0,4023	
		1,2373	0,7483	1,0413	0,6443	0,5473	0,4723	0,4473	0,3873	
		Hypoxie	0,8843	0,8333	0,5423	0,4993	0,3673	0,3823	0,3933	0,3503
			0,9263	1,0153	0,7453	0,5893	0,3333	0,2873	0,5133	0,3773
	0,8873		1,0173	0,7883	0,5223	0,6223	0,4513	0,5113	0,3993	
	0,8803		0,8823	0,6263	1,0223	0,6423	0,5153	0,4823	0,4213	
	0,8863		0,7743	1,0463	0,7243	0,7373	0,6213	0,4723	0,3993	
	0,9313		0,8473	0,9883	0,8223	0,7743	0,6983	0,4583	0,4403	
	0,8803		0,8363	0,8883	0,5393	0,7263	0,6013	0,4873	0,4073	
	0,8043		0,8663	0,9773	0,6343	0,6983	0,6003		0,3903	
	0,8163		0,8873	1,4563	1,0573	0,7043	0,7213	0,3953	0,3503	
	0,7993		0,8533	1,0163	0,5313	0,5083	0,4993	0,6313	0,3583	
	0,8033		0,9363	0,9493	0,6533	0,4823	0,4023	0,4983	0,3553	
	0,9353		0,4993	0,5273	0,4883	0,3263	0,3433	0,3703	0,3463	

V.Nr.	Oxygenierung	Aktivität [kBq/ml]								
		0	37	92,5	185	370	740	1110	1480	
17 (aw)	Normoxie	1,3128	0,7828	0,5568	0,6318	0,5808	0,5158	0,3918	0,3468	
		1,3508	0,8048	0,6928	0,8368	0,6538	0,7148	0,3918	0,3288	
		1,5568	0,8758	1,3208	0,6108	0,6528	0,5368	0,4888	0,3608	
		1,3328	0,9348	0,8228	1,8118	1,1728	0,8038	0,4848	0,3498	
		1,3918	1,1908	0,7108	0,6798	0,6758	0,7038	0,4208	0,3248	
		1,3978	0,8978	0,7618	0,7978	0,6728	0,6248	0,4078	0,3308	
		1,4028	1,3968	0,7548	0,6658	0,6728	0,7078	0,5388	0,3478	
		1,2908	0,8618	0,7178	0,8178	0,7548	0,6868	0,4218	0,3848	
		1,3138	1,3738	0,7438	1,2478	0,8198	0,6218	0,6678	0,3178	
		1,3208	0,8398	0,7448	0,6598	0,7878	0,7658	0,5518	0,3548	
		1,2938	0,7978	0,8138	0,6388	0,7898	0,6508	0,4968	0,3508	
		1,4128	0,7068	0,6288	0,5888	0,6118	0,5458	0,4258	0,3418	
		Hypoxie	1,7868	1,2778	0,8758	1,0008	0,7028	0,6588	0,5488	0,7288
			1,6888	1,5088	1,3428	1,2188	0,7938	0,5458	0,5378	0,5168
	1,6738		1,4328	1,4958	1,1928	0,7798	0,5698	0,5348	0,5008	
	1,5948		1,6078	1,4058	1,2648	0,8098	0,5638	0,5488	0,5288	
	1,6668		1,6018	2,2308	1,2758	0,7928	0,6138	0,5238	0,5528	
	1,7378		1,4598	1,0338	1,3008	0,7118	0,5928	0,5558	0,5768	
	1,7688		1,4388	1,7468	1,4158	0,8598	0,5638	0,5258	0,5498	
	1,6898		1,5178	1,3968	1,2248	0,7838	0,5878	0,5348	0,4858	
	2,3318		1,5628	1,4608	1,0998	0,7548	0,5698	0,5788	0,5038	
	1,4538		1,0628	1,4958	1,5348	0,9818	0,5748	0,5158	0,4988	
	1,5378		2,0238	1,4508	1,1818	0,6918	0,6048	0,5918	0,4978	
	1,6758		1,4158	1,0818	0,9548	0,6018	0,5278	0,5458	0,5788	

Tabelle 7.15: Einzelmesswerte der Extinktion bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (V.Nr.: Versuchsnummer).

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
18 (pw)	Normoxie	0,780167	0,894167	0,303167	0,563167	0,599167	0,391167	0,263167
		0,855167	0,759167	0,780167	0,579167	0,639167	0,373167	0,250167
		0,803167	0,827167	0,785167	0,575167	0,676167	0,371167	0,251167
		0,836167	1,031167	0,787167	0,560167	0,699167	0,407167	0,307167
		0,905167	0,881167	0,851167	0,639167	0,722167	0,434167	0,267167
		0,781167	0,899167	0,767167	0,638167	0,707167	0,414167	0,240167
		0,897167	0,868167	0,797167	0,702167	0,719167	0,421167	0,258167
		0,875167	0,867167	0,750167	0,644167	0,727167	0,447167	0,253167
		0,828167	0,920167	0,862167	0,656167	0,711167	0,424167	0,262167
		1,079167	0,836167	0,819167	0,642167	0,727167	0,464167	0,238167
		0,860167	0,838167	0,834167	0,682167	0,756167	0,392167	0,254167
		0,908167	0,910167	0,878167	0,673167	0,793167	0,407167	0,250167
		Hypoxie	0,8685	0,8785	1,0175	0,8545	0,9365	0,5585
	0,9365		0,9565	0,8775	0,9685	1,0165	0,5975	0,3795
	0,9715		1,1545	1,0815	0,9815	1,0335	0,6905	0,3855
	1,0065		1,1705	0,9575	1,0615	1,0185	0,6925	0,3885
	0,9535		1,1295	1,1945	0,9685	1,0895	0,6605	0,4145
	0,9975		1,2715	1,0655	1,0745	1,1685	0,7115	0,3695
	0,9325		1,0905	0,8415	0,8825	0,8965	0,8135	0,3585
	0,9775	1,1345	1,3065	1,1685	1,2755	0,8185	0,4255	
0,9765	0,9675	1,2465	1,0775	1,0855	0,7425	0,4165		
0,8795	1,0595	1,1295	0,7195	1,2575	0,8115	0,4305		
0,8975	0,9355	1,0285	0,9945	1,0075	0,7405	0,3985		
0,9475	1,0345	1,0325	1,0205	1,0185	0,6835	0,4175		

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]						
		0	0,5	1	2	3	6	12
19 (pw)	Normoxie	0,870083	0,722083	0,749083	0,665083	0,698083	0,434083	0,296083
		0,820083	0,802083	0,730083	0,645083	0,690083	0,421083	0,296083
		0,884083	0,821083	0,721083	0,702083	0,730083	0,452083	0,359083
		0,824083	0,832083	0,858083	0,674083	0,709083	0,403083	0,335083
		0,966083	0,874083	0,807083	0,833083	0,792083	0,447083	0,293083
		0,878083	0,878083	0,833083	0,803083	0,679083	0,505083	0,300083
		0,865083	0,867083	0,883083	0,707083	0,663083	0,412083	0,366083
		0,977083	0,794083	0,788083	0,759083	0,693083	0,487083	0,365083
		0,965083	0,894083	0,788083	0,696083	0,768083	0,477083	0,324083
		1,011083	0,909083	0,658083	0,781083	0,652083	0,453083	0,359083
		0,908083	0,889083	0,769083	0,727083	0,772083	0,427083	0,353083
		0,838083	0,817083	0,743083	0,740083	0,690083	0,439083	0,341083
		Hypoxie	0,554	0,547	0,7	0,586	0,59	0,566
	0,727		0,682	0,743	0,731	0,751	0,707	0,351
	0,712		0,646	0,812	0,795	0,679	0,64	0,363
	0,709		0,744	0,744	0,648	0,81	0,678	0,336
	0,755		0,63	0,832	0,721	0,747	0,646	0,354
	0,73		0,764	0,882	0,677	0,753	0,703	0,357
	0,745		0,799	0,789	0,799	0,693	0,711	0,335
	0,805	0,76	0,812	0,728	0,704	0,671	0,351	
0,726	0,774	0,817	0,633	0,784	0,677	0,357		
0,734	0,75	0,838	0,756	0,687	0,693	0,298		
0,724	0,754	0,763	0,734	0,795	0,697	0,44		
0,645	0,604	0,699	0,635	0,639	0,634	0,35		

