

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines  
Doktores der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

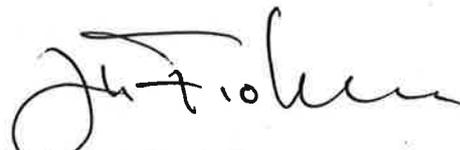
**Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen  
durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in humanen  
Plattenepitheltumorzellen des Kopf- /  
Halsbereiches zur Etablierung von EGFR  
gerichteten Radioimmuntherapien zur  
Tumorinaktivierung**

von Jarob Saker

Oktober 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Prof. Dr. E. DIKOMEY  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Prof. Dr. U. WIENAND  
Tag der Disputation: 02. September 2011

Hamburg, den 28. Juli 2011



Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

# 1. Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INHALTSVERZEICHNIS</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3. EINLEITUNG</b>   | <b>5</b>  |
| <b>3.1. BEDEUTUNG DER STRAHLENTHERAPIE FÜR DIE BEHANDLUNG VON MALIGNEN TUMOREN</b>         | <b>5</b>  |
| 3.1.1. GRUNDLAGEN DER STRAHLENTHERAPIE   | 5         |
| 3.1.2. WIRKUNGSWEISE DER STRAHLENTHERAPIE  | 7         |
| 3.1.3. NEBENWIRKUNGEN DER STRAHLENTHERAPIE   | 10        |
| <b>3.2. INTERNE BESTRAHLUNGSANSÄTZE KÖNNEN THERAPIEN MIT EXTERNER BESTRAHLUNG ERGÄNZEN</b> | <b>12</b> |
| <b>3.3. DER EGF-REZEPTOR ALS ZIELMOLEKÜL EINER RADIOIMMUNTHERAPIE</b>                      | <b>14</b> |
| 3.3.1. BIOLOGIE DER ERBB-REZEPTOREN  | 14        |
| 3.3.2. DER EGF-REZEPTOR  | 14        |
| 3.3.3. DER EGF-REZEPTOR IN TUMOREN   | 17        |
| 3.3.4. BESTEHENDE ANSÄTZE ZUR NUTZUNG DES EGFR ALS ZIELMOLEKÜL EINER RADIOIMMUNTHERAPIE    | 18        |
| <b>3.4. <sup>90</sup>YTTRIUM-DTPA-CETUXIMAB ALS RADIOIMMUNTHERAPEUTIKUM</b>                | <b>24</b> |
| <b>4. FRAGESTELLUNG</b>  | <b>27</b> |
| <b>5. MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>29</b> |
| <b>5.1. ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN</b>  | <b>29</b> |
| 5.1.1. KULTIVIERUNG VON ZELLEN   | 29        |
| 5.1.2. BESTRAHLUNG DER ZELLEN MIT DER RÖNTGENRÖHRE   | 29        |
| 5.1.3. INKUBATION DER ZELLEN MIT DEM NICHT RADIOAKTIVEN/RADIOAKTIVEN ANTIKÖRPER            | 30        |
| 5.1.4. DURCHFÜHREN DER PROLIFERATIONSASSAYS  | 32        |
| 5.1.5. AUSSÄEN DER ZELLEN FÜR KOLONIETEST  | 32        |
| <b>5.2. PROTEINANALYTIK</b>  | <b>33</b> |
| 5.2.1. AUFTRENNUNG VON PROTEINEN ÜBER EINE DIFFERENZIELLE ZENTRIFUGATION                   | 33        |
| 5.2.2. NACHWEIS VON PROTEINEN ÜBER SDS-PAGE UND WESTERN BLOT                               | 34        |
| <b>5.3. FLUSSZYTOMETRIE</b>  | <b>37</b> |
| <b>5.4. KONSTANTFELDGELELEKTROPHORESE</b>  | <b>38</b> |
| <b>5.5. IMMUNFLUORESCENZ</b>   | <b>39</b> |
| <b>5.6. LISTEN UND TABELLEN</b>  | <b>41</b> |
| 5.6.1. ZELLINIEN   | 41        |
| 5.6.2. CHEMIKALIEN, MEDIEN UND LABORDIAGNOSTIKA  | 41        |
| 5.6.3. ANTIKÖRPER  | 43        |
| 5.6.4. PUFFER UND LÖSUNGEN   | 44        |
| 5.6.5. GERÄTE  | 45        |
| 5.6.6. SOFTWARE  | 46        |
| <b>6. ERGEBNISSE</b>   | <b>48</b> |
| <b>6.1. EGFR EXPRESSION IN PLATTENEPIHELKARZINOMZELLINIEN</b>                              | <b>48</b> |
| 6.1.1. BESTIMMUNG DER EGFR EXPRESSION PER WESTERN BLOT                                     | 48        |
| 6.1.2. BESTIMMUNG DER EGFR OBERFLÄCHENEXPRESSSION PER FACS ANALYSE                         | 53        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>6.2. NACHWEIS VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN</b>  | <b>58</b>  |
| 6.2.1. YH2AX KINETIKEN ALS MARKER FÜR DOPPELSTRANGBRÜCHE  | 59         |
| 6.2.2. EINFLUSS NIEDRIGER TEMPERATUREN AUF DEN NACHWEIS VON YH2AX FOCI  | 60         |
| 6.2.3. EINFLUSS EINER LAGERUNG VON FIXIERTEN ZELLEN AUF DEN IMMUNOLOGISCHEN NACHWEIS VON YH2AX FOCI   | 65         |
| <b>6.3. CHARAKTERISIERUNG DES ANTIKÖRPERS DTPA-CETUXIMAB</b>  | <b>66</b>  |
| 6.3.1. AFFINITÄTSVERÄNDERUNGEN VON CETUXIMAB DURCH DIE KOPPLUNG DES CHELATORS DTPA  | 66         |
| 6.3.2. KINETIK DER BINDUNG VON DTPA-CETUXIMAB AN EGFR LEBENDER ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DER REAKTIONSBEDINGUNGEN                                    | 68         |
| 6.3.3. EINFLUSS VON DTPA-CETUXIMAB AUF DIE ANZAHL NACHWEISBARER DNA-DSB NACH EXTERNER BESTRAHLUNG   | 70         |
| <b>6.4. INDUKTION UND REPARATUR VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN DURCH <sup>90</sup>Y-DTPA-CETUXIMAB</b>   | <b>71</b>  |
| 6.4.1. KINETIK VON DURCH <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB ERZEUGTEN DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN   | 71         |
| 6.4.2. ABHÄNGIGKEIT ERZEUGTER DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHE VON DER INKUBATIONSDAUER   | 73         |
| 6.4.3. ANZAHL DER DURCH <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB INDUZIERTEN DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER EGFR EXPRESSION DER ZIELZELLEN. | 74         |
| 6.4.4. INDUKTION VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN DURCH <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB UNTER BERÜCKSICHTIGUNG VON REPARATURPROZESSEN.                  | 77         |
| <b>6.5. EINFLUSS VON <sup>90</sup>Y-DTPA-CETUXIMAB AUF DAS ZELLÜBERLEBEN</b>  | <b>82</b>  |
| <b>6.6. FAZIT</b>   | <b>87</b>  |
| <hr/> <b>7. DISKUSSION</b>  | <b>89</b>  |
| <hr/>   |            |
| 7.1. KONZEPT DER RADIOIMMUNTHERAPIE MIT <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB  | 89         |
| 7.2. DIE BEDEUTUNG DER VERTEILUNG DES EGFR IN PLATTENEPITHELKARZINOM-ZELLINIEN  | 90         |
| 7.3. KINETIK DER YH2AX UND 53BP1 FOCI - DNA-SCHADENSERKENNUNG UND REPARATUR IN PLATTENEPITHELKARZINOMZELLINIEN                                    | 92         |
| 7.4. KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB BINDUNG AN ZELLEN  | 95         |
| 7.5. ERZEUGUNG UND AKKUMULATION VON DURCH <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB INDUZIERTEN DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN                                      | 96         |
| 7.6. EINFLUSS VON <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB AUF DAS ZELLÜBERLEBEN  | 101        |
| 7.7. <sup>90</sup> Y-DTPA-CETUXIMAB UND RADIOIMMUNTHERAPIE IM MAUSMODELL UND MENSCHEN   | 103        |
| 7.8. AUSBLICK   | 107        |
| <hr/> <b>8. ANHANG</b>  | <b>111</b> |
| <hr/>   |            |
| 8.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS  | 111        |
| 8.2. LITERATURVERZEICHNIS   | 116        |
| <hr/> <b>9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>   | <b>123</b> |
| <hr/>   |            |
| <b>10. DANKSAGUNG</b>   | <b>124</b> |
| <hr/>   |            |

## 2. Zusammenfassung

Die Radioimmuntherapie ist ein neuer Ansatz zur gezielten Behandlung von Tumorzellen und Metastasen bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes. Sie ermöglicht durch an Antikörper gekoppelte, radioaktive Isotope die Anreicherung von Radioaktivität an spezifischen Oberflächenproteinen.

Aufgrund seiner Überexpression in einer Vielzahl von Tumoren ist der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) eine geeignete Zielstruktur für solche Strategien. Um das Potenzial einer EGFR gerichteten Radioimmuntherapie unter der Verwendung des Antikörpers <sup>90</sup>Yttrium-DTPA-Cetuximab zu untersuchen, wurden Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- / Halsbereiches hinsichtlich ihrer EGFR Expression charakterisiert und mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab behandelt.

Bei der Charakterisierung der zellulären EGFR Expression konnte sowohl auf Ebene der Gesamtproteinexpression als auch bei der intrazellulären Verteilung des Rezeptors (Membran / Cytoplasma / Kern) eine starke Heterogenität zwischen den untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass ausschließlich die EGFR Oberflächenexpression der Zellen die Cetuximabbindekapazität und damit die durch <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab applizierte Dosis bestimmt. So konnten in stark EGFR überexprimierenden Zellen Dosen von 135 mGy / h realisiert werden. Zellen mit geringer EGFR Expression erhielten hingegen deutlich geringere Dosen von nur 6,6 mGy / h.

In allen mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab behandelten Zellen konnten DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) induziert werden. Die Anzahl der induzierten Brüche hing dabei von zwei Faktoren ab: 1. der Inkubationszeit und damit der Dosisakkumulation und 2. der EGFR Oberflächenexpression und damit der Cetuximabbindekapazität. Der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und der Anzahl durch <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-DSB ist hoch signifikant ( $r^2 = 0,968$ ;  $p = 0,016$ ). Die Zahl der induzierten Brüche nahm dabei bis zur längsten untersuchten Inkubationszeit von 3 h linear mit der Zeit zu.

Für die Zahl der DSB zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Exposition mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab, zeigt sich jeweils eine strenge lineare Abhängigkeit von der zellulären EGFR Expression. Dies gilt sowohl für kurze Inkubationszeiten von 3 h ( $r^2 = 0,820$ ,  $p = 0,013$ ), als auch für eine Exposition von 24 h ( $r^2 = 0,863$ ;  $p = 0,007$ ) oder 48 h ( $r^2 = 0,905$ ;  $p = 0,003$ ). Da während der Exposition auch

DNA-Reparaturprozesse ablaufen können, bedeutet dies, dass unabhängig von der EGFR-Expression in allen Zellen auch eine effektive Reparatur stattfindet. In Zellen mit geringer EGFR-Expression werden aber die wenigen erzeugten DSB nahezu vollständig repariert. In Zellen mit starker EGFR Expression verbleiben aufgrund der großen Anzahl an erzeugten Schäden auch nach längerer Inkubation noch DSB.

Die Behandlung der Zelllinien mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab führte darüber hinaus zu einer Zellinaktivierung. Deren Ausmaß hing ebenfalls von der zellulären EGFR Expression ab ( $r^2 = 0,927$ ;  $p = 0,002$ ). Zellen mit starker EGFR Oberflächenexpression zeigten dabei eine deutliche Reduktion der Zellüberlebensrate von bis zu 90 %, während für Zellen mit geringer EGFR Expression die Überlebensrate nur wenig oder sogar gar nicht beeinträchtigt wurde. Ein Vergleich mit der Anzahl verbleibender DNA-DSB zeigt, dass dieser Parameter im wesentlichen das Überleben der Zellen nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass eine Strahlentherapie mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab, allein oder in Kombination mit externer Bestrahlung, aus zwei Gründen das Potenzial aufweist die Tumorkontrolle zu verbessern und gleichzeitig die durch die Therapie verursachten Normalgewebsschäden zu verringern: Erstens zeigen die Experimente, dass in Zellen mit niedriger EGFR Expression nur wenige DNA-DSB induziert werden und damit diese Zellen nicht inaktiviert werden. Zweitens können in Zellen mit starker EGFR Expression klinisch relevante Dosen von bis zu 10 Gy appliziert und dadurch eine signifikante Anzahl von Schäden akkumuliert werden. Diese könnten in einer klinischen Anwendung eine Reduktion der extern applizierten Dosis bzw. eine Behandlung von EGFR überexprimierenden Metastasen ermöglichen.

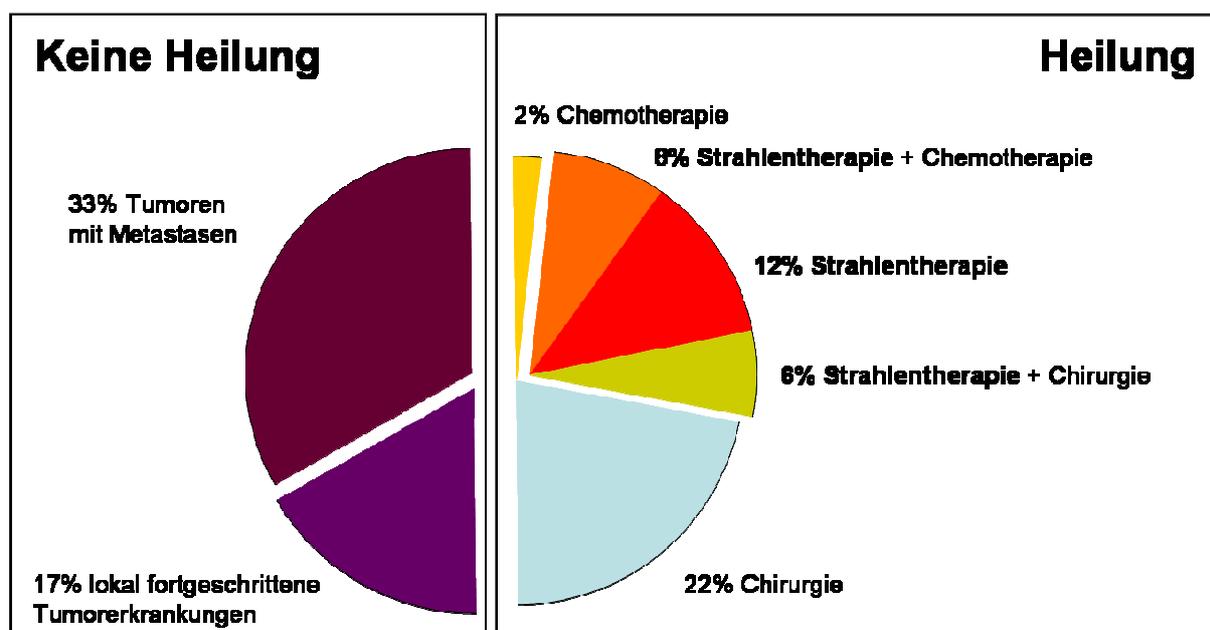
Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die hier vorgestellte Arbeit nicht nur ein Beleg dafür ist, dass sich durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab DNA-DSB induzieren lassen und diese eine entsprechende Zellinaktivierung zur Folge haben. Sie zeigt auch, dass radioimmunologische Therapieansätze das Potenzial haben den Therapieerfolg von soliden Tumoren und Metastasen zu steigern.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Bedeutung der Strahlentherapie für die Behandlung von malignen Tumoren

##### 3.1.1. Grundlagen der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist neben der Chirurgie und der Chemotherapie (inkl. Hormontherapie) eine der drei wichtigsten Therapieformen bei der Behandlung von malignen Tumoren. Sie wird, alleinig oder in Kombination mit Chirurgie und/oder Chemotherapie, in 50% aller kurativen und 80% aller palliativen Behandlungen eingesetzt (Willich, 2002) (Siehe Abbildung 1). Ob die Strahlentherapie alleinig oder in Kombination mit anderen Therapien eingesetzt wird, ist von der Art und Ausdehnung des Tumors sowie der individuellen Situation des Patienten abhängig (Batzler, 2008).



**Abbildung 1: Anteil der Strahlentherapie an kurativen Behandlungen.** Alleinig oder in Kombination mit Chemotherapie bzw. Chirurgie hat die Strahlentherapie einen Anteil von ca. 50 % an allen kurativen Behandlungen (Batzler, 2008; Dikomey, 2010).

Ihre erste klinische Anwendung fand die Strahlentherapie schon kurz nach der Entdeckung der Röntgenstrahlung Ende 1895. Zu dieser Zeit wurde sie vor allem zur Behandlung von gutartigen Erkrankungen der Haut eingesetzt. Die Entwicklung von Cäsium- und Kobaltbestrahlungsgeräten Anfang der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts ermöglichte erstmals die Behandlung tief im Gewebe liegender

Erkrankungen. Diese Geräte wurden aber Anfang der 90er Jahre des 20. Jh. von Elektronenbeschleunigern ersetzt.

In der aktuellen Medizin werden immer noch hauptsächlich Röntgenstrahlen aus Röntgenröhren und Linearbeschleunigern eingesetzt, welche mit Energien von 10keV – 50MeV arbeiten (Borgmann, 2009). Sie ermöglichen eine externe Bestrahlung von im Körper des Patienten liegenden Bereichen. Diese Form der Behandlung wird auch Teletherapie genannt.

Bei der Brachytherapie, also einer Bestrahlung bei der sich die Strahlenquelle im Inneren des Patienten oder nah am zu bestrahlendem Gewebe befindet, werden radioaktive Isotope verwendet. So werden zum Beispiel bei Prostatakarzinomen kleine Strahlenbehälter in die Prostata eingeführt. In Abhängigkeit der gewünschten Dosisleistungen werden unterschiedliche Isotope eingesetzt. Ist eine hohe Dosisleistung erforderlich, so kann zum Beispiel <sup>192</sup>Iridium (550 keV) eingesetzt werden. Sind hingegen niedrige Dosisleistungen erwünscht, wird beispielsweise <sup>137</sup>Cäsium (1,2 keV) verwendet (Krieger, 2005).

Man unterscheidet zwischen palliativer und kurativer Strahlentherapie. Das Ziel einer palliativen Strahlentherapie ist die Linderung der durch eine Tumorerkrankung entstandenen Symptome. Häufig lässt sich schon nach wenigen Bestrahlungen der Zustand des Patienten deutlich verbessern. Die häufigsten Gründe für die Verordnung einer palliativen Bestrahlung sind durch einen Tumor oder Metastasen bedingte Schmerzen. Andere Gründe sind zum Beispiel akut bedrohliche Symptome wie drohende Einengungen der Luftröhre, der Lunge sowie von Speiseröhre und Gallengang. Aber auch bei drohenden Querschnittslähmungen, Blutungen und Hirnmetastasen werden Patienten palliativ bestrahlt. Dabei kann eine hohe Dosis eingesetzt werden, da durch die Strahlentherapie erzeugte Spätfolgen nicht vermieden werden müssen (Borgmann, 2009).

Bei der kurativen Bestrahlung ist das Ziel der Therapie eine vollständige Heilung. Hierzu wird die Bestrahlung in den meisten Fällen mit einem chirurgischem Eingriff kombiniert. Die Strahlentherapie wird hierbei sowohl neoadjuvant zur Verkleinerung des Tumors vor dem chirurgischen Eingriff, als auch adjuvant zur Abtötung von im Tumorbett verbliebenen und in die Lymphknoten gewanderten Tumorzellen verwendet. In einigen Fällen wird das Gewebe auch während des operativen Eingriffes bestrahlt. Hierbei wird die Strahlenquelle nach Entfernen des

Tumorgewebes in die Operationshöhle eingebracht, so dass postoperativ verbliebene Tumorzellen bestrahlt werden. Da bei einem solchen Therapieansatz das langfristig komplikationsfreie Überleben des Patienten gesichert werden soll, werden geringere Dosen als bei einer palliativen Bestrahlung eingesetzt (NCCN, 2011).

Bei der kurativen Behandlung von Tumoren des Kopf- / Halsbereiches ist die Strahlentherapie von großer Bedeutung. Aufgrund der Vielzahl von empfindlichen Strukturen wie der Zunge, Luft- und Speiseröhre, Augen, Speicheldrüsen, Stimmbändern sowie zentralem Nervensystem ist hier ein Funktionserhalt der Strukturen wichtig. Bei der Behandlung von Kopf- / Halstumoren kann entweder primär operativ oder konservativ, mit Erhaltung des Organs, vorgegangen werden. Auf einen operativen Eingriff kann adjuvant eine Bestrahlung erfolgen. Die Dosen betragen 60 Gy bis 66 Gy und werden fraktioniert verabreicht. Eine Einzeldosis beträgt in der Regel 2 Gy. Bei einer primär konservativen Behandlung werden höhere Dosen von 70 Gy bis 72 Gy verabreicht. Die Strahlentherapie erfolgt in diesen Fällen ebenfalls fraktioniert (NCCN, 2011).

#### **3.1.2. Wirkungsweise der Strahlentherapie**

Das Ziel der Strahlentherapie ist die Abtötung der Tumorzellen. Durch die Bestrahlung können alle Bestandteile der Zellen ionisiert werden, also sowohl Lipide als auch Proteine und Nukleinsäuren. Die Zielzellen werden jedoch ausschließlich durch Schäden an der DNA inaktiviert.

Nach einer Ionisation durch primäre Teilchen, elektromagnetische Wellenstrahlung oder Sekundärelektronen kann es in der DNA zu vielfältigen Schäden kommen. So treten nach einer Dosis von 1Gy in einer humanen Zelle ~4000-5000 Basenschäden, ~1000 DNA-Einzelstrangbrüche, ~150 DNA-DNA- und DNA-Proteinvernetzungen sowie 20-40 DNA-Doppelstrangbrüche auf (Baumann, 1997).

Die am häufigsten auftretenden Schäden, Basenschäden und Einzelstrangbrüche, werden durch die Basenexzisionsreparatur vollständig und, aufgrund der mit dem 2. Strang vorhandenen Matrize, fehlerfrei repariert (Dikomey and Lorenzen, 1993; Föhe and Dikomey, 1994).

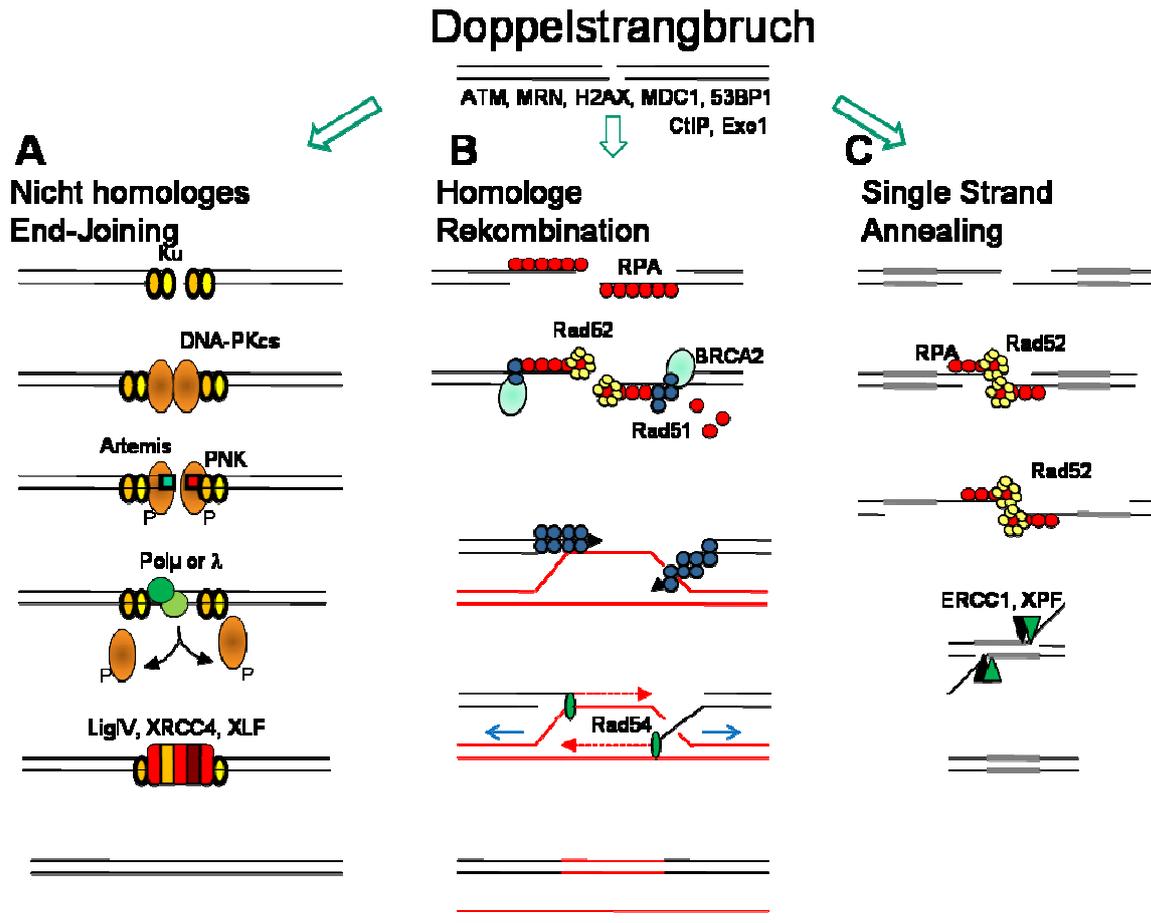
Im Gegensatz zu Basenschäden und Einzelstrangbrüchen sind DNA-Doppelstrangbrüche ungleich schwerer zu reparieren, da keine Matrize vorliegt. Sie stellen das zellinaktivierende Ereignis dar, da sie zu letalen

Chromosomenaberrationen führen können. Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen nutzen die Zellen mehrere Mechanismen.

Der am häufigsten genutzte und in allen Zellzyklusphasen zur Verfügung stehende Reparaturweg ist das nicht homologe End-Joining (Burma et al., 2006). Dieser Reparaturmechanismus führt zu einer direkten Verknüpfung der freien Enden des Bruches. Für die Verknüpfung der freien Enden werden keine Homologien benötigt (Hoeijmakers, 2001). In einigen Fällen, zum Beispiel bei Veränderungen der Basen, ist vor der Ligation der DNA Enden deren Prozessierung notwendig (Kanaar et al., 1998). In diesen Fällen geht die DNA Reparatur mit einem Informationsverlust einher und ist daher fehlerhaft (siehe Abbildung 2).

Darüber hinaus können Doppelstrangbrüche in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus auch über Homologe Rekombination (Helleday et al., 2007) beseitigt werden. Dieser Mechanismus führt zu einem Abbau der freien Enden des Doppelstrangs zu Einzelsträngen mit 3'-Überhängen. Diese Einzelstränge können in die homologen Bereiche des Schwesterchromatides einwandern (Kanaar et al., 1998). Dies ermöglicht eine Neusynthese der fehlenden Bereiche aufgrund der in Form des Schwesterchromatides vorliegenden Matrize (siehe Abbildung 2). Durch dieses Rekombinationsereignis kann der Bruch fehlerfrei und ohne einen Verlust von genetischer Information geschlossen werden.

Der 3. Mechanismus, das Single Strand Annealing, kann wie auch das nicht homologe End-Joining in allen Zellzyklusphasen durchgeführt werden (Price, 1993). Dieser Mechanismus führt ebenfalls durch einen Abbau des Doppelstrangs zu Einzelsträngen mit 3'-Überhängen und nutzt homologe Sequenzen, um die freien Einzelstränge miteinander zu verknüpfen. Die homologen Bereiche werden beim Single Strand Annealing jedoch innerhalb des Stranges gesucht. Dazu wird die DNA solange verdaut, bis die beiden Einzelstränge homologe Bereiche aufweisen und aneinander binden können. Dies ist insbesondere in repetitiven Sequenzen eine geeignete Möglichkeit einen auftretenden Schaden zu schließen. Da diese Reparaturmethode stets mit einem Verlust von genetischer Information verbunden ist, wird nur ein vergleichsweise geringer Anteil auftretender Brüche über diesen Mechanismus repariert (Price, 1993) (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Klassische Reparaturmechanismen zur Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen in eukaryotischen Zellen.** Die DNA Brüchen können entweder durch **A)** das nicht homologe End-Joining, **B)** die homologe Rekombination oder **C)** das Single Strand Annealing repariert werden. Das nicht homologe End-Joining kann aufgrund von Endresektionen mit einem Verlust von Information einhergehen. Das Single Strand Annealing geht dagegen zwangsläufig mit einem Verlust von Informationen einher. Nur die Homologe Rekombination bietet die Möglichkeit einer fehlerfreien Reparatur, benötigt hierfür jedoch ein Schwesterchromatid und kann daher nur in der G2 Phase stattfinden (verändert nach Dahm-Daphi).

Die Anwesenheit von Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung kann zur Apoptose, einem permanenten G1-Arrest oder einer mitotischen Katastrophe führen, wodurch die Zellen inaktiviert werden.

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod, bei dem eine definierte Degradation der geschädigten Zellen stattfindet. Insbesondere die DNA wird während der Apoptose gezielt fragmentiert. Die Zelle wird in der Folge in sogenannte „apoptotic Bodies“ degradiert, die effektiv durch phagozytierende Zellen entfernt werden können. Die Apoptose wird in der Regel durch eine Aggregation des Proteins p53 ausgelöst (Weinberg, 2006). In bestrahlten Lymphocyten spielt die Apoptose eine bedeutende Rolle.

Auch die Auslösung eines permanenten G<sub>1</sub>-Arrestes benötigt aktives p53. Hierbei werden die geschädigten Zellen zur Vermeidung eines größeren Verlustes von DNA in der nächsten Mitose beim Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase arretiert. Die Zelle stirbt dabei nicht ab, sondern teilt sich nur nicht mehr. Ein G<sub>1</sub> Arrest nach Bestrahlung wird vor allem in untransformierten Zellen wie Fibroblasten beobachtet (Di Leonardo et al., 1994; Linke et al., 1996).

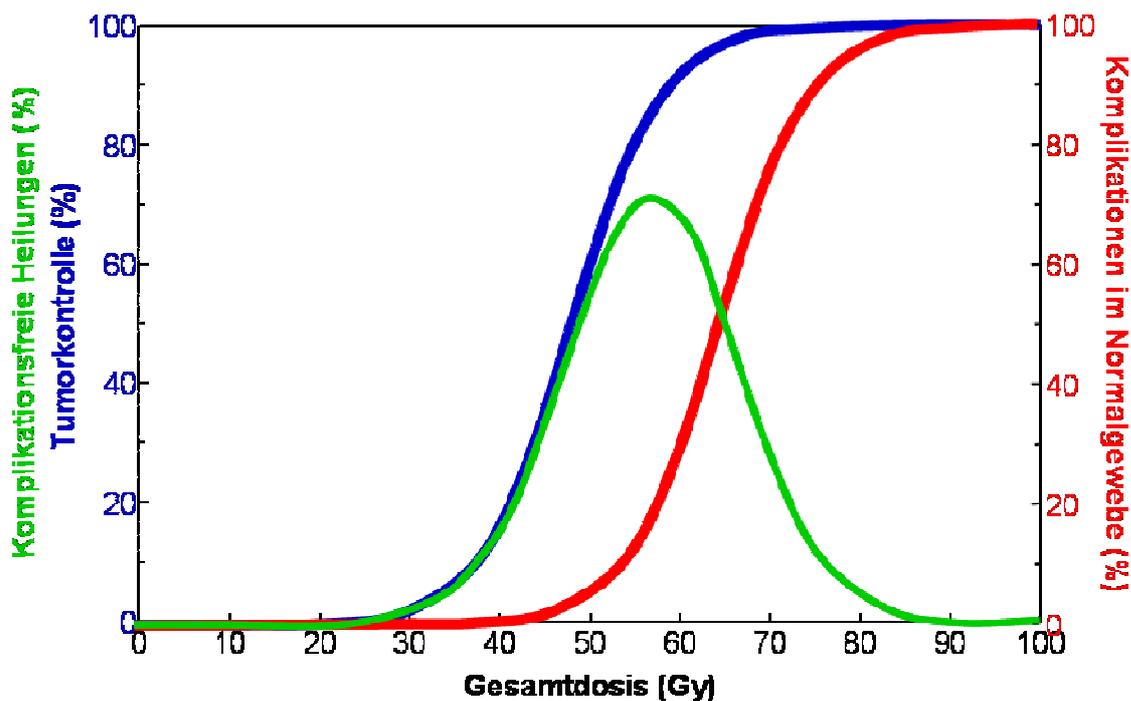
Da viele Tumore p53 mutiert oder negativ sind, spielen Apoptose und G<sub>1</sub> Arreste bei der Zellinaktivierung durch Bestrahlung eine untergeordnete Rolle. Unvollständige oder fehlerhafte DNA Reparatur ist der Hauptmechanismus der Tumorzellinaktivierung nach Bestrahlung (Hall, 2000). Wurden Doppelstrangbrüche nicht oder nur fehlerhaft repariert, so entstehen in der folgenden Mitose Chromosomenaberrationen, die letal sein können. Dies sind terminale und interstitielle Deletionen, dizentrische Chromosomen sowie die dazugehörigen azentrischen Fragmente. Die Chromosomenaberrationen führen dazu, dass die DNA während der nächsten Zellteilung nicht mehr ordnungsgemäß auf die Tochterzellen verteilt wird. Azentrische Fragmente führen dazu, dass während der nächsten Mitose aufgrund des fehlenden Zentromers ein so genannter Mikrokern entsteht. Dies bedeutet, dass die betroffene DNA aus dem Kern ausgeschleust und abgebaut wird, was zwangsläufig mit einem Verlust von genetischer Information einhergeht (Borgmann, 2009). Sollten für das Zellüberleben wichtige Gene betroffen sein, führt dies aufgrund des damit verbundenen Proteinverlustes in der Regel innerhalb von zwei Generationen zur Inaktivierung der Zelle über den nekrotischen Zelltod.

Dabei kann auch eine geringe Veränderung der Zahl unreparierter Schäden schon einen großen Einfluss auf die Tumorkontrolle nach Bestrahlung haben. Bereits eine Erhöhung der unreparierten Doppelstrangbrüche um 1 % senkt die Überlebensrate der Zellen um 50 % (Kasten-Pisula et al., 2005).

#### **3.1.3. Nebenwirkungen der Strahlentherapie**

Das Ziel der kurativen Strahlentherapie ist die vollständige Inaktivierung der Tumorzellen. Hierzu muss jede teilungsfähige Tumorzelle letal getroffen werden. Welche Dosis für einen individuellen Tumor von Nöten ist, hängt von vielen Faktoren ab, wie zum Beispiel der individuellen Strahlenempfindlichkeit des Patienten, der Tumorentität, des p53 und / oder des HPV Status des Tumors u.a. (NCCN, 2011). Dennoch lässt sich generell sagen, dass der Therapieerfolg umso wahrscheinlicher ist, je höher die eingesetzte Dosis und damit die Anzahl der induzierten

Doppelstrangbrüche ist. Mit steigender Dosis erhöht sich jedoch auch die Wahrscheinlichkeit, dass es zu Komplikationen im Normalgewebe kommt (Abbildung 3). Denn genauso wie in Tumorzellen wird während der Bestrahlung auch die DNA der im Bestrahlungsfeld liegenden Normalgewebszellen geschädigt. Insbesondere da bei der klassischen Teletherapie mit Röntgenstrahlen im Gewebe liegende Zielstrukturen von außen bestrahlt werden.



**Abbildung 3: Dosisabhängigkeit der Wahrscheinlichkeit einer lokalen Tumorkontrolle und dem Auftreten von Komplikationen im Normalgewebe.** Mit steigender Strahlendosis steigt die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Tumorkontrolle (blau). Da jedoch während einer Strahlentherapie eine Schädigung des Normalgewebes im Bestrahlungsfeld nicht zu vermeiden ist, steigt mit zunehmender Dosis auch die Wahrscheinlichkeit von Komplikationen im Normalgewebe (rot). Die Wahrscheinlichkeit einer komplikationsfreien Heilung (grün) ergibt sich aus dem Integral der Tumorkontrollwahrscheinlichkeit abzüglich der Wahrscheinlichkeit einer komplikationsfreien Heilung und erreicht nie 100%. Dieser Zusammenhang stellt das Grundproblem der Strahlentherapie dar. Daher ist die verordnete Dosis stets ein Kompromiss aus maximal möglicher Schädigung des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes.

Man unterscheidet hierbei zwischen akuten und späten Normalgewebsreaktionen. Die akuten Nebenwirkungen treten während der Strahlentherapie oder bis 90 Tage danach auf und heilen, abgesehen von eventueller Narbenbildung, in der Regel nach Abschluss der Behandlung wieder vollständig ab (Dorr and Hendry, 2001; Herrmann, 2006). Beispiele für so genannte akute Effekte sind Störungen des Appetits, Übelkeit,

Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindelgefühl. Am schwerwiegendsten sind jedoch akute Nebenwirkungen der Haut (Erythem).

Späte chronische Nebenwirkungen können 90 Tage bis viele Jahre nach der Bestrahlung auftreten. Hierbei handelt es sich vor allem um fibrotische Veränderungen des Ursprungsgewebes, verbunden mit Schrumpfung und Funktionsverlust. Späte Nebenwirkungen können in der Regel nicht medikamentös therapiert werden und sind nicht reversibel (Herrmann, 2006). Das Risiko nach Strahlentherapie eine späte Nebenwirkung auszubilden ist dabei konstant. Das bedeutet, dass auch mehrere Jahre nach der Strahlentherapie dasselbe Risiko einer späten Nebenwirkung besteht wie ein Jahr nach der Behandlung (Bajrovic et al., 2004).

Solche Komplikationen können unter Umständen so schwerwiegend sein, dass der Nutzen für den Patienten durch die Tumorkontrolle geringer ist als die Belastung durch die Nebenwirkungen. Die Erhaltung des Normalgewebes ist hier der dosislimitierende Faktor. Die therapeutisch eingesetzte Gesamtdosis kann daher nicht unbegrenzt erhöht werden und ist immer ein Kompromiss zwischen maximal möglicher Inaktivierung des Tumors bei noch akzeptabler Schädigung des Normalgewebes.

### **3.2. Interne Bestrahlungsansätze können Therapien mit externer Bestrahlung ergänzen**

Obwohl durch moderne Bestrahlungsplanung und Bestrahlungsvorrichtungen die Belastung des Normalgewebes gering gehalten wird, stellt sie noch immer den limitierenden Faktor bei der Dosisplanung dar. Häufig kann aufgrund der zu erwartenden Normalgewebsschäden nicht die Dosis appliziert werden, bei der eine vollständige Tumorkontrolle erreicht wird. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn der Tumor in räumlicher Nachbarschaft zu sensiblen Strukturen liegt, die entweder besonders essentiell oder strahlensensitiv sind. So zum Beispiel im Falle von Tumoren im Kopf- / Halsbereich in räumlicher Nähe zu Speicheldrüse, zentralem Nervensystem, Luft- und Speiseröhre, Stimmbändern usw.. Hinzu kommt, dass nur solide Tumoren effektiv mit einer externen Strahlenquelle bestrahlt werden können. Eine Bestrahlung von Metastasen ist kurativ kaum möglich, da aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer unbestimmten Position mit den aktuellen Methoden immer eine flächige Bestrahlung von Normalgewebe in Kauf genommen werden müsste.

Das konzeptionelle Problem der klassischen Bestrahlung ist, dass sich die Strahlenquelle außerhalb des Patienten befindet. Um das Zielgewebe im Inneren des Patienten zu erreichen muss die Strahlung erst eine gewisse Strecke im Patienten zurücklegen und induziert dort DNA Doppelstrangbrüche. Von Vorteil wäre es, eine Strahlenquelle mit niedriger Energie, also kurzer Reichweite, direkt im Zielgewebe des Patienten zu platzieren, so dass der größte Teil der Strahlung im Zielgewebe deponiert wird und nur ein geringer Anteil in das zu schonende Normalgewebe vordringt. Ein solcher Ansatz wird im Folgenden als interne Bestrahlung bezeichnet.

So werden zum Beispiel bereits bei der Brachytherapie von Prostatakarzinomen radioaktive Stäbchen direkt in der Prostata platziert. Diese sind immobil und schädigen das sie umgebende Tumorgewebe (Krieger, 2005). Dieser Ansatz ist jedoch eine Besonderheit aufgrund der guten Zugänglichkeit der Prostata. Für solide Tumoren, denen man eine spezifische Strahlung alternativ oder zusätzlich zur klassischen Radiotherapie verabreichen möchte, sowie der Behandlung von Metastasen, wäre eine systemische interne Bestrahlung eine sinnvolle Ergänzung. Hierzu könnte man sich eine Strahlenquelle vorstellen, bei der ein radioaktives Isotop an ein Molekül gekoppelt ist, welches entweder spezifisch mit einem Protein (z.B. ein Rezeptor oder ein Oberflächenprotein) oder einer Funktion (einem Transporter) von Tumorzellen interagiert. Wichtigstes Kriterium eines solchen Ansatzes ist hierbei die Tumorspezifität. Das Protein oder die Funktion muss im Tumor deutlich erhöht sein und darf in keinem anderen Organ oder Gewebe im gleichen Ausmaß vorliegen. Zudem sollte es zu einer lokalen Immobilisierung der Strahlenquelle führen, zum Beispiel über eine Aufnahme der Radioaktivität in die Zielzellen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Erfolg eines solchen Ansatzes ist die Wahl des verwendeten Isotops, da sich nicht jedes heutzutage in der Nuklearmedizin verwendete Isotop hierfür eignet. Generell lässt sich sagen, dass sich vor allem Nukleotide mit Zerfällen niedriger Energie (und daher auch geringer Reichweite) anbieten, da ihre Strahlung nicht tief ins umliegende Gewebe vordringt. So kann primär der Tumor bestrahlt werden, während umliegendes Normalgewebe nur in einem geringen Maße belastet wird. Darüber hinaus sollte die Halbwertszeit im Bereich einiger Tage liegen, so dass die Belastung zeitlich begrenzt ausfällt.

Der Optimalfall für eine wie oben beschriebene spezifische Funktion ist zum Beispiel die Anreicherung von radioaktivem <sup>131</sup>Jod oder <sup>99</sup>Technetium in der Schilddrüse. Dieses Verfahren wird routinemäßig zur Behandlung von

Schilddrüsenüberfunktionen eingesetzt. Über den Natrium-Jodid-Symporter gelangt das Jod bzw. Technetium in die Schilddrüsenzellen und wird dort in Schilddrüsenfollikeln gespeichert. Bei gleichzeitiger Gabe von Schilddrüsen stimulierenden Hormonen (z.B. Thyrogen) wird die Aufnahme zusätzlich gefördert. Eine Aufnahme der Isotope erfolgt nur in den Zellen der Schilddrüse, andere Organe des Körpers nehmen kein Jod auf. So kann spezifisch die Radioaktivität angereichert werden, ohne dass andere Organe belastet werden. Die Radiojodtherapie gehört mittlerweile zu den Standardverfahren in der Nuklearmedizin (Büll, 2001).

### **3.3. Der EGF-Rezeptor als Zielmolekül einer Radioimmuntherapie**

#### **3.3.1. Biologie der ErbB-Rezeptoren**

Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren (auch Her-Rezeptoren). Da er als erster dieser Rezeptoren charakterisiert wurde (Weinberg, 2006), wird er auch als ErbB-1 (bzw. Her-1) bezeichnet. Darüber hinaus gibt es noch drei weitere Rezeptoren der ErbB-Familie (ErbB-2 bis 4) (Earp et al., 1995).

