

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

**Bewertung der Radiotoxizität eines mit dem α -
Strahler ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen
Antikörpers anhand von Veränderungen der
Zellkernmorphologie**

Hedwig Schröck

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidkte
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 28.06.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.10.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	3
1.1	Grundlagen der Radioimmuntherapie	3
1.1.1	Transportmoleküle für Radionuklide	4
1.1.2	Radionuklide	5
1.1.3	Kopplungsmethoden	8
1.1.4	Klinische Anwendung	9
1.2	Quantifizierung von Strahlenschäden	10
1.2.1	Überblick	10
1.2.2	Geschichte der morphologischen Nachweisverfahren	11
1.2.3	MAA-Assay	13
1.2.3.1	Mikrokerne	13
1.2.3.2	Apoptotische Zellen	14
1.2.3.3	Abnormale Zellen	14
1.3	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Materialien und Geräte	17
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	17
2.1.2	Lösungen für die Zellpräparation und die Generatoreluierung	19
2.1.3	Geräte	20
2.2	Zellen und Zellkulturmethoden	20
2.2.1	Murine Fibroblasten L929	20
2.2.2	Humane Siegelring-Karzinom-Zellen HSC-45M2	20
2.3	Radioimmunkonjugate	21
2.3.1	Antikörper	21
2.3.2	Chelator	21
2.3.3	Eluierung und Kopplung von ^{213}Bi an die Antikörper	22
2.4	Versuche zur Inkubation mit ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten	24
2.4.1	Versuche mit L929-Zellen	24
2.4.2	Versuche mit HSC-45M2-Zellen	24
2.4.2.1	Kompetition der ^{213}Bi -Radioimmunkonjugatbindung	24
2.4.2.2	Zytotoxische Wirkung der ^{213}Bi -Radioimmunkonjugate	25
2.4.3	MAA-Assay	27
2.4.3.1	Mikrokernhaltige Zellen	27
2.4.3.2	Apoptotische Zellen	27
2.4.3.3	Abnormale Zellen	29
2.5	Röntgenbestrahlung	29
2.6	Klonogener Test	29
2.7	Statistik	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Qualitätskontrolle der Eluierung und Kopplung von Bi-213	31
3.2	MAA-Induktion bei L929-Zellen durch Inkubation mit ^{213}Bi -Konjugaten	31
3.3	Inkubation von HSC-Zellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten	33
3.3.1	Kompetitionsversuche	33
3.3.2	MAA-Induktion bei HSC-45M2-Zellen durch ^{213}Bi -Immunkonjugate	34
3.3.2.1	Auftreten von MAA-Zellen bei unbehandelten oder mit unmarkiertem Antikörper inkubierten Zellen	34
3.3.2.2	Abhängigkeit der MAA-Induktion von der Aktivitätskonzentration der ^{213}Bi -6H8-Konjugate	35
3.3.2.3	Effekt der Vorinkubation mit kaltem Antikörper	37

3.3.2.4	Vergleich der Effektivität von ^{213}Bi -6H8 und ^{213}Bi -7H1	39
3.4	MAA-Induktion durch Röntgenstrahlung.....	41
3.4.1	Bestrahlung der L929-Zellen.....	41
3.4.2	Bestrahlung von HSC-45M2-Zellen.....	42
3.5	Klonogener Test.....	43
4	Diskussion	45
4.1	Selektivität der Zellschädigung durch ^{213}Bi -Immunkonjugate	45
4.2	Beeinflussung der selektiven Wirkung von ^{213}Bi -Immunkonjugaten durch Aktivitätskonzentration und Inkubationszeit	46
4.3	Vergleich der Zellschädigung durch ^{213}Bi -Immunkonjugate mit der Schädigung durch Röntgenbestrahlung	49
4.4	Vergleich verschiedener Strahlenqualitäten und Mikrodosimetrie	51
4.4.1	Mikrokernbildung durch α -Strahlung	51
4.4.2	Relative Biologische Wirksamkeit	52
4.4.3	Mikrodosimetrie.....	53
5	Ausblick	56
6	Zusammenfassung	58
7	Summary.....	60
8	Danksagung.....	62
9	Literaturverzeichnis	63
10	Anhang.....	70
10.1	Inkubation von L929-Zellen mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten	70
10.2	Inkubation von HSC-45M2-Zellen mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten	71
10.3	Versuche mit Röntgenstrahlung	76
11	Abkürzungsverzeichnis.....	77

1 Einleitung

Die Radioimmuntherapie mit α -Emittern liefert neue Ansätze in der Tumorbehandlung. Es stehen einige α -Strahler zur Verfügung, die in den letzten Jahren verstärkt in der experimentellen Radioimmuntherapie untersucht wurden und teilweise schon in klinischer Erprobung sind. Für jedes Einsatzgebiet muss jedoch von neuem eine umfassende *in vitro* Untersuchung die Wirksamkeit des Therapieprinzips belegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Radioimmunkonjugat aus dem α -Emitter ^{213}Bi und einem tumorspezifischen Antikörper angewandt, das an ein mutiertes Oberflächenprotein beim diffusen Magenkarzinom bindet. Die Erfassung der zytotoxischen Wirkung erfolgte anhand von Veränderungen der Zellkernmorphologie. Auf diesem Weg wurde versucht, die Effektivität und Selektivität von tumorspezifischen ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten im Hinblick auf eine künftige Verwendung in der Behandlung des diffusen Magenkarzinoms nachzuweisen. Zusätzlich sollte die toxische Wirkung von α -Strahlung im Vergleich zu Röntgenstrahlung untersucht werden, um Hinweise auf mögliche Unterschiede bezüglich der Zelltodmechanismen durch die beiden Strahlenqualitäten zu erhalten.

1.1 Grundlagen der Radioimmuntherapie

Bei der Radioimmuntherapie (RIT) werden antigenspezifische Carrier eingesetzt, um ein Radionuklid als zellschädigendes Agens gezielt an Tumorzellen zu bringen. In den letzten Jahrzehnten erlangte die Radioimmuntherapie steigende Beachtung, weil die technische Entwicklung zu verbesserten Möglichkeiten der Herstellung spezifischer Antikörper so wie zur Verfügbarkeit neuer Radionuklide wie ^{213}Bi führte. Inzwischen belegen viele Untersuchungen mit unterschiedlichen Radionukliden und Antikörpern die Durchführbarkeit dieser neuen Therapieform (Srivastava und Dadachova, 2001). Dennoch blieben einige Hindernisse bestehen wie eine zu niedrige Aufnahme der Radioimmunkonjugate in das Tumorgewebe oder vereinzelt allergische Reaktionen, da die hauptsächlich eingesetzten Antikörper murinen Ursprungs sind. Zusätzlich steht auch trotz der selektiven Bindung von Radionukliden an die Tumorzellen bei der Radioimmuntherapie immer noch die dosislimitierende unspezifische Toxizität, besonders die Knochenmarksschädigung, einer routinemäßigen Anwendung im Weg (Buchsbaum, 2000), (Illidge und Brock, 2000),

(Behr et al., 1999). Vor allem bei hämatologischen Tumoren, also bei Lymphomen und Leukämien, bei Tumorresten nach Debulking-Operationen und bei Mikrometastasen erhofft man sich aber von der Radioimmuntherapie eine gute therapeutische Wirksamkeit bei zugleich weniger Nebenwirkungen als bei den herkömmlichen Methoden wie der Chemotherapie und der perkutanen Strahlentherapie (Goldenberg, 2002), (Buchsbaum, 2000), (Zalutsky und Vaidyanathan, 2000).

Voraussetzungen für den Einsatz der RIT sind:

- 1) Die Tumorzellen müssen ein Antigen exprimieren, das entweder für diese Tumorart spezifisch ist, oder das im Vergleich zu Normalgewebe auf den Tumorzellen in weit höherer Dichte vorhanden ist, also überexprimiert wird (Buchsbaum, 2000).
- 2) Es muss ein Trägermolekül für das zytotoxische Agens verfügbar sein, das die tumorspezifische Struktur bzw. die von Tumorzellen überexprimierte Struktur erkennt (Imam, 2001).
- 3) Eine Technik zur stabilen Verbindung zwischen dem Radionuklid und dem Trägermolekül, bzw. ein geeignetes Verbindungsmolekül, muss bekannt sein (Imam, 2001).

Im Folgenden werden geläufige Radionuklide, Trägersubstanzen und Möglichkeiten, das Nuklid an die Trägersubstanz zu binden, genauer erläutert.

1.1.1 Transportmoleküle für Radionuklide

Bei der RIT sollen die Radionuklide nur an den Tumor bzw. an maligne Einzelzellen und Mikrometastasen transportiert werden. Als Carrier werden Antikörper gegen tumorspezifische Antigene oder tumorassoziierte, also von Tumorzellen überexprimierte, Antigene benutzt. Nur wenige der bisher bekannten Antikörper sind tumorspezifisch, d. h., dass sie ausschließlich mit einer nur bei bestimmten Tumoren vorkommenden Antigenstruktur reagieren. Ein Beispiel ist der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper 6H8, der ein mutiertes Zelladhäsionsmolekül ($\Delta 9$ -E-Cadherin) erkennt (Becker et al., 1999). Diese Mutation tritt bei etwa 13 % der E-Cadherin-exprimierenden diffusen Magenkarzinome auf.

Antikörper als systemisch applizierte Träger eines Nuklids haben jedoch auch bestimmte Nachteile: Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts penetrieren sie Tumorgewebe nur langsam und sind daher kaum in der Lage, die Aktivität dort

homogen zu verteilen. Außerdem ist die Verweildauer im Blut bei intravenöser Applikation aufgrund ihrer Größe sehr lang, was zu unspezifischer Organschädigung führt. Nicht zuletzt wurden auch vereinzelt anaphylaktische Reaktionen von Patienten beschrieben (Illidge und Brock, 2000). Diese Hindernisse konnten teilweise überwunden werden: Die Aufnahme der Radioimmunkonjugate in den Tumor wurde durch den Einsatz von kleineren Trägermolekülen verbessert. Verwendung finden beispielsweise verschieden große Antikörperfragmente, Peptide und rekombinante Konstrukte wie Multimere mit einer variierenden Anzahl von Antigenbindungsstellen (Buchsbaum, 2000), (Senekowitsch-Schmidtke, 2000). Die lokoregionale Anwendung, z. B. intraperitoneale Applikation bei der Therapie von Magenkarzinommetastasen oder bei Peritonealkarzinose reduzierte die Häufigkeit und Stärke von systemischen Nebenwirkungen. Schließlich verminderte die Entwicklung modifizierter Antikörper durch Humanisierung oder Fragmentierung der Antikörper das Auftreten von Immunreaktionen.

1.1.2 Radionuklide

Die Auswahl des geeigneten Radionuklids ist in erster Linie vom Behandlungsziel abhängig. Wenn ein relativ großer solider Tumor vorliegt, ist ein Strahler mit einer Reichweite im Bereich von einigen Millimetern sinnvoll, um auch Zellen zu treffen, die das Antigen gar nicht exprimieren oder die sich im Zentrum des Tumors befinden und daher nicht vom Radioimmunkonjugat erreicht werden können (Imam, 2001). Wenn allerdings Einzelzellen oder Metastasen im Stadium von wenigen Zellen (Mikrometastasen) getötet werden sollen, ist ein Nuklid mit geringer Reichweite sowie mit hohem linearem Energietransfer (LET) und hoher relativer biologischer Wirksamkeit (RBW) vorzuziehen (Mattes, 2002), (Imam, 2001). Daher müssen die physikalischen Eigenschaften der Radionuklide, also die Strahlungsqualität, die Halbwertszeit und die Energie der ausgesendeten Strahlung, berücksichtigt werden (Srivastava, 1996). Wichtig ist auch, die Eigenschaften der Zerfallsprodukte des Radionuklids in die Überlegungen einzubeziehen, da diese oft ebenfalls radioaktiv sind (Imam, 2001). Generell werden β -Strahler, Auger-Elektronen-Emitter/Konversionselektronen-Emitter oder α -Strahler angewendet, wobei die beiden letztgenannten in den letzten Jahren auf steigendes Interesse stoßen.

β-Strahler

Die am häufigsten in der RIT verwendeten Nuklide sind β-Strahler wie ^{131}Jod oder $^{90}\text{Yttrium}$. β-Strahler emittieren Elektronen mit einem kontinuierlichen Energiespektrum. Durch ihre relativ großen mittleren Reichweiten im Gewebe von zum Beispiel 0,8 bzw. 5,3 Millimetern für ^{131}Jod und $^{90}\text{Yttrium}$ sind sie für die Therapie von Tumoren mit einem Durchmesser zwischen 2,6 und 5 Millimetern bzw. 28 und 42 Millimetern am besten geeignet (Illidge und Brock, 2000). Sie schädigen durch ihre Reichweite auch benachbarte Zellen, die das Zielantigen nicht exprimieren. Durch diesen so genannten „crossfire effect“ können sie auch bei Tumoren mit heterogener Antigenexpression gute Therapieerfolge erzielen (Imam, 2001). Außerdem sind sie aus dem gleichen Grund auch dann wirksam, wenn das Radioimmunkonjugat schlecht durch das Tumorgewebe penetriert und so nicht in allen Bereichen des Tumors gleichmäßig verteilt ist (Buchsbaum, 2000). Wenn hingegen kleine Zellverbände wie Mikrometastasen oder einzelne Zellen bei hämatologischen Tumoren zerstört werden sollen, so ist aufgrund des eher niedrigen LET der β-Emitter eine große Zahl von Nukliden pro Zelle nötig, um die Zelle zu töten. Gleichzeitig ist die unspezifische Toxizität durch Bestrahlung des umgebenden Normalgewebes stark ausgeprägt (Mattes, 2002).

Auger-Elektronen-Emitter

Auger-Elektronen-Emitter wie ^{125}Jod und $^{111}\text{Indium}$ zerfallen durch Elektroneneinfang. Dadurch verursachen sie einen Mangel an Elektronen in der inneren Schale, der durch Elektronenübergänge von höherenergetischen Schalen ausgeglichen wird. Die Energiedifferenz kann auf andere Elektronen übertragen werden, die dann als so genannte Auger-Elektronen aus dem Atom freigesetzt werden (Kriehuber und Simko, 2000), (Senekowitsch-Schmidtke, 2000). Die Energie der emittierten Elektronen liegt bei nur 10 – 30 keV (Mattes, 2002). Dennoch ist die Radiotoxizität hoch, da die Reichweite im Nanometer-Bereich liegt (Senekowitsch-Schmidtke, 2000). Eine effektive Zellschädigung tritt deshalb vor allem auf, wenn der Auger-Emitter in den Zellkern transportiert und in die DNS eingebaut wird (Mattes, 2002), (Daghighian et al., 1996). Daher werden die Auger-Emitter an Transportmoleküle gekoppelt, die selektiv in Tumorzellen aufgenommen und dort in die DNS integriert werden (Behr et al., 1999).

α -Strahler

α -Strahler emittieren hochenergetische Heliumkerne (α -Partikel) mit hohem LET und geringer Reichweite (Senekowitsch-Schmidtke, 2000). Bisher wurden vor allem $^{213}\text{Wismut}$, $^{212}\text{Wismut}$ und $^{211}\text{Astat}$ auf ihre Einsatzmöglichkeiten in der Radioimmuntherapie hin untersucht (Imam, 2001). In Tabelle 1 sind die für die Therapie geeigneten α -Strahler aufgeführt. Seit einiger Zeit ist das in der vorliegenden Arbeit verwendete Nuklid $^{213}\text{Wismut}$ (^{213}Bi) über einen ^{225}Ac -Generator verfügbar und kann daher in für die Radioimmuntherapie ausreichenden Mengen hergestellt werden (Nikula et al., 1995). ^{213}Bi zerfällt in mehreren Schritten zu dem stabilen ^{209}Bi (Abb. 1). Dabei werden vor allem hochenergetische α -Strahlen (5,9 MeV und 8,4 MeV), aber auch β^- - und γ -Strahlen emittiert (McDevitt et al., 1998). Die γ -Komponente (440 keV) eignet sich bei *in vivo* Anwendung zur Bildgebung (Imam, 2001). Die Halbwertszeit von ^{213}Bi beträgt 45,6 Minuten, die Reichweite der α -Partikel 40 bis 80 μm in Wasser. Wie die anderen α -Strahler weist auch ^{213}Bi einen hohen LET von etwa 100 keV/ μm auf (McDevitt et al., 1998). Bei einem LET in diesem Bereich tritt etwa alle 10 nm ein ionisierendes Ereignis auf. Da die beiden Stränge der DNS in der Doppelhelix 10 nm voneinander entfernt sind, induzieren α -Partikel relativ häufig irreparable Doppelstrangbrüche. Dies bedingt die hohe und vom Zellzyklus unabhängige Toxizität der α -Strahler (Imam, 2001).

Nuklid	$T_{1/2}$	E_{α} (MeV)	Reichweite (μm)
^{211}At	7,2 h	6,8	65
^{212}Bi	1,1 h	6,0	54
^{213}Bi	46 min	8,2	72
^{149}Tb	4,1 h	4,0	28
^{225}Ac	10 d	5,8	54

Tab. 1: α -Emitter für die Radioimmuntherapie

$T_{1/2}$: Halbwertszeit, E_{α} : mittlere Energie pro α -Partikel

Durch ihre Reichweite sind α -Strahler ideal für das Abtöten von Einzelzellen oder kleinen Zellclustern (Mattes, 2002), (Ballangrud et al., 2001). Daher wurden die monozellulären hämatologischen Tumoren, Mikrometastasen und Tumoren, die sich entlang innerer Oberflächen ausbreiten (z. B. neoplastische Meningitis, residuale Tumorzellen nach Glioblastom-Operation, Peritonealkarzinose) als ihre Haupteinsatzgebiete betrachtet (Imam, 2001). Dies wird allerdings kontrovers

diskutiert, da neuere klinische Studien Hinweise auf optimale therapeutische Effektivität der α -Strahler nur bei kleinen Zielvolumina und Mikrometastasen geben. Bei Leukämien sind demnach β -Strahler eher in der Lage, Totalremissionen herbeizuführen, wobei dann mehr systemische Nebenwirkungen auftreten (Burke et al., 2002).

Die kurze Halbwertszeit der in der RIT verwendeten α -Strahler kann bei systemischer Anwendung von Nachteil sein, da die Nuklide zu einem großen Teil zerfallen sind, bevor sie ihr Ziel erreicht haben. Andererseits ist aber bei lokoregionaler Applikation, beispielsweise intraperitoneal bei einer Peritonealkarzinose, mit wenig Beeinträchtigung anderer Organe zu rechnen, da die Radionuklide zu einem großen Teil zerfallen sind, bis die Immunkonjugate den Applikationsort verlassen haben.

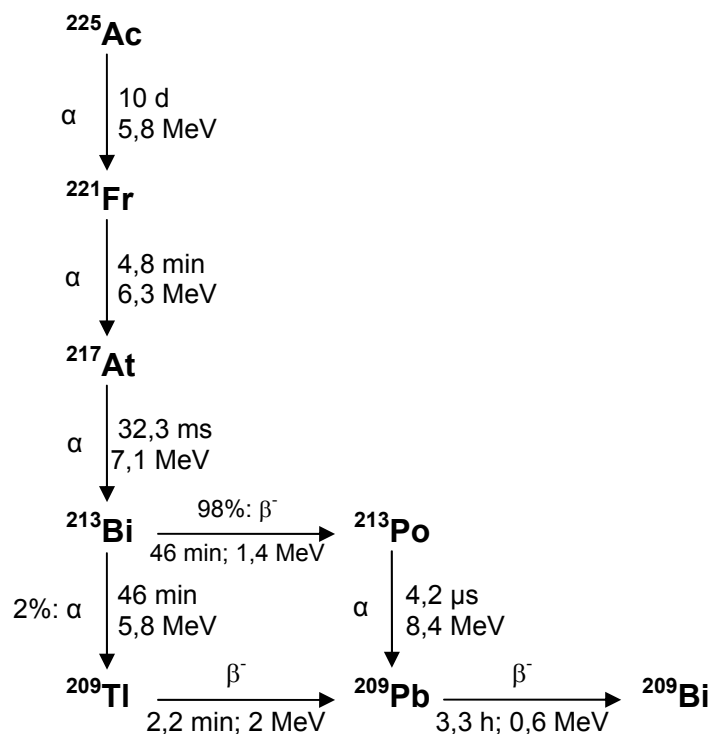


Abb. 1: Zerfall von ²²⁵Actinium nach McDevitt et al. (1998) und Geerlings et al. (1993)

1.1.3 Kopplungsmethoden

Die Kopplung eines Radionuklids an den Trägerantikörper soll *in vivo* stabil sein und die Immunreaktivität des Antikörpers nicht beeinträchtigen. Auch soll der Prozess bei Radionukliden mit kurzer Halbwertszeit schnell ablaufen (Imam, 2001), (Zalutsky und Vaidyanathan, 2000), (Brechtel et al., 1991). Abhängig vom Nuklid werden

unterschiedliche Kopplungsmethoden angewandt. Jod-Isotope können an Tyrosinreste des Trägerproteins angehängt werden. Metall-Nuklide benötigen ein Chelat, um auch *in vivo* stabil am Carrier zu bleiben. Häufig verwendet werden DOTA (Tetraazacyclododekan-Tetraazid) oder DTPA (Diethylentriamin-Pentaazetat) und deren Derivate (Zalutsky und Vaidyanathan, 2000), (Brechtel et al., 1991).

1.1.4 Klinische Anwendung

Seit mehr als zwei Jahrzehnten wird die Radioimmuntherapie sowohl systemisch als auch lokoregional bei Patienten angewandt. Illidge und Brock (2000) geben einen Überblick über verschiedene Phase-I/II-Studien, in denen meist die β -Strahler ^{131}I und ^{90}Y verwendet wurden. Die erste klinische Studie mit α -Emittern wurde 1997 von Jurcic et al. veröffentlicht. Neun Patienten mit akuter myeloischer Leukämie wurden mit ^{213}Bi -HuM195-Konjugaten behandelt. Der humanisierte monoklonale Antikörper HuM195 bindet spezifisch an das überexprimierte Oberflächen-Antigen CD33 auf myeloischen Leukämiezellen. Bei fünf Patienten wurden die Blasten im Knochenmark reduziert. Mittlerweile liegen weitere Ergebnisse vor, die bei 14 von 18 behandelten Patienten eine Reduktion der Blasten im Knochenmark zeigen, ohne dass signifikante extramedulläre Nebenwirkungen auftraten (Jurcic et al., 2002). Eine Vielzahl weiterer Versuche widmete sich ebenfalls der Behandlung von Lymphomen und Leukämien, aber auch solide Tumoren beziehungsweise deren Reste wurden schon therapiert (Burke et al., 2002). Ein Beispiel ist eine Phase-II-Studie an 74 Patienten mit Glioblastoma multiforme, die nach der konventionellen Behandlung (operative Entfernung des Tumors, Bestrahlung und teilweise Chemotherapie) eine lokoregionale RIT mit zwei ^{131}I beladenen monoklonalen Antikörpern gegen das gliomspezifische Protein Tenascin erhielten. Dabei wurde eine Erhöhung der mittleren Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit konventioneller Behandlung festgestellt (Riva et al., 1999). Dass auch α -Strahler zur intrakavitären Anwendung nach Glioblastom-Resektion geeignet sind, wird durch eine Phase-I-Studie mit dem Nuklid ^{211}At belegt (Zalutsky und Vaidyanathan, 2000). Bei Kolonkarzinom-Patienten konnte, ebenfalls bei Verwendung des β -Strahlers ^{131}I , die Wirksamkeit von adjuvanter RIT in einer Phase-II-Studie gezeigt werden (Behr et al., 2002).

1.2 Quantifizierung von Strahlenschäden

1.2.1 Überblick

Um Rückschlüsse auf die Strahlenwirkung in biologischen Systemen ziehen zu können, sind geeignete Methoden zur Quantifizierung von Strahlenschäden nötig (Müller und Streffer, 1991). Physikalische Messungen können nur die zugeführte Energiedosis ermitteln, während Strahlenschäden darüber hinaus auch von der Strahlenqualität und vor allem von der Strahlensensitivität der betrachteten Zellen bzw. Organe abhängen. Der Gold-Standard für die Evaluierung der Strahlensensitivität ist bei *in vitro* Versuchen der so genannte klonogene Test (Akudugu und Böhm, 2001). Dabei wird eine bestimmte Anzahl Zellen ausgesät und der Anteil der Zellen bestimmt, der durch Zellteilung Kolonien (Klone) bildet. Bei Aussaat von vorher bestrahlten oder mit Radioimmunkonjugaten inkubierten Zellen sinkt der Anteil der klonbildenden Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis oder der Aktivitätskonzentration. Für die experimentelle RIT ist die Reduktion des klonogenen Überlebens das Maß für die Wirksamkeit, da sie darauf abzielt, Zellen zu töten oder teilungsunfähig zu machen (Imam, 2001). Darüber hinaus gibt es aber noch eine Reihe anderer Möglichkeiten, die Schädigung von Zellen zu erfassen, die meist im Vergleich mit den Ergebnissen im klonogenen Test beurteilt werden. Einige dieser Methoden wurden für die biologische Dosimetrie entwickelt, weil die Durchführung der klonogenen Tests mit oft 10 bis 20 Tagen bis zur Auswertbarkeit einen großen zeitlichen Aufwand erfordert (Shibamoto et al., 1991). Außerdem sind sie nur *in vitro* anwendbar und damit für Fragestellungen wie die Knochenmarksbelastung bei Patienten nach Radionuklidtherapie oder lokalisierter perkutaner Strahlentherapie, oder auch die Ganzkörperdosis bei Personen mit akzidentieller radioaktiver Exposition ungeeignet (Lenarczyk et al., 2001), (Livingston et al., 1997). Müller und Streffer (1991) geben einen Überblick über biologische Indikatoren für Strahlenschäden und unterscheiden dabei molekulare bzw. biochemische, zytogenetische und zelluläre Endpunkte. Biochemische Nachweisverfahren für Proteine, die bei der Induktion von Apoptose oder bei den apoptotischen Prozessen selbst eine Rolle spielen, haben bis heute an Bedeutung gewonnen. Ein bekanntes Beispiel ist die TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-x Nick End Labeling), die die apoptotische DNS-Fragmentation nachweist (Mirzaie-Joniani et al., 2002), (Masunaga et al., 2001), (Belyakov et al., 1999). Die TdT

(terminale Deoxynukleotidyl-Transferase) katalysiert die Bindung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden an freie 3'-OH-Enden von DNS-Fragmenten. Zelluläre Indikatoren, wie Veränderungen des Blutbilds, der Spermatogenese oder des Haarwachstums (Müller und Streffer, 1991), werden vor allem zur Erfassung der Ganzkörper-Bestrahlung von Menschen oder Tieren verwendet. Zytogenetische Indikatoren sind z.B. Chromosomenaberrationen und die in dieser Arbeit untersuchten Mikrokerne, die mit Hilfe eines Mikroskops relativ einfach quantifiziert werden können.