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]							
		0	0,5	1	2	3	6	12	
20 (pw)	Normoxie	0,91825	0,83225	0,41525	0,66325	0,59125	0,45625	0,33125	
		1,07025	0,87325	0,89425	0,62425	0,67925	0,44925	0,35225	
		0,87625	0,89525	0,79125	0,68625	0,72225	0,36025	0,39625	
		1,02425	1,03725	0,69925	0,72125	0,68325	0,46225	0,32225	
		0,91625	0,89425	0,88725	0,69225	0,52825	0,40325	0,29825	
		0,90025	0,87925	1,07025	0,65325	0,80325	0,38525	0,34425	
		0,92025	0,88825	0,98925	0,73725	0,61025	0,37825	0,35625	
		0,99825	1,01225	0,80725	0,84525	0,57025	0,39925	0,29725	
		0,97825	1,12925	0,93325	0,77525	0,55325	0,37625	0,29825	
		0,88725	0,98625	0,88625	0,73625	0,80225	0,40025	0,35525	
		1,07425	1,08525	0,87125	0,75825	0,55425	0,40625	0,37825	
		1,06025	1,21925	0,86825	0,83525	0,65925	0,46425	0,41825	
		Hypoxie	0,626833	0,737833	0,666833	0,667833	0,638833	0,588833	0,399833
			0,756833	0,779833	0,686833	0,766833	0,707833	0,556833	0,371833
	0,758833		0,818833	0,675833	0,870833	0,722833	0,513833	0,415833	
	0,690833		1,017833	0,867833	0,818833	0,688833	0,502833	0,352833	
	0,701833		1,062833	1,017833	0,807833	0,817833	0,557833	0,401833	
	0,665833		1,038833	0,963833	0,719833	0,686833	0,485833	0,332833	
	0,748833		1,072833	0,866833	0,868833	0,682833	0,559833	0,350833	
	0,820833		0,953833	0,646833	0,816833	0,651833	0,548833	0,441833	
	0,719833		1,003833	0,957833	0,860833	0,807833	0,541833	0,368833	
	0,788833		0,837833	0,688833	0,782833	0,729833	0,532833	0,381833	
	0,732833		0,782833	0,758833	0,776833	0,644833	0,510833	0,342833	
	0,642833		0,805833	0,625833	0,770833	0,640833	0,525833	0,354833	

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]							
		0	0,5	1	2	3	6	12	
21 (pw)	Normoxie	1,190667	0,912667	1,128667	1,013667	0,852667	0,665667	0,330667	
		0,468667	1,062667	1,019667	0,980667	0,864667	0,604667	0,332667	
		1,297667	0,988667	1,154667	0,802667	0,998667	0,543667	0,334667	
		1,450667	1,008667	1,065667	0,927667	1,007667	0,478667	0,311667	
		1,314667	0,989667	0,970667	0,971667	0,786667	0,502667	0,289667	
		1,323667	1,218667	1,078667	1,016667	0,859667	0,490667	0,327667	
		1,219667	1,070667	1,012667	0,882667	0,838667	0,507667	0,315667	
		1,355667	1,061667	0,931667	1,005667	0,763667	0,501667	0,317667	
		1,347667	1,153667	1,073667	1,049667	0,786667	0,582667	0,292667	
		1,297667	0,960667	1,100667	0,953667	0,944667	0,457667	0,305667	
		1,249667	1,165667	1,030667	0,895667	0,904667	0,484667	0,288667	
		1,346667	1,085667	1,114667	0,940667	0,892667	0,503667	0,312667	
		Hypoxie	1,051	1,199	1,125	0,994	1,003	0,744	0,47
			1,2	1,164	1,115	1,014	1,129	0,768	0,458
	1,178		1,335	1,162	1,107	1,204	0,787	0,507	
	1,214		1,436	1,227	0,993	1,115	0,732	0,504	
	1,151		1,374	1,315	1,262	1,124	0,785	0,509	
	1,114		1,373	1,308	1,229	1,138	0,855	0,515	
	1,209		1,342	1,452	1,304	1,235	0,813	0,494	
	1,121		1,334	1,204	1,342	1,188	0,815	0,493	
	1,21		1,339	1,364	1,28	1,209	0,771	0,527	
	1,268		1,446	1,163	1,164	1,133	0,779	0,481	
	1,257		1,179	1,044	1,008	1,087	0,788	0,51	
	1,16		1,178	1,056	1,017	1	0,659	0,515	

V.Nr.	Oxygenierung	Dosis [Gy]							
		0	0,5	1	2	3	6	12	
22 (pw)	Normoxie	1,017333	0,661333	0,801333	0,771333	0,591333	0,359333	0,252333	
		1,033333	0,626333	0,820333	0,762333	0,591333	0,374333	0,211333	
		0,943333	0,604333	0,787333	0,792333	0,664333	0,401333	0,206333	
		0,985333	0,577333	0,762333	0,900333	0,759333	0,390333	0,233333	
		0,868333	0,631333	0,750333	0,799333	0,698333	0,400333	0,251333	
		1,007333	0,594333	0,866333	0,977333	0,670333	0,371333	0,206333	
		0,858333	0,600333	0,781333	0,870333	0,715333	0,531333	0,195333	
		0,947333	0,645333	0,776333	0,854333	0,824333	0,428333	0,266333	
		0,861333	0,638333	0,784333	0,834333	0,855333	0,394333	0,194333	
		0,946333	0,632333	0,786333	0,858333	0,699333	0,435333	0,217333	
		0,912333	0,646333	0,833333	0,933333	0,689333	0,506333	0,209333	
		1,014333	0,645333	0,835333	0,848333	0,703333	0,406333	0,228333	
		Hypoxie	0,717167	0,889167	0,816167	0,780167	0,832167		0,429167
			0,715167	0,862167	0,843167	0,808167	0,760167		0,403167
	0,739167		0,753167	0,931167	0,852167	0,850167		0,386167	
	0,789167		0,755167	0,932167	0,918167	0,986167		0,379167	
	0,725167		0,793167	0,829167	1,072167	0,906167		0,343167	
	0,701167		0,862167	0,860167	0,897167	0,987167		0,414167	
	0,725167		0,833167	0,889167	0,847167	0,891167		0,347167	
	0,790167		0,753167	0,806167	0,876167	0,837167		0,346167	
	0,708167		0,861167	0,859167	0,958167	0,893167		0,364167	
	0,685167		0,730167	0,911167	0,768167	0,769167		0,410167	
	0,697167		0,784167	0,826167	0,799167	0,758167		0,355167	
	0,702167		0,747167	0,782167	0,764167	0,732167		0,369167	