Die ErbB Rezeptoren sind membrangängige Rezeptortyrosinkinasen mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einem membrangängigen Teil sowie der cytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne (Gullick et al., 1985). ErbB-2 (in der Regel als Her-2 bezeichnet) ist nicht in der Lage Liganden zu binden, während ErbB-3 über keine Kinasedomäne verfügt (Earp et al., 1995). Es handelt sich bei diesen Rezeptoren um Wachstumsrezeptoren, die vor allem das Zellwachstum, Differenzierung, Zellmigration bzw. Adhäsion und Apoptose beeinflussen. Typische Liganden dieser Rezeptoren sind stimulierende Hormone wie EGF, TGF- $\alpha$ , Amphiregulin, Heregulin, und NRG (Yarden, 2001).

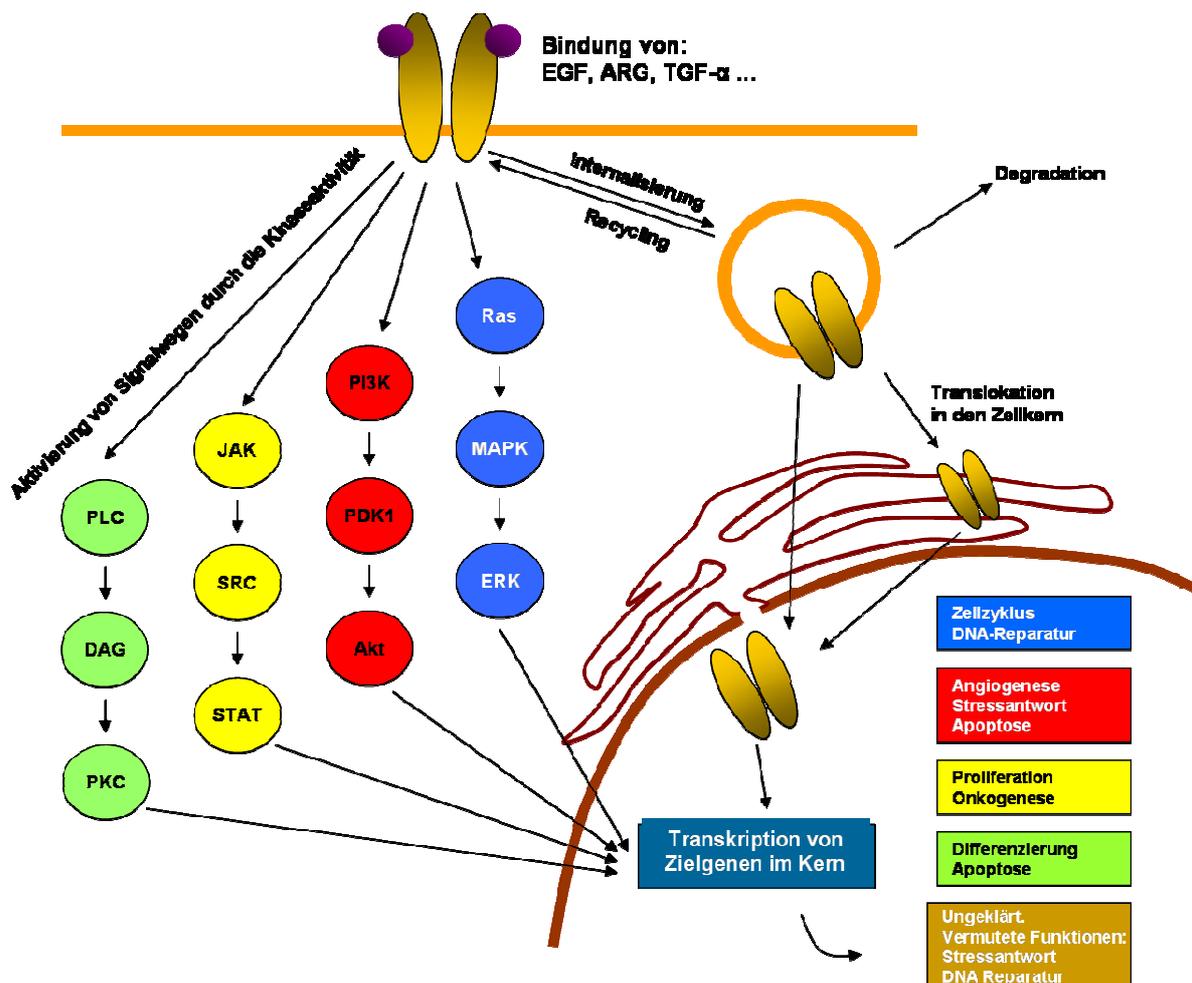
Die Rezeptoren bilden nach Ligandenbindung sowohl Homo- als auch Heterodimere (Burgess et al., 2003). Die Dimerisierung führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Kinasedomäne und damit zur Aktivierung des Rezeptors (Warren and Landgraf, 2006). Verschiedene Liganden begünstigen spezielle Dimerpaarungen, die sich auch in der Aktivierung von weiterführenden Signalproteinen unterscheiden (Weinberg, 2006).

#### **3.3.2. Der EGF-Rezeptor**

Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist eine Rezeptortyrosinkinase von 170 kDa. Er wird in einer Reihe von Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs

exprimiert. Eine der primären Fähigkeiten des EGFR ist es das zelluläre Wachstum, die Proliferation sowie die Differenzierung zu beeinflussen (Nyati et al., 2006). Er spielt daher auch während der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle (Miettinen et al., 1995).

Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors dient der Bindung von Liganden sowie der Dimerisierung mit anderen Rezeptoren. Sie besteht aus vier Unterdomänen. Zwei (Subdomäne 1 und 3) vermitteln die Ligandenbindung. Die anderen zwei sind zwei Cystein reiche Bereiche (Subdomäne 2 und 4) von denen die Subdomäne 2 die Dimerisierung des Rezeptors mit anderen Proteinen der ErbB-Familie vermittelt. Die intrazelluläre Domäne besteht aus der Tyrosinkinasedomäne sowie einer regulatorischen Einheit am C-terminalen Ende des Proteins. Die regulatorische Einheit zeichnet sich durch eine Vielzahl von Tyrosinresten aus, die durch andere regulatorische Proteine modifiziert werden können (Weinberg, 2006).



**Abbildung 4: Signalweiterleitung nach Aktivierung des EGFR.** Die Bindung von Liganden stimuliert die Dimerisierung des EGFR. Dies führt zur Aktivierung seiner Kinasedomäne. In

Abhängigkeit des Liganden und Dimerisierungspartners können verschiedene Signalwege stimuliert werden. Die bedeutsamsten sind der MAPK Signalweg (Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur), der Akt Signalweg (Angiogenese, Stressantwort, Apoptose), der JAK/STAT Signalweg (Proliferation, Onkogenese) sowie der Proteinkinase C Signalweg (Differenzierung, Apoptose). Die Internalisierung des EGFR kann neben der Degradation oder dem Recycling des Proteins auch zu einer Translokation des EGFR in nukleäre Kompartimente führen. Es wird angenommen, dass dies insbesondere als Reaktion auf Stress geschieht und einen Einfluss auf die DNA Reparatur haben könnte (Inhalt nach Nyati et al., 2006).

Die durch Ligandenbindung induzierte Dimerisierung des Rezeptors führt zu einer Phosphorylierung der regulatorischen Domäne. Neben der Aktivierung durch Liganden können auch unphysiologische Stimuli wie ionisierende Strahlung eine Aktivierung der Rezeptoren hervorrufen (Park et al., 2006; Yacoub et al., 2006).

Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen dabei als Bindestellen für verschiedene Adapterproteine. Die am besten untersuchten Signalwege des EGFR sind der Ras/MAP-K (Nishinaka and Yabe-Nishimura, 2001; Sebolt-Leopold, 2004), der STAT, der PLC sowie der Akt Signalweg (Hennessy et al., 2005) (siehe Abbildung 4). Eine rezeptorabhängige Aktivierung der Signalwege führt zur Veränderung der Genexpression (Nyati et al., 2006). Dabei wird zwischen der unmittelbaren schnellen Antwort und der mittelbaren schnellen Antwort unterschieden. Während im Rahmen der unmittelbaren schnellen Antwort die Expression und Stabilität von Transkriptionsfaktoren verändert wird, führt diese veränderte Ausstattung der Zelle mit Transkriptionsfaktoren zur mittelbaren Zellantwort (Weinberg, 2006).

Die Aktivierung des Rezeptors führt darüber hinaus zur Internalisierung desselben über Caveole oder Clathrin bedeckte Vesikel. Erfolgt eine Polyubiquitinierung des Rezeptors führt dies zur Internalisierung über Clathrin bedeckte Bereiche und zur Degradation des Moleküls in Lysosomen. Eine starke Aktivierung führt daher auch zum verstärkten Abbau des EGFR (Sigismund et al., 2005). Es kann jedoch nach Internalisierung durch Caveole auch zur Dephosphorylierung und erneuten Präsentation des EGFR an der Oberfläche der Zellen kommen. Caveoleständige Rezeptoren können zusätzlich auch nach ihrer Internalisierung aktiv bleiben und eine Signalweiterleitung induzieren (Sigismund et al., 2005).

Darüber hinaus kann der EGFR auch selbst in den Kern translozieren und mit nukleären Proteinen interagieren (Das et al., 2007; Dittmann et al., 2008). Die genauen Zielstrukturen und Mechanismen sind dabei jedoch noch nicht abschließend beschrieben.

#### 3.3.3. Der EGF-Rezeptor in Tumoren

Von allen ErbB-Rezeptoren scheinen vor allem der EGFR sowie Her-2 eine begünstigende Rolle in der Tumorgenese zu haben. Diese beiden Rezeptoren werden häufig in bestimmten Tumorentitäten überexprimiert. Eine solche Überexpression kann zum Beispiel durch eine Polysomie oder eine Genamplifikation verursacht werden (Brandt et al., 2006). Aber auch eine Veränderung regulatorischer Bereiche der EGFR Transkription, von Transkriptionsfaktoren oder regulatorischer miRNAs kann zu einer erhöhten Proteinexpression führen (Brandt et al., 2006; Nishi et al., 2002)

Der EGFR wird besonders häufig in Mamma-, Bronchial-, Kolorektalkarzinomen, Glioblastomen und Kopf- / Halstumoren überexprimiert (Bucci et al., 1997; Goike et al., 1999; Grandis JR, 1996; Messa et al., 1998; Rieske et al., 1998; Salomon et al., 1995). So findet sich in 40% aller Gehirntumore eine erhöhte Menge EGFR (Überall et al., 2008). In Kopf- / Halskarzinomen zeigen 80 % der Tumore eine EGFR Überexpression. Dies lässt sich auch bereits auf Transkriptionsebene beobachten. Das durchschnittliche mRNA Expressionsniveau liegt in EGFR überexprimierenden Kopf- / Halstumorzellen mehr als 60 fach über dem von Normalgewebe (Grandis and Tweardy, 1993).

Tumore mit einer erhöhten EGFR Expression sind durch einen deutlich aggressiveren Phänotyp charakterisiert. Sie zeigen eine verstärkte Proliferation, neigen zu einer erhöhten Invasivität und Metastasierung und gehen daher mit einer schlechten Prognose und einem verkürzten Überleben der Patienten einher (Ang et al., 2004). Darüber hinaus sind diese Tumore häufig chemo- und strahlenresistent (Ang et al., 2002), was unter anderem durch eine EGFR abhängige Modulation von DNA-Reparaturprozessen erklärt wird (Parra et al., 2004).

Als Ursache für den beobachteten Einfluss des Rezeptors auf die Resistenz nach Bestrahlung kommt eine verbesserte DNA Reparatur in Frage. Die DNA-Reparatur kann sowohl durch EGFR abhängige Signalwege (Kriegs, 2010; Toulany et al., 2005), als auch eine direkte Interaktion des Rezeptors mit Proteinen der DNA-Reparatur (Dittmann et al., 2008) stimuliert werden. Bereits mehrfach wurde ein Einfluss des EGFR auf die DNAPK, einem zentralem Protein des nicht homologen End-Joinings (vergl. Kapitel 3.1.2), beschrieben. So wird zum Beispiel die strahleninduzierte Akkumulation der DNAPK im Kern nach einer Inhibition des EGFR durch den Antikörper Cetuximab verringert (Huang and Harari, 2000).

Darüber hinaus kann in p53 wt Zellen eine Aktivierung des EGFR auch eine Verringerung der Apoptose bewirken und das Auslösen von Zellzyklusarresten nach Bestrahlung reduzieren (Huang and Harari, 1999).

Neben einer veränderten EGFR Menge kann auch eine veränderte EGFR Aktivierung einen Einfluss auf die Strahlenresistenz haben. So sind in Tumoren häufig aktivierende Mutationen des EGFR anzutreffen, die ähnliche Effekte wie eine Überexpression hervorrufen können (Kuan et al., 2001; Lammering et al., 2003). Mutationen der extrazellulären Domäne des EGFR, wie die VIII Mutante, sind in Glioblastomen häufig, während Mutationen der Tyrosinkinasedomäne (Exon 18 bis 21) oft in Lungenkarzinomen auftreten (Das et al., 2007).

Diese besonders aggressiven und stark metastasierenden Tumore sind genau solche, welche stark von einer gerichteten internen Bestrahlung profitieren würden. Denn in ihrem Fall kann aufgrund von Normalgewebsreaktion die notwendige Dosis nicht vollständig erreicht werden, bzw. im Falle der Metastasen ist die zu bestrahlende Region nicht bekannt. Der EGFR eignet sich daher als potentielle Zielstruktur für eine zielgerichtete interne Bestrahlung. Nicht nur aufgrund der möglichen Spezifität durch seine Überexpression in vielen Tumoren, sondern auch aufgrund der besonderen Aggressivität dieser Tumore.

#### **3.3.4. Bestehende Ansätze zur Nutzung des EGFR als Zielmolekül einer Radioimmuntherapie**

##### **3.3.4.1. Liganden vermittelte Anreicherung von Strahlung**

Eine Strategie der EGFR vermittelten internen Bestrahlung ist die Gabe von radioaktiv markierten Liganden des EGFR. Diese zeichnen sich besonders durch ihre geringe Größe und ihre hohe Spezifität aus. Darüber hinaus werden gebundene Liganden zusammen mit dem EGFR internalisiert und dadurch die Radioaktivität in die Zielzellen aufgenommen.

Eine Besonderheit bei dieser Strategie ist jedoch, dass der Rezeptor durch Bindung der Liganden aktiviert wird und sie daher neben dem Bestrahlungseffekt noch eine stimulierende Wirkung auf Funktionen des Rezeptors haben können (Rodemann et al., 2007).

An dieser Stelle soll beispielhaft die Verwendung von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF vorgestellt werden.  $^{111}\text{In}$  ist ein Isotop mit einer niederenergetischen  $\gamma$ -Strahlung.

In diesem Falle wurde das Isotop über den Chelator Diethylentriamin-pentaessigsäure (DTPA) an dem natürlichen Liganden EGF immobilisiert (Bailey et al., 2007; Cai et al., 2008; Chen et al., 2002).

Aufgrund der niedrigen Energie von  $^{111}\text{In}$  ist eine Internalisierung von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF zur Induktion von zellinaktivierenden Doppelstrangbrüchen notwendig. Bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde konnte  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF in membranösen, aber auch in cytoplasmatischen und nukleären Kompartimenten EGFR überexprimierender Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden (Bailey et al., 2007; Cai et al., 2008). Die Autoren zeigten darüber hinaus, dass die aufgenommenen Mengen abhängig von der EGFR Expression sind. So findet sich für Zelllinien mit geringer EGFR Expression fast keine Aufnahme von Radioaktivität, während in Zelllinien mit erhöhter Expression deutliche Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden konnten.

In EGFR überexprimierenden Brustkrebszelllinien konnte nach einer Behandlung mit von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF eine Wachstumsverzögerung im Vergleich zu mit DTPA-hEGF behandelten Zellen beobachtet werden (Chen et al., 2002). Als zugrunde liegender Mechanismus wurde eine Induktion von DNA Brüchen durch  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF nachgewiesen (Bailey et al., 2007). Dabei steht die Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche im Verhältnis zum Expressionsniveau des EGFR. So wurden in den EGFR überexprimierenden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 durch eine Behandlung mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci induziert, jedoch nicht in der Zelllinie MCF7, welche nur eine geringe EGFR Expression aufweist (Cai et al., 2008).

Der Nachweis der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF ist eine wichtige Voraussetzung um dessen Wirksamkeit zu erklären. Der mit solchen Strategien angestrebte und wichtigste Endpunkt ist jedoch ein verringertes Überleben der Tumorzellen durch  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF. Es konnte gezeigt werden, dass das klonogene Überleben von MDA-MB-468 Zellen bereits nach einer 24 stündigen Behandlung mit 5 ng / ml um knapp 60 % verringert wurde (Bailey et al., 2007). Bei steigenden Konzentrationen  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF von bis zu 250 ng / ml wurde dieser Effekt auf bis zu 90 % erhöht.

Die Arbeiten mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF liefern wertvolle Informationen über die Durchführbarkeit einer EGFR gerichteten Radiotherapie. Die besondere Stärke dieser Arbeiten liegt zweifelsohne in der Untersuchung der molekularen Mechanismen, welche der Zellinaktivierung zugrunde liegen, namentlich der EGFR abhängigen Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Hinzu kommt, dass die Wahl dieses Nuklids insofern äußerst sinnvoll ist, als dass aufgrund der geringen Reichweite nur Zellen getroffen werden, welche das  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF inkorporieren. Dies ist, im Hinblick auf eine Schonung des den Tumor umgebenden Normalgewebes des Patienten im Falle einer klinischen Anwendung, optimal. Zudem wurde gezeigt, dass in Zelllinien, die eine mit Normalgewebszellen vergleichbare, geringe EGFR Expression aufweisen, nur eine geringe Anzahl von DNA-Schäden induziert wird. Darüber hinaus geben die Arbeiten einen ersten Ausblick darauf, dass zusätzlich verstärkende Effekte durch eine gleichzeitige Inhibition der Rezeptorfunktion erzielt werden können (Bailey et al., 2007). In diesem Zusammenhang ist jedoch auf einen Nachteil dieses Ansatzes hinzuweisen. Der natürliche Ligand EGF, welcher in diesem Ansatz die Bindung des Radionuklids vermittelt, ist in der Lage verschiedene Signalwege und auch Reparaturmechanismen der Zielzelle zu stimulieren, so dass der erzielte Effekt eventuell nicht dem maximal möglichem entspricht (Kriegs, 2010).

#### 3.3.4.2. Anreicherung von Strahlung über monoklonale Antikörper

Das Prinzip einer Radioimmuntherapie ist die Gabe von radioaktiv markierten Antikörpern, welche spezifisch an den EGFR binden und auf diese Weise die Strahlung am Tumor immobilisieren. Im Vergleich zu natürlichen Liganden des EGFR haben sie ein relativ hohes Molekulargewicht, was sich negativ auf die Bioverfügbarkeit auswirken kann. Sie führen jedoch nicht wie die Liganden zu einer Aktivierung des EGFR, sondern können im Gegensatz dazu sogar inhibierende Wirkung auf natürliche Rezeptorfunktionen haben und dadurch die DNA-Reparatur inhibieren (Bonner et al., 2010; Dittmann et al., 2010). Ein weiterer Vorteil dieser Strategie im Sinne einer klinischen Anwendung ist, dass es sich bei einigen der verwendeten Antikörper um zugelassene Medikamente handelt, welche bereits auf mögliche Toxizitäten im Patienten untersucht wurden.

Die meisten Arbeitsgruppen deren Veröffentlichungen hier diskutiert werden sollen, haben sich für eine Anwendung in bildgebenden Verfahren interessiert. Diese Arbeiten sind besonders aufschlussreich für die Frage nach Normal-

gewebsreaktionen durch spezifische (also EGFR vermittelte) oder unspezifische (zum Beispiel durch Verstoffwechslung) Anreicherung in Organen außerhalb der Zielstruktur.

Im Gegensatz zu den im vorherigen Kapitel vorgestellten Arbeiten, die sich alle mit dem identischen Therapeutikum beschäftigt haben, unterscheiden sich die folgenden Arbeiten in der Wahl des Antikörpers und des Nuklids. Dennoch lassen sich anhand der Ergebnisse generelle Aussagen treffen.

Eine der aufschlussreichsten Arbeiten in diesem Zusammenhang ist zweifelsohne die Arbeit von Wen et al. (Wen et al., 2001). Der Ansatz, der von dieser Arbeitsgruppe verfolgt wurde, ist die Markierung des humanisierten, EGFR gerichteten Antikörpers Cetuximab (Markenname: Erbitux<sup>®</sup>) mit <sup>111</sup>Indium. Mit diesem Antikörper wurden Nacktmäuse behandelt, welche sowohl am Vorder- als auch am Hinterlauf ein Xenograft trugen. Der Nachweis der Verteilung der Radioaktivität erfolgte via Positronen Emissions Tomographie (PET). In allen Xenografts wurde der Großteil der Radioaktivität in der Leber festgestellt. Das Tumor zu Leber Verhältnis der gebundenen Radioaktivität betrug maximal 0,45. Dieses Ergebnis zeigt, dass der radioaktiv markierte Antikörper in einem starken Maße unspezifisch in der Leber angereichert wird. Wahrscheinliche Ursache sind Verstoffwechslungsvorgänge. Die Anreicherung der Radioaktivität im Xenograft hingegen ist EGFR spezifisch. So wurde in den Xenografts mit hoher EGFR Expression stets eine höhere Aktivität nachgewiesen als in denen mit geringer EGFR Expression. Darüber hinaus ließ sich die Anreicherung von <sup>111</sup>In-DTPA-PEG-Cetuximab durch eine vorherige Gabe von unmarkiertem Cetuximab blockieren.

Die unspezifische Anreicherung von Radiotherapeutika in normalen Organen ist ein besonders sensibler Punkt in Hinblick auf eine mögliche Anwendung im Patienten. Eine der umfangreichsten Untersuchungen hierzu wurde ebenfalls in aus der Zelllinie A431 generierten Xenografts durchgeführt (Perk et al., 2005). Dabei wurde die Verteilung einer Vielzahl von Nukliden, welche durch unterschiedliche Chelatoren an den Antikörper Cetuximab gebunden wurden, in Mäusen untersucht.

Auch in dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der Radioaktivität über PET, und zwar zu Zeitpunkten zwischen 24 und 144 Stunden nach Gabe des Antikörpers. Im Unterschied zu anderen Arbeiten wurde eine große Anzahl von Normalgeweben der

Maus untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass allein der Chelator durchaus einen geringen Einfluss auf die Anreicherung in Organen außerhalb des Zielgewebes haben kann und dass die generelle Verteilung der Radioaktivität in der Maus jedoch nicht durch den Chelator, sondern durch den Antikörper Cetuximab selbst definiert wird. Neben dem Tumor wurde eine hohe Strahlenbelastung vor allem in der Leber und dem Blut nachgewiesen. In geringem Maße waren auch die Haut, die Nieren, die Lunge und die Milz betroffen.

In diesem Zusammenhang ist auch die Arbeit von Torres et al. (Torres et al., 2005) von Interesse. Ihr kommt eine besondere Bedeutung zuteil, da sie die Anreicherung, Stabilität und Ausscheidung des radioaktiven Antikörpers <sup>99</sup>Tc-h-R3 im Menschen untersucht. Hier wurde beobachtet, dass die Anreicherung im Normalgewebe vor allem die Leber, Nieren und Milz betrifft. Eine Belastung der Lunge konnte nicht im selben Maße wie durch Perk et al (Perk et al., 2005) festgestellt werden. Zusätzlich wurde auch im Herzen Radioaktivität nachgewiesen, allerdings in einem deutlich geringerem Maße als die Belastung der Leber ausfiel (Faktor 10). Die wichtigste Beobachtung dieser Arbeit ist jedoch, dass bereits nach 24 Stunden ein Großteil der Aktivität, welche ursprünglich unspezifisch angereichert wurde, von den Patienten wieder ausgeschieden wurde. In einzelnen Fällen war es möglich mittels PET die Tumoren in den Patienten nachzuweisen. Dass dies nicht in jedem Patienten gelang, lässt sich dadurch erklären, dass alle Patienten der Studie unter Metastasierung litten und der Primärtumor in der Regel bereits chirurgisch entfernt wurde. Eine Einschränkung, die bei Betrachtung dieser Arbeit zu beachten ist, ist die Tatsache, dass der in dieser Untersuchung verwendete Antikörper h-R3 bislang keine klinische Relevanz hat. Die Arbeitsgruppe konnte jedoch im Vorfeld zeigen, dass der Antikörper im Vergleich zu Cetuximab nur über eine leicht verringerte Affinität gegenüber EGFR verfügt (Diaz et al., 2007).

Was die biologische Wirksamkeit solcher radioaktiv markierten Antikörper angeht, so gibt es bislang nur wenige Veröffentlichungen, welche diese ausführlich untersuchen. So haben zum Beispiel Rades et al. (Rades et al., 2009) zeigen können, dass eine Behandlung der EGFR überexprimierenden Zelllinie A431 mit <sup>131</sup>Iod-Cetuximab zu einer Wachstumsverzögerung führt, welche durch eine Kombination mit externer Bestrahlung synergistisch verstärkt wird. Als zugrunde liegenden Mechanismus postulierten die Autoren eine nach Bestrahlung verstärkte

Aufnahme von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab in die Zelle, welche darüber hinaus dosisabhängig zu sein scheint.

Die bedeutendste Arbeit zur biologischen Wirksamkeit ist die Veröffentlichung von Pfof et al. (Pfof et al., 2009). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in Blasenkarzinomxenografts, welche aus der EGFR überexprimierenden Blasenkrebszelllinie EJ-luc etabliert wurden, eine Behandlung mit dem radioaktiven, EGFR gerichteten Antikörper  $^{213}\text{Bi}$ -Matuzumab zu einem verbesserten Überleben der Tiere führt. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Größe des Tumors und des Therapieerfolges hergestellt werden. Wurde das  $^{213}\text{Bi}$ -Matuzumab 14 Tage nach der Induktion des Xenografts verabreicht, also wenn der Tumor bereits ein gewisses Volumen erreicht hatte, so konnte zwar eine Größenreduktion der Tumormasse bis zum Tag 21 nach Tumorinduktion erzielt werden. Der Tumor wuchs anschließend jedoch weiter, so dass er am Tag 49 nach Induktion wieder dieselbe Größe wie zu Therapiebeginn vorlag. Wurde die Therapie jedoch bereits am Tag 7 nach der Tumorinduktion oder eher begonnen, so kam es in einigen Tieren zur vollständigen Heilung. Dabei war die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges umso höher, je früher die Therapie begann. Die enorme Bedeutung dieser Experimente liegt darin, dass sie im Tumormodell die Wirksamkeit dieses Ansatzes beweisen. Darüber hinaus ist der Zusammenhang von Tumorgröße und Therapieerfolg im Falle einer systemischen Monotherapie zur Behandlung von Metastasen von großer Bedeutung.

Es konnte somit von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander demonstriert werden, dass radioaktiv markierte Antikörper in der Lage sind an EGFR überexprimierende Tumorzellen zu binden und in diese internalisiert zu werden. Genauso wie im Falle der radioaktiv markierten Liganden ist das EGFR Expressionsniveau hierbei von entscheidender Bedeutung. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass sich diese Antikörper in Xenografts und humanen Tumoren anreichern. Darüber hinaus sind jedoch immer auch gesunde Organe von der Therapie betroffen, allen voran die Leber und die Milz. Allerdings konnte, zumindest für einen Antikörper, gezeigt werden, dass im Menschen der Großteil der Radioaktivität aus den Normalorganen bereits nach 24 Stunden wieder ausgeschieden wird. Die bedeutendste Beobachtung ist jedoch, dass der Ansatz einer Radioimmuntherapie durchaus in der Lage ist, im Falle kleiner Tumore, zur Tumorkontrolle zu führen. Dies

ist besonders im Hinblick auf eine klinische Anwendung zur systemischen Behandlung von Metastasen von Bedeutung.

Potentiell tumorinaktivierende Mechanismen, wie zum Beispiel die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer Behandlung mit radioaktiv markierten Antikörpern, wurden bisher jedoch von keiner Arbeitsgruppe untersucht.

### 3.4. <sup>90</sup>Yttrium-DTPA-Cetuximab als Radioimmuntherapeutikum

In der neu aufzubauenden Therapie soll der bereits klinisch zugelassene EGFR gerichtete Antikörper Cetuximab (kurz C225, Markenname Erbitux<sup>®</sup>) mit dem klinisch relevanten Isotop <sup>90</sup>Yttrium gekoppelt und als radioaktiv markierter Antikörper <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab etabliert werden.

Der Antikörper Cetuximab (C225) ist ein chimere Antikörper der gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor gerichtet ist (Fan et al., 1993). Sein Antigen erkennender Bereich entspricht dem des monoklonalen Antikörpers m225. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, welcher in Mäusen generiert wurde und gegen die extrazelluläre, ligandenbindende Domäne des EGFR gerichtet ist. Um eine Anwendung in humanen Systemen zu ermöglichen ohne eine Immunantwort auszulösen (Khazaeli et al., 1994; Kuus-Reichel et al., 1994), wurden nicht Antigen erkennende Bereiche des Antikörpers humanisiert (Goldstein et al., 1995).

Eine Behandlung von Zellen mit Cetuximab führt zur Inhibition des EGFR und zur Unterdrückung der Signalweiterleitung (Harari and Huang, 2004). Damit einhergehend führt eine Behandlung von humanen Zellen mit EGFR Expression zu einer Reduktion ihres Wachstums, sowohl in vitro als auch in vivo (Goldstein et al., 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Cetuximab die Reparaturkapazität humaner Tumorzellen verringert (Dittmann et al., 2005; Kriegs, 2010; Toulany et al., 2005).

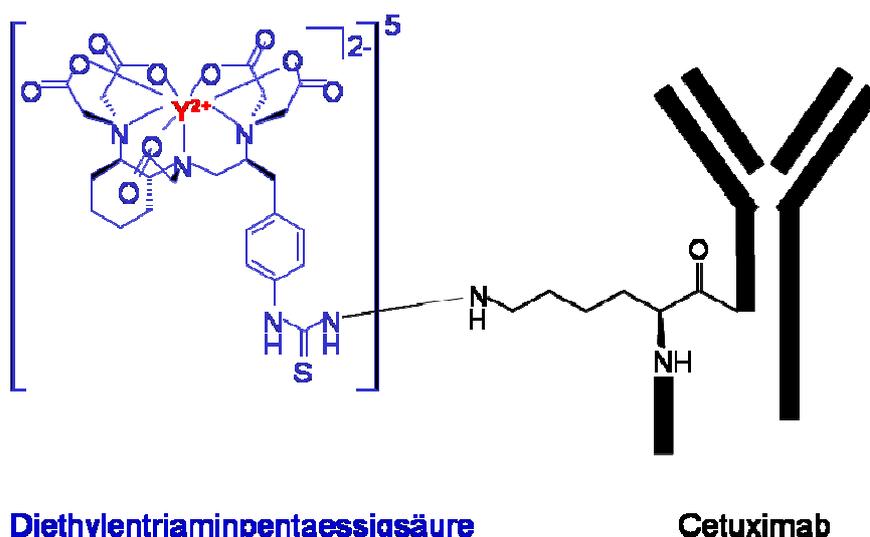
Aufgrund dieser Eigenschaften wird Cetuximab in der Klinik als EGFR Inhibitor eingesetzt. Dabei erfolgt oft eine Kombination mit DNA-Schädigenden Therapien wie einer Cisplatin basierten Chemotherapie (Baselga, 2001; Baselga et al., 2000) oder externer Bestrahlung (Bonner et al., 2009; Huang and Harari, 2000). In vielen Fällen kann auf diese Weise eine Verbesserung der Therapie erzielt werden. Mögliche Ursache hierfür ist der bereits beschriebene Einfluss des EGFR auf die DNA-Reparatur.

Wie Cetuximab wird auch  $^{90}\text{Y}$ trium bereits in der Klinik eingesetzt.  $^{90}\text{Y}$  ist ein  $\beta^-$  Strahler mit einer Halbwertszeit von 64 h und einer Zerfallsenergie von 2,28 MeV.

Dieses Isotop verfügt über einen Überschuss an Neutronen. Daher kann sich ein Neutron des Kerns in ein Proton umwandeln und ein Elektron sowie ein Elektron-Antineutrino aussenden. Sowohl Elektron als auch Antineutrino verlassen den Atomkern. Da sich nach dem Zerfallsprozess ein Neutron weniger, aber ein Proton mehr im Kern befindet, bleibt die Massenzahl unverändert, während sich die Kernladungszahl um 1 erhöht. Yttrium geht also in Zirkonium über. Zirkonium findet sich in geringem Maße im menschlichen Körper (4 mg / kg) und ist nicht toxisch (Büll, 2001).

$^{90}\text{Y}$  wird bei der Radiosynoviorthese von Kniegelenken eingesetzt. Dies ist eine nuklearmedizinische Methode zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen. Dabei werden die radioaktiven Isotope in die entzündeten Bereiche gespritzt. Die Schädigung des Gewebes während der Bestrahlung führt zu einer fibrotischen Umwandlung der Gelenkinnenhaut, welche die Symptome lindert (Büll, 2001).

Die kurze Halbwertszeit sowie die unproblematischen Folgeprodukte des  $^{90}\text{Y}$  sprechen für einen Einsatz in der Radioimmuntherapie. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Reichweite des Isotops von 10 mm. Sie ermöglicht theoretisch eine effiziente Bestrahlung solider Tumoren.



**Abbildung 5: Aufbau von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab.** Das radioaktive Ion  $^{90}\text{Y}^{2+}$  wird aufgrund seiner Ladung in der negativ geladenen Tasche des DTPA immobilisiert. DTPA ist an Lysinreste des Antikörpers gekoppelt. Die Synthese erfolgt ungerichtet, so dass die genaue Lokalisation des DTPA am Cetuximab unbekannt ist.

Aufgrund seiner hohen Spezifität und hohen Affinität gegenüber dem EGFR ( $K_d = 0,15$ ) (Goldenberg and Sharkey, 2007) ist Cetuximab ein ideales Vehikel für eine EGFR gerichtete Radioimmuntherapie.

Die Kopplung des radioaktiven Isotopes an den Antikörper wurde durch Kooperationspartner des Instituts für Radiopharmazie am Helmholtzzentrum Dresden Rossendorf durchgeführt. Als Chelator wurde die Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) verwendet und ein Konjugat aus Antikörper und Chelator synthetisiert (DTPA-Cetuximab). Dabei bindet der Chelator DTPA ungerichtet an Lysine des Antikörpers (siehe Abbildung 10). Es kann also zu einer Bindung an der schweren Kette, aber auch in der Epitop bindenden Domäne kommen. Es wurde ein Gemisch bereitgestellt, bei der im Mittel 5 Chelatoren pro Antikörper gebunden waren. Dadurch ließ sich eine spezifische Aktivität von 1,2 GBq / mg erreichen.

## **4. Fragestellung**

Bei einer Therapie von Tumoren ist die Strahlentherapie ein etablierter Ansatz zur kurativen Behandlung der Patienten. Ziel der Strahlentherapie ist es, unter Verwendung von ionisierenden Teilchen oder Strahlen, DNA-Doppelstrangbrüche in den Tumorzellen zu erzeugen und so eine Inaktivierung der Zielzellen zu erreichen. In seiner Anwendung stößt die klassische Strahlentherapie jedoch oft auf Beschränkungen. Da die Nebenwirkungen der Therapie für den Patienten so gering wie möglich zu halten sind, ist es bei komplexen Bestrahlungssituationen, zum Beispiel im Bereich des Kopfes oder in der Nähe der Lunge und des Herzens, oft nicht möglich die Dosis zu applizieren, welche eine vollständige Inaktivierung tumorogener Bereiche sicherstellt. Auch bei metastasierenden Krankheitsverläufen ist eine effektive kurative Strahlentherapie bislang unmöglich, da die Zielregionen in der Regel nicht vollständig bekannt und über große Bereiche verstreut liegen. Eine großflächige Bestrahlung potentieller Zielregionen ist aufgrund von Normalgewebsschäden nicht vertretbar.

Das Konzept der Radioimmuntherapie zur Behandlung von Tumoren und Metastasen ermöglicht eine zusätzliche Dosisapplikation, unabhängig von externen Strahlenquellen. Hierzu ist es jedoch notwendig, dass sich die zu behandelnden Zellen durch die Expression eines spezifischen Oberflächenproteins auszeichnen, welches eine Differenzierung zwischen Tumor und Normalgewebe ermöglicht. Das Oberflächenprotein epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR) kann aufgrund seiner Überexpression in einer Vielzahl von Tumoren als mögliche Zielstruktur einer Radioimmuntherapie dienen.

Der in dieser Arbeit etablierte, neue radioimmunologische Ansatz nutzt den bereits in der Klinik als EGFR Inhibitor etablierten monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>). Über einen Chelator wurde das radioaktive Nuklid <sup>90</sup>Yttrium an den Antikörper gekoppelt. Diese neue Strategie soll durch die Cetuximab vermittelte Immobilisierung der Radioaktivität an den EGFR überexprimierenden Zellen eine zusätzliche Strahlendeposition in Tumoren und Metastasen ermöglichen.

Dieser spezielle Ansatz einer EGFR gerichteten Radioimmuntherapie ist darüber hinaus von besonderer Bedeutung, da eine Überexpression des EGFR mit einer erhöhten Strahlenresistenz und daher auch mit einer schlechten Prognose unter Strahlentherapie assoziiert ist. Besonders in diesen Tumoren ist es aufgrund von

drohenden Normalgewebsreaktionen oft nicht möglich, die Strahlendosen zu applizieren, bei denen der Tumor effektiv geschädigt werden kann. Aufgabe dieser Arbeit war daher abzuschätzen, ob EGFR überexprimierende Zellen trotz erhöhter Strahlenresistenz durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inaktiviert werden können.

In der vorliegenden Arbeit soll dieser neue Ansatz auf der Ebene von Zellkulturen etabliert werden. Hierzu wurde das Potenzial von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab zur Schädigung von Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- / Halsbereiches evaluiert. Dafür wurden zwölf verschiedene Plattenepithelkarzinomzelllinien mit Hilfe von Western Blot und Flusszytometrie hinsichtlich ihrer EGF-Rezeptorexpression charakterisiert und eine repräsentative Auswahl von Zelllinien mit unterschiedlicher Expression für eine detaillierte Untersuchung der Wirkung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab verwandt.

Von besonderem Interesse sind hierbei die Fragestellungen ob es 1. durch eine Inkubation von Plattenepithelkarzinomzelllinien mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab zu einer Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen kommt. Diese können durch Immunfluoreszenzmethoden nachgewiesen und ausgewertet werden.

Um die Spezifität von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab gegenüber der Zielstruktur zu verifizieren ist es 2. von Bedeutung, ob das Ausmaß der DNA-Schädigung von der vorher bestimmten EGFR Expression der Zielzelle abhängt.

Ferner soll 3. geklärt werden, ob eine mögliche Induktion von DNA-Schäden in den Zellen hinreichend stark ist, um sie zu inaktivieren. Hierzu wird die Überlebensrate nach Inkubation mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Kolonieassays bestimmt.

Der Zusammenhang zwischen der EGFR Expression einer Zelle und dem Ausmaß einer Zellinaktivierung nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ist hierbei von besonderem Interesse. Will man eine Schonung des Normalgewebes während der Therapie sicherstellen, so muss bei einer EGFR gerichteten Radioimmuntherapie die Schädigung der Zellen durch die EGFR Expression bestimmt werden. Nur so wird eine Diskriminierung zwischen Tumor und Normalgewebe ermöglicht.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Arbeiten mit Zellkulturen

#### 5.1.1. Kultivierung von Zellen

Humane Plattenepithelkarzinomzelllinien (SCC) wurden in DMEM-Vollmedium (siehe Tabelle 5) bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden spätestens beim Erreichen von 90% Konfluenz, in der Regel zweimal wöchentlich, umgesetzt. Hierzu wurde das Kulturmedium aus dem Kulturgefäß entfernt. Anschließend wurde das Kulturgefäß erst mit einem dem verwendeten Medium äquivalenten Volumen an PBS (siehe Tabelle 1) gespült um eventuelle Reste des Kulturmediums zu beseitigen und dann mit einem zehntel des zur Kultivierung verwendeten Volumens Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 5) für etwa drei bis fünf Minuten, jedoch nicht mehr als für ein vollständiges Ablösen der Zellen notwendigen Zeit, bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch das Hinzugeben des zur Kultivierung verwendeten Volumens von DMEM Vollmedium abgestoppt. Danach wird ein zwanzigstel des Volumens in einem neuen Kulturgefäß derselben Größe ausgebracht.

**Tabelle 1:** Die zur Kultivierung der Zellen verwandten Kulturgeometrien und die notwendigen Medienvolumina.

| Bezeichnung | Typ               | Volumen für Kulturmedien |
|-------------|-------------------|--------------------------|
| T25         | Zellkulturflasche | 5 ml                     |
| T75         | Zellkulturflasche | 10 ml                    |
| T175        | Zellkulturflasche | 20 ml                    |
| 6-well      | Multiwellplatte   | 2 ml / well              |
| 12-well     | Multiwellplatte   | 1 ml / well              |

#### 5.1.2. Bestrahlung der Zellen mit der Röntgenröhre

Sollten Zellen in der Röntgenröhre bestrahlt werden, so wurde das Kulturgefäß mittig auf dem Hubteller der Röntgenröhre Gulmay RS225 (siehe Tabelle 8) positioniert, die Tischhöhe entsprechend Tabelle 2 eingestellt und die Probe bei 200 kV und 15 mA bestrahlt.

Um eine gewünschte Dosis zu applizieren, wurde die Bestrahlungsdauer der jeweiligen Dosisleistung entsprechend gewählt.

**Tabelle 2:** Betriebswerte für Standardbedingungen (200kV und 15 mA) der Röntgenröhre

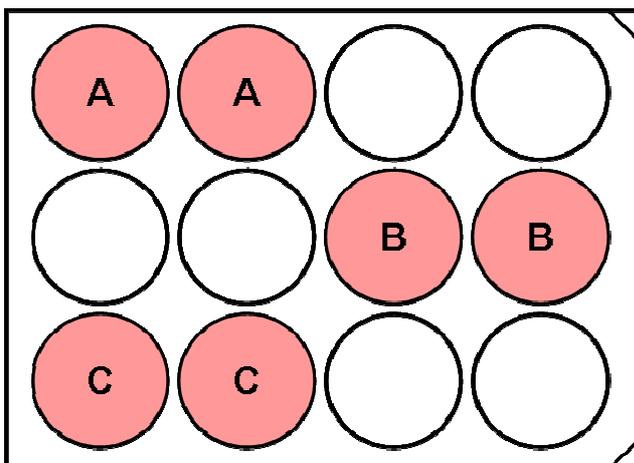
| Tischabstand | Mittlere Dosisrate | Genutzt für Kulturgeometrie |
|--------------|--------------------|-----------------------------|
| 299 mm       | 2 Gy/min           | T25                         |
| 398 mm       | 1,2 Gy/min         | T75, Wellschalen            |
| 495 mm       | 0,8 Gy/min         | Zwei Wellschalen            |

### 5.1.3. Inkubation der Zellen mit dem nicht radioaktiven/radioaktiven Antikörper

Für Versuche unter der Verwendung von DTPA-Cetuximab beziehungsweise  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurden die jeweiligen Zellen mit

- 150.000 Zellen / Well für eine Verwendung am Tag der Behandlung
- 100.000 Zellen / Well für eine Verwendung an Tag 1 nach Behandlung
- 50.000 Zellen / Well für eine Verwendung an Tag 2 nach Behandlung

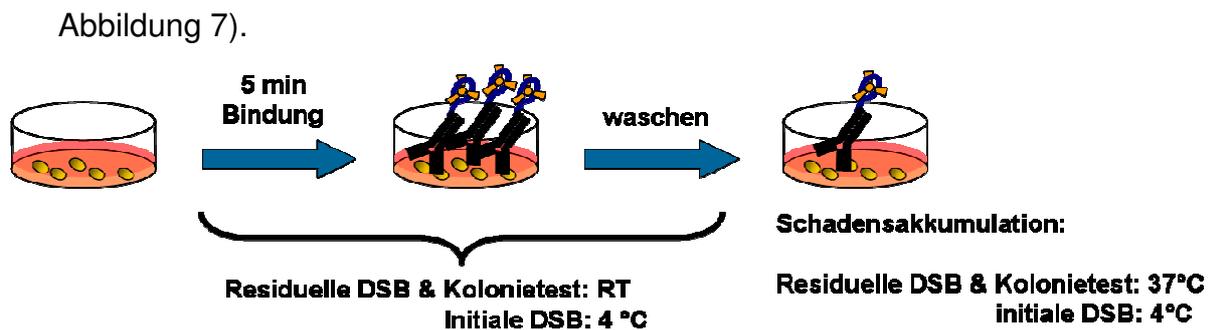
einen Tag vor Versuchsbeginn in DMEM-Vollmedium (siehe Tabelle 5) in einem 12-Loch Kulturgefäß ausgesät. Dabei sind die jeweiligen Vertiefungen so zu wählen, dass eine unspezifische Querbstrahlung verschiedener Zelllinien vermieden wird (siehe Abbildung 6). Sofern die Zellen für eine Analyse über Immunfluoreszenz vorgesehen sind (vergl. Kapitel 5.5), wurde vor der Aussaat der Zellen ein 18 mm Glasplättchen in die entsprechende Vertiefung gelegt, so dass die Zellen auf ihnen anwachsen konnten.