1.2.2 Geschichte der morphologischen Nachweisverfahren

Mikrokerne werden seit vielen Jahrzehnten als Indikatoren für zytogenetische Schäden herangezogen. Schon in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde ihr Erscheinen im Zusammenhang mit Bestrahlung beschrieben, bis erstmals 1959 der zytogenetische Schaden durch Röntgen- und Neutronenstrahlen mit Hilfe der Mikrokernhäufigkeit bestimmt wurde (Heddle et al., 1983). Obwohl also schon früh strahlenbiologische Untersuchungen mit Mikrokernen durchgeführt wurden, stand lange Zeit die Evaluierung von möglicherweise kanzerogenen Chemikalien im Vordergrund, wobei Mikrokerne als Maß für die Induktion von Chromosomenbrüchen galten (Schmid, 1975). Die Untersuchung von Mikrokernen hatte eine Reihe von Vorteilen gegenüber der vorher verwendeten Standardmethode, nämlich der Analyse von Chromosomen in der Metaphase, wie zum Beispiel die schnelle und relativ einfache Durchführung und die größere Unabhängigkeit vom Zellzyklus (Heddle et al., 1983). Daher wurden in den 60er und 70er Jahren verschiedene Techniken untersucht und schließlich von Schmid und seinen Mitarbeitern ein Verfahren entwickelt, das das karzinogene Potenzial von verschiedenen Substanzen über die Mikrokernhäufigkeit in jungen polychromatischen Erythrozyten (PCE) aus Knochenmarkausstrichen bestimmt (Schmid, 1975). Die PCE haben den Vorteil, dass sie sich von älteren Erythrozyten durch ihre Färbung unterscheiden. Daher sind mikrokernhaltige PCE geeignet, nur die Anomalien zu erfassen, die in der letzten Mitose vor der Ausschleußung des Zellkerns aus dem Erythrozyten entstanden sind, so dass ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Applikation der Testsubstanz und dem Auftreten der Mikrokerne entdeckt werden kann. Dieser Test setzte sich gegenüber anderen Methoden durch und wurde daher auch als „der Mikronukleustest“ bezeichnet (Heddle et al., 1983).

Zugleich entstanden weitere Mikrokern-Nachweisverfahren, um den zytogenetischen Schaden von Substanzen, die das Knochenmark nicht erreichen, *in vitro* zu erfassen (Heddle et al., 1983). Beispielsweise wurden nun auch Zellkulturen und menschliche Lymphozyten, die nach Entnahme mit der fraglichen Substanz behandelt worden waren, auf das Auftreten von Mikrokernen hin untersucht. Da für eine exakte Auswertung die Anzahl der Mitosen nach dem schädigenden Ereignis bekannt sein muss (siehe auch Kapitel 1.2.3.1), wurden völlig neue Techniken entwickelt, um Zellen, die sich einmal geteilt haben, von den anderen zu unterscheiden: Durch Substanzen wie Cytochalasin-B wird die Zellteilung bei intakter Kernteilung verhindert, so dass sich Zellen nach der Mitose als zweikernig darstellen. Die Mikrokernhäufigkeit wird prozentual nur in den zweikernigen Zellen bestimmt (Fenech und Morley, 1985). Diese Technik wurde nun auch zunehmend in der Strahlenbiologie bevorzugt auf dem Feld der biologischen Dosimetrie eingesetzt (Müller und Streffer, 1991). Dabei wurde z. B. die Radiosensitivität von Tumoren im Gegensatz zu Normalgewebe untersucht (Shibamoto et al., 1991). Auch Abschätzungen der individuellen Reaktion von Personen auf eine Strahlentherapie oder auf akzidentielle Strahlenexposition wurden vorgenommen (le Roux et al., 1998), (Catena et al., 1997), (Livingston et al., 1997), (Catena et al., 1996), (Mill et al., 1996), (Gantenberg et al., 1991). Mittlerweile ist die Cytochalasin-B-Methode aber umstritten, da Cytochalasin-B möglicherweise selbst Mikrokerne induziert und den Ablauf der Apoptose stört (Abend et al., 2000), (Abend et al., 1995).

Die Aussagekraft der strahleninduzierten Mikrokernhäufigkeit in Bezug auf die Strahlenempfindlichkeit von Zellen wird inzwischen kontrovers diskutiert, da die Mikrokernhäufigkeit allein oft nicht mit den Ergebnissen der klonogenen Tests übereinstimmt (Akudugu und Böhm, 2001). Schon relativ früh waren weitere Änderungen der Zellkernmorphologie neben der Mikrokernbildung als „nuclear anomaly test“ berücksichtigt worden, was sich zunächst jedoch nicht gegen „den Mikronukleustest“ von Schmid et al. behaupten konnte (Heddle et al., 1983). In den letzten Jahren wurden verstärkt die verschiedensten zusätzlichen Parameter herangezogen, beispielsweise dizentrische Chromosomen, Chromosomenaberrationen, apoptotische Zellen im Überstand oder die Lipidperoxidation (Przybyszewski et al., 2002), (Guo et al., 1999), (Venkatachalam et al., 1999), (Livingston et al., 1997). Auch bei all diesen Messungen des zytogenetischen Schadens durch Änderungen der Zellkernmorphologie war die

Korrelation mit der Reduktion des klonogenen Überlebens zelltypabhängig unterschiedlich ausgeprägt, wenn man nur einen einzelnen Parameter betrachtete. Deshalb wurden kombinierte Ansätze entwickelt, etwa die simultane Erfassung von Apoptose und Mikrokerninduktion (Guo et al., 1999), (Abend et al., 1995). Die Ergebnisse zeigen eine bessere, aber immer noch nicht befriedigende Übereinstimmung mit den klonogenen Tests. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MAA-Assay steht nun ein dreiparametrischer Ansatz zur Verfügung, der im nächsten Abschnitt vorgestellt wird.

1.2.3 MAA-Assay

Im MAA-Assay von M. Abend wird die Quantifizierung von Zellschäden durch die Beurteilung mehrerer verschiedener morphologischer Parameter vorgenommen (Mikrokernbildung, Apoptoseinduktion und Bildung Abnormaler Zellen) (Abend et al., 2000). Überlegungen, dass möglicherweise die Art bzw. das morphologische Erscheinungsbild des strahleninduzierten Zelltodes spezifisch für jeden Zelltyp ist, führten zur Berücksichtigung dreier Parameter. Dadurch sollen die verschiedenen Mechanismen des Zelltods möglichst vollständig erfasst werden. Die Summe von mikrokernhaltigen, apoptotischen und abnormalen Zellen korreliert daher unabhängig vom untersuchten Zelltyp mit dem klonogenen Überleben. Bestätigt werden diese Annahmen mittlerweile von Akadugu und Böhm (2001), die einen dritten Zelltodparameter neben Mikrokernbildung und Apoptoseinduktion fordern, um die Strahlenempfindlichkeit der Zelle zu evaluieren. Dieser dritte Parameter wird als zellspezifische Variable umschrieben. In einer neueren Studie über Strahlenwirkung auf Zellen werden ebenfalls drei morphologische Parameter (Mikrokerne, Apoptosen und Nekrosen) herangezogen (Przybyszewski et al., 2002). Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten des MAA-Assay näher beschrieben.

1.2.3.1 Mikrokerne

Mikrokerne sind zytoplasmatische Partikel, die Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen enthalten. Sie ähneln in Form, Färbeverhalten und Struktur dem Hauptkern, sind aber kleiner (Mill et al., 1996). Ihre Entstehung beruht auf Schäden in der DNS, die zu Chromatin-Fehlverteilungen in der Anaphase führen (Garewal et al., 1993). Folgende Mechanismen werden diskutiert: Durch ionisierende Strahlung oder Chemikalien entstandene azentrische oder multizentrische Chromosomenfragmente können bei der Kernteilung nicht in einen der beiden

entstehenden Tochterkerne inkorporiert werden, da sie vom Spindelapparat nicht oder nur fehlerhaft erfasst werden können (Abend, 2000). Auch eine geschädigte Kinetochore oder ein defekter Spindelapparat verhindern die regelrechte Aufteilung des Chromatins (Müller und Streffer, 1991). Die so außerhalb der Tochterkerne verbleibenden Chromosomenfragmente werden spontan von einer Kernmembran umschlossen und bilden dadurch Mikrokerne. Da Mikrokerne durch fehlerhafte Mitosen entstehen, sind sie frühestens nachweisbar, sobald nach der Zellschädigung eine Mitose abgelaufen ist (Mill et al., 1996). Ihr Auftreten steigt nach der Schädigung mit Zeitverzögerung bis zu einem Maximum an, bis die meisten Zellen eine Mitose vollzogen haben. Da sich nur die nicht geschädigten Zellen weiter teilen, nimmt die prozentuale Häufigkeit von mikrokernhaltigen Zellen wieder ab. Daher wurden die Mikrokerne in der vorliegenden Arbeit zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zellschädigung quantifiziert.

1.2.3.2 Apoptotische Zellen

Apoptose („programmierter Zelltod“) ist ein aktiver Prozess der Selbstzerstörung von Einzelzellen, der eine wichtige Rolle sowohl in der Ontogenese als auch beim physiologischen Gewebeumsatz spielt (Abend und Van Beuningen, 1998), (Ashkenazi und Dixit, 1998), (Nagata, 1997). In den letzten Jahren sind eine Reihe von „Todesrezeptoren“ entdeckt worden, die bei Stimulation von außen, z. B. durch Liganden aus der Familie des Tumornekrosefaktors (TNF), die Apoptoseprozesse in Gang setzen (Ashkenazi und Dixit, 1998). Dabei gibt es charakteristische morphologische Veränderungen: Die Zellen werden kleiner und dichter, wobei die Zellorganellen weitgehend intakt bleiben, und die Zellmembran bildet kleine Blasen („blebs“) aus. Das Chromatin in den Zellkernen wird kondensiert und fragmentiert. Lichtmikroskopisch können Zellen mit pyknotischen (geschrumpften) oder fragmentierten Zellkernen beobachtet werden (Mirzaie-Joniani et al., 2002), (Denk und Zatloukal, 2001). Der morphologische Apoptosenachweis beruht auf dem Nachweis dieser veränderten Zellkerne.

1.2.3.3 Abnormale Zellen

Zellen, die weder unter die Kategorie normale Zellen noch unter die Kategorien mikrokernhaltige oder apoptotische Zellen fallen, werden gesondert erfasst. Ein Beispiel für abnormale Zellen sind nekrotische Zellen. Diese imponieren durch Zellschwellung, während der Kern in Bruchstücke zerfällt oder aufgelöst wird (Denk

und Zatloukal, 2001). Weitere Zelltypen, die in dieser Arbeit als abnormale Zellen gewertet wurden, sind zwei- und mehrkernige Zellen mit und ohne Mikrokerne und Riesenformen mit mehrfach vergrößertem Zelldurchmesser. Für all diese Formen gilt, dass sie erst mit zeitlicher Verzögerung nach der Zellschädigung nachweisbar sind. An dieser Stelle soll kurz der Begriff Nekrose näher erläutert werden. Meist wird er als exogen induzierter Zelltod im Gegensatz zum „programmierten Zelltod“ (Apoptose) aufgefasst. Dies ist jedoch umstritten, da exogene toxische Substanzen oder Strahlung auch Apoptose induzieren können. Darüber hinaus ist auch morphologisch der Unterschied zwischen Nekrose und Apoptose nicht immer eindeutig, da beide ähnliche Endstadien aufweisen können wie zum Beispiel eine Karyolyse. Daher besteht die kontrovers diskutierte Ansicht, dass das Endstadium des Zelltods (Karyolyse) generell als Nekrose bezeichnet werden sollte. Unterschieden wird anhand der Morphologie des Anfangstadiums der Zelltod mit initialer Zellschwellung (Onkose) vom Zelltod mit initialer Zellschrumpfung (Apoptose), wobei beide letztendlich mit Karyolyse (Nekrose) enden (Majno und Joris, 1995).

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte *in vitro* die zytotoxische Wirkung von ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten untersucht werden, die an ein tumorspezifisches Adhäsionsmolekül binden. Verwendet wurde der monoklonale Antikörper 6H8, der selektiv das mutierte E-Cadherin ($\Delta 9\text{-E-Cad}$), nicht aber den Wildtyp (wt-E-Cad) erkennt (Becker et al., 1999). $\Delta 9\text{-E-Cad}$ kommt relativ häufig beim diffusen Magenkarzinom nach Laurén vor, das typischerweise früh in die Peritonealhöhle metastasiert. Bei der entstehenden Peritonealkarzinose breiten sich einzelne Zellen und Zellcluster intrakavitär aus, so dass die Radioimmuntherapie mit α -Emittern wie ^{213}Bi ein Erfolg versprechendes Behandlungskonzept darstellt.

Für die Quantifizierung der therapeutischen Wirksamkeit wurden strahleninduzierte Veränderungen der Zellkernmorphologie mit Hilfe des MAA-Assays erfasst. Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Werden Tumorzellen, die $\Delta 9\text{-E-Cadherin}$ exprimieren, durch tumorspezifische ^{213}Bi -Immunkonjugate selektiv geschädigt?
- Ist die Schädigung abhängig von der Aktivitätskonzentration des Radioimmunkonjugats im Inkubationsmedium und von der Inkubationszeit?
- Wie stark ausgeprägt ist die Zellschädigung durch Strahlung von unspezifischen Radioimmunkonjugaten?

Zusätzlich sollten die durch den α -Strahler ^{213}Bi induzierten Zellkernveränderungen mit den durch Röntgenstrahlung verursachten Änderungen verglichen werden. Dadurch sollte herausgearbeitet werden, ob die beobachteten Zellkernmorphologien spezifisch für eine bestimmte Strahlungsqualität sind.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Ammoniumazetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D-89555 Steinheim)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D-89555 Steinheim)
Bacto-Agar	Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol Serva Electrophoresis GmbH (D-69115 Heidelberg)
DAPI-Stammlösung	10 mg DAPI ad 100 ml Aqua dest.
DMEM-Lösung	Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-Pyruvat, ohne Na-Pyruvat Seromed Biochrom KG (D-12247 Berlin)
DMEM Instamed	Dulbecco's Modified Eagle Medium Instamed 13,54 g/l mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamat, ohne NaHCO ₃ , Na-Pyruvat Seromed Biochrom KG (D-12247 Berlin)
DMSO-Einfriermedium	DMSO Freeze Medium, steril filtriert Igen International Inc. (Gaithersburg, MD 20877)
EDTA-Lösung	Ethylendiamintetraazetat 1% in PBS ohne Ca, Mg c.c.pro GmbH (D-67433 Neustadt/W.)
Ethanol absolut denaturiert	Apotheke des Klinikum rechts der Isar
Ethidiumbromid- Lösung	Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D-89555 Steinheim)
Glycerin	Glycerin (87%) pro analysi Merck KgaA (D-64271 Darmstadt)
FBS	Fetal Bovine Serum (getestet auf Mycoplasma) seromed Biochrom KG (D-12247 Berlin)

Geneticin	50mg/ml Geneticin Gibco BRL (Schottland)
Natriumzitat	Tri-Natriumzitat-dihydrat Merck KgaA (D-64271 Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck KgaA (D-64271 Darmstadt)
Natriumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D-89555 Steinheim)
PBS-Lösung	Phosphate-Buffered-Saline-Dulbecco (1x) ohne Ca, Mg seromed Biochrom KG (D-12247 Berlin)
Penicillin/Streptomycin	10000U / 10000 µg/ml seromed Biochrom KG (D-12247 Berlin)
pPD	p-Phenylendiamin 97 % Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D-89555 Steinheim)
pPD-Antifading-Mittel	10 mg pPD + 1 ml PBS + 9 ml Glycerin, pH 8-9
Salzsäure	Salzsäure Suprapur 30 % Merck KgaA (D-64271 Darmstadt)
SSC (20fach)	3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumzitat, pH 7
PD-10 Säule	Amersham Biosciences Europe GmbH (D-79111 Freiburg)
ITLC-Papier für Chromatographie	Instant Thin Layer Chromatography Gelman Science Inc. (MI Ann Arbor)
Zellkulturflaschen	steril, mit Filter (25 cm ² , 75 cm ² , 182 cm ²), Cellstar Greiner Bio-one GmbH (D-72636 Frischhausen)
Zentrifugenröhrchen	50 ml (pyrogenfrei) Corning Inc. (Corning, NY 14831) bzw. BD Falcon Conical Tubes (15 ml, 50 ml) BD Biosciences (Bedford, MA)

2.1.2 Lösungen für die Zellpräparation und die Generatoreluierung

Lösung zum Ablösen der Zellen:

Die Zellen wurden mit 1 mM EDTA in PBS abgelöst.

Fixierpuffer:

Für den Zell-Fixierpuffer wurde der 20fach konzentrierte SSC-Puffer im Verhältnis 1 zu 10 mit Aqua dest. verdünnt und zu gleichen Teilen mit reinem Ethanol gemischt, so dass sich einfach konzentrierter SSC-Puffer mit einem Ethanolgehalt von 50 % ergab (SSC/ 50 % Ethanol).

Färbelösungen:

DAPI-Färbelösung:

Die DAPI-Färbelösung wurde durch 1:100 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest. hergestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

Ethidiumbromid-Färbelösung:

Für die Färbung wurde Ethidiumbromid (1%) 1:10 000 mit Aqua dest. verdünnt.

Antifading-Mittel:

Die Herstellung des Antifading- und Eindeck-Mittels aus pPD, PBS und Glycerin erfolgte in abgedunkelten Räumen, da p-Phenylendiamin sehr lichtempfindlich ist. Aliquots zu 0,5 bis 1 ml wurden bei -20°C gelagert.

Lösungen für die Eluierung und Kopplung von ²¹³Bi:

Die Eluierung des Generators wurde mit 0,2 M NaI/ 0,2 M HCl-Lösung in Aqua bidest. durchgeführt.

Die Pufferlösungen zur Kopplung des Antikörpers waren 3 M Ammoniumazetatlösung und Ascorbinsäure in einer Konzentration von 40 mg/ml H₂O bidest.

Als Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie (ITLC) diente 0,05 M Trinatriumzitat, pH 5,5.

Die Spülung des Generators erfolgte mit 0,01 M HCl.

2.1.3 Geräte

γ -Counter	Typ 1480 Wizard TM 3 Wallac, Turku (Finnland)
Röntgenröhre	Bestrahlungsanlage Isovolt 320/10 Seifert (Ahrensburg)
Zytozentrifuge	Cytospin 2 Shandon (Pittsburgh PA 15275, USA)
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2 (mit 3CCD color Video camera und Lampe Atto Arc HBO 100 W) Carl Zeiss (D-37070 Göttingen)

2.2 Zellen und Zellkulturmethoden

2.2.1 Murine Fibroblasten L929

Um für die Untersuchung der Effektivität der Radioimmuntherapie eine geeignete Modellzelllinie zu erhalten, wurden murine Fibroblasten (L929), die natürlicherweise kein E-Cadherin exprimieren, entweder mit dem Gen für wt-E-Cad oder dem Gen für das mutierte $\Delta 9$ -E-Cad transfiziert (Handschuh et al., 1999). FACS-Analysen unserer Forschergruppe ergaben eine Antigenanzahl von etwa 10^5 pro Zelle (persönliche Mitteilung von S. Seidenschwang). Die Zelllinien (L929 wt und L929 $\Delta 9$) zeigen Unterschiede in der Adhäsivität und Motilität als Folge der Expression unterschiedlicher E-Cadherine (Handschuh et al., 1999). Zusätzlich mit dem Gen für E-Cadherin wurde ein Geneticin-Resistenzgen transfiziert.

Die murinen Fibroblasten wurden in DMEM mit 10 % FBS und 90 U/ml Penicillin/Streptomycin in Zellkulturflaschen bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung gezüchtet. Außerdem wurde das Antibiotikum Geneticin zugesetzt (1000 μ g/ml), um die transfizierten Zellen zu selektionieren. Etwa zweimal pro Woche wurden die Zellen nach Spülen mit PBS und der Ablösung mit 1mM EDTA-Lösung passagiert. Die Zellen wurden regelmäßig auf Mycoplasmen untersucht.

2.2.2 Humane Siegelring-Karzinom-Zellen HSC-45M2

Die menschliche Zelllinie HSC-45M2, die natürlicherweise $\Delta 9$ -E-Cad exprimiert, wurde in Japan aus dem Aszites einer 28jährigen Patientin gewonnen. Diese

Siegelringzellen sezernieren die Tumormarker CEA, CA 19-9 und TPA (Tissue polypeptide antigen) (Yanagihara et al., 1993). Aufgrund der E-Cadherin-Mutation zeigen die Zellen ein unzusammenhängendes Wachstumsmuster mit lockeren Kolonien und sind nur teilweise adhären. Ein Teil der Zellen löst sich nach einigen Tagen in Zellkultur ab in geht in Suspensionskultur über (Fukudome et al., 2000). In FACS-Analysen wurde eine Antigenanzahl von 3×10^5 pro Zelle ermittelt (Mitteilung von S. Seidenschwang). Die Kulturbedingungen waren identisch zu denjenigen bei den L929-Zellen, jedoch ohne Zugabe von Geneticin. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen auf das Vorhandensein von Mycoplasmen überprüft.

2.3 Radioimmunkonjugate

2.3.1 Antikörper

Der monoklonale Antikörper 6H8, der spezifisch an $\Delta 9$ -E-Cad bindet, wurde von Becker et al. (1999) entwickelt. Dazu wurde ein Peptid aus den Aminosäuren, die sich zwischen Exon 8 und 10 des $\Delta 9$ -E-Cad befinden, synthetisiert und intraperitoneal sowie subkutan in Ratten injiziert. Immunzellen aus der Milz der Ratten wurden mit Myelomzellen fusioniert. Die so entstanden Hybridom-Zellen wurden auf die Bildung von Antikörpern gegen $\Delta 9$ -E-Cad untersucht. Der Antikörper des Klons 6H8, der spezifisch $\Delta 9$ -E-Cad bindet ($K_a = 1,82 \times 10^8$ l/mol), wurde für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Er gehört wie der Kontroll-Antikörper 7H1, der spezifisch E-Cadherin mit Deletion des Exon 8 erkennt, der Subklasse IgG2a an. Beide Antikörper wurden von K.-F. Becker und E. Kremmer (GSF, München) zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Chelator

Die Kopplung von ^{213}Bi an den Antikörper erfolgte über den Chelator 2-(4-Isothiozyanatobenzyl)-Diethylentriamin-Pentaessigsäure (SCN-CHX-A''-DTPA) (Brechtel et al., 1991), (Nikula et al., 1995), (Nikula et al., 1999). SCN-CHX-A''-DTPA bindet kovalent an Lysylreste des Antikörpers, wobei bei dem für diese Arbeit verwendeten Versuchsprotokoll durchschnittlich 3 bis 5 Chelate pro Antikörper binden (Mitteilung von T. Nikula, Institut für Transurane, Karlsruhe). Die Immunreaktivität liegt danach noch bei etwa 90 % (McDevitt et al., 1999), (Nikula et al., 1999). Die Chelatierung der Antikörper wurde am Institut für Transurane (Karlsruhe) durchgeführt.

2.3.3 Eluierung und Kopplung von ^{213}Bi an die Antikörper

^{213}Bi wurde aus einem Radionuklidgenerator eluiert, der vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission (Karlsruhe) bereitgestellt wird. Der Generator enthält ^{225}Ac , bei dessen Zerfall unter anderem ^{213}Bi entsteht (vgl. Abb. 1, S. 8). ^{213}Bi wird von einem Kationen-Austauscher-Harz gebunden und kann mehrmals täglich ausgewaschen werden, wobei ein Mindestabstand von zwei Stunden zwischen den Eluierungen eingehalten werden soll (Nikula et al., 1999). Nach jeder Eluierung muss der Generator mit 2 ml 0,01 M HCl gespült werden. Insgesamt ist der Generator etwa 20 Tage lang verwendbar.

Die Eluierung erfolgte durch zweiminütige Inkubation mit 0,1 M NaI/0,1 M HCl (600 μl). Dann wurden dem Eluat 100 μl Ascorbinsäure (40 mg/ml H_2O) als Radikalfänger und 100 μl 3 M Ammonium-Azetat zur pH-Einstellung auf 5,3 beigefügt (Abb. 2). Die Herstellung des ^{213}Bi -Radioimmunkonjugats erfolgte durch Zugabe des chelatierten Antikörpers 6H8- SCN-CHX-A''-DTPA (100 μg) bzw. 7H1- SCN-CHX-A''-DTPA (100 μg). Nach siebenminütiger Inkubation wurde das Radioimmunkonjugat von ungebundenem ^{213}Bi durch Gelfiltration abgetrennt. Zu diesem Zweck wurde das Eluat über eine PD-10-Säule mit 2 ml PBS ausgewaschen.

Nach jeder Eluierung wurden die Aktivitätskonzentrationen des Eluats und des gereinigten Therapieprodukts bestimmt. Dazu wurde die ^{213}Bi -Aktivität von 2 μl einer 1:100-Verdünnung des an den Antikörper konjugierten Eluats (E) sowie des aufgereinigten Produkts (P) im γ -Counter gemessen, und die Aktivität pro ml des Eluats oder Produkts berechnet (Abb. 2). Außerdem wurde das Verhältnis von freiem ^{213}Bi zu Antikörper-gekoppeltem ^{213}Bi bestimmt. Dazu wurden 2 μl der erwähnten 1:100-Verdünnungen mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie (ITLC) aufgetrennt (Laufmittel 0,05 M Trinatriumzitat, pH 5,5). Dabei wandert das freie ^{213}Bi mit dem Laufpuffer (E_F bzw. P_F für freies ^{213}Bi in Eluat bzw. Produkt), während das Radioimmunkonjugat an der Auftragsstelle verweilt (E_G bzw. P_G für gebundenes ^{213}Bi in Eluat bzw. Produkt). Die Chromatographie-Streifen wurden durchgeschnitten, und die Aktivität der beiden Teile getrennt im γ -Counter gemessen (Abb. 2). Aus der Aktivitätskonzentration des ^{213}Bi -Immunkonjugats nach der Aufreinigung (P_G) wurden die für die Versuche benötigten Volumina des Therapieprodukts (P) ermittelt.

Die Zeit vom Beginn der Eluierung bis zum Beginn der Inkubation der Zellen mit den ^{213}Bi -Immunkonjugaten betrug durchschnittlich 30 bis 40 Minuten. Da zwischen der Messung und der Zugabe zu den Zellkulturen durchschnittlich 10 Minuten vergingen,

wurde die gemessene Aktivität pauschal um den sich in 10 Minuten ereignenden Zerfall korrigiert. Die für jeden einzelnen Versuch angegebenen Aktivitätskonzentrationen sind die korrigierten Werte.