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Physiologische und Pathologische Auswirkungen der Hypoxie (modifiziert nach Ruan et al. (2009)).	20
Abbildung 1.2: Chemischer Mechanismus der strahleninduzierten DNA-Schädigung (modifiziert nach Jordan und Sonveaux (2012), Brown und Wilson (2004) und Brown (1999)).	23
Abbildung 3.1: CAL33 Zellen einen Tag nach Aussaat, Vergrößerung 200-fach.	41
Abbildung 3.2: CAL33 Zellen 2 Tage nach Aussaat, Vergrößerung 200-fach.	42
Abbildung 3.3: CAL33 Zellen 6 Tage nach Aussaat, Vergrößerung 200-fach.	42
Abbildung 3.4: Mikroskopisches Bild eines Klon 4.5 d nach Aussaat von 100 Zellen pro Well.	52
Abbildung 3.5: Aufbau des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystems.	54
Abbildung 3.6: Zerfallsschema von ^{225}Ac und ^{213}Bi (angegeben sind Zerfallsart, Halbwertszeit und Energie).	55
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Vorrichtung zur Photonenbestrahlung der CAL33 Zellen in der Aluminium-Hypoxiekammer.	59
Abbildung 4.1: Mikroskopisches Bild der CAL33 Zellen direkt nach 24 h Hypoxie (Anmerkung: Im unteren linken Bildrand sind abgelöste Zellen deutlich zu erkennen).	66
Abbildung 4.2: Mikroskopisches Bild der CAL33 Zellen nach 6 h Hypoxie bzw. Normoxie.	66
Abbildung 4.3: HIF-1 α -Signal in CAL33 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten seit Beginn der Inkubation unter Hypoxie.	71
Abbildung 4.4: HIF-1 α -Signal in CAL33 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beendigung einer 3-stündigen Hypoxie und Inkubation unter normoxischen Bedingungen.	71
Abbildung 4.5: Klonogenes Zellüberleben in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen (rot) und hypoxischen Bedingungen (blau). Das klonogene Zellüberleben wird anhand der Klonzahl im Klonogenen-Test quantifiziert....	74
Abbildung 4.6: Statistische Auswertung des klonogenen Zellüberlebens, entsprechend dem Klonogenen-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des GLMM.	76

- Abbildung 4.7: Statistische Auswertung des klonogenen Zellüberlebens, entsprechend dem Klonogenen-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des t-Tests.....76
- Abbildung 4.8: Extinktion als Maß für die Zellvitalität in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen (rot) und hypoxischen Bedingungen (blau). Die Zellvitalität wird anhand der Extinktion im WST-Test quantifiziert.78
- Abbildung 4.9: Statistische Auswertung der Zellvitalität, entsprechend dem WST-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des GLMM.80
- Abbildung 4.10: Statistische Auswertung der Zellvitalität, entsprechend dem WST-Test, nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) oder mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen anhand des t-Tests.80
- Abbildung 4.11: RR gemäß dem GLMM für das klonogene Gesamtüberleben im Klonogenen-Test (A) und die Gesamtvitalität im WST-Test (B) nach Bestrahlung mit Photonen und ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Normoxie und Hypoxie.....83
- Abbildung 4.12: MD gemäß dem t-Test für das klonogene Gesamtüberleben im Klonogenen-Test (A) und die Gesamtvitalität im WST-Test (B) nach Bestrahlung mit Photonen und ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb unter Normoxie und Hypoxie.83
- Abbildung 7.1: Exemplarische Standardgrade für die Proteinbestimmung....132

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Mittlere Sauerstoffpartialdrucke $p[O_2]$ in mmHg bzw. Volumenprozent von Sauerstoff (% O_2) in Tumoren und Normalgewebe.	15
Tabelle 3.1:	Volumina der Substanzen zur Erstellung einer Standardgeraden für die Bestimmung der Proteinkonzentration.	49
Tabelle 3.2:	Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.	50
Tabelle 4.1:	Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie. Dargestellt sind die Ergebnisse des Klonogenen-Tests in Form von Mittelwerten der Klonzahl, deren SD und der statistische Vergleich (Varianzanalyse, T-Test und GLMM).	69
Tabelle 4.2:	Quantitativer Vergleich der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie. Dargestellt sind die Ergebnisse des WST-Tests in Form von Mittelwerten der Extinktion, deren SD und der statistische Vergleich (Varianzanalyse, T-Test und GLMM). Signifikante Unterschiede sind farblich hervorgehoben.	70
Tabelle 4.3:	Klonogenes Zellüberleben in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Angegeben sind die mittleren Klonzahlen sowie die SD, die sich aus den Einzelmesswerten des Klonogenen-Tests ergeben.	74
Tabelle 4.4:	Extinktion als Maß der Zellvitalität in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (A) bzw. in Abhängigkeit der Strahlendosis nach Bestrahlung mit Photonen (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Angegeben sind die mittlere Extinktion sowie die SD, die sich aus den Einzelmesswerten des WST-Tests ergeben.	78
Tabelle 4.5:	OER für das klonogene Zellüberleben (A) und die Zellvitalität (B) nach Bestrahlung mit Photonen sowie für das klonogene Zellüberleben (C) und die Zellvitalität (D) nach Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb. Angegeben sind die OER für verschiedene Klonzahlen bzw. Extinktionen, deren Mittelwert und die SD. $c[A]$ bezeichnet die Aktivitätskonzentration.	85
Tabelle 5.1:	Statistische Auswertung des klonogenen Zellüberlebens für die unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche und des quantitativen Vergleichs des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie. Signifikante Unterschiede sind farblich hervorgehoben. Hypoxie 3 h + 3 h entspricht den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb, Hypoxie 6 h den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit Photonen.	88

Tabelle 5.2:	Statistische Auswertung der Zellvitalität für die unbestrahlten Kontrollen der Bestrahlungsversuche und des quantitativen Vergleichs der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie. Signifikante Unterschiede sind farblich hervorgehoben. Hypoxie 3 h + 3 h entspricht den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb, Hypoxie 6 h den hypoxischen Bedingungen bei der Bestrahlung mit Photonen.....	89
Tabelle 7.1:	Ergebnisse der Vorversuche zur Bestimmung der geeigneten Zellzahl pro Well für den WST-Test (a.M.: Messwerte außerhalb des Messbereichs).....	131
Tabelle 7.2:	Exemplarische Messergebnisse der Extinktion und berechnete Proteinmengen der Zelllysate für die HIF-1 α -Bestimmung.....	131
Tabelle 7.3:	Exemplarische Ergebnisse der Extinktionsmessungen zur Erstellung einer Standardgeraden für die Proteinbestimmung.	132
Tabelle 7.4:	Ergebnisse des WST-Tests in Vorversuchen, zur Definition des Bereichs der Aktivitätskonzentrationen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb.	133
Tabelle 7.5:	Ergebnisse des Klonogenen-Tests in Vorversuchen, zur Definition des Bereichs der Aktivitätskonzentrationen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb.....	133
Tabelle 7.6:	Quantitativer Vergleich des klonogenen Zellüberlebens unter Hypoxie und Normoxie im Klonogenen-Test (V.Nr.: Versuchsnummer).	134
Tabelle 7.7:	Quantitativer Vergleich der Zellvitalität unter Hypoxie und Normoxie im WST-Test (V.Nr.: Versuchsnummer).	134
Tabelle 7.8:	Markierungseffizienz nach Markierung (M), radiochemische Reinheit (R) und Antikörperverlust durch Gelfiltration (V) (V.Nr.: Versuchsnummer; ges.Ak/mark.Ak: Gesamtantikörperzahl dividiert durch die Anzahl markierter Antikörper)..	135
Tabelle 7.9:	Bindungseffizienz der ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb an CAL33 Zellen (V.Nr.: Versuchsnummer).	135
Tabelle 7.10:	Ergebnisse des GLMM (Signifikante Ergebnisse sind farblich hervorgehoben).	136
Tabelle 7.11:	Ergebnisse des t-Tests (Signifikante Ergebnisse sind farblich hervorgehoben).	137
Tabelle 7.12:	Einzelmesswerte der Klonzahlen bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (V.Nr.: Versuchsnummer).	138
Tabelle 7.13:	Einzelmesswerte der Klonzahlen bei der Bestrahlung mit Photonen (V.Nr.: Versuchsnummer).	140
Tabelle 7.14:	Einzelmesswerte der Extinktion bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (V.Nr.: Versuchsnummer).	142
Tabelle 7.15:	Einzelmesswerte der Extinktion bei der Bestrahlung mit ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAb (V.Nr.: Versuchsnummer).	145

7.4 Literaturverzeichnis

Adams, G.P., Shaller, C.C., Chappell, L.L., Wu, C., Horak, E.M., Simmons, H.H., Litwin, S., Marks, J.D., Weiner, L.M., Brechbiel, M.W. Delivery of the alpha-emitting radioisotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules. *Nucl. Med. Biol.* 27 (2000) 339-346.