**Abbildung 6: Austragsschema für Zellen.** Bei der Inkubation mehrerer verschiedener Zelllinien mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab unter der Verwendung von nur einer 12-Well-Platte wurden die verschiedenen Zelllinien (A, B und C) so ausgesät, dass eine Querbstrahlung von Wells verschiedener Zelllinien minimiert wird.

Am Versuchstag werden die bereitgestellten Konjugate DTPA-Cetuximab und  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in DMEM-Vollmedium auf eine Konzentration von 30 nM verdünnt.

Die Zellen wurden mit jeweils 1 ml der 30 nM Lösung für je 5 min inkubiert um eine Bindung des Antikörpers an die Zellen zu ermöglichen. Danach wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen wurden einmal mit DMEM-Vollmedium gewaschen. Anschließend konnten die Zellen für die Reparatorexperimente für die entsprechenden Zeiten bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> bzw. bei 4°C inkubiert werden (vergl. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Durchführung von Bestrahlungsexperimenten unter der Verwendung von DTPA-Cetuximab /  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab.** Zur Durchführung von Bestrahlungsexperimenten unter der Verwendung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurden die Zellen für 5 min mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inkubiert um eine Bindung des Antikörpers an den EGF-Rezeptor zu ermöglichen. Falls eine Reparatur der Schäden blockiert werden sollte, wurde dieser Schritt auf Eis ausgeführt, ansonsten jedoch bei Raumtemperatur (RT). Nach dem Abwaschen der ungebundenen Antikörper wurden die Platten für verschiedene Zeitsräume inkubiert um eine Akkumulation der Schäden zu ermöglichen. Auch hier wurden die Kulturen gekühlt gelagert falls eine Reparatur ausgeschlossen werden sollte, ansonsten jedoch im Brutschrank.

Sollte während der Inkubation die Reparaturkapazität der Zellen blockiert werden, so wurde sowohl die Antikörperlösung, als auch das DMEM-Vollmedium zum Waschen auf 4°C vorgekühlt. Des Weiteren fand die Inkubation zur Bindung des Antikörpers auf Eis statt. War dies nicht der Fall, so fand die Inkubation bei Raumtemperatur (RT) statt und die entsprechenden Lösungen wurden nicht heruntergekühlt.

Gekühlte Platten wurden vor dem Fixieren für eine immunologische Färbung für zwanzig Minuten in den Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um eine biochemische Markierung des Schadens zu ermöglichen (vergl. Kapitel 6.2.1, Abbildung 18).

Die Messung erfolgte grundsätzlich in Duplikaten.

### 5.1.4. Durchführen der Proliferationsassays

Zur Bestimmung des Einflusses von DTPA-Cetuximab auf die Zellproliferation wurden 50.000 Zellen einer Zelllinie in vierfacher Ausführung in 12-Loch Zellkulturschalen ausgelegt. 12 h nach der Aussaat wurden zwei der Proben für 5 min mit jeweils 1 ml der 30 nM Lösung inkubiert um eine Bindung des Antikörpers an die Zellen zu ermöglichen. Danach wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen wurden einmal mit DMEM-Vollmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei den Kontrollzellen erfolgte nur ein Mediumwechsel. Nach 48 h wurden die Zellen trypsinisiert und in 1 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mithilfe eines Zellzählgerätes (siehe Tabelle 8) bestimmt.

### 5.1.5. Aussäen der Zellen für Kolonietest

Um den Einfluss von Cetuximab und <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab auf die Zellvitalität abschätzen zu können wurden gemäß Kapitel 5.1.3 behandelte Zellen nach einer 48 stündigen Inkubation mit gebundenen Antikörpern bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> mit 1 ml PBS gewaschen und für 5 min mit 100 µl Trypsin EDTA (siehe Tabelle 5) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die 12-Well Platte vier Mal an einen schweren Gegenstand geklopft um die Zellen abzulösen. Da die Zellen in den 12-Well Platten Radioaktivität gebunden hatten wurde aus Gründen des Strahlenschutzes auf eine visuelle Kontrolle der Reaktion unter dem Mikroskop verzichtet.

Die Reaktion wurde mit 1 ml DMEM Vollmedium (siehe Tabelle 1) abgestoppt und 10 µl des Zellgemisches in eine T75 Zellkulturflasche, die 10 ml DMEM Vollmedium enthielt, ausgebracht.

Die T75 Zellkulturflaschen wurden mindestens solange bis Einzelkolonien sichtbar waren, bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

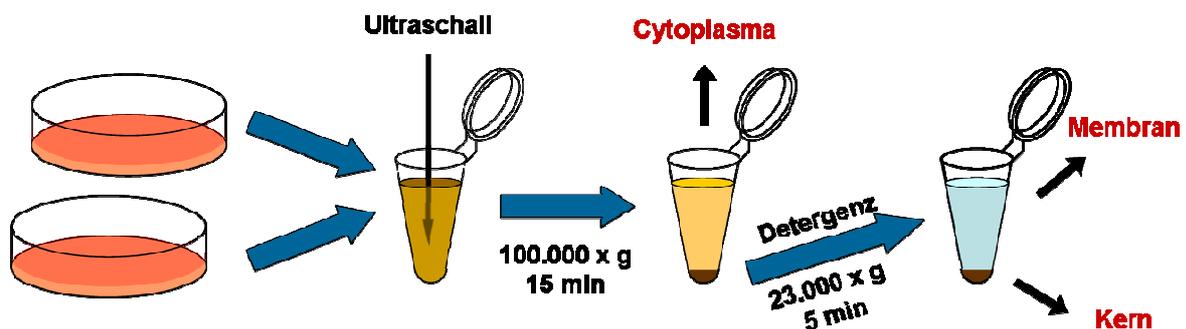
Um die einzelnen Kolonien sichtbar zu machen wurde das Kulturmedium aus den Flaschen entfernt, die Zellen für 5 min mit einer 70 %igen Ethanolösung fixiert und anschließend für weitere 5 min mit Kristallviolettlösung (siehe Tabelle 7) gefärbt. Nach der Färbung wurden die Flaschen mit Leitungswasser gespült, um sämtliches überschüssiges Kristallviolett zu entfernen.

Im Anschluss konnte die Anzahl der angewachsenen Kolonien bestimmt werden.

## 5.2. Proteanalytik

### 5.2.1. Auftrennung von Proteinen über eine differenzielle Zentrifugation

Um Proteinmengen in den verschiedenen Zellkompartimenten relativ zueinander abzuschätzen, wurden über eine Proteinisolation per differentieller Zentrifugation Proteinextrakte der cytoplasmatischen, der membranösen sowie der nukleären Kompartimente erzeugt, wobei in der nukleären Fraktion auch mitochondriale Proteine enthalten waren (Aufreinigungsschema siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Aufreinigungsschema der differentiellen Zentrifugation.** Durch eine Beschallung der Proben werden die Zellen aufgebrochen, so dass lipophile und Makrostrukturen bei einem Zentrifugationsschritt von cytoplasmatischen Bestandteilen der Zelle abgetrennt werden können. Unter Verwendung eines detergenzhaltigen Lösungsmittels werden die membranösen Kompartimente wie die äußere Zellmembran, aber auch Organellen wie der Golgiapparat und das endoplasmatische Reticulum, in Lösung gebracht. In einem weiteren Zentrifugationsschritt verbleiben diese im Überstand, während die Kerne, Mitochondrien und andere Makrostrukturen abgetrennt werden können.

Für jede Probe wurden Zellen in zwei 10 cm Zellkulturschalen ausgelegt und bis zu ca. 80 % Konfluenz wachsen gelassen.

Vor der Zellernte wurden beide 10 cm Zellkulturschalen mit je 10 ml PBS gewaschen und die Zellen einer Schale unter Verwendung eines Zelllifters in 600 µl des Puffers Extraktion 1 (siehe Tabelle 7) geerntet. Die so gewonnene Zelllösung wurde vollständig in die zweite 10 cm Schale übertragen und deren Zellen ebenfalls unter der Verwendung eines Zelllifters in der Lösung geerntet.

Von der erhaltenen Zellsuspension wurden 600 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (ultrazentrifugationsresistent) überführt und für die Dauer der gesamten Extraktion auf Eis gelagert. Von der so bereitgestellten Lösung wurden 100 µl abgenommen und die enthaltenen Zellen gezählt (siehe Tabelle 8). Die restlichen 500 µl wurden beschallt, um die Zellen aufzubrechen. Hierbei ist es wichtig, dass die Beschallungsdauer so gewählt wird, dass zwar die äußere Membran möglichst aller

Zellen geschädigt wird, die Kerne jedoch intakt bleiben. Je nach verwendeter Beschallungseinheit und darin installierter Sonde kann die notwendige Dauer variieren. In unserem Labor (vergl. Tabelle 8) betrug die optimale Beschallungsdauer 6 sek. bei voller Amplitude.

Anschließend konnten die Extrakte für 15 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert werden. Der danach gewonnene Überstand entsprach der Cytosolfraktion. Das Pellet enthielt sowohl die membrangebundenen Strukturen als auch die Kerne, die Mitochondrien und die Bestandteile des Cytoskeletts.

Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das Pellet zweimal mit dem Puffer Extraktion 1 gewaschen, wobei es nicht resuspendiert wurde. Danach wurde das Pellet in 500 µl 1 % Triton X-100 Lösung (siehe Tabelle 7) vollständig resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert.

Nach einer weiteren Zentrifugation bei 23.000 g für 5 min bei 4 °C konnte erneut der gewonnene Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Er enthielt alle membrangebundenen Proteine einschließlich des endoplasmatischen Retikulums. Kern- und Cytoskelettproteine hingegen fanden sich im verbliebenen Pellet, welches zweimal mit 1 % Triton X-100 Lösung gewaschen und anschließend unter Zuhilfenahme des Beschallungsgerätes in 100 µl Puffer Extraktion 3 (siehe Tabelle 7) resuspendiert wurde.

Zur gleichmäßigen Beladung eines SDS-Geles wurden die anfangs gemessenen Zellzahlen herangezogen.

### 5.2.2. Nachweis von Proteinen über SDS-Page und Western Blot

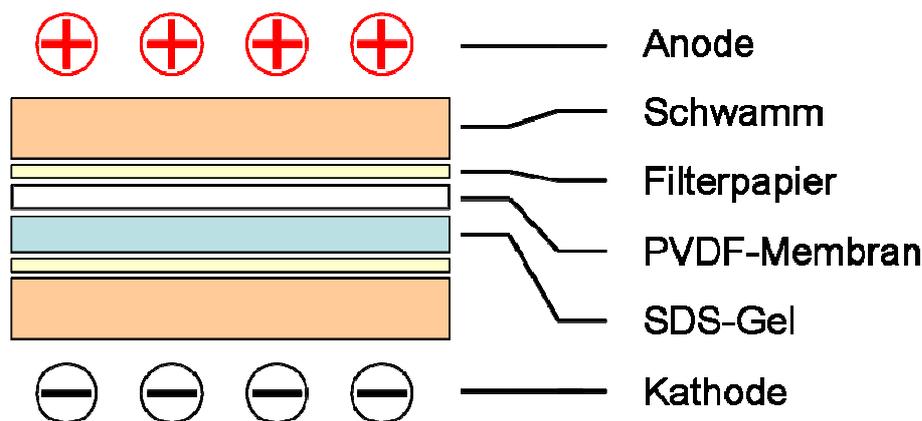
Vor der Durchführung eines Western Blottes wird eine SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Trennung von Proteinen im elektrischen Feld nach ihrer molaren Masse.

Die nach Kapitel 5.2.1 gewonnenen Proteinextrakte wurden 1:6 mit einem 6x SDS Probenpuffer (siehe Tabelle 7) vermischt. Die Zugabe von SDS im Probenpuffer führt zu einer negativen Maskierung der Proteine. Zwecks Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstrukturen wurden die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt und direkt auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zur Auftrennung der Proteine wurden 4 -15 % Acrylamid Tris-HCl Gele verwendet.

Zur leichteren Identifikation der aufgetrennten Proteine wurden 8 µl des Kaleidoskope Größenmarkers (7,6 bis 216 kDa) aufgetragen, welcher Proteine

bekannter Größen enthält. Die Gel-Apparatur wurde mit Laufpuffer (siehe Tabelle 7) befüllt und an eine Stromquelle angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte bei RT und 100 V für 10 min gefolgt von 200 V für 50 min.

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes, senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtet, auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. An der Membranoberfläche blieben die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und waren für Nachweisverfahren zugänglich. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol aktiviert, im Transferpuffer äquilibriert und auf das Gel gelegt. Aktivierung und Äquilibration sind notwendig, um der hydrophoben Oberfläche der PVDF-Membran hydrophile Eigenschaften zu geben. Beide Seiten wurden mit angefeuchtetem Whatmanpapier bedeckt und zwischen zwei Schwämme gelegt (siehe Abbildung 9). Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer befüllten Blotkammer bei 50 V für 3 h (sog. „Wet-Blot“).



**Abbildung 9: Aufbau des Western Blottes.** Um die nach der Gelelektrophorese im SDS-Gel befindlichen Proteine auf eine PVDF-Membran zu übertragen wird das Gel im Western Blot zusammen mit der PVDF-Membran zwischen Filterpapier und Schwämmen fixiert und im Transferpuffer einem Spannungsfeld ausgesetzt. Die im Gel befindlichen Proteine sind durch die Beladung mit SDS negativ maskiert und wandern im Spannungsfeld Richtung Anode, werden jedoch an der lipophilen Oberfläche der PVDF-Membran immobilisiert.

Die so fixierten Proteine konnten durch Antikörper spezifisch nachgewiesen werden.

Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blocken und für die Antikörper unzugänglich zu machen, wurde die Membran 1 h in 5 % Magermilchpulver bzw. 10% BSA in TBST bei Raumtemperatur (RT) unter stetigem Schwenken inkubiert. Die Wahl der Blockierlösung erfolgte analog zu der für die Inkubation des ersten Antikörpers verwendeten Puffers. Anschließend erfolgte die Zugabe des spezifischen

Erstantikörpers (siehe Tabelle 1) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenker, jeweils verdünnt in einer 5 % Milchpulver bzw. 10 % BSA TBST-Lösung. Anschließendes Waschen der Membran für 3x je 10 min mit TBST entfernte alle nicht gebundenen Antikörper. Jetzt konnte der Zweitantikörper für 1h bei RT auf die Membran gegeben werden. Dieser war gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet und mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Anschließend erfolgte ein wiederholtes dreimaliges Waschen für je 10 min in TBST, bei dem überschüssige Antikörper entfernt wurden. Danach wurde die Membran für 1 min in „Super Signal West Dura Extended Duration Substrate“ (siehe Tabelle 5) inkubiert. Dabei spaltet die Peroxidase den Farbstoff Luminol in einer Chemolumineszenzreaktion, was zur Freisetzung von Photonen und damit zur Emission von Licht einer Wellenlänge von  $\lambda=428$  nm führt. Die Lichtemission wurde sowohl mit Hilfe einer lichtempfindlichen Kamera (siehe Tabelle 8 & Tabelle 9) als auch durch Schwärzung eines Röntgenfilmes nachgewiesen. Die Auswertung mithilfe des Kamerasystems erlaubt neben der Dokumentierung auch eine Quantifizierung der Signale. Hierzu wurde für jedes Signal die Lichtintensität gemessen und mit dem jeweiligen Hintergrund direkt neben dem Signal abgeglichen. Um eine Vergleichbarkeit mehrerer Gele miteinander zu gewährleisten wurden Proteinextrakte der Zelllinie FaDuDD auf jedes Gel aufgetragen und die Signale auf diese normiert.

**Tabelle 3:** Blockierungs- und Inkubationsbedingungen für die immunologische Proteindetektion auf PVDF-Membranen

| <b>1. Antikörper</b>     | <b>Inkubations- und Blockierlösung für 1. und 2. Antikörper</b> |
|--------------------------|---|
| Calnexin (Maus)          | 5 % Milchpulver in TBST   |
| Calpain ½ (Maus)         | 5 % Milchpulver in TBST   |
| EGF-Rezeptor (Kaninchen) | 5 % BSA & 5 % Milchpulver in TBST                               |
| Histon H2B (Kaninchen)   | 5 % Milchpulver in TBST   |
| Lamin B1 (Kaninchen)     | 5 % BSA & 5 % Milchpulver in TBST                               |
| Sp1 (Kaninchen)          | 5 % BSA & 5 % Milchpulver in TBST                               |

### 5.3. Flusszytometrie zur Bestimmung der Cetuximabbindekapazität

Zur Bestimmung der Cetuximabbindekapazität an lebenden Zellen wurde eine Flusszytometrie (FACS) durchgeführt (Diaz et al., 2007). Bei dieser Methode werden Immunfluoreszenzgefärbte Zellen durch einen dünnen Kanal geführt und von einem Laser entsprechend der zu erwartenden Färbung abgelesen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Einzelzellmessungen vorgenommen werden können.

Um die Cetuximabbindekapazität nachzuweisen wurden die zu untersuchenden Zellen kurz vor Konfluenz einmal mit PBS (siehe Tabelle 7) gewaschen und mit Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 5 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) abtrypsiniert und in DMEM-Vollmedium (siehe Tabelle 5) aufgenommen (vergl. Kapitel 5.1.1). Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt und 300.000 Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle darauf folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis ausgeführt, um eine Internalisierung von gebundenen Antikörpern zu unterbinden.

Die Zellen wurden bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert und in 500 µl 1x PBS resuspendiert, um restliches Medium herauszuwaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 g für 5 min folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper. Hierzu wurden die Zellen in 500 µl PBS 30 nM Cetuximab resuspendiert. Als Negativkontrolle wurde für jede Zelllinie ein Duplikat mitgeführt, welches nicht mit dem 1. Antikörper inkubiert wurde. Die Zellen wurden 30 min auf einem Überkopfschüttler (siehe Tabelle 8) inkubiert, um eine Bindung des Antikörpers zu ermöglichen. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift, für den die Zellen erneut bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert wurden. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 g für 5 min folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Hierzu wurden die Zellen in 100 µl PBS + 0,03 µg / µl α human IgG (siehe Tabelle 6) resuspendiert und 30 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert.

Vor der Messung wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen. Hierzu folgte auf eine Zentrifugation bei 1000 g für 5 min eine Resuspendierung der Zellen in 500 µl 1x PBS und eine erneute Zentrifugation bei 1000 g für 5 min.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität pro Zelle im FACS BD FACS canto (siehe Tabelle 8) wurden die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert. Die FACS Einstellungen wurden wie gewünscht an der Probe festgelegt, von der das stärkste Signal erwartet wurde. Anschließend wurden alle Proben gemessen, die Einstellungen dabei jedoch nicht mehr verändert.

#### 5.4. Konstantfeldgelelektrophorese zum Nachweis einer DNA Fragmentierung

Die Fragmentierung genomischer DNA aufgrund von DNA-Doppelstrangbrüchen kann anhand einer Konstantgelelektrophorese nachgewiesen werden.

Für diese Methode ist es erforderlich, die Zellen in kleine Agarose-Gelblöcke, sog. Plugs, einzubetten. Diese Einbettung der Zellen schützt die DNA während der weiteren Präparation vor Scherkräften und verhindert so das Auftreten von methodisch bedingten, zusätzlichen Doppelstrangbrüchen.

In den Plugs können die bestrahlten Zellen einer intensiven chemischen Lysis ausgesetzt werden. Dabei werden die Zell- und Kernmembran aufgelöst, die DNA von den Histonen befreit und alle Proteine inaktiviert. Anschließend können die Plugs in vorgefertigte Taschen einer Agarose-Gelplatte eingesetzt werden.

Das Gel wird in einer Elektrophorese-Kammer einem konstanten elektrischen Feld von 1,0 V /cm ausgesetzt. Bei dieser Feldstärke können alle DNA-Fragmente mit einer Molekülgröße  $\leq 8 \times 10^6$  Basenpaaren aus dem Plug auswandern. Da die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Fragmente unabhängig von der Molekülgröße ist, wandern alle mit der gleichen Geschwindigkeit (bis auf schnellere, sehr kleine Bruchstücke von  $\leq 5 \times 10^4$  Basenpaaren). Nach Ende der Elektrophorese findet man daher die herausgewanderte DNA in einer einzigen Bande.

Zum Nachweis wird die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EB) gefärbt. Der Anteil der aus dem Plug herausgewanderten DNA wird mit Hilfe einer Videokamera und entsprechender Software bestimmt. Dazu wird das an die DNA gebundene EB über eine UV-Lampe angeregt und das Fluoreszenzlicht mit einer Videokamera aufgenommen. Das Videobild des Gels wird aufgenommen und dann am gespeicherten Bild die Verteilung der Fluoreszenzintensität in dem Gel und der Bande berechnet. Der Anteil der herausgewanderten DNA ist dann ein Maß für die Anzahl der Doppelstrangbrüche pro Zelle.

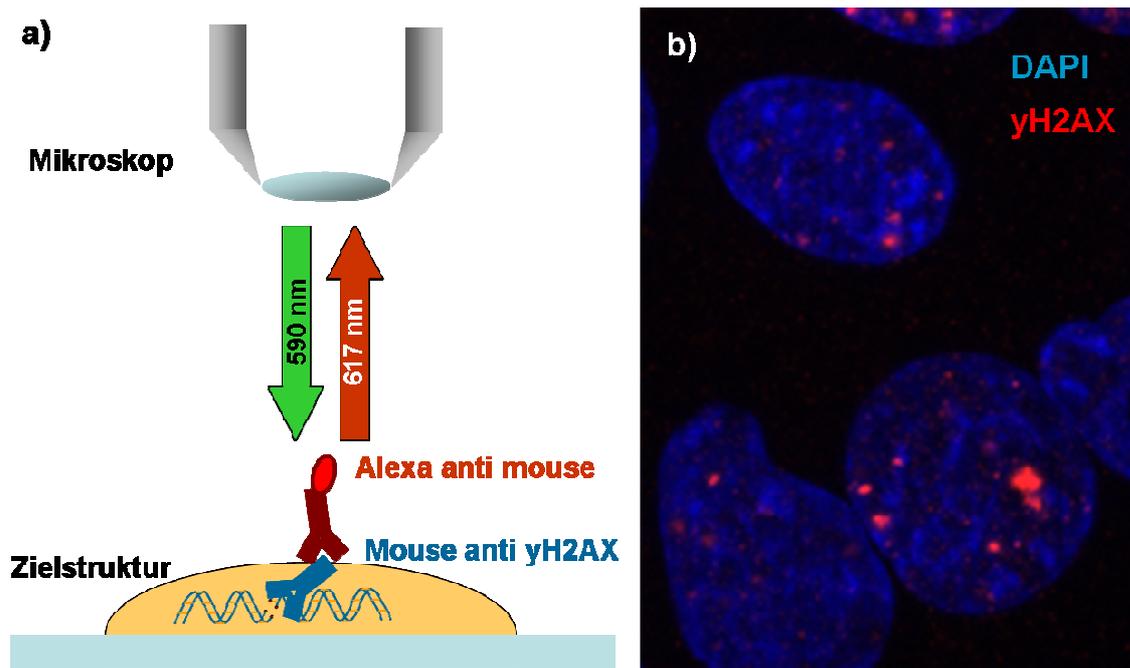
Zur Durchführung des Experimentes werden  $3 \cdot 10^6$  Zellen in Agaroseplugs eingebettet. Die Zellen werden in den Plugs mit 0 Gy bis 60 Gy bei 4 °C bestrahlt. Hierfür werden die Plugs in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und diese mit Medium aufgefüllt. Eine anschließende Inkubation der Zellen bei einer gewünschten Temperatur ermöglicht den Nachweis hierbei stattfindender Reparaturereignisse.

Zum Nachweis der DNA Fragmentierung wird das Medium aus dem Reaktionsgefäß entfernt und die Gefäße mit kaltem Lysepuffer aufgefüllt. Die Plugs werden erst für 15 min bei 4 °C und anschließend für 60 min bei 50 °C in dem Lysepuffer inkubiert. Anschließend wird der Lysepuffer entfernt, das Plug dreimal mit TE Puffer gespült und in die Taschen eines 0,7 % Agarose TBE Geles eingeführt.

Die Gelelektrophorese erfolgt über 14 h bei 1 V / cm. Die DNA wird anschließend über eine Ethidiumbromidfärbung des Geles nachgewiesen.

## 5.5. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine immunologische Methode, die einen mikroskopischen Nachweis von spezifischen Proteinen in Einzelzellen ermöglicht (Prinzip der Immunfluoreszenz siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Prinzip der Immunfluoreszenz.** Das Prinzip des mikroskopischen Nachweises von immunologisch fluoreszenzmarkierten Strukturen am Beispiel der Anfärbung des Proteins  $\gamma$ H2AX zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. **a)** Die Zielstruktur wird über einen spezifischen Erstantikörper erkannt und markiert. In einem zweiten Schritt wird die Aggregation des Erstantikörpers über einen zweiten Antikörper nachgewiesen, welcher spezifisch die schwere Kette des ersten Antikörpers bindet und an ein fluoreszierendes Protein gekoppelt ist. Bei Bestrahlung mit der entsprechenden Wellenlänge emittiert dieses selbst Licht einer definierten Wellenlänge, die im Mikroskop unter Verwendung entsprechender Filter sichtbar gemacht werden kann. **b)** Beispielhafte Abbildung des Nachweises der Aggregation von  $\gamma$ H2AX an DNA-Doppelstrangbrüchen. Der gegen das  $\gamma$ H2AX Protein gerichtete Erstantikörper wurde unter Verwendung des Farbstoffes Alexa 564 nachgewiesen

und erscheint unter dem Mikroskop rot. Zusätzlich wurde die DNA mit Diamidinphenylindol (DAPI) angefärbt und erscheint blau.

Zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen per Immunfluoreszenz wurden die Proteine  $\gamma$ H2AX (die am Serin 139 phosphorylierte Version des Histons H2AX) sowie das Protein 53Bp1 angefärbt, da beide an Doppelstrangbrüchen nachweisbar sind (Beyreuther et al., 2009).

Hierzu wurden die Deckgläschen ( $\varnothing$  18 mm) mit den zu untersuchenden Zellen (vergl. Kapitel 5.1.3) nach Durchführung des entsprechenden Versuches in der 12-Well Schale mit PBS gewaschen (1 ml pro Well) und anschließend in 1 ml PBS 2 % Formaldehyd für 15 min fixiert. Im Anschluss wurden die nun fixierten Zellen dreimal kurz mit PBS gewaschen, bevor sie in 0,2 % TritonX-100 PBS für 5 min bei 4 °C permeabilisiert wurden. Nach der Permeabilisierung folgte ein weiterer Waschschrift für 5 min in PBS.

Zum Blockieren von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den zur Detektion verwendeten Antikörpern und Strukturen der fixierten Zellen, wurden die Zellen in den Wells der Platte für 1 h unter leichtem Schwenken in PBS 3 % BSA blockiert. Anschließend konnten die Deckgläschen mit dem 1. Antikörper inkubiert werden. Hierzu wurden die Antikörper Maus anti  $\gamma$ H2AX im Verhältnis 1:100 und Kaninchen anti 53Bp1 (siehe Tabelle 6) im Verhältnis 1:500 in PBS 1 % BSA 0,5 % Tween20 verdünnt. Die Inkubation der Zellen erfolgte umgestürzt auf einem Tropfen (25  $\mu$ l) der Antikörperlösung in einer feuchten Kammer für 1 h. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Deckgläschen wieder in die 12-Wellenschale überführt und drei Mal für 10 min mit PBS 1 % BSA 0,5 % Tween20 gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den Zweitantikörpern, welche Aufgrund der Empfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe gegenüber bestimmter Wellenlängen unter Ausschluss von Sonnenlicht stattfand. Diese wurden ebenfalls in 1 % BSA 0,5 % Tween20 angesetzt, wobei Ziege anti Maus Alexa 564 1:500 und Esel anti Kaninchen Fluorescein 1:100 verdünnt wurden. Wurde eine Färbung der DNA benötigt, so wurde der Antikörperlösung außerdem 0,1  $\mu$ g/ml DAPI beigefügt. Die Inkubation der Zellen erfolgte analog zu der Inkubation mit dem Erstantikörper.

Im Anschluss wurden die Deckgläschen wieder in die 12-Wellenschale überführt und drei Mal für 10 min in PBS 0,5 % Tween20 gewaschen.

Um die gefärbten Zellen im Mikroskop auswerten zu können wurden die Deckgläschen gestürzt auf einen Tropfen Vectashield 1000 Mountingmedium, der

auf einem Objektträger getropft wurde, gelegt und mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4 °C.

## 5.6. Tabellen

### 5.6.1. Zelllinien

Tabelle 4: Untersuchte Zelllinien

| Zelllinie | Ursprung                             | DNA-Index |
|-----------|--------------------------------------|-----------|
| A431      | Vulvakarzinom                        | 1,4       |
| Cal33     | Persistierter Primärtumor, Mundboden | 1,2       |
| FaDuDD    | Primärtumor, Hypopharynx             | 1,6       |
| HSC4      | Primärtumor, Zunge                   | 2,0       |
| SAS       | Primärtumor, Zunge                   | 1,6       |
| SAT       | Plattenepithelkarzinom, Mundhöhle    | 1,6       |
| UT-SCC 5  | Metastase, Zunge                     | 1,4       |
| UT-SCC 8  | Metastase, Larynx supraglottic       | 1,0       |
| UT-SCC 14 | Rekurrenenter Primärtumor, Zunge     | 1,6       |
| UT-SCC 15 | Primärtumor, Zunge                   | 1,9       |
| UT-SCC 45 | Persistierter Primärtumor            | 1,9       |
| XF354     | Metastase, Mundboden                 | 1,7       |

### 5.6.2. Chemikalien, Medien und Labordiagnostika

Tabelle 5: Benutzte Chemikalien, Medien und Labordiagnostika

| Name                        | Hersteller    | Katalognummer |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| Bromphenolblau              | Sigma-Aldrich | B-5525        |
| Complete Protease Inhibitor | Roche         | 11836153001   |
| DAPI (Diamidinophenyl-      | Merck         | 1246530100    |

|                                       |               |         |
|---------------------------------------|---------------|---------|
| indole)                               |               |         |
| DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) | Invitrogen    | 10938   |
| DTT                                   | Sigma-Aldrich | 43816   |
| EDTA                                  | Serva         | 11280   |
| EGTA                                  | Sigma-Aldrich | E-3889  |
| Ethanol                               | Merck         | 1.00983 |
| Ethidium Bromid                       | Sigma-Aldrich | E7637   |
| FCS (Fetal Calf Serum)                | Biochrom      | S0615   |
| FACS Clean                            | BD            | 340345  |
| FACS Flow                             | BD            | 342003  |
| FACS Rinse                            | BD            | 340346  |
| Formaldehyd 37 %                      | Merck         | 1.04002 |
| Glutamin                              | Invitrogen    | 25030   |
| Glycerin                              | Roth          | 3783.2  |
| KCl                                   | Merck         | 1.04936 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | Merck         | 1.04873 |
| Kristallviolett                       | Merck         | 1.15940 |
| Methanol                              | J.T.Bakker    | 8045    |
| β-Mercaptoethanol                     | Sigma-Aldrich | M3148   |
| MgCl <sub>2</sub>                     | Sigma-Aldrich | M8266   |
| NaCl                                  | Sigma-Aldrich | S6150   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | Merck         | 1.06586 |
| NaOH                                  | Sigma-Aldrich | S8045   |
| NaVO <sub>4</sub>                     | Sigma-Aldrich | S-6508  |
| NLS (N-Lauroyl-Sarcosine)             | Sigma-Aldrich | L5777   |
| SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)          | Sigma-Aldrich | L4509   |
| Sucrose                               | Calbiochem    | 5737    |
| Tris-Base                             | Sigma-Aldrich | T1503   |

|                 |               |          |
|-----------------|---------------|----------|
| Tris-Borat-EDTA | Sigma-Aldrich | 93290    |
| Tris-EDTA       | Sigma-Aldrich | T9285    |
| Tris HCl        | Sigma-Aldrich | T3253    |
| Triton X-100    | Serva         | 39795.02 |
| Trypsin-EDTA    | Invitrogen    | 25300    |
| Tween 20        | Sigma-Aldrich | P7949    |

### 5.6.3. Antikörper

Tabelle 6: Verzeichnis der eingesetzten Antikörper

| Antigen   | Spezies           | Konzentration / Aktivität | Hersteller          | Katalognummer                  |
|---|-------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------|
| 53Bp1   | Kaninchen         | 1 mg/ml                   | Novus Biologicals   | NB100-305                      |
| Calnexin  | Maus              | 250 µg/ml                 | BD Pharmingen       | 610523                         |
| Calpain-1/2, small subunit                      | Maus (monoklonal) | 1000 µg/ml                | Callbiochem         | 208730                         |
| EGF-Rezeptor                                    | Kaninchen         | k.A.                      | Cell Signaling      | 2232                           |
| EGF-Rezeptor                                    | Humanisiert       | unterschiedlich           | Merck               | Cetuximab / Erbitux            |
| EGF-Rezeptor                                    | Humanisiert       | unterschiedlich           | Radiopharmazie HZDR | DTPA-Cetuximab                 |
| EGF-Rezeptor                                    | Humanisiert       | 1,2 GBq/mg                | Radiopharmazie HZDR | <sup>90</sup> Y-DTPA-Cetuximab |
| Histon γH2AX (Ser139)                           | Maus              | 700 µg/ml                 | millipore           | 05-636                         |
| Histon H2B                                      | Kaninchen         | 500 µg/ml                 | Imgenex             | IMG-359                        |
| Human IgG (H+L) FITC konjugiert                 | Esel              | 1,5 mg/ml                 | dianova             | 709-096-149                    |
| Kaninchen-IgG FITC konjugiert                   | Esel              | k.A.                      | GE Healthcare       | N1034-1ml                      |
| Kaninchen-IgG Meerrettich Peroxidase konjugiert | Esel              | k.A.                      | GE Healthcare       | NA934-1ml                      |
| Lamin B1  | Kaninchen         | 500 µg/ml                 | Imgenex             | IMG-5133A                      |
| Maus-IgG (H+L)                                  | Ziege             | 2 mg/ml                   | Molecular Probes    | A11005                         |

|  |           |           |               |           |
|--|-----------|-----------|---------------|-----------|
| Alexa Fluor 594 conjugated                 |           |           |               |           |
| Maus-IgG Meerrettich Peroxidase konjugiert | Schaf     | k.A.      | GE Healthcare | NA931-1ml |
| Sp 1 (H-225)                               | Kaninchen | 200 µg/ml | Santa Cruz    | sc-14027  |

#### 5.6.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Benutzte Puffer und ihre Zusammensetzung

| Bezeichnung des Puffers                         | Zusammensetzung   |
|---|---|
| 1 % Triton X-100 Lösung                         | 1 % Triton X-100<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>40 µl/ml Complete-Prot.-Inh. 25x<br>0,2 mM NaVO <sub>4</sub> |
| 6x SDS Probenpuffer                             | 200 mM Tris HCl<br>5 mM EDTA<br>10 % Sucrose<br>3,3 % SDS<br>2 % β-Mercaptoethanol<br>0,1 % Bromphenolblau  |
| EDTA Lösung                                     | 0,6 M EDTA<br>0,5 M NaOH<br>pH 8  |
| Ethidium Bromid Lösung                          | 1 mg / ml   |
| Extraktion 1                                    | 50 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>40 µl/ml Complete-Prot.-Inh. 25x<br>5 mM EDTA          |
| Extraktion 2                                    | 0,5 M Tris-Base pH 6,8<br>0,004 % SDS   |
| Extraktion 3                                    | 2,5 ml / 100 ml Buffer 2<br>1 g / l SDS<br>3 mg EDTA<br>30 mM DTT<br>10 % Glycerin                          |
| Kristallviolettlösung                           | 1 g / l Kristallviolett in H <sub>2</sub> O   |
| Laufpuffer                                      | TG mit 0,1 % SDS  |
| Lysis-Lösung<br>(Konstantfeldgelelektrophorese) | 0,015 g/l Proteinase K<br>0,5 M EDTA<br>10 % NLS  |
| PBS   | 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>19 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                           |

|                |   |
|----------------|---|
|                | 137 mM NaCl<br>2,7 mM KaCl<br>12 mM     |
| TBE            | 89 mM Tris-Borat<br>2 mM EDTA<br>pH 8.3 |
| TBS            | 10 mM Tris-HCl pH 7,5<br>100 mM NaCl    |
| TBST           | TBS mit 0,2 % Tween 20                  |
| TG (1 l)       | 192 mM Glycin<br>25 mM Tris-Base        |
| Transferpuffer | TG mit 20 % Methanol                    |

### 5.6.5. Geräte

Tabelle 8: Benutzte Geräte

| Gerätetyp                 | Gerätebezeichnung         | Hersteller       |
|---------------------------|---------------------------|------------------|
| Blotkammer (Western Blot) | Criterion Precast         | Biorad           |
| Brutschrank               | CO <sub>2</sub> Incubator | SANYO            |
| Eismaschine               | FM-120DE-50               | Hochizaki        |
| Entwicklermaschine        | Curix 60                  | AGFA             |
| FACS                      | BD FACS canto             | BD               |
| Gefrierschrank (-20 °C)   | Gefrierschrank -20        | Kryotec          |
| Gefrierschrank (-80 °C)   | Gefrierschrank -80        | Kryotec          |
| Gelkammern (Western Blot) | Criterion Precast         | Biorad           |
| Heizblock                 | Thermomixer comfort       | Eppendorf        |
| Kühlschrank               | Standart 432              | Kirsch           |
| Lumineszenzdetektor       | Night Owl                 | Berthold         |
| Magnetrührer              | RH Basic                  | IKA Labortechnik |
| Mikroskop                 | Observer Z1               | Zeiss            |
| Mikroskoplampe            | HXP 100                   | Zeiss            |

|                                    |                  |                   |
|------------------------------------|------------------|-------------------|
| Netzteil                           | E835             | Consort           |
| pH-Meter                           | HI 221           | Hanna             |
| Pipetten<br>(Wechselspitze)        | Research         | Eppendorf         |
| Pipettenheber                      | Accu-Jet pro     | Brandt            |
| Röntgenröhre                       | RS 225           | Gulmay Medical    |
| Schüttler                          |                  | B.Braun Melsungen |
| Schüttler<br>(Horizontalschwenker) | ST 5 Cat         | Neolab            |
| Schüttler (Überkopf)               | Rotator 2-1175   | Neolab            |
| Ultrazentrifuge                    | Optima Max       | Beckmann Coulter  |
| Ultrazentrifuge Rotor              | TLA 110          | Beckmann Coulter  |
| Werkbank                           | Hera Safe        | Heraeus           |
| Zellzählssystem                    | C2               | Beckmann Coulter  |
| Zentrifuge                         | miniSpin plus    | Eppendorf         |
| Zentrifuge                         | Centrifuge 5415D | Eppendorf         |
| Zentrifuge (gekühlt)               | Microfuge R      | Beckmann          |
| Zentrifuge (gekühlt)               | Megafuge 1.0R    | Heaeus            |

### 5.6.6. Software

Tabelle 9: Benutze Software

| Name                          | Version | Anwendung  |
|-------------------------------|---------|--|
| Adobe Acrobat Reader          | 8.2.5   | Darstellung von .pdf Dateien   |
| Adobe Photoshop Elements      | 4.0     | Grafikverarbeitung   |
| EndNote                       | 9.0     | Verwaltung von Literaturverzeichnissen   |
| Graph Pad Prism               | 4.03    | Statistische Auswertung, Erstellen von Grafiken                                  |
| Microsoft Office Professional | 2003    | Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Erstellen von Präsentationen und Grafiken |

---

|                                   |          |   |
|-----------------------------------|----------|---|
| Microsoft Windows XP Professional | 2002 SP3 | Betriebssystem  |
| Mozilla Firefox                   | 3.6.13   | Darstellung von HTML Inhalten                                 |
| Winlight32                        | 2.95     | Steuerungssoftware für Night Owl Luminometer                  |
| Zeiss Axiovision                  | 4.7.1    | Ansteuernd von Zeiss Mikroskopen, Verwaltung von .zvi Dateien |

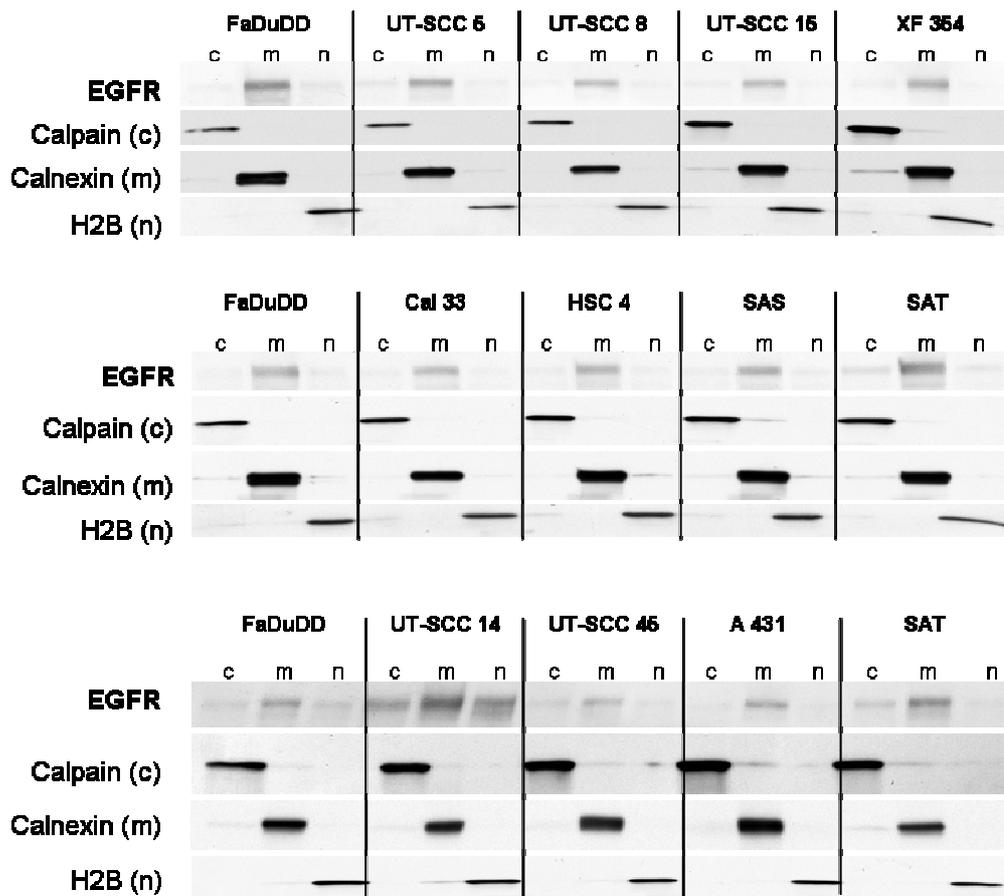
## 6. Ergebnisse

### 6.1. EGFR Expression in Plattenepithelkarzinomzelllinien

Um eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen der EGFR Expression von Kopf- / Halstumorzelllinien und dem Potential von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab zur Zelinaktivierung treffen zu können, wurde die EGFR Expression von zwölf Plattenepithelkarzinomzelllinien charakterisiert.