Die Berechnung der Antikörpermenge, die pro Zellkulturflasche zugegeben wurde, ergibt sich wie folgt: Die dem Eluat zugegebenen 100 µg Antikörper müssen vollständig in E_G vorhanden sein. Daher lässt sich die in P_G (und damit in P) vorhandene Menge Antikörper aus dem Verhältnis der beiden Aktivitäten E_G und P_G ausrechnen, die mit Hilfe des γ -Counter ermittelt wurden. Dann wird die Antikörpermenge in dem Volumenanteil von P bestimmt, der in jede Zellkulturflasche verabreicht wird. Im nächsten Schritt wird die Antikörperkonzentration (ng/ml) für jeden Versuchsansatz ermittelt. Die Werte für die verschiedenen Versuche sind in Tabelle 2 (S. 26) angegeben.

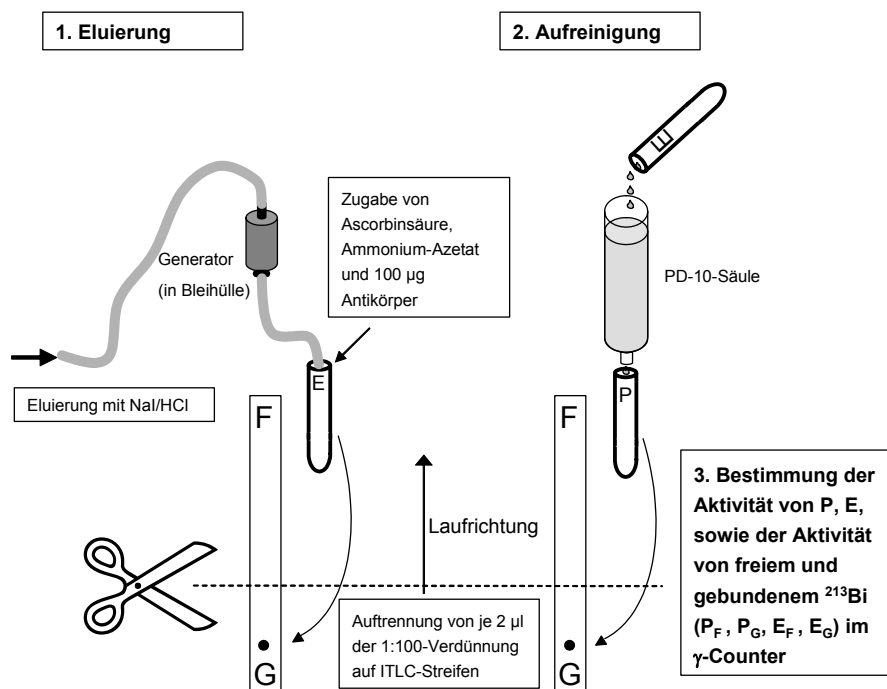


Abb. 2: Schematische Darstellung der Eluierung von ^{213}Bi , der Aufreinigung der ^{213}Bi -Immunkonjugate und der Aktivitätsbestimmung von freiem (E_F, P_F) und Antikörper-gekoppeltem ^{213}Bi (E_G, P_G) in Eluat (E) und aufgereinigtem Produkt (P).

2.4 Versuche zur Inkubation mit ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten

2.4.1 Versuche mit L929-Zellen

Je 5×10^5 L929 wt- oder L929 $\Delta 9$ -Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium in 25-cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation mit dem ^{213}Bi -Immunkonjugat: Pro Ansatz wurden 800 kBq des ^{213}Bi -6H8 zugegeben. Dies entspricht einer Aktivitätskonzentration von 160 kBq/ml und einer Radioimmunkonjugatkonzentration von durchschnittlich 141 ng/ml. Nach 30 Minuten Inkubation wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden dreimal mit 2 ml vorgewärmtem PBS gespült, dann wurde neues Medium zugegeben. Die nicht mit dem Radioimmunkonjugat inkubierte Kontrolle wurde ebenfalls dreimal mit 2 ml PBS gespült. Null, 24, 48 und 72 Stunden nach der Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten wurden die Zellen abgelöst, abzentrifugiert und einmal mit PBS gespült. Zum Fixieren wurden sie in 500 μl SSC/ 50 % Ethanol resuspendiert und bis zur Auswertung durch den MAA-Assay (siehe Kapitel 2.4.3) bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Versuche mit HSC-45M2-Zellen

2.4.2.1 Konkurrenz der ^{213}Bi -Radioimmunkonjugatbindung

Die Konkurrenzbarkeit der Bindung der Radioimmunkonjugate an $\Delta 9$ -E-Cad wurde bei den HSC-Zellen untersucht. 5×10^6 Zellen pro Ansatz wurden in je 1 ml Medium in Eppendorf-Cups pipettiert. Eine halbe Stunde vor der Inkubation mit ^{213}Bi -6H8-Immunkonjugaten wurde die Hälfte der Proben mit 61 μg (160facher Überschuss) kaltem 6H8-Antikörper bei 37 °C vorinkubiert, wodurch 99% der $\Delta 9$ -E-Cad-Moleküle besetzt werden. Nach 10minütiger Inkubationszeit mit den Radioimmunkonjugaten (je 3600 kBq) wurden die Zellen abzentrifugiert und die Überstände für jede Probe gesondert in γ -Counter-Messröhrchen gesammelt. Die Zellpellets wurden in je 800 μl PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und die Überstände ebenfalls in den Messröhrchen gesammelt. Anschließend wurde die Aktivität der einzelnen Zellpellets und der dazugehörigen Überstände im γ -Counter gemessen.

Dieser Versuch wurde mit den beiden verschiedenen Präparationen des chelatierten 6H8-Antikörpers (6,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 4,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie dem 7H1-Antikörper durchgeführt (vgl. Tab. 2, S. 26).

2.4.2.2 Zytotoxische Wirkung der ^{213}Bi -Radioimmunkonjugate

Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen in 5 ml Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden später mit 800 oder 3200 kBq des ^{213}Bi -6H8-Immunkonjugats inkubiert. Dies ergab Aktivitätskonzentrationen von 160 kBq/ml und 640 kBq/ml. Bei den HSC-Zellen wurden zwei unterschiedlich lange Inkubationszeiten, d. h. 10 und 90 Minuten, gewählt. Nach Absaugen des Mediums wurde dreimal mit 2 ml warmem PBS gespült. Eine nicht mit dem ^{213}Bi -Immunkonjugat inkubierte Kontrollgruppe wurde identisch behandelt. Eine zusätzliche Kontrollgruppe wurde nur mit dem kalten Antikörper inkubiert, um Veränderungen der Zellkernmorphologie durch den unmarkierten Antikörper allein auszuschließen.

Um die Selektivität und Spezifität der Radioimmunkonjugate zu evaluieren, wurden zwei weitere Versuchsgruppen untersucht: Eine Gruppe HSC-Zellen wurde 1 h vor Beginn der Inkubation mit ^{213}Bi -6H8 mit dem kalten, das heißt nicht mit ^{213}Bi beladenen, 6H8-Antikörper vorinkubiert, um so die Bindungsstellen für das Radioimmunkonjugat zu besetzen. Es wurden je 2,6 μg Antikörper für 2×10^5 Zellen in 5 ml Medium eingesetzt. Das entspricht einem 160fachen Überschuss gegenüber der Anzahl der Bindungsstellen. Eine weitere Gruppe der HSC-Zellen wurde mit ^{213}Bi -7H1-Konjugaten inkubiert. Damit sollte untersucht werden, inwieweit die Zellen durch α -Strahlung von unspezifischen beziehungsweise frei im Zellkulturmedium schwimmenden Radioimmunkonjugaten geschädigt werden.

Anders als bei den L929-Zellen wurden bei den HSC-Zellen keine Untersuchungen mit der Inkubationszeit 30 min durchgeführt, weil Vorversuche zum Vergleich der Zellschädigung durch ^{213}Bi -6H8 mit oder ohne kalte Vorinkubation bei dieser Inkubationszeit keine Unterschiede ergaben.

Die Fixierung und Lagerung der HSC-Zellen erfolgte wie bei den L929-Zellen beschrieben.

Sämtliche Versuchsansätze sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Antikörper	Inkub.-Zeit (min)	Akt.-Konz. (kBq/ml)	AK-Konz. (ng/ml)	kalte Vor- inkubation	Anzahl der Versuche
6H8 (a)	10	160	128	ohne	4
				mit	3
6H8 (b)	10	640	667	ohne	3
				mit	3
7H1 (c)	10	160	139	ohne	3
		640	723		3
6H8 (a)	90	160	128	ohne	3
6H8 (b)		640	667		3
7H1 (c)	90	160	139	ohne	3
		640	723		3
Kompetitionsversuche					
6H8 (a)		3,56 MBq/	3021		9 / 8
6H8 (b)	10	5x10 ⁶ Zell.	4050	ohne/mit	9 / 9
7H1 (c)		in 1 ml	4440		7 / 7

Tab. 2: Zusammenstellung der ²¹³Bi-Versuche mit HSC-Zellen.

Antikörperpräparationen mit folgenden verschiedenen Konzentrationen wurden als Trägermolekül für ²¹³Bi verwendet: a: 6,1 µg/µl; b: 4,7 µg/µl; c: 14 µg/µl. Die Inkubationszeit (Inkub.-Zeit) und die Aktivitätskonzentration (Akt. Konz.) sind für die einzelnen Versuche angegeben. Die Werte für die Antikörper-Konzentration bei jedem Versuchsansatz (AK-Konz.) beziehen sich auf die Konzentration des mit ²¹³Bi beladenen Antikörpers, wobei nur etwa 1 von 1000 Antikörpern tatsächlich ein ²¹³Bi-Atom trägt. Die Menge des bei der Vorinkubation zugegebenen kalten Antikörpers ist dabei nicht berücksichtigt.

Die Versuchsanzahlen bei den Wettbewerbsversuchen bezeichnen die Anzahl der Ansätze ohne/mit Vorinkubation mit dem kalten Antikörper.

2.4.3 MAA-Assay

Die fixierten Zellen wurden bei 4°C bis zur Erstellung der Zellpräparate gelagert. Es wurden 100 µl (für die Zeitpunkte 0 und 24 h) beziehungsweise 10 µl (für 48 und 72 h) der fixierten Zellsuspension auf Objektträger zentrifugiert (1000 Upm, 5 min). Nach Trocknung der Zytopräparate erfolgte die Färbung im DAPI-Tauchbad für zwei Minuten. Nach erneuter Trocknung wurden die Zellpräparate mit Ethidiumbromid-Färbelösung (0,9 µl) und p-PD-Antifadingmittel (15 µl) überschichtet und mit Deckgläsern abgedeckt. Pro Zeitpunkt und Versuchsansatz wurden mindestens 1000 Zellen im Fluoreszenzmikroskop mit einem DAPI-Filter (Exzitation bei 270-380 nm, Emission bei 410 bis 580 nm) ausgezählt (Abb. 3).

2.4.3.1 Mikrokernhaltige Zellen

Die Kriterien für Mikrokerne waren: Der Mikrokern färbt sich in ähnlicher Weise wie der Zellkern an, ist aber nicht mit diesem verbunden. Er ist rund oder oval geformt. Die maximale Größe eines Mikrokerns wurde auf etwa ein Drittel des Durchmessers des Hauptkerns festgelegt. Es wurde nicht zwischen Zellen mit nur einem und Zellen mit mehreren Mikrokernen unterschieden. Typische Morphologien sind in Abb. 3 B dargestellt.

Zellen, deren Mikrokerne nicht sicher vom Hauptkern abgrenzbar waren, wurden als normale Zellen bewertet. Wenn der Durchmesser eines Mikrokerns mehr als ein Drittel des Hauptkerns betrug, wurden die Zellen als zwei- bzw. mehrkernige Zellen den abnormalen Zellen zugerechnet.

Der Anteil mikrokernhaltiger Zellen unter den ausgezählten Zellen eines Präparates wurde prozentual bestimmt.

2.4.3.2 Apoptotische Zellen

Apoptotische Zellen wurden durch folgende drei Merkmale charakterisiert: Ihr Durchmesser war deutlich kleiner als der normaler Zellen; es waren Kernfragmente ähnlicher Größe, aber keine Haupt- und Mikrokerne unterscheidbar; die Kernfragmente zeigten durch die Chromatinkondensation eine stärkere Farbeintensität als die Zellkerne der umgebenden Zellen (Abb. 3 C).

Die Zählung erfolgte parallel zu der Zählung der Mikrokerne. Auch hier wurde die Apoptose-Häufigkeit von mindestens 1000 gezählten Zellen prozentual ausgedrückt.

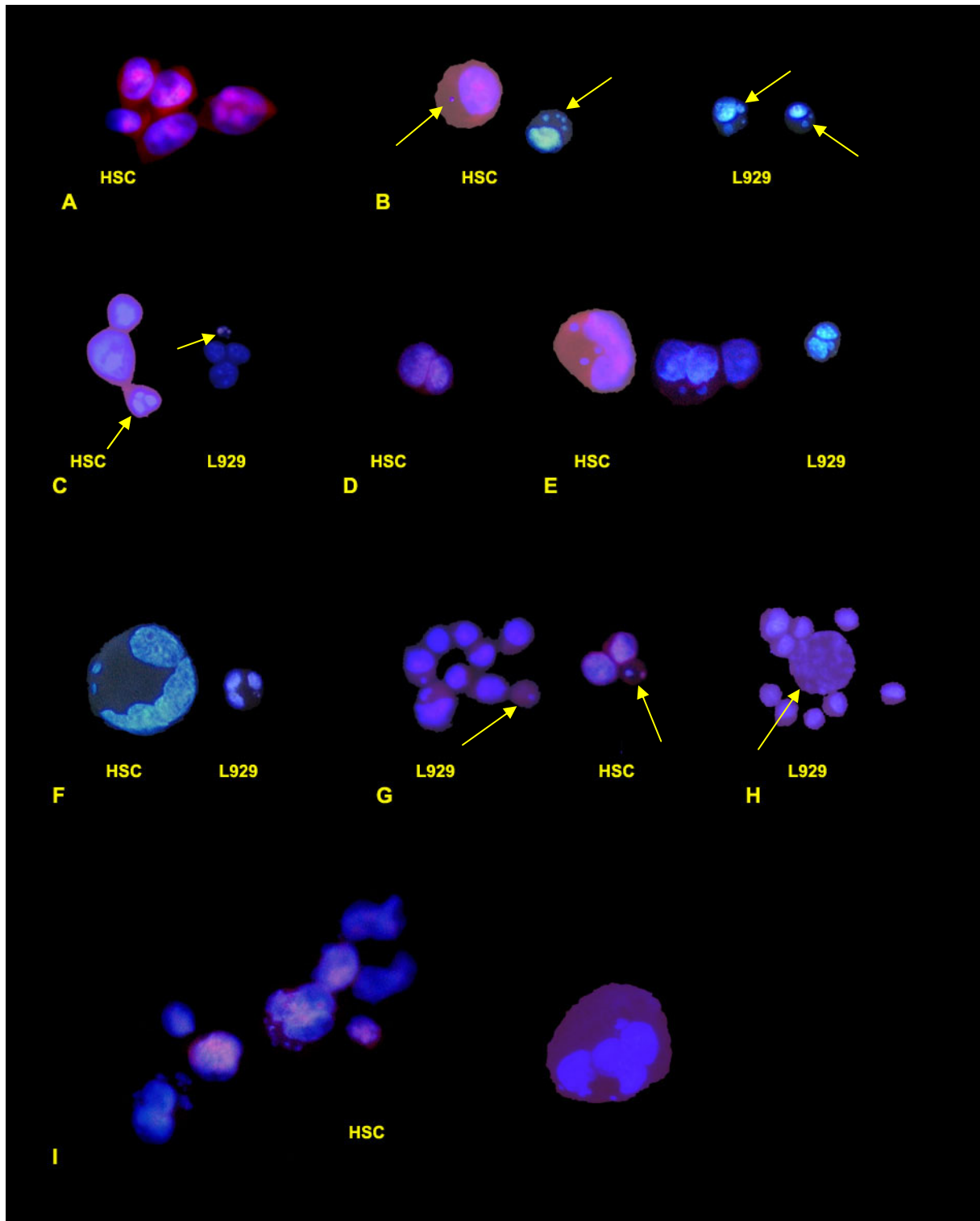


Abb. 3: Strahleninduzierte Zellmorphologien bei HSC und L929

(A) Normale Zellen mit bläulichem Zellkern, rötlichem Zytoplasma und leuchtend roten Nukleoli; (B) mikrokernhaltige Zellen mit einem oder mehreren Mikrokernen (Pfeile); (C) apoptotische Zellen (Pfeile) neben normalen Zellen; (D-H) abnormale Zellen: (D) zweikernige Zellen ohne, (E) mit Mikrokernen, (F) vielkernige Riesenzellen, (G) Zellen ohne Zellkern (Pfeile), (H) nekrotische Zellen mit aufgeblähtem Zellkern (Pfeil).

(I) Nach Inkubation mit höheren Aktivitätskonzentrationen (640 kBq/ml) oder Röntgenbestrahlung mit hohen Dosen (4 Gy) zeigten sehr viele Zellen innerhalb eines Blickfeldes starke Veränderungen, hier beispielsweise vier abnormale bei insgesamt neun abgebildeten Zellen.

2.4.3.3 Abnormale Zellen

Als abnormal wurden auffällige Zell-Morphologien bezeichnet, die nicht die Kriterien für mikrokernhaltige oder apoptotische Zellen erfüllten (Abb. 3 D-I). Im Einzelnen waren dies zwei- und mehrkernige Zellen mit oder ohne Mikrokern, Zellen ohne Zellkern, Riesenzellen mit mehrfach vergrößertem Zelldurchmesser, und vereinzelt nekrotische Zellen. Letztere zeigten einen vergrößerten Zellkern, der nur schwach und inhomogen gefärbt war. Das Auftreten der abnormalen Zellen wurde ebenfalls prozentual bestimmt.

2.5 Röntgenbestrahlung

Für die Versuche zur Bestimmung der Zytotoxizität von Röntgenstrahlung wurden je 2×10^5 Zellen in 5 ml Kulturmedium in 25-cm²-Flaschen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Bestrahlung mit Hilfe einer Röntgenröhre mit 240 kV Röntgenstrahlen, die durch 3 mm Beryllium gefiltert wurden. Die Dosisleistung lag bei 13 mA bei etwa 1Gy/min. Zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden nach der Bestrahlung mit den Dosen 1, 2 bzw. 4 Gy wurden die Zellen abgelöst und in SSC/ 50 % Ethanol fixiert. Die Auswertung erfolgte durch den MAA-Assay wie oben beschrieben.

2.6 Klonogener Test

Um die Korrelation des klonogenen Überlebens mit den Ergebnissen des MAA-Assays aufzuzeigen, wurden stichprobenartig mit HSC-Zellen auch klonogene Tests durchgeführt. Dazu wurden 2×10^5 HSC-Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und mit ²¹³Bi-Konjugaten inkubiert wie in Kap. 2.4.2.2 beschrieben. Sofort nach der Inkubation wurden die Zellen abgelöst und je 5×10^2 Zellen in 50mm-Petrischalen ausgesät. Nach acht bis zehn Tagen wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit 70 % Ethanol fixiert und alle Klone (dichte, rundliche Zellkolonien mit mindestens 50 Zellen) gezählt. Da teilweise keine gut abgrenzbaren Klone gebildet wurden, wurde zusätzlich die so genannte Softagar-Methode angewandt. Da sie aufwendiger ist als der oben beschriebene Test, war es nicht möglich, die Softagar-Technik zeitgleich mit den MAA-Versuchen mit ²¹³Bi durchzuführen. Bei den Versuchen zur Zellschädigung durch Röntgenbestrahlung wurde das klonogene Überleben der HSC-Zellen jedoch auf diese Weise getestet. Dazu wurden 0,3 g Bacto-Agar mit Aqua dest. ad 50 ml in der Mikrowelle mehrfach aufgekocht, bis die Flüssigkeit klar

und schlierenfrei war. Der Agar wurde dann im Wasserbad bei etwa 45°C am Erstarren gehindert. Dann wurden 50 ml eines doppelt konzentrierten Mediums (1,35 g DMEM Instamed + 0,37 g Natriumhydrogencarbonat in 50 ml Aqua dest., pH 7,25) hergestellt und steril filtriert. Nach Zugabe von 10 ml FBS und 1 ml Penicillin/Streptomycin wurde die Bacto-Agar-Lösung untergemischt. Dieses fertige Softagar-Medium-Gemisch wurde für die Dauer der folgenden Bestrahlungsversuche bei einer Temperatur von 45°C ins Wasserbad gestellt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit 1, 2 und 4 Gy bestrahlt, abgelöst und in 1 ml Medium auf 4 ml des Softagar-Medium-Gemischs in Petrischalen pipettiert. Pro Petrischale wurden 500 (unbestrahlte Kontrollen), 2000 (1 Gy), 3000 (2 Gy) und 10.000 (4 Gy) Zellen ausgesät.

2.7 Statistik

Die Induktion von MAA-Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen wurde verglichen. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz wurde der Student-t-Test verwendet. Bei p-Werten bis 0,05 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen angenommen. Für jeden Datenpunkt liegen, soweit nicht anders angegeben, mindestens drei parallele Experimente vor.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitätskontrolle der Eluierung und Kopplung von Bi-213

Insgesamt wurden für diese Arbeit 21 Eluierungen des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators durchgeführt. Im Mittel wurde im Eluat eine Aktivität von 157 ± 31 MBq erzielt (Mittelwert und Standardabweichung). Generell war diese erzielte Aktivität vor allem von drei Faktoren abhängig: Vom Generator, der mit unterschiedlichen Actinium-Aktivitäten beladen war, vom Alter des Generators und von der Zeit, die seit dem letzten Spülen des Generators vergangen war. Es wurde versucht, die beiden letzten Faktoren möglichst konstant zu halten. In dieser Arbeit wurden nur Eluate verwendet, die zwischen zwei und vier Stunden ($2,8\pm 0,5$ Stunden) nach dem letzten Spülen aus dem höchstens eine Woche alten Generator gewonnen worden waren.

Nach Inkubation mit dem chelatierten Antikörper waren 89 ± 4 % des ^{213}Bi im Eluat an den Antikörper gebunden. Durch die Gelfiltration zur Abtrennung des freien ^{213}Bi stieg die radiochemische Reinheit auf 98 ± 1 %. Dabei waren im aufgereinigten Produkt noch 60 ± 11 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden, da ein Teil der Radioimmunkonjugate in der Chromatographiesäule verbleibt. Die spezifische Aktivität betrug durchschnittlich $1,2\pm 0,2$ MBq/ μg für 6H8 und $1,0\pm 0,3$ MBq/ μg für 7H1. Das entspricht etwa einem ^{213}Bi -Atom auf je ca. 1000 Antikörpermoleküle.

3.2 MAA-Induktion bei L929-Zellen durch Inkubation mit ^{213}Bi -Konjugaten

Die L929-Zellen der Kontrollgruppen zeigten sehr wenige Atypien. Nur etwa 2,0 % der Zellen bildeten Mikrokerne und wenige abnormale Zellen, während keine Apoptosen vorkamen. Bei 30minütiger Inkubation mit 160 kBq/ml des ^{213}Bi -6H8-Konjugats zeigten die L929 $\Delta 9$ -Zellen einen deutlichen Anstieg der Mikrokernhäufigkeit mit einem Maximum von $9,7\pm 1,7$ % (24 h nach der Inkubation), während bei den L929 wt-Zellen kein signifikanter Anstieg zu erkennen war (Abb. 4). Die Häufigkeit von abnormalen Zellformen erhöhte sich bei L929 $\Delta 9$ bis auf $4,6\pm 1,9$ % (72 h), wohingegen bei den Wildtyp-Zellen fast keine abnormalen Zellen auftraten. Apoptotische Zellen wurden auch nach der Inkubation mit Radioimmunkonjugaten bei keiner der beiden Zelllinien gefunden. Bei Auswertung

aller drei Parameter im MAA-Assay ergaben sich für L929 $\Delta 9$ atypische Kernmorphologien in ungefähr 13+/-3,1 % mit einem Maximum bei 48 h nach der Inkubation. Im Unterschied hierzu war bei den L929 wt-Zellen kein signifikant erhöhtes Auftreten von MAA-Zellen feststellbar (3,5 +/- 1,3 % MAA-Zellen 24 h nach Inkubation mit $^{213}\text{Bi-6H8}$).

Die Daten, die der Abbildung zugrunde liegen, sind im Anhang (S. 70) aufgelistet.

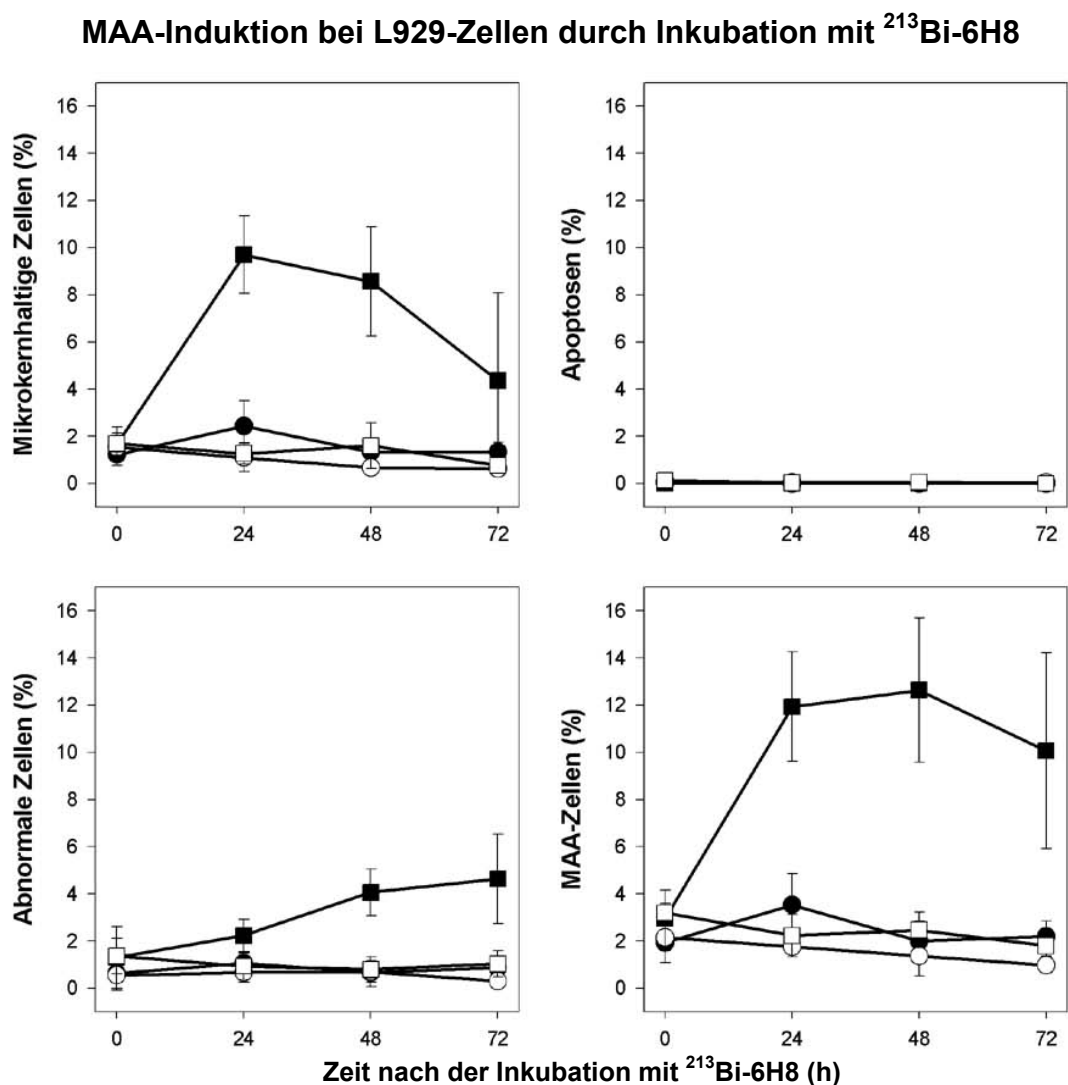


Abb. 4: Bildung von Mikrokernen, Apoptosen und abnormalen Zellen sowie die Summe der drei Parameter nach 30 min Inkubation mit 160 kBq/ml $^{213}\text{Bi-6H8}$ bei L929 wt- (●) und $\Delta 9$ -Zellen (■). Die offenen Symbole (○ □) zeigen die unbehandelten Kontrollen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei Versuchen.