Akabani, G., Kennel, S.J., Zalutsky, M.R. Microdosimetric analysis of alpha-particle-emitting targeted radiotherapeutics using histological images. *J. Nucl. Med.* 44 (2003) 792-805.

Alper, T., Howard-Flanders, P. Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of *E. coli* B. *Nature.* 178 (1956) 978-979.

Ambrosini, V., Fani, M., Fanti, S., Forrer, F., Maecke, H.R. Radiopeptide imaging and therapy in Europe. *J. Nucl. Med.* 52 (2011) 42-55.

Andersson, H., Cederkrantz, E., Bäck, T., Divgi, C., Elgqvist, J., Himmelman, J., Horvath, G., Jacobsson, L., Jensen, H., Lindegren, S., Palm, S., Hultborn, R. Intraperitoneal alpha-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of (211)At-MX35 F(ab')₂ – a phase I study. *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 1153-1160.

Antonovic L, Brahme A, Furusawa Y, Toma-Dasu I. Radiobiological description of the LET dependence of the cell survival of oxic and anoxic cells irradiated by carbon ions. *J. Radiat. Res.* (2012).

(Preprint: <http://jrr.oxfordjournals.org.eaccess.ub.tum.de/content/early/2012/08/21/jrr.rrs070.long>, Stand: 14.09.2012.)

Apostolidis, C., Molinet, R., Rasmussen, G., Morgenstern, A. Production of Ac-225 from Th-229 for targeted alpha therapy. *Anal. Chem.* 77 (2005) 6288-6291.

Ashrafi, S.A., Hosseinimehr, S.J., Varmira, K., Abedi, S.M. Radioimmunotherapy with ¹³¹I-bevacizumab as a specific molecule for cells with overexpression of the vascular endothelial growth factor. *Cancer Biother. Radiopharm.* 27 (2012) 420-425.

Barendsen, G.W., Beusker, T.L. Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. I. Irradiation techniques and dosimetry. *Radiat. Res.* 13 (1960) 832-840.

Barendsen, G.W., Walter, H.M. Effects of Different Ionizing Radiations on Human Cells in Tissue Culture: IV. Modification of Radiation Damage. *Radiat. Res.* 21 (1964) 314-329.

Barendsen, G.W., Koot, C.J., Van Kersen, G.R., Bewley, D.K., Field, S.B., Parnell, C.J. The effect of oxygen on impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by ionizing radiations of different LET. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 10 (1966) 317-327.

Beerman, T.A., Gawron, L.S., Shin, S., Shen, B., McHugh, M.M. C-1027, a radiomimetic enediyne anticancer drug, preferentially targets hypoxic cells. *Cancer Res.* 69 (2009) 593-598.

Behr, T.M., Sharkey, R.M., Juweid, M.E., Dunn, R.M., Ying, Z., Zhang, C.H., Siegel, J.A., Goldenberg, D.M. Variables influencing tumor dosimetry in radioimmunotherapy of CEA-expressing cancers with anti-CEA and antimucin monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* 38 (1997) 409-418.

Bensing, S.J., Christofk, H.R. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (2012) 352-361.

Bernier, J., Hall, E.J., Giaccia, A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 737-747.

Berry, R.J. Survival of murine leukemia cells in vivo after irradiation in vitro under aerobic and hypoxic conditions with monoenergetic accelerated charged particles. *Radiat. Res.* 44 (1970) 237-247.

Bertout, J.A., Patel, S.A., Simon, M.C. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 967-975.

Bindra, R.S., Crosby, M.E., Glazer, P.M. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 249-260.

Bischoff, P., Altmeyer, A., Dumont, F. Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitisers. *Expert Opin. Ther. Pat.* 19 (2009) 643-662.

Blöcher, D. DNA double-strand break repair determines the RBE of alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 761-771.

Bloechl, S., Beck, R., Seidl, C., Morgenstern, A., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Fractionated locoregional low-dose radioimmunotherapy improves survival in a mouse model of diffuse-type gastric cancer using a ²¹³Bi-conjugated monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 7070-7074.

Box, A.H., Demetrick, D.J. Cell cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell cycle arrest in human cancer cell lines. *Carcinogenesis.* 25 (2004) 2325-2335.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

Bristow, R.G., Hill, R.P. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 180-192.

Brizel, D.M., Scully, S.P., Harrelson, J.M., Layfield, L.J., Bean, J.M., Prosnitz, L.R., Dewhirst, M.W. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 56 (1996) 941-943.

Brown, J.M. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 59 (1999) 5863-5870.

Brown, J.M., Attardi, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 231-237.

Brown, J.M., Wilson, W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 437-447.

Buchegger, F., Rojas, A., Delaloye, A.B., Vogel, C.A., Mirimanoff, R.O., Coucke, P., Sun, L.Q., Raimondi, S., Denekamp, J., Pèlgrin, A. Combined radioimmunotherapy and radiotherapy of human colon carcinoma grafted in nude mice. *Cancer Res.* 55 (1995) 83-89.

Carillio, G., Montanino, A., Costanzo, R., Sandomenico, C., Piccirillo, MC., Di Maio, M., Daniele, G., Giordano, P., Bryce, J., Normanno, N., Rocco, G., Perrone, F., Morabito, A. Cetuximab in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 12 (2012) 163-175.

Carlin, S., Humm, J.L. PET of hypoxia: current and future perspectives. *J. Nucl. Med.* 53 (2012) 1171-1174.

Chapman, J.D., Doern, S.D., Reuvers, A.P., Gillespie, C.J., Chatterjee, A., Blakely, E.A., Smith, K.C., Tobias, C.A. Radioprotection by DMSO of mammalian cells exposed to X-rays and to heavy charged-particle beams. *Radiat. Environ. Biophys.* 16 (1979) 29-41.

Chaudary, N., Hill, R.P. Hypoxia and metastasis. *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1947-1949.

Cordier, D., Forrer, F., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Good, S., Müller-Brand, J., Mäcke, H., Reubi, J.C., Merlo, A. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ^{213}Bi -DOTA-[Thi8, Met(O₂)11]-substance P: a pilot trial. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 37 (2010) 1335-1344.

Cosse, J.P., Michiels, C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8 (2008) 790-797.

Dahle, J., Borrebaek, J., Jonasdottir, T.J., Hjelmerud, A.K., Melhus, K.B., Bruland, Ø.S., Press, O.W., Larsen, R.H. Targeted cancer therapy with a novel low-dose rate alpha-emitting radioimmunoconjugate. *Blood.* 110 (2007) 2049-2056.

Dahle, J., Bruland, O.S., Larsen, R.H. Relative biologic effects of low-dose-rate alpha-emitting ^{227}Th -rituximab and beta-emitting ^{90}Y -tiuxetan-ibritumomab versus external beam X-radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 72 (2008) 186-192.

Dahle, J., Jonasdottir, T.J., Heyerdahl, H., Nesland, J.M., Borrebaek, J., Hjelmerud, A.K., Larsen, R.H. Assessment of long-term radiotoxicity after treatment with the low-dose-rate alpha-particle-emitting radioimmunoconjugate (^{227}Th)-rituximab. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 37 (2010) 93-102.

Daniels, M., Scholes, G., Weiss, J. Chemical action of ionizing radiations in solution. Part XV. Effect of molecular oxygen in the irradiation of aqueous benzene solutions with X-rays. *J. Chem. Soc.* (1956) 832-834.

Dewhirst, M.W., Kimura, H., Rehmus, S.W., Braun, R.D., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Secomb, T.W. Microvascular studies on the origins of perfusion-limited hypoxia. *Br. J. Cancer Suppl.* 27 (1996) 247-251.