#### 6.1.1. Bestimmung der EGFR Expression per Western Blot

Aufgrund der guten Quantifizierbarkeit der Methode wurde die Proteinexpression per Western Blot nachgewiesen. Da für eine Bindung des Antikörpers an lebende Zellen allein die Proteinmenge an der Zelloberfläche entscheidend ist, wurden fraktionierte Zellextrakte hergestellt und untersucht (siehe Abbildung 8 & Abbildung 11). Hierzu wurden die Zellen per Ultraschall aufgebrochen und über verschiedene Pufferbedingungen und Zentrifugationsschritte in cytoplasmatische, membranöse und nukleäre Extrakte fraktioniert. Dies ermöglicht eine differenzierte Aussage über die Verteilung des Rezeptors innerhalb dieser Zellkompartimente und damit über die Menge der Moleküle, welche als Bindungspartner einer Radioimmuntherapie zur Verfügung stehen.



**Abbildung 11: Expression und Verteilung des EGFR in zwölf Kopf- Halstumorzelllinien.** Die Proteinextrakte der einzelnen Kompartimente wurden per differentieller Zentrifugation getrennt. Die EGFR Expression wurde über einen Western Blot bestimmt. Das Gel wurde mit den Extrakten aus 50.000 Zellen beladen. Die Reinheit der Fraktionen wurde über spezifische Proteine überprüft. Als Marker dienen die cytosolische Protease Calpain für das Cytoplasma (c), das Chaperon Calnexin für membranöse Strukturen (m) sowie das Histon H2B für die nukleäre Fraktion (n).

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Gele untereinander zu gewährleisten, wurde die Zelllinie FaDuDD auf jedem Gel als Standard mit aufgetragen und ermöglichte so eine Normierung der Gele während der quantitativen Auswertung. Der EGFR ist in allen untersuchten Zelllinien und in allen untersuchten Zellfraktionen nachweisbar (siehe Abbildung 11). Die einzelnen Zelllinien und Fraktionen unterscheiden sich deutlich in der Intensität der EGFR Expression. Für alle untersuchten Zelllinien findet sich die stärkste Expression stets in der Membranfraktion. Eine Voraussetzung für die Bewertung der EGFR Verteilung innerhalb der Zellkompartimente ist deren Reinheit. Hierzu wurden Kreuzverunreinigungen zwischen den verschiedenen Zellfraktionen anhand von spezifischen Markerproteinen kontrolliert. So fanden sich weder von der cytosolischen Protease Calpain (c), des Chaperons Calnexin als Protein des

endoplasmatischen Retikulums (m), noch des Histons H2B (n) signifikante oder vergleichbare Mengen in anderen als den erwarteten Kompartimenten. Aufgrund der hohen Spezifität der Markerproteine für ihr jeweiliges Kompartiment kann ein Nachweis des EGFR in allen Fraktionen durch Kreuzverunreinigungen während der Extraktion ausgeschlossen werden.

Durch die Verwendung einer empfindlichen Kamera ist die Auswertung der EGFR Intensität durch ein Aufnehmen der Chemolumineszenz möglich (siehe Kapitel 5.2.2). Mithilfe einer softwaregestützten Auswertung lässt sich so die Signalintensität quantifizieren.

Anhand der Auswertung und Addition der Signalintensität aller Fraktionen wurde die gesamt EGFR Expression berechnet (siehe Abbildung 12). Es lassen sich drei Gruppen von Zellen mit niedriger (UT-SCC 8, XF 354 sowie UT-SCC 15), mittlerer (Cal33, UT-SCC 5, UT-SCC 45, FaDuDD, SAS sowie HSC 4) und besonders hoher (A431, SAT und UT-SCC 14) EGFR Proteinexpression nachweisen. Die EGFR Expression in UT-SCC 14 Zellen (welche sich durch die stärkste Expression auszeichnen) ist dabei 20-mal stärker als in der Zelllinie UT-SCC 8 (welche die niedrigste Expression aufweist). Die Zelllinie FaDuDD mit einer mittleren EGFR Expression zeichnet sich durch eine dreimal stärkere EGFR Expression als die Zelllinie UT-SCC 8 aus.

Betrachtet man die einzelnen Fraktionen, so lässt sich mit steigender Gesamtproteinmenge eine Zunahme der EGFR Menge in allen untersuchten Kompartimenten beobachten (siehe Abbildung 13). Die stärkste Expression fand sich jedoch stets in der Membranfraktion.

Bei einer prozentualen Auswertung wird deutlich, dass während die nukleär lokalisierten EGF-Rezeptormoleküle stets einen Anteil von 15 bis 25 % an der gesamten EGF-Rezeptormenge haben, der membranöse Anteil mit einer steigenden gesamt EGFR-Menge abnimmt (siehe Abbildung 14). So finden sich in der Zelllinie UT-SCC 8 mit der geringsten EGFR-Expression über 75 % des Proteins in membranständigen Kompartimenten. In der Zelllinie UT-SCC 14, welche sich durch eine besonders hohe EGFR-Expression auszeichnet, sind es hingegen unter 50 %. Entsprechend dazu lässt sich eine Zunahme des cytoplasmatischen EGFR-Anteils von 10 % in UT-SCC 8 auf 25 % in UT-SCC 14 nachweisen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die gesamte EGFR Proteinexpression keineswegs mit der Anzahl der als Bindepartner für den Antikörper zur Verfügung stehenden

Moleküle gleichzusetzen ist. Vielmehr ist eine genauere Betrachtung der an der Oberfläche exprimierten Proteine notwendig, um eine Vorhersage über die Bindekapazität der Zelllinien zu treffen.

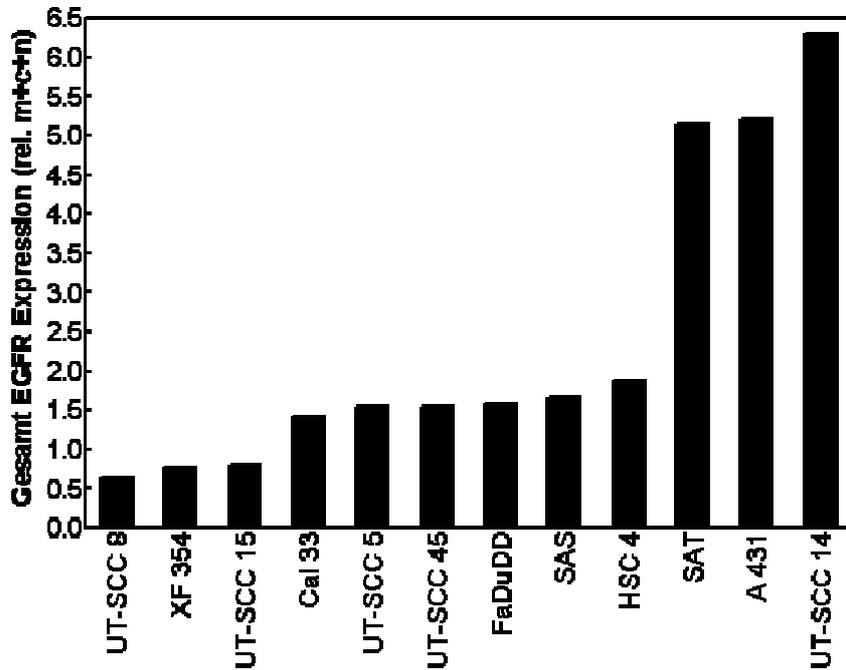


Abbildung 12: Heterogenität der EGFR Proteinexpression in 12 Plattenepithelkarzinomzelllinien. Durch die Auswertung der Signalintensität aller Fraktionen (vergl. Abbildung 11) und Addition der Signale der einzelnen Kompartimente wurde die gesamt EGFR Expression berechnet.

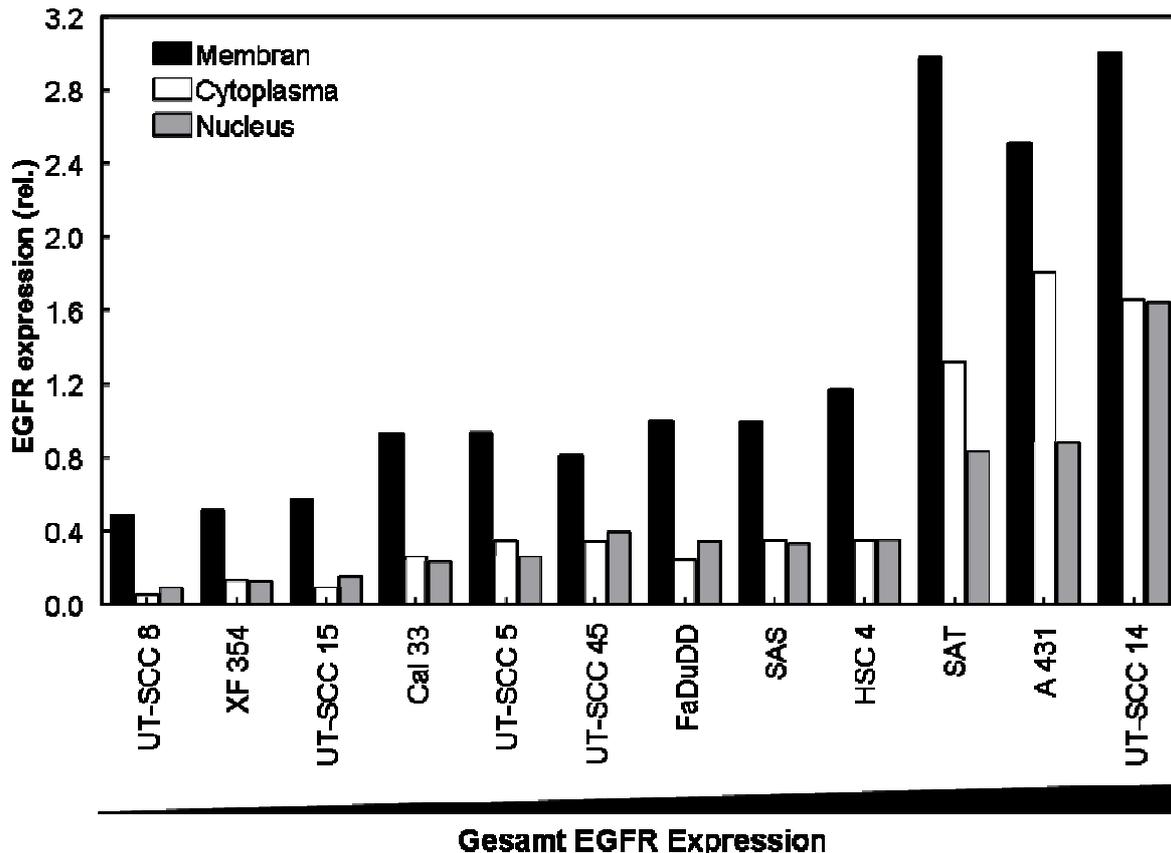
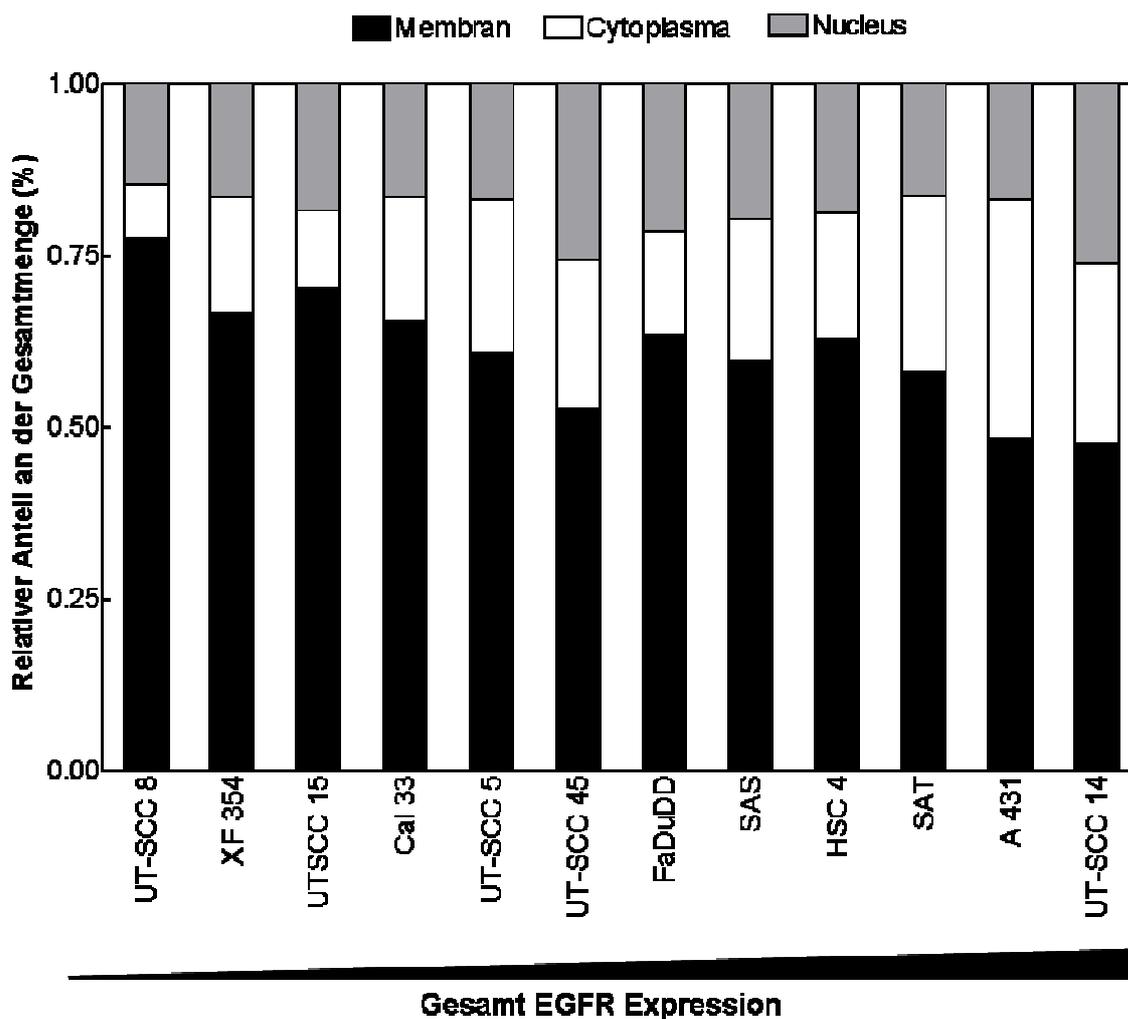


Abbildung 13: Verteilung des EGFR in verschiedenen Zellkompartimenten von 12 Plattenepithelkarzinomzelllinien. Durch die Auswertung der Signalintensität der jeweiligen Fraktionen (vergl. Abbildung 11) wurde die dazugehörige EGFR Expression berechnet (schwarz = Membran, weiß = Cytoplasma, grau = Kern). Die Zelllinien wurden von links nach rechts nach aufsteigender EGFR-Gesamtmenge sortiert.



**Abbildung 14: Verteilung des EGFR auf verschiedene Zellkompartimente.** Durch die Auswertung der Signalintensität der jeweiligen Fraktionen (vergl. Abbildung 13) wurde die intrazelluläre Verteilung des EGFR berechnet. Die Verteilung wird als prozentualer Anteil dargestellt (schwarz = Membran, weiß = Cytoplasma, grau = Kern). Die Zelllinien wurden von links nach rechts nach aufsteigender EGFR Gesamtmenge sortiert.

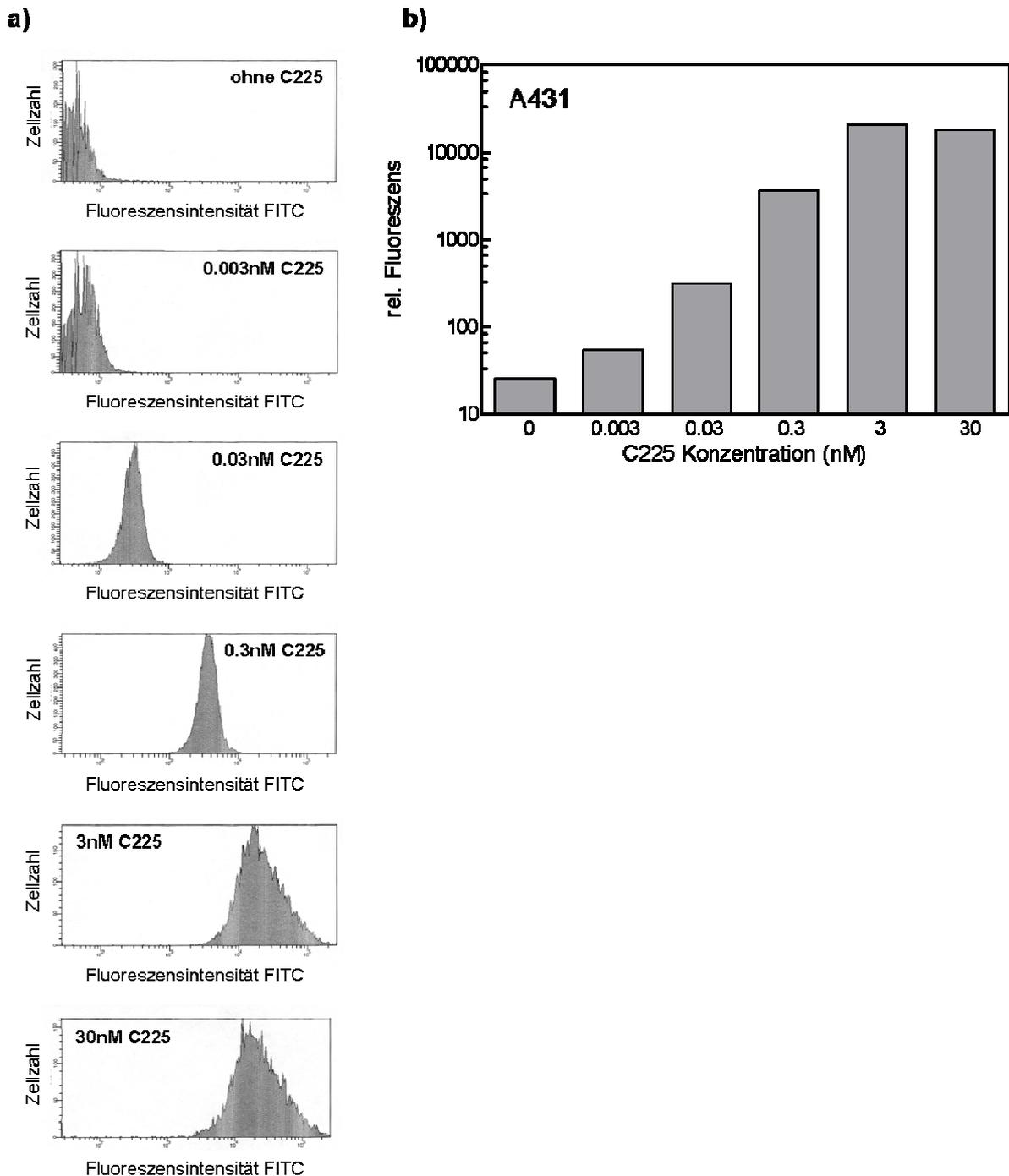
### 6.1.2. Bestimmung der EGFR Oberflächenexpression per FACS Analyse

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Western Blot Analyse mit einer weiteren Methode wurde die EGFR Oberflächenexpression der zwölf Zelllinien flusszytometrisch bestimmt. Hierzu wurden lebende Zellen in Suspension mit Cetuximab inkubiert und gebundene Antikörper durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers nachgewiesen (siehe Kapitel 5.3). Durch die Messung an lebenden Zellen mit intakter Zellmembran konnte nicht nur exklusiv die Menge der EGFR Moleküle an der Zelloberfläche bestimmt werden, sondern auch das Bindungsvermögen des für den Therapieansatz mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab relevanten Antikörpers Cetuximab.

Da nur bei gesättigten Konzentrationen alle EGFR Moleküle auf der Oberfläche der Zellen erfasst werden, ist es essentiell die Bindekapazität der Zellen zu kennen. Dafür wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von Cetuximab an die Zelloberfläche von lebenden A431 Zellen untersucht. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine besonders hohe EGFR Expression aus (siehe Abbildung 12 & Abbildung 13). Darüber hinaus wurde die Anzahl der EGFR Moleküle an der Zelloberfläche dieser Zelllinie bereits in der Literatur beschrieben (Goldstein et al., 1995; Haigler et al., 1978; Kawamoto et al., 1983), so dass sie für diese Untersuchungen als Referenz dienen kann.

Für Konzentrationen von 0,003 nM bis 3 nM ist eine Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten, welche linear von der angebotenen Antikörperkonzentration abhängt. Ab einer Konzentration von 3 nM kann keine weitere Steigerung der Fluoreszenz erzielt werden. So führt auch eine Inkubation mit 30 nM nicht zu einem stärkeren Signal (Abbildung 15). Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass sämtliche, für eine Bindung mit Cetuximab zugänglichen, EGFR Moleküle bereits von einem Antikörper gebunden wurden. Es ist also ein Sättigungseffekt zu beobachten.

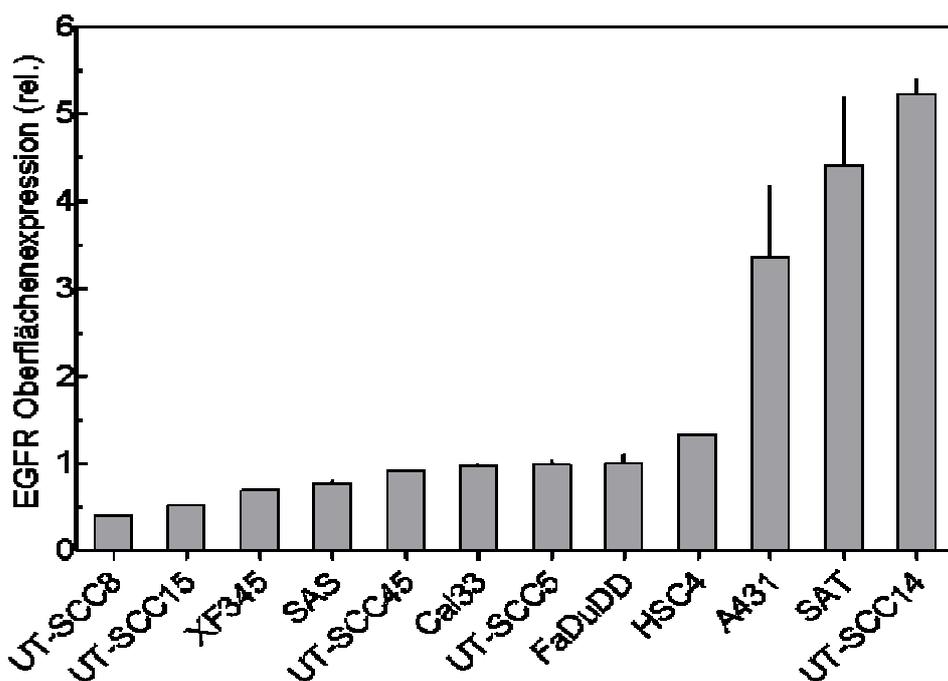
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nicht nur für die Untersuchung der Cetuximabbindekapazität, sondern auch für alle weiteren Experimente Cetuximab, DTPA-Cetuximab sowie  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in einer Konzentration von 30 nM verwendet. So kann sichergestellt werden, dass alle potentiellen Bindestellen erreicht werden.



**Abbildung 15: Cetuximab (C225) Bindung an lebende A431 Zellen.** Für die Untersuchung wurden 100.000 lebende A431 Zellen ausgewertet. Die Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. Die Abbildung zeigt **a)** die Einzelzellmessungen als Funktion der Fluoreszenzintensität und **b)** die Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten.

Um die relative EGFR Oberflächenexpression der hier eingesetzten Zellen zu bestimmen, wurde die Cetuximabbindekapazität von zwölf Plattenepithelkarzinomzelllinien per FACS Analyse quantifiziert (siehe Abbildung 16). Es ließen

sich Zellen mit besonders niedriger EGFR Oberflächenexpression (UT-SCC 8, UT-SCC 15 sowie XF345), mittlerer EGFR Oberflächenexpression (SAS, UT-SCC 45, Cal33, UT-SCC 5, FaDuDD sowie HSC4) sowie sehr starker EGFR Expression (A431, SAT und UT-SCC 14) charakterisiert. Die geringste EGFR Oberflächenexpression zeigte die Zelllinie UT-SCC 8, eine zehnmal höhere und damit die stärkste wurde für die Zelllinie UT-SCC 14 detektiert. Es konnten durch die FACS Analyse dieselben Gruppen ermittelt werden, wie zuvor schon durch den Western Blot (vergl. Abbildung 12). Das Cetuximabbindevermögen und damit auch indirekt die EGFR Menge der zwölf Plattenepithelkarzinomzelllinien nach einer Inkubation mit 30 nM Cetuximab zeigt ein ähnliches Verhältnis der Zelllinien zueinander, wie auch die Analyse der membranösen Proteinexpression per Western Blot. Da die Messung in einer übersättigten Konzentration durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass sämtliche Bindestellen erkannt wurden.

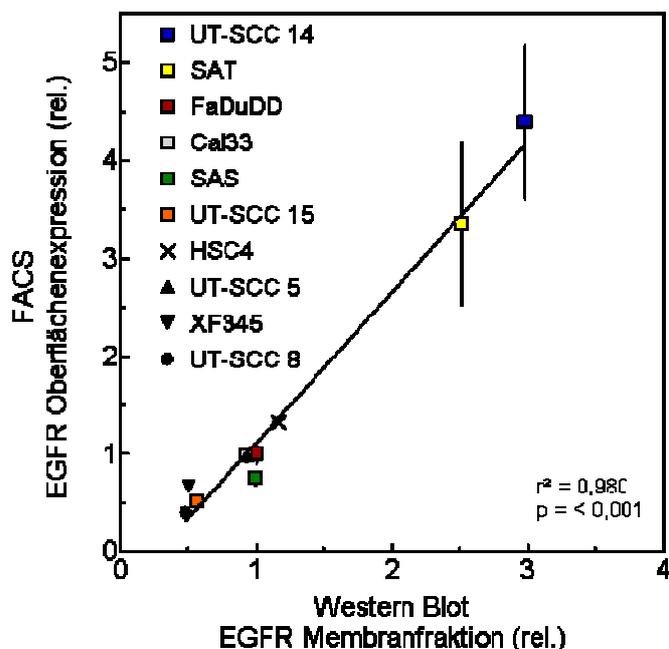


**Abbildung 16: EGFR Oberflächenexpression verschiedener Plattenepithelkarzinomzelllinien.** Die EGFR Oberflächenexpression wurde durch die Cetuximabbindekapazität lebender Zellen im FACS bestimmt. Die Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. Es wurden biologische Duplikate mit jeweils 100.000 Zellen nach einer Inkubation mit 30 nM Cetuximab untersucht. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate.

Vergleicht man die per FACS Analyse gewonnenen Daten mit den Ergebnissen des Western Blottes, so zeigt sich eine klare Korrelation ( $r^2 = 0,9675$ ,  $p = < 0,001$ )

zwischen der membranständigen EGFR Proteinexpression, die im Western Blot ermittelt wurde und der EGFR Oberflächenexpression, welche durch die im FACS gemessene Cetuximabbindekapazität bestimmt wurde (siehe Abbildung 17).

Diese Korrelation zeigt, dass die EGFR Expression des membranösen Kompartimentes vor allem die EGFR Moleküle der äußeren Zellmembran und damit die Epitope des Antikörpers darstellt. Obwohl die Membranfraktion durchaus auch Kompartimente wie das endoplasmatische Retikulum oder den Golgi Apparat beinhaltet. Deren EGFR Fraktion kann jedoch keine Bindestellen für Antikörper im Kulturmedium darstellen und ist daher nicht relevant. Dies ist insofern hervorzuheben, als dass die EGFR Expression in den membranösen Kompartimenten nicht mit der gesamt EGFR Expression gleichzusetzen ist (vergl. Abbildung 14).



**Abbildung 17:** Korrelation der im FACS gemessenen Cetuximab Bindekapazität mit der im Western Blot gemessenen EGFR Proteinmenge der Membranfraktion. Die EGFR Oberflächenexpression der zwölf Plattenepithelkarzinomzelllinien wurde per Western Blot Analyse von Membranextrakten (vergl. Abbildung 13) sowie flusszytometrisch anhand von Cetuximabbindekapazitätsstudien (vergl. Abbildung 16) bestimmt.

Da die Anzahl der EGFR Oberflächenmoleküle der Zelllinie A431 in Literaturdaten bereits beschrieben wurde (Goldstein et al., 1995; Haigler et al., 1978; Kawamoto et al., 1983), war es anhand der über die Flusszytometrie gewonnenen Daten möglich, die zu erwartende Anzahl an EGFR Oberflächenmolekülen für alle zwölf Zelllinien zu errechnen (siehe Tabelle 10). Sie unterscheidet sich von  $0,24 \cdot 10^6$  Molekülen an der

Zelloberfläche von UT-SCC 8 Zellen bis  $3,12 \cdot 10^6$  Molekülen pro Zelle bei UT-SCC 14 Zellen. Die Gruppe der niedrig exprimierenden Zelllinien hat im Mittel  $0,31 \cdot 10^6$ , die Gruppe der Zelllinien mit mittlerer EGFR Expression  $0,67 \cdot 10^6$  und die Gruppe der Zellen mit starker EGFR Expression  $2,58 \cdot 10^6$  EGFR Moleküle pro Zelle.

**Tabelle 10: Anzahl der errechneten EGFR Oberflächenmoleküle.**

|           | EGFR Moleküle pro Zelloberfläche $\times 10^6$ | SD $\times 10^6$ |
|-----------|--|------------------|
| A431      | 2,00 <sup>1,2,3</sup>                          | 0,49             |
| Cal33     | 0,59   | 0,01             |
| FaDuDD    | 0,60   | 0,05             |
| HSC4      | 0,79   | 0,01             |
| SAS       | 0,45   | 0,02             |
| SAT       | 2,62   | 0,47             |
| UT-SCC 5  | 0,59   | 0,01             |
| UT-SCC 8  | 0,24   | 0,01             |
| UT-SCC 14 | 3,12   | 0,10             |
| UT-SCC 15 | 0,31   | 0,01             |
| UT-SCC 45 | 0,54   | 0,01             |
| XF345     | 0,40   | 0,01             |

Die Berechnung der Moleküle pro Zelloberfläche erfolgte anhand der Ergebnisse aus den Cetuximabbindekapazitätsuntersuchungen (vergl. Abbildung 16). Als Referenz dient die in der Literatur charakterisierte Zelllinie A431 (Goldstein et al., 1995; Haigler et al., 1978; Kawamoto et al., 1983)

## 6.2. Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

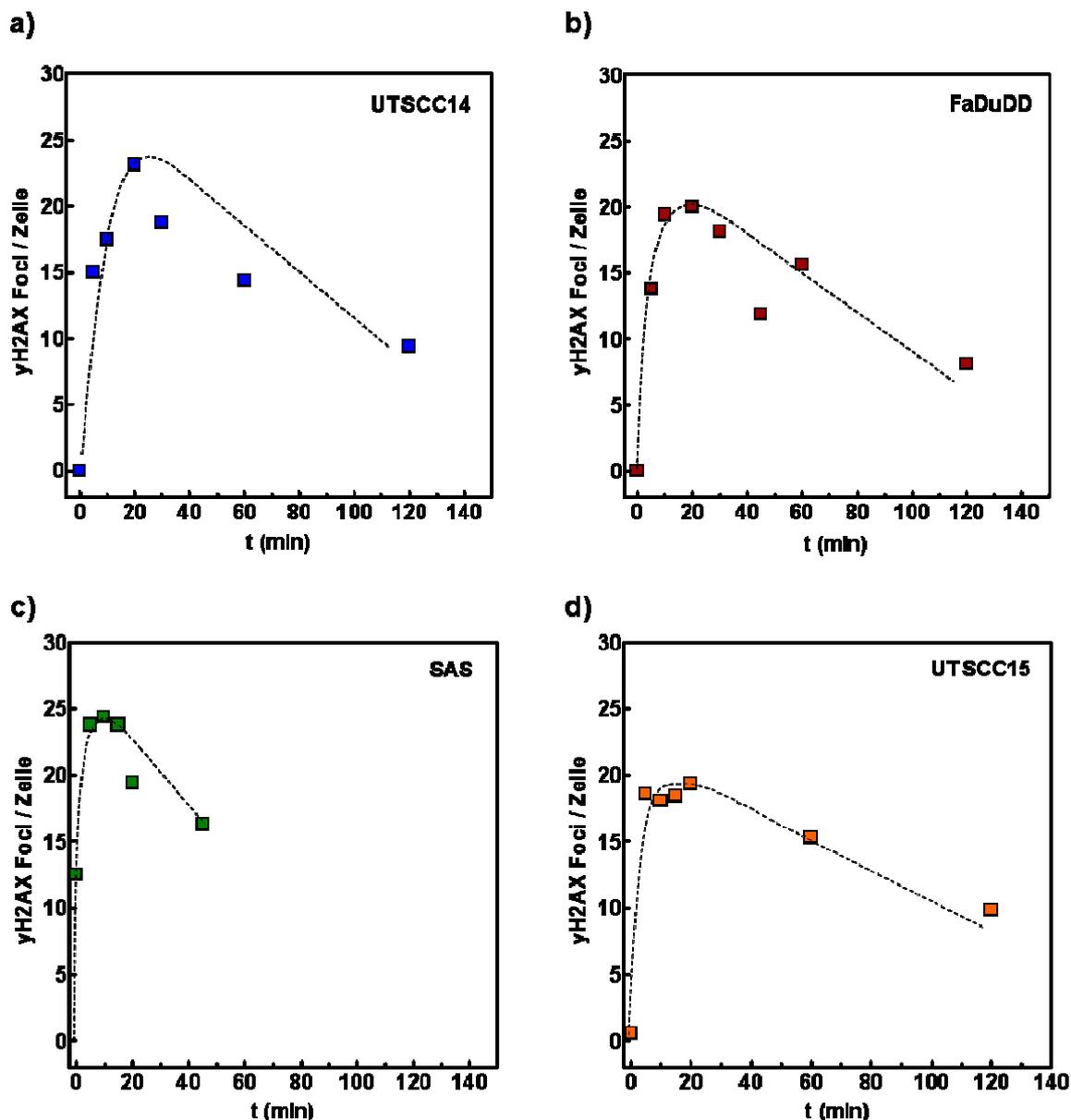
Eine der zentralen Fragestellungen der Arbeit ist die Untersuchung einer potenziellen Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) durch <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab in humanen Tumorzellen sowie die Überprüfung der Anzahl der induzierten Brüchen auf eine Abhängigkeit von der EGFR Expression der Zielzellen. Die Anzahl der DNA-DSB wird hierbei nicht direkt gemessen, sondern indirekt durch einen Nachweis von Phosphorylierungen des Histons H2AX am Serin 139 ( $\gamma$ H2AX). Diese Phosphorylierung über Bereiche in der Größenordnung von mehreren Megabasenpaaren findet im Rahmen der zellulären Reaktion auf DNA-DSB statt und wird durch DNA-DSB induziert. In der Konsequenz bedeutet dies, dass aufgrund der notwendigen enzymatischen Prozesse ein Nachweis der Phosphorylierung direkt nach der Schadensinduktion nicht möglich ist. Ein Vorteil

dieser Methode ist jedoch, dass sie einen Nachweis der DNA-Schädigung nach klinisch relevanten Dosen von wenigen Gray ermöglicht.

### 6.2.1. $\gamma$ H2AX Kinetiken als Marker für Doppelstrangbrüche

Um eine Aussage darüber zu treffen, welcher Zeitraum notwendig ist, um eine maximale Anzahl von  $\gamma$ H2AX Foci detektieren zu können, wurden exemplarisch die vier Zelllinien FaDuDD, SAS, UT-SCC 14 sowie UT-SCC 15, welche sich in ihrer EGFR Expression deutlich unterscheiden, auf ihre  $\gamma$ H2AX Erzeugungs- und Reparaturkinetiken untersucht. Hierzu wurden sie mit 1 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und die Anzahl der  $\gamma$ H2AX Foci nach frühen Zeitpunkten von bis zu maximal 2 h detektiert (siehe Abbildung 18).

Nach der Bestrahlung zum Zeitpunkt 0 min nimmt die Anzahl der nachgewiesenen  $\gamma$ H2AX Foci in allen Zelllinien zu. Dies spiegelt die einsetzende Schadenserkennung und den Start der DNA Reparatur wieder. Das Maximum der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci ist in allen untersuchten Zelllinien nach 15 min bis 20 min erreicht. Es spiegelt die Summe der erzeugten DNA Brüche wieder. Die Anzahl der erzeugten Doppelstrangbrüche ist in den verschiedenen Zelllinien leicht unterschiedlich und liegt zwischen 20 und 25 Brüchen pro Zelle, wobei diese Angaben auf den DNA-Gehalt der Zellen abgeglichen sind. Nach 15 min bis 20 min nimmt die Anzahl der nachgewiesenen  $\gamma$ H2AX-Foci wieder ab, was sich durch die einsetzende Reparatur und Beseitigung der Schäden erklärt. So lassen sich in allen untersuchten Zelllinien nach 2 h nur noch 10 Brüchen pro Zelle nachweisen. Bei den Kinetiken handelt es sich um die Summe aus neuer Markierung von Schäden und gleichzeitig stattfindender Reparatur. Dieses Experiment zeigt, dass die Kinetik der Schadensantwort in den verschiedenen Zelllinien grundsätzlich ähnlich ist. So ist in allen Zelllinien das Maximum nach 15 min bis 20 min zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse folgte in allen nachfolgenden Experimenten, in denen die Anzahl an initialen  $\gamma$ H2AX Foci zu untersuchen war, auf die Schadensinduktion eine zwanzigminütige Inkubation bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub>.



**Abbildung 18: H2AX Phosphorylierungskinetik in verschiedenen Kopf- / Halstumorzelllinien.** Die Phosphorylierungskinetik des Proteins H2AX nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen als Marker für vorhandene DNA-Doppelstrangbrüche in den Zelllinien a) UT-SCC 14, b) FaDuDD, c) SAS sowie d) UT-SCC15. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung für verschieden lange Zeiten bei 37 °C inkubiert und anschließend per Immunfluoreszenz die Phosphorylierung von H2AX nachgewiesen.

### 6.2.2. Einfluss niedriger Temperaturen auf den Nachweis von yH2AX Foci

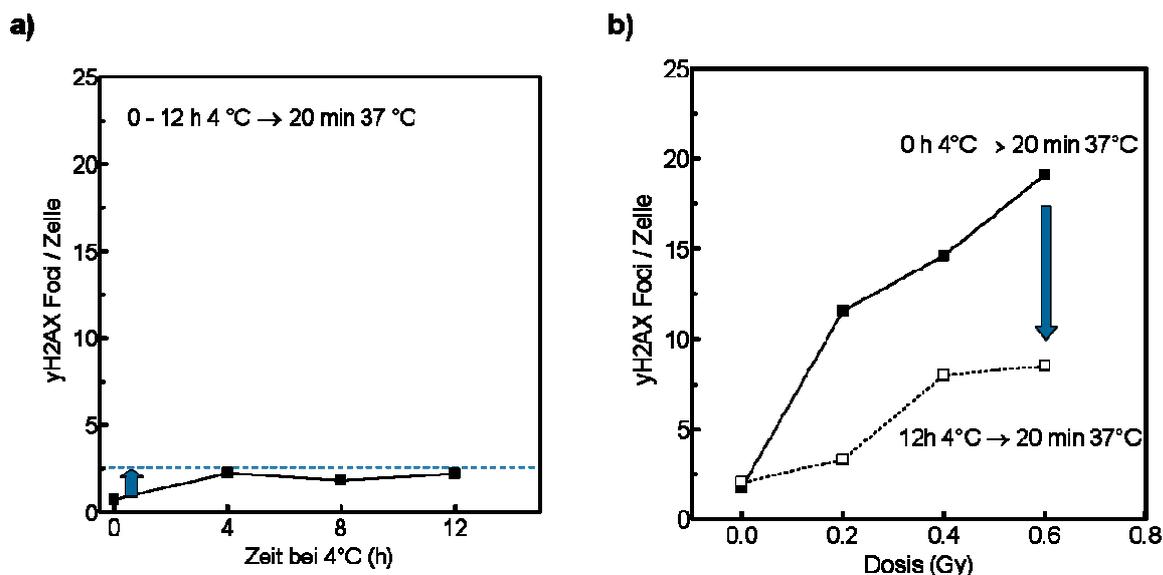
Während bei einer Bestrahlung durch Röntgenstrahlen Dosen von einem Gray in relativ kurzen Zeiträumen von 30 sek bis 2 min appliziert werden (vergl. Tabelle 2), ist die Dosisleistung einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab deutlich geringer. Dadurch ergeben sich, in Abhängigkeit der EGFR Expression, für eine Applikation von mehreren Gray Zeiträume von mehreren Stunden. Dies würde zwangsläufig

dazu führen, dass bei einer Untersuchung von initialen Doppelstrangbrüchen die unter der Bestrahlung stattfindende DNA-Reparatur eine korrekte Aussage unmöglich macht. Um dieses Problem zu umgehen, findet die Schadensakkumulation zur Untersuchung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten initialen Doppelstrangbrüchen bei 4 °C statt. Das Abkühlen der Zellen führt zu einer Blockierung von enzymatischen Prozessen in der Zelle und dadurch zur Hemmung der Reparatur. Allerdings stellt es für die Zellen einen zusätzlichen Stress dar, der die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma\text{H2AX}$  Foci beeinflussen kann. Um den Einfluss niedriger Temperaturen einschätzen zu können, wurden unbestrahlte UT-SCC 14 Zellen für 0, 4, 8 sowie 12 Stunden bei 4 °C gelagert. Im Anschluss daran wurden sie für 20 min bei 37 °C und 10 %  $\text{CO}_2$  inkubiert und die Anzahl nachweisbarer  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci bestimmt (siehe Abbildung 19a).

Die Inkubation unbestrahlter UT-SCC 14 Zellen bei 4 °C bewirkt einen Anstieg der nachgewiesenen  $\gamma\text{H2AX}$  Foci von <1 auf 2,5 Foci pro Zelle. Diese Zunahme ist bereits nach vier Stunden zu beobachten und nimmt auch bei einer Lagerung für längere Zeiträume nicht weiter zu. Das Experiment zeigt deutlich, dass eine Inkubation der Zellen bei 4 °C einen Stress darstellt, der zu einem Anstieg der nachweisbaren  $\gamma\text{H2AX}$  Foci führt, unabhängig von der Inkubationszeit. Dies bedeutet für sämtliche Bestrahlungsexperimente mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab, dass zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse die entsprechenden unbestrahlten Kontrollen ebenfalls für denselben Zeitraum bei 4 °C inkubiert werden müssen.