3.3 Inkubation von HSC-Zellen mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten

3.3.1 Wettbewerbsversuche

Um die Radioimmunkonjugatbindung an die Magenkarzinomzellen zu untersuchen, wurden HSC-45M2-Zellen mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten inkubiert und abzentrifugiert. Dann wurde die Aktivität der ungebundenen Radioimmunkonjugate im Überstand und die der an die Zellen gebundenen Radioimmunkonjugate getrennt gemessen. Dabei verblieb der Großteil der bei jedem Versuch eingesetzten Aktivität im Überstand (Abb. 5 A). Dies galt sowohl bei Verwendung der beiden untersuchten 6H8-Präparationen mit unterschiedlicher Antikörperkonzentration (6,1 µg/µl und 4,7 µg/µl) als auch bei der 7H1-Präparation. Durch Vorinkubation der Zellen mit dem kalten 6H8-Antikörper (160facher Überschuss) 30 min vor Beginn der Inkubation mit ²¹³Bi-6H8-Konjugaten ließ sich der Anteil der nicht an die Zellpellets gebundenen Aktivität weiter steigern. Bei den Versuchen mit dem unspezifischen 7H1-Antikörper hingegen wurde der Anteil der nicht gebundenen Aktivität durch Vorinkubation mit einem 160fachen Überschuss an kaltem 7H1 nicht beeinflusst (Abb. 5 A).

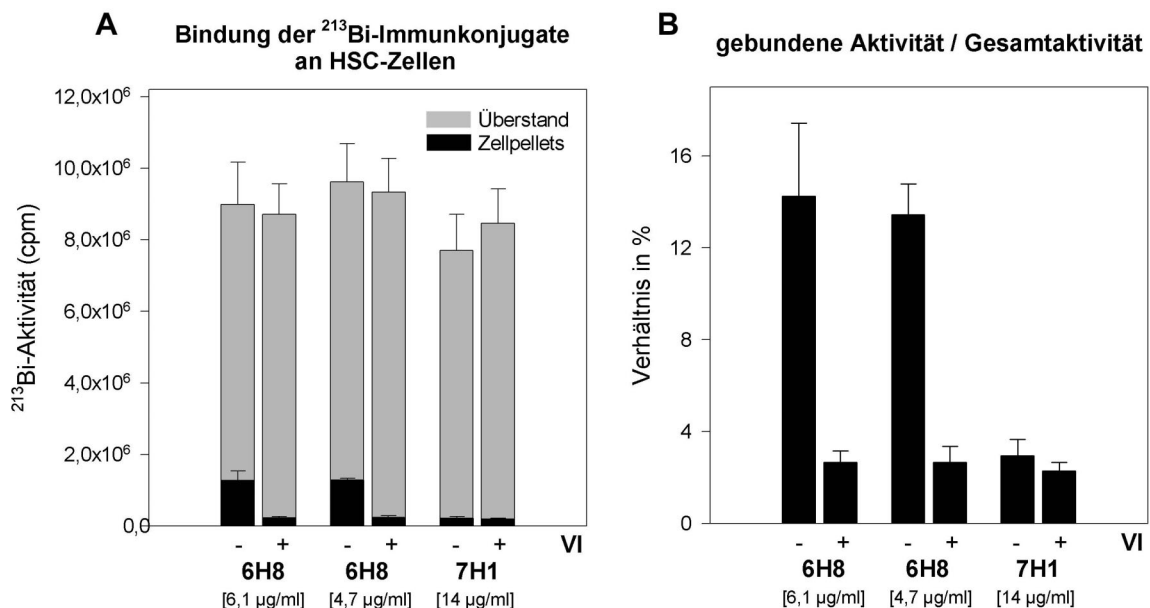


Abb. 5: Bindung von ²¹³Bi-Konjugaten an HSC-Zellen ohne (- VI) und mit (+ VI) Vorinkubation mit einem 160fachen Überschuss des jeweiligen kalten Antikörpers. (A): An die Zellen gebundene Aktivität und frei im Überstand befindliche Aktivität für beide 6H8-Präparationen und für 7H1. (Die Aktivität ist als direktes Messergebnis des γ -Counter in cpm angegeben, nicht in Bq.) (B): Die an die Zellen gebundene Aktivität als Prozentanteil der insgesamt eingesetzten Aktivität.

Deutlicher wurden diese Unterschiede bei Betrachtung der an die Zellen gebundenen Aktivität im Verhältnis zur Gesamtaktivität. Bei den beiden 6H8-Präparationen wurden 14+/-3,2 % bzw. 13+/-1,4 % der insgesamt zugegebenen Aktivität an den Zellpellets gemessen (Abb. 5 B). Bei Verwendung des unspezifischen 7H1-Antikörpers wurde mit 2,9+/-0,7 % der gesamten Aktivität deutlich weniger Aktivität an die Zellen gebunden als bei Verwendung von 6H8. Vorinkubation mit dem kalten Antikörper reduzierte die Bindung des 6H8-Radioimmunkonjugates an die Zelloberfläche auf 2,7+/-0,5 % bzw. 2,7+/-0,7 %. Die Bindung der unspezifischen ²¹³Bi-7H1-Konjugate nach Vorinkubation mit kaltem 7H1 blieb jedoch nahezu unverändert (2,3+/-0,4 %).

3.3.2 MAA-Induktion bei HSC-45M2-Zellen durch ²¹³Bi-Immunkonjugate

3.3.2.1 Auftreten von MAA-Zellen bei unbehandelten oder mit unmarkiertem Antikörper inkubierten Zellen

Die unbehandelten Kontrollgruppen der HSC-Zellen wiesen ein deutlich unregelmäßigeres Zellbild auf als die L929-Zellen. Zu allen Versuchszeitpunkten konnten bei etwa 6% der Zellen Veränderungen der Kernmorphologie festgestellt werden. Dabei wurden vor allem mikrokernhaltige und abnormale (meist zwei- und mehrkernige) Zellen, jedoch kaum apoptotische Zellen nachgewiesen.

Abb. 6 zeigt die MAA-Zellen bei den unbehandelten Kontrollen sowie bei Zellen, die mit den kalten Antikörpern (ohne ²¹³Bi) inkubiert worden waren. Beide Antikörper (6H8 und 7H1) verursachten einen geringfügigen Anstieg der MAA-Zellen.

Die Daten, die jedem Punkt der Abbildung zugrunde liegen, sind im Anhang dargestellt (S. 71).

MAA-Induktion bei HSC-Zellen durch Inkubation mit kaltem Antikörper

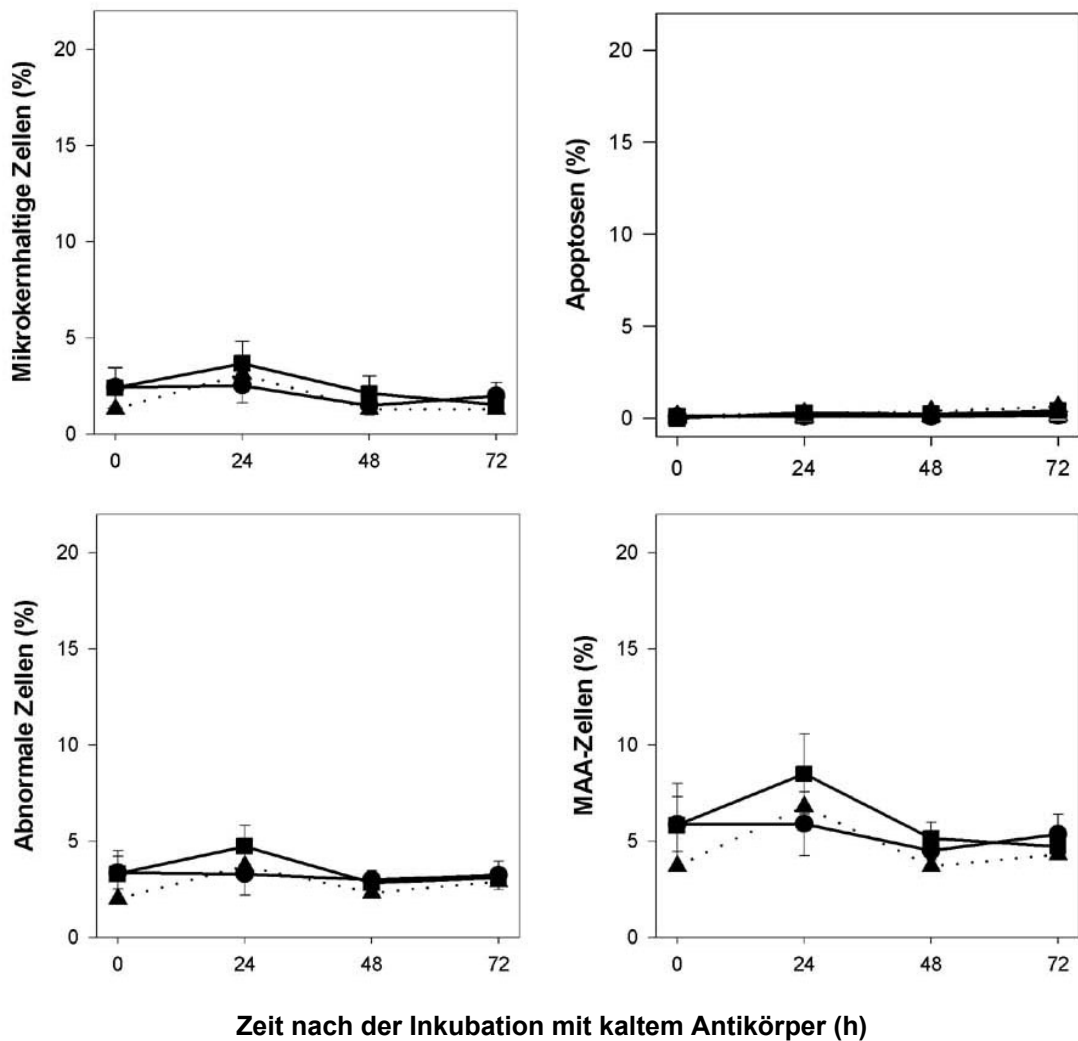


Abb. 6: Bildung von Mikrokernen, Apoptosen und abnormalen Zellen sowie die Summe der drei Parameter nach 2 h Inkubation mit kaltem Antikörper. (●) unbehandelte Kontrollen, (■) Inkubation mit unmarkiertem 6H8 (n = 3) und (▲) Inkubation mit unmarkiertem 7H1 (n = 1).

3.3.2.2 Abhängigkeit der MAA-Induktion von der Aktivitätskonzentration der ^{213}Bi -6H8-Konjugate

Mit zunehmender Aktivitätskonzentration von ^{213}Bi -6H8 stieg die Bildung von MAA-Zellen an (Abb. 7). Es waren vor allem mikrokernhaltige und abnormale Zellen nachweisbar. Dabei fiel auf, dass ab 24 h nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten vor allem mehrkernige Zellen mit zusätzlichen Mikrokernen oder Riesenzellen als abnormale Zellen auftraten, während unmittelbar nach der Behandlung mit Radioimmunkonjugaten (Zeitpunkt 0 h) und bei der unbehandelten Kontrollgruppe überwiegend zwei- und mehrkernige Zellen ohne Mikrokern zu

sehen waren. Der höchste prozentuale Anteil an MAA-Zellen konnte 24 h nach 10minütiger Inkubation mit 160 bzw. 640 kBq/ml ^{213}Bi -6H8-Konjugaten gezählt werden und betrug $12\pm 1,3\%$ bzw. $21\pm 3,6\%$ (Abb.7). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant.

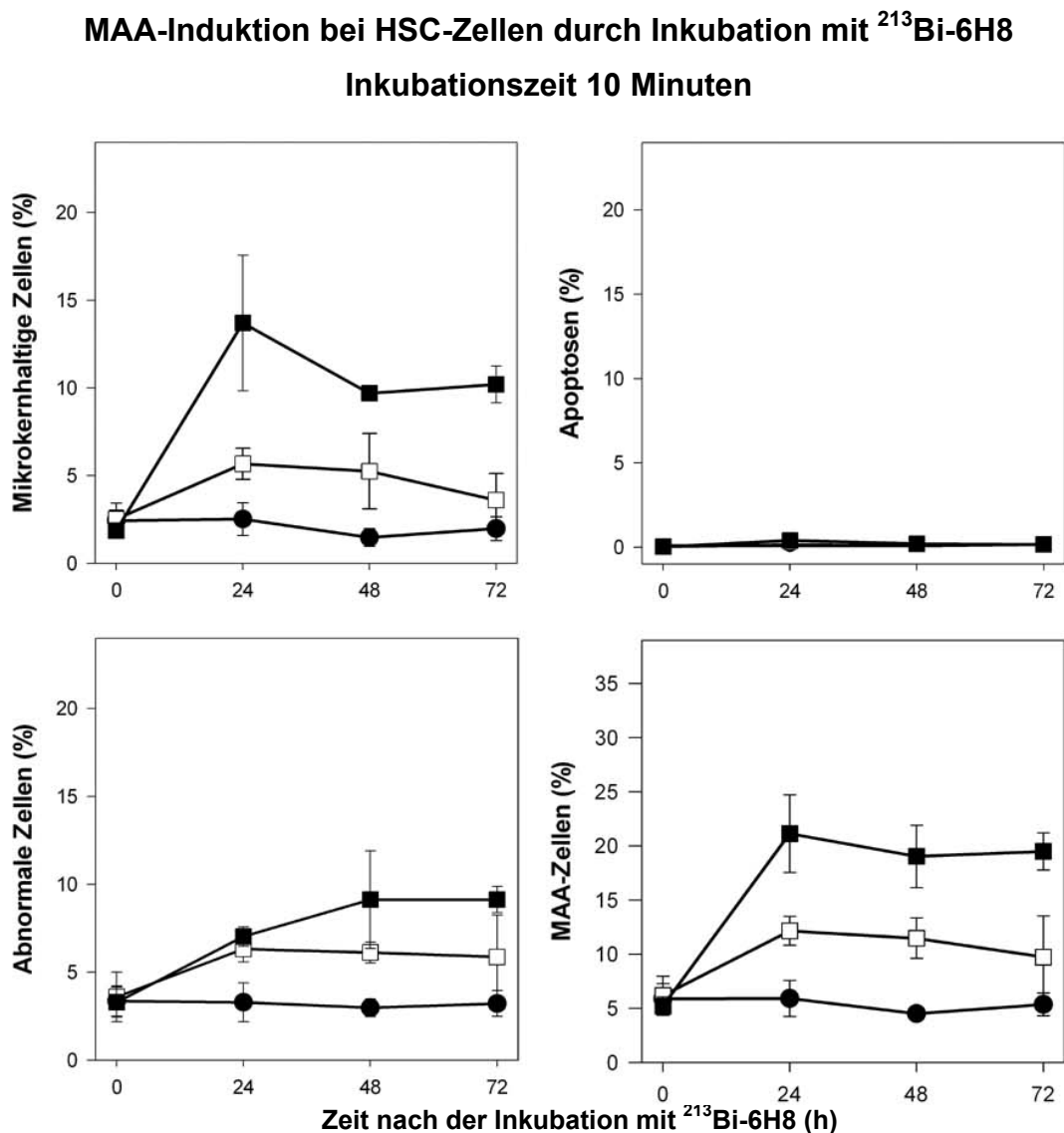


Abb. 7: Bildung von Mikrokernen, Apoptosen und abnormalen Zellen sowie die Summe der drei Parameter nach Inkubation für 10 min mit verschiedenen Aktivitätskonzentrationen (● Kontrollen, □ 160 kBq/ml, ■ 640 kBq/ml) von ^{213}Bi -6H8.

Nach 90minütiger Inkubation (Abb. 8) mit 160 kBq/ml bzw. 640 kBq/ml trat die maximale Anzahl an MAA-Zellen erst 48 h nach der Inkubation auf. Dabei führten 160 kBq/ml zu $19\pm 3,3\%$ und 640 kBq/ml zu $33\pm 5,7\%$ atypischen Morphologien.

Die erreichten MAA-Häufigkeiten bei 48 h waren für die beiden Aktivitätskonzentrationen signifikant verschieden.

Die Daten für die beiden Abbildungen sind im Anhang (S. 72) ausführlich dargestellt.

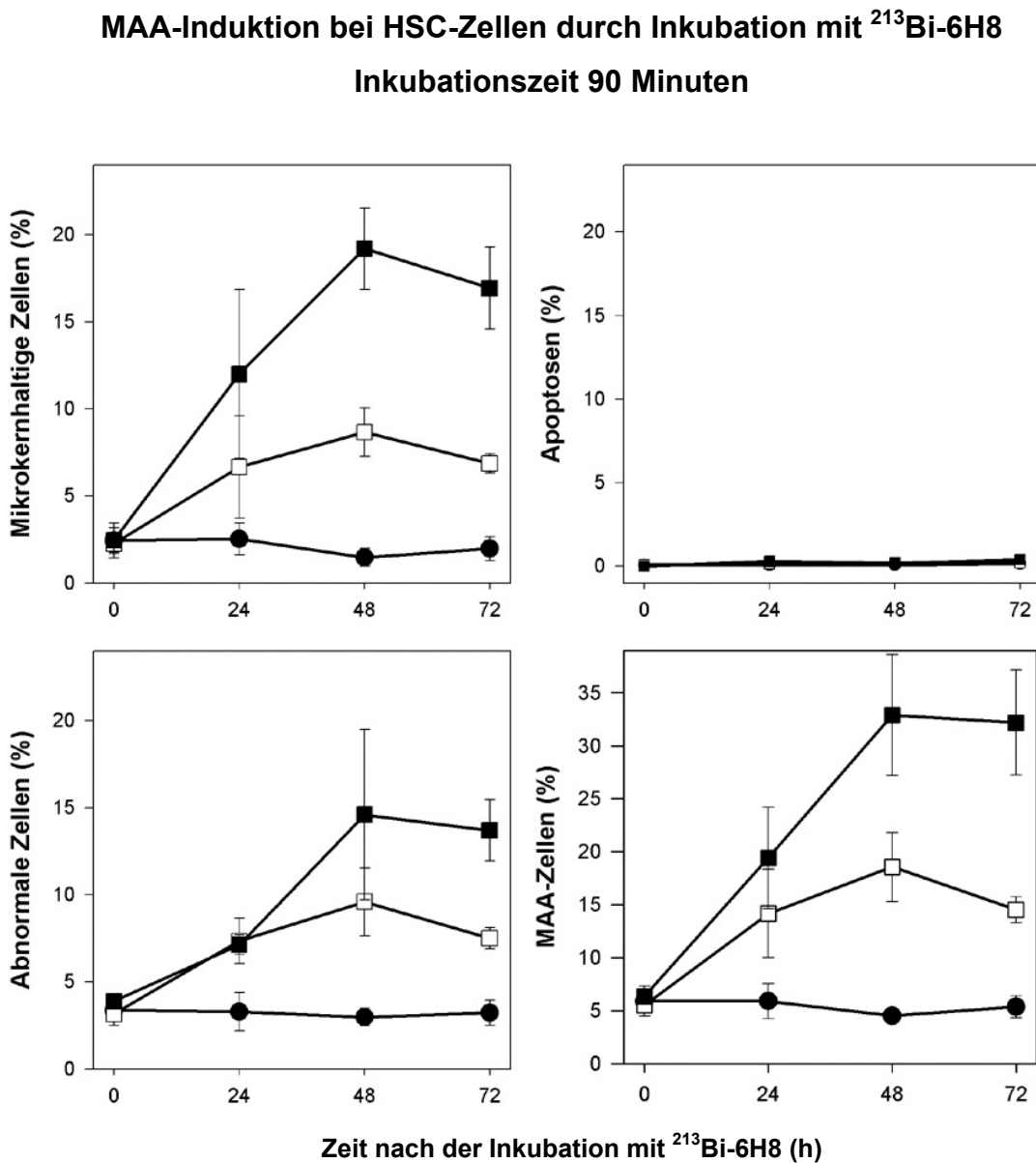


Abb. 8: Bildung von Mikrokernen, Apoptosen und abnormalen Zellen sowie die Summe der drei Parameter nach Inkubation für 90 min mit verschiedenen Aktivitätskonzentrationen (● Kontrollen, □ 160 kBq/ml, ■ 640 kBq/ml) von $^{213}\text{Bi-6H8}$.

3.3.2.3 Effekt der Vorinkubation mit kaltem Antikörper

Nach Vorinkubation mit einem 160fachen Überschuss an kaltem Antikörper und anschließender 10minütiger Inkubation der HSC-Zellen mit 160 kBq/ml $^{213}\text{Bi-6H8}$ konnte ein nur geringfügiger Anstieg der Mikrokernfrequenz und der Häufigkeit

abnormaler Zellen beobachtet werden (Abb. 9). Insgesamt wurden maximal 8,4 \pm 1,6 % MAA-Zellen 24 h nach der Inkubation gezählt. Der Unterschied zur MAA-Häufigkeit bei den nicht vorinkubierten Zellen (12 \pm 1,3 %) war statistisch signifikant. Inkubation mit 640 kBq/ml $^{213}\text{Bi-6H8}$ nach kalter Vorinkubation führte zu MAA-Werten von 20 \pm 0,6 % bei 24 h (Abb. 9). Damit war kein Unterschied zur nicht mit kaltem Antikörper vorinkubierten Versuchsgruppe feststellbar. Bei einer längeren Inkubationszeit (30 min) wurde unabhängig von der Aktivitätskonzentration ebenfalls kein schützender Effekt der kalten Vorinkubation mehr nachgewiesen (nicht graphisch dargestellt, Daten im Anhang, S. 73).

MAA-Induktion bei HSC-Zellen durch Inkubation mit $^{213}\text{Bi-6H8}$ nach Vorinkubation mit kaltem Antikörper

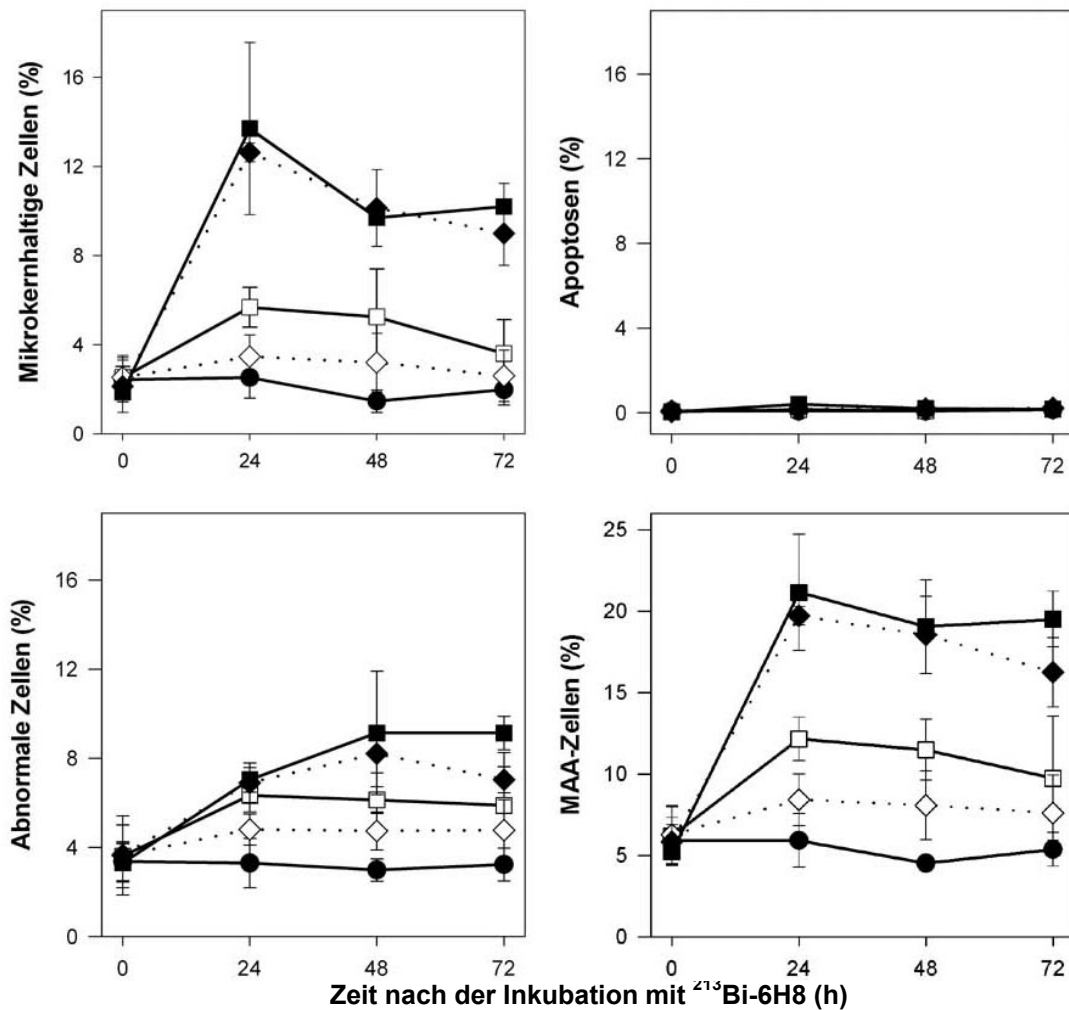


Abb. 9: Bildung von Mikrokernen, Apoptosen und abnormalen Zellen sowie die Summe der drei Parameter nach Inkubation mit 160 kBq/ml (offene Symbole) bzw. 640 kBq/ml (geschlossene Symbole) $^{213}\text{Bi-6H8}$ mit ($\cdots\diamond\blacklozenge\cdots$) und ohne ($\text{---}\square\blacksquare\text{---}$) kalte Vorinkubation. Die Kontrollgruppen (\bullet) sind mit dargestellt.