Dewhirst, M.W., Ong, E.T., Braun, R.D., Smith, B., Klitzman, B., Evans, S.M., Wilson, D. Quantification of longitudinal tissue pO₂ gradients in window chamber tumours: impact on tumour hypoxia. *Br. J. Cancer.* 79 (1999) 1717-1722.

Dewhirst, M.W., Cao, Y., Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 425-437.

Dewhirst, M.W. Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat. Res.* 172 (2009) 653-665.

Dumont, F., Altmeyer, A., Bischoff, P. Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: novel molecularly targeted approaches. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 19 (2009) 775-799.

Eddy, H.A., Casarett, G.W. Development of the vascular system in the hamster malignant neurilemmoma. *Microvasc. Res.* 6 (1973) 63-82.

Eriksson, D., Joniani, H.M., Sheikholvaezin, A., Löfroth, P.O., Johansson, L., Riklund Ahlström, K., Stigbrand, T. Combined low dose radio- and radioimmunotherapy of experimental HeLa Hep 2 tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 30 (2003) 895-906.

Essler, M., Gärtner, F.C., Neff, F., Blechert, B., Senekowitsch-Schmidtke, R., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Seidl, C. Therapeutic efficacy and toxicity of ²²⁵Ac-labelled vs. ²¹³Bi-labelled tumour-homing peptides in a preclinical mouse model of peritoneal carcinomatosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 39 (2012) 602-612.

Fahrmeir, L., Künstler, R., Pigeot, I., Tutz, G. *Der Weg zur Datenanalyse.* Springer Verlag, 2004, 5. Auflage.

Fazel, J., Rötzer, S., Seidl, C., Frank, A., Autenrieth, M., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Die fraktionierte intravesikale Therapie des fortgeschrittenen humanen Harnblasenkarzinoms im Mausmodell mit Bi-213-anti-EGFR-MAk zeigt keine Schädigung des tumorfreien Urothels. *Nuklearmedizin*. 50 (2011) A54, A55.

Feola, J.M., Lawrence, J.H., Welch, G.P. Oxygen enhancement ratio and RBE of helium ions on mouse lymphoma cells. *Radiat. Res.* 40 (1969) 400-413.

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 1 (2006) 2315-2319.

Furusawa, Y., Fukutsu, K., Aoki, M., Itsukaichi, H., Eguchi-Kasai, K., Ohara, H., Yatagai, F., Kanai, T., Ando, K. Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3)He-, (12)C- and (20)Ne-ion beams. *Radiat. Res.* 154 (2000) 485-496.

Gaertner, F.C., Souvatzoglou, M., Brix, G., Beer, A.J. Imaging of hypoxia using PET and MRI. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 552-570.

Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R.. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*. 300 (2003) 1155-1159.

Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L., Dang, C.V. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7919-7926.

Gioanni, J., Fischel, J-L., Lambert, J-C., Demard, F., Mazeau, C., Zanghellini, E., Ettore, F., Formento, P., Chauvel, P., Lalanne, C-M., Courdi, A. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24 (1988) 1445-1455.

Goldenberg, D.M. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J. Nucl. Med.* 43 (2002) 693-713.

Goodhead, D.T., Bance, D.A., Stretch, A., Wilkinson, R.E. A versatile plutonium-238 irradiator for radiobiological studies with alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 59 (1991) 195-210.

Goodhead, D.T., Thacker, J., Cox, R.. Weiss Lecture. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. *Int. J. Radiat. Biol.* 63 (1993) 543-556.

Goodhead, D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65(1994) 7-17.

Graves, E.E., Maity, A., Le, Q.T. The tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 20(2010) 156-163.

Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S., Scott, O.C. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 26 (1953) 638-648.

Guichard, M., Lachet, B., Malaise, E.P. Measurement of RBE, OER, and recovery of potentially lethal damage of a 645 MeV helium ion beam using EMT6 cells. *Radiat. Res.* 71 (1977) 413-429.

Hamacher, K.A., Den, R.B., Den, E.I., Sgouros, G. Cellular dose conversion factors for alpha-particle--emitting radionuclides of interest in radionuclide therapy. *J. Nucl. Med.* 42 (2001) 1216-1221.

Harada, H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *J. Radiat. Res.* 52 (2011) 545-556.

Harada, H., Inoue, M., Itasaka, S., Hirota, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Zeng, L., Ou, G., Zhu, Y., Yoshimura, M., McKenna, W.G., Muschel, R.J., Hiraoka, M. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat. Commun.* 3 (2012) 783.

Haro, K.J., Scott, A.C., Scheinberg, D.A. Mechanisms of resistance to high and low linear energy transfer radiation in myeloid leukemia cells. *Blood.* 120 (2012) 2087-2097.

Harris, A.L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 38-47.

Harrison, L.B., Chadha, M., Hill, R.J., Hu, K., Shasha, D. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* 7 (2002) 492-508.

Held, K.D. Radiation-induced apoptosis and its relationship to loss of clonogenic survival. *Apoptosis* 2 (1997) 265-282.

Held, L. *Methoden der statistischen Inferenz: Likelihood und Bayes*. Spektrum Verlag, 2008.

Hirayama, R., Ito, A., Tomita, M., Tsukada, T., Yatagai, F., Noguchi, M., Matsumoto, Y., Kase, Y., Ando, K., Okayasu, R., Furusawa, Y. Contributions of direct and indirect actions in cell killing by high-LET radiations. *Radiat. Res.* 171 (2009) 212-218.

Höckel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schaffer, U., Vaupel, P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 56 (1996) 4509-4515.

Höckel, M., Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer. Inst.* 93 (2001) 266-276.

Hoffman, R.M. In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 5 (1991) 133-143.

Huang, C.Y., Pourgholami, M.H., Allen, B.J. Optimizing radioimmunoconjugate delivery in the treatment of solid tumor. *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 854-860.

Huber, R. *Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ²¹³Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig - Maximilians - Universität München, München, 2003a, S. 101-102.

Huber, R., Seidl, C., Schmid, E., Seidenschwang, S., Becker, K.F., Schuhmacher, C., Apostolidis, C., Nikula, T., Kremmer, E., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.* 9 (2003b) 3922-3928.

Ishikawa, Y., Wada, I., Fukumoto, M. Alpha-particle carcinogenesis in Thorotrast patients: epidemiology, dosimetry, pathology, and molecular analysis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (2001) 311-315.

Jaggi, J.S., Kappel, B.J., McDevitt, M.R., Sgouros, G., Flombaum, C.D., Cabassa, C., Scheinberg, D.A. Efforts to control the errant products of a targeted in vivo generator. *Cancer Res.* 65 (2005) 4888-4895.

Jain, R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307 (2005) 58-62.

Jenner, T.J., deLara, C.M., O'Neill, P., Stevens, D.L. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in V79-4 mammalian cells following gamma- and alpha-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 64 (1993) 265-273.

Jordan, B.F., Sonveaux, P. Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Front. Pharmacol.* 3 (2012) 94.

Jurcic, J.G., Larson, S.M., Sgouros, G., McDevitt, M.R., Finn, R.D., Divgi, C.R., Ballangrud, A.M., Hamacher, K.A., Ma, D., Humm, J.L., Brechbiel, M.W., Molinet, R., Scheinberg, D.A. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood.* 100 (2002) 1233-1239.

Kaelin, W.G. Jr., Ratcliffe, P.J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell.* 30 (2008) 393-402.

Kavanagh, B.D., Coffey, B.E., Needham, D., Hochmuth, R.M., Dewhirst, M.W. The effect of flunarizine on erythrocyte suspension viscosity under conditions of extreme hypoxia, low pH, and lactate treatment. *Br. J. Cancer.* 67 (1993) 734-741.

Kennel, S.J., Stabin, M., Yoriyaz, H., Brechbiel, M., Mirzadeh, S. Treatment of lung tumor colonies with ^{90}Y targeted to blood vessels: comparison with the alpha-particle emitter ^{213}Bi . *Nucl. Med. Biol.* 26 (1999) 149-157.