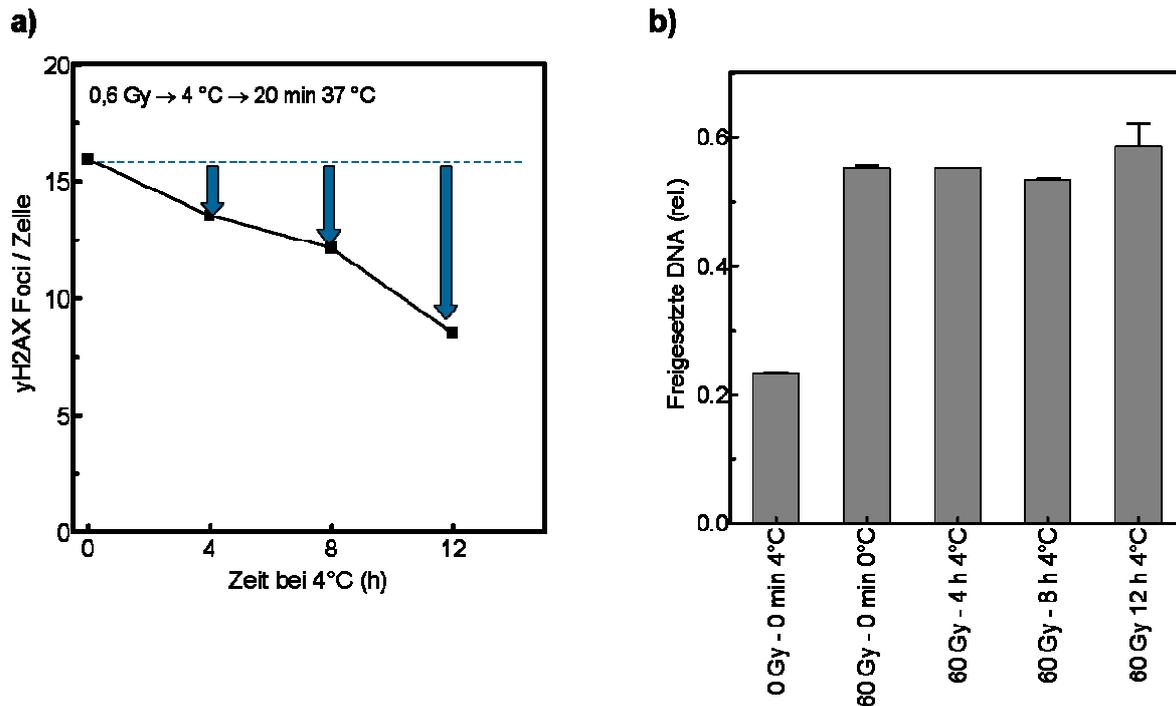
Es wurde zusätzlich untersucht, inwieweit eine 12 h Inkubation bei 4 °C einen Einfluss auf die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma\text{H2AX}$  Foci bestrahlter Zellen hat.

Hierzu wurden UT-SCC 14 Zellen mit Dosen von 0 Gy bis 0,6 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und vor dem Nachweis der  $\gamma\text{H2AX}$  Foci für 12 h bei 4 °C gelagert (Abbildung 19b). Die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma\text{H2AX}$  Foci nahm um den Faktor 0,5 ab. Ein Zusammenhang zwischen der Abnahme nachgewiesener Foci und der Dosis wurde nicht beobachtet.



**Abbildung 19: Einfluss der Temperatur auf den Nachweis von  $\gamma$ H2AX Foci.** a) Einfluss einer Lagerung bei 4 °C auf unbestrahlte Zellen. Unbestrahlte UT-SCC 14 Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 h bis 12 h) bei 4 °C gelagert und anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. b) Einfluss einer Lagerung bei 4 °C für 12 h auf mit unterschiedlicher Dosis bestrahlte Zellen. UT-SCC 14 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen bestrahlt (0 Gy bis 0,6 Gy) und im Anschluss für 0 h bzw. 12 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Werden hingegen mit einer konstanten Dosis von 0,6 Gy bestrahlte UT-SCC 14 Zellen, welche für unterschiedlich lange Zeiträume (0, 4, 8 und 12h) nach der Bestrahlung bei 4 °C gelagert wurden, untersucht, so lässt sich eine klare Zeitabhängigkeit erkennen (Abbildung 20a). So ist die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci nach einer vierstündigen Lagerung bei 4 °C im Vergleich zur ungekühlten Kontrolle um knapp 17 % reduziert. Nach einer 12 h Inkubation bei 4 °C sind sogar nur noch 50 % der  $\gamma$ H2AX Foci detektierbar. Dies steht im Gegensatz zur zeitunabhängigen Zunahme von  $\gamma$ H2AX Foci in unbestrahlten Zellen. Die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci sinkt also bei einer Kühlung der untersuchten Zellen. Diese Abnahme ist nicht dosisabhängig, aber abhängig von der Inkubationszeit bei 4 °C.



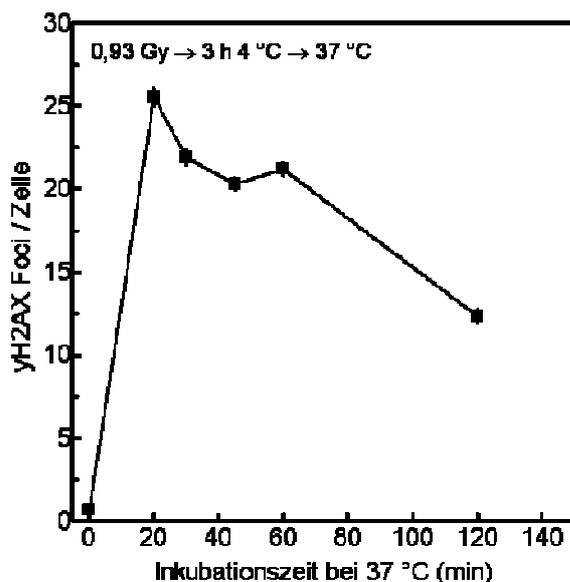
**Abbildung 20: Einfluss der Temperatur auf den Nachweis von  $\gamma$ H2AX in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.** a) Abnahme der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bei 4 °C. Mit 0,6 Gy bestrahlte UT-SCC 14 Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 h bis 12 h) bei 4 °C gelagert und anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. b) Direkter Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen durch eine Konstantfeldgelelektrophorese in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bei 4° C. UT-SCC 14 Zellen wurden mit 60 Gy bestrahlt und für verschieden lange Zeiträume (0 h bis 12 h) bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Fragmentierung der DNA in einer Konstantfeldgelelektrophorese nachgewiesen. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

Um zu untersuchen ob es sich bei diesem Phänomen um etwaige Reparaturereignisse handelt, welche entgegen der Erwartung bei 4 °C stattfinden können, wurde in UT-SCC 14 Zellen die Fragmentierung der DNA durch DNA-Doppelstrangbrüche direkt mit Hilfe der Konstantfeldgelelektrophorese nachgewiesen (siehe Abbildung 20b). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Fragmentierung der DNA durch Doppelstrangbrüche direkt in einer DNA-Gelelektrophorese und nicht indirekt durch die Färbung von Proteinmodifikationen während enzymatischer Reparaturprozesse nachgewiesen wird. Ein Nachteil ist jedoch, dass hohe Dosen notwendig sind, um mithilfe dieser Methode Doppelstrangbrüche nachzuweisen. Hierzu wurden die Zellen mit 0 Gy oder 60 Gy bestrahlt und entweder direkt lysiert oder vor der Lyse für verschieden lange Zeiträume (4, 8 und 12 h) bei 4 °C inkubiert. Es zeigt sich, dass durch die Bestrahlung mit 60 Gy die Fragmentierung der DNA

aufgrund der induzierten Doppelstrangbrüche von 0,22 auf 0,55 relative Einheiten steigt. Das Ausmaß der DNA Fragmentierung bleibt auch nach Kühlung bestrahlter Zellen für bis zu zwölf Stunden konstant. Es findet keine Reparatur statt. Der Rückgang von nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci während einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen lässt sich daher nicht durch Reparaturprozesse erklären.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Abnahme der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci in bestrahlten Zellen nach einer Inkubation bei 4 °C ist eine Störung der enzymatischen Prozesse, welche für die Phosphorylierung der Histone H2AX zuständig sind. Dadurch könnte sich das Maximum der  $\gamma$ H2AX Phosphorylierungskinetik zu späteren Zeitpunkten verschieben. Bei ungekühlten Zellen war das Maximum bereits nach 15 min bis 20 min zu beobachten.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde eine  $\gamma$ H2AX Phosphorylierungskinetik von UT-SCC 14 Zellen erstellt, welche nach einer Bestrahlung mit 0,93 Gy für 3 h bei 4 °C gelagert und anschließend für verschieden lange Zeiträume bei 37 °C inkubiert wurden (siehe Abbildung 21). Das Maximum der  $\gamma$ H2AX-Phosphorylierung von 25 Foci ist hierbei ebenfalls zum frühesten untersuchten Zeitpunkt von 20 min detektierbar, mit einer anschließenden, durch einsetzende Reparaturprozesse bedingten Abnahme auf 12  $\gamma$ H2AX Foci nach zwei Stunden. Eine Verschiebung der  $\gamma$ H2AX Phosphorylierungskinetik durch eine Lagerung bei 4 °C oder eine Störung der Dephosphorylierung findet demnach nicht statt. So konnten in ungekühlten Zellen nach 20 min 23  $\gamma$ H2AX Foci sowie nach 120 min 10 Foci nachgewiesen werden (vergl. Abbildung 18a).



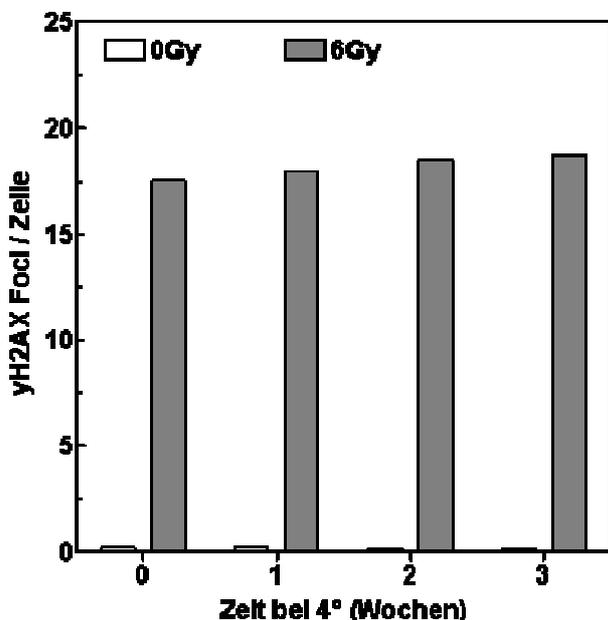
**Abbildung 21: Einfluss niedriger Temperaturen auf die  $\gamma$ H2AX Phosphorylierungskinetik von UT-SCC 14 Zellen.** Mit 0,93 Gy bestrahlte UT-SCC 14 Zellen wurden für 3 h bei 4 °C gelagert und anschließend für verschiedene lange Zeiträume (20 min bis 120 min) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Aufgrund der geringen Dosisleistung einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab stellt dies eine Limitation der Dosen dar, welche erreicht werden können, ohne dass die zu untersuchenden Zellen durch eine Lagerung bei 4 °C zu stark gestresst werden. Im Folgenden wurden die zu untersuchenden Zellen für maximal 3 h bei 4 °C gelagert, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch diesen Stressfaktor zu minimieren. Die Ursache für den Einfluss niedriger Temperaturen auf die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

### 6.2.3. Einfluss einer Lagerung von fixierten Zellen auf den immunologischen Nachweis von $\gamma$ H2AX Foci

Da die Proben im Anschluss an eine Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab vor der immunologischen Färbung aus Gründen des Strahlenschutzes im Kontrollbereich verbleiben müssen, wurde untersucht für welche Zeiträume die fixierten Zellen bei 4 °C gelagert werden können, ohne dass die Qualität der anschließenden Färbung abnimmt (siehe Abbildung 22). In Abhängigkeit der anfangs im Experiment eingesetzten Aktivitätsmenge können Lagerungen von bis zu zehn Halbwertszeiten notwendig werden. Im Falle von  $^{90}\text{Y}$  mit einer Halbwertszeit von 2,67 Tagen bedeutet dies einen Zeitraum von knapp vier Wochen. Bei einer Bestrahlung von FaDuDD Zellen mit 6 Gy Röntgen lassen sich nach 24 h ~ 17,5 DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen. Die Lagerung bei niedrigen Temperaturen beeinträchtigt innerhalb des

untersuchten Zeitraumes von bis zu drei Wochen nicht die Qualität der untersuchten Proben. Die mittlere Anzahl der detektierten  $\gamma$ H2AX Foci betrug  $\sim 18$ . Die Qualität der unbestrahlten Proben änderte sich ebenfalls nicht, die Anzahl der detektierbaren Brüche von unter einem blieb konstant.



**Abbildung 22: Einfluss der Lagerung von fixierten Zellen bei 4°C auf die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci.** FaDuDD Zellen wurden mit 0 Gy und 6 Gy bestrahlt und im Anschluss fixiert. Die fixierten Zellen wurden für bis zu 3 Wochen bei 4 °C gelagert und danach die  $\gamma$ H2AX Foci immunologisch nachgewiesen.

### 6.3. Charakterisierung des Antikörpers DTPA-Cetuximab

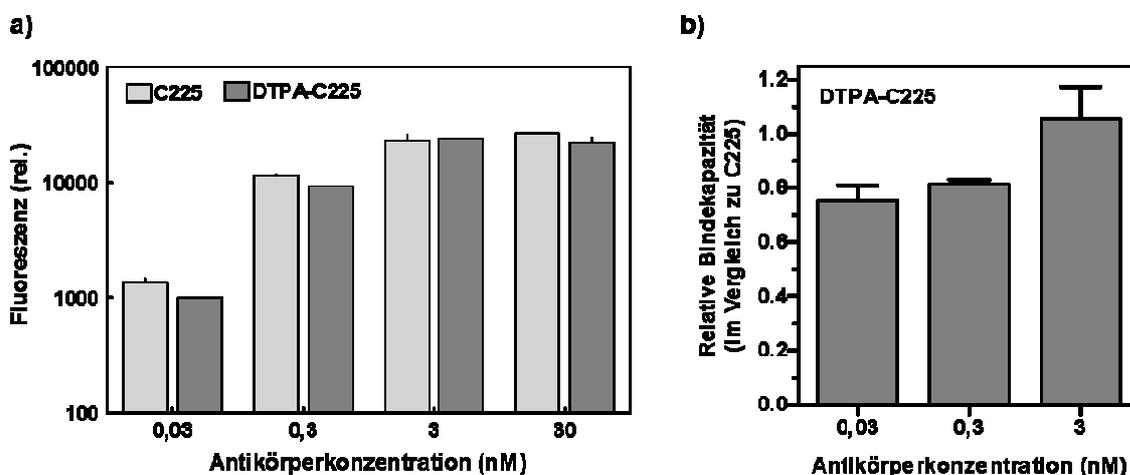
#### 6.3.1. Affinitätsveränderungen von Cetuximab durch die Kopplung des Chelators DTPA

Der Antikörper  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bindet auf der Oberfläche von EGFR exprimierenden Zellen an den Rezeptor, was zu einer Immobilisierung der Radioaktivität an den Zellen führt. Hierbei ist die Bindeaffinität des DTPA-Cetuximab nicht zwangsläufig identisch mit der des unmarkierten Antikörpers Cetuximab. Dies begründet sich darin, dass der Chelator Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) unspezifisch an Lysine des Antikörpers gekoppelt wird. Dies kann auch Aminosäuren von Bindungsdomänen der leichten Ketten des Antikörpers betreffen und so die Affinität eines DTPA-Cetuximab Gemisches herabsetzen. Um zu untersuchen ob durch die Kopplung des Chelators die Affinität des Antikörpers gegenüber dem EGF-Rezeptor herabgesetzt wird, ist die Bindekapazität der beiden Antikörper Cetuximab und DTPA-Cetuximab per FACS Analyse an der EGFR überexprimierenden Zelllinie

A431 untersucht worden. Hierzu wurden die beiden Konzentrationen von 0,03 nM und 0,3 nM, bei denen die Bindung von Cetuximab an die an der Oberfläche präsentierten EGFR Moleküle nicht abgesättigt ist, sowie die Konzentrationen von 3 nM und 30 nM, in denen die Bindung abgesättigt ist, untersucht (siehe Abbildung 23). Es wurde beobachtet, dass auch DTPA-Cetuximab in Konzentrationsbereichen von 0,03 bis 0,3 nM die Oberfläche der A431 Zellen nicht vollständig absättigt. Ab einer Konzentration von 3 nM jedoch tritt für beide Antikörper ein Sättigungseffekt ein. Das Fluoreszenzsignal lässt sich auch durch eine Inkubation mit höheren Antikörperkonzentrationen nicht mehr steigern (Abbildung 23a).

Grundsätzlich kommt es zu einem Affinitätsverlust von Cetuximab durch die Konjugation mit dem Chelator DTPA. Das Konstrukt DTPA-Cetuximab zeigte in diesem Experiment nur eine Bindekapazität von 75 - 80 % im Vergleich zu Cetuximab. Durch die unspezifische Bindung des Chelators an die Lysine des Antikörpers wird die Affinität also um ca. 23 % gesenkt.

Dieser Affinitätsverlust wirkt sich jedoch bei höheren Konzentrationen nicht aus. Liegt der Antikörper in Konzentrationen von mindestens 3 nM und damit im Überschuss vor, so wird die gleiche Signalstärke erreicht wie bei einer Inkubation mit Cetuximab allein. Dies liegt darin begründet, dass aufgrund der Vielzahl von zur Verfügung stehenden DTPA-Cetuximab Molekülen alle freien Bindestellen durch einen Antikörper besetzt werden können. Ein Affinitätsverlust lässt sich daher nur bei ungesättigten Konzentrationen beobachten (siehe Abbildung 23b). Da in den späteren Experimenten mit Konzentrationen von 30 nM gearbeitet wird, ist der Affinitätsverlust demnach irrelevant.

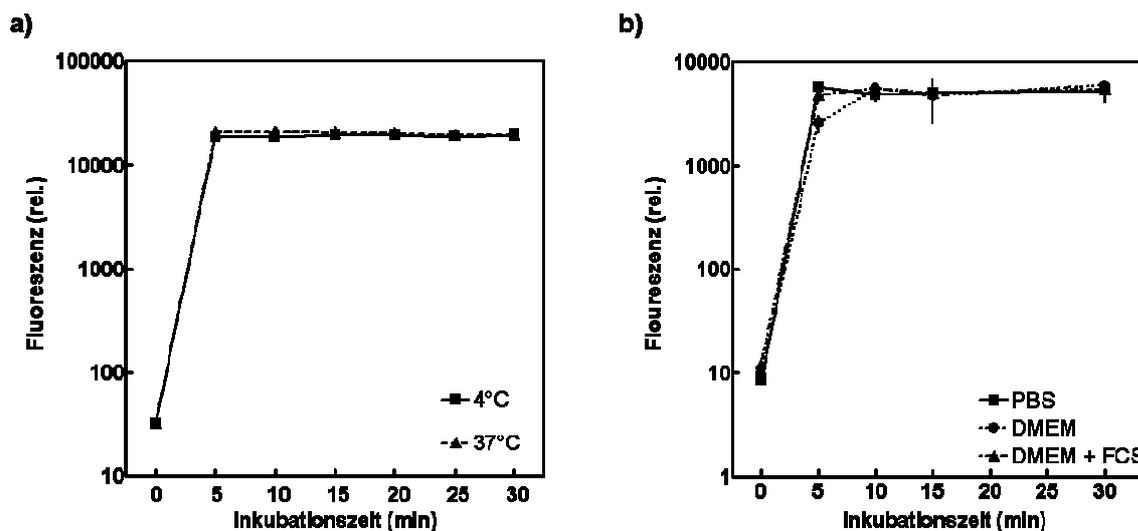


**Abbildung 23: Vergleich der Affinitäten von Cetuximab (C225) mit DTPA-Cetuximab (DTPA-C225) gegenüber EGFR. a) Die absolute Bindung der Antikörper C225 und DTPA-C225 an lebenden A431 Zellen. Es wurden biologische Duplikate mit jeweils 100.000 Zellen nach**

einer Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0,03 nM bis 30 nM) Cetuximab sowie DTPA-Cetuximab untersucht. Die Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) im FACS nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate. **b)** Die relative Affinität von DTPA-C225 im Vergleich zu C225. Die in a) dargestellten Bindungsintensitäten wurden miteinander verrechnet. Die Bindungskapazität von DTPA-Cetuximab wird relativ zur Cetuximabbindung dargestellt.

#### **6.3.2. Kinetik der Bindung von DTPA-Cetuximab an EGFR lebender Zellen in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen**

Bei Zellkulturexperimenten wird ein zu untersuchender Wirkstoff durch die Zugabe in das Kulturmedium appliziert. Durch die relativ hohe Reichweite der  $\beta$ -Strahlen von  $^{90}\text{Y}$  (bis zu 1 cm in Wasser) ist für eine Bestrahlung einer Zielzelle keine Bindung des Antikörpers an die EGF-Rezeptoren ihrer Oberfläche notwendig. Auch ein Zerfallsereignis, das in der Umgebung der Zielzelle stattfindet, kann zu einer Energiedeposition in der Zielzelle führen. Im Falle von Zellkulturexperimenten stellt dies jedoch ein Problem dar, da auch Antikörpermoleküle, welche sich im Überstand befinden, unabhängig von einer möglichen Bindung an die EGF-Rezeptoren des Monolayers, zu einer Bestrahlung der Zellen führen. Um die Abhängigkeit der Dosisdeposition von der EGFR Menge untersuchen zu können, ist es also von entscheidender Bedeutung den Inkubationszeitraum zur Bindung des Antikörpers an seine Epitope möglichst kurz zu gestalten und anschließend im Überstand befindliche ungebundene Antikörper zu entfernen. Über eine darauf folgende, entsprechend lang gestaltete Inkubationszeit zur Akkumulation der EGFR-spezifischen Dosis, kann sichergestellt werden, dass eine eventuelle Abhängigkeit der Dosis von der Antikörperbindung dargestellt werden kann.



**Abbildung 24: Kinetik der Bindung von DTPA-Cetuximab an lebenden Zellen unter verschiedenen Bedingungen.** a) Bindungskinetik in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur für 4 °C und 37 °C bei einer Inkubation in PBS. Für die Untersuchung wurden 100.000 lebende A431 Zellen ausgewertet. Die Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 min bis 30 min) mit DTPA-Cetuximab inkubiert. Die Messung erfolgte aus biologischen Duplikaten. Die DTPA-Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) im FACS nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. b) Bindungskinetik in Abhängigkeit des Inkubationsmediums bei 4 °C. Für die Untersuchung wurden 100.000 lebende A431 Zellen ausgewertet. Die Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 min bis 30 min) mit DTPA-Cetuximab inkubiert. Die Inkubation erfolgte in PBS, DMEM und DMEM + 10 % FCS. Die Messung erfolgte aus biologischen Duplikaten. Die DTPA-Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) im FACS nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate.

Zur Abschätzung der für eine Bindung des Antikörpers DTPA-Cetuximab aus dem Medium an die Zellen nötigen Inkubationszeiten, wurde die stark EGFR exprimierende Zelllinie A431 für verschiedene Zeiträume mit DTPA-Cetuximab inkubiert (siehe Abbildung 24) und die Intensität der Bindung per Flusszytometrie quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Affinität des Antikörpers Cetuximab zu seinem Epitop so hoch ist, dass die Oberfläche von lebenden A431 Zellen bereits nach einer fünfminütigen Inkubation mit 30 nM DTPA-Cetuximab abgesättigt ist. Eine weitere Steigerung des Fluoreszenzsignals durch längere Inkubationszeiten (bis 30 min) lässt sich nicht erzielen. Dabei spielt es aufgrund des hohen Überschusses an Antikörpern keine Rolle, ob die Reaktion bei 4 °C oder 37 °C stattfindet (Abbildung 24). In beiden Fällen ist die maximale Fluoreszenzintensität bereits zum frühesten untersuchten Zeitraum erreicht.

Des Weiteren wurde ein eventueller Einfluss von Bestandteilen des Mediums DMEM sowie von DMEM + 10 % FCS untersucht, da insbesondere Bestandteile des Serums als Liganden des EGFR mit den Antikörpern um eine Bindung konkurrieren könnten. Als Kontrolle diente PBS. Auch die eingesetzten Medien haben keinen Einfluss auf die Bindungskinetik. Sowohl bei einer Inkubation in PBS als auch in DMEM + 10 % FCS ist die Bindung nach einer Inkubationsdauer von 5 min abgesättigt. Bei einer Inkubation in DMEM wurde die Reaktion erst nach 10 min abgesättigt, jedoch konnte bereits nach 5 min 50 % der maximalen Bindung erzielt werden.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine Inkubationszeit von 5 min für die Bindung der Antikörper  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab und DTPA-Cetuximab an die EGFR der Oberfläche von zu untersuchenden Zellen bei einer Verwendung von DMEM Vollmedium ausreichend ist. Dies gilt auch dann, wenn das Experiment unter gekühlten Bedingungen stattfindet.

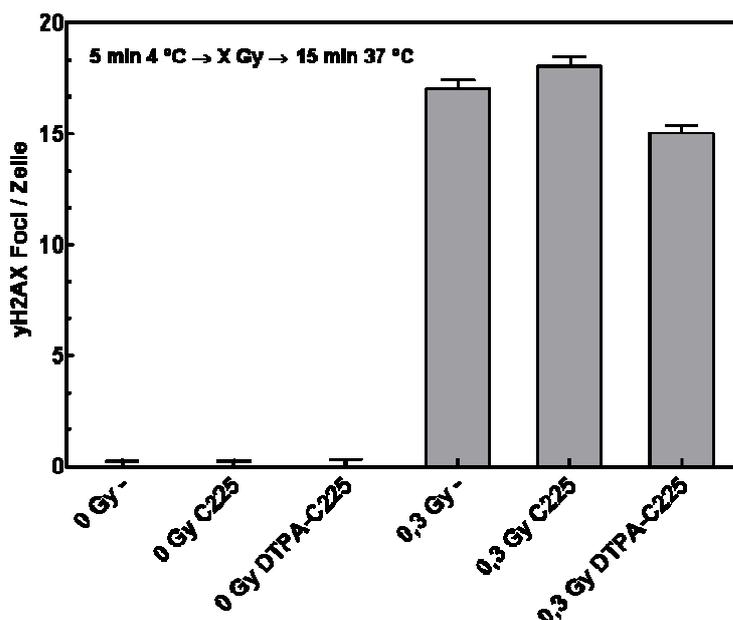
Eine Untersuchung kürzerer Zeitpunkte fand nicht statt, da zum Ausführen der relevanten Arbeitsschritte mindestens 5 min für die Inkubation des Antikörpers benötigt werden.

#### **6.3.3. Einfluss von DTPA-Cetuximab auf die Anzahl nachweisbarer DNA-Doppelstrangbrüche nach externer Bestrahlung**

Hauptziel der Arbeit zur Etablierung der neuartigen Therapiestrategie mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ist die Untersuchung der Wirksamkeit von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bezüglich der Induktion von DNA-DSB. Um einen möglichen Einfluss von Cetuximab und DTPA-Cetuximab auf die Doppelstrangbrucherzeugung abschätzen zu können, wurden die hoch EGFR exprimierenden Zellen UT-SCC 14 in einer Röntgenröhre extern bestrahlt und der Einfluss von Cetuximab oder DTPA-Cetuximab auf die Anzahl der nachweisbaren Doppelstrangbrüche untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C ohne und mit 30 nM Cetuximab bzw. DTPA-Cetuximab inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen mit jeweils 0 Gy und 0,3 Gy bestrahlt. Im Anschluss wurden ungebundene Antikörper aus dem Kulturgefäß gewaschen und die Zellen für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche über  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Foci quantifiziert (Abbildung 25).

In den unbehandelten Zellen führte die Bestrahlung mit 0,3 Gy zu einer Induktion von 16,6 initialen Doppelstrangbrüchen. Nach einer Inkubation mit Cetuximab nahm

die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche um 1,6 auf 18,2 zu. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant. Nach einer Inkubation mit DTPA-Cetuximab nimmt die Anzahl der Brüche um 1,6 auf 15 ab. Aufgrund der Schwankungen zwischen den mit Cetuximab und DTPA-Cetuximab behandelten Proben und der nicht vorhandenen Signifikanz der Abweichungen, können diese Änderungen als vernachlässigbar gewertet werden. Dies zeigt, dass weder Cetuximab noch DTPA-Cetuximab einen Einfluss auf die Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen haben.



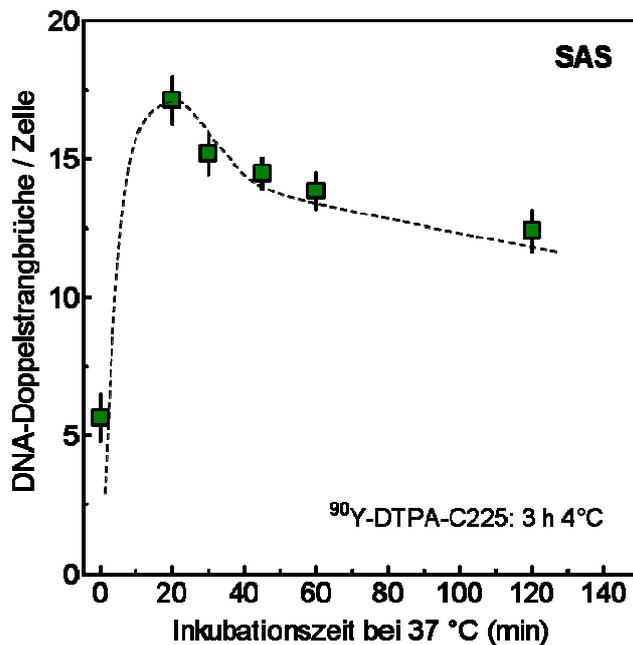
**Abbildung 25: Effekt von Cetuximab (C225) und DTPA-Cetuximab (DTPA-C225) auf die Anzahl erzeugter Doppelstrangbrüche.** UT-SCC 14 Zellen wurden mit und ohne 30 nM C225 sowie DTPA-C225 für 5 min auf Eis inkubiert und dabei mit 0,3 Gy bestrahlt. Anschließend wurden ungebundene Antikörper mit Medium ausgewaschen, die Zellen für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend fixiert. Die induzierten  $\gamma$ H2AX Foci wurden immunologisch angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.

## 6.4. Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab

### 6.4.1. Kinetik von durch $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüchen

In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich 20 min nach einer Schadensinduktion durch Röntgenstrahlung ein Maximum an  $\gamma$ H2AX Foci mit einer anschließenden Abnahme der Doppelstrangbrüche nachweisen lässt (vergl. Abbildung 18). Dies lässt sich durch die dynamischen Prozesse von Schadenserkennung und Reparatur erklären. Um abschätzen zu können, ob diese

Kinetik im Falle einer Schadensinduktion durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab verändert und damit das Maximum der nachweisbaren  $\gamma\text{H2AX}$  Foci zu einem anderen Zeitpunkt detektierbar ist, wurden SAS Zellen für 5 min mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bei 4 °C inkubiert. Danach wurden ungebundene Antikörper mit Medium abgewaschen und die Zellen für 3 h bei 4 °C zur Schadensakkumulation inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für verschieden lange Zeiträume bei 37 °C inkubiert, fixiert und die Anzahl der als  $\gamma\text{H2AX} / 53\text{Bp1}$  Foci nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüche quantifiziert (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: Kinetik der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche.** SAS Zellen wurden 3h bei 4 °C mit DTPA-Cetuximab (Startwert) beziehungsweise  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab (andere Zeitpunkte) inkubiert und anschließend für verschieden lange Zeiträume bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und  $\gamma\text{H2AX}$  als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.

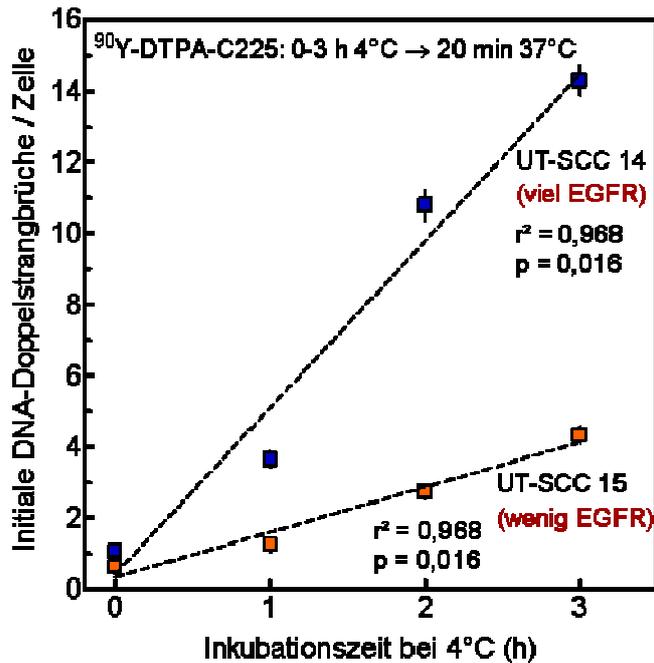
Das Maximum der via  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Doppelfärbung nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüche liegt beim frühesten untersuchten Zeitpunkt von 20 min. Es konnten nach einer dreistündigen Inkubation maximal 17 Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden. Eine Verschiebung der Kinetik durch den Einsatz von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab im Vergleich zu durch Röntgenstrahlen erzeugter Schäden findet demnach nicht statt. Nach einer zweistündigen Reparaturzeit konnten die Zellen bereits knapp 30 % der Schäden beseitigen. Die Erkennung von durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten Schäden durch die Reparaturmechanismen der Zellen unterscheidet sich also nicht von der durch Röntgenstrahlen erzeugter

Schäden. Um die Anzahl der durch das Isotop  $^{90}\text{Y}$  erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche zu quantifizieren, ist demnach ebenfalls eine 20 minütige Inkubationszeit geeignet.

##### 6.4.2. Abhängigkeit erzeugter DNA-Doppelstrangbrüche von der Inkubationsdauer

Bei gleich bleibender Anzahl von an die Zielzellen gebundener Moleküle  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab sollte bei einer Schadensakkumulation bei 4 °C die Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche abhängig von der Inkubationszeit sein. Um dies zu untersuchen, wurden die stark EGFR exprimierende Zelllinie UT-SCC 14 sowie die niedrig EGFR exprimierende Zelllinie UT-SCC 15 mit 30 nM  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab für verschiedene Zeiträume von 0 bis 3 h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss folgte eine 20 minütige Inkubation bei 37 °C und die Quantifizierung der nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüche via  $\gamma\text{H2AX}$  / 53Bp1 Färbung (siehe Abbildung 27). Es konnte für beide Zelllinien ein linearer Anstieg der erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche mit steigender Inkubationszeit festgestellt werden. Die Anzahl der erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche lag in der stark EGFR exprimierenden Zelllinie UT-SCC 14 mit 3,9 DNA-Doppelstrangbrüchen pro Stunde stets höher als in der niedrig EGFR exprimierenden Zelllinie UT-SCC 15, welche im Mittel nur 1 DNA-Doppelstrangbruch pro Stunde erhielten. Der lineare Zusammenhang von Inkubationszeit und Anzahl der induzierten Schäden ist sowohl für die Zelllinie UT-SCC 14 ( $r^2 = 0,968$ ;  $p = 0,016$ ) als auch für UT-SCC 15 ( $r^2 = 0,968$ ;  $p = 0,016$ ) signifikant. Es besteht also ein linearer Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit und der Anzahl erzeugter DNA-Doppelstrangbrüche, sofern die Reparaturmechanismen durch eine entsprechende Kühlung unterdrückt werden.

Darüber hinaus impliziert dieses Experiment einen Zusammenhang zwischen der EGFR Expression einer Zelle und der Anzahl von durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche.

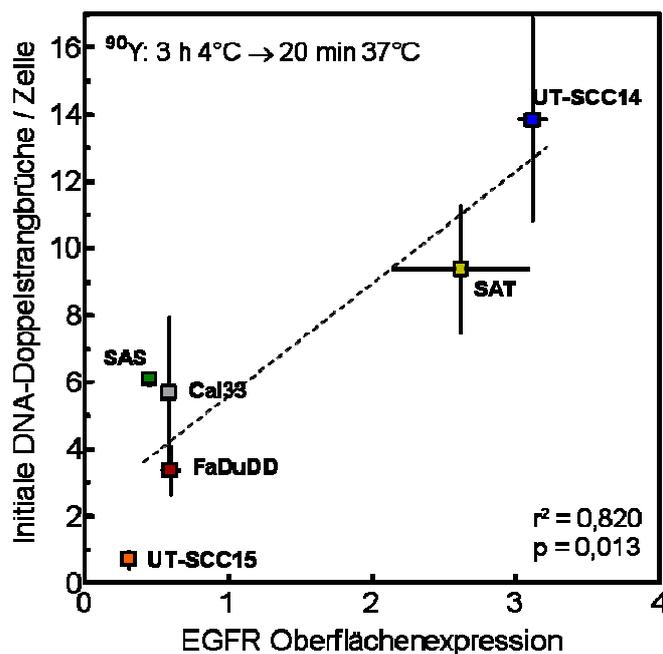


**Abbildung 27: Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.** UT-SCC 14 und UT-SCC 15 Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume bei 4 °C mit 30 nM  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inkubiert. Anschließend wurde durch eine Inkubation bei 37°C für 20 min eine Erkennung und Markierung der DNA-Schäden ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma\text{H2AX}$  als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.

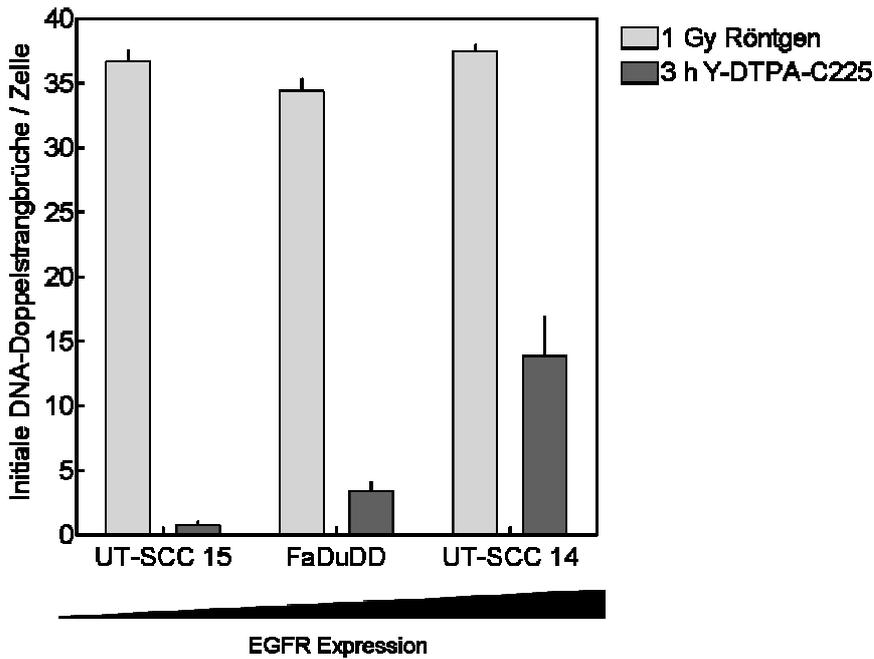
#### 6.4.3. Anzahl der durch $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit von der EGFR Expression der Zielzellen

Grundlegendes Konzept des hier untersuchten radioimmunologischen Ansatzes ist die gezielte Schädigung von Zellen in Abhängigkeit ihrer EGFR Expression. Da der EGFR die Bindungsstellen des  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab darstellt, sollte die applizierte Dosis daher durch die EGFR Expression bestimmt werden. Zur Verifizierung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen der EGFR Expression und der Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche wurden sechs verschiedene Kopf- / Halstumorzelllinien auf die in drei Stunden durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche untersucht (siehe Abbildung 28). Um Reparaturprozesse zu unterbinden wurden die Zellen während der Schadensakkumulation bei 4 °C gelagert. Es konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der EGFR Expression der behandelten Zellen sowie der Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche gibt ( $r^2 = 0,820$ ,  $p = 0,013$ ). So zeigten die Zelllinien UT-SCC 14 und SAT, welche sich durch eine hohe EGFR Expression auszeichnen, auch die stärkste DNA-Schädigung. In der Zelllinie

UT-SCC 15 hingegen, deren EGFR Expression ausgesprochen niedrig ist, wird die geringste Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen nachgewiesen. Die Zelllinien SAT, FaDuDD und Cal33, jeweils mit mittlerer EGFR Expression, erhalten ebenfalls nur eine moderate DNA-Schädigung. Das Spektrum der induzierten Schäden reicht von 13,8 Doppelstrangbrüchen im Falle der UT-SCC 14 bis zu 0,7 DNA-Doppelstrangbrüchen für UT-SCC 15 Zellen.



**Abbildung 28: Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der EGFR-Expression.** Sechs Kopf- Halstumorzelllinien wurden für verschieden lange Zeiträume mit 30 nM DTPA-Cetuximab bzw.  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bei gleichzeitiger Unterdrückung der Reparatur durch eine Lagerung bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde durch eine Inkubation bei 37°C für 20 min eine Erkennung und Markierung der DNA-Schäden ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma\text{H2AX}$  als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.



**Abbildung 29: Vergleich der durch 1 Gy Röntgenstrahlung und 3 h  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche.** Die nach einer Bestrahlung mit 1 Gy nachgewiesenen initialen Doppelstrangbrüche (vergl. Abbildung 18) im Vergleich zu durch eine 3 h Inkubation mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bei 4 °C induzierten Brüchen (vergl. Abbildung 28). Die Zellen wurden in beiden Experimenten nach der Schadensinduktion für 20 min bei 37 °C gelagert. Die DNA Doppelstrangbrüche wurden durch eine  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.

Um einen Anhaltspunkt über das Ausmaß der Schädigung nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab zu erhalten, hilft es die Anzahl der während einer 3 stündigen Behandlung induzierten Brüchen mit der Anzahl der durch 1 Gy Röntgenstrahlung induzierten Brüchen zu vergleichen (Abbildung 29). Die Anzahl der durch Röntgenstrahlen induzierten Brüchen ist zelllinienunabhängig und liegt im Mittel bei 36,1 Doppelstrangbrüchen pro Zelle. Die Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten Doppelstrangbrüche ist abhängig von der EGFR Expression und liegt im Falle der niedrig EGFR-exprimierenden Zelllinie UT-SCC 15 bei 0,7, im Falle der moderat EGFR überexprimierenden Zelllinie FaDuDD bei 3,4 und im Falle der stark EGFR überexprimierenden Zelllinie UT-SCC 14 bei 13,8 DNA-Doppelstrangbrüchen pro Zelle. Die Dosisäquivalente einer dreistündigen Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab sind demnach 19 mGy für UT-SCC 15, 94 mGy für eine Behandlung von FaDuDD und 382 mGy im Falle der UT-SCC 14.

Diese Betrachtung von bei 4 °C inkubierten Zellen lässt die Reparaturmechanismen außer Acht. Hierbei werden nur initiale Doppelstrangbrüche

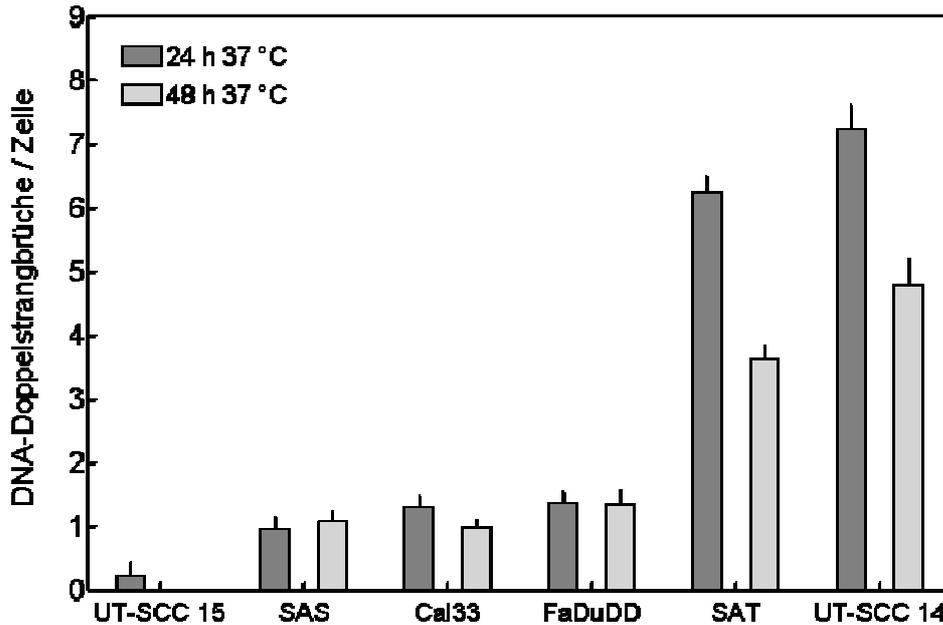
betrachtet. Daher spiegelt dies nicht zwangsläufig das Schädigungspotenzial von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wieder.