3.3.2.4 Vergleich der Effektivität von ^{213}Bi -6H8 und ^{213}Bi -7H1

Nach Inkubation mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -7H1-Konjugaten für 10 Minuten wurden weniger MAA-Morphologien ausgebildet als nach Inkubation mit den 6H8-Konjugaten (Abb. 10). Am deutlichsten zu sehen war dies 48 h nach der Inkubation mit 6,3 \pm 0,3 % MAA-Zellen durch 7H1-Konjugate verglichen mit 11 \pm 1,9 % bei 6H8-Konjugaten. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Bei einer Aktivitätskonzentration von 640 kBq/ml zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Induktion von MAA-Zellen zwischen dem spezifischen 6H8- und dem unspezifischen 7H1-Antikörper.

MAA-Induktion bei HSC-Zellen durch Inkubation mit ^{213}Bi -6H8 bzw. ^{213}Bi -7H1 Inkubationszeit 10 Minuten

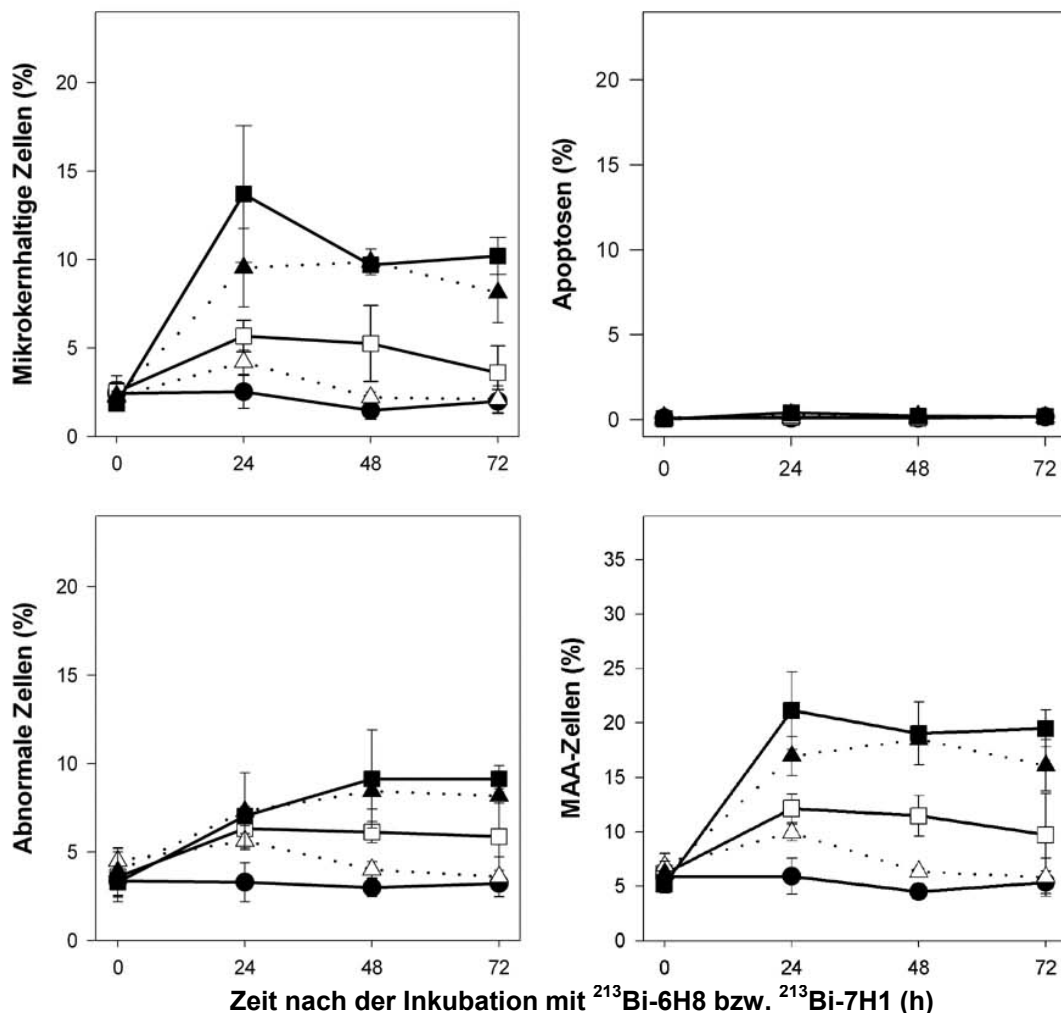


Abb. 10: Mikrokernbildung, Apoptoseinduktion und Bildung abnormaler Zellen sowie die Induktion von MAA-Zellen insgesamt nach Inkubation für 10 Minuten mit 160 kBq/ml (offene Symbole) und 640 kBq/ml (geschlossene Symbole). Kontrollen (●), Behandlung mit ^{213}Bi -6H8 (—□■—) und ^{213}Bi -7H1 (··△▲··).

MAA-Induktion bei HSC-Zellen durch Inkubation mit $^{213}\text{Bi-6H8}$ bzw. $^{213}\text{Bi-7H1}$
Inkubationszeit 90 Minuten

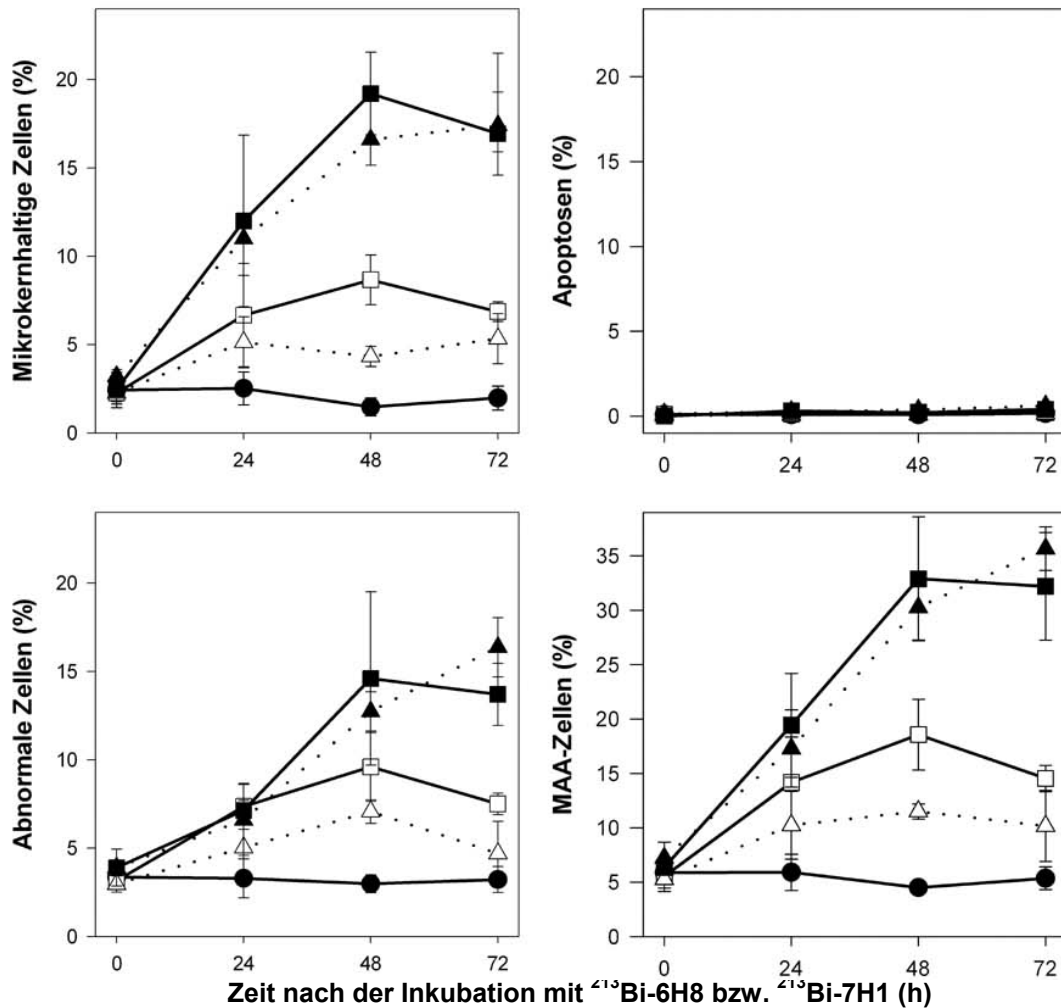


Abb. 11: Mikrokernbildung, Apoptoseinduktion und Bildung abnormaler Zellen sowie die Induktion von MAA-Zellen insgesamt nach Inkubation für 90 Minuten mit 160 kBq/ml (offene Symbole) und 640 kBq/ml (geschlossene Symbole). Kontrollen (●), Behandlung mit $^{213}\text{Bi-6H8}$ (—□■—) und $^{213}\text{Bi-7H1}$ (··△▲··).

Nach 90minütiger Inkubation mit 160 kBq $^{213}\text{Bi-7H1}$ entstanden $12 \pm 0,7$ % MAA-Zellen (48 h nach Inkubation), während die mit $^{213}\text{Bi-6H8}$ behandelte Gruppe insgesamt $19 \pm 3,3$ % MAA-Zellen entwickelte (Abb. 11). Nach Inkubation mit 640 kBq/ml für 90 Minuten war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Radioimmunkonjugaten hinsichtlich der MAA-Induktion feststellbar.

Die Daten für jeden Punkt der Abbildungen sind im Anhang aufgeführt (S. 74 für Abb. 10, S. 75 für Abb. 11).

3.4 MAA-Induktion durch Röntgenstrahlung

3.4.1 Bestrahlung der L929-Zellen

Nach Exposition der L929 Δ 9-Zellen mit zunehmenden Bestrahlungsdosen stieg die Häufigkeit von Veränderungen der Zellkernmorphologie an (Abb. 12). Dabei wurden vor allem mikrokernhaltige Zellen und nur wenige abnormale Zellen entdeckt. Die größte Anzahl an MAA-Zellen wurde 24 h nach der Bestrahlung gezählt. Bestrahlung mit 1 Gy verursachte maximal 12 % MAA-Zellen, 2 Gy maximal 19 % MAA-Zellen und 4 Gy 29 % MAA-Zellen. Die unbestrahlten Kontrollen zeigten auffällige Zellkernmorphologien in 2,3 % bis 4,4 %.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus den beiden Versuchen (vgl. Anhang, S. 76).

MAA-Induktion bei L929 Δ -Zellen durch Röntgenstrahlung

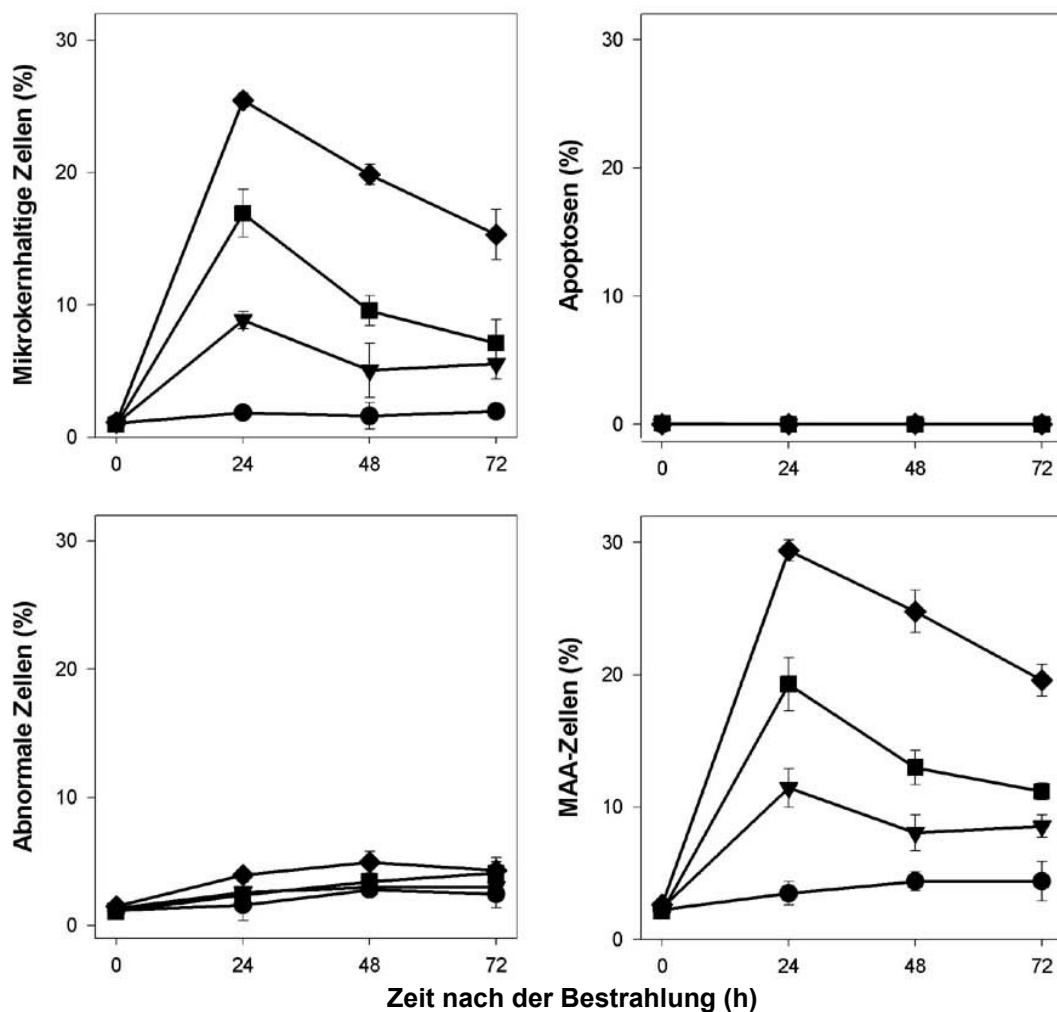


Abb. 12: Bestrahlung von L929 Δ 9-Zellen mit 0 (●), 1 (▼), 2 (■) und 4 Gy (◆) Röntgenstrahlung. Mikrokern- und Apoptoseinduktion, Induktion abnormaler Zellen und Bildung von MAA-Zellen insgesamt. Mittelwert +/- Streuung aus zwei Versuchen.

3.4.2 Bestrahlung von HSC-45M2-Zellen

Auch bei den HSC-Zellen war eine dosisabhängige Induktion von MAA-Zellen zu beobachten (Abb. 13). Es kamen vor allem mikrokernhaltige und abnormale, jedoch kaum apoptotische Zellen vor. Hohe Strahlendosen führten zu besonders auffälligen Zellschäden. So traten bei den Strahlendosen 2 und 4 Gy verstärkt riesige abnormale Zellen mit mehr als zwei sehr großen Zellkernen, mit unzählbar vielen kleinen Zellkernen oder mit einem Hauptkern und vielen Mikrokernen auf (vgl. Abb. 3 I).

24 Stunden nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 2 Gy waren 13 % bzw. 22 % MAA-Zellen nachweisbar. Die Dosis 4 Gy führte zu maximal 30 % atypischen Morphologien 48 h nach Bestrahlung. Die Daten für die einzelnen Parameter für jeden Datenpunkt sind im Anhang aufgeführt (S. 76).

MAA-Induktion bei HSC-Zellen durch Röntgenstrahlung

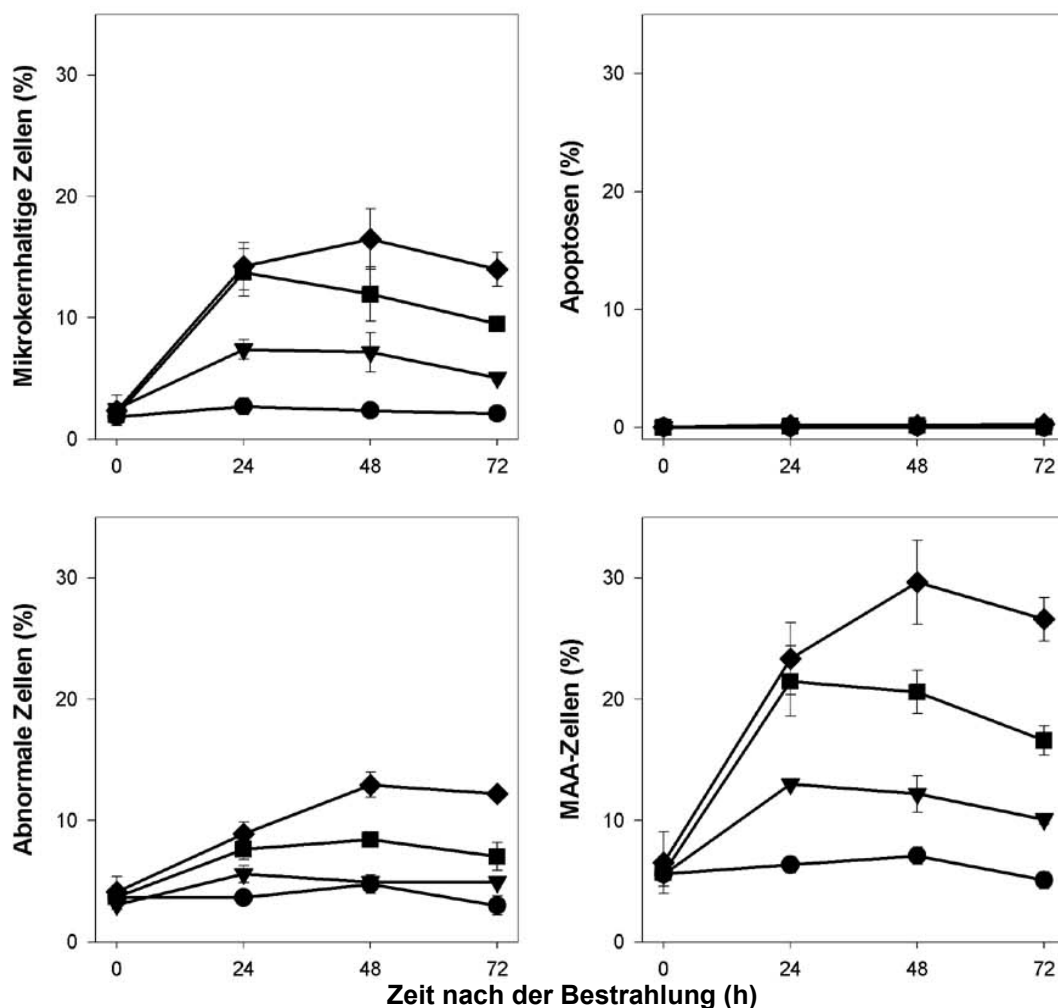


Abb. 13: Bestrahlung von HSC mit 0 (●), 1 (▼), 2 (■) und 4 Gy (◆) Röntgenstrahlung. Mikrokern- und Apoptoseinduktion, Induktion abnormaler Zellen und Bildung von MAA-Zellen insgesamt. Mittelwert +/- Streuung aus zwei Versuchen.

3.5 Klonogener Test

Das klonogene Überleben der Magenkarzinom-Zelllinie HSC-45M2 nach Inkubation mit 160 kBq/ml von ^{213}Bi -6H8 bzw. ^{213}Bi -7H1 wurde wie unter 2.6 beschrieben untersucht (Tab. 3).

^{213}Bi -Immunkonjugat	Inkub.-Zeit (min)	kalte Vorinkub.	Anzahl der gezählten Klone (Mittelwert)	Klonogenität in %	SD
Versuch 1:					
^{213}Bi -6H8	10	-	57,8	61	11
^{213}Bi -6H8	90	-	9,8	10	2
^{213}Bi -7H1	10	-	102,4	108	15
^{213}Bi -7H1	90	-	73,2	77	16
Kontrolle	-	-	95,2	100	27
Versuch 2:					
^{213}Bi -6H8	10	-	46,2	142	29
^{213}Bi -6H8	10	+	50,0	153	51
^{213}Bi -6H8	90	-	4,0	12	3
Kontrolle	-	-	32,6	100	16
Versuch 3:					
^{213}Bi -6H8	90	-	34,8	129	39
^{213}Bi -7H1	90	-	70,2	260	46
Kontrolle	-	-	27,0	100	39

Tab. 3: Klonogenität von HSC nach Inkubation mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -Immunkonjugaten.

Für jeden Versuch sind das verwendete ^{213}Bi -Immunkonjugat und die Dauer der Inkubationszeit (Inkub.-Zeit) angegeben. + und – zeigen eine Vorinkubation mit kaltem Antikörper an. Der Mittelwert entspricht der durchschnittlichen Anzahl von Klonen pro Versuch (n = 5). Die Klonogenität ist in % der Klonogenität der Kontrolle (100 %) ausgedrückt; hierfür ist die Standardabweichung (SD) angegeben.

Dabei ergaben sich Schwierigkeiten bezüglich der Auswertbarkeit, da HSC-Zellen ein unregelmäßiges Wachstumsverhalten aufweisen. Zum einen bildeten sie oft keine oder nur schlecht abgrenzbare Klone, zum anderen streute die bei den Kontrollen gezählte durchschnittliche Anzahl der gebildeten Klone zwischen den Versuchen stark. Darüber hinaus war das klonogene Überleben in den Kontrollgruppen in zwei von drei Versuchen (Versuch 2 und 3, Tab. 3) niedriger als in den mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten inkubierten Gruppen.

In Versuch 1 überlebten wie erwartet am wenigsten Zellen nach der langen Inkubationszeit (90 min) mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten; durchschnittlich betrug die Klonogenität 10 %. Nach 10minütiger Inkubation bildeten sich deutlich mehr Klone

(Klonogenität 61 %). Inkubation mit den unspezifischen ^{213}Bi -7H1-Konjugaten reduzierte das klonogene Überleben weniger stark als Inkubation mit 6H8-Konjugaten, so dass die Klonogenität nach 90 bzw. 10 min Inkubation mit ^{213}Bi -7H1 bei 77 % bzw. 108 % lag.

Versuch 2 und 3 zeigen tendenziell eine stärkere Zellschädigung durch die ^{213}Bi -6H8-Konjugate als durch 7H1-Konjugate sowie eine gering ausgeprägte Schutzwirkung der Vorinkubation mit kaltem 6H8-Antikörper. Aus oben genannten Gründen sind diese Daten jedoch nicht aussagekräftig.

Die Anwendung der Softagar-Technik nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen ermöglichte ebenfalls keine zuverlässige Bestimmung des klonogenen Überlebens. Bei mehrmaliger Versuchsdurchführung bildeten die Zellen entweder Klone oder aber einen lockeren Verband aus Einzelzellen. Da auch diese Untersuchungen das bei den klonogenen Tests mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten festgestellte nicht vorhersagbare Wachstumsverhalten der HSC-Zellen bestätigen und daher keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden keine weiteren klonogenen Tests unternommen.

4 Diskussion

4.1 Selektivität der Zellschädigung durch ^{213}Bi -Immunkonjugate

Durch Inkubation von Zellen mit tumorspezifischen ^{213}Bi -6H8-Radioimmunkonjugaten erhofft man sich eine selektive Zellschädigung der $\Delta 9$ -E-Cad-exprimierenden Zellen. Insgesamt entsprechen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse weitgehend dieser Erwartung. So führte die Inkubation der L929-Mäusefibroblasten mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -6H8 zu einer deutlichen Schädigung (13 % MAA-Zellen) der antigenexprimierenden L929 $\Delta 9$ -Zellen, während die atypischen Zellkernmorphologien bei den nicht-antigenexprimierenden L929 wt-Zellen nicht signifikant zunahmten.

Auch bei den menschlichen Magenkarzinomzellen (HSC-45M2) konnte eine selektive Wirkung der ^{213}Bi -6H8-Konjugate gezeigt werden. Die HSC-Zellen wurden durch unspezifische ^{213}Bi -7H1-Immunkonjugate signifikant weniger geschädigt als durch spezifische ^{213}Bi -6H8-Konjugate, wenn mit der niedrigen Aktivitätskonzentration (160 kBq/ml) inkubiert wurde. Ein weiterer Hinweis auf die selektive Zellschädigung durch ^{213}Bi -6H8-Konjugate ergab sich in den Versuchen mit Vorinkubation mit dem unmarkierten 6H8-Antikörper. Die Zugabe des kalten Antikörpers bedingt eine kompetitive Hemmung der Bindung der Radioimmunkonjugate. Außerdem kann sie als Verminderung der spezifischen Aktivität aufgefasst werden. Im Gegensatz zu den Versuchen ohne Vorinkubation, bei denen einer von etwa 1000 Antikörpern mit ^{213}Bi markiert ist, trägt bei den Versuchen mit Vorinkubation nur noch einer von etwa 4900 Antikörpern (bei Inkubation mit 160 kBq/ml) ein radioaktives ^{213}Bi -Atom. Dies bewirkt bei der Aktivitätskonzentration von 160 kBq/ml eine Verringerung der gebundenen, mit ^{213}Bi beladenen Antikörper von etwa 45 auf etwa 30 pro Zelle (errechnet mit $K_a = 1,82 \times 10^8$ l/mol und 3×10^5 $\Delta 9$ -E-Cad-Molekülen pro Zelle). Dass diese Verminderung der gebundenen ^{213}Bi -Immunkonjugate mit einer verminderten Zellschädigung einhergeht, wird durch ein signifikant geringeres Auftreten von MAA-Zellen nach 10minütiger Inkubation mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -6H8 bei den vorinkubierten Zellen im Vergleich zu nicht vorinkubierten Zellen belegt.

In den Wettbewerbsversuchen wurde durch Vorinkubation mit den unmarkierten Antikörpern eine Verminderung der Anzahl der an die Zelloberfläche gebundenen ^{213}Bi -6H8-Konjugate von 14 % auf 2,7 % gezeigt, während die schwache Bindung

der unspezifischen 7H1-Konjugate (2,9 %) nicht beeinflusst wurde. Wahrscheinlich beruht die Bindung von 7H1-Konjugaten wie auch die residuale Bindung von ^{213}Bi -6H8-Konjugaten nach kalter Vorinkubation (beide etwa 3 %) auf unspezifischen Interaktionen zwischen den Antikörpern und Oberflächenproteinen der Magenkarzinom-Zellen. Der experimentell ermittelte Wert für die Bindung von ^{213}Bi -6H8-Konjugaten (14 %) stimmt gut mit dem errechneten Wert von 13 % (10 % + 3 % unspezifische Bindung = 13 %) überein.