Kennel, S.J., Lankford, T., Davern, S., Foote, L., Taniguchi, K., Ohizumi, I., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Mayumi, T., Mirzadeh, S. Therapy of rat tracheal carcinoma IC-12 in SCID mice: vascular targeting with ^{213}Bi -MAb TES-23. *Eur. J. Cancer.* 38 (2002) 1278-1287.

Kim, Y.S., Brechbiel, M.W. An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biol.* 33 (2012) 573-590.

Kizaka-Kondoh, S., Inoue, M., Harada, H., Hiraoka, M.. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci.* 94 (2003) 1021-1028.

Krieger, H. Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 2012, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 311-313.

Kumareswaran, R., Ludkovski, O., Meng, A., Sykes, J., Pintilie, M., Bristow, R.G. Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability. *J. Cell. Sci.* 125 (2012) 189-199.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 (1970) 680-685.

Lane, D.M., Eagle, K.F., Begent, R.H., Hope-Stone, L.D., Green, A.J., Casey, J.L., Keep, P.A., Kelly, A.M., Ledermann, J.A., Glaser, M.G. Radioimmunotherapy of metastatic colorectal tumours with iodine-131-labelled antibody to carcinoembryonic antigen: phase I/II study with comparative biodistribution of intact and F(ab')₂ antibodies. *Br. J. Cancer.* 70 (1994) 521-525.

Leemans, C.R., Braakhuis, B.J., Brakenhoff, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 9-22.

Lemmon, M.J., van Zijl, P., Fox, M.E., Mauchline, M.L., Giaccia, A.J., Minton, N.P., Brown, J.M. Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene. Ther.* 4 (1997) 791-796.

Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z.N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M.W., Li, C.Y. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol. Cell.* 26 (2007) 63-74.

Lin, Z., Mechalakos, J., Nehmeh, S., Schoder, H., Lee, N., Humm, J., Ling, C.C. The influence of changes in tumor hypoxia on dose-painting treatment plans based on ¹⁸F-FMISO positron emission tomography. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70 (2008) 1219-1228.

Liu, J., Harada, H., Ogura, M., Shibata, T., Hiraoka, M. Adenovirus-mediated hypoxia-targeting cytosine deaminase gene therapy enhances radiotherapy in tumour xenografts. *Br. J. Cancer.* 96 (2007) 1871-1878.

Masunaga, S., Liu, Y., Tanaka, H., Sakurai, Y., Suzuki, M., Kondo, N., Maruhashi, A., Ono, K. Reducing intratumour acute hypoxia through bevacizumab treatment, referring to the response of quiescent tumour cells and metastatic potential. *Br. J. Radiol.* 84 (2011) 1131-1138.

Mateo, J., García-Lecea, M., Cadenas, S., Hernández, C., Moncada, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem. J.* 376 (2003) 537-544.

McCullagh, P., Nelder, J.A. *Generalized Linear Models*. Chapman & Hall / CRC, 1989.

McCullagh, P., Neuhaus, J.M. *Generalized Linear Mixed Models*. Encyclopedia of Biostatistics. John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

McDevitt, M.R., Sgouros, G., Finn, R.D., Humm, J.L., Jurcic, J.G., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur. J. Nucl. Med.* 25 (1998) 1341-1351.

Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.P. High-LET ion radiolysis of water: oxygen production in tracks. *Radiat. Res.* 171 (2009) 379-386.

Michael, B.D., Prise, K.M. A multiple-radical model for radiation action on DNA and the dependence of OER on LET. *Int. J. Radiat. Biol.* 69 (1996) 351-358.

Milenic, D.E., Brady, E.D., Brechbiel, M.W. Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 488-499.

Milosevic, M., Warde, P., Ménard, C., Chung, P., Toi, A., Ishkanian, A., McLean, M., Pintilie, M., Sykes, J., Gospodarowicz, M., Catton, C., Hill, R.P., Bristow, R. Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 2108-2114.

Minchinton, A.I., Tannock, I.F. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 583-592.

Mirzadeh, S., Brechbiel, M.W., Atcher, R.W., Gansow, O.A. Radiometal labeling of immunoproteins: covalent linkage of 2-(4-isothiocyanatobenzyl) diethylenetriaminepentaacetic acid ligands to immunoglobulin. *Bioconjug. Chem.* 1 (1990) 59-65.

Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., Dewhirst, M.W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*. 5 (2004) 429-441.

Moeller, B.J., Dreher, M.R., Rabbani, Z.N., Schroeder, T., Cao, Y., Li, C.Y., Dewhirst, M.W. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*. 8 (2005) 99-110.

Moeller, B.J., Dewhirst, M.W. HIF-1 and tumour radiosensitivity. *Br. J. Cancer*. 95 (2006) 1-5.

Moeller, B.J., Richardson, R.A., Dewhirst, M.W. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*. 26 (2007) 241-248.

Moon, S.Y., Chang, H.W., Roh, J.L., Kim, G.C., Choi, S.H., Lee, S.W., Cho, K.J., Nam, S.Y., Kim, S.Y. Using YC-1 to overcome the radioresistance of hypoxic cancer cells. *Oral. Oncol*. 45 (2009) 915-919.

Moon, E.J., Sonveaux, P., Porporato, P.E., Danhier, P., Gallez, B., Batinic-Haberle, I., Nien, Y.C., Schroeder, T., Dewhirst, M.W. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 20477-20482.

Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Apostolidis, C. Targeted alpha therapy with ²¹³Bi. *Curr. Radiopharm*. 4 (2011) 295-305.

Mottram, J.C. Factor of importance in radiosensitivity of tumours. *Brit. J. Radiol*. 9 (1936) 606-614.

Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol. Med*. 110 (2005) 21-28.

Nakano, T., Suzuki, Y., Ohno, T., Kato, S., Suzuki, M., Morita, S., Sato, S., Oka, K., Tsujii, H. Carbon beam therapy overcomes the radiation resistance of uterine cervical cancer originating from hypoxia. *Clin. Cancer Res*. 12 (2006) 2185-2190.

Nehmeh, S.A., Lee, N.Y., Schröder, H., Squire, O., Zanzonico, P.B., Erdi, Y.E., Greco, C., Mageras, G., Pham, H.S., Larson, S.M., Ling, C.C., Humm, J.L. Reproducibility of intratumor distribution of (18)F-fluoromisonidazole in head and neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70 (2008) 235-242.

Nikula, T.K., Curcio, M.J., Brechbiel, M.W., Gansow, O.A., Finn, R.D., Scheinberg, D.A. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl. Med. Biol.* 22 (1995) 387-390.

Nikula, T.K., McDevitt, M.R., Finn, R.D., Wu, C., Kozak, R.W., Garmestani, K., Brechbiel, M.W., Curcio, M.J., Pippin, C.G., Tiffany-Jones, L., Geerlings, M.W. Sr., Apostolidis, C., Molinet, R., Geerlings, M.W. Jr., Gansow, O.A., Scheinberg, D.A. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J. Nucl. Med.* 40 (1999) 166-176.

Ning, S., Bednarski, M., Oronsky, B., Scicinski, J., Saul, G., Knox, S.J. Dinitroazetidines are a novel class of anticancer agents and hypoxia-activated radiation sensitizers developed from highly energetic materials. *Cancer Res.* 72 (2012) 2600-2608.

Nordsmark, M., Bentzen, S.M., Rudat, V., Brizel, D., Lartigau, E., Stadler, P., Becker, A., Adam, M., Molls, M., Dunst, J., Terris, D.J., Overgaard, J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother. Oncol.* 77 (2005) 18-24.

Oommen, D., Prise, K.M. KNK437, abrogates hypoxia-induced radioresistance by dual targeting of the AKT and HIF-1 α survival pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421 (2012) 538-543.

Otte, A., Jermann, E., Behe, M., Goetze, M., Bucher, H.C., Roser, H.W., Heppeler, A., Mueller-Brand, J., Maecke, H.R. DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy. *Eur. J. Nucl. Med.* 24 (1997) 792-795.