### **6.4.4. Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab unter Berücksichtigung von Reparaturprozessen.**

In den bisherigen Experimenten wurde die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ermittelt. Hierzu wurden die Zellen stets bei niedrigen Temperaturen mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inkubiert, um DNA Reparaturmechanismen zu unterdrücken und eine Akkumulation der Schäden zu ermöglichen. Die Anzahl der initial durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche spiegelt aber nicht zwangsläufig das reale Schädigungspotential der Behandlung wieder. Durch die Lagerung bei niedrigen Temperaturen werden individuelle Reparaturkapazitäten der Zelllinien nicht berücksichtigt.

Diese können jedoch durchaus einen Einfluss auf das Schädigungspotenzial von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab haben. Es ist also notwendig, das Schädigungspotenzial bei gleichzeitig stattfindender DNA-Reparatur zu bestimmen, um das zellinaktivierende Potenzial von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab einschätzen zu können.

Dies kann durch eine Inkubation bei 37 °C erreicht werden. Während der Inkubation stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Erzeugung und Reparatur von DNA-Schäden ein. Mit steigender Inkubationsdauer nimmt die Erzeugung von neuen DNA-Schäden durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ab, da das Isotop  $^{90}\text{Y}$  nur eine Halbwertszeit von 2,67 Tagen besitzt. Um das Schädigungspotenzial unter diesen Bedingungen zu untersuchen, wurden sechs Kopf- / Halstumorzellen mit unterschiedlicher EGFR Expression mit dem radioaktiv markierten Antikörper behandelt und für 24 h sowie 48 h bei 37 °C inkubiert (siehe Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche bei gleichzeitig stattfindender DNA-Reparatur. Die Zellen wurden sowohl mit 30 nM DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die Zellen wurden nach der Bindung der Antikörper für 24 h bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma\text{H2AX}$  als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.

Die Anzahl der durch DTPA-Cetuximab erzeugten Doppelstrangbrüche lag mit 0,6 bis 0,8 Brüchen pro Zelle für beide Behandlungszeiträume auf dem Niveau un behandelter Zellen.

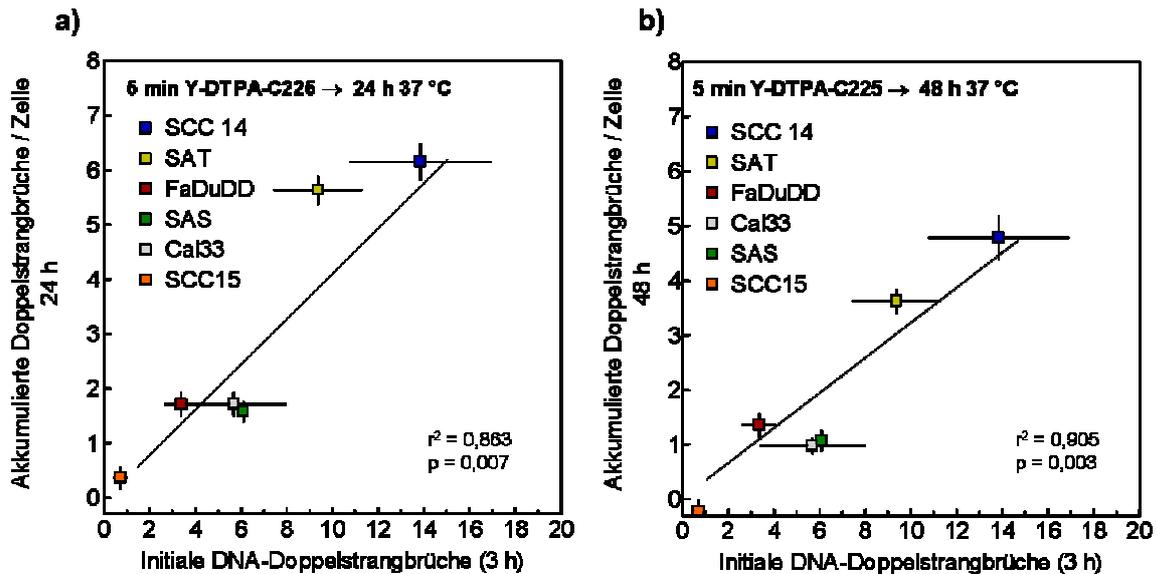
Die Anzahl der nachweisbaren Brüche war in den für 24 h mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelten Zellen in der Regel höher als in den für 48 h behandelten Zellen. Dies lässt sich durch Reparaturereignisse sowie die durch den Zerfall des Yttriums abnehmende Neuschädigung erklären. Die einzige Ausnahme waren hierbei die Zelllinien SAS und FaDuDD.

Nach 24 h lassen sich in der stark EGFR überexprimierenden Zelllinie UT-SCC 14 7,2 DNA-Doppelstrangbrüche, in der niedrig EGFR exprimierenden Zelllinie UT-SCC 15 nur 0,4 DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen.

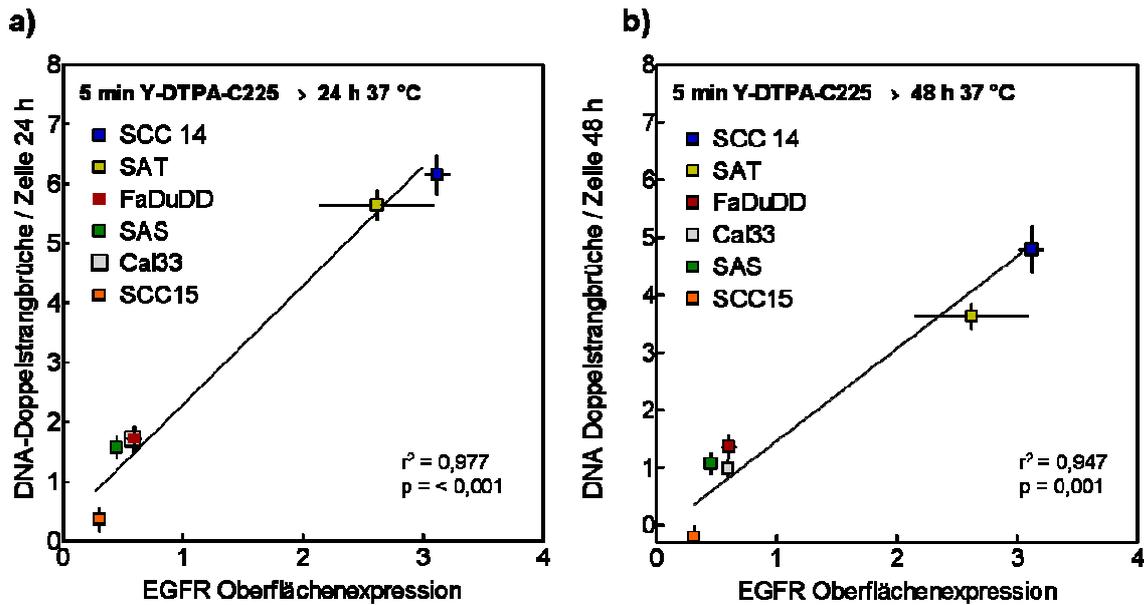
Nach 48 h ist das Niveau der detektierbaren DNA-Doppelstrangbrüche aufgrund der fortschreitenden Reparatur deutlich verringert. Die Zelllinie UT-SCC 14 weist noch 4,8 Brüche auf. In der schwach EGFR exprimierenden Zelllinie UT-SCC 15 lassen sich hingegen keine Doppelstrangbrüche mehr nachweisen (der gemessene

Wert lag aufgrund des Abgleiches auf mit DTPA-Cetuximab behandelten Proben bei 0 Brüchen pro Zelle).

Trotz des Einflusses der zellulären Reparaturkapazitäten auf die Anzahl der nach 24 h und 48 h verbleibenden DNA-Doppelstrangbrüche lässt sich eine signifikante Abhängigkeit der nach 24 h ( $r^2 = 0,863$ ;  $p = 0,007$ ) und 48 h ( $r^2 = 0,905$ ;  $p = 0,003$ ) nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüche von der Anzahl initial induzierter Brüche beobachten (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der Anzahl initial erzeugter DNA-Doppelstrangbrüche. Die Anzahl der durch eine a) 24 h bzw. b) 48 h Inkubation bei 37 °C akkumulierten DNA-Brüche (vergl. Abbildung 30) wurden mit den während einer 3 h Inkubation bei 4 °C erzeugten Schäden (vergl. Abbildung 28) verglichen. Die Zellen wurden sowohl mit 30 nM DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die DNA Schäden wurden durch eine  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.



**Abbildung 32: Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der EGFR Oberflächenexpression.** Die Anzahl der durch eine a) 24 h bzw. b) 48 h Inkubation bei 37 °C akkumulierten DNA-Brüche (vergl. Abbildung 30) wurden mit der flusszytometrisch bestimmten EGFR Oberflächenexpression (vergl. Abbildung 16) verglichen. Die Zellen wurden sowohl mit 30 nM DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die DNA Schäden wurden durch eine  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.

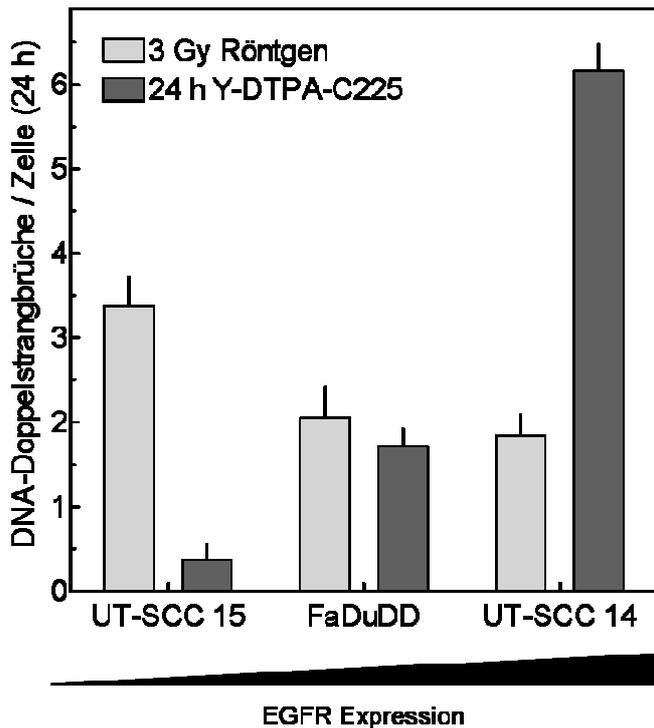
Da das Konzept dieser Therapie eine gezielte Schädigung von EGFR überexprimierenden Zellen bei Schonung von niedrig EGFR exprimierenden Zellen vorsieht, ist der wichtigste Parameter hierfür der Einfluss der EGFR Oberflächenexpression auf die Anzahl der durch eine Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche. Wie beschrieben, konnte bereits eine Abhängigkeit der initialen Doppelstrangbrüche von der EGFR Oberflächenexpression gezeigt werden (vergl. Abbildung 28). Dieser Zusammenhang besteht auch für die über längere Zeiträume von 24 h und 48 h, bei gleichzeitig stattfindender DNA-Reparatur, akkumulierten Schäden. Sowohl nach 24 stündiger ( $r^2 = 0,977$ ;  $p < 0,001$ ) als auch nach 48 stündiger ( $r^2 = 0,947$ ,  $p = 0,001$ ) Inkubation bei 37 °C ist dieser Zusammenhang hoch signifikant (siehe Abbildung 32).

Das Ausmaß der Schädigung durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab kann eingeschätzt werden, indem die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche mit durch Röntgenstrahlen induzierten Brüchen verglichen wird (siehe Abbildung 33). Da Röntgenstrahlung die DNA EGFR unabhängig schädigt, stellt dies eine Vergleichsgröße dar.

Die Anzahl der 24 h nach einer Bestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlen nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüche zeigt keine Abhängigkeit von der EGFR Expression. Die Anzahl der durch eine 24 h Behandlung mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab zeigt hingegen eine deutliche Abhängigkeit von der EGFR Expression.

In der niedrig EGFR exprimierenden Zelllinie UT-SCC 15 lassen sich 24 h nach einer Bestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlen noch 3,4 DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen. Dies ist von den drei hier verglichenen Zelllinien der höchste Wert. Sie besitzt also die niedrigste Reparaturkapazität. Dennoch hat sie aufgrund ihrer niedrigen EGFR Expression mit 0,4 Brüchen die geringste Schädigung nach einer 24 stündigen Behandlung mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab. Die Zelllinie FaDuDD zeigt mit 2 DNA-Doppelstrangbrüchen 24 h nach 3 Gy eine mittlere Reparaturkapazität. Aufgrund ihrer moderaten Überexpression wurden über den Behandlungszeitraum von 24 h 1,7 Brüchen induziert. Die beiden Werte sind nicht signifikant unterschiedlich. Die Zelllinie UT-SCC 14 hat die im Vergleich beste Reparaturkapazität. 24 h nach einer Bestrahlung mit 3 Gy lassen sich noch 1,8 DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen. Aufgrund der starken EGFR Überexpression erfährt diese Zelllinie jedoch bei einer Behandlung mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab die im Vergleich stärkste Schädigung. 24 h nach Behandlungsbeginn lassen sich 6,1 Brüchen nachweisen.

Die Dosisäquivalente einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung im Vergleich zu einer Behandlung mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab für 24 h zeigen daher eine starke Abhängigkeit von der EGFR Expression. Für die niedrig EGFR exprimierende Zelllinie UT-SCC 15 betrug es lediglich 0,3 Gy. Das Dosisäquivalent der Zelllinie FaDuDD betrug aufgrund der moderaten EGFR Überexpression 2,5 Gy und liegt damit deutlich höher. Die höchste Dosis konnte in der hoch EGFR überexprimierenden Zelllinie UT-SCC 14 deponiert werden. Die nachgewiesenen Schäden entsprechen hier einer Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlen.



**Abbildung 33:** Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche 24 h nach einer einmaligen Bestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlen sowie einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab für 24 h. Die Zellen wurden entweder mit 3 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt oder mit 30 nM DTPA-Cetuximab sowie mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma\text{H2AX}$  als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.

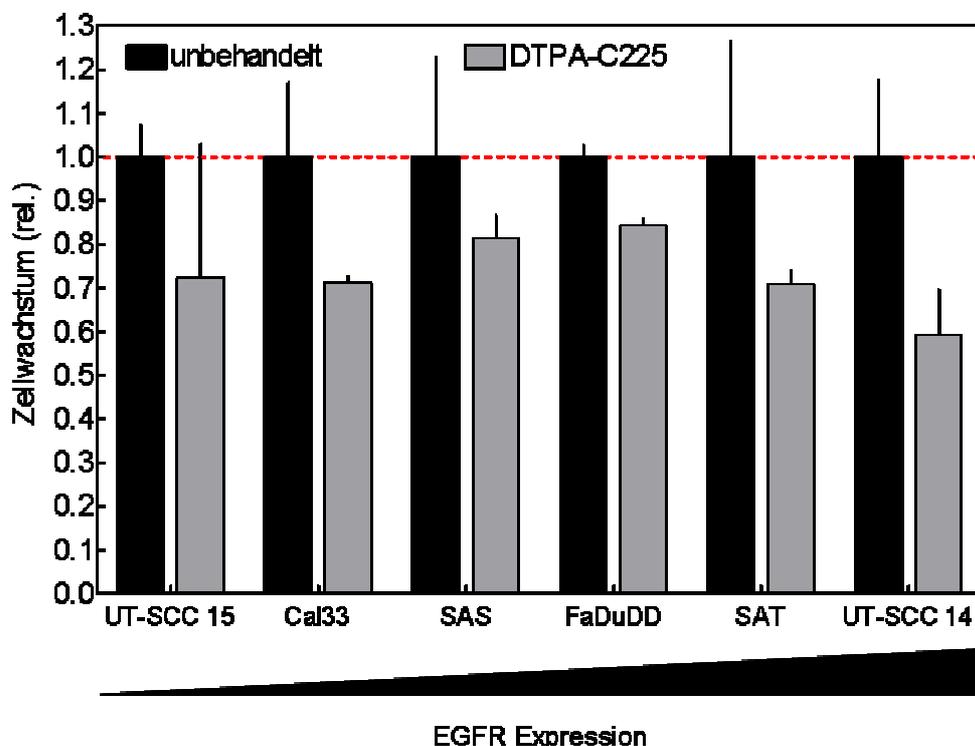
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Ausmaß der DNA-Schädigung durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab trotz anderer Einflussfaktoren, wie zum Beispiel Reparaturprozessen, vor allem durch die EGFR Expression der Zielzelle bestimmt ist. Dies ist der dosisbestimmende Faktor. Individuelle Reparaturkapazitäten spielen keine Rolle, da die Anzahl der induzierten Schäden der dominierende Parameter ist. Aufgrund der Halbwertszeit von  $^{90}\text{Y}$  (2,6 Tage) nimmt die applizierte Dosis zwar mit der Zeit ab, nach Zeitpunkten von bis 48 h nach Gabe der markierten Antikörper hat dies allerdings noch keinen Einfluss auf die EGFR Abhängigkeit der DNA-Schädigung.

## 6.5. Einfluss von $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab auf das Zellüberleben

Ziel einer Therapie von Tumoren mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ist die Schädigung von Tumorzellen, welche sich durch eine hohe EGFR Expression auszeichnen, bei

gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes. Dies wird jedoch nur möglich sein, wenn sich die Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Schäden auf das Zellüberleben auswirkt. Endpunkt ist hierbei die Inaktivierung der Tumorzellen. Für einen Therapieerfolg sollte das Ausmaß der Zellinaktivierung von der EGFR Expression abhängen.

In dem zur Beantwortung der Fragestellung ausgewähltem Versuchslayout (vergl. Kapitel 5.1.3) wirkt sich neben einer Inaktivierung der Zellen auch eine verlangsamte Proliferation auf das Ergebnis aus. Um den wachstumsverzögernden Effekt von DTPA-Cetuximab gegenüber unbehandelten Zellen abschätzen zu können, wurden die sechs Zelllinien mit DTPA-Cetuximab behandelt und in einem Proliferationstest mit unbehandelten Zellen verglichen (siehe Abbildung 34).

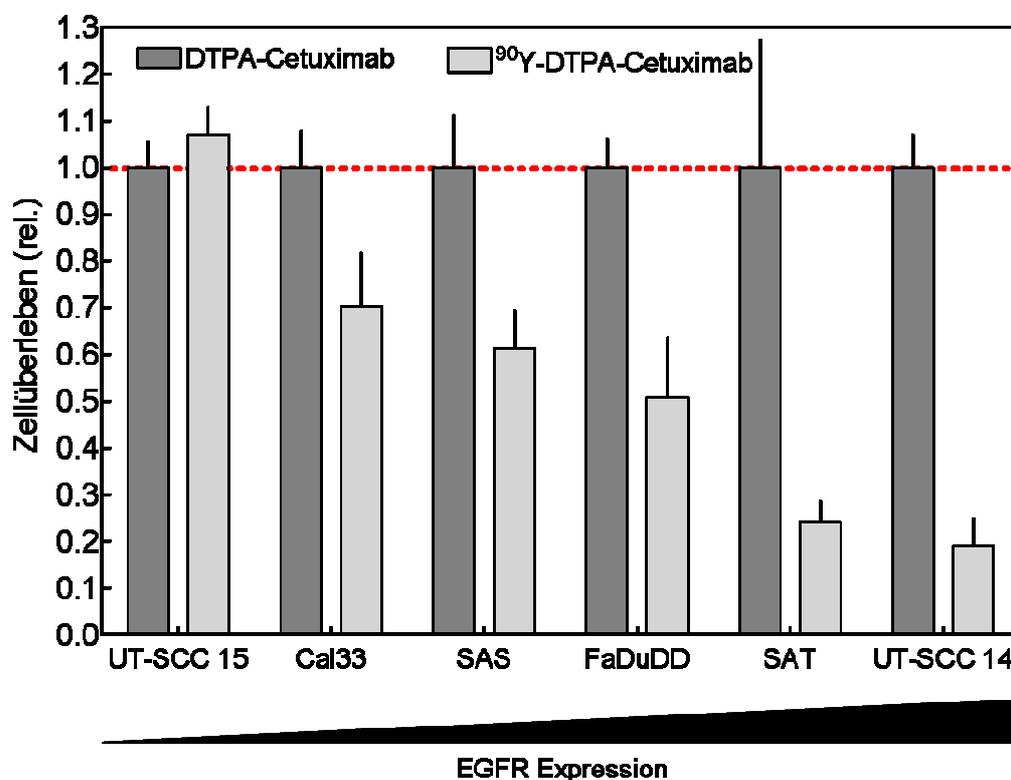


**Abbildung 34: Wachstumsverzögerung durch Behandlung mit DTPA-Cetuximab.** Die Wachstumsverzögerung durch DTPA-Cetuximab gegenüber unbehandelten Zellen wurde über einen Proliferationsassay bestimmt. Hierfür wurden die Zellen analog zu einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inkubiert. Nach dem Mediumswechsel bzw. der Behandlung mit DTPA-Cetuximab wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C inkubiert, anschließend abtrypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Die Werte der mit DTPA-Cetuximab behandelten Zellen wurden auf die unbehandelten Proben abgeglichen.

Eine Inkubation der Zellen mit DTPA-Cetuximab bewirkte im Vergleich zu den unbehandelten Proben ein verlangsamtes Wachstum der Zellen. Die Wachstumsverzögerung der sechs Kopf- / Halstumorzelllinien zeigte keine

Korrelation mit der EGFR Expression und war in allen Zelllinien nicht signifikant unterschiedlich. Sie lag im Mittel bei 26,9 %. Die stärkste Wachstumsverzögerung zeigte die Zelllinie UT-SCC 14 mit 41 %, die geringste die Zelllinie FaDuDD mit 15,8 %.

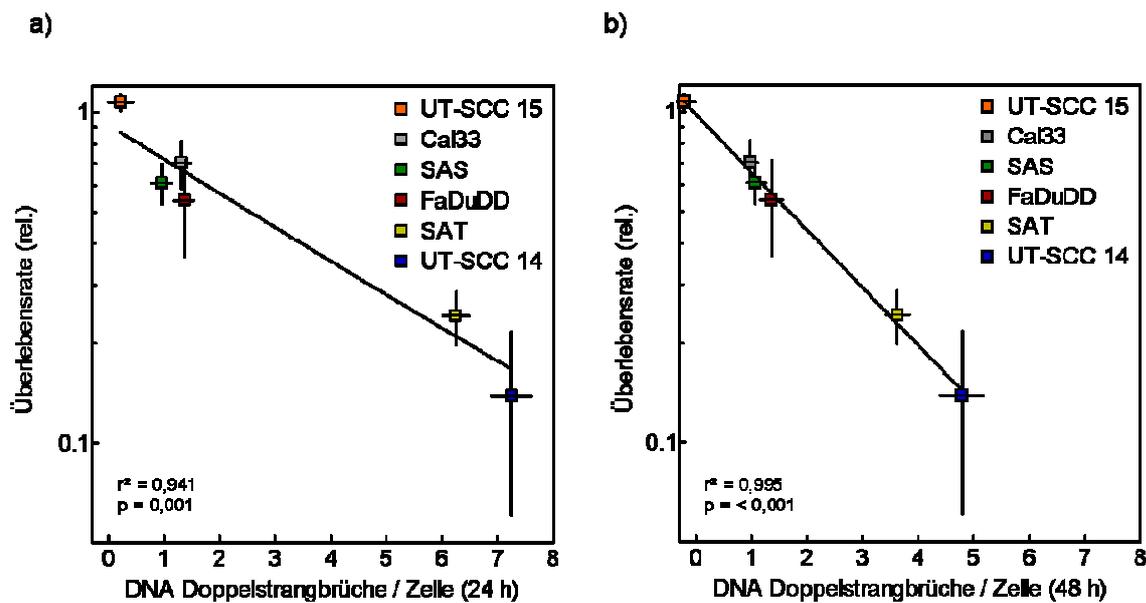
Zur Überprüfung des Einflusses von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab auf die Vitalität und eine eventuelle Inaktivierung der Zellen wurden die sechs Kopf- / Halstumorzelllinien 48 h mit DTPA-Cetuximab oder  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt und danach ein Teil dieser Zellen für einen Kolonietest erneut ausgesät. Die Anzahl der anwachsenden und lebensfähigen Zellen bzw. die Zahl der daraus entstehenden Kolonien gibt eine Auskunft über eventuell stattfindende Wachstumsverzögerungen und über eine mögliche Inaktivierung der Tumorzellen.



**Abbildung 35: Zellinaktivierung durch eine Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab.** Die Zelllinien wurden nach der Behandlung mit 30 nM DTPA-Cetuximab bzw.  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für einen Kolonietest ausgesät. Die Anzahl der Kolonien nach Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurde auf die Anzahl der nach einer Behandlung mit DTPA-Cetuximab angewachsenen Kolonien abgeglichen. Die Werte der mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelten Zellen wurden auf die mit DTPA-Cetuximab behandelten Proben abgeglichen. Die Messung erfolgte in Duplikaten.

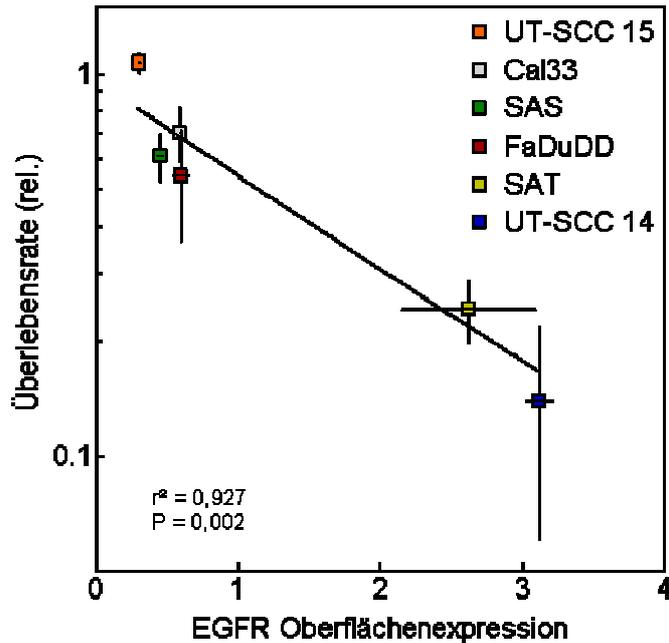
Die gebildeten Kolonien unterschieden sich zwischen den mit DTPA-Cetuximab und  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab nicht in Form und Größe. Der zellinaktivierende Effekt von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab im Vergleich zu den mit DTPA-Cetuximab behandelten Zellen

zeigt eine starke Abhängigkeit von der EGFR-Expression (siehe Abbildung 35). Keine signifikante Veränderung zeigte die schwach EGFR exprimierende Zelllinie UT-SCC 15. Die Anzahl nachgewiesener Kolonien betrug im Vergleich das 1,06 fache. Die moderat EGFR überexprimierenden Zelllinien Cal33, SAS und FaDuDD zeigen eine Reduktion der Zellviabilität von 47 % bis 30 %. Die stark EGFR überexprimierenden Zelllinien UT-SCC 14 und SAT zeigten mit einer Abnahme des Überlebens von 87 % und 76 % die stärkste Inaktivierung.



**Abbildung 36: Zellüberleben nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit der akkumulierten DNA-Doppelstrangbrüche.** Das Zellüberleben verschiedener Zelllinien (vergl. Abbildung 35) wurde mit der Anzahl der nach a) 24 h bzw. b) 48 h Inkubation bei 37 °C akkumulierten DNA-Brüche (vergl. Abbildung 30) korreliert. Die Zellen wurden sowohl mit DTPA-Cetuximab bzw. mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die Anzahl der Kolonien nach Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurde auf die Anzahl der nach einer Behandlung mit DTPA-Cetuximab angewachsenen Kolonien abgeglichen. Die DNA Schäden wurden durch eine  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert.

Das Zellüberleben wird dabei maßgeblich durch die Anzahl der akkumulierten DNA-Doppelstrangbrüche bestimmt (siehe Abbildung 36). Die Anzahl der nach 48 h akkumulierten DNA-Doppelstrangbrüche korreliert dabei besser ( $r^2 = 0,941$ ;  $p = 0,001$ ) mit dem Zellüberleben als die der nach 24 h akkumulierten DNA-Doppelstrangbrüche ( $r^2 = 0,995$ ;  $p < 0,001$ ). Dies lässt sich insofern erklären, als dass die Zellen nach einer 48 stündigen Behandlung für den Kolonietest ausgesät wurden. Die bis zu diesem Zeitpunkt angesammelten Doppelstrangbrüche stellen für die Zellen letale Schäden dar.



**Abbildung 37: Zellüberleben nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit der EGFR Oberflächenexpression.** Das Zellüberleben verschiedener Zelllinien (vergl. **Abbildung 35**) wurde mit der flusszytometrisch bestimmten EGFR Oberflächenexpression (vergl. **Abbildung 16**) korreliert. Die Zellen wurden sowohl mit DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die Anzahl der Kolonien nach Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurde auf die Anzahl der nach einer Behandlung mit DTPA-Cetuximab angewachsenen Kolonien abgeglichen.

Der entscheidende Endpunkt für den hier untersuchten therapeutischen Ansatz ist der Zusammenhang zwischen erzeugten DNA-Doppelstrangbrüchen und Reduktion des Zellüberlebens mit der EGFR Oberflächenexpression (siehe **Abbildung 37**), da das Therapieziel eine Schädigung von stark EGFR überexprimierenden Tumoren und Metastasen und die Schonung von Gewebe mit geringer EGFR Expression ist. Eine EGFR abhängige Akkumulation von DNA-Schäden sollte daher auch zu einer EGFR abhängigen Inaktivierung der Tumorzellen führen. Dieser Zusammenhang konnte gezeigt werden. Wie auch die Korrelation zwischen EGFR Expression und DNA-Doppelstrangbrüchen (vergl. **Abbildung 32**) ist der Zusammenhang zwischen EGFR Expression und durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab verringertem Zellüberleben hoch signifikant ( $r^2 = 0,927$ ;  $p = 0,002$ ).

Die Abtötung der Zellen wird also davon bestimmt, wie viele Bindungspartner dem  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab zur Verfügung stehen. In Abhängigkeit der Anzahl seiner Epitope reichert sich das  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab an der Oberfläche der Zellen an, was zu einer Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen und entsprechend damit zur Zellinaktivierung führt.

## 6.6. Fazit

Ziel der Studie war es die Wirksamkeit von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit der EGFR-Expression zu bestimmen. Die untersuchten Endpunkte waren die Induktion von DNA-Schäden und die damit verbundene Zellinaktivierung.

Es konnte gezeigt werden, dass die charakterisierten Plattenepithelkarzinomzelllinien eine starke Heterogenität bezüglich ihrer EGFR Expression aufweisen. Bei einer genaueren Betrachtung der intrazellulären Verteilung des EGFR (zwischen Membran, Cytoplasma und Kern) konnte diese Heterogenität bestätigt werden. Dabei zeigt sich, dass der EGFR in allen Fraktionen nachweisbar, jedoch die stärkste EGFR Expression stets in der Membranfraktion nachweisbar ist. Die Membranfraktion ist dabei essentiell für den therapeutischen Ansatz, da diese Fraktion des EGFR die Bindung des  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab an die Zellen vermittelt (siehe Kapitel 6.1).

Die Behandlung von ausgewählten Plattenepithelkarzinomzelllinien unterschiedlicher EGFR Expression mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab führte zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Wurden zelluläre Reparaturmechanismen durch eine Inkubation bei niedrigen Temperaturen unterdrückt, so war die Anzahl der induzierten Brüchen abhängig von der Behandlungsdauer und der zellulären EGFR Expression, die wie beschrieben die Zahl der möglichen Bindestellen bestimmt.

Wurden die Zellen während der Behandlung bei 37 °C inkubiert, so dass die erzeugten DNA-Schäden von den Zellen erkannt und repariert werden konnten, so ist die Anzahl der akkumulierten Doppelstrangbrüche ebenfalls abhängig von der zellulären EGFR Oberflächenexpression. Vorhandene Unterschiede bei der Induktion von Brüchen aufgrund von unterschiedlich starker  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab Bindung dominierten demnach gegenüber Unterschieden in der zellulären Reparaturkapazität (siehe Kapitel 6.4).

Die Inkubation der Plattenepithelkarzinomzelllinien mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab führt zu einer Verringerung des Zellüberlebens. Die Inaktivierung der Zellen wird dabei maßgeblich durch die Zahl akkumulierter DNA-Doppelstrangbrüche bestimmt. Wie stark das zellinaktivierende Potenzial von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab für eine Zelllinie jeweils ist, lässt sich daher durch die EGFR Oberflächenexpression vorhersagen. Der

Grund hierfür ist, dass die EGFR Expression die Bindung des  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab und dadurch direkt die applizierte Dosis bestimmt (siehe Kapitel 6.5).

## 7. Diskussion

### 7.1. Konzept der Radioimmuntherapie mit $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab

Der Ansatz einer EGFR gerichteten Radioimmuntherapie unter Verwendung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab verfolgt das Ziel, in EGFR überexprimierenden Tumoren und Metastasen eine Dosisdeposition zu erreichen, während Normalgewebe mit niedriger EGFR Expression geschont wird. Dies ermöglicht in soliden, EGFR überexprimierenden Tumoren die Dosis einer externen Strahlentherapie durch eine interne Bestrahlung zu ergänzen und damit die Wahrscheinlichkeit einer Tumorkontrolle zu erhöhen.

Darüber hinaus würden erstmals EGFR überexprimierende Metastasen radiotherapeutisch behandelt werden können, welche aufgrund ihrer unbekanntem Lokalisation in frühen Stadien keiner gezielten Strahlentherapie unterzogen werden können. Eine systemische Radioimmuntherapie würde hier eine gezielte Dosisdeposition ermöglichen.

Die Dosisdeposition soll zur Abtötung der Zellen führen. Diese erfolgt primär durch die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, da unreparierte DNA-Brüche während der Zellteilung zu Chromosomenabberationen und damit zum Verlust genetischer Information führen (Borgmann, 2009). Die Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche hängt dabei linear von der induzierten Dosis ab (Kelland et al., 1988).

Die Dosisdeposition im zu bestrahlenden Gewebe wird dabei erst durch die Bindung des Antikörpers an EGFR Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen ermöglicht. Die Stärke der EGFR Oberflächenexpression sollte daher die applizierte Strahlendosis und das Ausmaß der DNA Schädigung und Zellinaktivierung bestimmen.

$^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ist dabei ein viel versprechendes Radioimmuntherapeutikum. Sowohl Cetuximab als auch  $^{90}\text{Y}$ trium werden bereits im klinischen Alltag eingesetzt.

Cetuximab wird in der Onkologie als EGFR Inhibitor eingesetzt. Dies insbesondere auch in Kombination mit Radiotherapie, wodurch das 5-Jahresüberleben von Patienten mit Kopf- / Halstumoren bei einer

Kombinationstherapie um 9 % gesteigert werden kann (Bonner et al., 2010). Dies erklärt sich wahrscheinlich durch die inhibierende Wirkung von Cetuximab auf DNA-Reparaturprozesse (Dittmann et al., 2005; Kriegs, 2010; Toulany et al., 2005).

<sup>90</sup>Yttrium wird in der Nuklearmedizin bereits zur gezielten Schädigung von Geweben eingesetzt. Aufgrund seiner hohen Reichweite von bis zu 11 mm können auch größere Strukturen geschädigt werden, weswegen es zum Beispiel bei der Behandlung chronisch entzündeter Kniegelenke eingesetzt wird (Büll, 2001).

Um das Konzept einer Radioimmuntherapie mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab auf seine Anwendbarkeit zu überprüfen, wurde der kausale Zusammenhang von EGFR Oberflächenexpression, DNA Schädigung und Zellinaktivierung in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von kultivierten Tumorzelllinien untersucht.

### **7.2. Die Bedeutung der Verteilung des EGFR in Plattenepithelkarzinomzelllinien**

Ziel des Projektes ist es, eine Aussage über die Abhängigkeit der durch <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab vermittelten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und damit zusammenhängend der Inaktivierung von Tumorzelllinien zu treffen. Das Epitop des hierzu verwendeten Antikörpers <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab ist der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) (Fan et al., 1993; Goldstein et al., 1995). Als Modellsystem wurden Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- / Halsbereiches ausgewählt, da diese Tumorentität häufig eine EGFR Überexpression aufweist und die Strahlentherapie eine wichtige Therapieform bei der Behandlung darstellt. Daher wurde zunächst die EGFR Expression in zwölf Zelllinien anhand zweier Methoden bestimmt, die insbesondere eine Aussage über die intrazelluläre Verteilung des Rezeptors sowie seiner Oberflächenexpression ermöglichen (vergl. Kapitel 5.2.1, Kapitel 1.1) (Diaz et al., 2007). An der Oberfläche präsentierte Rezeptoren stellen die Bindestellen für den Antikörper dar und sind daher von Interesse.

Die EGFR Expression der untersuchten Tumorzelllinien zeigt eine große Heterogenität. So ist die Zelllinie UT-SC 15 in ihrer EGFR Expression mit humanen Normalfibroblasen vergleichbar und die stark EGFR exprimierenden Zellen SAT, UT-SCC 14 sowie A431 repräsentieren Tumorzellen mit einer aufgrund von Genamplifikationen sehr stark erhöhten EGFR Expression (Kasten-Pisula et al., 2011).

Die Experimente zeigen, dass mit zunehmender Gesamtmenge an EGFR der Anteil membranständiger Moleküle von 75 % auf 50 % abnimmt. Im Gegensatz hierzu nimmt der cytoplasmatische Anteil von 10 % auf 25 % zu. In der Literatur wird in verschiedenen stark EGFR exprimierenden Zelllinien 40 % bis 60 % der zellulären EGFR Expression in Strukturen der äußeren Zellmembran nachgewiesen (Warren and Landgraf, 2006). Die Verschiebung lässt sich durch eine verstärkte spontane Dimerisierung der Rezeptoren erklären, deren Wahrscheinlichkeit mit zunehmender Rezeptordichte steigt. Eine solche, ligandenunabhängige Dimerisierung der Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des Rezeptors (Warren and Landgraf, 2006). Die Aktivierung stimuliert die Internalisierung des Rezeptors über sogenannte „lipid rafts“ oder Caveole (Warren and Landgraf, 2006) und führt so zu einer Verringerung der Rezeptordichte an der Oberfläche und einer Zunahme im Cytoplasma.

Aufgrund der Ergebnisse der Experimente lässt sich feststellen, dass die gesamte EGFR Expression und die EGFR Oberflächenexpression nicht gleichzusetzen sind. Für Fragestellungen bezüglich der Cetuximabbindung ist daher nur die EGFR Oberflächenexpression entscheidend.

Eine verstärkte EGFR Expression ist ein negativer prognostischer Marker in der Strahlentherapie (Ang et al., 2004; Ang et al., 2002) und hat eine verstärkte Strahlenresistenz in vitro und in vivo (Kasten-Pisula et al., 2011) zur Folge. Eine aufgrund der erhöhten Rezeptordichte verstärkte EGFR Autophosphorylierung und die dadurch bedingte Verstärkung nachgeschalteter Signalwege könnte dies erklären. So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Aktivierung von EGFR abhängigen Signalkaskaden zu einer verbesserten DNA-Reparatur führt (Das et al., 2007; Kriegs, 2010). Es ist also vorstellbar, dass eine Liganden unabhängige Aktivierung des Rezeptors und seiner Signalwege aufgrund einer erhöhten Oberflächenexpression zu einer Stimulation der DNA-Reparatur und dadurch zu einem verbessertem Überleben nach Bestrahlung führt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch bereits internalisierte Rezeptoren eine Signalweiterleitung bewirken können. Dies geschieht aus den Vesikeln heraus durch die aktivierte Kinasedomäne des Rezeptors, die auch nach einer Internalisierung noch im Cytoplasma andere Proteine phosphorylieren kann, oder durch eine Translokation des Rezeptors in bestimmte Kompartimente, wie zum

Beispiel dem Zellkern, wo es zu einer direkten Interaktion mit Zielproteinen kommen kann (Dittmann et al., 2008; Warren and Landgraf, 2006; Weinberg, 2006).

Für einen therapeutischen Ansatz unter der Verwendung spezifischer Kinaseinhibitoren mit dem Ziel einer Blockierung der Kinasefunktion des EGFR sowie seiner Translokation in verschiedene Zellkompartimente muss die intrazelluläre Verteilung des Rezeptors bei Therapiebeginn nicht zwangsläufig eine Rolle spielen. Die hierfür verwendeten Inhibitoren sind in der Regel membrangängig und können auch innerhalb der Zelle wirken.

Wird jedoch ein monoklonaler Antikörper wie Cetuximab, mit einem Molekulargewicht von über 170 kDa, für einen immunologischen oder einen radioimmunologischen Ansatz verwendet, so sind für eine Bindung nur die an der Oberfläche präsentierten EGFR Moleküle ausschlaggebend. Ihre Anzahl bestimmt die bei einer Therapie mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzielbare Dosis.

Die aufgrund der gewonnenen Daten erzielte Erkenntnis, dass die EGFR Gesamtmenge nicht mit der EGFR Oberflächenexpression gleichzusetzen ist, kommt daher in diesem Zusammenhang eine zentrale Bedeutung zu.

Die Anzahl der EGFR Moleküle, welche auf der Oberfläche präsentiert werden, wird klassischer Weise durch Ligandenbindungsassays bestimmt und wird in der Literatur für die in unserer Auswahl enthaltenen A431 Zellen mit  $2 \cdot 10^6$  EGFR Moleküle pro Zelle angegeben (Haigler et al., 1978; Kawamoto et al., 1983). Die in dieser Studie durchgeführten Cexuximab Bindungsassays ermöglichen aufgrund dieser Information eine Berechnung der EGFR Oberflächenexpression für alle untersuchten Kopf- / Halstumorzelllinien. Die Oberflächenexpression variierte dabei von  $0,24 \cdot 10^6$  bis  $3,14 \cdot 10^6$  EGFR Molekülen pro Zelle.

Die dadurch gewonnenen Daten ermöglichen eine Untersuchung des Zusammenhanges zwischen EGFR Oberflächenexpression und Dosisdeposition.

### **7.3. Kinetik der $\gamma\text{H2AX}$ und 53Bp1 Foci - DNA-Schadenserkennung und Reparatur in Plattenepithelkarzinomzelllinien**

Durch Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen oder Teilchen werden in Zellen u.a. DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Die Komplexität des Doppelstrangbruches hängt dabei von der Energie der Strahlung ab. Da ein Doppelstrangbruch aus zwei Einzelstrangbrüchen besteht, sind zwei Ionisationsereignisse notwendig, um einen

Doppelstrangbruch zu erzeugen. Diese beiden Ionisationsereignisse können dabei auch von einem Primärteilchen bzw. Primärquant ausgehen. So kann das durch die erste Wechselwirkung beschleunigte Sekundärelektron den für einen Doppelstrangbruch notwendigen zweiten Einzelstrangbruch erzeugen.

Je geringer die Energie des Primärteilchens oder der Primärstrahlung ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die folgende Ionisation durch das entstehende Sekundärelektron räumlich benachbart stattfindet. Bei bestimmten Strahlenarten, wie zum Beispiel Alphastrahlern, kann es auch zu so genannten komplexen Schäden kommen. Hierbei finden sich eine Vielzahl von DNA-Brüchen und -Veränderungen innerhalb eines Bereiches von wenigen Basenpaaren. Diese Schäden sind für die Zelle ungleich schwieriger zu reparieren (Hall, 2000).

Die Anwesenheit eines DNA-Doppelstrangbruches im Zellkern führt zur Rekrutierung des sogenannten MRN Komplexes (bestehend aus Mre11, Rad50 und Nibrin) an die Bruchstelle. Dadurch wird das in Dimeren vorliegende Protein ATM am Serin 1981 phosphoryliert und die Dimere gespalten. Im Anschluss werden die Histone H2AX im Bereich mehrerer Megabasenpaare des Doppelstrangbruches am Serin 139 phosphoryliert (Bakkenist and Kastan, 2003; Lukas et al., 2004; Stucki et al., 2005). Erst im späteren Verlauf der Reparatur werden auch 53Bp1 Foci sichtbar. Das Protein 53Bp1 transloziert nach DNA-Schädigung in den Kern und akkumuliert zusammen mit BRCA1, einem weiteren Protein der DNA-Schadenserkennung am Doppelstrangbruch (Panier and Durocher, 2009). Für die Aggregation des 53Bp1 am Doppelstrangbruch ist neben der Aktivierung von MDC1 und RNF8 auch die vorangegangene Phosphorylierung des Histons H2AX notwendig (Panier and Durocher, 2009). Nach erfolgreicher Reparatur werden die Phosphorylierungen der Histone H2AX durch die Phosphatasen PP2A und PP4C entfernt, was auch eine Ablösung des Proteins 53Bp1 zur Folge hat (Chowdhury et al., 2008). Dabei ist die Dephosphorylierung des Histons H2AX ein kritischer Schritt für die Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass wenn die Dephosphorylierung unterbunden wird, dies zu einem verringertem Überleben der Zellen führt. Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch noch unklar (Chowdhury et al., 2008).

Zur Bestimmung der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurden  $\gamma\text{H2AX}$  sowie 53Bp1 Foci immunologisch angefärbt und

ausgezählt. Diese Proteine lassen sich an DNA-Doppelstrangbrüchen nachweisen und ermöglichen dadurch eine indirekte Aussage über die Menge der induzierten Doppelstrangbrüche (Beyreuther et al., 2009). Da sowohl  $\gamma$ H2AX als auch 53Bp1 Foci zu frühen Zeitpunkten nach der Bestrahlung eine geringe Größe und noch keine definierte Struktur aufweisen, ermöglicht eine Kofärbung beider Proteine einen Ausschluss von methodischen Artefakten. Zu späteren Zeitpunkten, zum Beispiel bei der Untersuchung von residuellen Doppelstrangbrüchen, zeigen die Foci einen starken Kontrast zum Hintergrund und eine klare, runde Struktur.

Das Maximum der nachweisbaren Foci konnte in allen untersuchten Zelllinien 15 min bis 20 min nach einer Schädigung durch ionisierende Strahlung beobachtet werden. Dieser Zeitraum erklärt sich durch die enzymatischen Prozesse, welche im Rahmen der Schadenserkenkung stattfinden und zur Phosphorylierung von  $\gamma$ H2AX sowie zur Aggregation von 53Bp1 am Doppelstrangbruch führen.

In der Literatur wurden diese Prozesse ebenfalls nach frühen Zeitpunkten beobachtet. Die frühesten in der Literatur beschriebenen Aggregationsereignisse finden sich bereits nach 10 min (Doil et al., 2009), jedoch handelte es sich hierbei um Schäden welche durch eine Microbeambestrahlung mithilfe eines Lasers induziert wurden. Sie sind in ihrer Struktur eher mit Schäden nach Bestrahlung mit besonders niedrigen Energien vergleichbar. Bei solchen, lokal kompakten, massiven Schäden über große Bereiche von mehreren Megabasen kann die methodisch bedingte Nachweisschwelle für eine fluoreszenzbasierte Detektion wahrscheinlich schon zu früheren Zeitpunkten erreicht werden.

Andere Arbeiten detektieren das Maximum der immunologisch nachweisbaren Foci in mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen ebenfalls nach 15 bis 30 min (Beyreuther et al., 2009; Kato et al., 2008; Yamauchi et al., 2008). Dieser Zeitraum entspricht der in dieser Arbeit beobachteten Kinetik.

Ab 20 min nach der Induktion der Schäden erfolgt eine Abnahme der nachweisbaren Foci. Dies lässt sich durch erfolgreiche Reparaturprozesse erklären, welche innerhalb dieses Zeitraumes durchgeführt werden. So können Schäden durch die Mechanismen des „nicht homologen End Joinings“ innerhalb von wenigen Minuten geschlossen werden (Rothkamm et al., 2003). Hierbei werden die DNA-Enden direkt miteinander verknüpft, ohne dass es zu einer größeren Prozessierung der DNA kommt.

Ähnliche Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wurden auch durch andere Arbeitsgruppen beschrieben (Beels et al., 2010; Groesser et al., 2011; Kato et al., 2008).

Aufgrund der geringen Dosisleistung einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ist für die Akkumulation klinisch relevanter Dosen ein Zeitraum von über 20 min notwendig. Um erzeugte Doppelstrangbrüche über Zeiträume von über 20 min in den Zellen akkumulieren zu können, ist es notwendig die DNA-Reparatur zu hemmen. Die Tatsache, dass es sich bei der DNA-Schadenserkennung und Reparatur um enzymatische Prozesse handelt, kann hierfür ausgenutzt werden. So wird durch eine Lagerung bei 4 °C die Reparatur unterbunden (Kampinga and Konings, 1987). Es ist jedoch notwendig zu kontrollieren, ob eine Lagerung der Zellen bei niedrigen Temperaturen einen Einfluss auf die Ausbildung der Foci hat.

In unseren Experimenten war es möglich die DNA-Reparatur durch eine Inkubation der Zellen bei 4 °C vollständig zu blockieren (siehe Kapitel 6.2.2). Eine Lagerung der Zellen bei niedrigen Temperaturen stellt jedoch einen Stress dar, der einen Einfluss auf die Formation von  $\gamma\text{H2AX}$  Foci hat. Vor allem die Reduktion der Anzahl nachweisbarer  $\gamma\text{H2AX}$  Foci in bestrahlten Zellen nach Lagerung der Zellen bei 4 °C ist bemerkenswert, da es sich offensichtlich um einen zeitabhängigen Vorgang handelt. Als Ursache für diese Abnahme könnte man eine bei 4 °C stattfindende Reparatur vermuten. Ein direkter Nachweis der DNA-Fragmentierung per Konstantfeldgelelektrophorese zeigte jedoch deutlich, dass bei einer Lagerung bei 4 °C keine DNA-Reparatur mehr beobachtet werden kann. Auch ein Einfluss auf die enzymatischen Prozesse konnte ausgeschlossen werden. Die Ursache für dieses Phänomen ist derzeit noch unklar. In der aktuellen Literatur finden sich keine Hinweise auf ähnliche Beobachtungen durch andere Gruppen.

#### **7.4. Konzentrationsabhängigkeit der $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab Bindung an Zellen**

In Zellkulturexperimenten zur Untersuchung der EGFR vermittelten Wirkung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab auf humane Zellen ist es notwendig den Antikörper in einer übersättigten Konzentration einzusetzen. Nur so kann sichergestellt werden, dass sämtliche potentielle Cetuximab Bindestellen erkannt werden.

Um den für die geplanten Experimente relevanten Konzentrationsbereich zu bestimmen, wurden sowohl für den unveränderten Antikörper Cetuximab als auch für das Konjugat DTPA-Cetuximab Affinitätsmessungen an der humanen Tumorzelllinie A431 durchgeführt (siehe Kapitel 6.1.2 und Kapitel 6.3.1). Die Tumorzelllinie A431 eignet sich aufgrund ihrer hohen EGFR Expression besonders gut für solche Untersuchungen. Konzentrationen die zu einer Absättigung der EGFR Moleküle an der Oberfläche von A431 führen, werden auch bei Zelllinien mit geringerer EGFR Expression zu einer vollständigen Bindung aller EGFR Moleküle führen.

Für beide Antikörper wurde gezeigt, dass sich bei Konzentrationen ab 3 nM Sättigungseffekte einstellen. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass ab dieser Konzentration keine freien Epitope mehr zur Verfügung stehen.

Andere Arbeitsgruppen haben mithilfe von ELISA (Goldstein et al., 1995) und FACS Experimenten (Diaz et al., 2007) Affinitätsuntersuchungen unter Verwendung derselben Zelllinie durchgeführt. Im ELISA zeigte sich eine Absättigung der untersuchten A431 Zellen ab Konzentrationen von 8 nM. In den FACS Untersuchungen von Diaz et al. wurde für A431 Zellen ein Sättigungseffekt ab 3,2 nM beobachtet. In beiden Untersuchungen führt eine um den Faktor 10 verringerte Antikörperkonzentration nicht mehr zu einer Absättigung der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren.

Die Tatsache, dass verschiedene Labore mit verschiedenen Methoden die Bindung von Cetuximab an der Zelllinie A431 untersucht haben und zu denselben Ergebnissen gekommen sind, ist eine sehr gute Bestätigung für unsere Daten.

#### **7.5. Erzeugung und Akkumulation von durch <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen**

Bei einer Therapie von EGFR exprimierenden Zellen mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab wird die Schädigung durch die Bindung des Antikörpers an EGFR Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen ermöglicht. Die Anzahl der gebundenen Antikörper hängt hierbei von der EGFR Expression ab (vergl. Kapitel 6.1.2). Die Stärke der EGFR Oberflächenexpression sollte daher das Ausmaß der DNA Schädigung bestimmen (Heyerdahl et al., 2011).

Um das Konzept einer Radioimmuntherapie mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab auf seine Anwendbarkeit zu überprüfen, wurde der kausale Zusammenhang von EGFR Oberflächenexpression und DNA Schädigung durch  $\gamma$ H2AX und 53Bp1 Färbungen

nach Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab untersucht. Aufgrund des strahlenbiologischen Prinzips, dass die Anzahl der induzierten Schäden linear von der Dosis abhängt (Kauffmann, 2001), ist ein Zusammenhang zwischen EGFR Oberflächenexpression und der Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche zu erwarten.

In den Experimenten dieser Studie konnte deutlich gezeigt werden, dass die Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche maßgeblich dadurch bestimmt wird, wie viele Epitope dem Antikörper zur Verfügung stehen (siehe Kapitel 6.4.3).

Die Kinetik der Markierung von DNA-Schäden durch die Ausbildung von  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Foci ähnelt dabei der durch Röntgenstrahlen induzierter DNA-DSB. Lediglich die Abnahme der nachweisbaren Foci nach 2 h sank, so dass 6 % mehr Brüche nachweisbar waren.

Obwohl die Kinetiken der DNA Reparatur von der Energie der ionisierenden Strahlen oder Teilchen und der damit verbundenen Komplexität der induzierten Doppelstrangbrüche abhängen (Prise et al., 2001; Schmidt et al., 2010), ist aufgrund der hohen Energie von  $^{90}\text{Y}$  (2,28 MeV) nicht davon auszugehen, dass dies die Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Reparaturkinetik ist. Vielmehr ist bei einer Inkubation mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab die Strahlenquelle auch während der Reparatur präsent, da gebundene Antikörper zu keiner Zeit entfernt werden. Es lässt sich also daher eine höhere Anzahl an Doppelstrangbrüchen nachweisen, weil stetig neue Brüche entstehen.

Dennoch handelt es sich im Falle einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab um eine andere Bestrahlungssituation als während einer Bestrahlung unter Verwendung einer Röntgenröhre. Während die Röntgenstrahlen, in Abhängigkeit der Dosisleistung der Strahlenquelle, innerhalb eines kurzen Zeitraumes von wenigen Minuten appliziert werden, akkumulieren die durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten Brüche erst mit der Zeit. Dass hierbei in unseren Experimenten ein linearer Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und Anzahl der akkumulierten Schäden nachgewiesen wurde, obwohl es sich bei der Strahlenquelle um ein zerfallendes Isotop handelt, lässt sich durch den kurzen Beobachtungszeitraum von maximal drei Stunden erklären. Die Halbwertszeit von  $^{90}\text{Y}$  beträgt 2,67 Tage und hat daher

innerhalb dieses Zeitraumes keinen starken Einfluss auf die Aktivitätsmenge. Vergleichbare Daten von anderen Arbeitsgruppen zu einem radioaktiven Cetuximabkonjugat liegen noch nicht vor. Da die Bindung jedoch stabil ist und die Bestrahlung dadurch anhaltend vorliegt, war eine Abhängigkeit der Schadensinduktion von der Zeit zu erwarten.

Besonders interessant ist der von uns gezeigte Zusammenhang zwischen induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen und der EGFR Expression der mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelten Zellen. Dieser Zusammenhang ist eine der Grundvoraussetzungen des Konzeptes einer Radioimmuntherapie mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab. Eine vergleichbare Beobachtung konnte zuvor bereits für die Substanz  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF gemacht werden (Bailey et al., 2007). Diese Arbeitsgruppe ist bislang die Einzige, welche vergleichbare molekulare Untersuchungen nach Behandlung mit radioaktiven, EGFR gerichteten Wirkstoffen durchgeführt hat. In dieser Veröffentlichung beschreiben die Autoren, dass nach einer Behandlung mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF, dem radioaktiv markierten natürlichen Liganden des EGF-Rezeptors, die EGFR überexprimierenden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 nach Inkubation für 1 h zwischen 10 und 15 DNA-Doppelstrangbrüche aufweisen, wohingegen sich in der moderat EGFR exprimierenden Zelllinie MCF 7 nach einer gleichen Behandlung nur 3 Doppelstrangbrüche nachweisen ließen.

Die von uns durchgeführten Studien erweitern diese Aussage, als dass wir erstmals die EGFR Expression von sechs Zelllinien mit der Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche korreliert haben. Die Reichweiten von  $^{90}\text{Y}$  und  $^{111}\text{In}$  unterscheiden sich deutlich.  $^{111}\text{In}$  ist ein Augerelektronenemitter mit einer sehr kurzen Reichweite von wenigen nm, daher sind die Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche nach 1 h  $^{111}\text{In}$  ohne Unterdrückung der DNA-Reparatur nur bedingt mit der hier detektierten Anzahl der Foci nach 3 h  $^{90}\text{Y}$  bei Unterdrückung der Reparatur vergleichbar. Dennoch zeigen sich verblüffende Gemeinsamkeiten. So hat die nur moderat EGFR exprimierende Zelllinie FaDuDD vergleichbare 3,4 Brüche nach einer 3 h Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab akkumuliert, die hoch EGFR exprimierende Zelllinie UT-SCC 14 dagegen 13,8.

Auch die theoretischen Dosisäquivalente im Vergleich zu Röntgenstrahlen liegen mit circa 120 mGy für die moderat EGFR exprimierende Zelllinie MCF 7 in einem

ähnlichen Bereich wie die 94 mGy welche bei unseren Experimenten in der moderat EGFR exprimierenden Zelllinie FaDuDD nach 3 h  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzielt werden konnten (Cai et al., 2008).

Bei der Betrachtung von über längere Behandlungszeiträume akkumulierten Doppelstrangbrüchen zeigen sich ebenfalls Ähnlichkeiten zu Studien mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF (Cai et al., 2008).

Die Experimente unserer Studie zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen der Anzahl der nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüche und der EGFR Expression. Dies gilt auch, wenn  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab über Zeiträume von 24 h oder 48 h auf den Zellen verbleibt ohne dass die DNA Reparatur unterdrückt wird. So lassen sich 24 h nach der Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in der niedrig EGFR exprimierenden Zelllinie UT-SCC 15 0,4 und in der stark EGFR überexprimierenden Zelllinie UT-SCC 14 7,2 Doppelstrangbrüche detektieren. Nach 48 h betrug die Zahl der verbleibenden Brüche 0 in UT-SCC 15 und 4,7 in UT-SCC 14 Zellen. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF bereits in der Literatur beschrieben. So wiesen die Autoren nach einer 24 h Behandlung mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF für die moderat EGFR exprimierende Zelllinie MCF 7 nur 3 Doppelstrangbrüche nach, in den stark EGFR exprimierenden Zellen MDA-MB-231 und MDA-MB-468 bis zu 35 (Cai et al., 2008).

Auffällig ist hierbei, dass sich die absoluten Zahlen der DNA-Doppelstrangbrüche bei Behandlungen mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab und  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF stark unterscheiden. Dies lässt sich durch das experimentelle Design erklären. Da  $^{111}\text{In}$  eine sehr kurze Reichweite hat und die Zielzellen nur dann geschädigt werden, wenn das  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF in den Zellkern gelangt, kann während des Experimentes im Kulturmedium stets  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF vorhanden sein ohne einen Einfluss auf die Schädigung der Zellen zu haben. Nachdem die EGF-Rezeptoren der Zielzellen ein  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF gebunden haben und internalisiert wurden (Warren and Landgraf, 2006), können über die 24 h neue oder recycelte Rezeptoren an die Oberfläche gebracht werden, so dass es zu einer kontinuierlichen Aufnahme von Radioaktivität in die Zellen kommt.

Aufgrund der hohen Reichweite von  $^{90}\text{Y}$  war dies in unseren Experimenten nicht möglich. Durch die Reichweite von bis zu 1 cm in Wasser, ist für eine Bestrahlung einer Zielzelle keine Bindung des Antikörpers an die EGF-Rezeptoren ihrer

Oberfläche notwendig. Auch ein Zerfallsereignis, welches in der Umgebung der Zielzelle stattfindet, kann zu einer Energiedeposition in der Zielzelle führen. Im Falle von Zellkulturexperimenten stellt dies ein Problem dar, da auch Antikörpermoleküle, welche sich im Kulturmedium befinden, unabhängig von einer möglichen Bindung an die EGF-Rezeptoren des Monolayers zu einer Bestrahlung der Zellen führen. Um eine Abhängigkeit der Dosisdeposition von der EGFR Menge untersuchen zu können, war es also von entscheidender Bedeutung den Inkubationszeitraum zur Bindung des Antikörpers an seine Epitope mit nur 5 min möglichst kurz zu gestalten und anschließend im Überstand befindliche, ungebundene Antikörper zu entfernen. Alle nach 24 h oder 48 h nachweisbaren Brüche lassen sich daher auf ein <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab Molekül zurückführen, dass zu Anfang der Behandlung appliziert wurde.

Bei einer Behandlung von Mäusen oder Patienten wäre die Situation eine andere. Aufgrund der steten Anwesenheit des <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab im Serum lassen sich in 24 h höhere Dosisäquivalente realisieren als die gemessenen 2,5 bis 10 Gy.

Dass die über 24 h und 48 h akkumulierten Doppelstrangbrüche mit der Anzahl der induzierten Brüche korreliert ist hierbei von großer Bedeutung. Für die Anzahl der induzierten Brüche ist nur die EGFR Oberflächenexpression von Bedeutung. Auf die nach 24 h oder 48 h verbleibenden Schäden hat jedoch die individuelle Reparaturkapazität der Zellen einen Einfluss. Die Reparaturkapazität ist in der Auswahl an untersuchten Zelllinien dabei keineswegs identisch, sondern zeigt Unterschiede von bis zu 400 % (Kasten-Pisula et al., 2011). Dennoch wird der Anteil der verbleibenden Schäden durch die Anzahl der induzierten Brüche bestimmt. Erklärbar ist dies mit der Tatsache, dass während des untersuchten Zeitraumes weiterhin neue DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt werden und die Schädigung sich aus der Summe von Reparatur und Erzeugung ergibt. Dabei ist die Erzeugung von neuen Schäden in EGFR überexprimierenden Zellen dominant gegenüber der Reparatur.

Weil die Anzahl der <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab Bindestellen die applizierte Dosis und damit die induzierten Doppelstrangbrüche bestimmt, hängt auch die Zahl der akkumulierten DNA-Schäden von der EGFR Oberflächenexpression der Zellen ab (vergl. Kapitel 6.4.4).

## 7.6. Einfluss von <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab auf das Zellüberleben

Das Konzept der Radioimmuntherapie mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab sieht eine Dosisdeposition in EGFR überexprimierenden Tumoren und Metastasen vor, während Normalgewebe mit niedriger EGFR Expression geschont wird.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Ausmaß der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab behandelten Zellen von ihrer EGFR Oberflächenexpression abhängt. Je mehr EGFR Moleküle an der Oberfläche der Zellen exprimiert werden, umso mehr Doppelstrangbrüche konnten erzeugt werden.

Dies wirkt sich auch unter Berücksichtigung von Reparaturprozessen auf die Anzahl der in den Zellen akkumulierten Brüche aus. Diese waren von der Induktion neuer Brüche und damit ebenfalls von der zellulären EGFR Oberflächenexpression abhängig (vergl. Kapitel 6.4).

Eine unvollständige Reparatur der DNA führt zum Zelltod (Kelland et al., 1988). Dies ist eine der Grundlagen der Strahlentherapie. Unreparierte DNA-Doppelstrangbrüche führen während der Zellteilung zu Chromosomenabberationen (Borgmann, 2009), weshalb die Zellen entweder durch eine mitotische Katastrophe absterben oder bereits vorher zum Schutz der genetischen Stabilität permanent in der Zellzyklusphase G<sub>1</sub> arretieren (Dewey et al., 1995). Dabei kann bereits ein einzelner nicht oder falsch reparierter Bruch ein letales Ereignis darstellen.

Da die Anzahl der bei einer Behandlung mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab akkumulierten DNA-Schäden von der EGFR Expression abhängt, galt es zu untersuchen ob auch die Zellinaktivierung durch die EGFR Oberflächenexpression bestimmt wird.

Die in unserer Studie durchgeführten Experimente zeigen deutlich, dass eine Behandlung von humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab einen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben hat. Das Ausmaß der Zellinaktivierung hängt dabei von der Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche und damit von der EGFR Oberflächenexpression ab.

Vergleichbare Experimente in Zellkultur hat die Arbeitsgruppe von Cai et al. unter Verwendung von <sup>111</sup>In-DTPA-hEGF durchgeführt (Cai et al., 2008). Literaturdaten zu in Zellkultur getesteten, cetuximabbasierten Radioimmuntherapien stehen nicht zur

Verfügung. In unseren Untersuchungen führte  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit von der EGFR Expression der Zielzellen zu einer Reduktion des Zellüberlebens von bis zu 87 % im Vergleich zu DTPA-Cetuximab. Im Vergleich zu komplett unbehandelten Zellen sind es sogar über 90%. Diese Zelinaktivierung konnte bereits nach einer nur 5 minütigen Behandlung erreicht werden. In den Arbeiten von Cai et al., 2008, führte eine 20 h Behandlung mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF zu einer 98 % Zelinaktivierung.

Da die Höhe der applizierten Dosis und damit die Anzahl der akkumulierten DNA-Schäden von der EGFR-Expression abhängt, hängt auch die Zelinaktivierung durch eine Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab von der EGFR Oberflächenexpression ab (vergl. Kapitel 6.4 und Kapitel 6.5).

Der Zusammenhang von Dosis und Verringerung des Zellüberlebens ist dabei nicht linear sondern exponentiell. Dies erklärt sich dadurch, dass die Inaktivierung der Zellen hauptsächlich durch Chromosomenaberrationen erzielt wird. Apoptose oder Zellzyklusarreste in  $G_1$  spielen aufgrund des p53 Status der Zellen keine Rolle.

Die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen ist linear quadratisch von der eingesetzten Dosis abhängig, da für das Entstehen von Chromosomenaberrationen zwei Doppelstrangbrüche notwendig sind. Bei niedrigen Dosen ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass beide Brüche durch das selbe Elektron verursacht wurden. In diesem Dosisbereich ist die Anzahl der induzierten Chromosomenaberrationen linear von der Dosis abhängig. Bei höheren Dosen hingegen ist es wahrscheinlicher, dass die beiden Brüche, welche zur Chromosomenaberration geführt haben, durch zwei verschiedene Elektronen erzeugt wurden. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit einer Aberration vom Quadrat der Dosis abhängig (Hall, 2000).

Dass dieser Zusammenhang so klar besteht war im Vorfeld der Untersuchungen nicht abzusehen. Die Bedeutung dieses Ergebnisses ist von enormer Bedeutung, da das Konzept der Radioimmuntherapie durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab davon ausgeht, dass es in niedrig oder moderat EGFR exprimierendem Normalgewebe des Patienten nicht zu einer Akkumulation von Aktivität kommt und diese Strukturen geschont werden. Die Zelllinie UT-SCC 15, welche in dieser Studie stets als Beispiel für eine niedrig exprimierende Zelllinie genutzt wurde, ähnelt in ihrer EGFR

Expression humanen Normalfibroblasen (Kasten-Pisula et al., 2011). Im Vergleich zu DTPA-Cetuximab konnte für die Zelllinie UT-SCC 15 keine Zellinaktivierung durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab nachgewiesen werden. Es ist also davon auszugehen, dass in dieser Zelllinie keine ausreichende Dosis appliziert werden kann, um unter der Behandlung eine Akkumulation von DNA-Brüchen zu verursachen. So konnte gezeigt werden, dass nach 48 h keine unreparierten DNA-Schäden übrig bleiben. Eine Schonung von niedrig EGFR exprimierenden Geweben ist demnach möglich.

Im Vergleich mit den durch Kasten-Pisula et al. in den gleichen Zelllinien durchgeführten Studien (unveröffentlichte Daten) nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, zeigt sich ein ähnlicher Zusammenhang von induzierten Doppelstrangbrüchen und Effekt auf das Zellüberleben (Kasten Pisula et al., unveröffentlichte Daten). So führte, unabhängig von der Zelllinie, eine Induktion von 2 Doppelstrangbrüchen nach 24 h zu einer Reduktion des Überlebens um 50 %. Eine Induktion von 4 Brüchen senkte das Überleben im Vergleich zur Kontrolle auf 28 %. Die Anzahl der residuellen Brüche bestimmt in Tumorzellen die Zellinaktivierung (Dewey et al., 1995; Dikomey and Brammer, 2000; Kasten-Pisula et al., 2005; Kelland et al., 1988). Dass der biologische Zusammenhang von der Anzahl vorhandener DNA-Doppelstrangbrüchen und Zellinaktivierung nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab und Röntgenstrahlen identisch ist, zeigt dass sich die erzeugten DNA-Brüche hinsichtlich ihrer Komplexität aufgrund der hohen Energie von  $^{90}\text{Y}$  (2,28 MeV) nicht von durch Röntgenstrahlen erzeugten Schäden unterscheiden.

## 7.7. $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab und Radioimmuntherapie im Mausmodell und Menschen

Die hier vorgestellten Zellkulturuntersuchungen klären die grundsätzlichen Mechanismen, welche einer Inaktivierung von Zellen durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab zugrunde liegen.

So werden in mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelten Zellen durch das radioaktive Isotop DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt. Die Anzahl der erzeugten Schäden wird dabei von der EGFR Expression der behandelten Zellen bestimmt und definiert auch die Menge der über längere Zeiträume akkumulierten DNA-Brüche. Da unreparierte DNA-Schäden für sich teilende Zellen ein letales Ereignis darstellen, werden die

Zellen bei einer Behandlung mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit ihrer EGFR Expression inaktiviert.

Eine Immobilisierung der radioaktiven Antikörper in den EGFR überexprimierenden Geweben kann aber neben der zellulären EGFR Expression auch von anderen Faktoren, welche die Bioverfügbarkeit beeinflussen, bestimmt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Tumorangiogenese (Aerts et al., 2007; Aerts et al., 2009; Niu et al., 2009).

Dennoch wurde bereits gezeigt, dass die zelluläre EGFR Expression auch im Tiermodell bei EGFR gerichteten Radioimmuntherapien die Anreicherung der Aktivität bestimmt. Faktoren wie das Gefäßsystem beeinflussen nicht die Anreicherung der Substanzen im Zielgewebe (Cai et al., 2008; Eiblmaier et al., 2008; Li et al., 2008).

Eine Anwendung von <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab in Patienten ist, auch aufgrund der Daten dieser Studie, als mittelfristiges Ziel der Bemühungen zu betrachten. Bei einer solchen Behandlung von Patienten mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab würde der Wirkstoff über das Gefäßsystem appliziert. Eine solche systemische Therapie soll nicht nur eine Dosisdeposition im Tumor, sondern auch in unbekanntem Metastasen ermöglichen.

Unsere Kooperationspartner haben parallel zu unseren Versuchen bereits erste Studien mit FaDuDD Xenografts durchgeführt, um die Wirksamkeit von <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab im Tumormodell zu verifizieren.

Eine Gabe von 2,5 MBq in 13 µg <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab in Kombination mit einer externen Bestrahlung von 26 Gy ergab einen Anstieg der lokalen Tumorkontrolle von 20 % auf 90 % im Vergleich zu Bestrahlung mit 13 µg unmarkiertem DTPA-Cetuximab oder nur Bestrahlung allein (Koi et al., unveröffentlichte Daten).

Einen ähnlichen Erfolg konnte in einem Modellsystem für Blasenkarzinome erzielt werden (Pfoest et al., 2009). In dieser Arbeit wurde durch die Gabe von EGFR überexprimierenden EJ25-luc Zellen über einen Katheter ein Xenograft etabliert, welches sich aufgrund der Luziferaseexpression der Tumorzellen leicht beobachten ließ. Nach einer Behandlung mit dem EGFR gerichteten Antikörper <sup>213</sup>Bi-DTPA-Matuzumab konnte das durchschnittliche Überleben im Vergleich zur

Kontrolle sowohl mit einer Behandlung von 0,37 MBq als auch mit 0,925 MBq von 41 auf über 300 Tage gesteigert werden. Aufgrund der kurzen Reichweite von <sup>213</sup>Bi fanden sich diese starken Effekte jedoch nur, wenn die Behandlung 1 Tag nach Implantation der Tumorzellen begonnen wurde. Beginn die Behandlung zu späteren Zeitpunkten, zum Beispiel an Tag 14 nach Inokulation der Tumorzellen, so sank das mittlere Überleben auf 55 Tage. Begründet wurde dies damit, dass eine Behandlung von bereits großen Tumoren mit <sup>213</sup>Bi-DTPA-Matuzumab aufgrund der kurzen Reichweite von <sup>213</sup>Bi nicht zu einer Schädigung aller Tumorzellen führt, da der Tumor nicht vollständig penetriert werden konnte. Eine mögliche Behandlung von Metastasen ist davon jedoch nicht betroffen.

Ein kritischer Faktor von Radioimmuntherapien sind mögliche Nebenwirkungen. Der Ansatz der Radioimmuntherapie verspricht eine zusätzliche Dosisdeposition bei minimaler Belastung von Normalgeweben durch die Diskriminierung von Zielgewebe und Normalgewebe über die Expression des Antigens. Eine vergleichende Studie von Seidl et al. (2011) betrachtete die Nebenwirkungen von <sup>213</sup>Bi-d9MAb sowie <sup>177</sup>Lu-d9MAb bei der Behandlung von d9-E-cadherin exprimierenden Xenografts eines Peritonealkarzinoms. Sowohl eine Behandlung mit <sup>213</sup>Bi-d9MAb als auch mit <sup>177</sup>Lu-d9MAb führte zu einem verbessertem Überleben der Tiere, jedoch waren für ein vergleichbar verbessertes Überleben 7,4 MBq <sup>177</sup>Lu-d9MAb und 1,85 MBq <sup>213</sup>Bi-d9MAb notwendig. Hinzu kommt, dass aufgrund der deutlich längeren Halbwertszeit von <sup>177</sup>Lu (6,734 Tage) im Vergleich zu <sup>213</sup>Bi (45,59 min) die Belastung für das Normalgewebe stärker ausfällt. So konnte nach einer Therapie mit <sup>177</sup>Lu-d9MAb in den Tieren eine deutliche Abnahme der Leukozyten und Erythrozyten beobachtet werden. Darüber hinaus wurde in einigen Tieren Lymphadenopathie (eine Veränderung der Lymphknoten mit ersten Zeichen eines lymphoblastischen Lymphoms), Plasmazytomie (Entartung der Plasmazellen im Knochenmark) sowie frühe Stadien von Hepatokarzinomen beobachtet (Seidl et al., 2011).

Auswirkungen auf die Anzahl der Leukozyten, Erythrocyten und Thrombocyten unter einer Radioimmuntherapie konnte auch für eine Behandlung mit dem Her2 gerichteten Antikörper <sup>111</sup>In-NLS-Trastuzumab beobachtet werden, obwohl sich dieses Isotop durch seine geringe Reichweite von wenigen nm auszeichnet. Der Effekt war nach Absetzen der Therapie jedoch reversibel (Costantini et al., 2010).

Eine mögliche Belastung von Normalgeweben ist jedoch der kritischste Parameter bei der Durchführung von Radioimmuntherapien. Solche Veränderungen wurden in den von unseren Kooperationspartnern mit <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab behandelten Tieren nicht beobachtet (Puttrich et al., unveröffentlichte Daten). Vor allem die Leber und Lymphknoten wiesen innerhalb des Beobachtungszeitraumes keine Auffälligkeiten auf.

PET-Untersuchungen unserer Kooperationspartner mit <sup>86</sup>Y-DTPA-Cetuximab zeigten eine starke unspezifische Anreicherung der Aktivität in Leber und Knochenmark der Tiere. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen anhand von <sup>111</sup>In-DTPA-Cetuximab (Wen et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, dass murine EGF-Rezeptoren keine geeigneten Epitope für Cetuximab darstellen (Luo et al., 2005), ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um unspezifische Anreicherungen handelt. So werden die Wirkstoffe zum Beispiel in der Leber verstoffwechselt. Für die Anreicherung der Antikörper im Knochenmark könnten auch immunologische Effekte verantwortlich sein.

Solche Effekte können, wenn man annimmt dass sie allgemeingültig für Therapien mit Antikörpern sind, auch die bereits beobachteten Nebenwirkungen auf Leber und Knochengewebe erklären, die in anderen radioimmunologischen Ansätzen wie zum Beispiel mit <sup>111</sup>In-NLS-Trastuzumab oder <sup>177</sup>Lu-d9MAb beobachtet wurden (Costantini et al., 2010; Seidl et al., 2011).

Die Xenograftdaten zu Normalgewebsreaktionen zeigen, wie wichtig es ist, dass bei einer späteren Anwendung im Patienten eine starke Überexpression des EGF-Rezeptors vorliegt, da auch Normalgewebe des Menschen den EGF-Rezeptor exprimieren und das Ausmaß der Normalgewebsschädigung höher sein kann.

Es gibt bereits erste Untersuchungen zu EGFR gerichteten, radioaktiv markierten Antikörpern im Menschen mit bildgebenden Methoden. Diese können einen Hinweis auf die Verteilung der Antikörper und damit auf eine mögliche Belastung geben.

Bei einer Untersuchung der Bioverteilung nach einer Gabe von 1110 MBq und 2220 MBq <sup>99</sup>Tc-h-R3, konnte die Verteilung der Aktivität in den Patienten für die Zeiträume von 5 min bis 24 h nach Gabe des Antikörpers beschrieben werden. Neben einer Anreicherung in den jeweiligen Tumoren der Patienten fanden sich Belastungen der (nach Intensität sortiert) Leber, Niere, Dickdarms, Herzens sowie

der Bauchspeicheldrüse. Während die Belastungen von Leber, Niere und Herz während des Beobachtungszeitraumes abnahmen, blieb die Belastung der Bauchspeicheldrüse unverändert und die des Dickdarmes stieg. So sank im genannten Zeitraum die Belastung der Leber zerfallsbereinigt von 55 % der Gesamtaktivität auf 20 %, der Nieren von 42 % auf 15 % und des besonders strahlenempfindlichen Herzens von 3 % auf 0,5 % der ursprünglichen Gesamtmenge. Dies geschieht darüber hinaus unabhängig von der Gesamtmenge des ursprünglich verabreichten Antikörpers. So schieden Patienten, welche mit 3mg <sup>90</sup>TC-h-R3 behandelt wurden, die Aktivität mit derselben Kinetik aus wie solche, die mit 6 mg <sup>90</sup>TC-h-R3 behandelt wurden (Torres et al., 2005).

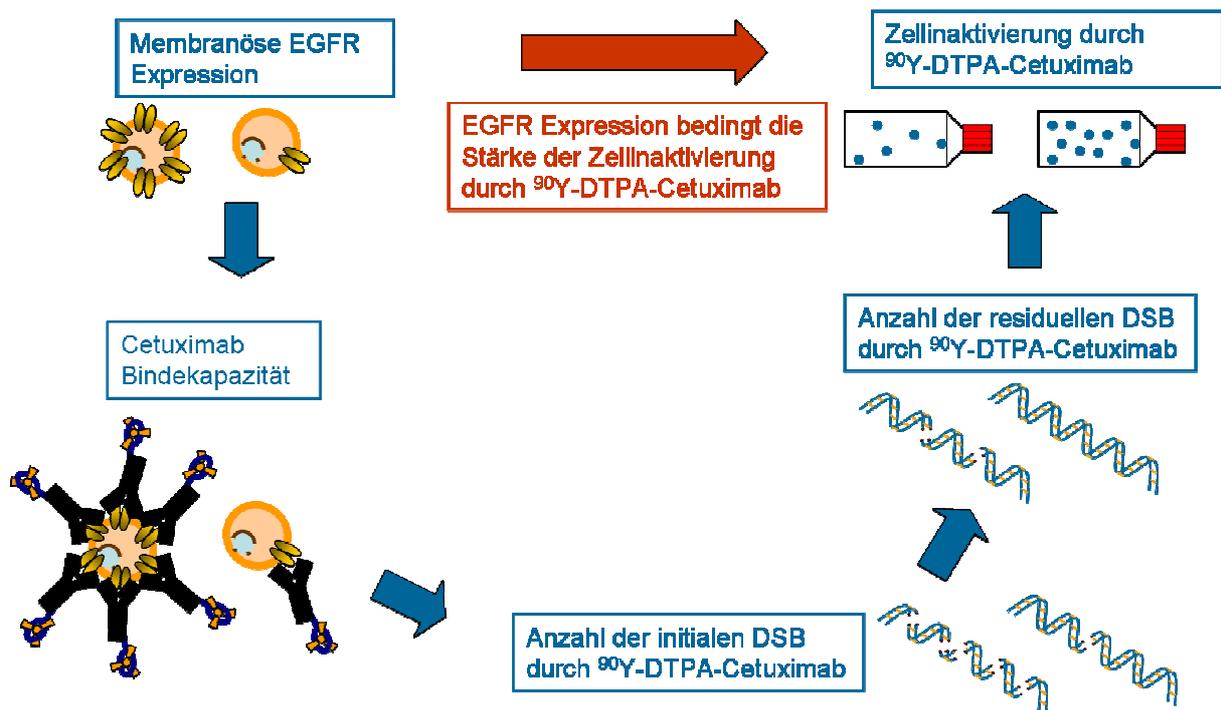
Untersuchungen mit <sup>188</sup>Re-Nimotuzumab und <sup>123</sup>I-Cetuximab an Patienten mit malignen Gliomen konnten zeigen, dass die Antikörper nicht nur die Blut-Hirn Schranke passieren können (Rades et al., ; Rades et al., 2009), sondern sich auch im Vergleich zu Leber, Niere und Blase um den Faktor 50 stärker im Tumor anreichern. Gründe für diesen deutlichen Erfolg sind neben der Überexpression des EGFR in den untersuchten Tumoren wahrscheinlich auch die gute Durchblutung des Hirns (Torres et al., 2008).

Die in diesem Kooperationsprojekt getestete Anwendung von <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab im Xenograft zeigte erste Erfolge bei der Kombinationstherapie mit externer Bestrahlung. PET Untersuchungen von Mäusen zeigten jedoch, dass es zu einer Belastung von Leber und Knochenmark kommt. Fernziel dieses Ansatzes ist der klinische Einsatz von <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab. Auf dem Weg dorthin sind weiterführende Untersuchungen im Xenograft als auch PET-Verteilungsstudien im Menschen notwendig.

## 7.8. Ausblick

Die hier vorgestellte Studie zu den grundsätzlichen Mechanismen, welche einer Inaktivierung von Zellen durch <sup>90</sup>Y-DTPA-Cetuximab zugrunde liegen, ist Teil eines Verbundprojektes mehrerer wissenschaftlicher Forschungseinrichtungen. Das langfristige Ziel der gesamten Forschungsgruppe ist die klinische Etablierung einer EGFR gerichteten Radioimmuntherapie unter Verwendung des klinisch etablierten Antikörpers Cetuximab. Hierzu wurden parallel zu den präsentierten Zellkulturuntersuchungen auch Experimente im Xenograft durchgeführt (vergl. Kapitel 7.7).

Die durch diese Studie erzielten Ergebnisse geben einen Aufschluss über Potenzial und Wirkungsweise des getesteten radioimmunologischen Ansatzes zur Inaktivierung von humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien durch die Verwendung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab. Die Daten zeigen, dass  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab an den auf der Oberfläche von Zellen exprimierten EGFR bindet. Die Anzahl der gebundenen  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab Moleküle hängt dabei von der zellulären EGFR-



**Abbildung 38: Konzept der Zellinaktivierung durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit der zellulären EGFR Expression.** Die membranöse EGFR Expression bestimmt die Cetuximabbindekapazität und damit die applizierte Dosis. Dies führt zu einer unterschiedlichen Akkumulation von DNA-Schäden und damit zu einer spezifischen Inaktivierung von Zellen mit starker EGFR Expression.

Expression ab. Zellen mit starker EGFR Expression akkumulieren höhere Aktivitäten als Zelllinien mit geringer EGFR Expression. Dadurch wird in diesen Zellen auch eine höhere Dosis appliziert.

Dies führt dazu, dass die Anzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche ebenfalls durch die zelluläre EGFR Expression bestimmt wird.

Darüber hinaus bedingt sie auch, wie viele Brüche in den Zelllinien akkumulieren und als residuelle, unreparierte DNA-Schäden verbleiben. Da unreparierte DNA-DSB zu Chromosomenschäden und dem Verlust von Erbinformationen führen können, werden die Zellen in Abhängigkeit der angehäuften Doppelstrangbrüche inaktiviert. In

der Konsequenz bedeutet dies, dass mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelte Zellen in Abhängigkeit ihrer EGFR Expression inaktiviert werden können. Zellen mit hoher EGFR Expression werden stärker inaktiviert als Zellen mit niedriger EGFR Expression.

Damit ist die Grundvoraussetzung für eine Behandlung von EGFR überexprimierenden Tumoren und Metastasen bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes mit geringer EGFR Expression gegeben. Eine endgültige Abschätzung über die Schädigung von Normalgeweben kann jedoch nur ein geeignetes Tiermodell geben. Entweder durch eine Verwendung von z.B.  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab im Affenmodell oder die Verwendung eines radioaktiven Antikörpers der gegen murine EGFR gerichtet ist in einem Maustumormodell.

Im Hinblick auf eventuelle Nebenwirkungen durch eine Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wird innerhalb des Kooperationsprojektes auch ein Einsatz von  $^{117}\text{Lu}$ -DTPA-Cetuximab erwogen. Diese Substanz zeichnet sich durch eine deutlich geringere Reichweite gegenüber  $^{90}\text{Y}$  aus (1 mm vs. 10 mm), eine Belastung von umliegenden Geweben wird daher verringert. Unspezifische Anreicherungen können jedoch weiterhin zu Effekten führen, auch in Hinblick auf die mehr als doppelt so lange Halbwertszeit von  $^{117}\text{Lu}$  gegenüber dem  $^{90}\text{Y}$  (161 h vs. 64 h). Hierbei ist eine molekularbiologische Abschätzung des Schädigungspotenzials von  $^{117}\text{Lu}$ -DTPA-Cetuximab im Vergleich zu  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab natürlich hilfreich und wird Bestandteil zukünftiger Studien sein.

Dass eine solche Strategie bei einer Behandlung von soliden Tumoren die Dosen applizieren kann, welche für eine vollständige Tumorkontrolle notwendig sind, ist dabei eher unwahrscheinlich. Eine Kombination mit externer Bestrahlung, wie sie auch in den Xenograftmodell unserer Kooperationspartner durchgeführt wurde, ist daher notwendig.

Weiterführende Studien in Zellkultur könnten dabei eine sinnvolle Möglichkeit sein, das zellinaktivierende Potenzial einer Kombinationsbehandlung dahingehend einzuschätzen, ob der Effekt einer externen Dosisapplikation sich eventuell synergistisch auf eine interne Bestrahlung durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab auswirkt (vergl. Rades et al., 2009).

Darüber hinaus gibt es innerhalb des Verbundprojektes die Bestrebung das DTPA-Cetuximab Gerüst durch das Einfügen eines Lipidteils oder von dendrischen Verzweigungen des Chelators zu verändern, um die biologische Wirksamkeit und die spezifische Aktivität zu verbessern. Die neuen Strukturen werden ebenfalls vor einem weiteren Einsatz in Tiermodellen durch *in vitro* Untersuchungen auf ihr zellinaktivierendes Potenzial im Vergleich zu  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab untersucht werden müssen.

Unabhängig von der weiteren Entwicklung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab ist aufgrund der Literaturdaten als auch der durch diese Studie hinzugewonnenen Erkenntnisse schon jetzt deutlich, dass die Radioimmuntherapie in Zukunft einen bedeutenden Anteil in der Therapie von malignen Erkrankungen einnehmen wird, da sie eine auf den Patienten maßgeschneiderte Möglichkeit bietet, vorhandene strahlentherapeutische Ansätze zu erweitern und bislang schwer behandelbare Krankheitsbilder, wie Tumore mit starker EGFR Überexpression und EGFR überexprimierende Metastasen, einer effizienten Strahlentherapie zu unterziehen.

## 8. Anhang

### 8.1. Abbildungsverzeichnis

*Abbildung 1: Anteil der Strahlentherapie an kurativen Behandlungen. Alleinig oder in Kombination mit Chemotherapie bzw. Chirurgie hat die Strahlentherapie einen Anteil von ca. 50 % an allen kurativen Behandlungen (Batzler, 2008; Dikomey, 2010).* \_\_\_\_\_ 5

*Abbildung 2: Klassische Reparaturmechanismen zur Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen in eukaryotischen Zellen. Die DNA Brüche können entweder durch A) das nicht homologe End-Joining, B) die homologe Rekombination oder C) das Single Strand Annealing repariert werden. Das nicht homologe End-Joining kann aufgrund von Endresektionen mit einem Verlust von Information einhergehen. Das Single Strand Annealing geht dagegen zwangsläufig mit einem Verlust von Informationen einher. Nur die Homologe Rekombination bietet die Möglichkeit einer fehlerfreien Reparatur, benötigt hierfür jedoch ein Schwesterchromatid und kann daher nur in der G2 Phase stattfinden (verändert nach Dahm-Daphi).* \_\_\_\_\_ 9

*Abbildung 3: Dosisabhängigkeit der Wahrscheinlichkeit einer lokalen Tumorkontrolle und dem Auftreten von Komplikationen im Normalgewebe. Mit steigender Strahlendosis steigt die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Tumorkontrolle (blau). Da jedoch während einer Strahlentherapie eine Schädigung des Normalgewebes im Bestrahlungsfeld nicht zu vermeiden ist, steigt mit zunehmender Dosis auch die Wahrscheinlichkeit von Komplikationen im Normalgewebe (rot). Die Wahrscheinlichkeit einer komplikationsfreien Heilung (grün) ergibt sich aus dem Integral der Tumorkontrollwahrscheinlichkeit abzüglich der Wahrscheinlichkeit einer komplikationsfreien Heilung und erreicht nie 100%. Dieser Zusammenhang stellt das Grundproblem der Strahlentherapie dar. Daher ist die verordnete Dosis stets ein Kompromiss aus maximal möglicher Schädigung des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes.* \_\_\_\_\_ 11

*Abbildung 4: Signalweiterleitung nach Aktivierung des EGFR. Die Bindung von Liganden stimuliert die Dimerisierung des EGFR. Dies führt zur Aktivierung seiner Kinasedomäne. In Abhängigkeit des Liganden und Dimerisierungspartners können verschiedene Signalwege stimuliert werden. Die bedeutsamsten sind der MAPK Signalweg (Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur), der Akt Signalweg (Angiogenese, Stressantwort, Apoptose), der JAK/STAT Signalweg (Proliferation, Onkogenese) sowie der Proteinkinase C Signalweg (Differenzierung, Apoptose). Die Internalisierung des EGFR kann neben der Degradation oder dem Recycling des Proteins auch zu einer Translokation des EGFR in nukleäre Kompartimente führen. Es wird angenommen, dass dies insbesondere als Reaktion auf Stress geschieht und einen Einfluss auf die DNA Reparatur haben könnte (Inhalt nach Nyati et al., 2006).* \_\_\_\_\_ 15

*Abbildung 5: Aufbau von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab. Das radioaktive Ion  $^{90}\text{Y}^{2+}$  wird aufgrund seiner Ladung in der negativ geladenen Tasche des DTPA immobilisiert. DTPA ist an Lysinreste des Antikörpers gekoppelt. Die Synthese erfolgt ungerichtet, so dass die genaue Lokalisation des DTPA am Cetuximab unbekannt ist.* \_\_\_\_\_ 25

*Abbildung 6: Austragsschema für Zellen. Bei der Inkubation mehrerer verschiedener Zelllinien mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab unter der Verwendung von nur einer 12-Well Platte wurden die verschiedenen Zelllinien (A, B und C) so ausgesät, dass eine Querbstrahlung von Wells verschiedener Zelllinien minimiert wird.* \_\_\_\_\_ 30

*Abbildung 7: Durchführung von Bestrahlungsexperimenten unter der Verwendung von DTPA-Cetuximab /  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab. Zur Durchführung von Bestrahlungsexperimenten unter der Verwendung von  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurden die Zellen für 5 min mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inkubiert um eine Bindung des Antikörpers an den EGF-Rezeptor zu ermöglichen. Falls eine Reparatur der Schäden blockiert werden sollte, wurde dieser Schritt auf Eis ausgeführt, ansonsten jedoch bei Raumtemperatur (RT). Nach dem Abwaschen der ungebundenen Antikörper wurden die Platten für verschiedene Zeiträume inkubiert um eine Akkumulation der Schäden zu ermöglichen. Auch hier wurden die Kulturen gekühlt gelagert falls eine Reparatur ausgeschlossen werden sollte, ansonsten jedoch im Brutschrank.* \_\_\_\_\_ 31

*Abbildung 8: Aufreinigungsschema der differentiellen Zentrifugation. Durch eine Beschallung der Proben werden die Zellen aufgebrochen, so dass lipophile und Makrostrukturen bei einem Zentrifugationsschritt von cytoplasmatischen Bestandteilen der Zelle abgetrennt werden können. Unter Verwendung eines detergenzhaltigen Lösungsmittels werden die membranösen Kompartimente wie die äußere Zellmembran, aber auch Organellen wie der Golgiapparat und das endoplasmatische Reticulum, in Lösung gebracht. In einem*

weiteren Zentrifugationsschritt verbleiben diese im Überstand, während die Kerne, Mitochondrien und andere Makrostrukturen abgetrennt werden können. \_\_\_\_\_ 33

Abbildung 9: Aufbau des Western Blottes. Um die nach der Gelelektrophorese im SDS-Gel befindlichen Proteine auf eine PVDF-Membran zu übertragen wird das Gel im Western Blot zusammen mit der PVDF-Membran zwischen Filterpapier und Schwämmen fixiert und im Transferpuffer einem Spannungsfeld ausgesetzt. Die im Gel befindlichen Proteine sind durch die Beladung mit SDS negativ maskiert und wandern im Spannungsfeld Richtung Anode, werden jedoch an der lipophilen Oberfläche der PVDF-Membran immobilisiert. \_\_\_\_\_ 35

Abbildung 10: Prinzip der Immunfluoreszenz. Das Prinzip des mikroskopischen Nachweises von immunologisch fluoreszenzmarkierten Strukturen am Beispiel der Anfärbung des Proteins  $\gamma$ H2AX zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. a) Die Zielstruktur wird über einen spezifischen Erstantikörper erkannt und markiert. In einem zweiten Schritt wird die Aggregation des Erstantikörpers über einen zweiten Antikörper nachgewiesen, welcher spezifisch die schwere Kette des ersten Antikörpers bindet und an ein fluoreszierendes Protein gekoppelt ist. Bei Bestrahlung mit der entsprechenden Wellenlänge emittiert dieses selbst Licht einer definierten Wellenlänge, die im Mikroskop unter Verwendung entsprechender Filter sichtbar gemacht werden kann. b) Beispielhafte Abbildung des Nachweises der Aggregation von  $\gamma$ H2AX an DNA-Doppelstrangbrüchen. Der gegen das  $\gamma$ H2AX Protein gerichtete Erstantikörper wurde unter Verwendung des Farbstoffes Alexa 564 nachgewiesen und erscheint unter dem Mikroskop rot. Zusätzlich wurde die DNA mit Diamidinphenylindol (DAPI) angefärbt und erscheint blau. \_\_\_\_\_ 39

Abbildung 11: Expression und Verteilung des EGFR in zwölf Kopf- Halstumorzelllinien. Die Proteinextrakte der einzelnen Kompartimente wurden per differentieller Zentrifugation getrennt. Die EGFR Expression wurde über einen Western Blot bestimmt. Das Gel wurde mit den Extrakten aus 50.000 Zellen beladen. Die Reinheit der Fraktionen wurde über spezifische Proteine überprüft. Als Marker dienten die cytosolische Protease Calpain für das Cytoplasma (c), das Chaperon Calnexin für membranöse Strukturen (m) sowie das Histon H2B für die nukleäre Fraktion (n). \_\_\_\_\_ 49

Abbildung 12: Heterogenität der EGFR Proteinexpression in 12 Plattenepithel-karzinomzelllinien. Durch die Auswertung der Signalintensität aller Fraktionen (vergl. Abbildung 11) und Addition der Signale der einzelnen Kompartimente wurde die gesamt EGFR Expression berechnet. \_\_\_\_\_ 51

Abbildung 13: Verteilung des EGFR in verschiedenen Zellkompartimenten von 12 Plattenepithelkarzinomzelllinien. Durch die Auswertung der Signalintensität der jeweiligen Fraktionen (vergl. Abbildung 11) wurde die dazugehörige EGFR Expression berechnet (schwarz = Membran, weiß = Cytoplasma, grau = Kern). Die Zelllinien wurden von links nach rechts nach aufsteigender EGFR-Gesamtmenge sortiert. \_\_\_\_\_ 52

Abbildung 14: Verteilung des EGFR auf verschiedene Zellkompartimente. Durch die Auswertung der Signalintensität der jeweiligen Fraktionen (vergl. Abbildung 13) wurde die intrazelluläre Verteilung des EGFR berechnet. Die Verteilung wird als prozentualer Anteil dargestellt (schwarz = Membran, weiß = Cytoplasma, grau = Kern). Die Zelllinien wurden von links nach rechts nach aufsteigender EGFR Gesamtmenge sortiert. \_\_\_\_\_ 53

Abbildung 15: Cetuximab (C225) Bindung an lebende A431 Zellen. Für die Untersuchung wurden 100.000 lebende A431 Zellen ausgewertet. Die Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. Die Abbildung zeigt a) die Einzelzellmessungen als Funktion der Fluoreszenzintensität und b) die Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten. \_\_\_\_\_ 55

Abbildung 16: EGFR Oberflächenexpression verschiedener Plattenepithelkarzinomzelllinien. Die EGFR Oberflächenexpression wurde durch die Cetuximabbindekapazität lebender Zellen im FACS bestimmt. Die Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. Es wurden biologische Duplikate mit jeweils 100.000 Zellen nach einer Inkubation mit 30 nM Cetuximab untersucht. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate. \_\_\_\_\_ 56

Abbildung 17: Korrelation der im FACS gemessenen Cetuximab Bindekapazität mit der im Western Blot gemessenen EGFR Proteinmenge der Membranfraktion. Die EGFR Oberflächenexpression der zwölf Plattenepithelkarzinomzelllinien wurde per Western Blot Analyse von Membranextrakten (vergl. Abbildung 13) sowie flusszytometrisch anhand von Cetuximabbindekapazitätsstudien (vergl. Abbildung 16) bestimmt. \_\_\_\_\_ 57

Abbildung 18: H2AX Phosphorylierungskinetik in verschiedenen Kopf- / Halstumorzelllinien. Die Phosphorylierungskinetik des Proteins H2AX nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen als Marker für vorhandene DNA-Doppelstrangbrüche in den Zelllinien a) UT-SCC 14, b) FaDuDD, c) SAS sowie d) UT-SCC15. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung für verschieden lange Zeiten bei 37 °C inkubiert und anschließend per Immunfluoreszenz die Phosphorylierung von H2AX nachgewiesen. \_\_\_\_\_ 60

Abbildung 19: Einfluss der Temperatur auf den Nachweis von  $\gamma$ H2AX Foci. a) Einfluss einer Lagerung bei 4 °C auf unbestrahlte Zellen. Unbestrahlte UT-SCC 14 Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 h bis 12 h) bei 4 °C gelagert und anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. b) Einfluss einer Lagerung bei 4 °C für 12 h auf mit unterschiedlicher Dosis bestrahlte Zellen. UT-SCC 14 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen bestrahlt (0 Gy bis 0,6 Gy) und im Anschluss für 0 h bzw. 12 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. \_\_\_\_\_ 62

Abbildung 20: Einfluss der Temperatur auf den Nachweis von  $\gamma$ H2AX in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. a) Abnahme der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bei 4 °C. Mit 0,6 Gy bestrahlte UT-SCC 14 Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 h bis 12 h) bei 4 °C gelagert und anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. b) Direkter Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen durch eine Konstantfeldgelelektrophorese in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bei 4 °C. UT-SCC 14 Zellen wurden mit 60 Gy bestrahlt und für verschieden lange Zeiträume (0 h bis 12 h) bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Fragmentierung der DNA in einer Konstantfeldgelelektrophorese nachgewiesen. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt. \_\_\_\_\_ 63

Abbildung 21: Einfluss niedriger Temperaturen auf die  $\gamma$ H2AX Phosphorylierungskinetik von UT-SCC 14 Zellen. Mit 0,93 Gy bestrahlte UT-SCC 14 Zellen wurden für 3 h bei 4 °C gelagert und anschließend für verschieden lange Zeiträume (20 min bis 120 min) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und die  $\gamma$ H2AX Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. \_\_\_\_\_ 65

Abbildung 22: Einfluss der Lagerung von fixierten Zellen bei 4 °C auf die Anzahl der nachweisbaren  $\gamma$ H2AX Foci. FaDuDD Zellen wurden mit 0 Gy und 6 Gy bestrahlt und im Anschluss fixiert. Die fixierten Zellen wurden für bis zu 3 Wochen bei 4 °C gelagert und danach die  $\gamma$ H2AX Foci immunologisch nachgewiesen. \_\_\_\_\_ 66

Abbildung 23: Vergleich der Affinitäten von Cetuximab (C225) mit DTPA-Cetuximab (DTPA-C225) gegenüber EGFR. a) Die absolute Bindung der Antikörper C225 und DTPA-C225 an lebenden A431 Zellen. Es wurden biologische Duplikate mit jeweils 100.000 Zellen nach einer Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (0,03 nM bis 30 nM) Cetuximab sowie DTPA-Cetuximab untersucht. Die Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) im FACS nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate. b) Die relative Affinität von DTPA-C225 im Vergleich zu C225. Die in a) dargestellten Bindungsintensitäten wurden miteinander verrechnet. Die Bindungskapazität von DTPA-Cetuximab wird relativ zur Cetuximabbindung dargestellt. \_\_\_\_\_ 67

Abbildung 24: Kinetik der Bindung von DTPA-Cetuximab an lebenden Zellen unter verschiedenen Bedingungen. a) Bindungskinetik in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur für 4 °C und 37 °C bei einer Inkubation in PBS. Für die Untersuchung wurden 100.000 lebende A431 Zellen ausgewertet. Die Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 min bis 30 min) mit DTPA-Cetuximab inkubiert. Die Messung erfolgte aus biologischen Duplikaten. Die DTPA-Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) im FACS nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. b) Bindungskinetik in Abhängigkeit des Inkubationsmediums bei 4 °C. Für die Untersuchung wurden 100.000 lebende A431 Zellen ausgewertet. Die Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume (0 min bis 30 min) mit DTPA-Cetuximab inkubiert. Die Inkubation erfolgte in PBS, DMEM und DMEM + 10 % FCS. Die Messung erfolgte aus biologischen Duplikaten. Die DTPA-Cetuximabbindung wurde über einen FITC markierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 6) im FACS nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität pro Zelle gemessen. \_\_\_\_\_ 69

Abbildung 25: Effekt von Cetuximab (C225) und DTPA-Cetuximab (DTPA-C225) auf die Anzahl erzeugter Doppelstrangbrüche. UT-SCC 14 Zellen wurden mit und ohne 30 nM C225 sowie DTPA-C225 für 5 min auf Eis inkubiert und dabei mit 0,3 Gy bestrahlt. Anschließend wurden ungebundene Antikörper mit

Medium ausgewaschen, die Zellen für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend fixiert. Die induzierten  $\gamma$ H2AX Foci wurden immunologisch angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_\_\_\_\_ 71

Abbildung 26: Kinetik der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche. SAS Zellen wurden 3h bei 4 °C mit DTPA-Cetuximab (Startwert) beziehungsweise  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab (andere Zeitpunkte) inkubiert und anschließend für verschieden lange Zeiträume bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und  $\gamma$ H2AX als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_\_\_\_\_ 72

Abbildung 27: Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. UT-SCC 14 und UT-SCC 15 Zellen wurden für verschieden lange Zeiträume bei 4 °C mit 30 nM  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inkubiert. Anschließend wurde durch eine Inkubation bei 37°C für 20 min eine Erkennung und Markierung der DNA-Schäden ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma$ H2AX als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_\_\_\_\_ 74

Abbildung 28: Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der EGFR-Expression. Sechs Kopf- Halstumorzelllinien wurden für verschieden lange Zeiträume mit 30 nM DTPA-Cetuximab bzw.  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bei gleichzeitiger Unterdrückung der Reparatur durch eine Lagerung bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde durch eine Inkubation bei 37°C für 20 min eine Erkennung und Markierung der DNA-Schäden ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma$ H2AX als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_\_\_\_\_ 75

Abbildung 29: Vergleich der durch 1 Gy Röntgenstrahlung und 3 h  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab induzierten DNA-Doppelstrangbrüche. Die nach einer Bestrahlung mit 1 Gy nachgewiesenen initialen Doppelstrangbrüche (vergl. Abbildung 18) im Vergleich zu durch eine 3 h Inkubation mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab bei 4 °C induzierten Brüchen (vergl. Abbildung 28). Die Zellen wurden in beiden Experimenten nach der Schadensinduktion für 20 min bei 37 °C gelagert. Die DNA Doppelstrangbrüche wurden durch eine  $\gamma$ H2AX und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_ 76

Abbildung 30: Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche bei gleichzeitig stattfindender DNA-Reparatur. Die Zellen wurden sowohl mit 30 nM DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die Zellen wurden nach der Bindung der Antikörper für 24 h bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma$ H2AX als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_\_\_\_\_ 78

Abbildung 31: Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der Anzahl initial erzeugter DNA-Doppelstrangbrüche. Die Anzahl der durch eine a) 24 h bzw. b) 48 h Inkubation bei 37 °C akkumulierten DNA-Brüche (vergl. Abbildung 30) wurden mit den während einer 3 h Inkubation bei 4 °C erzeugten Schäden (vergl. Abbildung 28) verglichen. Die Zellen wurden sowohl mit 30 nM DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die DNA Schäden wurden durch eine  $\gamma$ H2AX und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_\_\_\_\_ 79

Abbildung 32: Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der EGFR Oberflächenexpression. Die Anzahl der durch eine a) 24 h bzw. b) 48 h Inkubation bei 37 °C akkumulierten DNA-Brüche (vergl. Abbildung 30) wurden mit der flusszytometrisch bestimmten EGFR Oberflächenexpression (vergl. Abbildung 16) verglichen. Die Zellen wurden sowohl mit 30 nM DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die DNA Schäden wurden durch eine  $\gamma$ H2AX und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen. \_\_\_\_\_ 80

*Abbildung 33: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche 24 h nach einer einmaligen Bestrahlung mit 3 Gy Röntgenstrahlen sowie einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab für 24 h. Die Zellen wurden entweder mit 3 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt oder mit 30 nM DTPA-Cetuximab sowie mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und  $\gamma\text{H2AX}$  als auch 53Bp1 Foci per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Anzahl der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 200 Zellen.* \_\_\_\_\_ 82

*Abbildung 34: Wachstumsverzögerung durch Behandlung mit DTPA-Cetuximab. Die Wachstumsverzögerung durch DTPA-Cetuximab gegenüber unbehandelten Zellen wurde über einen Proliferationsassay bestimmt. Hierfür wurden die Zellen analog zu einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab inkubiert. Nach dem Mediumswechsel bzw. der Behandlung mit DTPA-Cetuximab wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C inkubiert, anschließend abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Die Werte der mit DTPA-Cetuximab behandelten Zellen wurden auf die unbehandelten Proben abgeglichen.*\_\_\_\_\_ 83

*Abbildung 35: Zellinaktivierung durch eine Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab. Die Zelllinien wurden nach der Behandlung mit 30 nM DTPA-Cetuximab bzw.  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für einen Kolonietest ausgesät. Die Anzahl der Kolonien nach Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurde auf die Anzahl der nach einer Behandlung mit DTPA-Cetuximab angewachsenen Kolonien abgeglichen. Die Werte der mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelten Zellen wurden auf die mit DTPA-Cetuximab behandelten Proben abgeglichen. Die Messung erfolgte in Duplikaten.*\_\_\_\_\_ 84

*Abbildung 36: Zellüberleben nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit der akkumulierten DNA-Doppelstrangbrüche. Das Zellüberleben verschiedener Zelllinien (vergl. Abbildung 35) wurde mit der Anzahl der nach a) 24 h bzw. b) 48 h Inkubation bei 37 °C akkumulierten DNA-Brüche (vergl. Abbildung 30) korreliert. Die Zellen wurden sowohl mit DTPA-Cetuximab bzw. mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die Anzahl der Kolonien nach Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurde auf die Anzahl der nach einer Behandlung mit DTPA-Cetuximab angewachsenen Kolonien abgeglichen. Die DNA Schäden wurden durch eine  $\gamma\text{H2AX}$  und 53Bp1 Immunfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der der unter DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche wurde von der Anzahl der durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche subtrahiert.* \_\_\_\_\_ 85

*Abbildung 37: Zellüberleben nach einer Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit der EGFR Oberflächenexpression. Das Zellüberleben verschiedener Zelllinien (vergl. Abbildung 35) wurde mit der flusszytometrisch bestimmten EGFR Oberflächenexpression (vergl. Abbildung 16) korreliert. Die Zellen wurden sowohl mit DTPA-Cetuximab als auch mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab behandelt. Die Anzahl der Kolonien nach Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab wurde auf die Anzahl der nach einer Behandlung mit DTPA-Cetuximab angewachsenen Kolonien abgeglichen.*\_\_\_\_\_ 86

*Abbildung 38: Konzept der Zellinaktivierung durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in Abhängigkeit der zellulären EGFR Expression. Die membranöse EGFR Expression bestimmt die Cetuximabbindekapazität und damit die applizierte Dosis. Dies führt zu einer unterschiedlichen Akkumulation von DNA-Schäden und damit zu einer spezifischen Inaktivierung von Zellen mit starker EGFR Expression.* \_\_\_\_\_ 108

## 8.2. Literaturverzeichnis

**Aerts, H. J., Dubois, L., Hackeng, T. M., Straathof, R., Chiu, R. K., Lieuwes, N. G., Jutten, B., Weppler, S. A., Lammering, G., Wouters, B. G. et al.** (2007). Development and evaluation of a cetuximab-based imaging probe to target EGFR and EGFRvIII. *Radiother Oncol* **83**, 326-32.

**Aerts, H. J., Dubois, L., Perk, L., Vermaelen, P., van Dongen, G. A., Wouters, B. G. and Lambin, P.** (2009). Disparity between in vivo EGFR expression and 89Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET. *J Nucl Med* **50**, 123-31.

**Ang, K. K., Andratschke, N. H. and Milas, L.** (2004). Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 959-65.

**Ang, K. K., Berkey, B. A., Tu, X., Zhang, H. Z., Katz, R., Hammond, E. H., Fu, K. K. and Milas, L.** (2002). Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* **62**, 7350-6.

**Bailey, K. E., Costantini, D. L., Cai, Z., Scollard, D. A., Chen, Z., Reilly, R. M. and Vallis, K. A.** (2007). Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the nuclear localization and cytotoxicity of the Auger electron emitting radiopharmaceutical 111In-DTPA human epidermal growth factor. *J Nucl Med* **48**, 1562-70.

**Bajrovic, A., Rades, D., Fehlauer, F., Tribius, S., Hoeller, U., Rudat, V., Jung, H. and Alberti, W.** (2004). Is there a life-long risk of brachial plexopathy after radiotherapy of supraclavicular lymph nodes in breast cancer patients? *Radiother Oncol* **71**, 297-301.

**Bakkenist, C. J. and Kastan, M. B.** (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.

**Baselga, J.** (2001). Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol* **19**, 41S-44S.

**Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K. et al.** (2000). Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* **18**, 904-14.

**Batzler, H., Husmann, Kaatsch, Katalinic, Kieschke, Kraywinkel, Meyer, Stabenow, Stegmaier** (2008). Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin.

**Baumann, H. T., Matthiessen W, Koch R, Strelocke K, Paul U.** (1997). CHARTWEL-Bronchus (ARO 97-1): a randomized multicenter trial to compare conventional fractionated radiotherapy with CHARTWEL radiotherapy in inoperable non-small-cell bronchial carcinoma. *Strahlenther Onkol* **197 Dec;173(12):663-7**.

**Beels, L., Werbrouck, J. and Thierens, H.** (2010). Dose response and repair kinetics of gamma-H2AX foci induced by in vitro irradiation of whole blood and T-lymphocytes with X- and gamma-radiation. *Int J Radiat Biol* **86**, 760-8.

**Beyreuther, E., Lessmann, E., Pawelke, J. and Pieck, S.** (2009). DNA double-strand break signalling: X-ray energy dependence of residual co-localised foci of gamma-H2AX and 53BP1. *Int J Radiat Biol* **85**, 1042-50.

**Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S. A., Zhu, J. et al.** (2009). Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* **11**, 21-8.

**Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S. A., Zhu, J. et al.** (2010). Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* **11**, 21-8.

**Borgmann.** (2009). Prädiktion der Nebenwirkungen nach Strahlentherapie In *Fachbereich Medizin der Universität Hamburg*, vol. PD. Hamburg: University of Hamburg.

**Brandt, B., Meyer-Staekling, S., Schmidt, H., Agelopoulos, K. and Buerger, H.** (2006). Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* **12**, 7252-60.

- Bucci, B., D'Agnano, I., Botti, C., Mottolese, M., Carico, E., Zupi, G. and Vecchione, A.** (1997). EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications. *Anticancer Res* **17**, 769-74.
- Büll, S., Biersack, Knapp, Reiners.** (2001). Nuklearmedizin. Stuttgart: Thieme.
- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W. and Yokoyama, S.** (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* **12**, 541-52.
- Burma, S., Chen, B. P. and Chen, D. J.** (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1042-8.
- Cai, Z., Chen, Z., Bailey, K. E., Scollard, D. A., Reilly, R. M. and Vallis, K. A.** (2008). Relationship between induction of phosphorylated H2AX and survival in breast cancer cells exposed to <sup>111</sup>In-DTPA-hEGF. *J Nucl Med* **49**, 1353-61.
- Chen, P., Mrkobrada, M., Vallis, K. A., Cameron, R., Sandhu, J., Hendler, A. and Reilly, R. M.** (2002). Comparative antiproliferative effects of (<sup>111</sup>In)-DTPA-hEGF, chemotherapeutic agents and gamma-radiation on EGFR-positive breast cancer cells. *Nucl Med Biol* **29**, 693-9.
- Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Dykxhoorn, D. M., Weinstock, D. M., Pfeifer, G. P. and Lieberman, J.** (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell* **31**, 33-46.
- Costantini, D. L., McLarty, K., Lee, H., Done, S. J., Vallis, K. A. and Reilly, R. M.** (2010). Antitumor effects and normal-tissue toxicity of <sup>111</sup>In-nuclear localization sequence-trastuzumab in athymic mice bearing HER-positive human breast cancer xenografts. *J Nucl Med* **51**, 1084-91.
- Das, A. K., Chen, B. P., Story, M. D., Sato, M., Minna, J. D., Chen, D. J. and Nirodi, C. S.** (2007). Somatic mutations in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor (EGFR) abrogate EGFR-mediated radioprotection in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* **67**, 5267-74.
- Dewey, W. C., Ling, C. C. and Meyn, R. E.** (1995). Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **33**, 781-96.
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. and Wahl, G. M.** (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**, 2540-51.
- Diaz, A., Suarez, E., Blanco, R., Badia, T., Rivero, D., Lopez-Requena, A., Lopez, A. and Montero, E.** (2007). Functional expression of human-epidermal-growth-factor receptor in a melanoma cell line. *Biotechnol Appl Biochem* **48**, 21-7.
- Dikomey, E.** (2010). Biophysik und Strahlenbiologie. Hamburg.
- Dikomey, E. and Brammer, I.** (2000). Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line. *Int J Radiat Biol* **76**, 773-81.
- Dikomey, E. and Lorenzen, J.** (1993). Saturated and unsaturated repair of DNA strand breaks in CHO cells after X-irradiation with doses ranging from 3 to 90 Gy. *Int J Radiat Biol* **64**, 659-67.
- Dittmann, K., Mayer, C., Kehlbach, R. and Rodemann, H. P.** (2008). Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol Cancer* **7**, 69.
- Dittmann, K., Mayer, C. and Rodemann, H. P.** (2005). Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol* **76**, 157-61.
- Dittmann, K., Mayer, C. and Rodemann, H. P.** (2010). Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol* **186**, 1-6.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J. et al.** (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**, 435-46.

- Dorr, W. and Hendry, J. H.** (2001). Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* **61**, 223-31.
- Earp, H. S., Dawson, T. L., Li, X. and Yu, H.** (1995). Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* **35**, 115-32.
- Eiblmaier, M., Meyer, L. A., Watson, M. A., Fracasso, P. M., Pike, L. J. and Anderson, C. J.** (2008). Correlating EGFR expression with receptor-binding properties and internalization of <sup>64</sup>Cu-DOTA-cetuximab in 5 cervical cancer cell lines. *J Nucl Med* **49**, 1472-9.
- Fan, Z., Masui, H., Altas, I. and Mendelsohn, J.** (1993). Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* **53**, 4322-8.
- Föhe, C. and Dikomey, E.** (1994). Induction and repair of DNA base damage studied in X-irradiated CHO cells using the *M. luteus* extract. *Int J Radiat Biol* **66**, 697-704.
- Goike, H. M., Asplund, A. C., Pettersson, E. H., Liu, L., Sanoudou, D. and Collins, V. P.** (1999). Acquired rearrangement of an amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in a human glioblastoma xenograft. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 697-701.
- Goldenberg, D. M. and Sharkey, R. M.** (2007). Novel radiolabeled antibody conjugates. *Oncogene* **26**, 3734-44.
- Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P. and Mendelsohn, J.** (1995). Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* **1**, 1311-8.
- Grandis JR, M. M., Barnes EL.** (1996). Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **78**, 1284-1292.
- Grandis, J. R. and Tweardy, D. J.** (1993). TGF- $\alpha$  and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl* **17F**, 188-91.
- Grosser, T., Chang, H., Fontenay, G., Chen, J., Costes, S. V., Helen Barcellos-Hoff, M., Parvin, B. and Rydberg, B.** (2011). Persistence of gamma-H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to gamma-rays or iron ions. *Int J Radiat Biol*.
- Gullick, W. J., Downward, J., Parker, P. J., Whittle, N., Kris, R., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Waterfield, M. D.** (1985). The structure and function of the epidermal growth factor receptor studied by using antisynthetic peptide antibodies. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **226**, 127-34.
- Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J. and Cohen, S.** (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3317-21.
- Hall.** (2000). Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia.
- Harari, P. M. and Huang, S. M.** (2004). Combining EGFR inhibitors with radiation or chemotherapy: will preclinical studies predict clinical results? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 976-83.
- Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C. and Engelward, B. P.** (2007). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* **6**, 923-35.
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. and Mills, G. B.** (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 988-1004.
- Herrmann.** (2006). Klinische Strahlenbiologie - kurz und bündig -: Urban & Fischer Verlag.
- Heyerdahl, H., Krogh, C., Borrebaek, J., Larsen, A. and Dahle, J.** (2011). Treatment of HER2-expressing breast cancer and ovarian cancer cells with alpha particle-emitting <sup>227</sup>Th-trastuzumab. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **79**, 563-70.

- Hoeijmakers, J. H.** (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-74.
- Huang, S. M. and Harari, P. M.** (1999). Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* **17**, 259-69.
- Huang, S. M. and Harari, P. M.** (2000). Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* **6**, 2166-74.
- Kampinga, H. H. and Konings, A. W.** (1987). Inhibition of repair of X-ray-induced DNA damage by heat: the role of hyperthermic inhibition of DNA polymerase alpha activity. *Radiat Res* **112**, 86-98.
- Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H. and van Gent, D. C.** (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* **8**, 483-9.
- Kasten-Pisula, U., Saker, J., Eichelner, W., Krause, M., Yaromina, A., Meyer-Staeckling, S., Scherkl, B., Kriegs, M., Brandt, B., Grenman, R. et al.** (2011). Cellular and Tumor Radiosensitivity is Correlated to Epidermal Growth Factor Receptor Protein Expression Level in Tumors Without egfr Amplification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
- Kasten-Pisula, U., Tastan, H. and Dikomey, E.** (2005). Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int J Radiat Biol* **81**, 409-19.
- Kato, T. A., Okayasu, R. and Bedford, J. S.** (2008). Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and gamma-H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1-phase or in condensed metaphase cells. *Mutat Res* **639**, 108-12.
- Kauffmann, M., Sauer.** (2001). Radiologie. München: Urban & Fischer.
- Kawamoto, T., Sato, J. D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G. H. and Mendelsohn, J.** (1983). Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1337-41.
- Kelland, L. R., Edwards, S. M. and Steel, G. G.** (1988). Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in human cervix carcinoma cell lines of differing radiosensitivity. *Radiat Res* **116**, 526-38.
- Khazaeli, M. B., Conry, R. M. and LoBuglio, A. F.** (1994). Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* **15**, 42-52.
- Krieger.** (2005). Strahlungsquellen für Technik und Medizin. Wiesbaden: Teubner.
- Kriegs, K.-P., Rieckmann, Holst, Dahm-Daphi, Dikomey.** (2010). The epidermal growth factor receptor modulates DNA double strand break repair by regulating non-homologous end joining. *DNA-Repair*.
- Kuan, C. T., Wikstrand, C. J. and Bigner, D. D.** (2001). EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* **8**, 83-96.
- Kuus-Reichel, K., Grauer, L. S., Karavodin, L. M., Knott, C., Krusemeier, M. and Kay, N. E.** (1994). Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin Diagn Lab Immunol* **1**, 365-72.
- Lammering, G., Hewit, T. H., Valerie, K., Contessa, J. N., Amorino, G. P., Dent, P. and Schmidt-Ullrich, R. K.** (2003). EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene* **22**, 5545-53.
- Li, P. C., Wang, C. R., Shieh, D. B., Wei, C. W., Liao, C. K., Poe, C., Jhan, S., Ding, A. A. and Wu, Y. N.** (2008). In vivo photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody-conjugated gold nanorods. *Opt Express* **16**, 18605-15.
- Linke, S. P., Clarkin, K. C., Di Leonardo, A., Tsou, A. and Wahl, G. M.** (1996). A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* **10**, 934-47.

- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., Jackson, S. P., Bartek, J. and Lukas, J.** (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *Embo J* **23**, 2674-83.
- Luo, F. R., Yang, Z., Dong, H., Camuso, A., McGlinchey, K., Fager, K., Flefleh, C., Kan, D., Inigo, I., Castaneda, S. et al.** (2005). Correlation of pharmacokinetics with the antitumor activity of Cetuximab in nude mice bearing the GEO human colon carcinoma xenograft. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**, 455-64.
- Messa, C., Russo, F., Caruso, M. G. and Di Leo, A.** (1998). EGF, TGF- $\alpha$ , and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol* **37**, 285-9.
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z. and Derynck, R.** (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* **376**, 337-41.
- NCCN.** (2011). Evidence based cancer guidelines.
- Nishi, H., Nishi, K. H. and Johnson, A. C.** (2002). Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res* **62**, 827-34.
- Nishinaka, T. and Yabe-Nishimura, C.** (2001). EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **31**, 205-16.
- Niu, G., Li, Z., Xie, J., Le, Q. T. and Chen, X.** (2009). PET of EGFR antibody distribution in head and neck squamous cell carcinoma models. *J Nucl Med* **50**, 1116-23.
- Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y. and Lawrence, T. S.** (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 876-85.
- Panier, S. and Durocher, D.** (2009). Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **8**, 436-43.
- Park, C. M., Park, M. J., Kwak, H. J., Lee, H. C., Kim, M. S., Lee, S. H., Park, I. C., Rhee, C. H. and Hong, S. I.** (2006). Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Res* **66**, 8511-9.
- Parra, H. S., Cavina, R., Latteri, F., Zucali, P. A., Campagnoli, E., Morengi, E., Grimaldi, G. C., Roncalli, M. and Santoro, A.** (2004). Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **91**, 208-12.
- Perk, L. R., Visser, G. W., Vosjan, M. J., Stigter-van Walsum, M., Tijink, B. M., Leemans, C. R. and van Dongen, G. A.** (2005). (89)Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals (90)Y and (177)Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med* **46**, 1898-906.
- Pfost, B., Seidl, C., Autenrieth, M., Saur, D., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Schwaiger, M. and Senekowitsch-Schmidtke, R.** (2009). Intravesical alpha-radioimmunotherapy with <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J Nucl Med* **50**, 1700-8.
- Price, A.** (1993). The repair of ionising radiation-induced damage to DNA. *Semin Cancer Biol* **4**, 61-71.
- Prise, K. M., Pinto, M., Newman, H. C. and Michael, B. D.** (2001). A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiat Res* **156**, 572-6.
- Rades, D., Nadrowitz, R., Buchmann, I., Hunold, P., Noack, F., Schild, S. E. and Meller, B.** Radiolabeled cetuximab plus whole-brain irradiation (WBI) for the treatment of brain metastases from non-small cell lung cancer (NSCLC). *Strahlenther Onkol* **186**, 458-62.
- Rades, D., Wolff, C., Nadrowitz, R., Breunig, C., Schild, S. E., Baehre, M. and Meller, B.** (2009). Radioactive EGFR antibody cetuximab in multimodal cancer treatment: stability and synergistic effects with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **75**, 1226-31.

- Rieske, P., Kordek, R., Bartkowiak, J., Debiec-Rychter, M., Biernat, W. and Liberski, P. P. (1998). A comparative study of epidermal growth factor receptor (EGFR) and MDM2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. *Pol J Pathol* **49**, 145-9.
- Rodemann, H. P., Dittmann, K. and Toulany, M. (2007). Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int J Radiat Biol* **83**, 781-91.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H. and Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**, 5706-15.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**, 183-232.
- Schmidt, M., Haagen, J. and Dorr, W. (2010). [Biology of radiation effects in normal tissues]. *MMW Fortschr Med* **152**, 31, 33.
- Sebolt-Leopold, J. S. (2004). MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors. *Curr Pharm Des* **10**, 1907-14.
- Seidl, C., Zockler, C., Beck, R., Quintanilla-Martinez, L., Bruchertseifer, F. and Senekowitsch-Schmidtke, R. (2011). <sup>177</sup>Lu-immunotherapy of experimental peritoneal carcinomatosis shows comparable effectiveness to <sup>213</sup>Bi-immunotherapy, but causes toxicity not observed with <sup>213</sup>Bi. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **38**, 312-22.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P. and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2760-5.
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J. and Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**, 1213-26.
- Torres, L. A., Coca, M. A., Batista, J. F., Casaco, A., Lopez, G., Garcia, I., Perera, A., Pena, Y., Hernandez, A., Sanchez, Y. et al. (2008). Biodistribution and internal dosimetry of the <sup>188</sup>Re-labelled humanized monoclonal antibody anti-epidermal growth factor receptor, nimotuzumab, in the locoregional treatment of malignant gliomas. *Nucl Med Commun* **29**, 66-75.
- Torres, L. A., Perera, A., Batista, J. F., Hernandez, A., Crombet, T., Ramos, M., Neningen, E., Perez, M., Sanchez, E. L., Romero, S. et al. (2005). Phase I/II clinical trial of the humanized anti-EGF-r monoclonal antibody h-R3 labelled with <sup>99m</sup>Tc in patients with tumour of epithelial origin. *Nucl Med Commun* **26**, 1049-57.
- Toulany, M., Dittmann, K., Kruger, M., Baumann, M. and Rodemann, H. P. (2005). Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiother Oncol* **76**, 143-50.
- Uberall, I., Kolar, Z., Trojanec, R., Berkovcova, J. and Hajdich, M. (2008). The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Exp Mol Pathol* **84**, 79-89.
- Warren, C. M. and Landgraf, R. (2006). Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* **18**, 923-33.
- Weinberg, R. (2006). *Biology of Cancer*: Garland Science.
- Wen, X., Wu, Q. P., Ke, S., Ellis, L., Charnsangavej, C., Delpassand, A. S., Wallace, S. and Li, C. (2001). Conjugation with <sup>111</sup>In-DTPA-poly(ethylene glycol) improves imaging of anti-EGF receptor antibody C225. *J Nucl Med* **42**, 1530-7.
- Willich, D., Flentje, Herrmann, Rodemann, Stuschke. (2002). Zur biologischen Forschung in der Radioonkologie. *Positionspaper der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie*.
- Yacoub, A., Miller, A., Caron, R. W., Qiao, L., Curiel, D. A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., Grant, S. and Dent, P. (2006). Radiotherapy-induced signal transduction. *Endocr Relat Cancer* **13 Suppl 1**, S99-114.
- Yamauchi, M., Oka, Y., Yamamoto, M., Niimura, K., Uchida, M., Kodama, S., Watanabe, M., Sekine, I., Yamashita, S. and Suzuki, K. (2008). Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA Repair (Amst)* **7**, 405-17.

**Yarden, Y.** (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**, S3-8.

## 9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jarob Saker, geboren am 2.5.1983 in Hamburg, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

**“Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen durch  $^{90}\text{Y}$ -DTPA-Cetuximab in humanen Plattenepitheltumorzellen des Kopf- / Halsbereiches zur Etablierung von EGFR gerichteten Radioimmuntherapien zur Tumorinaktivierung“**

selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Hamburg, Juni 2011

## 10. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Lüthen für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dikomey und Herrn Prof. Dr. Wienand für die Begutachtung meiner Dissertation sowie bei Frau Prof. Dr. Borgmann und Herrn Prof. Dr. Voigt für die Begutachtung meiner Disputation. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Kasten Pisula, Frau Dr. Mosch, Frau Dr. Vollstedt sowie Herrn Dr. Mansour für die Mitwirkung an meiner Disputation bedanken.

Für die großartige Unterstützung bei der Durchführung meine Experimente außer Haus möchte ich mich bei Frau Gesche, Frau Matterna, Frau Morgenegg, Herrn Zenker, Herrn Dr. Heldt und Herrn Dr. Pietsch bedanken.

Ein großer Dank geht an alle die mich während der letzten drei Jahre begleitet haben. Dies ist vor allem das gesamte Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie am UKE. Dazu gehören auch die Medizinstudenten Babara, Cora, Kristin, Nadja und Julia. Ihr wart zwar nur kurz da, aber ihr habt die Zeit hier unglaublich bereichert.

Ich danke auch Chetan, Prashanti und Mengxia dafür, dass ihr mich so toll aufgenommen habt und ich so schöne drei Monate bei euch verbringen durfte. Ein großer Dank geht auch an Anne, Birgit, Maria und Mohammed dafür dass ihr die Tage in Dresden spannend gehalten habt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Britta, Konstantin, Laura, Malte und Nils. Es hat immer Spaß gemacht in der besten Arbeitsgruppe von allen zu arbeiten!

Ich möchte auch meiner Familie und meinen Freunden für die schöne Zeit danken. Vor allem Riyad, Kirsten und Isa. Es ist toll zu wissen dass ihr immer für einen da seid.

Mein größter Dank geht an Ekkehard und Ulla für die großartige Betreuung während der letzten drei Jahre. Bei euch habe ich mehr gelernt als nur wissenschaftlich zu arbeiten und ich kann mir keine bessere Betreuung vorstellen. Vor allem danke ich Ulla dafür, dass sie mich in Durststrecken immer wieder neu motiviert hat und immer für mich da war, auch wenn sie eigentlich Urlaub hatte. Du bist super!