Aufgrund der beschriebenen Befunde ergibt sich, dass ^{213}Bi -6H8-Konjugate selektiv Zellen schädigen, die $\Delta 9$ -E-Cad exprimieren. Die Selektivität wurde jedoch nur bei der niedrigen Aktivitätskonzentration (160 kBq/ml) beobachtet (vgl. Kapitel 4.2). Des Weiteren ergibt sich, dass die Bindung der ^{213}Bi -Immunkonjugate an die Zelloberfläche entscheidend ist für das Ausmaß der Zellschädigung, da eine Verminderung der ^{213}Bi -Atome pro Zelle auch die Bildung von MAA-Zellen reduziert. Dieses Ergebnis ist viel versprechend im Hinblick auf die Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -gekoppelten tumorspezifischen Antikörpern *in vivo*, bei der eine selektive Schädigung der Tumorzellen bei gleichzeitig weitgehender Schonung des Normalgewebes angestrebt wird.

4.2 Beeinflussung der selektiven Wirkung von ^{213}Bi -Immunkonjugaten durch Aktivitätskonzentration und Inkubationszeit

Mit steigenden Aktivitätskonzentrationen konnte wie erwartet eine zunehmende Schädigung der Magenkarzinomzellen beobachtet werden, wobei die Kompetitierbarkeit der zellschädigenden Wirkung von ^{213}Bi -6H8-Konjugaten durch Vorinkubation mit unmarkierten Antikörpern sowie die Selektivität im Vergleich zur Wirkung unspezifischer 7H1-Konjugate abnahm. Bei Einsatz der Aktivitätskonzentration 640 kBq/ml war (im Gegensatz zur Inkubation mit 160 kBq/ml) keine Reduktion der Zellschädigung durch Vorinkubation mit dem kalten Antikörper nachweisbar. Drei mögliche Gründe dafür sind: Erstens kommt es bei einer vierfach höheren Konzentration des ^{213}Bi -6H8-Konjugats zu einer schnelleren Verdrängung des unmarkierten Antikörpers. Zweitens ist die Verminderung der spezifischen Aktivität durch die Vorinkubation unterschiedlich stark für die verschiedenen Aktivitätskonzentrationen (bei 160 kBq/ml trägt nach der Vorinkubation einer von

etwa 4900, bei 640 kBq/ml aber einer von etwa 2000 6H8-Antikörpern ein radioaktives ^{213}Bi -Atom) und nähert sich mit steigender Aktivitätskonzentration dem Wert für die Versuche ohne Vorinkubation an (einer von 1000 Antikörpern ist radioaktiv markiert). Drittens ist bei der hohen Aktivitätskonzentration die unspezifische Bestrahlung durch ungebundene Radioimmunkonjugate weitaus größer. Mehr als 99 % der Radioimmunkonjugate in den MAA-Tests binden nicht an die Zelloberfläche, so dass bei einer Vervierfachung der Aktivitätskonzentration die Konzentration der freien Konjugate annähernd auf das Vierfache ansteigt. Im Gegensatz dazu nimmt die Zahl der an die Zelloberfläche gebundenen Radioimmunkonjugate bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zell- und Antikörperkonzentrationen nur um den Faktor 2,8 zu. Dies führt in den Versuchen ohne Vorinkubation mit unmarkiertem Antikörper zu einer Steigerung von ca. 45 (160 kBq/ml) auf etwa 120 (640 kBq/ml) gebundene ^{213}Bi -Atome pro Zelle und in den Versuchen mit Vorinkubation zu einer Zunahme von etwa 30 auf 85 gebundene ^{213}Bi -Atome pro Zelle. Der große Überschuss an freien ^{213}Bi -6H8-Konjugaten ist gleichmäßig im Kulturmedium verteilt und schädigt die Zellen durch Zerfälle, die sich zufällig in der unmittelbaren Umgebung der Zellen ereignen („crossfire effect“). Daraus ergibt sich, dass mit der Höhe der Aktivitätskonzentration vor allem das Verhältnis der ungebundenen Radioimmunkonjugate zur Anzahl der Tumorzellen ansteigt. In den MAA-Versuchen waren pro HSC-Zelle $1,3 \times 10^4$ (160 kBq/ml) bzw. $5,2 \times 10^4$ (640 kBq/ml) mit ^{213}Bi markierte Antikörper ungebunden. Der Beitrag der unspezifischen Strahlung zur Zellschädigung nimmt also mit zunehmender Aktivitätskonzentration zu und überwiegt schließlich die Wirkung durch spezifische, an die Zellen gebundene Konjugate. Der gleiche Effekt zeigte sich auch in den Versuchen mit dem unspezifischen 7H1-Antikörper: Bei der hohen Aktivitätskonzentration (640 kBq/ml) führten ^{213}Bi -7H1-Konjugate eine gleich starke Schädigung der HSC-Zellen wie die spezifischen ^{213}Bi -6H8-Konjugate herbei, wahrscheinlich durch die Strahlung der freien Radioimmunkonjugate.

Ein Abnehmen der selektiven Zytotoxizität bei steigender Aktivitätskonzentration wird auch von Ballangrud et al. (2001) beschrieben: Bei Behandlung von Sphäroiden einer Prostatakarzinom-Zelllinie mit spezifischen und unspezifischen ^{213}Bi -Immunkonjugaten konnte nur bei der Aktivitätskonzentration 900 kBq/ml eine

spezifische Strahlentoxizität nachgewiesen werden, während bei Verdopplung der Aktivitätskonzentration die Zellschädigung für beide Antikörper gleich war.

Bei einem Vergleich der Abtötung antigenexprimierender und nicht-antigenexprimierender Leukämie-Zellen durch ^{213}Bi -Radioimmunkonjugate war schon ab einer Aktivitätskonzentration von etwa 370 kBq/ml die Schädigung bei beiden Zelltypen gleich stark (Nikula et al., 1999). Nach Nikula et al. (1999) kann auch eine sehr niedrige spezifische Aktivität (7,4 kBq/mg) zu einer Reduktion der selektiven Zellschädigung führen. Dies spielt aber vermutlich für die vorliegende Arbeit keine Rolle, da die spezifische Aktivität in allen Experimenten im Bereich von 1000 kBq/ μg lag.

Die Dauer der Inkubation mit Radioimmunkonjugaten beeinflusste ebenfalls die Effektivität und Selektivität der Behandlung von Magenkarzinomzellen mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 10 auf 90 Minuten führte zu einem Anstieg der auffälligen Zellkernmorphologien (beispielsweise Zunahme von 12 % auf 19 % bei Inkubation mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -6H8 für 10 bzw. 90 min). Dies lässt sich durch den oben diskutierten Einfluss der unspezifischen Strahlung durch nicht an die Zelloberfläche gebundene Radioimmunkonjugate erklären. Dieser nimmt mit der Dauer der Inkubation zu, so dass es zu einer stärkeren Zellschädigung kommt. Darüber hinaus besteht ein Gleichgewicht zwischen den Radioimmunkonjugaten an der Zelloberfläche und in der Zellumgebung. Daher kann ein an die Zelle gebundenes Radioimmunkonjugat, dessen ^{213}Bi -Atom zerfallen ist, durch ein möglicherweise noch radioaktives ^{213}Bi -Immunkonjugat aus dem Inkubationsmedium ersetzt werden, so dass die Zelle bei längerer Inkubationszeit mehr radioaktiven Zerfällen direkt an der Zelloberfläche ausgesetzt ist.

Vorinkubation mit dem kalten Antikörper führte nur in den Versuchen mit kurzer Inkubationszeit (10 min) zu einer Verringerung der Anzahl geschädigter Zellen gegenüber der nicht vorinkubierten Gruppe. Möglicherweise liegt dies an der Konkurrenz der heißen und kalten Antikörper um die Antigen-Bindungsstellen auf den Tumorzellen. Durch die Vorinkubation findet bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden Antikörper- und Zellkonzentrationen zunächst eine Besetzung von etwa 40 % der $\Delta 9\text{-E-Cad}$ -Moleküle auf der Zelloberfläche statt. Dadurch stehen für die ^{213}Bi -6H8-Konjugate weniger Bindungsstellen zur Verfügung, so dass sich theoretisch eine Reduktion von 45 mit ^{213}Bi -beladenen Antikörpern pro Zelle auf 15 errechnen ließe.

Allerdings findet durch die Konkurrenz der ^{213}Bi -6H8-Konjugate mit den kalten Antikörpern um die $\Delta 9$ -E-Cad-Moleküle ein rascher Austausch der gebundenen Antikörper statt, so dass die Anzahl der tatsächlich gebundenen ^{213}Bi -Atome nach kalter Vorinkubation wahrscheinlich eher im Bereich von 30 pro Zelle liegt, wie oben beschrieben. Trotzdem scheint die Durchmischung der kalten und heißen Immunkonjugate und das damit verbundene Absinken der spezifischen Aktivität abhängig von der Inkubationszeit zu sein, da nur bei der kurzen Inkubationsdauer von 10 min, nicht aber 30 min, eine Schutzwirkung des kalten Antikörpers feststellbar war. Dagegen konnten nach Inkubation mit ^{213}Bi -7H1 in der Aktivitätskonzentration 160 kBq/ml auch bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten signifikant weniger Zellschäden als nach Inkubation mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten beobachtet werden. Dies zeigt, dass bei der Aktivitätskonzentration 160 kBq/ml die spezifische Bindung der Radioimmunkonjugate direkt an die Zelle einen wichtigen Beitrag zur Zellschädigung leistet. Das Ausmaß der Bindung an die Zelloberfläche scheint bei Inkubation mit den schwach bindenden unspezifischen 7H1-Konjugaten kaum von der Inkubationszeit abhängig zu sein (maximal etwa 10 % bzw. 12 % MAA-Zellen nach Inkubation für 10 bzw. 90 min). Bei höheren Aktivitätskonzentrationen (640 kBq/ml) kommt es dann unabhängig von der Inkubationsdauer zum Überwiegen der Wirkung von crossfire Strahlung, so dass kein Unterschied in der Zytotoxizität der spezifischen und unspezifischen Radioimmunkonjugate beobachtet wurde.

4.3 Vergleich der Zellschädigung durch ^{213}Bi -Immunkonjugate mit der Schädigung durch Röntgenbestrahlung

Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen führte zu einer dosisabhängig zunehmenden Zellschädigung. Die Strahlensensibilität war bei den L929-Zellen und den HSC-Zellen etwa gleich, d. h. bei gleicher Strahlendosis entstanden ungefähr gleich viele MAA-Zellen. Dabei ergab Bestrahlung der L929 $\Delta 9$ -Zellen mit 1 Gy ein ähnliches Bild wie die Inkubation mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -6H8 für 30 Minuten. Auch die Verteilung der Zellschäden auf die verschiedenen Parameter war gleichartig mit hauptsächlich mikrokernhaltigen Zellen, wenigen abnormalen Zellen und kaum apoptotischen Zellen. Bestrahlung der HSC-Zellen mit 1 Gy schädigte die Zellen in gleichem Maß wie 10minütige Inkubation mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -6H8-Konjugaten. Die Zahl der MAA-Zellen war nach Bestrahlung mit 2 Gy etwa gleich hoch wie nach 10minütiger Inkubation der HSC-Zellen mit 640 kBq/ml ^{213}Bi -6H8-Konjugaten oder

auch nach 90minütiger Inkubation mit 160 kBq/ml. Die Strahlendosis 4 Gy induzierte ungefähr ebenso viele MAA-Zellen wie 90 min Inkubation mit 640 kBq/ml $^{213}\text{Bi-6H8}$. Die Zunahme der MAA-Zellen nach Röntgenbestrahlung mit steigenden Dosen war durch einen etwa gleich starken Anstieg der Anzahl von mikrokernhaltigen und abnormalen Zellen bedingt, wie dies auch nach der Inkubation mit $^{213}\text{Bi-6H8}$ -Konjugaten steigender Aktivitätskonzentrationen der Fall war.

Auffallend bei diesen Ergebnissen ist, dass eine Verdopplung der Strahlendosis von 2 auf 4 Gy die MAA-Häufigkeit im gleichen Maß ansteigen ließ wie eine Vervierfachung der $^{213}\text{Bi-6H8}$ -Aktivitätskonzentration von 160 auf 640 kBq/ml bei einer Inkubationszeit von 90 min. Dies ist mit den bisherigen Forschungsergebnissen nicht erklärbar, so dass weitere vergleichende Untersuchungen der beiden Strahlenqualitäten nötig sind. Möglicherweise ist dieses unerwartete Ergebnis auf die Streubreite des MAA-Assays zurückzuführen.

Für die Zelllinie L929 liegen Vergleichsdaten in der Literatur vor (Abend et al., 2000). Es wurden allerdings Fibroblasten ohne Transfektion untersucht, die weder wt-E-Cad noch $\Delta 9$ -E-Cad exprimieren. Dabei führte Röntgenbestrahlung mit den gleichen Dosen zu mehr Zellschäden als in der vorliegenden Arbeit: 24 h nach Bestrahlung mit 2 bzw. 4 Gy wurden über 30 % bzw. 40 % MAA-Zellen gezählt, während in der vorliegenden Arbeit bei den L929 $\Delta 9$ -Zellen MAA-Morphologien nur in 19 % bzw. 29 % auftraten. Ein möglicher Grund für diese Unterschiede könnte die Transfektion sein, die vielleicht auch die Strahlensensitivität beeinflusst. Des Weiteren ist die morphologische Auswertung subjektiv, so dass ein Teil der Differenz auch durch geringfügig unterschiedliche Kriterien zur Auswertung von MAA-Zellen erklärt werden kann. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse von Versuchen mit Zellkulturen relativ stark streuen können, da sie auch vom Alter (Passage), der Vitalität und den Kulturbedingungen der Zellkulturen beeinflusst werden, so dass z. B. der höhere Zusatz an FBS in der zitierten Arbeit einen direkten Vergleich erschwert. Beide Arbeiten stimmen aber dahingehend überein, dass sich die Zellschädigungen fast ausschließlich durch einen Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen zeigen.

4.4 Vergleich verschiedener Strahlenqualitäten und Mikrodosimetrie

4.4.1 Mikrokernbildung durch α -Strahlung

Da der MAA-Assay erst vor wenigen Jahren von Abend et al. (2000) eingeführt wurde, gibt es bisher kaum Arbeiten, die diese Methode verwenden. Allerdings befassen sich zahlreiche Veröffentlichungen mit strahleninduzierter Mikrokernbildung und Induktion von Apoptose. Für α -Strahlung liegen Studien zu Quantifizierung der Zellschädigung vor, in denen die Mikrokernbildung als Maß der genomischen Instabilität dient (Kennedy et al., 1996), (Talbot et al., 1989). Eine umfassende Untersuchung der unterschiedlichen Effekte von α -Strahlung und Röntgenstrahlung an menschlichen Fibroblasten ergab einige interessante Unterschiede (Belyakov et al., 1999): Während bei Röntgenbestrahlung das Maximum der Mikrokernbildung dosisabhängig war und konstant etwa drei Tage nach Bestrahlung auftrat, waren nach Bestrahlung mit α -Partikeln sowohl die Höhe als auch der Zeitpunkt des Maximums dosisabhängig. Je höher die Dosis, umso später wurde die höchste Mikrokernhäufigkeit ermittelt, z. B. 35 % Mikrokernkerne acht Tage nach Bestrahlung mit 3 Gy α -Partikeln aus einer ^{238}Pu -Quelle. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Induktion apoptotischer Zellen, die darüber hinaus nach Bestrahlung mit α -Teilchen viel stärker ausgeprägt war als nach Röntgenbestrahlung.

Dies konnte durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden, wobei allerdings ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Eine Plutonium-Quelle liefert α -Strahlung einer bestimmten Energiedosis (in der zitierten Arbeit 3 Gy), während in der vorliegenden Arbeit Radioimmunkonjugate in verschiedenen Aktivitätskonzentrationen eingesetzt wurden (vgl. Kapitel 4.4.3). Eine Erhöhung der Aktivitätskonzentration bedingte nicht regelmäßig eine Verschiebung des Maximums der MAA-Zellen auf einen späteren Zeitpunkt nach der Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten. Dagegen führte eine Verlängerung der Inkubationszeit von 10 auf 90 Minuten zu einer solchen Verschiebung des maximalen Auftretens von MAA-Zellen von 24 auf 48 Stunden nach der Inkubation. Ein weiterer Unterschied zu den Ergebnissen Belyakovs ist, dass in den eigenen Daten auch nach Röntgenbestrahlung der HSC-Zellen mit 4 Gy eine Verschiebung des Maximums von MAA-Zellen von 24 h (bei 1 und 2 Gy) auf 48 h nachgewiesen werden konnte. Die Vergleichsmöglichkeit der beiden Studien ist

jedoch eingeschränkt durch die unterschiedlich langen Zeiträume nach der Bestrahlung, in denen die Datenerhebungen durchgeführt wurden (72 h in der vorliegenden Arbeit, 30 Tage bei Belyakov et al.).

Wie die Arbeit Belyakovs, so zielen auch die meisten anderen Studien, die den Effekt von α -Strahlung mit Hilfe der Mikrokernbildung quantifizieren, auf einen Vergleich der Wirkung verschiedener Strahlenqualitäten und damit auf genauere Bestimmung der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW) ab (Green et al., 2001), (Mill et al., 1996) (Ono et al., 1990). Diese soll daher im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

4.4.2 Relative Biologische Wirksamkeit

Das strahlenbiologische Interesse gilt der Fragestellung, welcher Schaden an einem Organ oder einer Zelle durch eine bestimmte Energiedosis verursacht wird. Dabei gibt es Unterschiede im Wirkprofil bei verschiedenen Strahlenqualitäten, so dass der Begriff der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW) eingeführt wurde. Die RBW gibt das Verhältnis zweier Energiedosen wider, die bei einem bestimmten Nachweisverfahren den gleichen Effekt haben. Sie ist definiert als das Verhältnis der Referenzstrahlendosis (Röntgenstrahlung) zu der Dosis der getesteten Strahlung, die nötig ist, um den gleichen Effekt hervorzurufen wie die Referenzstrahlung. Für jede Strahlenqualität gibt es einen RBW-Wichtungsfaktor, der mit der Energiedosis multipliziert die Äquivalenzdosis ergibt. Diese soll die tatsächliche Strahlenwirkung und den tatsächlichen Strahlenschaden angeben. Für elektromagnetische Strahlung und Röntgenstrahlung wurde der RBW-Faktor als 1 definiert, α -Strahlern wurde aufgrund hoher Zytotoxizität der Faktor 10-20 zugeteilt (Hall, 2000). Mittlerweile wird die Richtigkeit dieser Festlegung immer stärker bezweifelt, da die RBW von vielen verschiedenen Faktoren abzuhängen scheint (Behr et al., 1999). Nach Belyakov et al. (1999) steigt die RBW von α -Strahlung mit dem Zeitraum, der zwischen Bestrahlung der Zellen und Evaluierung liegt, von 4,4 auf 11,3 an. Dies wurde auf die Induktion von genomischer Instabilität zurückgeführt, die bei α -Strahlung anders als bei Strahlung mit niedrigem LET noch lange nach Bestrahlung Schäden wie Mikrokerne und Apoptosen verursachen kann und zu einem reduzierten klonogenen Überleben führt (Lorimore et al., 1998), (Watson et al., 1996), (Kadhim et al., 1995). Watson et al. (2001) dagegen berichtet über langfristige genomische Instabilität sowohl nach Bestrahlung mit hohem LET (α -Strahlung) als auch nach Bestrahlung mit niedrigem LET (Röntgen-Strahlung). Untersuchungen von Mill et al. (1996) und

Ono et al. (1990) zur Mikrokernbildung nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, α -Strahlung, β -Strahlung und Neutronenstrahlung zeigen, dass die RBW in Abhängigkeit von der Energiedosis sinkt. Der höchste ermittelte RBW-Wert für α -Strahlung betrug 6,9 (Mill et al., 1996). Darüber hinaus schwankt der RBW-Faktor auch je nach dem Parameter, der als Maß für die biologischen Effekte verwendet wurde, und ist daher unterschiedlich, wenn er z. B. anhand der Apoptoseinduktion oder der Mikrokernbildung errechnet wird (Belyakov et al., 1999), (Green et al., 2001). Möglicherweise bietet der dreiparametrische MAA-Assay eine für die Beurteilung der RBW verlässlichere Untersuchungsmethode, da durch die Berücksichtigung dreier Zelltodparameter die Zytotoxizität möglichst vollständig erfasst werden soll. In tierexperimentellen Studien zur Untersuchung der RBW werden ganz andere Indikatoren der biologischen Wirksamkeit benützt, z. B. die Knochenmarksuppression. Dabei ergeben sich ebenso wie bei den *in vitro* Experimenten Hinweise, dass die früher angenommenen RBW-Faktoren so nicht korrekt sind und dass vielleicht keine absolut gültigen Faktoren angegeben werden können, da die RBW vielen verschiedenen Einflüssen unterworfen ist (Behr et al., 1999).

4.4.3 Mikrodosimetrie

Vergleichende Untersuchungen zur RBW sind nur möglich, wenn die absorbierte Energie (Einheit Gray, $1\text{Gy} = 1\text{Joule/kg}$) bei den verschiedenen Strahlenqualitäten bekannt ist, da die RBW als das Verhältnis zweier Energiedosen, die die gleiche biologische Wirkung zeitigen, definiert ist (vgl. 4.4.2). Für Röntgenstrahlung ist dies meist gut durchführbar, da mit Bestrahlungsgeräten gearbeitet wird, die eine definierte Dosisleistung liefern. Auch Kontrollen mit Hilfe eines Dosimeters im Bestrahlungsfeld sind in der Regel durchführbar. Für Versuche mit Radioimmunkonjugaten ergeben sich jedoch völlig andere Voraussetzungen, die den Vergleich mit anderen Strahlenqualitäten und damit Berechnungen der RBW erschweren oder überhaupt nicht zulassen. So beruht die Applikation von Radioimmunkonjugaten einer bestimmten Aktivitätskonzentration bei der RIT mit α -Strahlern auf der Messung der Aktivität (in Becquerel, $1\text{Bq} = 1\text{ Zerfall/Sekunde}$). Die Aktivität kann nicht direkt in die Energiedosis (Gy) umgerechnet werden. Verschiedene Ansätze versuchen jedoch eine Annäherung, um auch für α -Emitter eine Dosimetrie angeben zu können.

Dabei müssen grundsätzliche Unterschiede zwischen α -Strahlung in der Radioimmuntherapie und Röntgenstrahlung berücksichtigt werden, die mit der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Energie bzw. der Aktivität zu tun haben (Roeske und Stinchcomb, 1997):

Röntgenstrahlung ist im gesamten Bestrahlungsgebiet (zum Beispiel in einer Zellkulturflasche) relativ homogen verteilt, während die α -Teilchen aufgrund ihrer geringen Reichweite und zusätzlich durch die spezifische Bindung der Radioimmunkonjugate an die Zielzellen extrem lokal wirksam werden. Daraus resultiert eine hohe Dosis an Tumorzellen, während am Normalgewebe eine niedrige Dosis wirksam ist. In den oben zitierten Arbeiten von Belyakov (1999), Kennedy (1996) und Mill (1996) wurden α -emittierende äußere Strahlenquellen verwendet, so dass anders als bei Inkubation mit Radioimmunkonjugaten eine bekannte Dosis in gleichmäßiger Bestrahlungsdichte appliziert werden konnte.

Außerdem ist Röntgenstrahlung ein- und ausschaltbar und daher exakt dosierbar, d. h. innerhalb der Bestrahlungszeit wird eine bekannte Strahlendosis appliziert. Im Gegensatz dazu müssen bei Bestrahlung durch α -Partikel viele Faktoren einbezogen werden. Von Bedeutung sind die Zahl der Radionuklide, die an den einzelnen Antikörper gebunden sind, und die Kenntnis der Bindungskinetik des Radioimmunkonjugats, so dass eine Abschätzung der auf eine Zelle einwirkenden α -Nuklide ermöglicht wird. Zusätzlich muss die Wahrscheinlichkeit, dass ein α -Teilchen den Zellkern trifft und so zum Zelltod führt, abgeschätzt werden, wobei vor allem die Zellgeometrie berücksichtigt werden muss. Dazu kommt noch das Phänomen eventuell auftretender „crossfire“ Bestrahlung durch α -Strahler, die an benachbarte Zellen gebunden haben, und durch freie Radioimmunkonjugate (Larsen et al., 1998). Auch der so genannte „Bystander Effekt“ könnte für die langfristige Zellschädigung eine Rolle spielen. Darunter versteht man die Schädigung von Zellen, die nicht selbst von α -Teilchen getroffen wurden, sich aber in der Nachbarschaft von betroffenen Zellen befinden. Es gibt Hinweise, dass auch diese nicht bestrahlten Zellen Spätschäden durch genomische Instabilität zeigen, vielleicht durch Interaktionen mit direkt geschädigten Zellen induziert (Lorimore et al., 1998).

Die folgende Methode wird häufig zur Abschätzung der Energiedosis bei der RIT mit α -Emittern eingesetzt (Imam, 2001), (McDevitt et al., 1998), (Roeske und Stinchcomb, 1997), (Goddu et al., 1994): Zuerst werden das Volumen und die Masse der Zielzellen und des Zellkerns sowie die Lage des Zellkerns innerhalb der Zelle

abgeschätzt oder gemessen, beispielsweise durch fotografische Analysen. Dann wird eine Bindungskinetik des Radioimmunkonjugats erstellt, aus der auf die Zahl der radioaktiven Atome geschlossen werden kann, die abhängig von der Inkubationszeit an einer einzelnen Zelle wirksam werden können. Meist wird danach mit Hilfe von Computerprogrammen – zum Beispiel nach der Monte-Carlo-Methode – die Wahrscheinlichkeit für α -Partikel, den Zellkern zu treffen, berechnet (Kennel et al., 1999). Zusätzlich wird oft die Wahrscheinlichkeit für „crossfire irradiation“ sowohl durch Nachbarzellen als auch durch ungebundene Radioimmunkonjugate aus dem Medium berücksichtigt (Larsen et al., 1998).

Zusammenfassend gilt, dass die α -Dosimetrie immer stochastische Überlegungen mit einbeziehen muss, da die Geometrie der Zellen bzw. des Zellverbandes, die Bindungskinetik des Radioimmunkonjugats und damit die Verteilung der Radionuklide auf die Zellen sowie die Bestrahlung durch Nachbarzellen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für einen Treffer des Zellkerns haben. Von Bedeutung ist auch, wie viele Zellen gar nicht geschädigt werden, weil kein α -Teilchen auf den Zellkern trifft, und wie stark die Dosis pro Zelle streut (Roeske und Stinchcomb, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellschäden durch α -Strahlung und Röntgenstrahlung verglichen. Es wurde bei bestimmten Röntgenstrahlendosen bzw. Aktivitätskonzentrationen ein ähnlicher Grad der Zellschädigung erreicht. Dennoch konnte kein direkter Vergleich hinsichtlich der Toxizität der beiden Strahlenarten durchgeführt werden, da die auf den Zellkern wirkende Energiedosis für die Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten nicht bekannt ist.