Pajonk, F., Vlashi, E., McBride, W.H. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem. Cells.* 28 (2010) 639-648.

Papa, A., Rossi, L., Lo Russo, G., Giordani, E., Spinelli, G.P., Zullo, A., Petrozza, V., Tomao, S. Emerging role of cetuximab in the treatment of colorectal cancer. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 7 (2012) 233-247.

Park, S.I., Shenoi, J., Pagel, J.M., Hamlin, D.K., Wilbur, D.S., Orgun, N., Kenoyer, A.L., Frayo, S., Axtman, A., Bäck, T., Lin, Y., Fisher, D.R., Gopal, A.K., Green, D.J., Press, O.W. Conventional and pretargeted radioimmunotherapy using bismuth-213 to target and treat non-Hodgkin lymphomas expressing CD20: a preclinical model toward optimal consolidation therapy to eradicate minimal residual disease. *Blood.* 116 (2010) 4231-4239.

Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S.I., O'Sullivan, J.M., Fosså, S.D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D.C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N.D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., Boehmer, S., Dall'Oglio, M., Franzén, L., Coleman, R., Vogelzang, N.J., O'Bryan-Tear, C.G., Staudacher, K., Garcia-Vargas, J., Shan, M., Bruland, Ø.S., Sartor, O., ALSYMPCA Investigators. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 213-223.

Pettersen, E.O., Wang, H. Radiation-modifying effect of oxygen in synchronized cells pre-treated with acute or prolonged hypoxia. *Int. J. Radiat. Biol.* 70 (1996) 319-26.

Pfost, B., Seidl, C., Autenrieth, M., Saur, D., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Intravesical alpha-radioimmunotherapy with ²¹³Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 1700-1708.

Prise, K.M., Folkard, M., Davies, S., Michael, B.D. The irradiation of V79 mammalian cells by protons with energies below 2 MeV. Part II. Measurement of oxygen enhancement ratios and DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 58 (1990) 261-277.

Puck, T.T., Markus, P.I., Cieciura, S.J. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J. Exp. Med.* 103 (1956) 273-283.

Raja, C., Graham, P., Abbas Rizvi, S.M., Song, E., Goldsmith, H., Thompson, J., Bosserhoff, A., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Kearsley, J., Reisfeld, R., Allen, B.J. Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 6 (2007) 846-852.

Reeves, T.D., Hill, E.G., Armeson, K.E., Gillespie, M.B. Cetuximab therapy for head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review of the data. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 144 (2011) 676-684.

Reiser, M, Kuhn, F., Debus, J. *Radiologie Duale Reihe.* Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, 2. korrigierte Auflage, S. 2-55.

Rischin, D., Peters, L., Fisher, R., Macann, A., Denham, J., Poulsen, M., Jackson, M., Kenny, L., Penniment, M., Corry, J., Lamb, D., McClure, B. Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation versus Fluorouracil, Cisplatin, and Radiation in patients with locally advanced head and neck cancer: a randomized phase II trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group (TROG 98.02). *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 79-87.

Rizvi, S., Allen, B., Lee, C., Bruchertseifer, F., Apostolidis, C., Morgenstern, A., Clarke, R. Orthotopic administration of (213)Bi-bevacizumab inhibits progression of PC3 xenografts in the prostate. *Immunotherapy.* 4 (2012) 549-554.

Robbins, R.J., Schlumberger, M.J. The evolving role of (131)I for the treatment of differentiated thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.* 46 (2005) 28-37.

Roots, R., Okada, S. Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 21 (1972) 329-342.

Roots, R., Okada, S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat. Res.* 64 (1975) 306-320.

Roots, R., Chatterjee, A., Chang, P., Lommel, L., Blakely, E.A. Characterization of hydroxyl radical-induced damage after sparsely and densely ionizing irradiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 47 (1985) 157-166.

Rosenblat, T.L., McDevitt, M.R., Mulford, D.A., Pandit-Taskar, N., Divgi, C.R., Panageas, K.S., Heaney, M.L., Chanel, S., Morgenstern, A., Sgouros, G., Larson, S.M., Scheinberg, D.A., Jurcic, J.G. Sequential cytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 5303-5311.

Ruan, K., Song, G., Ouyang, G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J. Cell. Biochem.* 107 (2009) 1053-1062.

Rüger B. Test- und Schätztheorie. Oldenbourg Verlag, 2002, Band 2: Statistische Tests.

Salceda, S., Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 22642–22647.

Saleem, W., Suzuki, Y., Mobaraki, A., Yoshida, Y., Noda, S., Saitoh, J.I., Nakano, T. Reduction of nitric oxide level enhances the radiosensitivity of hypoxic non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 102 (2011) 2150-2156.

Sawant, S.G., Zheng, W., Hopkins, K.M., Randers-Pehrson, G., Lieberman, H.B., Hall, E.J. The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. *Radiat. Res.* 157 (2002) 361-364.

Schilling, D., Gehrman, M., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, A.G., Abend, M., Molls, M., Multhoff, G. Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. *FASEB. J.* 23 (2009) 2467-2477.

Schilling, D., Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München, persönliche Mitteilung, 2009.

Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011, 3. Auflage, S. 98.

Schödel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Mole, D.R. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 117 (2011) 207-217.

Secomb, T.W., Hsu, R., Dewhirst, M.W., Klitzman, B., Gross, J.F. Analysis of oxygen transport to tumor tissue by microvascular networks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 25 (1993) 481-489.

Secomb, T.W., Hsu, R., Ong, E.T., Gross, J.F., Dewhirst, M.W. Analysis of the effects of oxygen supply and demand on hypoxic fraction in tumors. *Acta Oncol.* 34 (1995) 313-316.

Seidl, C., Wulbrand, C., Gilbertz, K.P., Rauser, S., Feuchtinger, A., Frank, A., Gaertner, F.C., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidke, R. High cytotoxicity of ²¹³Bi-immunconjugates is due to efficient induction of DNA double-strand breaks and is independent of cellular oxygenation. *Symposiumsausgabe des 7th Symposium on Targeted Alpha Therapy.* (2011) 35.

Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 148 (2012a) 399-408.

Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 33 (2012b) 207-214.

Sgouros, G., Ballangrud, A.M., Jurcic, J.G., McDevitt, M.R., Humm, J.L., Erdi, Y.E., Mehta, B.M., Finn, R.D., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: ²¹³Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. *J. Nucl. Med.* 40 (1999) 1935-1946.

Shannon, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Condrón, C.M., Toomey, D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat. Rev.* 29 (2003) 297-307.

Sharkey, R.M., Karacay, H., Govindan, S.V., Goldenberg, D.M. Combination radioimmunotherapy and chemoimmunotherapy involving different or the same targets improves therapy of human pancreatic carcinoma xenograft models. *Mol. Cancer Ther.* 10 (2011) 1072-1081.

Shrieve, D.C., Deen, D.F., Harris, J.W. Effects of extreme hypoxia on the growth and viability of EMT6/SF mouse tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 43 (1983) 3521-3627.

Shrieve, D.C., Harris, J.W. The in vitro sensitivity of chronically hypoxic EMT6/SF cells to X-radiation and hypoxic cell radiosensitizers. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 48 (1985) 127-138.

Singh Jaggi, J., Henke, E., Seshan, S.V., Kappel, B.J., Chattopadhyay, D., May, C., McDevitt, M.R., Nolan, D., Mittal, V., Benezra, R., Scheinberg, D.A. Selective alpha-particle mediated depletion of tumor vasculature with vascular normalization. *PLoS One.* 2 (2007) 267.

Sofou, S., Kappel, B.J., Jaggi, J.S., McDevitt, M.R., Scheinberg, D.A., Sgouros, G. Enhanced retention of the alpha-particle-emitting daughters of Actinium-225 by liposome carriers. *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 2061-2067.

Song, H., Hobbs, R.F., Vajravelu, R., Huso, D.L., Esaias, C., Apostolidis, C., Morgenstern, A., Sgouros, G.. Radioimmunotherapy of breast cancer metastases with alpha-particle emitter ^{225}Ac : comparing efficacy with ^{213}Bi and ^{90}Y . *Cancer Res.* 69 (2009) 8941-8948.

Song, H., Sgouros, G. Radioimmunotherapy of solid tumors: searching for the right target. *Curr. Drug Deliv.* 8 (2011) 26-44.

Sprong, D., Janssen, H.L., Vens, C., Begg, A.C. Resistance of hypoxic cells to ionizing radiation is influenced by homologous recombination status. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 64 (2006) 562-572.

Stuglik, Z. On the "oxygen in heavy-ion tracks" hypothesis. *Radiat. Res.* 143 (1995) 343-348.

Swallow, A.J., Velandia, J.A. Oxygen effect as an explanation of differences between the action of alpha-particles and x- or gamma-rays on aqueous solutions of amino-acids and proteins. *Nature.* 195 (1962) 798-800.

Tejani, M.A., Cohen, R.B., Mehra, R. The contribution of cetuximab in the treatment of recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Biologics.* 4 (2010) 173-185.

Thoday, J.M., Read, J. Effect of oxygen on the frequency of chromosome aberrations produced by X-rays. *Nature*. 160 (1947) 608.

Thoday, J.M., Read J. Effect of oxygen on the frequency of chromosome aberrations produced by alpha-rays. *Nature*. 163 (1949) 133.

Thomlinson, R.H., Gray, L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer*. 9 (1955) 539-549.

Todd, P. Heavy-ion irradiation of cultured human cells. *Radiat. Res. Suppl.* 7 (1967) 196-207.

Todd, P., Martins, B.I., Lyman, J.T., Kim, J.H., Schroy, C.B. Spatial distribution of human cell survival and oxygen effect in a therapeutic helium ion beam. *Cancer*. 34 (1974) 1-5.

Tomblyn, M. Radioimmunotherapy for B-cell non-hodgkin lymphomas. *Cancer Control*. 19 (2012) 196-203.

Triantafyllou, A., Liakos, P., Tsakalof, A., Georgatsou, E., Simos, G., Bonanou, S. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free. Radic. Res.* 40 (2006) 847-856.

Vaupel, P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* 14 (2004) 198-206.

Vaupel, P., Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 225-39.

Vergroesen, A.J., Eudkel, Vos, O. Protection of tissue-culture cells against ionizing radiation. III. The influence of anoxia on the radioprotection of tissue-culture cells by cysteamine. *Int. J. Radiat. Biol.* 6 (1963) 117-126.

Viola, R.J., Provenzale, J.M., Li, F., Li, C.Y., Yuan, H., Tashjian, J., Dewhirst, M.W. In vivo bioluminescence imaging monitoring of hypoxia-inducible factor 1alpha, a promoter that protects cells, in response to chemotherapy. *AJR. Am. J. Roentgenol.* 191 (2008) 1779-1784.

- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (1995) 5510-5514.
- Warburg, O., Posener, K., Negelein, E. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren; *Biochemische Zeitschrift* 152 (1924) 319-344.
- Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science.* 123 (1956) 309-314.
- Ward, J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* 35 (1988) 95-125.
- Ward, J.F. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1994) 427-432.
- Weeks, A.J., Paul, R.L., Marsden, P.K., Blower, P.J., Lloyd, D.R. Radiobiological effects of hypoxia-dependent uptake of ⁶⁴Cu-ATSM: enhanced DNA damage and cytotoxicity in hypoxic cells. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 37 (2010) 330-338.
- Wenzl, T., Wilkens, J.J. Modelling of the oxygen enhancement ratio for ion beam radiation therapy. *Phys. Med. Biol.* 56 (2011) 3251-3268.
- Williams, K.J., Telfer, B.A., Xenaki, D., Sheridan, M.R., Desbaillets, I., Peters, H.J., Honess, D., Harris, A.L., Dachs, G.U., van der Kogel, A., Stratford, I.J. Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother. Oncol.* 75 (2005) 89-98.
- Wilson, W.R., Hay, M.P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 393-410.
- Wollina, U. Cetuximab in non-melanoma skin cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 12 (2012) 949-956.
- Wong, J.Y., Shibata, S., Williams, L.E., Kwok, C.S., Liu, A., Chu, D.Z., Yamauchi, D.M., Wilczynski, S., Ikle, D.N., Wu, A.M., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Doroshow, J.H., Raubitschek, A.A. A Phase I trial of ⁹⁰Y-anti-carcinoembryonic antigen chimeric T84.66 radioimmunotherapy with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 5842-5852.

Wouters, B.G., Koritzinsky, M.. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 851-864.

Yaromina, A., Kroeber, T., Meinzer, A., Boeke, S., Thames, H., Baumann, M., Zips, D. Exploratory study of the prognostic value of microenvironmental parameters during fractionated irradiation in human squamous cell carcinoma xenografts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 80 (2011) 1205-1213.

Zalutsky, M.R., Reardon, D.A., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., McLendon, R.E., Wong, T.Z., Bigner, D.D. Clinical experience with alpha-particle emitting 211At: treatment of recurrent brain tumor patients with 211At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* 49 (2008) 30-38.

Zhang, X., Kon, T., Wang, H., Li, F., Huang, Q., Rabbani, ZN., Kirkpatrick, J.P., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M.W., Li, C.Y. Enhancement of hypoxia-induced tumor cell death in vitro and radiation therapy in vivo by use of small interfering RNA targeted to hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res.* 64 (2004) 8139-8142.

Zielinska, B., Apostolidis, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A. An improved method for the production of Ac-225/Bi-213 from Th-229 for targeted alpha therapy. *Solvent. Extr. Ion. Exc.* 25 (2007) 339-349.

Zigler, J.S. Jr., Lepe-Zuniga, J.L., Vistica, B., Gery, I. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 21 (1985) 282-287.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Ermöglichung einer Dissertation am Institut für Nuklearmedizin der Technischen Universität München. Vor allem bedanke ich mich für die stets zielführenden Vorschläge und Anregungen, den ausgesprochen freundlichen Umgang und den beruhigenden Zuspruch bei Problemen.

Ein ebenso großer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Christof Seidl für seine ruhige und geduldige Art, die große Unterstützung beim Erstellen der Versuchsprotokolle, die intensive Hilfe bei der Ausarbeitung von Vorträgen und Veröffentlichungen und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Phys. Benjamin Terjung für die freundliche Unterstützung bei den dosimetrischen Messungen und der Bedienung des Linearbeschleunigers der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologischen Onkologie der Technischen Universität München bedanken.

Ein weiterer herzlicher Dank gilt Frau. Dr. rer. nat. Daniela Schilling für die flexible und unkomplizierte Bereitstellung der Hypoxiekammer der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologischen Onkologie der Technischen Universität München.

Herrn Dipl.-Stat. Andreas Bayerstadler möchte ich für die mühevollen und zeitaufwendigen Hilfe bei der statistischen Auswertung der Messergebnisse ausdrücklich danken.

Den Mitarbeitern im Labor danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung im Umgang mit den Zellkulturen und dem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem, sowie der Assistenz bei Experimenten, die alleine nicht durchführbar waren. Zudem soll das stets sehr freundliche Umfeld erwähnt sein, das die Arbeit deutlich erleichtert hat.

Bei Herrn Dr. med. Florian Gärtner möchte ich mich für die aufschlussreichen und weiterführenden Diskussionen zu vorliegendem Thema bedanken.

Finanziert wurde die Arbeit durch die Europäische Kommission (Projekt: FP7 Collaborative Project TARCC HEALTH-F2-2007-201962).

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Familie für den großen Rückhalt, die ständige Verfügbarkeit für Ratschläge und die moralische Unterstützung danken. Ohne sie wären ein Studium und eine Doktorarbeit nicht möglich gewesen.