5 Ausblick

Radioimmuntherapie mit tumorspezifischen Antikörpern und hochenergetischen α -Emittern kann bei geeigneten Aktivitätskonzentrationen Tumorzellen selektiv schädigen, wie in der vorliegenden Arbeit durch *in vitro* Versuche gezeigt wurde. In den letzten Jahren wurde wegen der besseren Verfügbarkeit von geeigneten α -Strahlern wie ^{213}Bi aus dem $^{225}\text{Ac} / ^{213}\text{Bi}$ -Generator und von monoklonalen Antikörpern durch die Produktion in Hybridom-Zellen eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien zur α -RIT durchgeführt. Ein Beispiel aus jüngster Zeit ist eine Untersuchung mit dem α -Strahler ^{149}Tb bei Leukämie in SCID-Mäusen, wodurch eine signifikante Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte (Beyer et al., 2004). Doch trotz dieser und zahlreicher anderer präklinischer Untersuchungen mit viel versprechenden Ergebnissen gibt es nach wie vor nur zwei Veröffentlichungen zur α -RIT beim Menschen, die bereits zitierten Studien an Leukämie-Patienten von Jurcic et al. (2002) sowie an Glioblastom-Patienten von Zalutsky und Vaidyanathan (2000) (vgl. 1.1.4). Ein Grund für diese Diskrepanz ist, dass es immer noch schwierig ist, eine für die klinische Anwendung ausreichende Menge des Radionuklids zu erhalten (Vandenbulcke et al., 2003). Um dieses Hindernis zu überwinden, werden die Verwendung neuer Nuklide oder Entwicklung neuer Produktionsarten diskutiert, so zum Beispiel die Herstellung von ^{149}Tb in größerem Umfang durch Ionen-induzierte Reaktionen an leichten Lanthanoiden (Beyer et al., 2004). Auch an der Produktion von ^{225}Ac mittels Zyklotron über die Reaktion $^{226}\text{Ra}(p, 2n)^{225}\text{Ac}$ wird an der TUM in Garching intensiv geforscht, wobei bereits Erfolge zu verzeichnen sind. Ein weiteres Problem ist die oft sehr kurze Halbwertszeit (46 min für ^{213}Bi), die es praktisch nicht zulässt, dass ein im Labor hergestelltes Radioimmunkonjugat noch eine ausreichend hohe Aktivitätskonzentration besitzt, wenn es einem Patienten appliziert wird (Borchardt et al., 2003). Deshalb müssen schnelle automatisierte Kopplungsverfahren entwickelt werden. Eine alternative Strategie ist der Einsatz von so genannten *in vivo* Generatoren: In präklinischen Experimenten wurden Radioimmunkonjugate mit ^{225}Ac gekoppelt, dem Vorläufer von ^{213}Bi und zwei weiteren α -Emittern, so dass es nach der Applikation *in vivo* durch Zerfall mit einer Halbwertszeit von 10 Tagen zu einer lang anhaltenden Zellschädigung kommt (McDevitt et al., 2001), (Borchardt et al., 2003).

Mittlerweile werden auch Einsatzgebiete für die α -RIT außerhalb der Tumorbekämpfung erforscht. Bei Primaten wurde eine Reduktion der Transplantatabstoßung durch mit ^{212}Bi beziehungsweise ^{211}At beladene Antikörper gegen den Interleukinrezeptor $\text{IL-2R}\alpha$ nachgewiesen (Wesley et al., 2004). Dieser Rezeptor kommt überwiegend auf T-Zellen vor, die bei der Transplantatabstoßung sowie bei manchen Leukämien und Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen. Eine weitere Einsatzmöglichkeit für die RIT mit α -Strahlern mit kurzer Reichweite sind möglicherweise Infektionskrankheiten mit multiresistenten Pathogenen. Bei Mäusen wurde bereits eine erfolgreiche Therapie nach Infektion mit den Pilzen *Cryptokokkus neoformans* oder *Histoplasma capsulatum* beschrieben (Dadachova et al. 2004). Diese Pilze zählen zu den Problemkeimen bei immunsupprimierten Patienten.

Zahlreiche experimentelle Arbeiten belegen mittlerweile das Potenzial der Radioimmuntherapie mit α -Emittern sowohl für die Tumorthherapie als auch für viele weitere Einsatzbereiche, obwohl noch einige technische Schwierigkeiten gelöst werden müssen. In dieser Arbeit wurde die selektive Abtötung von Einzelzellen durch einen ^{213}Bi -gekoppelten tumorspezifischen Antikörper, der an ein nur beim diffusen Magenkarzinom vorkommendes Antigen bindet, nachgewiesen. Dies stimmt mit Ergebnissen von tierexperimentellen Studien unserer Forschergruppe überein, in denen die selektive Bindung der ^{213}Bi -6H8-Konjugate an intraperitoneale Tumoren sowie eine gute therapeutische Wirksamkeit bei geringer systemischer Toxizität gezeigt wurde (Huber et al., 2003), (Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001). Weitere, vor allem klinische Studien sind nötig, um die Behandlung mit α -Radioimmunkonjugaten als neue Therapieform zur Behandlung des disseminierten diffusen Magenkarzinoms und anderer Krebsarten zu etablieren.

6 Zusammenfassung

Bewertung der Radiotoxizität eines mit dem α -Strahler ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörpers anhand von Veränderungen der Zellkernmorphologie

Bei der Radioimmuntherapie sollen Tumorzellen durch die antikörpervermittelte Bindung geeigneter Radionuklide selektiv abgetötet werden. In dieser Arbeit wurde der α -Strahler ^{213}Bi gekoppelt an einen Antikörper verwendet, der an ein mutiertes Adhäsionsmolekül bindet. Dieses veränderte E-Cadherin ($\Delta 9$ -E-Cad) kommt auf Zellen des diffusen Magenkarzinoms vor, nicht aber auf Normalgewebe. Die therapeutische Wirksamkeit der tumorspezifischen Antikörper-Bindung an antigenexprimierende Tumorzellen wurde anhand von strahleninduzierten Veränderungen der Zellkernmorphologie untersucht. Darüber hinaus wurde die Wirkung der α -Radioimmuntherapie mit dem Effekt von Röntgenbestrahlung verglichen.

Die Quantifizierung der Radiotoxizität erfolgte mit Hilfe des MAA-Assay. Dazu wurde fluoreszenzmikroskopisch der Prozentsatz mikrokernhaltiger (M), apoptotischer (A) und abnormaler Zellen (A) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inkubation mit Radioimmunkonjugaten oder nach Röntgenbestrahlung ermittelt, um die verschiedenen Arten des Zelltods zu erfassen.

Untersucht wurden zum einen transfizierte Mäusefibroblasten, die entweder Wildtyp-E-Cad (L929 wt) oder $\Delta 9$ -E-Cad (L929 $\Delta 9$) exprimieren. Die Zellen wurden mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten gegen $\Delta 9$ -E-Cad (^{213}Bi -6H8) inkubiert. Nach Inkubation mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -6H8 nahm die Anzahl an MAA-Zellen bei den L929 $\Delta 9$ -Zellen signifikant auf 13 \pm 3 % zu, während bei den L929 wt-Zellen und den nicht mit ^{213}Bi -6H8 inkubierten Kontrollen höchstens 2 \pm 1 % MAA-Zellen gezählt wurden.

Zum anderen wurden menschliche Magenkarzinomzellen (HSC-45M2) getestet, die $\Delta 9$ -E-Cad natürlicherweise exprimieren. Die Induktion von MAA-Zellen durch ^{213}Bi -6H8 war abhängig von der Aktivitätskonzentration und der Inkubationszeit. Inkubation mit 160 kBq/ml für 10 bzw. 90 min führte zu 12 \pm 1,3 % bzw. 19 \pm 3,3 % MAA-Zellen. Inkubation mit 640 kBq/ml induzierte die Bildung von 21 \pm 3,6 % (10 min Inkubation) und 33 \pm 5,7 % MAA-Zellen (90 min Inkubation). Eine Gruppe der HSC-

Zellen wurde vor der Zugabe von ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten mit dem nicht markierten Antikörper vorinkubiert, um die Kompetitierbarkeit der Bindung von ^{213}Bi -6H8 zu untersuchen. Eine weitere Gruppe der HSC-Zellen wurde mit einem unspezifischen, mit ^{213}Bi beladenen Antikörper inkubiert. In beiden Gruppen wurden bei der niedrigen Aktivitätskonzentration (160 kBq/ml) signifikant weniger MAA-Zellen gebildet als bei den mit ^{213}Bi -6H8 bei gleicher Aktivitätskonzentration inkubierten Zellen, während bei Inkubation mit 640 kBq/ml durch den crossfire Effekt kein Unterschied nachweisbar war.

Zusätzlich wurden L929- Δ 9 und HSC-Zellen mit verschiedenen Dosen von Röntgenstrahlung exponiert und ebenfalls mit Hilfe des MAA-Assay beurteilt. Bei beiden Zelllinien (L929 Δ 9 und HSC) wurde die Bildung von MAA-Zellen in etwa gleichem Ausmaß induziert. 1 Gy führte zu etwa 12 %, 2 Gy zu 20 % und 4 Gy zu 30 % MAA-Zellen.

Antigenexprimierende Tumorzellen wurden durch die Inkubation mit tumorspezifischen, ^{213}Bi -markierten Antikörpern abhängig von der Aktivitätskonzentration und der Inkubationszeit selektiv geschädigt, während Inkubation mit den unspezifischen Konjugaten oder Inkubation nach der Vorinkubation mit unmarkiertem Antikörper weniger Zellschäden induzierte. Dadurch wird gezeigt, dass die Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -gekoppelten Antikörpern gegen Δ 9-E-Cadherin bei geeigneten Aktivitätskonzentrationen eine neue Behandlungsmöglichkeit des diffusen Magenkarzinoms bieten kann.

7 Summary

Quantification of cell death induced by ^{213}Bi -radioimmunoconjugates by evaluation of changes in nuclear morphology

The concept of radioimmunotherapy is to selectively eliminate tumor cells due to specific targeting with appropriate nuclides. In this study we used the alpha-emitter ^{213}Bi coupled to an antibody that binds to a mutated adhesion molecule. This altered E-cadherin ($\Delta 9\text{-E-cad}$) is expressed by diffuse type gastric cancer cells but not by normal tissue. The aim was to demonstrate specific therapeutic efficiency of antibody targeting by quantification of alpha-particle induced cell death. Furthermore the effects of alpha-radioimmunotherapy were compared to those of X-ray irradiation.

The radiotoxicity was quantified via the MAA assay. At various time points after incubation with radioimmunoconjugates or after X-ray irradiation, cells were scored for the percentage of micronucleus formation (M), apoptosis (A), and abnormal cells (A) to evaluate different modes of cell death.

We tested murine fibroblasts transfected with either wildtype E-cad (L929 wt) or mutant $\Delta 9\text{-E-cad}$ (L929 $\Delta 9$) for radioinduced alterations in nuclear morphology. The cells were incubated with ^{213}Bi -immunoconjugates directed against $\Delta 9\text{-E-cad}$ (^{213}Bi -6H8). The MAA peak frequency was $13 \pm 3\%$ in L929 $\Delta 9$ cells with L929 wt cells and unirradiated controls not exceeding $2 \pm 1\%$.

Furthermore, we investigated human gastric cancer cells (HSC-45M2) constitutively expressing $\Delta 9\text{-E-cad}$. MAA formation occurred in a dose and time dependent manner with a maximum of $12 \pm 1.3\%$ after 10 minutes incubation and $19 \pm 3.3\%$ after 90 minutes incubation with $160\text{ kBq/ml } ^{213}\text{Bi}$ -6H8. Incubation with 640 kBq/ml led to $21 \pm 3.6\%$ (10 minutes incubation) and $33 \pm 5.7\%$ MAA cells (90 minutes incubation). A group of HSC cells had been preincubated with unlabeled anti- $\Delta 9\text{-E-cad}$ -antibody prior to application of ^{213}Bi -6H8 to examine competitive inhibition of radioimmunoconjugate binding. An unspecific antibody labeled with ^{213}Bi was applied to another group of HSC cells to evaluate unspecific cell damage. Preincubation with unlabeled 6H8-antibody before application of ^{213}Bi -6H8 as well as incubation with unspecific ^{213}Bi -immunoconjugates significantly reduced cell death at the low activity

concentration (160 kBq/ml) compared to incubation with ^{213}Bi -6H8. At 640 kBq/ml, no difference was observed, most likely due to crossfire irradiation.

Additionally, L929 Δ 9 cells and HSC cells were irradiated with different X-ray doses. X-ray irradiation with 0, 1, 2, and 4 Gy equally induced MAA cells in both HSC and L929 Δ 9 cells with about 12 % after irradiation with 1 Gy, 20 % with 2 Gy, and 30 % with 4 Gy.

Tumorspecific ^{213}Bi -labeled antibodies selectively induce cell death in antigen-expressing tumor cells depending on activity concentration and incubation time, whereas incubation with the unspecific radioimmunoconjugate or incubation with ^{213}Bi -6H8 following preincubation with the unlabeled antibody had less effect. Thus, radioimmunotherapy with ^{213}Bi -labeled specific antibodies targeting Δ 9-E-cadherin may at appropriate activity concentrations provide a new strategy in the treatment of diffuse type gastric cancer.

8 Danksagung

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas und für die lebenswürdige Unterstützung bei allen Bereichen meiner Arbeit.

Herrn Dr. Ch. Seidl danke ich für die Betreuung, seine kritischen Anregungen und die geduldige Hilfestellung.

Den Mitarbeitern der Forschergruppe Nuklearmedizin von Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, bin ich dankbar für ein freundschaftliches und jederzeit hilfsbereites Umfeld.

Herrn PD Dr. M. Abend vom Radiobiologischen Institut der Deutschen Bundeswehr, München, möchte ich besonders danken für die Einführung in den MAA-Assay, viele anregende Diskussionen sowie die großzügige Bereitstellung seiner Labors für einen großen Teil meiner Versuche.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Abend, besonders Herrn R. Obermair und Frau B. Zagel, gilt mein Dank für die große Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche an der Bundeswehr.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. K.-F. Becker, Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Fluoreszenzmikroskop in seinem Institut.

Den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum rechts der Isar, danke ich für die Möglichkeit, Geräte (Zytozentrifuge und Zell-Zählgerät) mitbenutzen zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Gratzl, Frau Dr. M. Haasemann und Frau Dr. K. Schmidt-Bäse vom Graduierten-Kolleg 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ möchte ich mich für die Förderung in vielen ausgezeichneten Seminaren und Diskussionsrunden bedanken.

Bei meinem Freund und Kollegen T. Maurer bedanke ich mich herzlich für viele Anregungen und vor allem für die Hilfe beim Organisieren von Geräten und Arbeitsmitteln im Institut für Medizinische Mikrobiologie.

Ganz besonders dankbar bin ich meinem Mann Florian für den Rückhalt und die Unterstützung bei meiner Arbeit.

9 Literaturverzeichnis

- Abend, M. Strahlenbiologische Bedeutung verschiedener Mechanismen des Zelltodes. 2000. Habilitationsschrift an der Technischen Universität München
- Abend, M., Kehe, K., Kehe, K., Riedel, M., Van Beuningen, D. Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death can be improved by considering other modes of death. *Int.J.Radiat.Biol.* 76 (2000) 249-259
- Abend, M., Van Beuningen, D. Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie. Teil I. *Strahlenther.Onkol.* 174 (1998) 156-166
- Abend, M., Rhein, A., Gilbertz, K.P., Blakely, W.F., Van Beuningen, D. Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. *Int.J.Radiat.Biol.* 67 (1995) 315-326
- Akudugu, J.M., Böhm, L. Micronuclei and apoptosis in glioma and neuroblastoma cell lines and role of other lesions in the reconstruction of cellular radiosensitivity. *Radiat.Environ.Biophys.* 40 (2001) 295-300
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281 (1998) 1305-1308
- Ballangrud, A.M., Yang, W.H., Charlton, D.E., McDevitt, M.R., Hamacher, K.A., Panageas, K.S., Ma, D., Bander, N.H., Scheinberg, D.A., Sgouros, G. Response of LNCaP spheroids after treatment with an alpha-particle emitter (²¹³Bi)-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody (J591). *Cancer Res.* 61 (2001) 2008-2014
- Becker, K.F., Kremmer, E., Eulitz, M., Becker, I., Handschuh, G., Schuhmacher, C., Müller, W., Gabbert, H.E., Ochiai, A., Hirohashi, S., Höfler, H. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am.J.Pathol.* 155 (1999) 1803-1809
- Behr, T.M., Liersch, T., Greiner-Bechert, L., Griesinger, F., Behe, M., Markus, P.M., Gratz, S., Angerstein, C., Brittinger, G., Becker, H., Goldenberg, D.M., Becker, W. Radioimmunotherapy of small-volume disease of metastatic colorectal cancer. *Cancer* 94 (2002) 1373-1381
- Behr, T.M., Behe, M., Stabin, M.G., Wehrmann, E., Apostolidis, C., Molinet, R., Strutz, F., Fayyazi, A., Wieland, E., Gratz, S., Koch, L., Goldenberg, D.M., Becker, W. High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of ²¹³Bi- versus ⁹⁰Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res.* 59 (1999) 2635-2643
- Belyakov, O.V., Prise, K.M., Trott, K.R., Michael, B.D. Delayed lethality, apoptosis and micronucleus formation in human fibroblasts irradiated with X-rays or alpha-particles. *Int.J.Radiat.Biol.* 75 (1999) 985-993

- Beyer, G.J., Miederer, M., Vranjes-Duric, S., Comor, J.J., Künzi, G., Hartley, O., Senekowitsch-Schmidtke, R., Soloviev, D., Buchegger, F. Targeted alpha therapy in vivo: direct evidence for single cancer cell kill using ¹⁴⁹Tb-rituximab. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 31 (2004) 547-554
- Borchardt, P.E., Yuan, R.R., Miederer, M., McDevitt, M.R., Scheinberg, D.A. Targeted actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer. *Cancer Res.* 63 (2003) 5084-5090
- Brechbiel, M.W., Pippin, C.G., McMurry, T.J., Milenic, D.E., Roselli, M., Colcher, D., Gansow, O.A. An effective chelating agent for labelling of monoclonal antibody with Bi-212 for alpha-particle mediated radioimmunotherapy. *J.Chem.Soc., Chemical Communications* 17 (1991) 1169-1170
- Buchsbaum, D.J. Experimental radioimmunotherapy. *Semin.Radiat.Oncol.* 10 (2000) 156-167
- Burke, J.M., Jurcic, J.G., Scheinberg, D.A. Radioimmunotherapy for acute leukemia. *Cancer Control* 9 (2002) 106-113
- Catena, C., Parasacchi, P., Conti, D., Sgura, A., Trenta, G., Righi, E., Trinci, M.M., Trinci, M. Peripheral blood lymphocyte decrease and micronucleus yields during radiotherapy. *Int.J.Radiat.Biol.* 72 (1997) 575-585
- Catena, C., Conti, D., Parasacchi, P., Marengo, P., Bortolato, B., Botturi, M., Leoni, M., Portaluri, M., Paleani-Vettori, P.G., Righi, E. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes may predict patient response to radiotherapy. *Int.J.Radiat.Biol.* 70 (1996) 301-308
- Dadachova, E., Howell, R.W., Bryan, R.A., Frenkel, A., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. Susceptibility of the human pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* to gamma-radiation versus radioimmunotherapy with alpha- and beta-emitting radioisotopes. *J. Nucl. Med.* 45 (2004) 313-320
- Daghighian, F., Barendsward, E., Welt, S., Humm, J., Scott, A., Willingham, M.C., McGuffie, E., Old, L.J., Larson, S.M. Enhancement of radiation dose to the nucleus by vesicular internalization of iodine-125-labeled A33 monoclonal antibody. *J.Nucl.Med.* 37 (1996) 1052-1057
- Denk, H., Zatloukal, K. Zell- und Gewebsreaktionen. In: "Pathologie", Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (Eds.), Urban & Fischer, München, 2001, 50-68
- Fenech, M., Morley, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat.Res.* 147 (1985) 29-36
- Fukudome, Y., Yanagihara, K., Takeichi, M., Ito, F., Shibamoto, S. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma. *Int.J.Cancer* 88 (2000) 579-583
- Gantenberg, H.W., Wuttke, K., Streffer, C., Müller, W.U. Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. *Radiat.Res.* 128 (1991) 276-281

- Garewal,H.S., Ramsey,L., Kaugars,G., Boyle,J. Clinical experience with the micronucleus assay. *J.Cell Biochem.Suppl.* 17F:206-12. (1993) 206-212
- Geerlings,M.W., Kaspersen,F.M., Apostolidis,C., van der Hout,R. The feasibility of ²²⁵Ac as a source of alpha-particles in radioimmunotherapy. *Nucl.Med.Commun.* 14 (1993) 121-125
- Goddu,S.M., Howell,R.W., Rao,D.V. Cellular dosimetry: absorbed fractions for monoenergetic electron and alpha particle sources and S-values for radionuclides uniformly distributed in different cell compartments. *J.Nucl.Med.* 35 (1994) 303-316
- Goldenberg,D.M. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J.Nucl.Med.* 43 (2002) 693-713
- Green,L.M., Murray,D.K., Bant,A.M., Kazarians,G., Moyers,M.F., Nelson,G.A., Tran,D.T. Response of Thyroid Follicular Cells to Gamma Irradiation Compared to Proton Irradiation. I. Initial Characterization of DNA Damage, Micronucleus Formation, Apoptosis, Cell Survival, and Cell Cycle Phase Redistribution. *Radiat.Res.* 155 (2001) 32-42
- Guo,G.Z., Sasai,K., Oya,N., Shibata,T., Shibuya,K., Hiraoka,M. A significant correlation between clonogenic radiosensitivity and the simultaneous assessment of micronucleus and apoptotic cell frequencies. *Int.J.Radiat.Biol.* 75 (1999) 857-864
- Hall,E.J. "Radiobiology for the Radiobiologist" Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000
- Handschuh,G., Candidus,S., Luber,B., Reich,U., Schott,C., Oswald,S., Becke,H., Hutzler,P., Birchmeier,W., Höfler,H., Becker,K.F. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18 (1999) 4301-4312
- Hedde,J.A., Hite,M., Kirkhart,B., Mavournin,K., MacGregor,J.T., Newell,G.W., Salamone,M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat.Res.* 123 (1983) 61-118
- Huber,R., Seidl,C., Schmid,E., Seidenschwang,S., Becker,K.F., Schuhmacher,C., Apostolidis,C., Nikula,T.K., Kremmer,E., Schwaiger,M., Senekowitsch-Schmidtke,R. Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 3922S-3928S
- Illidge,T.M., Brock,S. Radioimmunotherapy of cancer: using monoclonal antibodies to target radiotherapy. *Curr.Pharm.Des.* 6 (2000) 1399-1418
- Imam,S.K. Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 51 (2001) 271-278
- Jurcic,J.G., Larson,S.M., Sgouros,G., McDevitt,M.R., Finn,R.D., Divgi,C.R., Ballangrud,A.M., Hamacher,K.A., Ma,D., Humm,J.L., Brechbiel,M.W., Molinet,R., Scheinberg,D.A. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 100 (2002) 1233-1239

Jurcic, J.G., McDevitt, M.R., Sgouros, G., Ballangrud, A.M., Finn, R.D., Geerlings, M.W., Humm, J., Molinet, R., Apostolidis, C., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia: A phase I trial of bismuth-213-HuM195 (anti-CD33). *Blood* 90 (1997) 504a-504a

Kadhim, M.A., Lorimore, S.A., Townsend, K.M., Goodhead, D.T., Buckle, V.J., Wright, E.G. Radiation-induced genomic instability: delayed cytogenetic aberrations and apoptosis in primary human bone marrow cells. *Int.J.Radiat.Biol.* 67 (1995) 287-293

Kennedy, C.H., Mitchell, C.E., Fukushima, N.H., Neft, R.E., Lechner, J.F. Induction of genomic instability in normal human bronchial epithelial cells by ²³⁸Pu alpha-particles. *Carcinogenesis* 17 (1996) 1671-1676

Kennel, S.J., Stabin, M., Roeske, J.C., Foote, L.J., Lankford, P.K., Terzaghi-Howe, M., Patterson, H., Barkenbus, J., Popp, D.M., Boll, R., Mirzadeh, S. Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroid cultures of tumor cells. *Radiat.Res.* 151 (1999) 244-256

Kriehuber, R., Simko, M. Apoptosis induction and micronucleus formation after exposure to the Auger electron emitter zinc-65 in a human cell line. *Acta Oncol.* 39 (2000) 699-706

Larsen, R.H., Akabani, G., Welsh, P., Zalutsky, M.R. The cytotoxicity and microdosimetry of astatine-211-labeled chimeric monoclonal antibodies in human glioma and melanoma cells in vitro. *Radiat.Res.* 149 (1998) 155-162

le Roux, J., Slabbert, J., Smit, B., Blekkenhorst, G. Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-blocked lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial body-radiotherapy. *Strahlenther.Onkol.* 174 (1998) 75-81

Lenarczyk, M., Goddu, S.M., Rao, D.V., Howell, R.W. Biologic dosimetry of bone marrow: induction of micronuclei in reticulocytes after exposure to ³²P and ⁹⁰Y. *J.Nucl.Med.* 42 (2001) 162-169

Livingston, G.K., Jensen, R.H., Silberstein, E.B., Hinnefeld, J.D., Pratt, G., Bigbee, W.L., Langlois, R.G., Grant, S.G., Shukla, R. Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl. *Int.J.Radiat.Biol.* 72 (1997) 703-713

Lorimore, S.A., Kadhim, M.A., Pocock, D.A., Papworth, D., Stevens, D.L., Goodhead, D.T., Wright, E.G. Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (1998) 5730-5733

Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am.J.Pathol.* 146 (1995) 3-15

Masunaga, S., Ono, K., Suzuki, M., Kinashi, Y., Takagaki, M. Radiobiologic significance of apoptosis and micronucleation in quiescent cells within solid tumors following gamma-ray irradiation. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 49 (2001) 1361-1368

- Mattes, M.J. Radionuclide-antibody conjugates for single-cell cytotoxicity. *Cancer* 94 (2002) 1215-1223
- McDevitt, M.R., Ma, D., Lai, L.T., Simon, J., Borchardt, P., Frank, R.K., Wu, K., Pellegrini, V., Curcio, M.J., Miederer, M., Bander, N.H., Scheinberg, D.A. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* 294 (2001) 1537-1540
- McDevitt, M.R., Finn, R.D., Ma, D., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. Preparation of alpha-emitting ²¹³Bi-labeled antibody constructs for clinical use. *J.Nucl.Med.* 40 (1999) 1722-1727
- McDevitt, M.R., Sgouros, G., Finn, R.D., Humm, J.L., Jurcic, J.G., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur.J.Nucl.Med.* 25 (1998) 1341-1351
- Mill, A.J., Wells, J., Hall, S.C., Butler, A. Micronucleus induction in human lymphocytes: comparative effects of X rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry. *Radiat.Res.* 145 (1996) 575-585
- Mirzaie-Joniani, H., Eriksson, D., Sheikholvaezin, A., Johansson, A., Lofroth, P.O., Johansson, L., Stigbrand, T. Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation. *Cancer* 94 (2002) 1210-1214
- Müller, W.U., Streffer, C. Biological indicators for radiation damage. *Int.J.Radiat.Biol.* 59 (1991) 863-873
- Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88 (1997) 355-365
- Nikula, T.K., McDevitt, M.R., Finn, R.D., Wu, C., Kozak, R.W., Garmestani, K., Brechbiel, M.W., Curcio, M.J., Pippin, C.G., Tiffany-Jones, L., Geerlings, M.W., Sr., Apostolidis, C., Molinet, R., Geerlings, M.W., Jr., Gansow, O.A., Scheinberg, D.A. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J.Nucl.Med.* 40 (1999) 166-176
- Nikula, T.K., Curcio, M.J., Brechbiel, M.W., Gansow, O.A., Finn, R.D., Scheinberg, D.A. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl.Med.Biol.* 22 (1995) 387-390
- Ono, K., Nagata, Y., Akuta, K., Abe, M., Ando, K., Koike, S. Frequency of micronuclei in hepatocytes following X and fast-neutron irradiations--an analysis by a linear-quadratic model. *Radiat.Res.* 123 (1990) 345-347
- Przybyszewski, W.M., Widel, M., Palyvoda, O. Lipid peroxidation, DNA damage, and cellular morphology of R1 Rhabdomyosarcoma cell line irradiated in vitro by gamma-rays with different dose rates. *Teratog.Carcinog.Mutagen.* 22 (2002) 93-102
- Riva, P., Franceschi, G., Frattarelli, M., Riva, N., Guiducci, G., Cremonini, A.M., Giuliani, G., Casi, M., Gentile, R., Jekunen, A.A., Kairemo, K.J. ¹³¹I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma--phase I and II study. *Acta Oncol.* 38 (1999) 351-359

Roeske,J.C., Stinchcomb,T.G. Dosimetric framework for therapeutic alpha-particle emitters. *J.Nucl.Med.* 38 (1997) 1923-1929

Sandmaier,B.M., Bethge,W.A., Wilbur,D.S., Hamlin,D.K., Santos,E.B., Brechbiel,M.W., Fisher,D.R., Storb,R. Bismuth 213-labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts. *Blood* 100 (2002) 318-326

Schmid,W. The micronucleus test. *Mutat.Res.* 31 (1975) 9-15

Senekowitsch-Schmidtke,R., Schuhmacher,C., Becker, K.F., Nikula,T., Seidl,C., Becker,I., Miederer,M., Apostolidis,C., Adam,C., Huber,R., Kremmer,E., Fischer,K., Schwaiger,M. Highly specific tumor binding of a Bi-213-labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional alpha-radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res.* 61 (2001) 2804-2808

Senekowitsch-Schmidtke,R. Antibodies. In: "International Forum of Nuclear Medicine: Molecular Nuclear Medicine with Antibodies, Peptides and Nucleotides. Facts and Fiction. ", Munz,D.L. (Ed.), Zuckschwerdt, München, 2000, 5-23

Shibamoto,Y., Streffer,C., Fuhrmann,C., Budach,V. Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Radiat.Res.* 128 (1991) 293-300

Srivastava,S., Dadachova,E. Recent advances in radionuclide therapy. *Semin.Nucl.Med.* 31 (2001) 330-341

Srivastava,S.C. Criteria for the selection of radionuclides for targeting nuclear antigens for cancer radioimmunotherapy. *Cancer Biother.Radiopharm.* 11 (1996) 43-50

Talbot,R.J., Nicholls,L., Morgan,A., Moores,S.R. Effect of inhaled alpha-emitting nuclides on mouse alveolar macrophages. *Radiat.Res.* 119 (1989) 271-285

Vandenbulcke,K., De Vos,F., Offner,F., Philippe,J., Apostolidis,C., Molinet,R., Nikula,T.K., Bacher,K., de Gelder,V., Vral,A., Lahorte,C., Thierens,H., Dierckx,R.A., Slegers,G. In vitro evaluation of 213Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 30 (2003) 1357-1364

Venkatachalam,P., Solomon,F.D., Prabhu,B.K., Mohankumar,M.N., Gajendiran,N., Jeevanram,R.K. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Mutat.Res.* 429 (1999) 1-12

Watson,G.E., Pocock,D.A., Papworth,D., Lorimore,S.A., Wright,E.G. In vivo chromosomal instability and transmissible aberrations in the progeny of haemopoietic stem cells induced by high- and low-LET radiations. *Int.J.Radiat.Biol.* 77 (2001) 409-417

Watson,G.E., Lorimore,S.A., Wright,E.G. Long-term in vivo transmission of alpha-particle-induced chromosomal instability in murine haemopoietic cells. *Int.J.Radiat.Biol.* 69 (1996) 175-182

Wesley,J.N., McGee,E.C., Garmestani,K., Brechbiel,M.W., Yordanov,A.T., Wu,C., Gansow,O.A., Eckelman,W.C., Bacher,J.D., Flynn,M., Goldman,C.K., MacLin,M., Schwartz,U.P., Jackson-White,T., Phillip,C.M., Decker,J., Waldmann,T.A. Systemic radioimmunotherapy using a monoclonal antibody, anti-Tac directed toward the alpha subunit of the IL-2 receptor armed with the alpha-emitting radionuclides (212)Bi or (211)At. *Nucl. Med. Biol.* 31 (2004) 357-364

Yanagihara,K., Ito,A., Toge,T., Numoto,M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 53 (1993) 5815-5821

Zalutsky,M.R., Vaidyanathan,G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. *Curr.Pharm.Des.* 6 (2000) 1433-1455

10 Anhang

10.1 Inkubation von L929-Zellen mit ²¹³Bi-6H8-Konjugaten

Daten zu Kapitel 3.2 (Abbildung 4)

Inkubation von L929-Zellen mit ²¹³Bi-6H8-Konjugaten:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
L929 wt Kontrolle	1,6+/-0,5	1,1+/-0,6	0,7+/-0,2	0,6+/-0,3	Mikrokerne
	0,1+/-0,1	0,0	0,0	0,0+/-0,1	Apoptosen
	0,6+/-0,6	0,7+/-0,4	0,7+/-0,6	0,3+/-0,1	abnormale Z.
	2,2+/-1,1	1,8+/-0,2	1,4+/-0,8	1,0+/-0,3	MAA
L929 wt 160 kBq/ml	1,2+/-0,5	2,4+/-1,1	1,3+/-0,5	1,3+/-0,4	Mikrokerne
	0,1+/-0,1	0,0+/-0,1	0,0	0,0	Apoptosen
	0,6+/-0,3	1,1+/-0,3	0,7+/-0,4	0,9+/-0,3	abnormale Z.
	1,9+/-0,4	3,5+/-1,3	2,0+/-0,9	2,2+/-0,7	MAA
L929 Δ9 Kontrolle	1,7+/-0,7	1,3+/-0,5	1,6+/-1,0	0,8+/-0,3	Mikrokerne
	0,1+/-0,2	0,0+/-0,1	0,1+/-0,1	0,0	Apoptosen
	1,4+/-0,8	1,0+/-0,6	0,8+/-0,4	1,0+/-0,6	abnormale Z.
	3,2+/-0,4	2,2+/-0,9	2,5+/-0,8	1,8+/-0,4	MAA
L929 Δ9 160 kBq/ml	1,7+/-0,5	9,7+/-1,7	8,6+/-2,3	4,4+/-3,7	Mikrokerne
	0,0	0,0	0,0	0,0	Apoptosen
	1,3+/-1,3	2,2+/-0,7	4,1+/-1,0	4,6+/-1,9	abnormale Z.
	3,0+/-1,2	12+/-2,3	13+/-3,1	10+/-4,1	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 30 min Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen. Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

10.2 Inkubation von HSC-45M2-Zellen mit ²¹³Bi-6H8-Konjugaten

Daten zu Kapitel 3.3.2.1 (Abbildung 6)

Inkubation mit unmarkierten Antikörpern:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle (n = 15)	2,4+/-1,0	2,5+/-0,9	1,5+/-0,5	2,0+/-0,8	Mikrokerne
	0,08+/-0,07	0,08+/-0,09	0,08+/-0,09	0,15+/-0,14	Apoptosen
	3,4+/-0,9	3,3+/-1,1	3,0+/-0,5	3,2+/-0,7	abnormale Z.
	5,9+/-1,4	5,9+/-1,7	4,5+/-0,5	5,4+/-1,0	MAA
6H8 kalt (n = 3)	2,4+/-1,1	3,7+/-1,2	2,1+/-0,9	1,5+/-0,4	Mikrokerne
	0,13+/-0,15	0,10+/-0,10	0,20+/-0,10	0,1+/-0,10	Apoptosen
	3,3+/-1,2	4,7+/-1,1	2,8+/-0,3	3,1+/-0,2	abnormale Z.
	5,8+/-2,2	8,5+/-2,1	5,1+/-0,8	4,7+/-0,3	MAA
7H1 kalt (n = 1)	1,3	3,1	1,3	1,3	Mikrokerne
	0	0	0,1	0,1	Apoptosen
	2	3,7	2,3	2,9	abnormale Z.
	3,7	6,8	3,7	4,3	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2 h Inkubation mit unmarkierten Antikörpern. Angegeben sind die Versuchsanzahl (n) sowie für jeden Datenpunkt Mittelwert und Standardabweichung. Bei n < 3 wurde auf die Standardabweichung verzichtet.

Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

Daten zu Kapitel 3.3.2.2 (Abbildung 7)

Inkubation mit ^{213}Bi -6H8-Immunkonjugaten in verschiedenen Aktivitätskonzentrationen, Inkubationszeit 10 min:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle (n = 15)	2,4+/-1,0	2,5+/-0,9	1,5+/-0,5	2,0+/-0,8	Mikrokerne
	0,08+/-0,07	0,08+/-0,09	0,08+/-0,09	0,15+/-0,14	Apoptosen
	3,4+/-0,9	3,3+/-1,1	3,0+/-0,5	3,2+/-0,7	abnormale Z.
	5,9+/-1,4	5,9+/-1,7	4,5+/-0,5	5,4+/-1,0	MAA
6H8 10 min 160 kBq/ml (n = 4)	2,5+/-0,5	5,7+/-2,1	5,3+/-2,1	3,6+/-1,5	Mikrokerne
	0,05+/-0,06	0,15+/-0,13	0,10+/-0,08	0,12+/-0,10	Apoptosen
	3,6+/-1,4	6,3+/-0,7	6,1+/-0,6	5,9+/-2,4	abnormale Z.
	6,2+/-1,8	12+/-1,3	11+/-1,9	9,7+/-3,8	MAA
6H8 10 min 640 kBq/ml (n = 3)	1,9+/-0,2	14+/-3,9	9,7+/-0,3	10+/-1,0	Mikrokerne
	0,03+/-0,06	0,40+/-0,10	0,2	0,17+/-0,15	Apoptosen
	3,3+/-0,9	7,0+/-0,6	9,1+/-2,8	9,1+/-0,8	abnormale Z.
	5,2+/-0,9	21+/-3,6	19+/-2,8	20+/-1,7	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 10 min Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten. Es wurde mit 160 kBq/ml bzw. 640 kBq/ml ^{213}Bi -6H8 inkubiert. Angegeben sind die Versuchsanzahl (n) sowie für jeden Datenpunkt Mittelwert und Standardabweichung.

Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

Daten zu Kapitel 3.3.2.2 (Abbildung 8)

Inkubation mit ^{213}Bi -6H8-Immunkonjugaten in verschiedenen Aktivitätskonzentrationen, Inkubationszeit 90 min:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle (n = 15)	2,4+/-1,0	2,5+/-0,9	1,5+/-0,5	2,0+/-0,8	Mikrokerne
	0,08+/-0,07	0,08+/-0,09	0,08+/-0,09	0,15+/-0,14	Apoptosen
	3,4+/-0,9	3,3+/-1,1	3,0+/-0,5	3,2+/-0,7	abnormale Z.
	5,9+/-1,4	5,9+/-1,7	4,5+/-0,5	5,4+/-1,0	MAA
6H8 90 min 160 kBq/ml (n = 3)	2,3+/-0,6	6,7+/-2,9	8,7+/-1,4	6,9+/-0,6	Mikrokerne
	0,10+/-0,17	0,13+/-0,16	0,23+/-0,25	0,20+/-0,10	Apoptosen
	3,2+/-0,3	7,4+/-1,3	9,6+/-1,9	7,5+/-0,6	abnormale Z.
	5,5+/-0,4	14+/-4,2	19+/-3,3	15+/-1,2	MAA
6H8 90 min 640 kBq/ml (n = 3)	2,5+/-0,7	12+/-4,9	19+/-2,3	17+/-2,4	Mikrokerne
	0,0+0	0,30+/-0,20	0,27+/-0,12	0,4+0	Apoptosen
	3,9+/-0,3	7,1+/-0,6	15+/-4,9	14+/-1,8	abnormale Z.
	6,4+/-0,7	19+/-4,8	33+/-5,7	32+/-5,0	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 90 min Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten. Es wurde mit 160 kBq/ml bzw. 640 kBq/ml ^{213}Bi -6H8 inkubiert. Angegeben sind die Versuchsanzahl (n) sowie für jeden Datenpunkt Mittelwert und Standardabweichung.

Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

Daten zu Kapitel 3.3.2.3 (Abbildung 9)
Effekt der Vorinkubation mit kaltem Antikörper:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle (n = 15)	2,4+/-1,0	2,5+/-0,9	1,5+/-0,5	2,0+/-0,8	Mikrokerne Apoptosen abnormale Z. MAA
	0,08+/-0,07	0,08+/-0,09	0,08+/-0,09	0,15+/-0,14	
	3,4+/-0,9	3,3+/-1,1	3,0+/-0,5	3,2+/-0,7	
	5,9+/-1,4	5,9+/-1,7	4,5+/-0,5	5,4+/-1,0	
6H8 10 min 160 kBq/ml (n = 4)	2,5+/-0,5	5,7+/-2,1	5,3+/-2,1	3,6+/-1,5	Mikrokerne Apoptosen abnormale Z. MAA
	0,05+/-0,06	0,15+/-0,13	0,10+/-0,08	0,12+/-0,10	
	3,6+/-1,4	6,3+/-0,7	6,1+/-0,6	5,9+/-2,4	
	6,2+/-1,8	12+/-1,3	11+/-1,9	9,7+/-3,8	
6H8 10 min 160 kBq/ml; VI (n = 3)	2,5+/-1,0	3,5+/-1,0	3,2+/-1,3	2,6+/-1,2	Mikrokerne Apoptosen abnormale Z. MAA
	0,10+/-0,10	0,13+/-0,06	0,13+/-0,23	0,23+/-0,15	
	3,6+/-1,8	4,8+/-0,7	4,7+/-0,9	4,8+/-1,4	
	6,3+/-1,8	8,4+/-1,6	8,1+/-2,1	7,6+/-2,3	
6H8 10 min 640 kBq/ml (n = 3)	1,9+/-0,2	14+/-3,9	9,7+/-0,3	10+/-1,0	Mikrokerne Apoptosen abnormale Z. MAA
	0,03+/-0,06	0,40+/-0,10	0,2	0,17+/-0,15	
	3,3+/-0,9	7,0+/-0,6	9,1+/-2,8	9,1+/-0,8	
	5,2+/-0,9	21+/-3,6	19+/-2,8	20+/-1,7	
6H8 10 min 640 kBq/ml; VI (n = 3)	2,1+/-1,2	13+/-0,4	10+/-1,8	9,0+/-1,4	Mikrokerne Apoptosen abnormale Z. MAA
	0,03+/-0,06	0,17+/-0,12	0,20+/-0,10	0,20+/-0,10	
	3,7+/-0,6	6,9+/-0,9	8,2+/-0,9	7,0+/-0,6	
	5,8+/-1,0	20+/-0,6	19+/-2,4	16+/-2,1	
6H8 30 min 160 kBq/ml (n = 2)	2,3	11	7,1	3,9	Mikrokerne Apoptosen abnormale Z. MAA
	0	0,25	0,15	0,3	
	3,1	6,6	6	7,1	
	5,4	18	13	11	
6H8 30 min 160 kBq/ml; VI (n = 2)	2,8	13	6,8	2,7	Mikrokerne Apoptosen abnormale Z. MAA
	0,1	0,1	0,15	0,2	
	4,3	5	4,8	4,4	
	7	18	12	7,3	

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 10 min Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten. Es wurden 160 kBq/ml bzw. 640 kBq/ml ²¹³Bi-6H8 eingesetzt. Mit VI gekennzeichnet sind die Versuche, bei denen mit unmarkiertem Antikörper vorinkubiert wurde. Angegeben sind die Versuchsanzahl (n) sowie für jeden Datenpunkt Mittelwert und Standardabweichung. Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

Außerdem sind Daten für die Inkubationszeit 30 min angegeben, die nicht graphisch dargestellt sind. Da nur zwei Versuche durchgeführt wurden, wurde auf die Berechnung der Standardabweichung verzichtet.

Daten zu Kapitel 3.3.2.4 (Abbildung 10)

Vergleich der Wirkung spezifischer und unspezifischer ²¹³Bi-Immunkonjugate, Inkubationszeit 10 min:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle (n = 15)	2,4+/-1,0	2,5+/-0,9	1,5+/-0,5	2,0+/-0,8	Mikrokerne
	0,08+/-0,07	0,08+/-0,09	0,08+/-0,09	0,15+/-0,14	Apoptosen
	3,4+/-0,9	3,3+/-1,1	3,0+/-0,5	3,2+/-0,7	abnormale Z.
	5,9+/-1,4	5,9+/-1,7	4,5+/-0,5	5,4+/-1,0	MAA
6H8 10 min 160 kBq/ml (n = 4)	2,5+/-0,5	5,7+/-2,1	5,3+/-2,1	3,6+/-1,5	Mikrokerne
	0,05+/-0,06	0,15+/-0,13	0,10+/-0,08	0,12+/-0,10	Apoptosen
	3,6+/-1,4	6,3+/-0,7	6,1+/-0,6	5,9+/-2,4	abnormale Z.
	6,2+/-1,8	12+/-1,3	11+/-1,9	9,7+/-3,8	MAA
7H1 10 min 160 kBq/ml (n = 3)	2,2+/-0,3	4,2+/-0,7	2,2+/-0,3	2,1+/-0,8	Mikrokerne
	0,13+/-0,15	0,10+/-0,10	0,07+/-0,06	0,13+/-0,16	Apoptosen
	4,5+/-0,7	5,6+/-0,4	4,0+/-0,5	3,6+/-1,1	abnormale Z.
	6,9+/-1,2	9,9+/-0,8	6,3+/-0,3	5,8+/-1,8	MAA
6H8 10 min 640 kBq/ml (n = 3)	1,9+/-0,2	14+/-3,9	9,7+/-0,3	10+/-1,0	Mikrokerne
	0,03+/-0,06	0,40+/-0,10	0,2	0,17+/-0,15	Apoptosen
	3,3+/-0,9	7,0+/-0,6	9,1+/-2,8	9,1+/-0,8	abnormale Z.
	5,2+/-0,9	21+/-3,6	19+/-2,8	20+/-1,7	MAA
7H1 10 min 640 kBq/ml (n = 3)	2,3+/-0,8	9,5+/-2,2	9,9+/-0,7	8,1+/-1,7	Mikrokerne
	0	0,30+/-0,10	0,20+/-0,10	0,13+/-0,06	Apoptosen
	3,9+/-1,3	7,3+/-2,2	8,4+/-1,0	8,2+/-0,4	abnormale Z.
	6,2+/-1,1	17+/-1,8	19+/-0,2	16+/-2,4	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 10 min Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten. Es wurden spezifische ²¹³Bi-6H8-Konjugate und unspezifische ²¹³Bi-7H1-Konjugate eingesetzt. Angegeben sind die Versuchsanzahl (n) sowie für jeden Datenpunkt Mittelwert und Standardabweichung.

Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

Daten zu Kapitel 3.3.2.4 (Abbildung 11)

Vergleich der Wirkung spezifischer und unspezifischer ²¹³Bi-Immunkonjugate, Inkubationszeit 90 min:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle (n = 15)	2,4+/-1,0	2,5+/-0,9	1,5+/-0,5	2,0+/-0,8	Mikrokerne
	0,08+/-0,07	0,08+/-0,09	0,08+/-0,09	0,15+/-0,14	Apoptosen
	3,4+/-0,9	3,3+/-1,1	3,0+/-0,5	3,2+/-0,7	abnormale Z.
	5,9+/-1,4	5,9+/-1,7	4,5+/-0,5	5,4+/-1,0	MAA
6H8 90 min 160 kBq/ml (n = 3)	2,3+/-0,6	6,7+/-2,9	8,7+/-1,4	6,9+/-0,6	Mikrokerne
	0,10+/-0,17	0,13+/-0,16	0,23+/-0,25	0,20+/-0,10	Apoptosen
	3,2+/-0,3	7,4+/-1,3	9,6+/-1,9	7,5+/-0,6	abnormale Z.
	5,5+/-0,4	14+/-4,2	19+/-3,3	15+/-1,2	MAA
7H1 90 min 160 kBq/ml (n = 3)	2,3+/-0,6	5,1+/-1,4	4,3+/-0,6	5,3+/-1,4	Mikrokerne
	0,03+/-0,06	0,07+/-0,06	0,10+/-0,10	0,13+/-0,15	Apoptosen
	3,0+/-0,5	5,0+/-1,8	7,0+/-0,7	4,7+/-1,8	abnormale Z.
	5,3+/-1,1	10+/-3,1	12+/-0,7	10+/-3,3	MAA
6H8 90 min 640 kBq/ml (n = 3)	2,5+/-0,7	12+/-4,9	19+/-2,3	17+/-2,4	Mikrokerne
	0,0+0	0,30+/-0,20	0,27+/-0,12	0,4+0	Apoptosen
	3,9+/-0,3	7,1+/-0,6	15+/-4,9	14+/-1,8	abnormale Z.
	6,4+/-0,7	19+/-4,8	33+/-5,7	32+/-5,0	MAA
7H1 90 min 640 kBq/ml (n = 3)	3,2+/-0,4	10+/-1,5	17+/-2,0	19+/-2,8	Mikrokerne
	0,13+/-0,16	0,27+/-0,12	0,37+/-0,15	0,60+/-0,17	Apoptosen
	3,9+/-1,0	6,6+/-2,0	13+/-1,1	16+/-1,7	abnormale Z.
	7,2+/-1,4	17+/-3,6	30+/-3,0	36+/-2,0	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 90 min Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten. Es wurden spezifische ²¹³Bi-6H8-Konjugate und unspezifische ²¹³Bi-7H1-Konjugate eingesetzt. Angegeben sind die Versuchsanzahl (n) sowie für jeden Datenpunkt Mittelwert und Standardabweichung.

Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

10.3 Versuche mit Röntgenstrahlung

Daten zu Kapitel 3.4.1 (Abbildung 12)
Röntgenbestrahlung von L929 Δ 9-Zellen:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle	1,1	1,9	1,6	2,0	Mikrokerne
	0,0	0,0	0,0	0,0	Apoptosen
	1,2	1,6	2,8	2,5	abnormale Z.
	2,3	3,5	4,4	4,4	MAA
1 Gy	1,1	8,9	5,1	5,6	Mikrokerne
	0,0	0,0	0,0	0,0	Apoptosen
	1,4	2,6	3,0	3,0	abnormale Z.
	2,4	11	8,1	8,6	MAA
2 Gy	1,0	17	10	7,1	Mikrokerne
	0,1	0,0	0,0	0,0	Apoptosen
	1,1	2,4	3,5	4,1	abnormale Z.
	2,2	19	13	11	MAA
4 Gy	1,2	25	20	15	Mikrokerne
	0,0	0,0	0,1	0,0	Apoptosen
	1,5	4,0	5	4,3	abnormale Z.
	2,7	29	25	20	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Röntgenbestrahlung mit 1, 2 bzw. 4 Gy. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen. Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

Daten zu Kapitel 3.4.2 (Abbildung 13)
Röntgenbestrahlung von HSC-Zellen:

Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	
Kontrolle	1,9	2,7	2,4	2,1	Mikrokerne
	0,1	0,0	0,1	0,0	Apoptosen
	3,7	3,7	4,8	3,0	abnormale Z.
	5,6	6,4	7,1	5,1	MAA
1 Gy	2,5	7,4	7,2	5,1	Mikrokerne
	0,0	0,0	0,1	0,1	Apoptosen
	3,1	5,6	5,0	5,0	abnormale Z.
	5,6	13	12	10	MAA
2 Gy	2,0	14	12	10	Mikrokerne
	0,0	0,1	0,2	0,1	Apoptosen
	3,7	7,7	8,5	7,1	abnormale Z.
	5,7	22	21	17	MAA
4 Gy	2,4	14	17	14	Mikrokerne
	0,0	0,2	0,2	0,3	Apoptosen
	4,2	8,9	13	12	abnormale Z.
	6,6	23	30	27	MAA

Prozentuale Anzahl mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen sowie die Summe der drei Parameter (MAA-Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Röntgenbestrahlung mit 1, 2 bzw. 4 Gy. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei Versuchen. Die Maximalwerte von mikrokernhaltigen Zellen, abnormalen Zellen und MAA-Zellen im Versuchszeitraum sind fett gedruckt.

11 Abkürzungsverzeichnis

Bi	Wismut
²¹³ Bi	²¹³ Wismut
²¹³ Bi-6H8	Radioimmunkonjugat (²¹³ Bi gekoppelt an den 6H8-Antikörper)
²¹³ Bi-7H1	Radioimmunkonjugat (²¹³ Bi gekoppelt an den 7H1-Antikörper)
Δ9	Δ9-Mutation (Deletion des Exon 9 im E-Cadherin-Gen)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E-Cad	E-Cadherin (Zelladhäsionsmolekül)
wt-E-Cad	Wildtyp-E-Cadherin
Δ9-E-Cad	Δ9-Mutation des E-Cadherin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
HSC	Menschliche Siegelringkarzinom-Zellen (HSC45-M2)
6H8	Antikörper 6H8 (bindet an die Δ9-Mutation des E-Cadherin)
7H1	Antikörper 7H1 (bindet an die Δ8-Mutation des E-Cadherin)
ITLC	Dünnschichtchromatographie (Instant Thin Layer Chromatography)
L929	Murine Fibroblasten der Laborzelllinie L929
L929 Δ9	Murine Fibroblasten, mit Δ9-E-Cadherin transfiziert
L929 wt	Murine Fibroblasten, mit wt-E-Cadherin transfiziert
LET	Linearer Energietransfer
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
RIT	Radioimmuntherapie
SD	Standardabweichung
SCID	Severe combined immunodeficiency
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp