

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

Untersuchungen zur In-Vitro-Zytotoxizität von ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Sabine Seidenschwang

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-Schmidtke

2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 02.03.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

Gewidmet Robert

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Konventionelle Tumorthapien	10
1.2 Spezifische Tumorthapien	13
1.3 Therapie bei fortgeschrittenen Tumoren und Therapieresistenz	14
1.4 Radionuklidtherapie	15
2. Zielsetzung	21
3. Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Chemikalien, Lösungen, Kits und Antikörper	22
3.1.2 Zellkulturmedien und Lösungen für die Zellkultur	23
3.1.3 Verbrauchsmaterial.....	23
3.1.4 Geräte	24
3.1.5 Software.....	25
3.1.6 Zellen.....	25
3.1.7 Tumorspezifische Antikörper.....	25
3.1.8 Radionuklide	26
3.2 Zellkultur	27
3.2.1 Morphologie der verwendeten Zelllinien	27
3.2.2 Kulturbedingungen	29
3.2.3 Ablösen und Zählen der Zellen	29
3.3 Bestimmung von Verdopplungszeit und optimalen Proliferationsbedingungen ..	30
3.3.1 Ermittlung der Verdopplungszeit	30
3.3.2 Beeinflussung der Klonogenität durch Veränderung der Wachstumsbedingungen.....	30
3.4 Das ²²⁵Ac/²¹³Bi-Generator-System zur Gewinnung von ²¹³Bi	32
3.4.1 Aufbau	32
3.4.2 Elution von ²¹³ Bi und Markierung der Antikörper	32
3.5 Markierung der Antikörper mit ¹²⁵I und ¹¹¹In	35
3.5.1 Markierung mit ¹²⁵ I.....	35
3.5.2 Markierung mit ¹¹¹ In.....	35
3.6 Untersuchungen zur Antigenexpression und Antigendichte sowie Internalisierung der ²¹³Bi-Immunkonjugate	36
3.6.1 Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz.....	36
3.6.2 Quantifizierung von E-Cadherin an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS)	36
3.6.3 Bestimmung von Antigendichte mittels „Scatchard“-Analyse.....	37
3.6.4 Kinetikexperimente zur Internalisierung von Radioimmunkonjugaten	39
3.7 Quantifizierung zellulären Überlebens mittels klonogenem Test nach ¹³⁷Cs-Bestrahlung	41
3.8 Quantifizierung zellulären Überlebens mittels klonogenem Test nach Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten	43
3.8.1 Experimente in 96-Well-Platten	44
3.8.2 Experimente in 24-Well-Platten	44
3.9 Analyse von chromosomalen Aberrationen nach Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten	46
3.10 Abschätzung der ²¹³Bi-Dosis nach Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten	47
3.10.1 Berechnung der Absatigung der $\Delta 9$ -E-Cadherine an der Zelloberfläche mit ²¹³ Bi-Immunkonjugaten.....	47

3.10.2 Rechenweg zur Abschätzung der Dosis	49
4. Ergebnisse.....	53
4.1 Zellkultur	53
4.2 Quantifizierung der Zellproliferation an Hand von Verdopplungszeiten.....	53
4.3 Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Zellproliferation in Multi-Well-Platten	55
4.4 Untersuchungen zum Nachweis und zur Quantifizierung von $\Delta 9$-E-Cadherin an der Zelloberfläche sowie zur Internalisierung von anti-$\Delta 9$-E-Cadherin.....	57
4.4.1 Darstellung von $\Delta 9$ -E-Cadherin an HSC, MDA $\Delta 9$ und L 929 $\Delta 9$ mittels Immunfluoreszenz	57
4.4.2 Nachweis und Quantifizierung von E-Cadherin mittels Durchflusszytometrie (FACS)	58
4.4.3 Bestimmung der Antigendichte ausgewählter Zelllinien mittels „Scatchard“-Analyse	59
4.4.4 Kinetikexperimente zur Internalisierung von Radioimmunkonjugaten.....	60
4.5 Überleben ausgewählter Zelllinien nach Bestrahlung mit ^{137}Cs	66
4.6 Überleben ausgewählter Zelllinien nach Inkubation mit ^{213}Bi-Immunkonjugaten	69
4.6.1 Überleben von MPE-600 nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten	70
4.6.2 Überleben von MDA-Zellen nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten	71
4.6.3 Überleben von Magenkarzinomzelllinien nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten	77
4.6.4 Überleben von murinen Fibroblasten nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten	87
4.6.5 Alternative Auswertung des Überlebens für ausgewählte Experimente nach „tumor cure probability“	92
4.7 Chromosomale Aberrationen nach Inkubation mit ^{213}Bi-Immunkonjugaten	96
4.7.1 Chromosomale Aberrationen in Magenkarzinomzelllinien.....	100
4.7.2 Chromosomale Aberrationen in Fibroblasten.....	102
4.7.3 Chromosomale Aberrationen in MDA-Zellen.....	103
4.8 Abschätzung der ^{213}Bi-Dosis für die Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi-Immunkonjugaten.....	105
4.8.1 Dosen der ^{213}Bi -Immunkonjugate in klonogenen Tests	105
4.8.2 Dosen der ^{213}Bi -Immunkonjugate zur Induktion von Chromosomenaberrationen.....	107
5. Diskussion.....	109
5.1 Zur Ermittlung von Zellproliferationsraten und plating efficiencies.....	109
5.2 Zur Markierung der Antikörper mit Radionukliden	111
5.3 Zur Quantifizierung der Antigene pro Zelle.....	113
5.4 Zur Kinetik der Internalisierung von Radioimmunkonjugaten	115
5.5 Vergleich der Strahlensensibilitäten der untersuchten Zelllinien gegenüber ^{137}Cs-Bestrahlung und Behandlung mit ^{213}Bi-Immunkonjugaten	119
5.6 Bewertung der Überlebenskurven nach Inkubation mit ^{213}Bi-Immunkonjugaten	123
5.7 Chromosomale Schäden nach Behandlung mit ^{213}Bi-Immunkonjugaten	130
5.8 Zur Dosisabschätzung.....	133
6. Zusammenfassung.....	136
7. Anhang.....	138
7.1 Tabellen.....	138
7.2 Literaturverzeichnis.....	165
7.3 Abbildungsverzeichnis	173

7.4 Versuchsverzeichnis.....	177
Danksagung	180

Verwendete Abkürzungen

u	atomare Masseneinheit (1,660566*10 ⁻²⁷ kg)
¹²⁵ I	Iod-125
¹³¹ I	Iod-131
¹⁶⁹ Er	Erbium-169
¹⁷⁷ Lu	Lutetium-177
¹⁸⁶ Re	Rhenium-186
¹⁸⁸ Re	Rhenium-188
¹⁹² Ir	Iridium-192
1-JÜR	Ein-Jahres-Überlebensrate
²¹¹ At	Astat-211
²¹² Bi	Wismut-212
²¹³ Bi	Wismut-213
²¹³ Po	Polonium-213
²¹⁷ At	Astat-217
²²⁵ Ac	Actinium-225
²²⁶ Rn	Radon-226
²³⁹ Pu	Plutonium-239
²⁴¹ Am	Americium-241
5-JÜR	Fünf-Jahres-Überlebensrate
⁶⁷ Cu	Kupfer-67
⁸⁹ Sr	Strontium-89
⁹⁰ Y	Yttrium-90
AGMP-50	Kationenaustauscherharz
Aqua dest.	Entionisiertes Wasser aus der Millipore Anlage
ATCC	American type culture collection
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copyDesoxyribonucleinsäure
CEA	Karziñoembryonales Antigen
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DOTA	1,4,7,10-tetra-azazyklododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic-acid
DTPA	diethylentriamine pentaacetic acid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Normalfallbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
ICRU	Internationale Kommission für radiologische Einheiten und Messungen
IL	Interleukin
ITLC	instant thin layer chromatography
keV	Kiloelektronvolt
M	Molar (Stoffkonzentration in mol/l)
MAK	Monoklonaler Antikörper
MeV	Megaelektronvolt
mfi	mean fluorescence intensity
min	Minute
M _m	Molekulargewicht (g/mol)

mRNA	messengerRibonucleinsäure
MUC1	epitheliales Muzin 1
n	Anzahl der Messpunkte
NHL	Non Hodgkin Lyphom
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2
PBS	Phosphate buffered saline without Ca^{2+} und Mg^{2+}
PCC	premature chromosome condensation
PE	plating efficiency
RI	Radioimmunkonjugate
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCN-CHX-A''-DTPA	2-(4-isothiocyanatobenzyl)diethylenetriamine pentaacetic acid
SD	Standardabweichung (n-1 Wichtung)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAG-72	Tumorassoziertes Glykoprotein von Adenokarzinomen
tcp	tumor cure probability
TUM	Technische Universität München
UICC	Unio Internationalis Contra Cancrum
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Maligne Tumore stellen nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Dabei zeigt sich ein rückläufiger Trend der malignen Tumore als Todesursache seit 1990, wobei die absolute Zahl der Todesfälle wegen der steigenden Lebenserwartung zunimmt. Aufgrund rückläufiger Tendenz der Sterblichkeit an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems wird vermutet, dass in 15-20 Jahren maligne Tumorerkrankungen die häufigste Todesursache darstellen.

Die fünf häufigsten Malignome als Todesursache bei Männern sind das Bronchial-, Kolorektale, Prostata-, Magen- und das Pankreaskarzinom. Frauen versterben am häufigsten am Mamma-, Kolorektalen, Bronchial-, Ovarial-, Pankreas- und Magenkarzinom (Becker et al, 2002).

1.1 Konventionelle Tumortherapien

Die Diagnostik maligner Tumore hat sich durch Fortschritte in der Bildgebung und Einführung endoskopischer Verfahren verbessert. Die Weiterentwicklung der konventionellen Therapieverfahren, d.h. der Tumorchirurgie, der medikamentösen antineoplastischen Systemtherapie und der externen Bestrahlung von Tumoren ist dank verbesserter Operationsmethoden, besser verträglicher Chemotherapeutika und computergestützter Dosisberechnungen erheblich vorangekommen. Trotz der bisherigen Fortschritte stoßen die beschriebenen Therapien ab einem gewissen Krankheitsstadium an ihre Grenzen. Diese Situation erfordert verbesserte Therapien für die jeweiligen Tumorentitäten. Die medikamentöse antineoplastische Systemtherapie beinhaltet etablierte Therapieverfahren wie die zytostatische Chemotherapie, die Hormontherapie und die Immuntherapie. Daneben gibt es weitere Therapieansätze, die sich derzeit im experimentellen Stadium befinden. Dazu gehören die zelluläre Immuntherapie, die Zytokintherapie, die Therapie der Inhibition von Wachstumsfaktoren und –rezeptoren, die Neoangiogenese-differenzierungs-induzierende Therapie sowie verschiedene Ansätze zur Gentherapie (Junginger Th. et al; 2004).

Die chirurgische Therapie strebt die Entfernung der gesamten Tumormasse durch Resektion an. Der Erfolg der chirurgischen Therapie hängt dabei nicht nur von der vollständigen Tumorentfernung (R_0 -Resektion), sondern auch von der Beherrschung intraoperativer Risiken wie Narkose, Blutverlust während der Operation sowie postoperativer Komplikationen wie Blutungen, Infektionen, Anastomoseninsuffizienzen und Wundheilungsstörungen ab. Sowohl bei der Vermeidung als auch bei der Behandlung von Komplikationen wurden in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht. Durch die verbesserte Operationstechnik verringerte sich die Letalität zum Beispiel nach totaler Gastrektomie von 25 auf 13% im Zeitraum von 1959 bis 1976 (Gall et al, 1982). Heute ist die postoperative Letalität nach Magenresektion geringer als 5% (Siewert et al; 2001).

Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) beim Magenkarzinom verbesserte sich nach kurativer totaler Gastrektomie von 6 auf 20% im Zeitraum von 1950-1969 (Gall et al, 1982).

Die Chemotherapie wird überwiegend zur Behandlung von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen und innerhalb von multimodalen Therapiekonzepten zur Behandlung von soliden Tumoren verschiedener Gewebe eingesetzt. Ziel der Chemotherapie ist die irreversible Inhibierung der Zellteilung mittels geeigneter Zytostatika. Da Tumorzellen eine deutlich höhere Proliferationsrate aufweisen als die meisten Normalgewebe, werden Tumorzellen bevorzugt durch Chemotherapie abgetötet. Es werden jedoch auch Zellen stark proliferierender Gewebe, wie der Schleimhäute oder des Knochenmarks eliminiert. Zytostatika können auch zytotoxisch und zytolytisch wirken (Erbar et al; 2002). Vor der Einführung der Chemotherapie betrug das 1-Jahres-Überleben (1-JÜR) im Falle einer Akuten Myeloischen Leukämie entsprechend dem natürlichen Verlauf der Erkrankung nur 2%. Mit dem Einsatz von Zytostatika werden 60-80 % der Patienten in Vollremission gebracht und 20-40% bleiben 5 Jahre rezidivfrei (Beckers; 2001); (Freund, 1999). Die Behandlungsmöglichkeiten von hämatologischen Neoplasien wurden durch die Myeloablative Therapie stark erweitert. Die Myeloablative Behandlung, d.h. die vollständige Elimination der Vorläuferzellen des Blut bildenden Systems, wurde erst in Verbindung mit anschließender Knochenmarktransplantation möglich.

Bei der perkutanen Strahlentherapie werden Tumorzellen gezielt durch Zufuhr von hochenergetischer, ionisierender γ -Strahlung, Elektronen, Röntgenstrahlung (kleine Hauttumore, oberflächliche Metastasen) und Strahlung von umschlossenen Radionukliden (Afterloading: ^{60}Co , ^{137}Cs und ^{192}Ir) inaktiviert. Sie wird als alleinige Therapie z.B. bei malignen Lymphomen oder dem Prostatakarzinom angewandt. In Kombination mit Chirurgie und Chemotherapie wird sie bei gynäkologischen, HNO- und vielen anderen soliden Tumoren angewandt. Circa 60-70% aller Patienten mit Malignomen werden im Verlauf ihrer Krankheitsgeschichte bestrahlt. Circa 30% aller Heilungen sind auf Strahlentherapie zurück zu führen (Kauffmann G. et al, 1996).

Radio- und Chemotherapie können in Verbindung mit chirurgischer Therapie neoadjuvant, intraoperativ oder adjuvant eingesetzt werden. Die neoadjuvante und adjuvante Anwendung ist sinnvoll, wenn der Tumor primär nicht resektabel ist oder noch ein mikroskopischer Rest des Tumors im Operationsgebiet verblieben ist (R₁-Resektion). Neoadjuvante Maßnahmen dienen zur Verkleinerung des Primärtumors und zur Senkung des lokoregionalen Rezidivrisikos. Im Fall des Ösophaguskarzinoms und des Rektumkarzinoms ist die Wirksamkeit nachgewiesen, bezüglich des Langzeitüberlebens liegen jedoch noch keine Ergebnisse vor (Junginger Th. et al; 2004). Zur Ausschaltung von okkulten Mikrometastasen werden Radio- bzw. Chemotherapie adjuvant eingesetzt. Beim Kolonkarzinom (Stadium II und III, UICC) ist die adjuvant durchzuführende Chemotherapie Teil der empfohlenen Standardtherapie (Harder und von Flie M.; 2001). Beim

Mammakarzinom konnte die radikale Mastektomie durch Einsatz der adjuvanten Strahlentherapie von Brust erhaltenden Operationsverfahren abgelöst werden (Hölzel et al, 2001). Die Radikalität des Operationsverfahrens bei malignen Weichteiltumoren an den Extremitäten konnte durch die Kombination mit Radiotherapie ebenfalls verringert werden (Rosenberg et al, 1982);(Junginger et al, 2001). Durch Kombination von Radio- und Chemotherapie werden synergistische, d.h. sich gegenseitig verstärkende, Effekte erzielt. Bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen gilt die präoperative Radiochemotherapie als empfohlene Standardtherapie (Budach et al, 1998). Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde bisher ausschließlich Radiochemotherapie angewandt. Chemotherapie kombiniert mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumorantigene ist ebenfalls Erfolg versprechend. So erwies sich die Anwendung von Bevacizumab (bindet am EGFR (epidermal growth factor receptor)) mit 5-Floururacil und Leukovorin an 104 Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom in einer randomisierten klinischen Studie überlegen gegenüber der alleinigen Anwendung von 5-Floururacil und Leukovorin (Kabbinar et al, 2003). Für Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinomen, die das Onkogen Her2/neu überexprimieren ist zusätzlich zur Chemotherapie mit Taxanen die Behandlung mit Trastuzumab (Handelsname Herceptin), einem AK gegen die Oberflächendomäne Her2 des Onkogens zugelassen. Die Therapie mit Trastuzumab in Verbindung mit Taxanen und einem Platinsalz (zweifache Chemotherapie) führte zur Verlängerung des Überlebens im Vergleich zur Behandlung mit Trastuzumab und einer Monochemotherapie (Luftner et al, 2005).

Alle hier vorgestellten Therapieformen sind nach wie vor in ihrem Einsatz limitiert.

Die Chirurgie gelangt an ihre Grenzen, wenn Tumore benachbarte Gewebe infiltrieren, die nicht reseziert werden können wie z.B. Gefäße, Nerven und lebenswichtige Organe.

Die Einsetzbarkeit der Chemotherapie wird durch die toxische Wirkung auf Epithelien im Gastrointestinaltrakt und Knochenmarkszellen begrenzt. So treten als unerwünschte Folgen der Chemotherapie Durchfälle, Immunschwäche, Blutungsneigung und peripherer Sauerstoffmangel auf. Außerdem wird der Behandlungserfolg von der Empfindlichkeit der Tumorentität gegenüber dem verwendeten Chemotherapeutikum bestimmt.

Für die Anwendbarkeit der externen Strahlentherapie sind die Strahlensensibilität des bestrahlten Tumors, sowie der angrenzenden Gewebe entscheidend. Durch exakte Berechnung und Festlegung der Strahlendosis im Bestrahlungsfeld wird versucht, die Wirkung auf anliegendes gesundes Gewebe zu minimieren.

Um den Erfolg der Therapie zu maximieren und die Nebenwirkungen gering zu halten, werden die drei aufgezeigten Behandlungsmodalitäten wie erwähnt auch miteinander kombiniert (multimodale Therapiekonzepte). Strahlentherapie wirkt dabei ausschließlich lokal, während zytostatische Therapie auch vereinzelte, bereits migrierte Zellen (Mikrometastasen) erfasst.

Zur weiteren Steigerung der Therapieeffizienz bzw. besseren Verträglichkeit werden supportive Therapien eingesetzt. Dazu gehören z.B. Hyperthermie, d.h. kurzzeitige Erwärmung des Tumors auf 42°C, zur Steigerung der Wirkung von externer Bestrahlung und Chemotherapie oder der Einsatz von Wachstumsfaktoren, der die Folgen der Myelosuppression ausgleichen soll.

1.2 Spezifische Tumorthérapien

Da die beschriebenen Therapien auch gesundes Gewebe schädigen, wird nach Therapieansätzen gesucht, die spezifisch nur Tumorzellen eliminieren. Solche Ansätze sind möglicherweise mittels Gentherapie und Immuntherapie umsetzbar.

Die Gentherapie nutzt das molekulare Wissen über die Entstehung von Tumoren. Dabei wird die Wirkung mutierter Gensequenzen, die für die Tumorgenese verantwortlich sind, durch Implementierung von genetischer Information mittels Vektoren ausgeglichen (Pschyrembel, 2005). Somit wird gezielt versucht, Tumorzellen abzutöten. Als Vektoren dienen u. a. Viren und Plasmide (Talmadge, 2004). Momentan befindet sich diese Therapieform im experimentellen Stadium, wird jedoch im Rahmen von Studien schon klinisch angewandt.

Als ein so genanntes „Selbstmordgen“ wird das Gen für die herpesvirale Thymidinkinase bezeichnet. Nach Implementierung des Gens in Tumorzellen werden diese selektiv durch Gabe von Ganciclovir abgetötet. Ganciclovir wird von allen Zellen aufgenommen, kann jedoch nur in Zellen mit viraler Thymidinkinase zum Monophosphat verstoffwechselt werden. Nachdem das Nucleosidanalogen von zellulären Kinasen zum Triphosphat phosphoryliert wurde, verursacht es nach Einbau in die DNA dort einen Abbruch. Die betroffenen Zellen sind dadurch teilungsunfähig. Diese Form der Gentherapie wurde bereits in einer Vielzahl von experimentellen Studien an Zellkulturen und an Tiermodellen erfolgreich eingesetzt. Als Beispiele seien die erfolgreiche Anwendung beim Prostatakarzinom (Sato et al, 2005) und Mammakarzinom (Gadal et al, 2004) genannt.

Im Fall des malignen Glioms konnte nach Einführung von toxischen Transgenen in die Erbsubstanz mittels Retroviren in einer klinischen Phase-III-Studie keine signifikante Verlängerung des Überlebens erreicht werden. Dies könnte mit der geringen Transduktionsrate in vivo oder mit der Applikationsstrategie der Retroviren zusammenhängen (Rainov und Ren, 2003). Die Implementierung der Gene für Interleukin (IL) 6 und des löslichen agonistischen Rezeptors führte beim malignen Melanom in einer polnischen Studie an 220 Patienten zu signifikant verlängertem Überleben. In mehr als 25 % der Fälle war die Therapie klinisch erfolgreich (Wysocki et al, 2002). Die Implementierung von Tumorsuppressorgenen verbessert möglicherweise die Empfindlichkeit im Hinblick auf Chemotherapie und Bestrahlung, wie in klinischen Studien über die Gentherapie beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom gezeigt werden konnte. Bezüglich der Effizienz von Vektoren, der Erforschung von Genen und

Kombinationsstrategien mit herkömmlichen Therapien sind die Grenzen der biotechnologischen Entwicklung in der Gentherapie noch nicht erreicht (Roth und Grammer, 2004).

Unter Immuntherapie werden Verfahren zur gezielten Auslösung immunologischer Reaktionen zusammengefasst. Bei der Tumorbehandlung wird die Immuntherapie durch Verabreichung von Antikörpern, von immunmodulatorischen Substanzen wie z.B. Zytokinen (IL 2, Interferon), von speziellen immunogenen Proteinen oder reifen dendritischen Zellen durchgeführt. Beim Non Hodgkin Lymphom (NHL) wird die Verabreichung von Antikörpern gegen CD20 (CD: cluster of differentiation) als Standardtherapie durchgeführt. Daneben findet die Hoch-Dosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation oder die Verabreichung von Antikörpern in Kombination mit Chemotherapie bzw. die Radioimmuntherapie mit ^{90}Y gekoppelten CD20-AK (Zevalin) Anwendung (Hennessy et al, 2004). Im Folgenden sind Beispiele der zahlreichen Entwicklungen, die sich noch in der experimentellen Phase befinden, beschrieben. An Metastasen von Melanomen werden Transkriptionsprofile genau untersucht, um durch die aktive Immunisierung kombiniert mit der systemischen Gabe von IL 2 die T-Zell-vermittelte Zerstörung von Tumorzellen zu ermöglichen (Wang et al, 2004). Die Behandlung von CEA-exprimierenden metastasierten Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes und der Lunge sei als weiteres Beispiel genannt. Hier werden die Patienten mit eigenen dendritischen Zellen, die ein von CEA abgeleitetes Peptid präsentieren, geimpft (Ueda et al, 2004). Die Impfung mit dendritischen Zellen, die mit Tumorlysat behandelt und mittels Tumornekrosefaktor α zum Ausreifen gebracht wurden, erfolgte auch an Patienten mit malignem Melanom im Stadium IV (Nagayama et al, 2003). Die Therapien zeigen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen, hemmen aber die Tumorprogression nur unzureichend. Abschließend kann festgehalten werden, dass vorrangig aktive Immunisierungen Gegenstand der Forschung zur Abtötung disseminierter Tumorzellen sind (Paukovits et al, 2004).

1.3 Therapie bei fortgeschrittenen Tumoren und Therapieresistenz

In Stadien ausgedehnter Tumorerkrankung führt auch die Anwendung von multimodalen Therapiekonzepten nur zu einer eingeschränkten Prognoseverbesserung, auch aufgrund der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Chemo- oder Strahlentherapie bei bestimmten Neoplasien. Das sei am Beispiel der Peritonealkarzinose beim Magenkarzinom näher ausgeführt. Bei 30-50% der Patienten im Rezidiv nach kurativer Gastrektomie ist eine Peritonealkarzinose zu diagnostizieren. Das durchschnittliche Überleben nach peritonealer Aussaat beträgt nur 5 Monate (Lee et al, 2003). Für die Patienten, deren Magenkarzinom primär nicht resektabel ist, wurde eine Prognoseverbesserung durch die Durchführung präoperativer Chemotherapie mit Cisplatin, 5-Fluorouracil und Leukovorin erreicht (Ott et al, 2003). Dagegen hat sich die postoperative Chemotherapie als nicht wesentlich Prognose verbessernd herausgestellt (Schuhmacher et al, 2001). Im Fall der Peritonealkarzinose führt die Kombination von lokaler Chemotherapie unter

Hyperthermie mit zellreduzierender Chirurgie zu einem medianen Überleben von 10 Monaten (Glehen et al, 2004). Trotz dieser Fortschritte in der Therapie des Magenkarzinoms ist eine nachhaltige Verbesserung der Prognose bei peritonealer Aussaat vorerst nicht erreichbar (Ott et al, 2003), u. a. weil sich ein Großteil der Neoplasien als chemoresistent erweist. Einen spezifischen Angriffspunkt zur Therapie können die molekularen Veränderungen in den Tumorzellen, die mit dem diffusen Magenkarzinom einhergehen, darstellen. Der diffuse Typ des Magenkarzinoms führt häufiger als der intestinale Typ zur Peritonealkarzinose. Ferner korreliert die Veränderung des E-Cadherin/beta-Catenin-Komplexes (Oberflächenmolekül bzw. integrale Proteine der Zellmembran) mit undifferenzierten Stadien und höhergradigen Stadien des Magenkarzinoms nach Borrmann. Die Veränderung des Beta-Catenins zeigt einen signifikanten Zusammenhang mit Lymphknotenmetastasierung, während der Beta-Catenin Wildtyp signifikant mit verbesserter Prognose einhergeht (Zhou et al, 2002). Fehlende Expression des Oberflächenmoleküls E-Cadherin kommt in 65% der diffusen Magenkarzinome vor (Chen et al, 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund geringer Effizienz bestehender Therapiemodalitäten im Falle fortgeschrittener Tumorerkrankungen und angesichts vieler potentieller molekularer Angriffspunkte (Onkogene, Tumorsuppressorgene und Tumorzellantigene) die Entwicklung neuer Therapien notwendig und viel versprechend erscheint.

1.4 Radionuklidtherapie

Erfolgreiche Ansätze zur Entwicklung spezifischer Behandlungsmethoden von malignen Erkrankungen finden sich in der Nuklearmedizin, wobei offene Radionuklide zur internen Bestrahlung eingesetzt werden. So lassen sich maligne Erkrankungen mittels Radioiodtherapie, Radiopeptidtherapie oder Radioimmuntherapie behandeln.

Bei der Radioiodtherapie mit ^{131}I und Radionuklidtherapie mit ^{89}Sr reichern sich die Radionuklide in Schilddrüsenzellen und Schilddrüsenkarzinomzellen (Ausnahme Calcitonin-produzierende Schilddrüsenkarzinomzellen) bzw. Knochen spezifisch an.

Die Radionuklidtherapie von Malignomen anderer Gewebe wird mit geeigneten Carriern (z.B. Antikörper) für die Nuklide durchgeführt. Dabei wird die unspezifische Bestrahlung von gesundem Gewebe minimiert.

Die Radiopeptidtherapie kann angewendet werden, wenn ein maligner Tumor einen Rezeptor über- bzw. exklusiv exprimiert, an den Nuklid-markierte Peptide selektiv binden.

Bei der Radioimmuntherapie werden Radionuklide an Antikörper (AK) gekoppelt, die am ausgewählten Tumorantigen selektiv binden. Die Kopplung der Radionuklide an die Antikörper erfolgt bei ^{131}I durch elektrophile aromatische Substitution an Tyrosin-Reste des AKs. Metallische Nuklide dagegen werden mittels geeigneter Chelate an AK gebunden. Aufgrund zahlreicher

Variablen, wie z.B. Transport der Konjugate zum Tumor, Bindungsverhalten der Konjugate, Verstoffwechslung der Konjugate und des Radionuklids, Tumorgröße, Retention im Tumor usw., gestaltet sich die Dosimetrie aufwendig. Bei der perkutanen Strahlentherapie ist dagegen die Berechnung der Dosis an Hand der Bestrahlungsgeometrie, der Eigenschaften der Strahlenquelle und der Gewebearten im Bestrahlungsfeld exakter durchzuführen.

Die klassische und häufigste Anwendung von Radionukliden zur Behandlung von Malignomen stellt die Therapie von Schilddrüsenkarzinomen mit ^{131}I dar, die 1946 von Seidlin, Marinelli und Oshry eingeführt wurde. ^{131}I ($t_{1/2}=8,02$ d) zerfällt mittels β^- (606 keV, 85%) und γ -Zerfall (365 keV, 15%), wobei die zytotoxische Wirkung nahezu ausschließlich vom β -Anteil ausgeht. Aufgrund spezifischer Anreicherung von ^{131}I im Schilddrüsengewebe und einer maximalen Reichweite der Strahlung von 2 mm im Gewebe, ist ein starker Dosisabfall außerhalb der Schilddrüse gewährleistet. Diese nebenwirkungsarme Therapie wird als Behandlungsmethode bei immunogener Hyperthyreose und autonomen Adenomen eingesetzt, wenn die thyreostatische Therapie nicht greift, oder Kontraindikationen zur Operation bestehen. Nach chirurgischer Resektion wird die Radioiodtherapie additiv beim Schilddrüsenkarzinom angewandt, um restliches Tumorgewebe beziehungsweise Metastasen zu abladien. Handelt es sich um nicht iod-speicherndes, malignes Gewebe, ist die perkutane Bestrahlung indiziert.

Weitere Anwendungen der Radionuklidtherapie sind die palliative Behandlung von Schmerzen bei Skelettmastasen mit ^{89}Sr , die intrakavitäre Therapie bei Pleura- oder Peritonealkarzinose mittels ^{90}Y -Silikat und die Radiosynoviorthese mit ^{90}Y , ^{186}Re und ^{169}Er bei rheumatoider Arthritis (Kauffmann G. et al, 1996). Diese Behandlungsmethoden werden jedoch im Vergleich zur Radioiodtherapie selten durchgeführt.

Peptid-Rezeptor-Systeme lassen sich sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie maligner Erkrankungen heranziehen.

Etabliert hat sich die Therapie von Somatostatinrezeptor-Typ 2 positiven neuroendokrinen Tumoren in inoperablen oder metastasierten Stadien mit radiomarkierten glykosylierten Peptidrezeptorliganden, wie z.B. [^{90}Y] DOTA-TOC (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-Tyr(3)]octreotide) oder [^{177}Lu] DOTA-TOC (Kwekkeboom et al, 2005). Die Therapie bewirkt teilweise bzw. komplette Remission, sowie die Reduzierung der Schmerz- und Karzinoidsymptomatik. Da sich die markierten Peptide in der Niere anreichern, wirken sie auch nephrotoxisch. Mittels Nephroprotektiva kann diese Nebenwirkung kontrolliert werden. Die übrigen Nebenwirkungen sind Erbrechen unmittelbar nach der intravenösen Injektion bei 23 % und Panzytopenie bei 5 % der Patienten.

Weitere geeignete Rezeptoren, die von malignen Tumoren exprimiert werden und an die Radionuklid-gekoppelte Liganden binden, sind: Somatostatinrezeptor Typ 1 (Bronchialkarzinoid,

Sarkom, Prostatakarzinom und Insulinom), der Rezeptor für den Subtyp VPAC 1 des pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (Neuroendokrine Tumore), der Rezeptor für Vasoaktives intestinales Peptid (Adenokarzinom, kleinzelliges Bronchialkarzinom) und Cholezystokininrezeptor-Subtyp 2 (medulläres Schilddrüsenkarzinom, Insulinom, Vipom, Bronchialkarzinoid und Astrozytom).

Tumorzellen, die bestimmte Antigene überexprimieren oder exklusiv exprimieren, können mittels Radionuklid-gekoppelter Antikörper gezielt abgetötet werden.

Aufgrund der enormen Fortschritte in der Erforschung molekularer Mechanismen der Karzinogenese ist heute eine Vielzahl von tumorassoziierten Antigenen bekannt. Es seien nachfolgend nur diejenigen Antigene aufgeführt, die bereits Gegenstand klinischer Forschung im Hinblick auf Radioimmuntherapie sind (Goldenberg, 2002).

Hämatologische Neoplasien exprimieren z. B. CD-Antigene (CD: cluster of differentiation), die verschiedene Typen und Differenzierungsstadien von Lymphozyten charakterisieren. NHL exprimieren verstärkt CD20, CD22 oder HLA-DR (Histokompatibilitätsantigen) auf der Zelloberfläche. Im Fall der myeloischen Leukämie werden CD33 und NCA95 überexprimiert und daher als Zielstruktur für Antikörper bei der Radioimmuntherapie genutzt.

Für die Radioimmuntherapie solider Tumore wurden Antikörper gegen folgende Antigene eingesetzt:

- CEA (Karzinoembryonales Antigen) beim medullären Schilddrüsenkarzinom, Ovarialkarzinom, Bronchialkarzinom und Kolorektalen Karzinom
- Tenascin und EGFR beim malignen Gliom
- MUC1 (epitheliales Muzin 1) beim Ovarialkarzinom, Mammakarzinom und Blasenkarzinom
- TAG-72 (Glykoprotein von Adenokarzinomen) beim Ovarialkarzinom, Kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom und Prostatakarzinom

Maligne Gliome exprimieren häufig Tenascin, ein extrazelluläres Matrix-Glykoprotein. Anti-Tenascin-AK, mit ^{90}Y oder ^{131}I markiert, dienen zur intrakavitären, lokoregionalen Radioimmuntherapie bei malignen Gliomen in Verbindung mit chirurgischer Resektion, externer Bestrahlung und Chemotherapie. Bei der intrakavitären lokoregionalen Radioimmuntherapie wurde in klinischen Studien ein verlängertes Überleben (medianes Überleben von 79 Wochen) im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe (medianes Überleben ca. 40 Wochen, verwendete Therapien: konventionelle Strahlentherapie und Chemotherapie) verzeichnet (Goetz et al, 2003; Reardon et al, 2002). Für die gleiche Indikation stehen ^{211}At -gekoppelte AK zur Verfügung, die wegen der Reichweite der α -Strahlung im Bereich von wenigen Zelldurchmessern im Hinblick auf die Toxizität für das übrige Gehirngewebe viel versprechend sind (Zalutsky et al, 2001).

Radionuklide zur Therapie

Als Radionuklide für eine spezifische Therapie, mit der selektiv Tumorzellen eliminiert werden sollen, eignen sich α - und β -Emitter, deren Strahlung eine maximale Reichweite von wenigen mm aufweist. Für die Behandlung von soliden Tumoren mit Knötchen im mm-Bereich werden in der Regel β -Emitter eingesetzt. α -Strahler eignen sich aufgrund ihrer relativ geringen Reichweite von ca. 100 μm für die Therapie von intrakavitären Tumorzellclustern und Einzelzellen. Einige α - und β -Emitter emittieren zusätzlich γ -Strahlung, die zur Diagnostik und Dosimetrie verwendet werden kann. Die γ -Komponente verschiedener Strahler (z.B. ^{131}I , ^{213}Bi) ermöglicht zu dem die Lokalisation der Nuklide im Körper mittels Szintigrafie.

β -Emitter

^{131}I ist der am häufigsten verwendete β -Emitter. Die Anwendung zur Radioiodtherapie der Schilddrüse entspricht dem heutigen Standard. Im Rahmen der Radioimmuntherapie ist ^{131}I gekoppelt an AK, gerichtet gegen CD20, zur Therapie des NHL in den USA zugelassen. Die zusätzliche Aussendung von γ -Strahlung von ^{131}I wird zur Dosimetrie und Therapieplanung genutzt.

Die leicht durchführbare Bindung von ^{131}I an Antikörper mittels der Iodogenmethode stellt einen Vorteil für die Radioimmuntherapie dar. Das metallische Nuklid ^{90}Y , als reiner β -Emitter, und weitere metallische β -Strahler mit zusätzlicher γ -Emission wie z.B. ^{188}Re , ^{186}Re , ^{67}Cu und ^{177}Lu werden mittels Chelatierung an AK gekoppelt und zur Radioimmuntherapie von Tumoren (NHL, Blasenkarzinom und Ovarialkarzinom) in klinischen Studien erprobt (Goldenberg, 2002). Die wichtigsten Daten dieser β -Emitter sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ausgewählte Eigenschaften einiger therapeutisch eingesetzter β -Strahler

Nuklid	Halbwertszeit (h)	Zerfallsenergie (MeV)	Maximale Reichweite in Gewebe (mm)
^{188}Re	17	2,1	11,0
^{131}I	193	0,6	2,0
^{177}Lu	161	0,5	1,5
^{186}Re	91	1,1	5,0
^{67}Cu	62	0,6	1,8
^{90}Y	64	2,3	12,0

Klinische Anwendung von ^{131}I und ^{90}Y bei der Therapie des NHL

Die Radioimmuntherapie beim NHL hat sich in mehr als zwanzig Jahren von experimentellen Anfängen bis zur klinischen Anwendung im Routinebetrieb entwickelt. Das Oberflächenantigen CD20 dient dabei als Angriffspunkt für radiomarkierte Antikörper.

Das NHL hat in Deutschland eine Inzidenz von 5-10/100.000 Einwohnern jährlich, wobei die Häufigkeit zunimmt. 80-85% dieser Lymphom-Entität betreffen die B-Zellreihe, davon sind über 90% CD20 positiv und können mit Radioimmuntherapie behandelt werden (Wood, 2001).

Die radiomarkierten Antikörper sind ^{90}Y ibritumomab (Zevalin) und ^{131}I tositumomab (Bexxar). In Deutschland ist bisher nur Zevalin zugelassen. Beide Substanzen zeigen Erfolg versprechende Resultate an Patienten mit NHL im Vergleich zu bisher angewendeten Therapien. Bexxar verlängerte die Dauer der Remission im Vergleich zur alleinig angewendeten Chemotherapie. Bei 54-71% der Patienten zeigte die Therapie Erfolg, im Fall der neu diagnostizierten Erkrankungen, ohne bisherige Vortherapie, war in 63% der Fälle eine komplette Remission zu verzeichnen (Vose, 2004).

Die Standardtherapie beim hochmalignen B-Zell-NHL, dessen Krankheitsverlauf ohne Therapie nach Wochen bis Monaten tödlich endet, ist nach wie vor Chemotherapie in Kombination mit Strahlentherapie. Die Behandlungsmöglichkeiten des hochmalignen NHL wurden durch die Option der hochdosierten Chemotherapie zur Myeloablation in Verbindung mit der autologen Stammzelltransplantation Mitte der neunziger Jahre erweitert. Weitere Ergänzungen der Therapie aller B-Zell-NHL stellen seit 1997 die Immuntherapie mit Rituximab (humaner MAK gegen CD20) und der Einsatz von den bereits erwähnten ^{131}I - und ^{90}Y -gekoppelten Antikörpern dar (Hennessy et al, 2004).

Die Radioimmuntherapie mit ^{90}Y -ibritumomab und die Immuntherapie mit Rituximab wurden in einer klinischen Studie an Patienten mit rezidivierendem bzw. nicht ansprechendem niedrigmalignen NHL miteinander verglichen (Witzig et al, 2002). Es zeigte sich, dass die Therapie mit ^{90}Y -ibritumomab der Immuntherapie mit kaltem AK bezüglich der Ansprechrate (80 bzw. 56%) als auch bezüglich der medianen Dauer der Remission (14 bzw. 12 Monate) signifikant überlegen war. Die nach der Behandlung mit Radioimmunkonjugaten auftretende Myelosuppression erwies sich als reversibel.

α -Emitter

α -Emitter geben ihre hohe Energie ($> 3 \text{ MeV}$) auf einer Strecke von 80-100 μm ab, was zu einem hohen linearen Energietransfer (LET) von ca. 100 $\text{keV}/\mu\text{m}$ (zum Vergleich LET von ^{90}Y : 0,2 $\text{keV}/\mu\text{m}$) führt. Daher induzieren α -Partikel in hohem Maße Doppelstrangbrüche in der DNA, die für die Zellen aufgrund fehlerhafter Reparatur oft letal sind.

Seit den 70iger Jahren wird die Abtötung von Säuger-Zellen durch α -emittierende Radionuklide wie z.B. ^{241}Am , ^{239}Pu und ^{226}Rn untersucht. Anfang der 80iger Jahre standen die Effekte von α -Strahlern auf den Zellzyklus (Hieber et al, 1981), auf die Induktion von Knochensarkomen (Taylor et al, 1983) und die Wirkung auf Blutzellen (Purrott et al, 1980) im Fokus der Untersuchungen. Bereits 1988 wurde mit ^{212}Bi erstmals ein α -Strahler zur intraperitonealen Radioimmuntherapie im Tierversuch eingesetzt. Dazu wurde ein monoklonaler IgM-AK verwendet, der spezifisch das murine T-Zell Antigen Thy 1.2 auf neuroektodermalen Oberflächen erkennt (Macklis et al, 1988).

Die Verfügbarkeit von α -Emittern wurde verbessert und es wurde intensiv daran gearbeitet, die Kopplung der Radionuklide an Antikörper (u.a. Chelatchemie) zu optimieren (Chappell et al, 2000)(Nikula et al, 1995); (Milenic et al, 2001). Aktuell werden als α -Emitter ($t_{1/2}$) mit passenden Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) Nuklide wie ^{213}Bi (45 min) und ^{211}At (7,2 h) in der klinischen Forschung verwendet. ^{225}Ac (10 d) ist das Mutternuklid von ^{213}Bi , das in den vorliegenden Untersuchungen zur Anwendung kam. ^{225}Ac wurde bisher nur in experimentellen Studien verwendet (Miederer et al, 2004).

Die therapeutische Effizienz eines ^{225}Ac -markierten AKs trastuzumab, gerichtet gegen das Onkogen her2/neu, wurde in einem Mausmodell mit intraperitonealem Ovarialkarzinom sowie an Spheroiden aus Mammakarzinomzellen untersucht. Im Mausmodell bewirkte die Therapie mit ^{225}Ac -trastuzumab (8-17 kBq) eine Verdreifachung der Überlebensdauer im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Borchardt et al, 2003). Das Volumen von Zell-Sphäroiden konnte mit Aktivitätskonzentrationen von 1-18 kBq/ml maximal auf die Hälfte reduziert werden (Ballangrud et al, 2004).

Die Therapie mit ^{213}Bi -markierten Antikörpern (7,4 MBq) gegen mutiertes E-Cadherin an Magenkarzinomzellen im Mausmodell der Peritonealkarzinose zeigte eine signifikante Überlebensverlängerung gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (Huber et al, 2003).

Erste klinische Studien mit ^{213}Bi -195 HuM-AK gegen CD33 exprimierende Zellen wurden schon an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie bzw. chronischer myelomonozytischer Leukämie durchgeführt (Jurcic et al, 2002). Mit der beschriebenen Therapie konnte in 93% eine Reduktion der zirkulierenden Blasten und in 78% eine Reduktion des Prozentsatzes der Blasten im Knochenmark erreicht werden.

Viel versprechend erscheint die Anwendung von ^{211}At -gekoppeltem AK gegen das Tumorantigen MOv18 im Mausmodell des Ovarialkarzinoms. Die Therapie reduzierte im Tierexperiment Aszites sowie Tumorwachstum und zeigte eine Verlängerung der Überlebenszeit ohne toxische Nebenwirkungen (Andersson et al, 2003).

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zytotoxizität von ^{213}Bi -Immunkonjugaten gegen ein tumorspezifisches Antigen in vitro zu analysieren und zu quantifizieren.

Als Zielstruktur für den verwendeten Antikörper (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) diente ein mutiertes E-Cadherin Zelladhäsionsmolekül mit Deletion von Exon 9 ($\Delta 9$ -E-Cadherin). Der α -Emitter ^{213}Bi wurde mittels des Chelators SCN-CHX-A-DTPA an anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin gekoppelt. Zur Quantifizierung der unspezifischen Wirkung wurden einerseits WT-E-Cadherin-exprimierende Zelllinien (L 929 WT, MDA WT) mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin, andererseits $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierende Zelllinien (L 929 $\Delta 9$, HSC, MPE-600) mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin (unspezifisch) inkubiert. Die spezifische Wirkung wurde nach Applikation von ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten an allen $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierenden Zelllinien quantifiziert.

Die zytotoxische Wirkung der ^{213}Bi -Immunkonjugate wurde mittels klonogener Tests quantifiziert. Die Untersuchung ^{213}Bi -induzierter Chromosomenaberrationen diente dazu, das Ausmaß von mikroskopisch sichtbaren Schäden in der Erbsubstanz der behandelten Zellen zu ermitteln.

Als mögliche Einflussfaktoren auf die Zytotoxizität wurden die Anzahl der $\Delta 9$ -E-Cadherin-Moleküle pro Zelle sowie die Bindung an die Zelloberfläche bzw. die Internalisierung der ^{213}Bi -Immunkonjugate untersucht.

Zur Abschätzung der jeweiligen ^{213}Bi -Dosis wurde ein vereinfachtes Modell erstellt, in dem die Absättigung der Antigene ($\Delta 9$ -E-Cadherine) in Abhängigkeit von der Konzentration der ^{213}Bi -Immunkonjugate berücksichtigt wurde.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Lösungen, Kits und Antikörper

Chemikalien:

Natriumazid (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumchlorid p.A. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

pH-Streifen (Merck)

Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA) (Sigma)

NaOH

Glycin (Merck)

Lösungen:

Gesättigte Methylene-Blau-Lösung (99prozentiger Alkohol (23%), KOH (1%), 4 Wochen gereift bei 37°C)

Glycinpuffer für Internalisierungsversuche: 50 mM Glycin, 150 mM NaCl (pH 2,8)

Waschpuffer für Internalisierungsversuche: 28 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl (pH=3)

Salzlösung CASYton (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) zur Verdünnung von Zellsuspensionen zur Bestimmung der Zellzahlen

Durchflußzytometrie (FACS-Analyse):

SHE-AK: AK murinen Ursprungs, der E-Cadherin erkennt (Takara, Genevilleiers, Frankreich)

Anti-Maus IgG, FITC-markiert (Sigma)

DAKO Quifikit®, Kit zur Quantifizierung von Antigenbindungsstellen (DAKO, Glostrup, Dänemark)

Isoton II (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

Waschpuffer : 0,1 % Natriumazid, 0,1 % BSA in PBS

1%ige BSA-Lösung in PBS

Elution von ²¹³Bi:

Natrium-Jodid ACS Reagent (Sigma)

Suprapur®30%ige HCl (Merck)

L-Ascorbinsäure (Sigma)

Ammoniumacetat (Sigma)

Trinatriumcitrat (Merck)

Chelating-Resin (Iminodiacetic Acid) Chelex 100 (Sigma)

Herstellung von Chromosomenpräparaten:

Hypotone Lösung: 25% HANK'S Salzlösung (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Fixativ: 25% Essigsäure, 75% Methanol

Giemsa-Färbelösung : Gurr® (BDH laboratory supplies, Pooles, England), 1:20 verdünnt in Weise-Puffer

Weise-Puffer: Kaliumdihydrogenphosphat (7mM) und Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck) (16mM) in 1000 ml Aqua dest. (pH 7,2)

Mitosegift Colcemid

Proteinbestimmung:

„BioRad protein assay Kit“ (Bio-Rad Laboratories Incorporation, Hercules, USA)

Antikörper:

CY-3-markierter Sekundär-AK (Ziegen-Ig gegen Ratten-IgG), (Chemicon International, Temecula, USA) zur Detektion von Ratten-IgG Primär-AK (anti- $\Delta 9$ - und anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin)

3.1.2 Zellkulturmedien und Lösungen für die Zellkultur

Sämtliche Lösungen für die Kultivierung von Zellen wurden von Biochrom bzw. Gibco BRL

Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen:

Fetales Kälberserum (FKS), Charge 611A

PBS

Medium für MPE 600:

Medium 199 mit EARLE'S Salzen mit 2,2 g/l NaHCO_3 und N-acetyl-L alanyl-Glutamin (stabilem Glutamin) + 10% FKS + Glucose (3,6 g/l) + Insulin (9 mg/l)

Medium für MDA $\Delta 9$, L929 $\Delta 9$, MDA WT und L 929 WT:

DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO_3 und stabilem Glutamin (DMEM) +10% FKS + 91 I.E. Penicillin und 91 mg/ml Streptomycin (P/S) +Genitacin (1 g/l)

Medium für HSC und HTB-135:

DMEM+10% FKS +P/S

3.1.3 Verbrauchsmaterial

cellstar (greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland):

-Beschichtete Zellkulturflaschen aus Polystyren mit und ohne Filterkappe, 175 cm² (550 ml), 75 cm² (250 ml) und 25 cm² (50 ml) steril verpackt

- Well-Gewebekulturplatten, beschichtet und steril verpackt
- 5 ml PS-Rundbodenröhrchen
- 15 ml Zentrifugen-Röhrchen mit Spitzboden

Corning Inc. (New York, USA):

- Petrischalen: 60mm x15mm mit Zählgitter, Kantenlänge 2mm
- Zellkulturflaschen in Dreiecksform, 25 cm²
- Zellkulturflaschen, 25 cm², mit Filterkappe
- 50 ml Zentrifugen-Röhrchen mit Spitzboden

-tissue-culture-Röhrchen, 10 cm², (Techno Plastic Product AG, Trasadingen, Schweiz)

-Deckgläser (18 mm x 18 mm)

-Objektträger

-Eppendorf cups

-ITLCTM-SG Papier für Chromatographie (Gelman Sciences, Ann Arbor, USA)

-PD-10 Säulen (SephadexTM G 25M) (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

-Glaswolle

-Filmmaterial: Farbfilm ISO 400/24° (Kodak), Schwarzweißdiafilm Scala ISO 200/ 24° (Agfa)

3.1.4 Geräte

Auflichtmikroskop Axiovert 10 mit Fluoreszenzeinrichtung (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Zellzählgerät CASY-1 (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland)

Brutschrank Heraeus 6000 (Heraeus, Hanau, Deutschland)

LaminAir® HB 2472 Flow Bank (Heraeus)

Megafuge 1.0 (Heraeus)

Trockenschrank (Heraeus)

ELISA-Reader (Behring Diagnostika, Frankfurt a. Main, Deutschland)

Photometer UVIKON 931 (Kontron Instruments, Mailand, Italien)

γ-Counter 1480 Wizard TM 3 (Wallac, Turku, Finnland)

Analysenwaage LA 230 S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Feinwaage BL 1500 S (Sartorius)

Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland)

Epics XL FACS (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)

Milli-Q UF-Plus Membrapure (Millipore, Billerica, Mass., USA) zur Herstellung von entionisiertem Wasser

¹³⁷Cs-Strahlenquelle 0,7 Gy/min in 10/2001 (GSF GmbH, Neuherberg, Dosisleistung von ca. 0,7 Gy/min)

Kleinbild-Spiegelreflexkamera X 300 S (Minolta, Unterföhring, Deutschland)

3.1.5 Software

SigmaPlot (Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA)

SAS-Statistik-Paket, (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)

3.1.6 Zellen

Es wurden acht adhärenzte Zelllinien verwendet.

Fünf davon wurden am Institut für Pathologie der Technischen Universität München stabil transfiziert (Handschuh et al, 1999):

- MDA-MB-435S WT (MDA WT), humanes duktales Mammakarzinom, transfiziert mit WT-E-Cadherin
- MDA-MB-435S Δ9 (MDA Δ9), humanes duktales Mammakarzinom, transfiziert mit Δ9-E-Cadherin
- MDA-MB-435S Δ8 (MDA Δ8), humanes duktales Mammakarzinom, transfiziert mit Δ8-E-Cadherin
- L 929 Δ9, murine Fibroblasten, transfiziert mit Δ9-E-Cadherin
- L 929 WT, murine Fibroblasten, transfiziert mit WT-E-Cadherin

- HTB-135 (ATCC number), auch bekannt unter HS 746 T, humanes Magenkarzinom
- MPE-600, humanes Mammakarzinom mit Δ9-E-Cadherin-Expression
- HSC M2-45 (HSC), humanes Magenkarzinom (Siegelringzellen) mit Δ9-E-Cadherin-Expression

3.1.7 Tumorspezifische Antikörper

Die monoklonalen IgG_{2a} Antikörper (MAK) anti-Δ9-E-Cadherin (6H8-Klon) und anti-Δ8-E-Cadherin (7H1-Klon) wurden wie bei Becker beschrieben an der GSF hergestellt (Becker et al, 1999b);(Becker et al, 1999a). Die spezifischen Antikörper anti-Δ9-E-Cadherin und anti-Δ8-E-Cadherin sind respektive gegen E-Cadherin mit Deletion des Exons 9 bzw. Deletion des Exons 8 gerichtet. Diese durch Mutation veränderten E-Cadherine konnten an Magenkarzinomen des diffusen Typs nachgewiesen werden, während sie an nicht entarteten Referenzgeweben nicht nachweisbar waren (Becker et al, 1994). Die Chelatierung der MAK mit SCN-CHX-A''-DTPA -

Voraussetzung für die Markierung mit ^{213}Bi - wurde am Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe durchgeführt (Nikula et al, 1995).

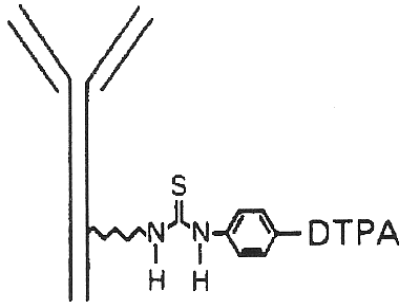


Abbildung 1: Schematisch dargestellte Bindung des Chelats SCN-CHX-A''-DTPA an den AK

Abbildung 1 zeigt schematisch die Bindung des Chelats an den MAK (Mirzadeh et al, 1990). Die DTPA-Gruppe des Moleküls bindet das ^{213}Bi -Ion, während die Isothiocyanatgruppe die Verbindung zu einer Lysinseitenkette des MAK herstellt. Pro AK-Molekül sollten ca. 3 Chelatmoleküle zufällig über Lysinreste gekoppelt werden.

Von jedem chelatierten MAK wurden die in Tabelle 2 zusammengefassten Chargen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Chargen chelatiertes MAK

MAK	Charge	Proteinkonzentration (mg/ml)
6H8	1	4,2
6H8	2	4,0
6H8	3	2,6
6H8	4	12,8
7H1	5	1,8
7H1	6	14,5
7H1	7	7,6
6H8	8	6,1
6H8	9	1,3

3.1.8 Radionuklide

$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem (370-600 MBq) zur Gewinnung von ^{213}Bi (Institut für Transurane der Europäischen Kommission, Karlsruhe)

$^{111}\text{In Cl}_3$ (Mallinckrodt, Petten, Holland)

^{125}I (Mallinckrodt, Petten, Holland)

3.2 Zellkultur

3.2.1 Morphologie der verwendeten Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien unterschieden sich hinsichtlich der erforderlichen Kulturbedingungen ebenso wie hinsichtlich ihrer Morphologie. Die Identität der Zellen wurde regelmäßig mikroskopisch überprüft. Die Expression von $\Delta 9$ - bzw. WT-E-Cadherin wurde in größeren Zeitabständen mittels Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) oder Immunfluoreszenz überprüft. Die Zelldichte und der Vitalitätsgrad der Zellen wurden mikroskopisch beurteilt.

Die Abbildungen 2-5 zeigen die adhärenenten Zelllinien in Kultur, bei guter Vitalität und geringer Zelldichte. In Tabelle 3 sind gemittelte Daten des Zellzählgerätes bezüglich Zellvolumen und Zelldurchmesser von Zellen in Suspension dargestellt. In Suspension nach dem Ablösen mittels EDTA zeigen die Zellen kugelförmige Morphologie.

Tabelle 3: Zellvolumen und Zelldurchmesser einiger verwendeter Zelllinien in Suspension (gemittelte Daten des Zellzählgerätes)

Zelllinie	Zellvolumen (Mittelwert \pm SD in pl)	n	Zelldurchmesser in μm
HTB-135	4,5 \pm 0,54	4	20,5
HSC	3,0 \pm 0,82	16	17,9
L 929 $\Delta 9$	0,98 \pm 0,14	14	12,3
L 929 WT	0,86 \pm 0,10	13	11,8

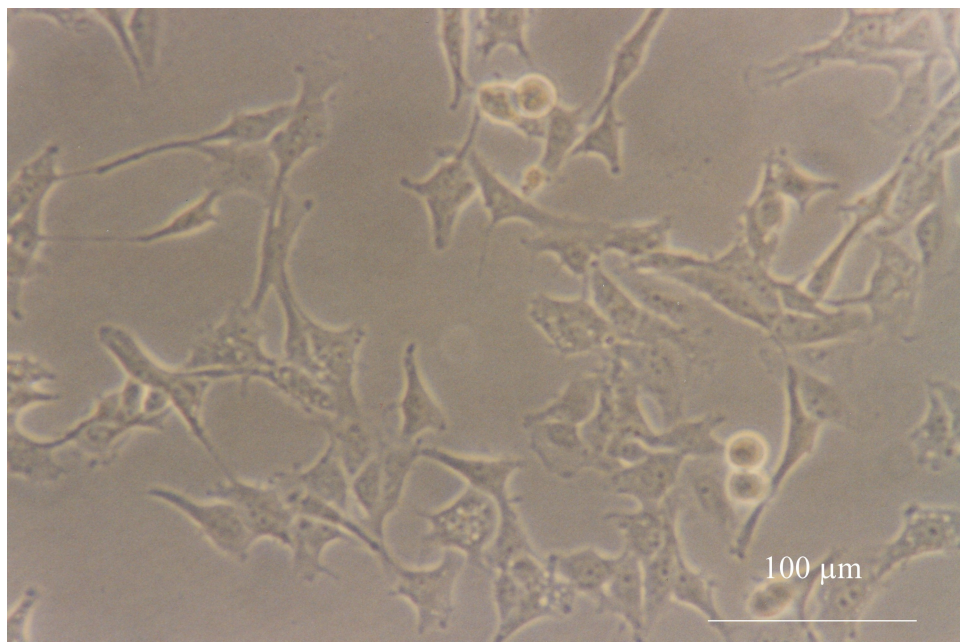


Abbildung 2: HTB-135, 200-fach

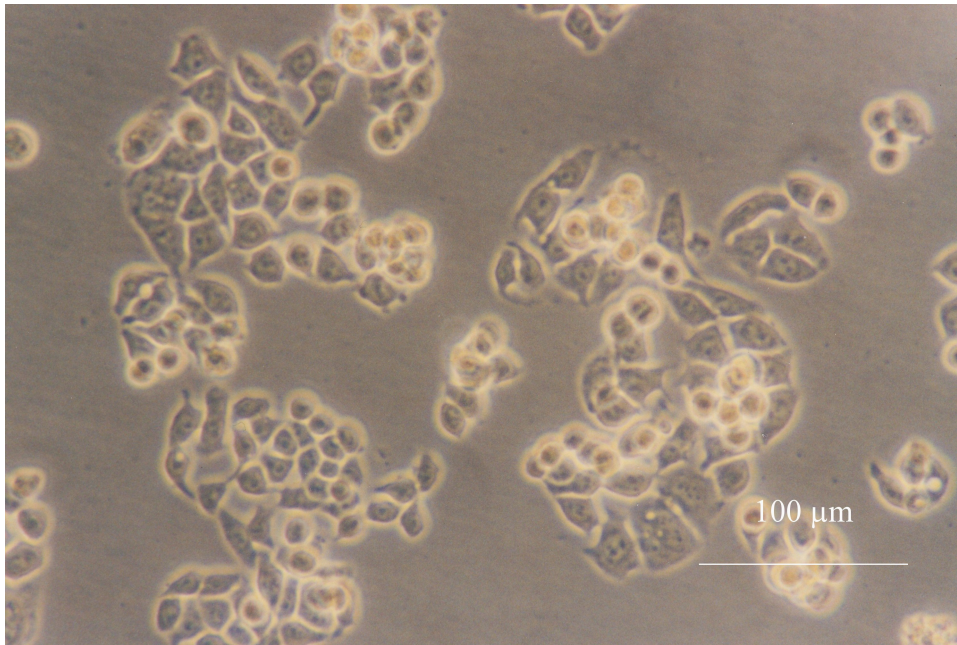


Abbildung 3: HSC, 200-fach

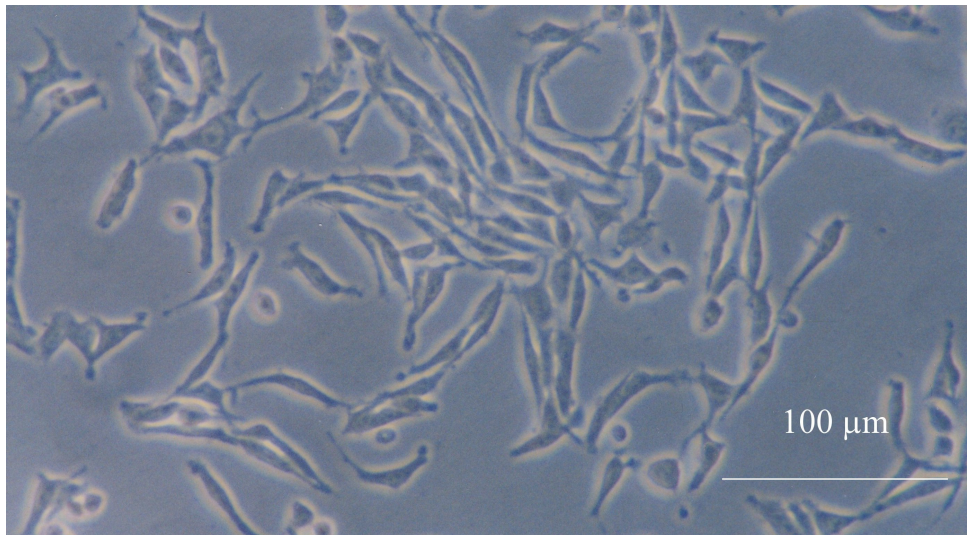


Abbildung 4: L 929 WT, 200-fach

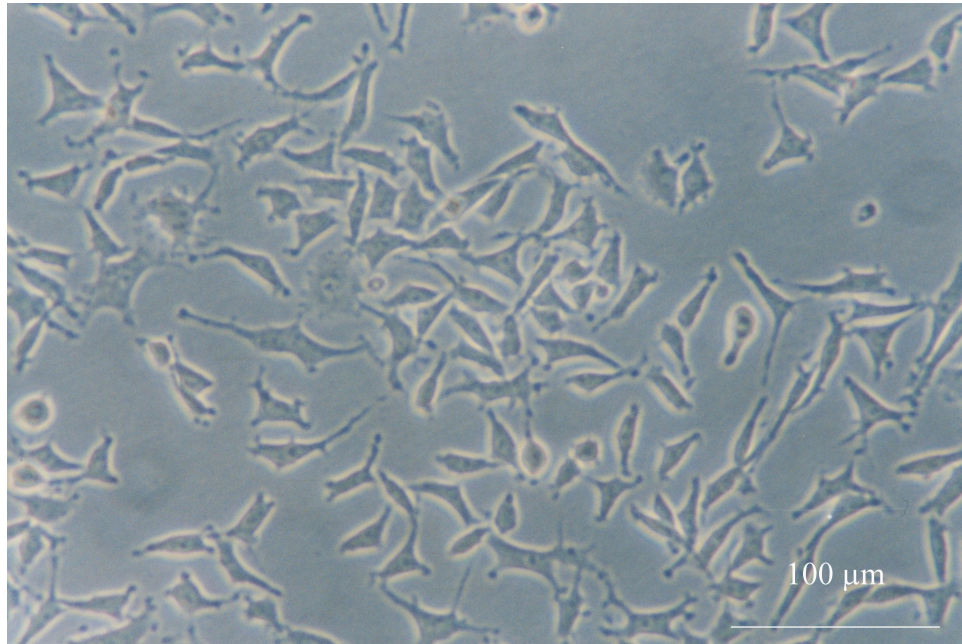


Abbildung 5: L 929 A9, 200-fach

3.2.2 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂-Sättigung gezüchtet. Bei gelblicher Verfärbung des Mediums aufgrund von Substratmangel bzw. Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte wurde das Medium erneuert bzw. wurden die Zellen abgelöst und in neue Zellkulturgefäße umgesetzt.

3.2.3 Ablösen und Zählen der Zellen

Alle Schritte zur Prozessierung der Zellen wurden unter einer LaminAir® Flow Bank (Heraeus) mit vorgewärmten Lösungen und Nährmedien durchgeführt. Vor dem Ablösen wurden die Zellen einmal mit PBS gespült, um Calcium-Reste aus dem Medium und Detritus zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit ca. 6 ml (175 cm²-Flasche) 1 mM EDTA in PBS für ca. 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Klopfen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 6 ml Medium für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Aliquots der Zellsuspension in isotoner Salzlösung verdünnt und im Zellzählgerät gezählt.

3.3 Bestimmung von Verdopplungszeit und optimalen Proliferationsbedingungen

Die Zellproliferationsgeschwindigkeit ist zelllinienspezifisch und abhängig von der ausgesäten Zellzahl pro Fläche. Sie wurde mittels Bestimmung der Zellzahl zu verschiedenen Zeiten nach Aussaat ermittelt.

Die optimalen Proliferationsbedingungen wurden mit klonogenen Tests untersucht. Dabei wurden 20-1.200 Zellen pro Well ausgesät und Klone, bestehend aus 50-100 Zellen, 8-20 d später mikroskopisch ausgezählt.

3.3.1 Ermittlung der Verdopplungszeit

Zu diesem Zweck wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen der Zelllinien HSC, L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, MDA $\Delta 9$ und MDA WT in 15 ml Medium in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät. In täglichem Abstand wurden die Zellzahlen bis 10 d nach Aussaat bestimmt. Als Ausgangswert diente die Zellzahlbestimmung nach 24 h. Dieser Wert berücksichtigt den jeweiligen Zellverlust beim Ablösen der Zellen bzw. nicht vitale Zellen, die nach Aussaat nicht wieder adhärent werden.

Alternativ wurde die Verdopplungszeit auch nach Aussaat von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen der Zelllinien HSC, L 929 $\Delta 9$, MDA $\Delta 9$ und MDA WT in 5 ml Medium in tissue-culture-Röhrchen mit 10 cm² Fläche ermittelt.

3.3.2 Beeinflussung der Klonogenität durch Veränderung der Wachstumsbedingungen

Der Einfluss unterschiedlicher Bedingungen wurde jeweils an Hand der plating efficiency (PE) untersucht. Die PE als Maß für die Klonogenität gibt den Anteil der ausgesäten Zellen wieder, der Kolonien bildet. Bei der Auswertung ist folgendes zu beachten: Ein Klon sollte mindestens aus 50 Zellen bestehen. Die Zuordnung der Zellen zu Klonen sollte eindeutig möglich sein. Die Klone sollten untereinander nicht konfluieren.

Mediumwechsel nach 24 h

Bei 40, 80, 120 und 160 Zellen/Well der Zelllinie HSC wurde 24 h nach Aussaat in 24-Well-Platten in je 6 Wells pro Ansatz das Medium erneuert und in den anderen 6 Wells nicht. Die Anzahl der Klone wurde nach 8 d bestimmt. L 929 WT wurden in Anzahlen von 40, 80, 120 und 200 Zellen/Well eingesät und ebenso in jeweils 6 Wells ein Mediumwechsel durchgeführt/bzw. nicht durchgeführt. Die Ansätze wurden nach durchschnittlich 10 d ausgewertet.

Zugabe von Pyruvat zum Kulturmedium

An Hand von MDA WT und MDA $\Delta 9$ wurde die Klonogenität bei Verwendung zweier verschiedener Medien verglichen. Zum einen wurde Kulturmedium ohne Pyruvat verwendet, zum anderen wurde Kulturmedium versetzt mit 110 mg/l Pyruvat zu den Zellen gegeben. Pyruvat wird Zellkulturmedien zugesetzt um die Kultivierbarkeit und Vitalität von Zellen positiv zu beeinflussen. Das Endprodukt der Glykolyse ist Substrat für die Glukoneogenese (Kohlenhydratstoffwechsel) sowie den Citratzyklus (Fettstoffwechsel). Dieses Experiment wurde in 96-Well-Platten (5-25 Zellen/Well MDA $\Delta 9$), sowie in 24-Well-Platten (30-200 Zellen/Well MDA $\Delta 9$ und MDA WT) durchgeführt und nach 15 d (MDA-WT) bzw. 20 d (MDA $\Delta 9$) ausgewertet.

Verwendung von konditioniertem Medium

Konditioniertes Medium bezeichnet Medium, das nach 2 d aus einer Kulturflasche mit adhärenen Zellen gewonnen und mittels Zentrifugation geklärt wurde. Jeweils drei Ansätze mit Zellzahlen von 200, 300, 400, 600, 900 und 1.200 HTB-135 pro Well in 24-Well-Platten wurden mit Normalmedium und jeweils drei Ansätze mit konditioniertem Medium behandelt. Die Auswertung fand 11 d nach Aussaat statt.

3.4 Das $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator-System zur Gewinnung von ^{213}Bi

Das $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem wurde vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission (Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

3.4.1 Aufbau

Das $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem ist folgendermaßen aufgebaut (Apostolidis et al, 2001): In einer Säule aus Fluorpolymer (5,5 cm x 0,64 cm) ist in saurem Milieu (1,5 M HCl) ^{225}Ac an das Kationen-Austauscherharz AGMP-50 gebunden. Damit möglichst wenig ^{225}Ac bei der Elution von ^{213}Bi verloren geht, befindet sich das ^{225}Ac am Ende des zuführenden Schlauchs der Säule. Sollte sich ^{225}Ac dort vom Harz lösen, kann es erneut vor Verlassen der Säule am nicht radioaktiven Harz binden (Abbildung 6).

^{225}Ac ist ein metallisches Radionuklid, das mit einer $t_{1/2}$ von 10,0 d über mehrere Töchter zu metallischem ^{213}Bi und schließlich zu stabilem ^{209}Bi zerfällt (Abbildung 7). Abgesehen von ^{209}Pb ($t_{1/2}=3,3$ h) hat ^{213}Bi im Vergleich zu den anderen Tochternukliden die längste $t_{1/2}$ von 45,6 min.

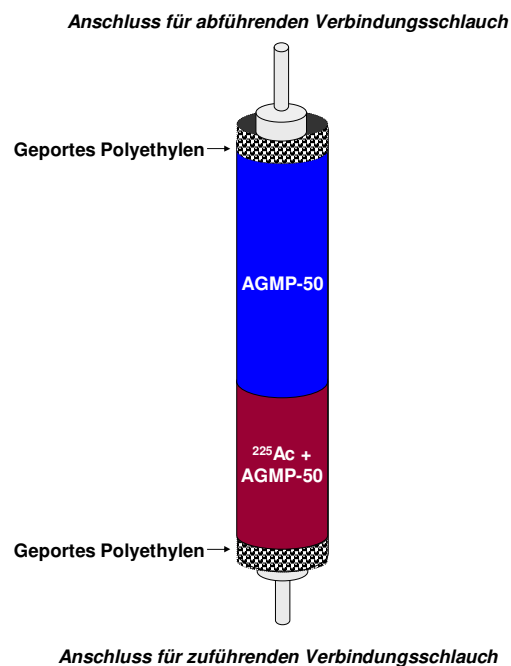


Abbildung 6: Aufbau des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator-Systems (Einzelheiten siehe Text)

3.4.2 Elution von ^{213}Bi und Markierung der Antikörper

Die Elution wurde nach der Vorschrift des Instituts für Transurane (Karlsruhe), abgeleitet von McDevitt et al, 1999 durchgeführt. Alle Lösungen, die für die Elution nötig waren, wurden für jeden Generator frisch hergestellt und über das Chelatierungs-Harz Chelex 100 von Metallen gereinigt. Der Generator wurde 2 bis max. 8 h vor Elution mit 0,01 M HCl gespült. Zur Gewinnung

von ^{213}Bi als $(\text{BiI}_4)^-/(\text{BiI}_5)^{2-}$ wurde eine Mischung aus 300 μl 0,2 M NaI und 300 μl 0,2 M HCl im Zeitraum von 2 min sehr langsam über die Säule geschickt. Der resultierenden gelblich gefärbten Lösung -verursacht durch Iod, erzeugt mittels radiolytischer Oxidation- wurden 100 μl L-Ascorbinsäure (50 mg/ml; pH=5,5) zur Radioprotektion sowie 100 μl 3 M Ammoniumacetat zur pH-Einstellung zugesetzt (Sollbereich: 5,0-5,5, überprüft mittels pH-Papier). Ammoniumacetat bewirkt zudem eine Reduktion des Iods zu farblosem Iodid wodurch sich die Lösung schlagartig entfärbt.

Zu den 800 μl ^{213}Bi -Lösung mit einem pH-Wert von 5,3 wurde der MAK (50-130 μg) pipettiert. Die gesamte Lösung wurde gut durchmischt und für 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Vor Zugabe von PBS ad 2,5 ml wurden 10 μl entnommen, um die Markierungseffizienz zu überprüfen (E_γ , E_A , E_E).

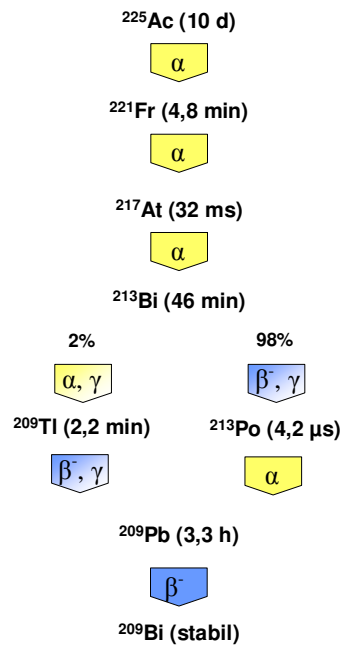


Abbildung 7: Zerfallsschema von ^{225}Ac nach ICRU

Zur Entfernung von freiem ^{213}Bi wurde die Lösung (2,5 ml) auf eine PD-10 Säule aufgetragen. Die ^{213}Bi -MAK-Konjugate wurden mit 2 ml PBS abgetrennt (Gelfiltration). Vom Produkt nach Gelfiltration wurde ebenfalls ein 10 μl Aliquot zur Überprüfung der Abtrennung des freien ^{213}Bi entnommen (P_γ). Mittels ITLC-Chromatographie mit 0,05 M Trinatriumcitrat (pH 5,5) als Laufmittel wird freies ^{213}Bi (mobile Phase, E_E und P_E) von MAK-gebundenem ^{213}Bi (stationäre Phase, E_A und P_A) getrennt.

Wichtige Parameter zur Beurteilung der Qualität der Markierung des MAK mit ^{213}Bi sind die Markierungseffizienz (%) unmittelbar nach der Markierung ($M = E_A \cdot 100 / (E_A + E_E)$), die radiochemische Reinheit (%) der Radioimmunkonjugate nach der Gelfiltration ($P = P_A \cdot 100 / (P_A + P_E)$) und der AK-Verlust (%) durch die Gelfiltration ($L = 100 \cdot (1 - P_A / E_A)$).

Die Markierungseffizienz beziffert den Anteil des eingesetzten ^{213}Bi , der an den MAK gekoppelt ist. Die radiochemische Reinheit gibt Aufschluss darüber, welcher Prozentsatz des ^{213}Bi nach Aufreinigung über die PD 10 Säule am MAK gebunden (P_A) bzw. frei (P_E) vorliegt.

Die Aktivitätskonzentration (kBq/ml) lässt sich mit Hilfe der Markierungseffizienz berechnen, die spezifische Aktivität (kBq/ μg) der ^{213}Bi -Immunkonjugate lässt sich mit Hilfe von AK-Verlust und radiochemischer Reinheit berechnen.

3.5 Markierung der Antikörper mit ^{125}I und ^{111}In

3.5.1 Markierung mit ^{125}I

^{125}I ($t_{1/2}=59,4$ d) zerfällt mittels Elektroneneinfang, die dabei frei werdende Energie der γ -Strahlung beträgt 35,5 keV und die Auger-Elektronen der verschiedenen Schalen weisen Energien im Bereich von 3,2-34,5 keV auf. Der therapeutische Effekt ist auf die Wirkung der Auger-Elektronen zurückzuführen.

Die Markierung mit ^{125}I wurde freundlicherweise von Hr. Dr. G. Reidel bzw. Hr. W. Linke durchgeführt. Dabei wird ^{125}I als I^+ durch elektrophile aromatische Substitution an Tyrosin-Reste des unchelatierten MAK gebunden. Als Oxidationsmittel wird Iodogen verwendet.

Die Reaktion wurde in einem mit 150 μg Iodogen (gelöst in 200 μl Chloroform) beschichteten Eppendorf-Cup mit 300 μg MAK in 50 μl PBS und etwa 60 MBq ^{125}I (als Na^{125}I in 10-20 μl NaOH) für 30 min bei RT durchgeführt. Die Markierungseffizienz des ^{125}I -markierten MAK wurde mittels Dünnschichtchromatographie mit Aceton, Butanol, Wasser und Ammoniak (65:20:5:10) als Laufmittel durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des ^{125}I -markierten AKs erfolgte mittels Bradford-Test (bio-rad protein assay) mit γ -Globulin als Standard. Dabei wird die Farbänderung nach Interaktion von Protein mit dem Farbstoff Coomassie Blue photometrisch bei 595 nm bestimmt.

Für die Erstellung der Standardgerade wurden je 0,7 ml PBS, 0,2 ml Coomassie-Farblösung und γ -Globulin-Standard in 0,1 ml PBS (1,41; 2,82; 5,64 und 11,28 μg) gegen einen Leerwert gemessen (je 3-fach). Die Proben wurden in maximal 0,1 ml PBS mit 0,7 ml PBS und 0,2 ml Coomassie-Lösung (je 2-fach) gegen den Leerwert bestimmt. Die Messung erfolgte innerhalb von 5-10 min nach Mischung der Ansätze (empfohlender Messzeitraum vom Hersteller: 5-60 min nach Mischung).

3.5.2 Markierung mit ^{111}In

^{111}In ($t_{1/2}=2,8$ d) ist ein Auger-Elektronen-Emitter mit auftretenden γ -Energien von 171,3 und 245,4 keV. Die Auger-Elektronen der verschiedenen Schalen haben Energien im Bereich von 0,51-25,4 keV. ^{111}In zerfällt zu stabilem Cadmium.

Das metallische Nuklid ^{111}In wird mittels Chelator CHX-A`-DTPA am AK gekoppelt (McDevitt et al, 1999; Nikula et al, 1995; Nikula et al, 1999). Zur Markierung chelatierter MAK mit ^{111}In wurden 0,4-6,4 MBq $^{111}\text{InCl}_3$ -Lösung (3-73 μl), gelöst in Eisen(III)-Chlorid (0,04 M HCl) mit MAK (30-60 μg) in PBS bei pH 5,0 (eingestellt mit 0,01M HCl) für 5-10 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit PBS auf 2,5 ml aufgefüllt. Die Abtrennung von freiem ^{111}In erfolgte mittels Gelfiltration über eine PD 10 Säule. Der markierte MAK wurde mit 2 ml PBS aus

der Säule herausgewaschen. Die Effizienz der Markierung, die radiochemische Reinheit und der AK-Verlust bei der Gelfiltration wurden analog zu ^{213}Bi bestimmt (siehe 3.4.2).

3.6 Untersuchungen zur Antigenexpression und Antigendichte sowie Internalisierung der ^{213}Bi -Immunkonjugate

3.6.1 Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz

Folgende Zelllinien wurden so hinsichtlich der Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin analysiert: MDA WT, MDA $\Delta 9$, HTB-135, HSC, L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT. $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well wurden auf eine 6-Well-Platte 24 h vor Versuchsbeginn ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen je dreimal mit 1 ml PBS gespült. Mit 1 ml unchelatiertem 6H8-MAK als Primärantikörper (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin, 40-100 $\mu\text{g/ml}$) wurden die Zellen für 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Cy3-markierten Sekundär-AK (anti-Ratte-IgG, aus der Ziege) für 30 min. Das Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes Cy3 liegt bei 570 nm. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.6.2 Quantifizierung von E-Cadherin an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Sämtliche Arbeiten dazu wurden am Institut für Pathologie der TUM durchgeführt.

Die Expression von E-Cadherin wurde zweimal im Abstand von 3 Monaten überprüft.

Von L 929 $\Delta 9$, L 929 WT und HSC wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen (100 μl) mit dem murinen AK gegen E-Cadherin (SHE-MAK) in Sättigungskonzentration für 30 min auf Eis inkubiert. Die niedrige Temperatur sollte eine Internalisierung der AK verhindern. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (siehe 3.1.1) wurden die Zellen mit 50 μl Sekundär-AK (Anti-Maus IgG, FITC-markiert, Verdünnung 1:50) für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden nach einem letzten Waschvorgang in Isoton-II-Lösung aufgenommen, um anschließend die Fluoreszenzintensität (mfi = mean fluorescence intensity) der verschiedenen Zellen im FACS-Gerät zu messen. Die gewonnenen Daten wurden mit geeigneter Software (Expo V 2.0 Cytometer Software), zugehörig zum FACS-Gerät (Beckman Coulter) analysiert und dargestellt.

Alle Ansätze wurden zweifach durchgeführt. Für jede Zelllinie wurde eine Negativkontrolle - inkubiert nur mit Sekundär-AK- mitgeführt. Zentrifugiert wurde jeweils nach dem Waschen bei 300 g und 4°C für 4 min.

Für die Bestimmung der Antigenanzahl pro Zelle wurde der Dako Quifikit Assay verwendet. Zur Erstellung der Standardgerade wurden „beads“ mit einem Durchmesser von 10 μm verwendet, die 0, 3.200, 15.000, 52.000, 183.000 und 689.000 murine AK an ihrer Oberfläche besitzen. Diese „beads“ wurden genau wie die mit Primär-AK inkubierten Zellen mit Sekundär-AK inkubiert und

deren mfi ebenso im Durchflußzytometer gemessen. Mittels Kalibrierungsbeads wurde am Gerät der passende Intensitätsbereich eingestellt.

Folgende Zelllinien wurden analysiert: MDA Δ 9 (1 Messwert, ohne Kontrolle), L 929 Δ 9, HSC (zwei Messwerte), und MDA WT und L 929 WT (1 Messwert). Die Inkubation der Zellen erfolgte, wie oben beschrieben. Statt 50 μ l Sekundär-AK wurden 100 μ l verwendet. Jeweils 100 μ l der Eich- und Kalibrierungsbeads wurden nach einmaligem Waschen auch mit 100 μ l Sekundär-AK inkubiert. Die Inkubationszeit für den Sekundär-AK betrug 45 min bei völliger Dunkelheit auf Eis. Vor der Messung im FACS-Gerät wurden alle Ansätze noch zweimal gewaschen und in 500 μ l Waschpuffer resuspendiert.

Mit Hilfe der Gleichung für die Standardgerade wurden die mfi-Werte in die Anzahl der Antigene umgerechnet. Von mehreren Proben wurde jeweils der Mittelwert gebildet und um den Wert der Kontrolle korrigiert.

3.6.3 Bestimmung von Antigendichte mittels „Scatchard“-Analyse

Die „Scatchard“-Analyse basiert auf der Sättigung zellulärer Antigene mit radioaktiv markiertem AK. Es wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μ l PBS/1% BSA mit 100 μ l radioaktiv-markiertem anti- Δ 9-E-Cadherin vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die MAK-Konzentrationen betragen dabei entweder 50, 100, 200, 400, 600 und 800 ng/ml (50-800 ng/ml) oder 500, 1.000, 2.000, 4.000 und 6.000 ng/ml (500-6.000 ng/ml) (Ausnahme Versuch 7). Folgende Zelllinien wurden analysiert: L 929 Δ 9 (2x), L 929 WT (1x), MDA Δ 8 (1x), MDA Δ 9 (6x), MDA WT (2x), MPE-600 (3x), HSC (2x) und HTB-135 (1x).

Im Experiment Nr.7 wurden die Zellen in PBS mit Zusatz von Natriumazid suspendiert und bei 4°C inkubiert, weil Natriumazid die Internalisierung von Rezeptoren verhindert ohne die Bindung zu beeinträchtigen (persönliche Mitteilung Jörg Mages).

Pro MAK-Konzentration wurden ein bzw. drei Ansätze analysiert. Nach Inkubation wurden die Proben dreimal mit 1 ml PBS gewaschen (Zentrifugation: 1.200 rpm, 3 min, RT), wobei alle Überstände einer Probe in einem Röhrchen gesammelt wurden. Die Aktivitäten in Zellen und gesammelten Überständen wurden im γ -Counter gemessen. Tabelle 16 im Anhang zeigt eine Übersicht über alle 18 Experimente, Versuch (V.) 1-18 (5 Experimente mit 125 I-anti- Δ 9-E-Cadherin, Proteinkonzentration 28 μ g/ml; 13 Experimente mit 213 Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin).

Die für die Scatchard-Experimente verwendeten 213 Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugate hatten unverdünnt eine durchschnittliche Aktivitätskonzentration von 14 MBq/ml und eine durchschnittliche spezifische Aktivität von 0,5 MBq/ μ g AK. Der Median der Markierungseffizienz bzw. der Reinheit betrug $90 \pm 8,5\%$ bzw. $94 \pm 10\%$ (n=12).

Für die Auswertung wurde das Verhältnis gebundene MAK (B)/freie MAK (F) (B/F) auf der y-Achse und die Masse der gebundenen MAK (B) auf der x-Achse aufgetragen (Scatchard-Plot). Mit den Werten wurde eine Regressionsgerade erstellt, deren Schnittpunkt mit der x-Achse die maximale Anzahl der gebundenen MAK (B_{\max}) darstellt (Repke und Liebmann; 1987). Die Masse von B_{\max} (ng) wurde, wie in Gleichung 1 dargestellt, in die Anzahl der Antigene umgerechnet. Die Scatchard-Analyse eignet sich zur Erfassung der Größenordnung der Antigenbindungsstellen und der Assoziationskonstanten, sie wird heutzutage jedoch zunehmend von exakteren Methoden (z.B. FACS-Analyse) abgelöst.

Aus der Formel für die Regressionsgeraden (Gleichung 2) wird für $B/F=0$ (Schnittpunkt mit der x-Achse) B_{\max} berechnet.

$$m = M_m \cdot n = \frac{M_m \cdot Z \cdot A}{N_A}$$

$$A = \frac{m \cdot N_A}{M_m \cdot Z} \quad (\text{Gleichung 1})$$

m = Masse des maximal gebundenen MAK (g)

M_m = 150.000 g/mol (Molekulargewicht eines IgG-AK)

n = Stoffmenge (mol)

Z = Zellanzahl

A = Anzahl der maximal gebundenen MAK (=Anzahl der Antigene)

N_A = $6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ (Avogadro-Konstante)

$$\left(\frac{B}{F}\right) = \left(-\frac{1}{K_D}\right) \cdot B + \left(\frac{1}{K_D} \cdot B_{\max}\right)$$

$$y = m \cdot x + t$$

$$\left(\frac{B}{F}\right) \hat{=} y$$

$$\left(-\frac{1}{K_D}\right) \hat{=} m$$

$$\left(\frac{1}{K_D} \cdot B_{\max}\right) \hat{=} t$$

$$B \hat{=} x$$

(Gleichung 2)

B = Anteil der an Zellantigenen gebundenen MAK am eingesetzten MAK

F = Anteil der freien MAK im Überstand am eingesetzten MAK

K_D = Dissoziationskonstante

B_{\max} = Maximale Anzahl an gebundenen MAK

m= Steigung der Regressionsgeraden

t= Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse

3.6.4 Kinetikexperimente zur Internalisierung von Radioimmunkonjugaten

$\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierende Zellen bzw. WT-E-Cadherin-exprimierende bzw. Zelllinien, die kein E-Cadherin exprimieren wurden mit ^{125}I - bzw. ^{111}In -markiertem anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin bei 4°C, 25°C bzw. 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation erfolgte 1. die Trennung von Zellen und Überstand und 2. die Ablösung gebundener Radioimmunkonjugate (RI) von der Zelloberfläche mit saurem Glycinpuffer (50 mM, pH 2,8, (McDevitt et al, 2001)) bzw. saurem Natrium-Acetat-Puffer (28 mM, pH 3,0, (Schottelius et al, 2005)). Die Radioaktivität der verschiedenen Fraktionen (Überstand, Gebundene RI und Internalisierte RI) wurden zu jedem Zeitpunkt gemessen.

Die verwendeten ^{111}In -Immunkonjugate entstammen aus 13 verschiedenen Markierungsreaktionen. Die Mediane der Markierungseffizienz bzw. Reinheit bezüglich der Markierung betragen $91 \pm 9\%$ bzw. $93 \pm 8\%$.

3.6.4.1 Kinetik ohne Auswaschung ungebundener Radioimmunkonjugate

Tabelle 17 im Anhang zeigt ausgewählte Versuchsbedingungen der 26 Experimente, die hierzu durchgeführt wurden (V. 19-44).

In den Experimenten 19-39 wurden je nach Zelllinie (L 929 $\Delta 9$ (7x), L 929 WT (6x), HSC (7x) und HTB-135 (1x)) zwischen $8,0 \cdot 10^4$ und $4,0 \cdot 10^5$ Zellen pro Well (in Vorversuchen als optimal ermittelt) in 24-Well-Platten ausgesät. Zu Versuchsbeginn wurden adhärenente Zellen in DMEM/1% BSA kultiviert, zur Reduktion unspezifischer Bindung der RI (persönliche Mitteilung Dr. M. Schottelius). Die Zellen wurden mit ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (0,33-0,45 $\mu\text{g}/\text{Well}$, spezifische Aktivität 1-115 kBq/ μg MAK) bei 4°C, 25°C oder 37°C zwischen 2 und 240 min (maximal 10 Zeitpunkte: 0, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 150, 180, 240 min) inkubiert.

Nach Inkubation wurde das Medium mit den RI abgesaugt. Es erfolgte einmaliges Waschen mit 250 μl FKS-freiem Medium. Beide Überstände wurden vereinigt und als Fraktion „Überstand“ gemessen. Zell-gebundene RI wurden nach 5 min Inkubation mit 250 μl Natriumacetat-Waschpuffer abgelöst und nach einmaligem Waschen als Fraktion „Gebundene RI“ gemessen. Um die Fraktion „Internalisierte RI“ zu erhalten, wurden die Zellen mit 250 μl NaOH von der Unterlage abgelöst und lysiert. Die Wells wurden danach ein weiteres Mal mit NaOH ausgespült. Die gemessenen Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen wurden in Prozent der Gesamtaktivität angegeben.

In 4 Experimenten (40-43) wurden $1,2 - 2,2 \cdot 10^7$ Zellen (MDA $\Delta 9$, MDA WT, L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT) als Suspension in PBS/1% BSA mit ^{125}I -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat (0,15 μg in 100 μl) für

30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Gesamtansatz bei 37°C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 60, 120, 180, 300, 420 min) Aliquots mit je $1,0 \cdot 10^6$ Zellen entnommen. Mit den Aliquots wurde folgendermaßen verfahren: Die nicht gebundenen RI im Überstand nach Zentrifugation und im Überstand nach einmaligem Waschen mit PBS wurden verworfen. Anschließend wurden die Aliquots mit Glycinpuffer (50mM, pH 2,8) für 30 min bei 4°C inkubiert, um die an der Zelloberfläche gebundenen RI abzulösen. Nach Zentrifugation und einmaligem Waschen mit PBS resultierte die Fraktion „Gebundene RI“. Die verbliebenen Zellpellets wurden als Fraktion „Internalisierte RI“ gemessen. Bei der Auswertung wurden die gemessenen Werte folglich nicht auf die Gesamtaktivität sondern auf die Summe der Aktivität von gebundenen und internalisierten AK bezogen.

Der Versuch 44 wurde mit $9,5 \cdot 10^6$ L 929 WT als Suspension in DMEM/1% BSA mit ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (140 kBq/ μg MAK, 49,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Volumen 200 μl) durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit den RI für 80 min auf Eis inkubiert. Aus dem Gesamtansatz wurden nach 0-, 60-, 120- und 240- minütiger Inkubation bei 37°C Aliquots mit je $1,0 \cdot 10^6$ Zellen entnommen. Die Aliquots wurden zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen, dabei wurden alle ungebundenen RI entfernt. Die abpipettierte Volumina entsprechen der Fraktion „Überstand“. Um an der Zelloberfläche gebundenen RI abzulösen, wurden die Aliquots für 6 min bei 4°C mit Natriumacetat-Waschpuffer (28 mM, pH 3,0) inkubiert. Diesem Schritt folgte die Zentrifugation und das einmalige Waschen, um die Fraktion „Gebundene RI“ zu erhalten. Die Zellpellets entsprachen der Fraktion Internalisierte RI. In allen Fraktionen wurde die Radioaktivität von ^{111}In bestimmt.

3.6.4.2 Kinetik nach Auswaschung ungebundener Radioimmunkonjugate

Tabelle 18 im Anhang zeigt die Versuchsbedingungen für die 16 Experimente (V. 45-60) mit L 929 $\Delta 9$ (5x), L 929 WT (5x), HSC (4x) und HTB-135 (2x). In den Experimenten wurden adhärente Zellen in 24-Well-Platten verwendet. Der Inkubation mit ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (0,34-0,55 μg MAK pro Well, 75-147 kBq/ μg MAK) für 5 min bei 25°C bzw. 60 min bei 4°C folgte ein Mediumwechsel, bei dem alle ungebundenen RI entfernt wurden. In den Versuchen 50-60 wurde zusätzlich einmaliges Waschen durchgeführt. Anschließend folgte die Inkubation bei 37°C für 0-180 min (maximal 9 Zeitpunkte: 0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 150, 180 min nach Mediumwechsel). Nach der Inkubation wurden die Proben genauso weiterbehandelt wie in Kapitel 3.6.4.1 für die Versuche 19-39 beschrieben.

3.7 Quantifizierung zellulären Überlebens mittels klonogenem Test nach ^{137}Cs -Bestrahlung

Die Zellen wurden in 25 cm² Kulturflaschen 24 h vor Bestrahlung ausgesät. In Vorversuchen wurde für jede Zelllinie ermittelt, bei welcher Zellzahl nach etwa 19 d 100 Klone/Flasche vorlagen. Ausgehend von der Zellzahl für die Kontrolle wurden für die niedrigste Dosis die 3,3fache und die jeweils nächst höheren Dosen die 10fache, die 33fache bzw. die 100fache Anzahl der Zellen ausgesät, um in jeder Flasche in etwa die gleiche Anzahl an Klonen zu erhalten. Die Zellkulturflaschen wurden jeweils in 4 bzw. 10 ml Medium in unterschiedlicher Position zweimal mit der gleichen ^{137}Cs -Dosis bestrahlt, um die Dosisinhomogenität <5% zu halten. ^{137}Cs emittiert γ -Strahlung mit einer Energie von 662 keV ($t_{1/2}=30$ a). Innerhalb der nächsten 19 d nach Bestrahlung wurde stichprobenartig die Klondichte und die Farbe des Mediums beurteilt. Bei Bedarf wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. 13-19 d nach Bestrahlung wurden die Zellklone (>50 Zellen) mikroskopisch ausgezählt, wobei alle Flaschen einer Versuchsreihe und Zelllinie am gleichen Tag ausgewertet wurden.

In den Tabellen 4-6 sind Bestrahlungsdosis, Bestrahlungszeit, Zelllinie und Zellzahl für die verschiedenen Experimente zusammengefasst.

Tabelle 4: Versuchsdaten zur ^{137}Cs -Bestrahlung von HSC und HTB-135 (V.63-64)

Dosis in Gy	Bestrahlungszeit in min	Anzahl HSC pro 25 cm ² -Flasche	Anzahl HTB-135 pro 25 cm ² -Flasche
0	0	1000	5000
5,9	2*2,8	3300	16500
6,3	2*4,5	10000	50000
8,4	2*6,0	33000	165000
10,1	2*7,2	100000	500000

Tabelle 5: Versuchsdaten zur ^{137}Cs -Bestrahlung von L 929 und HSC (V.65-68)

Dosis in Gy	Bestrahlungszeit in min	Anzahl L 929 Δ 9 pro 25 cm ² -Flasche	Anzahl L 929 Δ 9 pro 25 cm ² -Flasche	Anzahl L 929 WT pro 25 cm ² -Flasche	Anzahl HSC pro 25 cm ² -Flasche
0	0	200	5000	200	700
3,9	2*2,8	660	16500	660	2300
5,3	2*3,8	2000	50000	2000	7000
6,8	2*4,9	6600	165000	6600	23000
8,4	2*6,0	20000	500000	20000	70000

Tabelle 6: Versuchsdaten zur ^{137}Cs -Bestrahlung von L 929 WT (V.69)

Dosis in Gy	Bestrahlungszeit in min	Anzahl L 929 WT pro 25 cm ² - Flasche
0	0	180
3,9	2*2,8	594
5,6	2*4,0	1800
8,3	2*6,0	5940
11,7	2*8,4	18000

Zur Darstellung der Ergebnisse in Überlebenskurven (Überleben nach ^{137}Cs -Bestrahlung in Abhängigkeit der Dosis in Gy) wurde eine Parameterschätzung mithilfe des Sas-Statistik-Pakets durchgeführt. Der Parameterschätzung wurde eine linear-quadratische Dosis-Wirkungsbeziehung für das Zellüberleben zu Grunde gelegt. Es wurden die Parameter α und α/β geschätzt. Diese Parameter sind in der Funktion enthalten, die die Überlebenskurve der Zellen nach dem linear-quadratischen Modell beschreibt (Gleichung 3).

$$y = e^{-\alpha D - \beta D^2} = e^{-\alpha D - \frac{\alpha D^2}{\beta}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

y = Überleben = Klone/Flasche = Aussaat * PE

α = zelluläre Strahlenempfindlichkeit im linearen Bereich der Überlebenskurve

$[\alpha] = \text{Gy}^{-1}$

β = zelluläre Strahlenempfindlichkeit im quadratischen Bereich der Überlebenskurve

$[\beta] = \text{Gy}^{-2}$

D = Strahlendosis

$[D] = \text{Gy}$

3.8 Quantifizierung zellulären Überlebens mittels klonogenem Test nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Die klonogenen Tests wurden mit verschiedenen Zelllinien zunächst in 96-Well-Platten und später in 24-Well-Platten durchgeführt. Die Aussaat in 96-Well-Platten wurde durchgeführt, weil die photometrische Auswertung des klonogenen Wachstums mittels XTT-Vitalitätstest nur mit 96-Well-Platten möglich war. Nachdem Ergebnisse zeigten, dass sich die photometrische Auswertung als nicht praktikabel erwies, wurde die Durchführung der klonogenen Tests in 24-Well-Platten favorisiert.

Nach Vorversuchen, zur Aussaat in 24-Well-Platten mit verschiedenen Zelllinien (Tabelle 19, Anhang), konnte für jede Zelllinie eine geeignete Zellzahl für die klonogenen Tests ermittelt werden.

Die Variablen zur Vorgehensweise, Zelllinie, MAK und MAK-Charge, MAK-Konzentration, ausgesäte Zellzahl, Aktivitätskonzentration und Anzahl der Wells pro Ansatz, sind jeweils tabellarisch im Anhang in den Tabellen 20-24 dargestellt.

Die für die klonogenen Tests verwendeten ^{213}Bi -Immunkonjugate wiesen eine durchschnittliche Aktivitätskonzentration von 37 ± 19 MBq/ml und eine durchschnittliche spezifische Aktivität von $1,3 \pm 1,0$ MBq/ μg AK auf. Die Mediane für Markierungseffizienz bzw. Reinheit betragen $98 \pm 13,6\%$ bzw. $97 \pm 11\%$ ($n=42$). Entsprechend verdünnte RI wurden in Aktivitätskonzentrationen bis zu 2.000 kBq/ml zu den Zellen in 1,5 ml Medium pipettiert (max. Volumen der RI 50 μl). Die Inkubationszeit war variabel. Im Falle eines Mediumwechsels nach Inkubation zur Entfernung der ^{213}Bi -Immunkonjugate, wurden die Zellen 24 h vor Inkubation ausgesät. Die Proteinkonzentration der RI mit der höchsten Aktivitätskonzentration in einem Experiment wurde jeweils für die Kontroll-Platte verwendet. Nach 10-19 d wurden die Klone (>50 Zellen) lichtmikroskopisch ausgezählt. Das Überleben wurde normiert (Klonanzahl bezogen auf die Klonzahl der Kontrolle) in % angegeben.

Zur Darstellung der Ergebnisse in Überlebenskurven wurde eine Parameterschätzung durchgeführt. Der Parameterschätzung mit Hilfe des Sas-Statistik-Pakets wurde eine exponentielle Dosis-Wirkungsbeziehung entsprechend der Verwendung von α -Strahlung für das Zellüberleben zu Grunde gelegt. So wurden für jeden Versuch die Parameter k und α geschätzt. Diese Parameter sind Teil der Funktion, die die Überlebenskurve der Zellen beschreibt (Gleichung 4) (Dr. Kummermehr GSF, persönliche Mitteilung).

$$y = e^{k-x\alpha} \quad (\text{Gleichung 4})$$

y = Überleben

x = Aktivitätskonzentration

$[x]$ =kBq/ml

α = zelluläre Strahlenempfindlichkeit

$[\alpha]$ =ml/kBq

k = natürlicher Logarithmus von y

Neben der Darstellung in Überlebenskurven wurde bei einem Teil der Experimente auch eine andere Form der Auswertung vorgenommen. Dabei wurde das binäre Ereignis, ob ein oder mehrere Klone (Nicht-Heilung) oder keine Klone gebildet wurden (Heilung), ausgewertet. Die Anzahl der Wells ohne Klone (Heilung) wurde zur Gesamtzahl der Wells in Bezug gesetzt. Dieser Parameter wird tumor cure probability (tcp) genannt.

Die tcp, aufgetragen in Abhängigkeit der applizierten Aktivitätskonzentration, ergibt eine sigmoide Kurve, so dass die Häufigkeit von 0 überlebenden Zellen $p(0)$ aufgrund der Poisson-Verteilung beschrieben wird durch Gleichung 5:

$$p(0) = e^{-y} = e^{-e^{k-x\alpha}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

$p(0)$: Wahrscheinlichkeit, dass 0 Klone in einem Well gebildet werden

Übrige Variablen siehe Gleichung 4

3.8.1 Experimente in 96-Well-Platten

Von MPE-600, MDA-WT (2x) und MDA $\Delta 9$ (2x) wurden jeweils 20-150 Zellen in 100 μl Medium pro Well mit bis zu 462 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten ohne Mediumwechsel inkubiert (Versuche 74-78). In den Experimenten 75 und 76 wurden identische Ansätze mit bzw. ohne Vorinkubation von kaltem MAK (10 μl /Well, Konzentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 3 h vor Zugabe der RI behandelt. Weitere Daten zur Versuchsdurchführung jedes einzelnen Experimentes stehen im Anhang in Tabelle 20.

3.8.2 Experimente in 24-Well-Platten

Die Zellen wurden stets mit 0,6 bis 1,5 ml Medium pro Well inkubiert. Für L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, MPE-600, MDA $\Delta 8$, HTB-135 und HSC wurden in Vorversuchen als optimale Zellzahl zur Aussaat respektive 40, 40, 200, 50, 300/600 und 80 Zellen pro Well ermittelt. Die Ergebnisse der Vorversuche sind im Anhang in Tabelle 19 zusammengefasst. Anhand der PE kann die Klonogenität der verschiedenen Zelllinien, trotz unterschiedlicher Zellzahlen bei Aussaat, miteinander verglichen werden. Wachsen zu wenige Klone, bzw. erreichte die PE nicht einen für die Zelllinie charakteristischen Mindestwert in den Kontrollen (HTB-135: $<0,01$; HSC: $<0,1$), der empirisch festgelegt wurde, wurde ein Versuch nicht gewertet. Als optimal wurde eine Klonanzahl von 10-50 in einem Well angesehen.

Jeweils 90 min nach der Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten wurde in 28 Versuchen (V.107-134) das Medium gewechselt. Die Daten zum Versuchsaufbau sind in Tabelle 24 im Anhang zusammengefasst. Dabei wurden HSC mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten, HSC mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten, L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-

Konjugaten inkubiert. Die verwendeten maximalen Aktivitätskonzentrationen waren dabei respektive 1.950, 1.787, 2.057 und 1.914 kBq/ml.

22 Experimente (V. 85-106) wurden mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten mit einer Inkubationszeit von 45 min mit anschließendem Mediumwechsel durchgeführt. Die Versuchsdaten zeigt Tabelle 23 im Anhang.

HSC wurden mit Aktivitätskonzentrationen bis zu 1.558 kBq/ml behandelt (7 Experimente). Die maximalen Aktivitätskonzentrationen betragen jeweils 473 kBq/ml für L 929 $\Delta 9$ (2x) und L 929 WT (4x), 428 kBq/ml für HTB-135 (4x), 1.780 kBq/ml für MDA $\Delta 9$ (2x) und 313 kBq/ml für MDA WT (3x).

In den Versuchen 80-82 wurde nach der Zugabe der ^{213}Bi -Immunkonjugate zu MPE-600, MDA- $\Delta 9$ und MDA-WT kein Mediumwechsel durchgeführt. Im Experiment 80 wurden zusätzlich identische Ansätze mit bzw. ohne Vorinkubation von kaltem MAK behandelt. Den jeweiligen Versuchsaufbau zeigt Tabelle 21 im Anhang. In zwei Experimenten mit MDA WT und MDA $\Delta 9$ (V. 83 und 84) wurde nach 30 min Inkubation mit ^{213}Bi - anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 22 im Anhang zusammengefasst.

3.9 Analyse von chromosomalen Aberrationen nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Dazu wurden $1,2-6,5 \cdot 10^6$ Zellen (HSC, HTB-135, L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, MDA $\Delta 9$ und MDA WT) in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 15 ml Medium ausgesät, nach 24 h mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten (bis 777 kBq/ml) für 90 min inkubiert und 18-24 h nach Inkubation abgelöst (^{213}Bi -Immunkonjugate: durchschnittliche spezifische Aktivität 778 ± 306 kBq/ μg ; Median der Markierungseffizienz $98 \pm 3\%$, Median der Reinheit $96 \pm 4\%$ (n=14)). Zur Arretierung in der Metaphase wurde zur Zellsuspension Colcemid (0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegeben.

Zur Präparation der Chromosomen nach der „Bombing Methode“ wurden die Zellen 3 h nach Zugabe des Colcemids in hypotoner Lösung (siehe 3.1.1) für 14 min bei 37°C inkubiert. Danach folgte eine 20-minütige Inkubation in Fixativ (25% Essigsäure, 75% Methanol). Die Zellen wurden anschließend aus einer Höhe von 5 cm auf kalte, befeuchtete Objektträger getropft. Die Färbung nach Giemsa fand für 5 min in der Färbelösung statt. Für die mikroskopische Auswertung wurden die Chromosomen von je 100 Zellkernen hinsichtlich struktureller Veränderungen analysiert.

Die Chromosomenpräparation wurde von Frau Haney und die Analyse der Chromosomenschäden von Herrn Professor E. Schmid an der GSF in Neuherberg durchgeführt.

Details zu den einzelnen Versuchen wie Zelllinie, Zellzahl, MAK, spezifische Aktivität und Aktivitätskonzentration sind in den Tabellen 25-27 im Anhang angegeben. Kontrollen ohne MAK-Behandlung bzw. mit Inkubation der Zellen mit kaltem MAK wurden für jede Zelllinie mitgeführt.

Die Daten zur Versuchsdurchführung mit Magenkarzinomzellen (HSC und HTB-135, V. 136-142) sind in Tabelle 25 im Anhang dargestellt. Die Chromosomenaberrationen von HSC wurden in 5 Versuchen nach der Behandlung mit maximal 777 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK) und in 3 Versuchen mit maximal 733 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1-AK) untersucht.

Mit L 929 Fibroblasten (murin) wurden 8 Versuche (V.143-150) nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten mit einer Aktivitätskonzentration bis zu 370 kBq/ml jeweils an L 929 $\Delta 9$ (4x) und L 929 WT (4x) durchgeführt (siehe Tabelle 26 im Anhang).

Die Durchführung der 6 Experimente (151-156) mit MDA-Zellen ist im Anhang in Tabelle 27 dargestellt. Jeweils 3 Versuche wurden mit MDA $\Delta 9$ und MDA-WT mit einer maximalen Aktivitätskonzentration von 167 kBq/ml der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate durchgeführt.

3.10 Abschätzung der ^{213}Bi -Dosis nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Die Abschätzung wurde für klonogene Tests und die Versuche zur Induktion von Chromosomenaberrationen (Inkubationszeit jeweils 90 min) durchgeführt.

Als Berechnungsgrundlage dienten die ^{213}Bi -Aktivitätskonzentration, die spezifische Aktivität der ^{213}Bi -Immunkonjugate sowie der errechnete gebundene Anteil und der experimentell ermittelte internalisierte Anteil der Radioimmunkonjugate. Zusätzlich wurden folgende Annahmen zur Vereinfachung der Dosisberechnung getroffen (in Zusammenarbeit mit Prof. Roos, Strahlenbiologie, Ludwigs-Maximilians-Universität München (LMU) München):

1. Die von ^{213}Bi freigesetzte Energie wird vollständig vom Medium und den darin befindlichen Zellen absorbiert.
2. Zellen und Medium besitzen die gleiche Masse und Dichte wie Wasser.
3. Zellen sind kugelförmig.

3.10.1 Berechnung der Absättigung der $\Delta 9$ -E-Cadherine an der Zelloberfläche mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Abhängig von der Assoziationskonstante K_a des verwendeten Antikörpers, der Zellkonzentration, der Anzahl der Antigenbindungsstellen pro Zelle und der Antikörperkonzentration wurde der Anteil der besetzten Antigene pro Zelle mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes berechnet (Gleichung 6).

$$K_a = \frac{[\text{Antigen} - \text{Antikörper} - \text{Komplex}]}{[\text{Antigene} - \text{frei}] \cdot [\text{Antikörper} - \text{frei}]} = \frac{k}{f \cdot F} = \frac{x \cdot T}{f \cdot (1 - x) \cdot T} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Für alle Versuche mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierenden Zellen, behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten, wurde ein experimentell ermittelter K_a -Wert für 6H8-MAK ($1,82 \cdot 10^8$ l/mol) verwendet. Für die übrigen Antigen-AK Konstellationen mit unspezifischer Bindung ($\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierende Zellen, inkubiert mit anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten; WT-E-Cadherin-exprimierende Zellen, inkubiert mit anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten und HTB-135, inkubiert mit anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten) wurde ein um 2 Zehnerpotenzen niedriger liegender K_a -Wert ($1,82 \cdot 10^6$ l/mol) angenommen. Das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 6) wurde zur Berechnung der Antikörpermenge umgeformt (Gleichung 7) und in Form einer quadratischen Gleichung ($ax^2+bx+c=0$, Gleichung 8) dargestellt und aufgelöst (Gleichung 9). Die Diskriminante $b^2-4ac \geq 0$ entspricht dem Term $(T+t+1/K_a)^2-4Tt$.

$$f = \frac{x \cdot T}{K_a \cdot (1-x) \cdot T}$$

$$t = f + B = \frac{x \cdot T}{K_a \cdot (1-x) \cdot T} + x \cdot T \quad (\text{Gleichung 7})$$

$$T \cdot x^2 - (T + t + \frac{1}{K_a}) \cdot x + t = 0 \quad (\text{Gleichung 8})$$

$$x_{1/2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4 \cdot a \cdot c}}{2 \cdot a} = \frac{(T + t + \frac{1}{K_a}) \pm \sqrt{(T + t + \frac{1}{K_a})^2 - 4 \cdot T \cdot t}}{2 \cdot T} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Größenbezeichnungen:

V = Volumen	[V]=l
M _m = Molekulargewicht	[M _m]=g/mol
m = Masse des MAK	[m]=g
t = Konz. des gesamten MAK	[t]=mol/l
f = Konz. des freien MAK	[f]=mol/l
b = Konz. des gebundenen MAK	[b]=mol/l
T = Konz. der gesamten Antigene	[T]=mol/l
F = Konz. des freien Antigens	[F]=mol/l
B = Konz. der mit MAK besetzten Antigene	[B]=mol/l
k = Konz. der Antigen-MAK-Komplexe	[k]=mol/l
x = Anteil der Antigene, die besetzt sind	0<x<1
1-x = Anteil der Antigene, die frei sind	

Zusammenhänge:

$$B=b=k$$

$$t=f+b$$

$$B=T \cdot x$$

$$F=T \cdot (1-x)$$

Konstanten:

$$K_a (6H8) = 1,82 \cdot 10^8 \text{ l/mol}$$

$$K_a (7H1, \text{ bzw. unspezifische Antigen-AK-Wechselwirkung}) = 1,82 \cdot 10^6 \text{ l/mol}$$

$$N = \text{Avogadro Konstante} = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$M_m(\text{MAK}) = 1,5 \cdot 10^5 \text{ g/mol}$$

3.10.2 Rechenweg zur Abschätzung der Dosis

3.10.2.1 Dosisbegriff

Nach der Internationalen Kommission für radiologische Einheiten und Messungen (ICRU) ist die Dosis folgendermaßen definiert:

Dosis ist der Quotient aus ΔE und Δm , wobei ΔE die absorbierte Energie in einem Volumenelement und Δm die Masse der Materie in dem Volumenelement ist. Die Dosis gibt die Strahlungsenergie an, die durch Absorption an eine bestimmte Materiemenge übertragen wird.

3.10.2.2 Konstanten, Größenbezeichnungen und Zelldaten

Konstanten:

Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von ^{213}Bi :	$t_{1/2} = 45,58 \text{ min} = 2.734,8 \text{ s}$
Energie eines α -Teilchens (E_α), emittiert von ^{213}Bi :	$E_\alpha = 8,375 \text{ MeV} = 1,34 \cdot 10^{-12} \text{ J}$
Molekulargewicht des Antikörpers $M_m(\text{MAK})$	$M_m(\text{MAK}) = 1,5 \cdot 10^5 \text{ g/mol}$
LET: linearer Energietransfer von ^{213}Bi , gemittelt	$\text{LET} = 61,3 \text{ keV}/\mu\text{m}$

Größenbezeichnungen:

N: Anzahl der Atome	dimensionslos
N_b : Anzahl der zellgebundenen Atome	dimensionslos
N_u : Anzahl der nicht gebundenen Atome	dimensionslos
N_i : Anzahl der internalisierten Atome	dimensionslos
A: Aktivität	$[A] = \text{Bq} = 1/\text{s}$
D: Dosis	$[D] = \text{J}/\text{kg} = \text{Gy}$
E: Energie	$[E] = \text{J}$
m: Masse	$[m] = \text{kg}$
a: Aktivitätskonzentration	$[a] = \text{kBq}/\text{ml}$
V: Volumen	$[V] = \text{ml}$
V_Z : Zellvolumen	$[V_Z] = \text{ml}$
P: spezifische Aktivität	$[P] = \text{kBq}/\text{g}$
B: Zahl der besetzten Antigene	dimensionlos
e: in der Zelle deponierter Anteil von E_α (Bardies und Myers, 1990)	dimensionslos
Z: Anzahl der Zellen	dimensionslos
ρ : Dichte von Wasser	$[\rho] = \text{g}/\text{cm}^3$
N_A : Anzahl der Teilchen pro mol (Avogadro-Konstante)	$[N_A] = \text{mol}^{-1}$
l: Streckenlänge innerhalb der Zelle	$[l] = \mu\text{m}$

i: Verhältnis zwischen internalisierten und gebundenen ^{213}Bi -Atomen nach 90 min dimensionslos

(experimentell ermittelt aus Internalisierungsexperimenten bei 37°C ohne Auswaschung der RI (V.31-39: L 929 $\Delta 9$ und HSC: n=3, L 929 WT n=2, HTB-135 n=1) bei 35-96fachem Überschuss von ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten zur Anzahl der Antigene)

Zelldaten:

Zellvolumina und Zellradien wurden mit Hilfe des Zellzählgerätes ermittelt.

Zellvolumen HTB-135 $V_z=4,5 \cdot 10^{-9}\text{ml}$

Zellradius HTB-135 $r=10,2 \mu\text{m}$

HTB-135: $i=0,17$ Zur Ermittlung: nach 90 min, V. 35

Zellvolumen HSC $V_z=3,0 \cdot 10^{-9}\text{ml}$

Zellradius HSC $r=8,9 \mu\text{m}$

HSC: $i=0,8$ Zur Ermittlung: Mittelwert nach 90 min aus V. 31, 34 und 37

Zellvolumen L 929 WT $V_z=0,86 \cdot 10^{-9}\text{ml}$

Zellradius L 929 WT $r=5,9 \mu\text{m}$

L 929 WT: $i=0,32$ Zur Ermittlung: Mittelwert nach 90 min aus V. 33 und 39

Zellvolumen L 929 $\Delta 9$ $V_z=0,98 \cdot 10^{-9}\text{ml}$

Zellradius L 929 $\Delta 9$ $r=6,2 \mu\text{m}$

L 929 $\Delta 9$: $i=1,05$ Zur Ermittlung: Mittelwert nach 90 min aus V. 32, 36 und 38

3.10.2.3 Rechenweg

Das Konzept zur Dosisberechnung wurde gemeinsam mit Hr. Prof. Roos von der Strahlenbiologie der LMU München erarbeitet.

Die verabreichte Aktivität bestimmt die Gesamtanzahl der vorhandenen ^{213}Bi -Atome (zu Beginn der Inkubationszeit, siehe Grundlegende Formeln, S.51). Die Anzahl der Atome setzt sich zusammen aus:

N_a : ^{213}Bi -Atome, die sich frei im Medium befinden, N_b : ^{213}Bi -Atome, die an die Zellen über AK gebunden sind und N_i : ^{213}Bi -Atome, die an internalisierten RI in der Zelle zerfallen.

Das Modell von Bardies liefert in Abhängigkeit von der Energie der α -Teilchen (E_α) und des Zellradius (r) den Anteil von E_α , der von Zellen absorbiert wird (Bardies und Myers, 1990). Dieser Anteil nimmt mit steigender Energie (steigender Reichweite) und kleiner werdendem Zellradius ab,

er wird für die Ermittlung der Dosis, resultierend aus N_b , verwendet. In diesem Modell ist der sich über die Bahnlänge eines α -Teilchens verändernde LET berücksichtigt. Demnach erhält man für einen Zellradius von 5 μm einen absorbierten Anteil von 0,025 und für einen Zellradius von 10 μm einen absorbierten Anteil von 0,05 bei einer Energie der α -Teilchen von 8,4 MeV (entspricht ^{213}Bi). Um die von Zellen absorbierte Energie, verursacht durch N_i (internalisierte ^{213}Bi -Atome) zu berechnen, wird ein konstanter mittlerer LET von 61,3 keV/ μm angenommen. Die Strecke l in der Zelle, auf der die Energie deponiert wird, wird als 75% des Zellradius angenommen (Kellerer, 1984).

Die Energie ausgehend von N_i und N_b , die nicht von den Zellen absorbiert wird, weil die Bahnlänge des α -Teilchens über die Zelle hinaus geht, wird vom Medium absorbiert.

Aufgrund dieser Überlegungen ergeben sich 5 Dosiskomponenten für die Zellen, die addiert die Gesamtdosis ergeben:

D_1 ist der Anteil der Dosis, der sich aus Zerfällen von nicht gebundenen ^{213}Bi -Atomen innerhalb von 90 min ($0,75 \cdot N_u$) ergibt (Gleichung 10).

Aus der Energie der Zerfälle von zellgebundenen Atomen (N_b) ergeben sich zwei Dosiskomponenten.

D_2 ist der Anteil der Dosis, der sich aus dem von Zellen absorbierten Anteil der Energie ergibt (Gleichung 11).

D_3 ist der Anteil der Dosis, der sich aus der Energie ergibt, die vom Medium absorbiert wird (Gleichung 12).

Aus der Energie der Zerfälle von internalisierten Atomen (N_i) ergeben sich zwei Dosisanteile.

D_4 ist der Anteil der Dosis, der sich aus der Energie ergibt, die von der Zelle absorbiert wird (Gleichung 13).

D_5 ist der Anteil der Dosis, der durch die Energie aus Zerfällen von N_i entsteht, die vom Medium absorbiert wird (Gleichung 14).

D_3 und D_5 erwiesen sich um mehrere Zehnerpotenzen geringer als die übrigen Dosisanteile (μGy -Bereich) und wurden deshalb vernachlässigt. Die Gesamtdosis ergibt sich daher aus den Dosisanteilen D_1 , D_2 und D_4 (Gleichung 15).

Grundlegende Formeln:

$$N = A \cdot \frac{T_{1/2}}{\ln 2}$$

$$A = a \cdot V$$

$$N = N_b + N_u + N_i$$

$$N_i = i \cdot N_b$$

Rechenweg:

$$D_1 = \frac{E_\alpha \cdot N_u \cdot 0,75}{V \cdot \rho} = \frac{E_\alpha \cdot 0,75 \cdot (N - N_b)}{V \cdot \rho} = \frac{E_\alpha \cdot 0,75 \cdot \left(\frac{a \cdot V \cdot T_{1/2}}{\ln 2} - \frac{P \cdot M \cdot B \cdot T_{1/2}}{N_A \cdot \ln 2} \right)}{V \cdot \rho} \quad (\text{Gleichung 10})$$

$$D_2 = \frac{N_b \cdot E_\alpha \cdot e}{V_Z \cdot \rho \cdot Z} = \frac{P \cdot M \cdot B \cdot T_{1/2} \cdot E_\alpha \cdot e}{N_A \cdot V_Z \cdot \rho \cdot Z \cdot \ln 2} \quad (\text{Gleichung 11})$$

$$D_3 = \frac{N_b \cdot E_\alpha \cdot (1-e)}{V \cdot \rho} = \frac{P \cdot M \cdot B \cdot T_{1/2} \cdot E_\alpha \cdot (1-e)}{N_A \cdot V \cdot \rho \cdot \ln 2} \quad (\text{Gleichung 12})$$

$$D_4 = \frac{LET \cdot l \cdot N_i}{V_Z \cdot Z \cdot \rho} = \frac{LET \cdot \frac{3}{4} \cdot r \cdot N_i}{V_Z \cdot Z \cdot \rho} \quad (\text{Gleichung 13})$$

$$D_5 = \frac{E_\alpha \cdot N_i - LET \cdot \frac{3}{4} \cdot r \cdot N_i}{V \cdot \rho} \quad (\text{Gleichung 14})$$

$$D = D_1 + D_2 + D_4 = \frac{E_\alpha \cdot 0,75 \cdot \left(\frac{a \cdot V \cdot T_{1/2}}{\ln 2} - \frac{P \cdot M \cdot B \cdot T_{1/2}}{N_A \cdot \ln 2} \right)}{V \cdot \rho} + \frac{P \cdot M \cdot B \cdot T_{1/2} \cdot E_\alpha \cdot e}{N_A \cdot V_Z \cdot \rho \cdot Z \cdot \ln 2} + \frac{LET \cdot \frac{3}{4} \cdot r \cdot N_i}{V_Z \cdot Z \cdot \rho} \quad (\text{Gleichung 15})$$

4. Ergebnisse

4.1 Zellkultur

Die Proliferationsraten der einzelnen Zelllinien waren wie erwartet unterschiedlich. Auch innerhalb einer Zelllinie waren Passage-bedingte Schwankungen zu verzeichnen. Die Linien MDA WT, MDA $\Delta 8$ und MDA $\Delta 9$ ließen sich nach mehreren Passagen zum Teil nicht mehr weiter kultivieren. Bakterien- sowie Pilzwachstum und Temperaturschwankungen im Brutschrank konnten als Ursache ausgeschlossen werden.

4.2 Quantifizierung der Zellproliferation an Hand von Verdopplungszeiten

Die Aussaat von je $1 \cdot 10^6$ Zellen der Zelllinien HSC, L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, MDA $\Delta 9$ und MDA WT in 75 cm² Kulturflaschen bzw. $1,5 \cdot 10^5$ Zellen der Zelllinien HSC, L 929 $\Delta 9$, MDA $\Delta 9$ und MDA WT in 10 cm² Zellkulturgefäßen ermöglichte die tägliche Zellzahlbestimmung bis 10 d nach der Aussaat. Als durchschnittliche Verdopplungszeiten (Anzahl der Einzelwerte) ergaben sich für HSC 36 ± 30 h (3), für HTB-135 49 h (1), für L 929 $\Delta 9$ 22 ± 2 h (4), für L 929 WT 26 h (1), für MDA $\Delta 9$ 23 ± 1 h (2) und für MDA WT 25 ± 1 h (2).

Die Zellzahlen wurden in Abhängigkeit der Zeit graphisch aufgetragen. Da die Zellproliferation mathematisch als Exponentialgleichung beschrieben wird (Gleichung 16), wurde der exponentiell verlaufende Teil der Kurve der Berechnung der Verdopplungszeiten zu Grunde gelegt. Die Exponentialfunktion stellte eine Trendlinie (berechnet mit Excel) dar, deren Korrelationskoeffizient jeweils mit angegeben wurde (aufgeführt im Anhang in Tabelle 28, neben anderen Daten zu den Einzelversuchen). Für jede Zelllinie ist jeweils das Experiment mit größtem Korrelationskoeffizient r^2 zur Trendlinie in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Die Berechnung der Verdopplungszeiten ($x_2 - x_1$) erfolgte aus den graphisch ermittelten Größen a (Zellzahl) und b (Exponent) nach Gleichung 17. Die Gleichung stellt den Berechnungsansatz und die Umformung nach der Verdopplungszeit dar.

$$y = a \cdot e^{b \cdot x} \quad (\text{Gleichung 16})$$

$$2 \cdot y_1 = y_2$$

$$2 \cdot a \cdot e^{b \cdot x_1} = a \cdot e^{b \cdot x_2}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{e^{b \cdot x_1}}{e^{b \cdot x_2}} = e^{b(x_1 - x_2)}$$

$$\ln \frac{1}{2} = b \cdot (x_1 - x_2)$$

$$x_2 - x_1 = -\frac{\ln \frac{1}{2}}{b} \quad (\text{Gleichung 17})$$

x: Zeitdifferenz (h)

y: Zellzahl

a: Zellzahl (ermittelt aus der graphisch dargestellten Proliferationskinetik)

b: Exponent (ermittelt aus der graphisch dargestellten Proliferationskinetik)

e: Eulersche Zahl: 2,71828

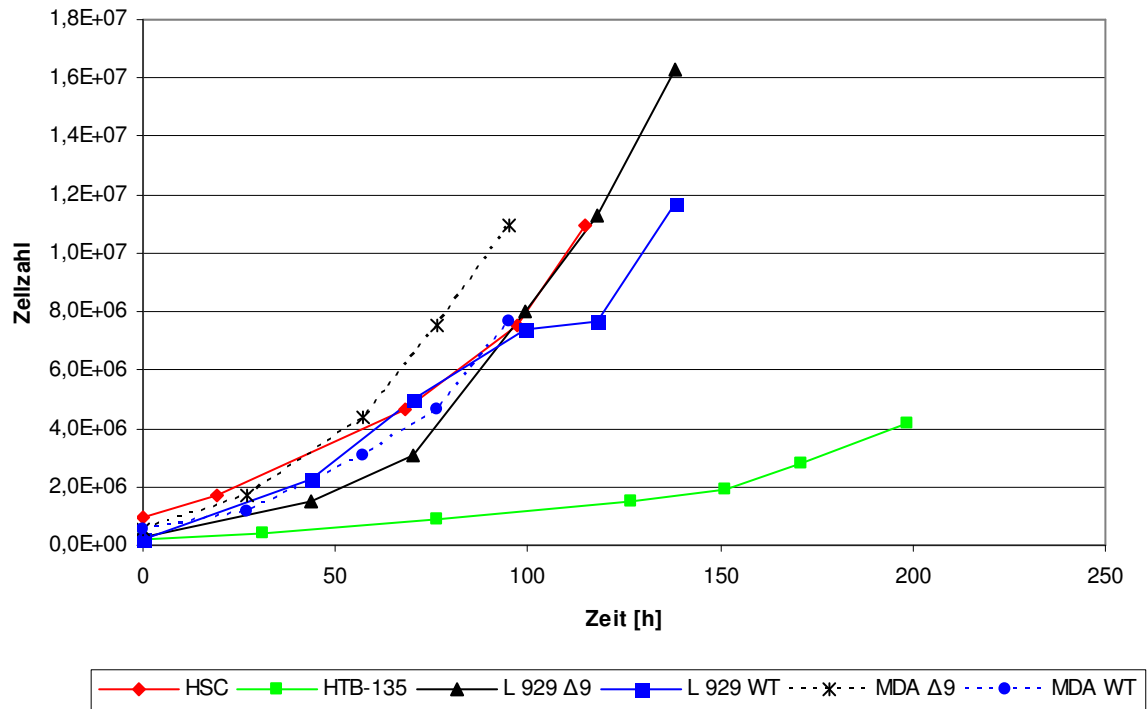


Abbildung 8: Proliferationskinetiken verschiedener Zelllinien (Einzelheiten siehe Text 4.2)

4.3 Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Zellproliferation in Multi-Well-Platten

Bei L 929 WT hatte ein Mediumwechsel 24 h nach Aussaat von 40, 80, 120 und 200 Zellen/Well eine durchschnittliche PE (siehe Kapitel 3.3.2) von 0,64 zur Folge, während die PE ohne Mediumwechsel 0,62 betrug.

Bei HSC verursachte der Mediumwechsel 24 h nach Aussaat von 40, 80, 120 und 160 Zellen/Well eine deutliche Steigerung der durchschnittlichen PE von 0,32 auf 0,45 (Abbildung 9).

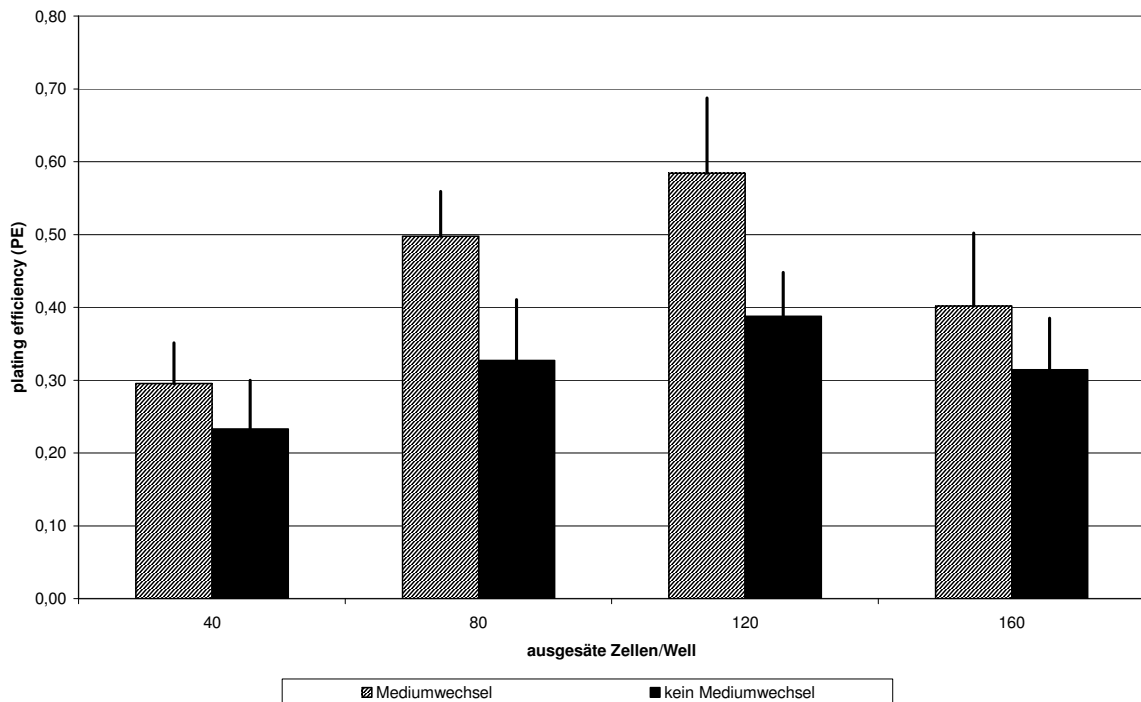


Abbildung 9: Plating efficiency (PE) nach Klonogenem Test (Wachstumszeit 8 d) in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl (40, 80, 120 und 160 Zellen/Well) bei HSC in 24-Well-Platten mit bzw. ohne Mediumwechsel nach 24 h: Der Mediumwechsel bewirkte eine deutliche Erhöhung der PE

Bei MDA-WT in 24-Well-Platten wurde durch die Ergänzung des Mediums mit Pyruvat (110 mg/l) die PE je nach Zellzahl (30-200 Zellen/Well) auf das 3-27fache gesteigert. Zum Beispiel wurden nach Aussaat von 50 Zellen pro Well in Medium ohne Pyruvat nur 1 Klon, in Medium mit Pyruvat dagegen durchschnittlich 9 Klone registriert. Der positive Effekt von Pyruvat hinsichtlich der Koloniezahl schwächte sich mit zunehmender Anzahl ausgesäter Zellen ab.

Bei MDA $\Delta 9$ in 24-Well-Platten bewirkte die Zugabe von Pyruvat keine Änderung der Zellproliferation. Hier waren die Klonzahlen bei allen eingesäten Zellzahlen (30, 50, 70, 100, 150 und 200) mit bzw. ohne Pyruvat in etwa gleich (3-5, 11-12, 9, 11-13, 12, 11-18). In Gegenwart von Pyruvat im Kulturmedium in 96-Well-Platten erhöhte sich die PE von MDA $\Delta 9$ 2-4fach.

Die Verwendung von konditioniertem Medium (geklärtes Medium einer 2 d alten Kultur) bei HTB-135 führte annähernd zu einer Verdopplung der Klonanzahl (1,9-2,6fache PE) bei Ausplattierung von 200-600 Zellen pro Well.

4.4 Untersuchungen zum Nachweis und zur Quantifizierung von $\Delta 9$ -E-Cadherin an der Zelloberfläche sowie zur Internalisierung von anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin

4.4.1 Darstellung von $\Delta 9$ -E-Cadherin an HSC, MDA $\Delta 9$ und L 929 $\Delta 9$ mittels Immunfluoreszenz

Die Zelllinien MDA $\Delta 9$, MDA WT, L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, HTB-135 und HSC wurden adhärenz mit anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin als Primärantikörper inkubiert. Anti-Ratten-IgG, markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 wurde als Sekundär-AK zum Nachweis gebundener Primärantikörper verwendet. Kontrollen wurden nur mit dem Sekundär-AK inkubiert. Ein Fluoreszenzsignal als Nachweis der Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin war bei MDA $\Delta 9$, HSC (Abbildung 10) und L 929 $\Delta 9$ (Abbildung 11) zu beobachten.

Die entsprechenden Kontrollen zeigten erwartungsgemäß keine Fluoreszenz. MDA WT, L 929 WT, und HTB-135, die WT-E-Cadherin bzw. gar kein E-Cadherin exprimieren, zeigten keine Fluoreszenz nach Inkubation mit anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin (Primär-AK) und Cy3-AntiRatte-AK (Sekundär-AK).

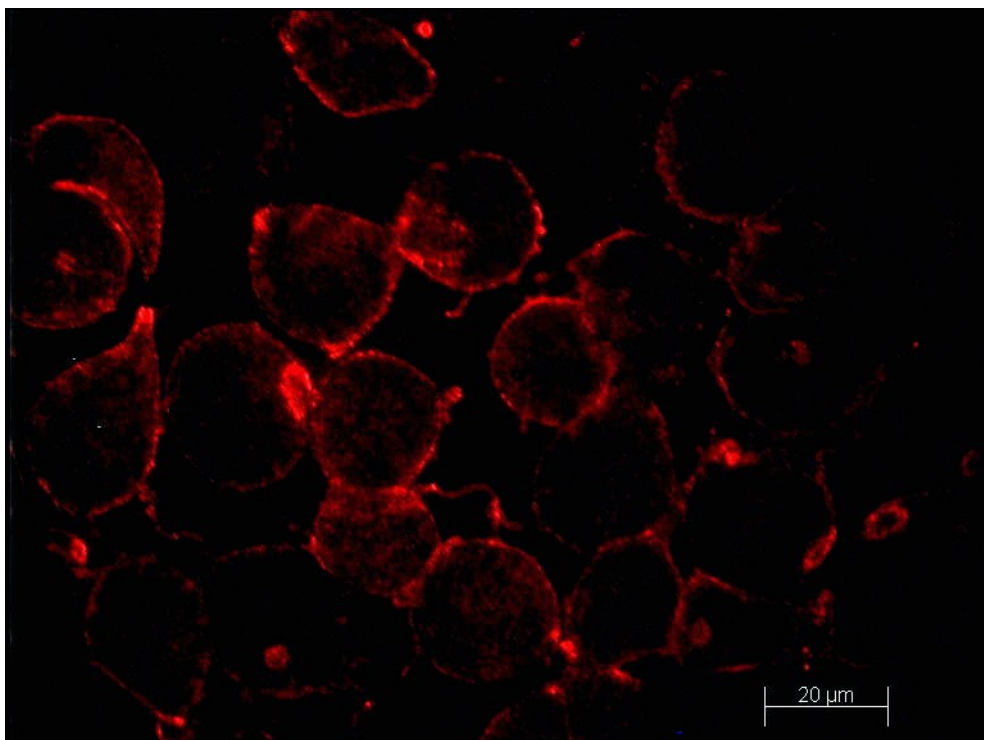


Abbildung 10: Nachweis der $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression mittels Cy3-Immunfluoreszenz an HSC-Zellen

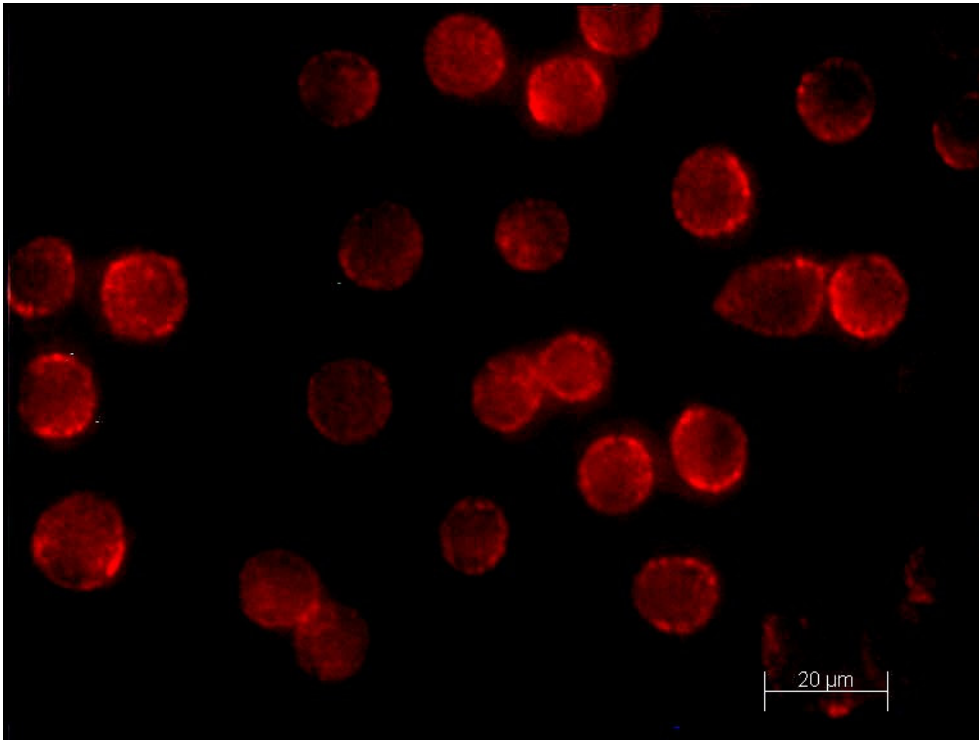


Abbildung 11: Nachweis der $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression mittels Cy3-Immunfluoreszenz an L 929 $\Delta 9$ Zellen

4.4.2 Nachweis und Quantifizierung von E-Cadherin mittels Durchflusszytometrie (FACS)

4.4.2.1 Nachweis von E-Cadherin an der Zelloberfläche

Der Nachweis von E-Cadherin-Molekülen (WT-E-Cadherin und $\Delta 9$ -E-Cadherin) an der Zelloberfläche von L 929 $\Delta 9$, L 929 WT und HSC erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensität (mfi-Wert) nach Markierung. Die Markierung der Zellen wurde mittels Primärantikörper gegen E-Cadherin und nachfolgend mit FITC-markiertem Sekundärantikörper durchgeführt. Kontrollen wurden ausschließlich mit Sekundärantikörper markiert (Kapitel 3.6.2).

Diese Messungen wurden im Abstand von 3 Monaten zweimal durchgeführt um jeweils den Antigenbesatz zu überprüfen. Beim ersten Versuch betragen die durchschnittlichen mittels FACS ermittelten mfi-Werte für L 929 $\Delta 9$, L 929 WT und HSC 93, 61 und 148. Die entsprechenden Werte der Kontrollen lagen mit 2, 2, und 5 weit darunter. Beim zweiten Experiment betragen die durchschnittlichen mfi-Werte für L 929 $\Delta 9$, L 929 WT und HSC 47, 38 und 82 bzw. 12, 19 und 9 für die Kontrollen. Die Resultate belegen, dass alle untersuchten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten E-Cadherin exprimiert haben. Die Fluoreszenzintensitäten waren bei der zweiten Messung, 3 Monate nach der 1. Messung, bei allen Zelllinien geringer. Ohne Korrelation zu der genauen Anzahl an Antigenen mittels Standardgerade lässt sich allerdings über einen evtl. Verlust von E-Cadherin-Molekülen an der Zelloberfläche keine Aussage treffen.

4.4.2.2 Bestimmung der Anzahl der E-Cadherin-Moleküle pro Zelle

Dazu wurde mittels Durchflusszytometrie zunächst eine Standardgerade erstellt, die die anschließende Zuordnung der mittels Durchflusszytometrie ermittelten mfi-Werte zur Anzahl der pro Zelle exprimierten E-Cadherine ermöglichte (siehe Kapitel 3.6.2).

Die ermittelte Anzahl der E-Cadherine pro Zelle (Mittelwert, korrigiert um die Kontrolle) betrug für MDA $\Delta 9$ 280.200, für MDA WT 262.000, für L 929 $\Delta 9$ 163.400, für L 929 WT 125.500 und für HSC 356.500.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 29 im Anhang für alle untersuchten Zelllinien zusammengefasst.

4.4.3 Bestimmung der Antigendichte ausgewählter Zelllinien mittels „Scatchard“-Analyse

Der Bestimmung liegt jeweils ein Sättigungsexperiment mit steigenden Konzentrationen von RI, die spezifisch an $\Delta 9$ -E-Cadherin binden, zu Grunde (3.6.3). Es wurde der Quotient aus B (zellgebundene RI) und F (nicht gebundene RI) gegen die Masse der gebundenen AK aufgetragen. Aus der resultierenden Regressionsgeraden mit negativer Steigung lässt sich die maximal bindungsfähige Anzahl an RI (=Anzahl an Antigenen) ermitteln. Für den Fall, dass die Regressionsgerade keine oder eine positive Steigung aufweist, zeigt diese Methode an, dass eine unspezifische Bindung der AK vorliegt.

Von 18 Experimenten mit anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten zeigten 6 Regressionsgeraden mit positiver oder keiner Steigung, darunter Experimente mit MDA $\Delta 8$ und HTB-135 ohne $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression. Die anderen 12 Experimente mit MDA $\Delta 9$, L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, HSC und MPE-600 konnten aufgrund negativer Steigung der Regressionsgeraden zur Bewertung herangezogen werden.

Demnach exprimieren MDA $\Delta 9$ durchschnittlich (2 Experimente mit ^{125}I -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin und 3 Experimente mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) 76.000 $\Delta 9$ -E-Cadherine pro Zelle. L 929 $\Delta 9$ besitzen durchschnittlich 32.000 $\Delta 9$ -E-Cadherine pro Zelle (^{125}I - und ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin). Für HSC ergaben zwei Experimente eine durchschnittliche Anzahl von 75.000 E-Cadherinen pro Zelle. Für MPE-600 errechneten sich durchschnittlich (2 Versuche) 80.000 $\Delta 9$ -E-Cadherine pro Zelle. Für L 929 WT wurden nach dem Scatchard-Plot 16.000 E-Cadherine pro Zelle errechnet. In Tabelle 30 im Anhang sind die Ergebnisse für alle Versuche dargestellt, deren Scatchard-Plots negative Steigungswerte zeigten.

Das positive Ergebnis für L 929 WT überrascht, weil anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin WT-E-Cadherin nicht erkennen sollte. Dagegen wurde erwartet, dass anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin an HTB-135 und MDA $\Delta 8$ nur unspezifisch bindet. In je einem Experiment mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierenden MDA $\Delta 9$ (V.14) und MPE-600 (V.5) ergaben die Scatchard-Plots entgegen der Erwartung keine negativen Steigungswerte.

Auffallend ist, dass die ermittelten Anzahlen für $\Delta 9$ -E-Cadherin-Moleküle pro Zelle mittels Scatchard-Analyse deutlich geringer sind, als mittels Durchflusszytometrie.

4.4.4 Kinetikexperimente zur Internalisierung von Radioimmunkonjugaten

Die Internalisierung von RI gegen $\Delta 9$ -E-Cadherin wurde bei unterschiedlichen Temperaturen mit verschiedenen Zelllinien ohne bzw. mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression untersucht. Dabei wurde die Internalisierung (i) während der Inkubation mit RI gegen $\Delta 9$ -E-Cadherin und (ii) nach Entfernung der ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Zu (i) sind Methode und Ergebnisse in den Kapiteln 3.6.4.1 und 4.4.4.1 beschrieben, zu (ii) in den Kapiteln 3.6.4.2 und 4.4.4.2.

4.4.4.1 Internalisierung während der Inkubation mit Radioimmunkonjugaten (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin)

Für diese Experimente wurden adhärenente Zellen (Monolayer) bzw. Zellen in Suspension mit RI gegen $\Delta 9$ -E-Cadherin für Zeiträume von 0-4 h bzw. 0-7 h bei 4°C, 25°C bzw. 37°C inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene RI mit dem Medium (Überstand) entfernt. Die an der Zelloberfläche gebundenen RI wurden mittels Natriumacetat- bzw. Glycinpuffer abgelöst, die internalisierten RI wurden im Zellpellet gemessen (siehe 3.6.4.1). Die einzelnen Fraktionen, Überstand, gebundene RI und internalisierte RI ergaben die Gesamtmenge an radioaktiv markiertem MAK (Ausnahme V. 40-43, siehe 4.4.4.1.1 und 4.4.4.1.2). Gebundene und internalisierte RI hatten gemessen an der Gesamtaktivität vergleichsweise geringe Anteile, von 0,01-20 %.

Die Auswertung zeigt den Verlauf der Bindung und Internalisierung während der Inkubation der Zellen mit den ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten, wobei zwischen 17 und 166fach mehr MAK-Moleküle als Antigene vorhanden waren. Drei Experimente bei 37°C (V. 37-39) mit L 929 WT, L 929 $\Delta 9$ und HSC sind exemplarisch in Abbildung 12 graphisch dargestellt (nur Internalisierung). Hier ist zu sehen, dass L 929 $\Delta 9$ und HSC im Zeitverlauf deutlich mehr RI internalisiert haben als

L 929 WT. Zwischen 10 min und 180 min schwankt die Internalisierung geringfügig zwischen 1,3% und 1,7% für HSC und L 929 $\Delta 9$, danach nimmt sie langsam ab.

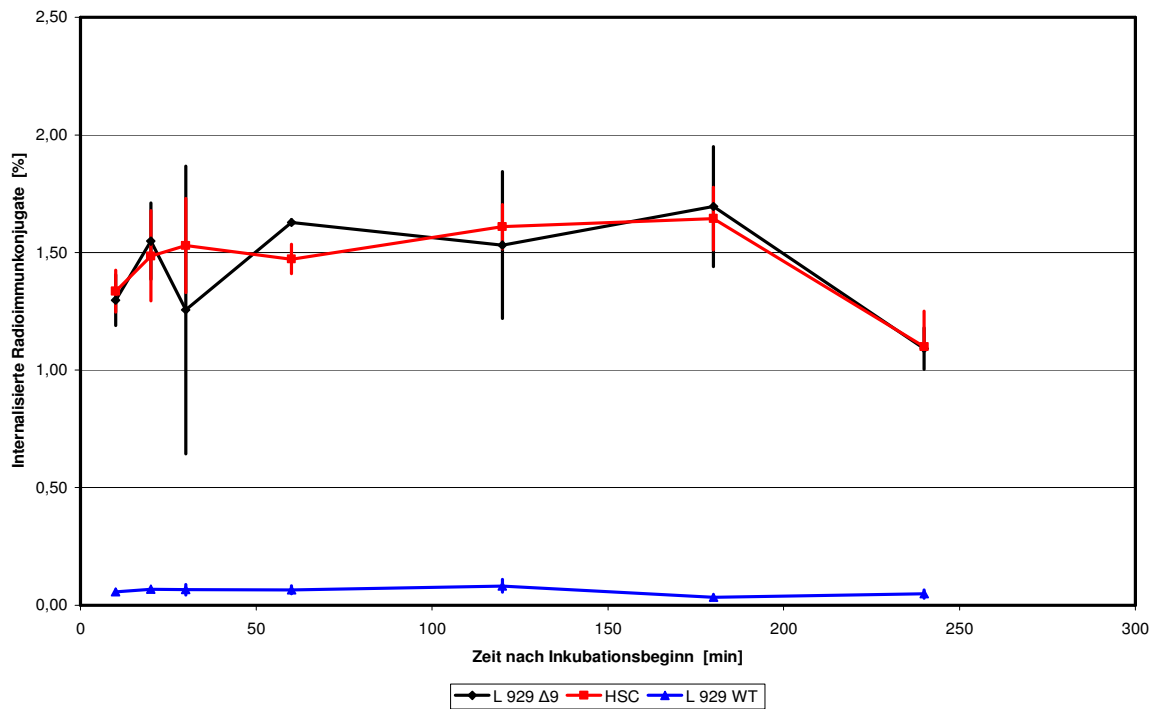


Abbildung 12: Internalisierungskinetik von ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bei 37°C (V. 37-39) bei Zelllinien mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression (L 929 $\Delta 9$, HSC) bzw. ohne $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression (L 929 WT)

4.4.4.1.1 Zelllinien mit Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin

Die Internalisierung der ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate von HSC-Zellen wurde in insgesamt 7 Experimenten bei drei verschiedenen Inkubationstemperaturen (4°C, 25°C und 37°C) analysiert. Bei 4°C wurden durchschnittlich $1,4 \pm 0,3\%$ internalisiert und $0,7 \pm 0,1\%$ der RI gebunden, wobei die Kinetik zeigt, dass bezüglich Bindung keine wesentliche Veränderung während des Beobachtungszeitraums und bezüglich Internalisierung nur ein schwacher Anstieg bis auf maximal 1,7% während des Versuchs stattfand. In den 3 Experimenten bei 25°C waren die maximal internalisierten Anteile der RI (2,4; 12,4 und 2,0%) jeweils größer als die gebundenen (0,6; 3,1 und 0,9%). Im Zeitverlauf nahm die Bindung um das 3-30fache bis mindestens 60 min nach Versuchsbeginn zu. Die Internalisierung nahm über die Zeit bis mindestens 120 min nach Versuchsbeginn um das 10-30fache zu. Bei 37°C lagen die Werte von HSC für Bindung zwischen 0,6 und 1,9% und die Werte für Internalisierung zwischen 0,4 und 1,6%. Die maximale Schwankungsbreite pro Zeitpunkt bezüglich Bindung und Internalisierung betrug innerhalb eines Experimentes das Zwei- oder Dreifache. Die detaillierten Versuchsergebnisse der Experimente mit HSC (V.19, 22, 25, 28, 31, 34, und 37) sind in Tabelle 31 im Anhang zusammengefasst.

Die 7 Experimente zur Internalisierung von ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten mit L 929 $\Delta 9$ zeigten unterschiedliche Resultate im Hinblick auf Bindungs- und Internalisierungskinetiken (0-240 min) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Bei 4°C war der gebundene Anteil (max. 1,4 %) der MAK stets höher als der internalisierte Anteil (max. 0,7%), wobei im Zeitverlauf ein schwacher Anstieg beider Fraktionen in den ersten 60 min zu verzeichnen war. Bei 25°C betrug die Anteile der internalisierten RI zwischen 0,3 und 18,8%, während die Anteile für die gebundenen RI 0,1-3,9% betrug. Die Kinetik zeigt bezüglich Bindung und Internalisierung einen starken Anstieg über mindestens 120 min (gesamte Inkubationsdauer 180 min) um das 3-20fache. Bei 37°C waren Bindung und Internalisierung in etwa gleich. Es wurden durchschnittlich $1,1 \pm 0,2\%$ der RI gebunden und durchschnittlich $1,3 \pm 0,3\%$ der RI internalisiert. Die Werte zeigten keine großen Veränderungen im Zeitverlauf der Kinetik. Die betreffenden Ergebnisse der Experimente mit L 929 $\Delta 9$ (V. 20, 23, 26, 29, 32, 36 und 38) sind in Tabelle 31 im Anhang dargestellt.

Die Versuche 40 und 42 wurden mit ^{125}I -anti $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten an L 929 $\Delta 9$ (0-420 min) und MDA $\Delta 9$ (0-300 min) durchgeführt. Dabei wurde der Überstand nach der jeweiligen Inkubationszeit mit den ungebundenen RI verworfen. Die RI wurden mit Glycin von der Zelloberfläche abgelöst. Die Anteile gebundener und internalisierter RI addierten sich zu jeweils 100%. Die internalisierten Anteile der RI betrug für MDA $\Delta 9$ für die verschiedenen Zeitpunkte zwischen 61% und 72% (Maximum nach 120 min) und für L 929 $\Delta 9$ zwischen 55% und 88% (Maximum nach 420 min). Bei MDA blieben die Werte in etwa über 300 min konstant, während bei L 929 $\Delta 9$ die gebundenen RI kontinuierlich ab- und die internalisierten RI kontinuierlich zunahm. Die einzelnen Versuchsergebnisse sind in Tabelle 31 im Anhang zusammengefasst (V. 40 und 42). Die Abbildung 13 bezieht sich neben V. 41 und 43 auch auf die hier dargestellten Experimente.

4.4.4.1.2 Zelllinien mit Expression von WT-E-Cadherin bzw. ohne Expression von E-Cadherin

HTB-135 Zellen wurden in einem Experiment bei 37°C mit ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten für einen Zeitraum von 120 min inkubiert. Dabei wurden $1,2 \pm 0,2\%$ der RI gebunden und $0,2 \pm 0,05\%$ internalisiert. Die Werte waren während der gesamten Inkubationszeit in etwa konstant. Die detaillierten Ergebnisse dieses Experimentes (V. 35) sind in Tabelle 32 im Anhang dargestellt.

Bindung und Internalisierung der ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate von L 929 WT wurden bei 4°C (1 Experiment), 25°C (3 Experimente) und 37°C (2 Experimente) beobachtet. Sowohl bei 4°C als auch bei 37°C blieben die Werte für Bindung und Internalisierung über den Zeitverlauf weitgehend konstant: bei 4°C wurden $0,5 \pm 0,1\%$ der RI gebunden und $0,1 \pm 0,05\%$ internalisiert; bei 37°C betrug die durchschnittlichen Werte für Bindung $1,0 \pm 0,3\%$ und für Internalisierung $0,2 \pm 0,1\%$. Bei 25°C war von 0-180 min ein 10-39facher Anstieg für Bindung und Internalisierung

zu verzeichnen. Von den Zellen wurden maximal 3,9% der RI gebunden und maximal 19,7% der RI internalisiert. Bezüglich detaillierter Ergebnisse der entsprechenden Versuche (V. 21, 24, 27, 30, 33 und 39) sei auf Tabelle 32 im Anhang verwiesen.

Die Versuche 41 und 43 wurden mit ^{125}I -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten an L 929 WT und MDA WT durchgeführt. Ungebundene RI wurden nach Inkubation mit dem Überstand verworfen. Die Ablösung der gebundenen RI von der Zelloberfläche erfolgte mit Glycin. Die gebundenen und internalisierten RI ergaben addiert jeweils 100%. Im Unterschied zu MDA $\Delta 9$ und L 929 $\Delta 9$ (maximal 72% bzw. 88% internalisierte RI) waren bei den Zelllinien mit Expression von WT-E-Cadherin die Werte für die gebundenen RI höher als für die internalisierten RI: bei MDA WT betrug der Anteil gebundener RI zwischen 60% und 75% während der 420-minütigen Inkubation bei 37°C, bei L 929 WT zwischen 69% und 48% mit kontinuierlicher Abnahme über 300 min. Internalisiert wurden maximal 43% der RI von MDA WT und 52% von L 929 WT. Tabelle 32 im Anhang zeigt die Versuchsergebnisse von V. 41 und 43. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

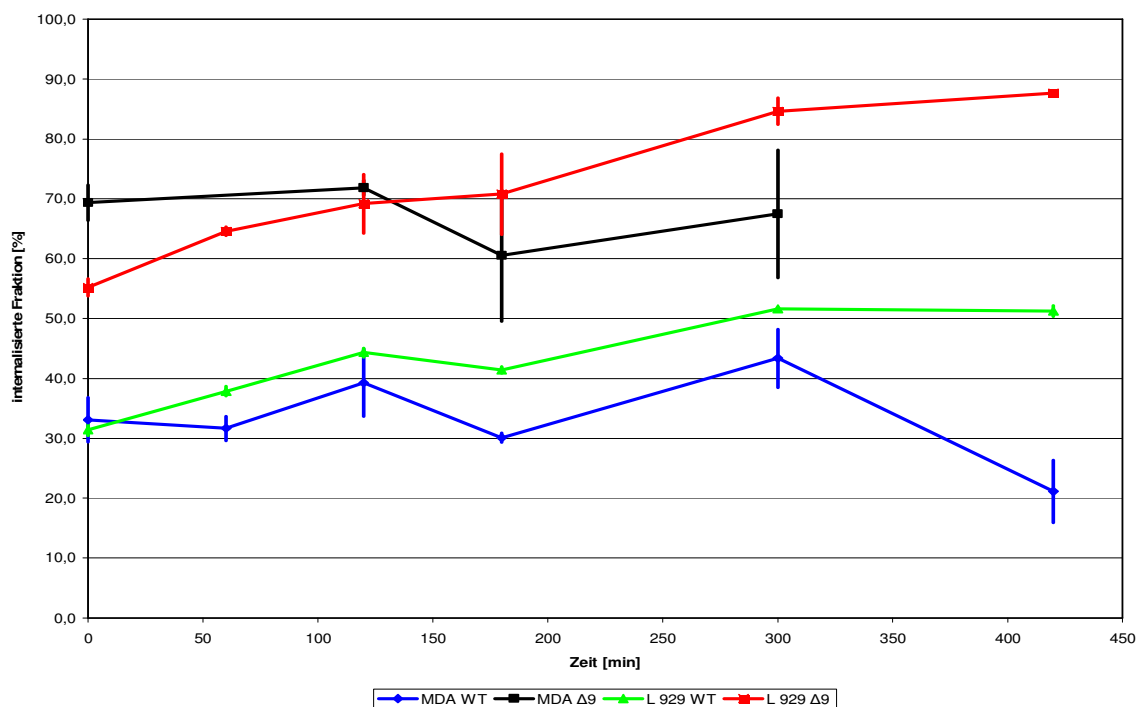


Abbildung 13: Internalisierungskinetik der ^{125}I -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bei 37°C von MDA-Zellen und murinen Fibroblasten mit Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin bzw. WT-E-Cadherin (Versuche 40-43)

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Die Ergebnisse zur Bindung und Internalisierung von RI (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) bei Zellen mit Expression von WT-E-Cadherin, ohne Expression von E-Cadherin bzw. mit Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin entsprechen nicht den Erwartungen. Z.B. fällt auf, dass sich HTB-135 ohne Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin und HSC mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-

Expression bei 37°C bezüglich Bindung von ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten kaum unterschieden (HTB-135: 1,0-1,4%; HSC: 0,6-1,9%). Die Internalisierung der RI war bei HSC etwas höher (0,4-1,6%) als bei HTB-135 (0,2-0,3%).

L 929 $\Delta 9$ internalisierten bei 4°C und 37°C einen größeren Anteil der RI als L 929 WT (z.B. bei 37°C: L 929 $\Delta 9$ 1,3 \pm 0,3%, L 929 WT 0,2 \pm 0,1%). Die Werte für die Bindung der RI waren für beide Zelllinien bei allen Temperaturen in etwa gleich und zeigten eine ähnliche Kinetik.

Der Vergleich der Internalisierung von ^{125}I -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bei MDA und L 929 zeigt, dass bei MDA die Werte mit geringen Schwankungen in etwa konstant blieben, während bei L 929 die Werte jeweils unabhängig von $\Delta 9$ - bzw. WT-E-Cadherin-Expression über den Zeitverlauf zunahmten. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 13 dargestellt. Von den Zelllinien mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression (MDA $\Delta 9$ bzw. L 929 $\Delta 9$) waren zum jeweiligen Zeitpunkt der Kinetik mehr RI internalisiert als gebunden, wogegen von Zelllinien mit WT-E-Cadherin-Expression (MDA WT und L 929 WT) jeweils mehr RI gebunden als internalisiert waren.

4.4.4.2 Internalisierung nach Entfernung der nicht gebundenen ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate

Bei diesen Experimenten wurden adhärenente Zellen (L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, HSC und HTB-135) in 24-Well-Platten bei 4°C für 60 min bzw. bei 25°C für 5 min mit ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene RI mit dem Medium entfernt und die Zellen in frischem Zellkulturmedium bei 37°C weiter inkubiert. Die Anteile gebundener und internalisierter RI wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (maximal 9 Zeiten: 0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 150, 180 min) untersucht (siehe Kapitel 3.6.4.2).

4.4.4.2.1 Zelllinien mit Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin

Der maximal internalisierte bzw. maximal gebundene Anteil der ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate von HSC zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Entfernung der RI, anschließend an die 60-minütige Inkubation bei 4°C betragen 13% (10 min) bzw. 2% (10 min). Im weiteren Verlauf nahmen die Werte sowohl für Bindung als auch für Internalisierung weiter ab.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 25°C lagen die Anteile für gebundene RI nach Entfernen der ungebundenen RI (im Folgenden auch Mediumwechsel genannt) zwischen 6% und 18% für HSC über den Zeitraum von 180 min. Die Anteile der internalisierten RI betragen respektive zwischen 8% und 47%. Die Werte für Internalisierung waren ca. 60 min nach dem Mediumwechsel am höchsten. Die Einzelergebnisse sind im Anhang in Tabelle 33 (V. 45, 50, 53 und 57) dargestellt.

Die Bindung und Internalisierung der ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate von L 929 $\Delta 9$ wurde zwischen 10 und 180 min nach Entfernen der RI (nach 60 min Inkubation bei 4°C) gemessen. Die

Werte für Internalisierung (12-30%) waren dabei in etwa viermal so hoch wie die Werte für Bindung (1-7%).

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 25°C waren die Werte für Internalisierung (untersuchter Zeitraum 0-180 min) mit 5-70% nur etwa 2-3fach so hoch wie die Werte für Bindung mit 5-21%. Auffallend war, dass die höchsten Werte 10 min nach Mediumwechsel zu beobachten waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 im Anhang (V. 46, 48, 51, 55 und 59) zusammengefasst.

4.4.4.2.2 Zelllinien mit Expression von WT-E-Cadherin bzw. ohne Expression von E-Cadherin

An HTB-135 wurde die Bindung und Internalisierung von ¹¹¹In-anti-Δ9-E-Cadherin-Konjugaten nach einer 5-minütigen Inkubation bei 25°C durchgeführt. 0-180 min nach Entfernung der nicht gebundenen RI betrug die Werte für Bindung zwischen 1 und 23% und für Internalisierung zwischen 15 und 45%. Dieses Ergebnis ist nicht erwartungsgemäß, da HTB-135 Zellen kein Δ9-E-Cadherin exprimieren und die Bindung und Internalisierung unspezifischer Art sein muss. Die Ergebnisse mit HTB-135 (V. 54 und 58) sind im Anhang in Tabelle 34 dargestellt.

Mit L 929 WT wurden die Bindung und Internalisierung von ¹¹¹In-anti-Δ9-E-Cadherin-Konjugaten sowohl nach 60 min Inkubation bei 4°C als auch nach 5 min Inkubation bei 25°C untersucht. Nach 60 min Inkubation bei 4°C waren nach dem Mediumwechsel geringfügig mehr RI gebunden (1-2%) als internalisiert (0,2-2%). Während des Zeitverlaufs von 0-180 min blieben die Werte in etwa konstant. Nach 5 min bei 25°C waren nach dem Mediumwechsel meist deutlich mehr RI internalisiert (33-52%) als gebunden (11-16%). Auch hier blieben die Werte während des untersuchten Zeitraumes in etwa konstant. Tabelle 34 im Anhang zeigt die Versuchsergebnisse im Überblick (V. 44, 47, 49, 52, 56 und 60).

Bei Zusammenschau der Ergebnisse für die Inkubation bei 25° für 5 min vor dem Mediumwechsel mit verschiedenen Zelllinien, lässt sich über die Internalisierung feststellen, dass unabhängig von der Expression des Δ9-E-Cadherins ähnlich hohe Maximalwerte erreicht wurden (HTB-135: 45%, HSC: 47%, L 929 WT: 52%, L 929 Δ9: 70%). Wurden die Zellen dagegen für 60 min bei 4°C vor dem Mediumwechsel mit ¹¹¹In-anti-Δ9-E-Cadherin-Konjugaten inkubiert, betrug die Maximalwerte für Internalisierung bei HSC 13%, bei L 929 WT 2% und bei L 929 Δ9 30%.

Bezüglich der Internalisierungskinetiken (meist im Zeitraum von 0-180 min) nach Entfernung der Radioimmunkonjugate lässt sich feststellen, dass ein Anstieg der Werte allenfalls in den ersten 10 min zu beobachten war, die Werte in den meisten Fällen jedoch konstant blieben. Eine Ausnahme davon machten die Ergebnisse bei HSC-Zellen, hier war in den Versuchen 50, 53 und 57 bis 60 min nach Kinetikbeginn ein Anstieg der Werte zu verzeichnen (von 33 zu 47%, von 11 zu 15% und von 29 zu 38%).

4.5 Überleben ausgewählter Zelllinien nach Bestrahlung mit ^{137}Cs

Das Überleben der Zellen sollte nach Bestrahlung mit ^{137}Cs in Abhängigkeit der applizierten Dosis (Gy) untersucht werden. Nach einer Dosisabschätzung der verabreichten Aktivitäten bei der Behandlung mit ^{213}Bi konnte die resultierende Strahlendosis in Gy bestimmt werden. Dies sollte den direkten Vergleich der Auswirkungen von α -Strahlung (^{213}Bi) und γ -Strahlung (^{137}Cs) an den gleichen Zelllinien ermöglichen (siehe Kapitel 4.8 und 5.7).

Dazu wurden entsprechend der zu applizierenden Dosis L 929 WT, L 929 Δ 9, HSC und HTB-135 in verschiedenen Zellkonzentrationen in 25 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und 24 h später mit ^{137}Cs bestrahlt (bis zu 11,7 Gy). 13-19 d nach Bestrahlung wurde die Anzahl der Klone bestimmt. Aus der Klonanzahl in Abhängigkeit von der Dosis (Gy) ergaben sich die Überlebenskurven, deren Parameter nach dem linear-quadratischen Modell berechnet wurden. Die Maße für die Strahlenempfindlichkeit stellen α und α/β dar (siehe Kapitel 3.7). α gibt die Steigung im linear verlaufenden Teil der Überlebenskurve an. Dabei gilt die Beziehung: je größer α , desto steiler ist der Verlauf der Überlebenskurve. Das bedeutet, dass die Schädigung der Zellen bei gleicher Dosis mit steigendem α größer wird. β ist ein Parameter, der den Verlauf der Überlebenskurve im quadratischen Bereich beschreibt. Je höher die Werte für α/β sind, desto flacher verläuft die sogenannte Schulter der Überlebenskurve, die ein Maß für die Reparaturfähigkeit der Zellen darstellt (Kauffmann G. et al, 1996). Die Werte α und α/β sind in der mathematischen Formel für die Überlebenskurve enthalten, sind jedoch nicht direkt in den Kurven abzulesen. Für alle Überlebensdaten einer Zelllinie wurde die Berechnung dieser Parameter durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und Abbildung 14 dargestellt.

L 929 Δ 9 zeigte sich gegenüber ^{137}Cs -Bestrahlung am wenigsten empfindlich, gefolgt von L 929 WT, HSC und HTB-135 als empfindlichste Zelllinie. Die α/β -Werte betragen respektive 127, 51, 21 und <0 Gy. Der Wert für HTB-135 scheint dabei nicht korrekt zu sein. Es könnte sein, dass die Berechnung, die nur an Hand von 2 Datenpunkten neben der Kontrolle ausgeführt wurde (bei den restlichen Dosierungen waren keine Klone mehr zu sehen), wegen der wenigen Datenpunkte die tatsächlichen Verhältnisse nicht wieder gibt.

Tabelle 7: Die Parameter α und α/β zur Beschreibung der Überlebenskurven nach dem linear-quadratischen Modell nach Bestrahlung verschiedener Zelllinien mit ^{137}Cs (4-11,7 Gy): α ist ein Maß für die Steigung des exponentiell verlaufenden Teils der Überlebenskurve, α/β bestimmt den Verlauf des parabelförmig verlaufenden Teils der Überlebenskurve und stellt ein Maß für die Reparaturfähigkeit der Zellen dar

V.-Nr.	Zelllinie	α in Gy ⁻¹	95% Konfidenzintervall von α		α/β in Gy	95% Konfidenzintervall von α/β	
			Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben
63, 68	HSC	0,54	0,49	0,59	20,6	13,6	27,6
65, 66	L 929 Δ 9	0,34	0,33	0,35	127,0	43,2	210,7
67, 69	L 929 WT	0,43	0,37	0,48	50,9	3,2	98,5
64	HTB-135	0,91	0,88	0,93	-2,7E+54	-	-

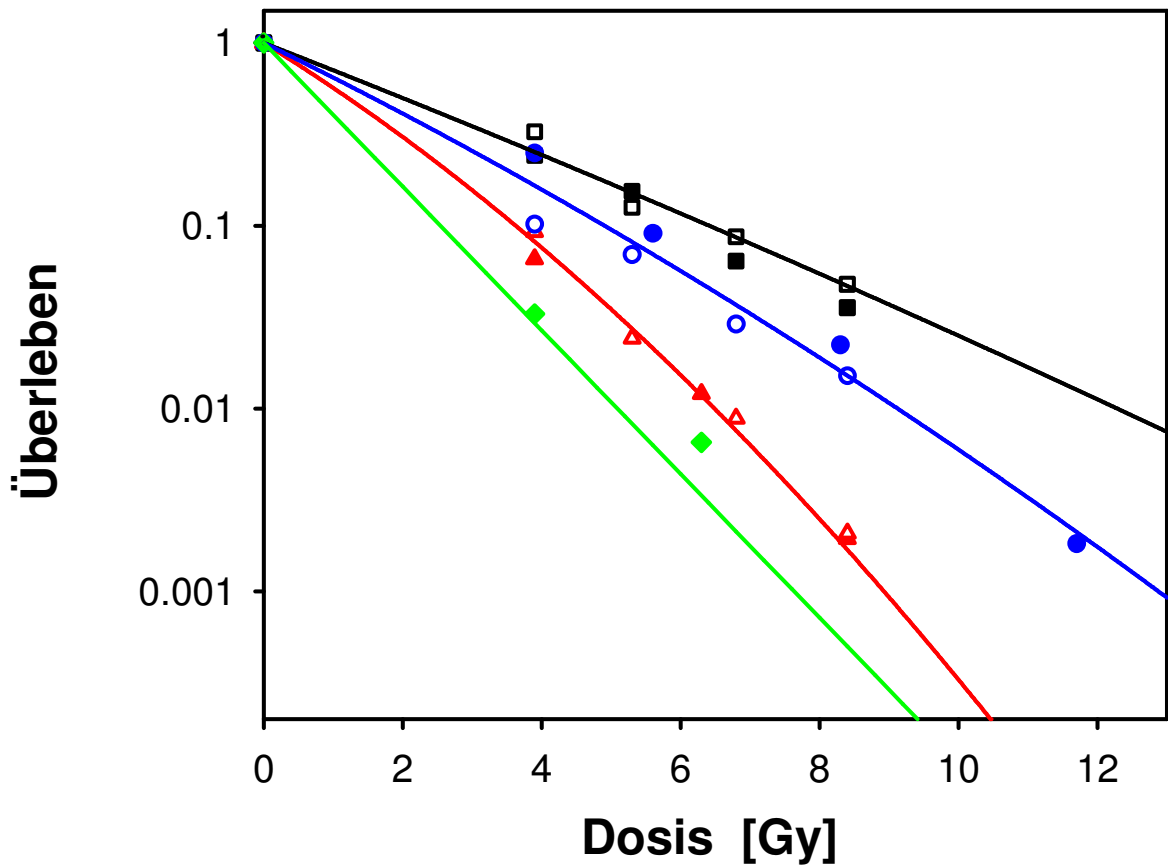


Abbildung 14: Überlebenskurven nach Bestrahlung mit ^{137}Cs (Maximaldosis 8,4-11,7 Gy) für L 929 $\Delta 9$ (schwarz), L 929 WT (blau), HSC (rot) und HTB-135 (grün), die Symbole repräsentieren die einzelnen Datenpunkte, die Linien die Überlebenskurven nach Berechnung der Parameter α und α/β (linear-quadratisches Modell)

Ein Beispiel für morphologische Veränderungen der Zellen nach Bestrahlung zeigt Abbildung 15. L 929 $\Delta 9$ zeigten nach Bestrahlung mit 3,9 Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle innerhalb einzelner Klone auch deutlich vergrößerte Zellen. Ab einem Durchmesser von 20 μm , der hier überschritten wurde, sind Zellen nicht mehr in der Lage sich zu teilen (Barrandon und Green, 1985).

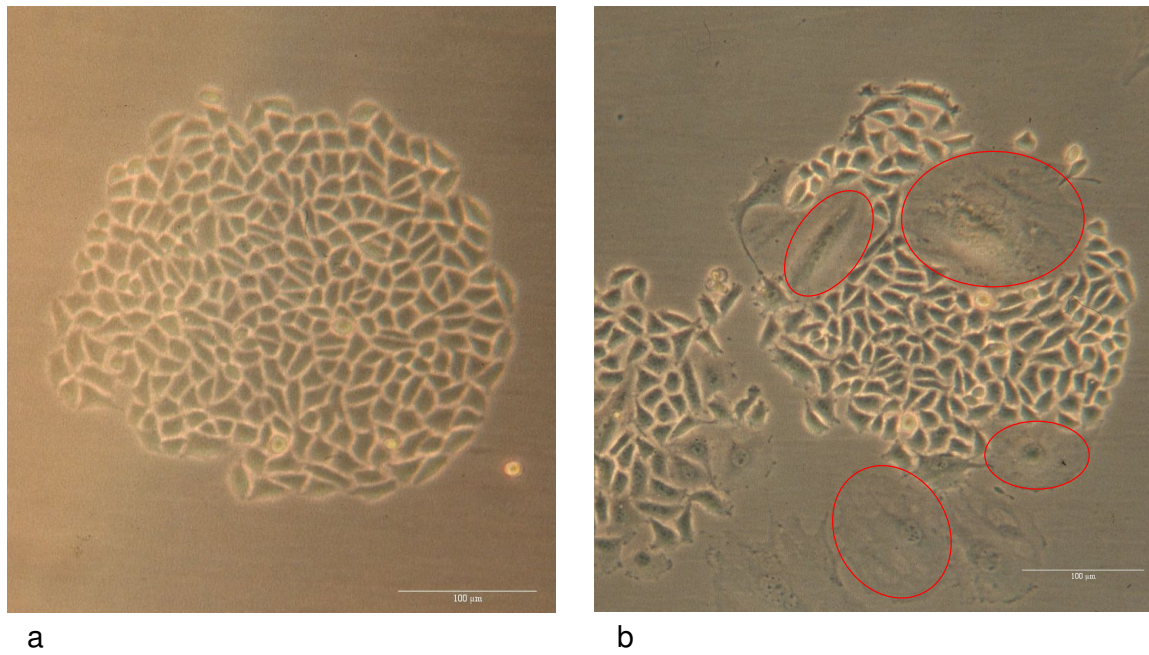


Abbildung 15: *L 929 Δ9* nach Bestrahlung mit ^{137}Cs : a unbestrahlter Kontroll-Klon, b Klon nach Bestrahlung mit 3,9 Gy, rot umrandet sind stark vergrößerte teilungsunfähige Zellen

4.6 Überleben ausgewählter Zelllinien nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Für klonogene Tests wurden unterschiedliche Anzahlen von Zellen in 96- oder 24-Well-Platten in der Regel 24 h vor Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten ausgesät. Die Inkubation mit den RI erfolgte entweder unbegrenzt (d.h. ohne Mediumwechsel) oder mit Mediumwechsel nach 45 min bzw. 90 min. Die ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate (6H8-AK) bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate (7H1-AK) wurden in Aktivitätskonzentrationen bis zu 2.000 kBq/ml appliziert. Nach 10-19 d wurden die Klone gezählt und zu den Klonen der Kontrollen (Behandlung mit kaltem MAK) in Bezug gesetzt. Daraus wurde das normierte Überleben in % (im Folgenden auch nur als Überleben bezeichnet) berechnet, wobei die Anzahl der Klone in der Kontrolle jeweils 100% Überleben entsprach. Sämtliche Daten sind im Anhang in den Tabellen 35 und 36 für ausgewählte Versuche dargestellt und werden in den folgenden Kapiteln (4.6.1 - 4.6.4) detailliert besprochen. Das Überleben wurde entweder logarithmisch oder linear gegen die Aktivitätskonzentration (kBq/ml) aufgetragen. Die lineare Darstellung hat den Vorteil, dass die Standardabweichung der Mittelwerte auch im negativen Bereich dargestellt werden kann. Um die Überlebenskurven auch an Hand der mathematischen Parameter zur Beschreibung der Überlebenskurven vergleichen zu können, wurden diese Parameter für jedes Experiment berechnet. Ergebnisse, deren Berechnung mit dem Sas-Statistik-Paket nur als annähernd gelten kann, sind gekennzeichnet (*). Der Berechnung wurde eine exponentielle Dosis-Wirkungsbeziehung zu Grunde gelegt. Die Parameter heißen α und k . Der α -Wert ist ein Maß für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit und wird in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$ angegeben. Graphisch veranschaulicht bestimmt der α -Wert die Steigung der Überlebenskurve. Der k -Wert bezeichnet den natürlichen Logarithmus der klonogenen Zellzahl pro Well und ist dimensionslos (siehe auch Kapitel 3.8, Gleichung 4).

Für die Überlebensdaten (ohne Berechnung der Parameter der Überlebenskurve) folgender Versuche wurde eine einfache Varianzanalyse (Konfidenzintervall 90%) durchgeführt:

HSC, inkubiert mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK) bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1-AK) und L 929 $\Delta 9$ sowie L 929 WT, inkubiert mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK). Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Unterschied des Überlebens von L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT, während zwischen dem Überleben von HSC, behandelt mit ^{213}Bi -6H8 bzw. ^{213}Bi -7H1 kein signifikanter Unterschied festzustellen war.

Die k -Werte sämtlicher Versuche bewegten sich im Bereich von 0,50-4,11 (entspricht einer Anzahl von klonogenen Zellen zwischen 2 und 60). Die größten Schwankungsbreiten hatten dabei die Zelllinien MDA WT (0,80-3,67) und L 929 $\Delta 9$ (0,50-3,36). Die geringste Schwankungsbreite wiesen MDA $\Delta 9$ (1,82-3,16) und L 929 WT (1,54-3,14) auf, während sich die Streubreite von MPE-600 (0,52-2,28), HTB-135 (1,46-3,52) und HSC (2,13-4,11) dazwischen befand.

Die α -Werte sämtlicher Experimente befanden sich im Bereich von 0,8-179 ml/kBq*10³. Der α -Wert als Maß für die Strahlenempfindlichkeit variierte am stärksten bei MPE-600 (14,6-179 ml/kBq*10³) und MDA Δ 9 (2,7-69,3 ml/kBq*10³). Bei MDA WT (1,5-19,6 ml/kBq*10³), L 929 Δ 9 (2,3-15,4 ml/kBq*10³) und HSC (1,7-13,7 ml/kBq*10³) ist die Variationsbreite ähnlich groß und bei HTB-135 (3,8-10,7 ml/kBq*10³) und L 929 WT (0,8-4,8) am geringsten. Die 95%-Konfidenzintervalle der Parameter k und α sind bei vorangehenden Angaben nicht berücksichtigt. Sie sind für jeden einzelnen Versuch in den Tabellen 8-15 angegeben.

4.6.1 Überleben von MPE-600 nach Inkubation mit ²¹³Bi-Immunkonjugaten

Es wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt, jeweils ohne Entfernung der RI.

In den unbestrahlten Kontrollen betrug die PEs bei Aussaat von 50 und 100 Zellen pro Well in 96-Well-Platten zwischen 0,1 und 0,15. Auf 24-Well-Platten wurden 10 und 20 Zellen pro Well ausgesät. Die PEs waren dabei zwischen 0,15 und 0,23 und bei 0,05 und 0,04.

Im ersten Experiment (V.74) wurden 50 und 100 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät und mit ²¹³Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten mit 2, 36 und 113 kBq/ml inkubiert. Daraus resultierten durchschnittliche Klonzahlen zwischen 0,3 und maximal 15 Klonen/Well. Das normierte Überleben (Mittelwert \pm SD) betrug bei einer Zellzahl von 50/Well 100 \pm 70% (Kontrolle), 136 \pm 93% (2 kBq/ml), 37 \pm 31% (36 kBq/ml) und 6 \pm 10% (113 kBq/ml), bei 100 Zellen/Well betrug das normierte Überleben respektive 100 \pm 54%, 101 \pm 57%, 30 \pm 23% und 2 \pm 4%. Die Berechnung der Parameter zur mathematischen Darstellung der Überlebenskurve ergab für α Werte von 29 (50 Zellen/Well) und 33 (100 Zellen/Well) ml/kBq*10³. Die Parameter bedingen parallel verlaufende Überlebenskurven. Hieraus ist abzuleiten, dass die Variation der Zellzahl in diesem Fall zu keiner Änderung der Steigung der Überlebenskurve führte.

Im zweiten Experiment (V.80) wurden 10 und 20 Zellen/Well in 24-Well-Platten ausgesät. Die Inkubation mit ²¹³Bi-anti- Δ 8-E-Cadherin-Konjugaten (5 und 15 kBq/ml) erfolgte zum einen ohne Vorinkubation und zum anderen nach Vorinkubation der Zellen mit kaltem anti- Δ 8-E-Cadherin (Zugabe von 1 μ g in 10 μ l PBS, 3 h vor Zugabe der RI).

Bei einer Aussaat von 10 Zellen/Well bildeten sich bei der Kontrolle und 5 kBq/ml in etwa gleich viele Klone unabhängig von der Vorinkubation. Ohne Vorinkubation betrug das normierte Überleben (Mittelwert \pm SD) respektive 100 \pm 70% und 71 \pm 71%, mit Vorinkubation 100 \pm 88% und 70 \pm 48%. Bei der Aktivitätskonzentration von 15 kBq/ml fiel das Überleben in den Wells mit Vorinkubation niedriger (3 \pm 12%) aus als ohne Vorinkubation (29 \pm 52%). Diese Ergebnisse führten auch zu deutlichen Unterschieden bei α : 82 ml/kBq*10³ ohne Vorinkubation und 179 ml/kBq*10³ mit Vorinkubation.

Bei einer Aussaat von 20 Zellen/Well betrug das Überleben bei der Kontrolle, 5, und 15 kBq/ml ohne Vorinkubation entsprechend $100 \pm 72\%$, $70 \pm 56\%$ und $35 \pm 41\%$ und mit Vorinkubation $100 \pm 59\%$, $86 \pm 41\%$ und $50 \pm 29\%$. Der Wert α , der in den Überlebenskurven die Steilheit angibt, betrug für die Wells ohne Vorinkubation $70 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$ und für die Wells mit Vorinkubation $47 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$. Der k-Wert, der die Klonogenität der Zellen wiedergibt, lag für die Proben mit 10 Zellen/Well etwa bei 0,5 (entspricht 1,6 Klonen) und für die Proben mit 20 Zellen/Well etwa bei 1,5 (entspricht 4,5 Klonen). Die Ergebnisse der Berechnung der Parameter für die Überlebenskurven k und α sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Die Annahme, dass eine Vorinkubation der Zellen mit kaltem AK eine schützende Wirkung ausübt, konnte mit dem vorliegenden Experiment an $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zellen mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten nicht geprüft werden. Das entsprechende Experiment mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten musste leider wegen zu geringer PE von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Errechnete Parameter für die Überlebenskurven (bei exponentieller Dosis-Wirkungsbeziehung) von MPE-600 nach Inkubation mit bis zu 15 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (V.74) und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (V.80), α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$ bestimmt die Steigung der Überlebenskurve, k gibt den natürlichen Logarithmus des Überlebens an, Das 95% Konfidenzintervall gibt die Schwankung der Parameter an, die mit den zu Grunde liegenden Daten (Klone/Well) möglich sind, A: ohne Vorinkubation, B: mit Vorinkubation mit kaltem anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin

V.-Nr.	Well-Platte	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$	95% Konfidenzintervall von α		Bemerkung
				Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben	
74	96	0,10	1,31	1,23	1,39	29,1	24,9	33,2	50 Zellen/Well (Z.)
74	96	0,15	2,28	2,23	2,33	33,0	30,0	36,0	100 Z.
80	24	0,17	0,54	0,27	0,82	81,7	38,5	124,9	10 Z., ohne Vorinkubation (A)
80		0,23	1,52	1,35	1,69	69,9	45,0	94,8	20 Z., A
80		0,15	0,52	0,22	0,81	178,5	104,2	252,8	10 Z., mit Vorinkubation (B)
80		0,19	1,37	1,19	1,54	46,7	22,8	70,6	20 Z., B

4.6.2 Überleben von MDA-Zellen nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten

Es wurden 6 Experimente mit MDA $\Delta 9$ und 7 Experimente mit MDA WT jeweils mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten mit verschiedenen Inkubationszeiten (keine Entfernung der RI, 30 min, 45 min Inkubation mit anschließendem Mediumwechsel) durchgeführt. Die verwendeten Aktivitätskonzentrationen lagen im Bereich von 0,2 – 1.780 kBq/ml. Für die Versuche wurden sowohl 96-Well-Platten als auch 24-Well-Platten verwendet.

Der Vergleich der Ergebnisse für MDA $\Delta 9$ und MDA WT soll zeigen, ob $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierende Zellen selektiv durch ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate geschädigt werden.

Die unbestrahlten Kontrollen ergaben für MDA $\Delta 9$ bei einer Aussaat von 50, 70 bzw. 100 Zellen pro Well in 96-Well-Platten PEs zwischen 0,13 und 0,23. In 24-Well-Platten lag die PE bei einer Aussaat von 120 bzw. 400 Zellen/Well zwischen 0,03 und 0,08. Alle Experimente wurden in die Auswertung mit aufgenommen.

Für MDA WT konnten in 96-Well-Platten nach Aussaat von 20 und 150 Zellen pro Well PEs von 0,12-0,40 erzielt werden. In 24-Well-Platten betrug die PE nach Aussaat von 180, 200 bzw. 400 Zellen pro Well zwischen 0,02-0,21.

4.6.2.1 Inkubation mit kaltem anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin in 96-Well-Platten vor der Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten

In 96-Well-Platten wurden zwei Experimente (V.76 und V.75) mit MDA $\Delta 9$ (50 und 100 Zellen/Well) und MDA WT (20 Zellen/Well) parallel jeweils mit und ohne Vorinkubation mit kaltem MAK durchgeführt. Zur Vorinkubation wurde in jedes Well 1 μg anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin in 10 μl 3 h vor Zugabe der RI gegeben. Die RI wurden nicht entfernt.

MDA $\Delta 9$ wurden mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Aktivitätskonzentrationen von 54 und 193 kBq/ml (mit Vorinkubation) bzw. 58 und 210 kBq/ml (ohne Vorinkubation) behandelt. Bei einer Aussaat von 50 Zellen/Well wuchsen zwischen 2 und 11 Klone/Well. Das Überleben betrug für die Proben mit Vorinkubation $100\pm 45\%$ (Kontrolle), $72\pm 40\%$ (54 kBq/ml) und $31\pm 28\%$ (193 kBq/ml). Der berechnete α -Wert stellt nur eine Annäherung dar und betrug $6,2 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$. Ohne Vorinkubation mit kaltem AK führte die Behandlung zu einem Überleben von $100\pm 36\%$ (Kontrolle), $83\pm 31\%$ (58 kBq/ml) und $39\pm 37\%$ (210 kBq/ml). Die Berechnung von α ergab einen als annähernd zu betrachtenden Wert mit $4,3 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$. Bei einer Aussaat von 100 Zellen/Well ließen sich pro Well zwischen 9 und 18 Klone zählen. In den Wells mit Vorinkubation betrug das Überleben $100\pm 33\%$ (Kontrolle), $68\pm 21\%$ (54 kBq/ml) und $48\pm 20\%$ (193 kBq/ml). Die nachfolgende Berechnung der Parameter der Überlebenskurve ergab ein als annähernd zu betrachtendes α von $3,7 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$. Ohne Vorinkubation mit kaltem MAK betrug das normierte Überleben jeweils $100\pm 16\%$ (Kontrolle), $93\pm 27\%$ (58 kBq/ml) und $56\pm 28\%$ (210 kBq/ml) und α $2,7 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$.

MDA WT wurde mit Aktivitätskonzentrationen der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate von 17 und 59 kBq/ml (mit Vorinkubation) sowie 18 und 64 kBq/ml (ohne Vorinkubation) inkubiert. Es bildeten sich zwischen 5 und 8 Klone/Well. Das Überleben betrug für Wells mit Vorinkubation $100\pm 46\%$ (Kontrolle), $76\pm 36\%$ (17 kBq/ml) und $74\pm 39\%$ (59 kBq/ml) sowie für Wells ohne Vorinkubation $100\pm 35\%$ (Kontrolle), $80\pm 30\%$ (18 kBq/ml) und $67\pm 30\%$ (64 kBq/ml). Die α -Werte betrug nach Berechnung $4,2 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$ (mit Vorinkubation) und als annähernd zu betrachtender Wert für die Wells ohne Vorinkubation $5,8 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$.

Die Ergebnisse belegen, dass eine Vorinkubation mit Überschuss an kaltem AK keinen positiven Einfluss auf das Überleben hat.

Als natürlicher Logarithmus der klonogenen Zellen stimmen die k -Werte von 1,86 – 2,88 (entspricht Klonzahlen von 7-18) mit den tatsächlichen Klonzahlen von 2-18 weitgehend überein. Die α -Werte lagen im Bereich zwischen 2,7 und 6,2 ml/kBq*10³ für MDA-Zellen.

4.6.2.2 Inkubation mit ²¹³Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten in 96-Well-Platten ohne Entfernung der Radioimmunkonjugate

In den Experimenten V.77 und V.78 wurden MDA WT (150 Zellen/Well) und MDA Δ 9 (70 Zellen/Well) in 96-Well-Platten jeweils mit 121 und 462 kBq/ml ²¹³Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten inkubiert, wobei die RI nicht entfernt wurden.

Daraus resultierten bei MDA WT durchschnittlich 18 (Kontrolle), 11 (121 kBq/ml) und 3 (462 kBq/ml) Klone/Well, was Überlebenswerten von respektive 100±21%, 63±22% und 16±25% entsprach. Der Parameter α für die Überlebenskurve betrug 3,0 ml/kBq*10³.

MDA Δ 9 zeigte dagegen ein Klonwachstum bei den entsprechenden Aktivitätskonzentrationen von durchschnittlich 9 (Kontrolle), 3 (121 kBq/ml) und 0,4 (462 kBq/ml) Klonen/Well, entsprechend einem Überleben von respektive 100±43%, 30±30% und 4±22%. Der Wert α betrug 8,1 ml/kBq*10³.

Die Überlebenskurven zeigen, dass Δ 9-E-Cadherin exprimierende MDA-Zellen sensibler auf die RI reagieren als WT-E-Cadherin-exprimierende Zellen (siehe Abbildung 16 b).

4.6.2.3 Inkubation mit ²¹³Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten in 24-Well-Platten mit verschiedenen Inkubationszeiten

Weitere Experimente wurden in 24-Well-Platten ohne Entfernung der RI, nach Inkubation von 30 min und nach Inkubation von 45 min durchgeführt.

Ohne Entfernung der RI der Aktivitätskonzentrationen von 9 und 17 kBq/ml (V.81 und V.82) der ²¹³Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugate konnte zwischen MDA WT (180 Zellen/Well) mit Überleben von respektive 100±20% (Kontrolle), 93±26% (9 kBq/ml) und 62±24% (17 kBq/ml) und MDA Δ 9 (120 Zellen/Well) mit Überleben von jeweils 100±32% (Kontrolle) 103±47% (9 kBq/ml) und 56±31% (17 kBq/ml) nahezu kein Unterschied festgestellt werden. Dementsprechend sind die α -Werte mit 19,6 ml/kBq*10³ für MDA WT und 29,7 ml/kBq*10³ für MDA Δ 9 in der gleichen Größenordnung.

In Experiment 83 und 84 wurden jeweils 400 Zellen MDA WT und MDA Δ 9 pro Well mit 52 und 103 kBq/ml der ²¹³Bi-anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugate für 30 min inkubiert. Das Überleben war bei MDA Δ 9 mit 100±36% (Kontrolle), 29±19% (52 kBq/ml) und 24±16% (103 kBq/ml) deutlich geringer als bei MDA WT mit respektive 100±29%, 82±21% und 70±18%.

Mit einer Inkubationszeit der RI von 45 min und einem anschließenden Waschvorgang vor Zugabe von frischem Medium wurden insgesamt 3 Experimente mit MDA WT (V.102-104) und 2 Experimente mit MDA Δ 9 (V.105 und V.106) durchgeführt. Dabei wurden beide Zelllinien mit

identischen Aktivitätskonzentrationen der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bis zu 313 kBq/ml inkubiert. Im Versuch 102 wurden MDA WT mit bis zu 1.780 kBq/ml inkubiert.

In den Experimenten 103 (MDA WT) bzw. 105 (MDA $\Delta 9$) ergaben sich bei 0-2, 4, 8, 16 und 31 kBq/ml Überlebenswerte von $100\pm 25\%$ (Kontrolle), $98\pm 27\%$ (2 kBq/ml), $88\pm 19\%$ (4 kBq/ml), $70\pm 28\%$ (8 kBq/ml), $80\pm 18\%$ (16 kBq/ml) und $65\pm 12\%$ (31 kBq/ml) bzw. respektive $100\pm 67\%$, $75\pm 28\%$, $54\pm 11\%$, $46\pm 33\%$, $32\pm 19\%$ und $39\pm 27\%$. Das geringere Überleben für MDA $\Delta 9$ spiegelt sich auch in einem ca. siebenfach höheren α -Wert ($69,3 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$) für MDA $\Delta 9$ als für MDA WT ($10,0 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$) wieder. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 16 a graphisch dargestellt.

Auch bei höheren Aktivitätskonzentrationen der RI bis maximal 313 kBq/ml zeigte sich die $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierende Zelllinie sensibler gegenüber den ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten als die WT-E-Cadherin exprimierende Zelllinie (V. 106 und 104). Dies belegen folgende Werte für das Überleben: $100\pm 44\%$ (Kontrolle), $79\pm 42\%$, $95\pm 43\%$ und $45\pm 16\%$ (MDA WT) und $100\pm 37\%$ (Kontrolle), $115\pm 62\%$, $40\pm 26\%$ und $5\pm 6\%$ (MDA $\Delta 9$) bei Aktivitätskonzentrationen von 7, 61 und 313 kBq/ml.

In Experiment 102 wurden MDA WT mit 3, 31, 330 und 1.780 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten inkubiert. Daraus resultierte Überleben von $100\pm 132\%$ (Kontrolle), $52\pm 56\%$, $61\pm 44\%$, $25\pm 40\%$ und $8\pm 18\%$. Der α -Wert als Maß für die Strahlenempfindlichkeit der MDA-WT Zellen lag hier mit $4,0 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$ in der gleichen Größenordnung wie in den vorangegangenen Versuchen ($2,3$; $10,0$; $19,6$ und $3,5 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$).

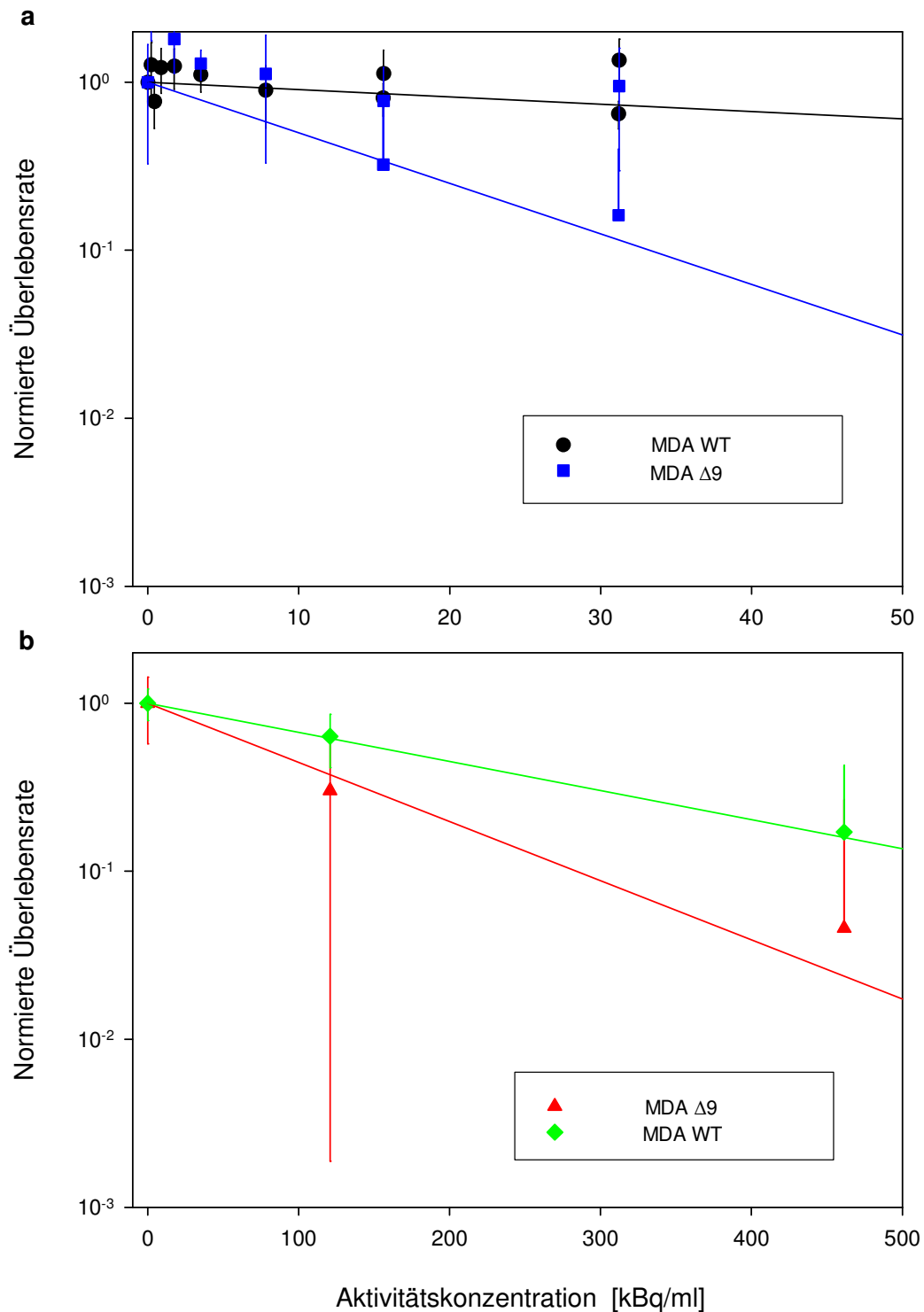


Abbildung 16: Überleben von MDA WT bzw. MDA $\Delta 9$ nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten; $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierende Zellen zeigen deutlich geringeres Überleben als WT-E-Cadherin-exprimierende Zellen. Die Datenpunkte mit Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SD (teilweise wegen logarithmischer Darstellung nur Darstellung der oberen SD möglich). Die Überlebenskurven wurden an Hand des berechneten α -Wertes erstellt

a Versuche in 24-Well-Platten mit Aktivitätskonzentrationen bis 31 kBq/ml und Inkubation für 45 min

b Versuche in 96-Well-Platten mit Aktivitätskonzentrationen bis 462 kBq/ml und ohne Entfernung der RI

Mit Ausnahme der Experimente in 24-Well-Platten ohne Entfernung der RI nach Inkubation zeigten alle Experimente sowohl in 96-, als auch in 24-Well-Platten, dass das Überleben von MDA $\Delta 9$ durch Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten stärker reduziert wurde als das von MDA WT. Das konnte sowohl für vergleichsweise geringe Aktivitätskonzentrationen bis zu 31 kBq/ml, als auch relativ hohe bis zu 500 kBq/ml gezeigt werden (siehe Abbildung 16).

Die berechneten Parameter α und k für die Überlebenskurven sowie deren Konfidenzintervalle sind für MDA WT in Tabelle 9 und für MDA $\Delta 9$ in Tabelle 10 zusammengefasst.

Für die Versuche 84 und 106 wurden wegen sehr niedriger PEs (0,05 und 0,06) keine Berechnungen durchgeführt.

*Tabelle 9: Errechnete Parameter der Überlebenskurven (bei exponentieller Dosis-Wirkungsbeziehung) von MDA WT nach Inkubation mit 0-462 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten; α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$ bestimmt die Steigung der Überlebenskurve; k gibt den natürlichen Logarithmus des Überlebens an; Das 95% Konfidenzintervall gibt die Schwankung der Parameter an, die mit den zu Grunde liegenden Daten (Klone/Well) in 95% der Fälle möglich sind, A: ohne Vorinkubation, B: mit Vorinkubation mit kaltem anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin, Parameter, die als annähernde Werte gelten, sind mit * gekennzeichnet*

V.-Nr.	Well-Platte	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$	95% Konfidenzintervall von α		Bemerkung
				Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben	
75	96	0,40	2,02*	1,91*	2,14*	5,8*	2,4*	9,2*	20 Z., A
75	96	0,35	1,86	1,73	1,99	4,2	0,4	7,9	20 Z., B
77	96	0,02	2,88*	2,83*	2,92*	3,0*	3,7*	4,3*	ohne Waschen
81	24	0,13	3,48	3,44	3,53	19,6	15,1	24,0	ohne Waschen
103	24	0,26	3,66	3,62	3,71	10,0	7,5	12,6	45 min Inkubation (Ink), waschen (w), Mediumwechsel (MW)
83	24	0,09	3,56	3,49	3,62	3,5	2,4	4,5	30 min Ink, w, MW
104	24	0,16	3,39	3,34	3,43	2,3	1,9	2,7	45 min Ink, w, MW
102	96	0,02	2,88	2,83	2,92	4,0	3,7	4,3	45 min Ink, w, MW

*Tabelle 10: Errechnete Parameter der Überlebenskurven (bei exponentieller Dosis-Wirkungsbeziehung) von MDA $\Delta 9$ nach Inkubation mit 0-462 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten; α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$ bestimmt die Steigung der Überlebenskurve; k gibt den natürlichen Logarithmus des Überlebens an; Das 95% Konfidenzintervall gibt die Schwankung der Parameter an, die mit den zu Grunde liegenden Daten (Klone/Well) in 95% der Fälle möglich sind, A: ohne Vorinkubation, B: mit Vorinkubation mit kaltem anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin, Parameter, die als annähernde Werte gelten, sind mit * gekennzeichnet*

V.-Nr.	Well-Platte	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$	95% Konfidenzintervall von α		Bemerkung
				Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben	
76	96	0,23	2,45*	2,38*	2,53*	4,3*	3,3*	5,3*	50 Z., A
76	96	0,16	2,78*	2,72*	2,85*	2,7*	2,0*	3,5*	100 Z., A
76	96	0,15	2,01*	1,89*	2,13*	6,2*	4,8*	7,5*	50 Z., B
76	96	0,18	2,88*	2,80*	2,96*	3,7*	3,0*	4,5*	100 Z., B
78	96	0,30	2,18*	2,11*	2,24*	8,1*	7,3*	8,9*	
82	24	0,08	2,32	2,20	2,44	29,7	17,7	41,7	
105	24	0,03	1,82	1,69	1,95	69,3	56,6	81,9	

Die Empfindlichkeit α von MDA WT gegenüber der Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bewegte sich bei Versuchen in 24-Well-Platten von 2,3 bis $19,6 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$ und bei Versuchen in 96-Well-Platten zwischen 3,0 und $5,8 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$. Die hohen α -Werte (19,6 und $10,0 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$) fanden sich bei den Versuchen 81 und 103 mit sehr niedrigen Aktivitätskonzentrationen (bis 31 kBq/ml) in 24-Well-Platten. Der Parameter α variierte für MDA $\Delta 9$ in 96-Well-Platten zwischen 2,7 und $8,1 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$ und in 24-Well-Platten zwischen 29,7 und $69,3 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$.

4.6.3 Überleben von Magenkarzinomzelllinien nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Mit HTB-135 wurden 4 Experimente und mit HSC 15 Experimente jeweils in 24-Well-Platten durchgeführt. HTB-135 exprimiert im Gegensatz zu HSC kein $\Delta 9$ -E-Cadherin. Das Überleben von HTB-135 und HSC wurde nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (bis 428 kBq/ml) verglichen. Die Inkubation erfolgte für 45 min, danach wurden die Zellen vor Zugabe von frischem Medium einmal mit PBS gewaschen (Kapitel 4.6.3.1).

Das Überleben von HSC wurde nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (binden nicht an $\Delta 9$ -E-Cadherin) bei Aktivitätskonzentrationen bis 1.950 kBq/ml verglichen. Die Inkubationszeit betrug 90 min, die Entfernung der RI erfolgte durch Mediumwechsel (Kapitel 4.6.3.2).

Mit beiden experimentellen Ansätzen sollte die spezifische zytotoxische Wirkung von ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten an $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zellen analysiert werden.

Die PEs von unbehandelten (nur kalter MAK) HTB-135 Zellen bei Aussaat von 300, 500 und 600 Zellen pro Well (aus 4 Experimenten) variierten zwischen 0,01 und 0,05. In zwei Experimenten davon wurde die niedrigste Aktivitätskonzentration (V.99: 1 kBq/ml , V.101: 13 kBq/ml) als Kontrolle verwendet, weil in der eigentlichen Kontrolle keine Klone gewachsen waren.

Bei HSC variierte die PE unbehandelter Kontrollen aus 15 Experimenten bei Aussaat von 80 Zellen/Well von 0,24 bis 0,77. Die Häufigkeitsverteilung der Klone/Well aller Kontrollwerte ($n=325$ Wells) ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Ergebnisse scheinen nicht normalverteilt zu sein. Die Häufigkeitsverteilung erstreckt sich vielmehr „bandförmig“ bis zu etwa 60 Klonen/Well und nimmt dann ab.

Für HSC konnte die Überlebensrate von Experimenten mit 45 min Inkubationszeit mit den Überlebensraten aus Experimenten mit 90 min Inkubation für den Aktivitätsbereich bis etwa 600 kBq/ml miteinander verglichen werden. Dabei unterschied sich das normierte Überleben in beiden Gruppen (45 min und 90 min) bei der höchsten Aktivitätskonzentration (428 und 673 kBq/ml) mit jeweils 4% nicht. Der durchschnittliche Wert für α aus den Experimenten mit 45 min

Inkubationszeit (V.89, 90 und 91) betrug $9,2 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$. Der durchschnittliche Wert für α aus den Versuchen mit 90 min Inkubationszeit (V.108, 109, 115 und 116) betrug $4,3 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$. Der Unterschied der Werte im Sinne einer geringeren Schädigung der Zellen bei einer Inkubationszeit von 90 min lässt sich nur durch Schwankungen der Klonzahlen erklären und ist als gering anzusehen.

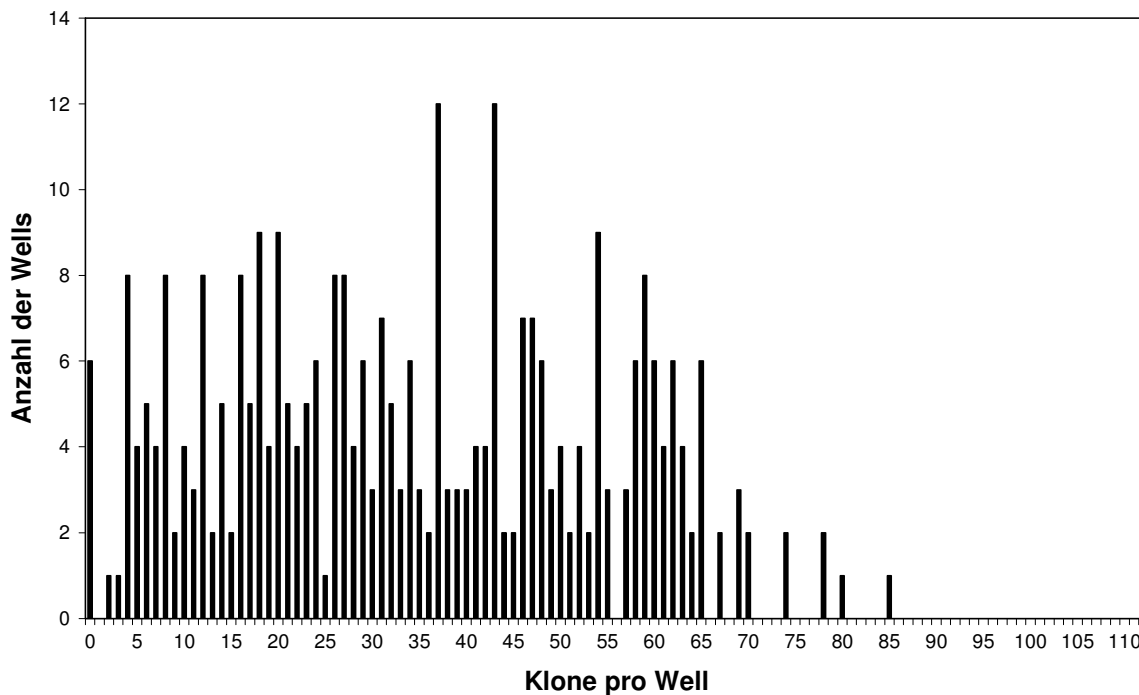


Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung von Wells mit gleicher Klonzahl bei Aussaat von 80 HSC- Zellen/Well aus den Kontrollen (325 Einzelwerte): Annähernd bandförmige Verteilung der Klonzahlhäufigkeit zwischen 0 und 65 Klonen/Well

4.6.3.1 Überleben von HTB-135 und HSC nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten

Mit HSC und HTB-135 standen zwei Magenkarzinomzelllinien zur Verfügung, von denen eine $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimiert (HSC) und die andere nicht (HTB-135). Für beide Zelllinien wurde das Überleben nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten im klonogenen Test ermittelt. Dazu wurden dreimal je zwei Experimente mit HSC und HTB-135 parallel (Versuch 89/99, 90/100 und 91/101) in 24-Well-Platten durchgeführt, wobei 300, 500 oder 600 Zellen der Zelllinie HTB-135, bzw. 80 Zellen der Zelllinie HSC pro Well ausgesät wurden. Die Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bis 428 kBq/ml erfolgte für 45 min. Vor Zugabe von frischem Medium nach Entfernung der RI wurden die adhärennten Zellen einmal mit PBS gewaschen.

Nach Inkubation von HTB-Zellen mit RI in Aktivitätskonzentrationen von 1, 12, 140 und 316 kBq/ml (300 Zellen/Well, V.99) betrug das Überleben $100\pm 58\%$, $86\pm 54\%$, $30\pm 26\%$ und $0,5\pm 2\%$ (0-4 Klone/Well). Bei HSC (V.89) betrug das Überleben entsprechend 1, 12, 140 und 316 kBq/ml $100\pm 28\%$ (unbehandelte Kontrolle), $39\pm 18\%$, $36\pm 18\%$, $10\pm 7\%$ und $3\pm 5\%$ (1-24 Klone/Well). An Hand dieser Ergebnisse wurde für HTB-135 ein α -Wert von $10,7 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$ und ein k-Wert von 1,46, für HSC ein α -Wert von $12,1 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$ und ein k-Wert von 2,7 berechnet.

In zwei weiteren Versuchen (V.100/V.90) konnten bei 26 und 272 kBq/ml Überlebenswerte von $100\pm 28\%$ (Kontrolle), $67\pm 25\%$ und $32\pm 16\%$ für HTB-135 und $100\pm 18\%$ (Kontrolle), $82\pm 24\%$ und $21\pm 12\%$ für HSC ermittelt werden. Dabei wuchsen 5-15 HTB-135-Klone und 4-20 HSC-Klone. Die α -Werte betragen für HTB-135, bzw. HSC 3,8 bzw. 5,7 $\text{ml/kBq}\cdot 10^3$, die k-Werte 2,6 bzw. 3,0. Die Datenpunkte und die mit den Parametern α und k erstellten Überlebenskurven sind in Abbildung 18 in halblogarithmischem Maßstab dargestellt.

In einem dritten experimentellen Ansatz mit HTB-135 (V.101) bzw. HSC (V. 91) überlebten bei Aktivitätskonzentrationen von 13, 41, 83 und 428 kBq/ml der RI $100\pm 30\%$, $80\pm 31\%$, $57\pm 24\%$ und $20\pm 10\%$ bzw. $100\pm 24\%$, $40\pm 22\%$, $29\pm 15\%$ und $4\pm 6\%$. In V.101 wurde die niedrigste Aktivitätskonzentration als Kontrolle verwendet, weil in der eigentlichen Kontrolle keine Klone gewachsen waren. Die Werte α für HTB-35 bzw. HSC errechneten sich zu $3,9 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$ bzw. $9,8 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$. Die k-Werte waren mit 2,3 (HTB-135) und 2,8 (HSC) ähnlich hoch wie in den vorher beschriebenen Versuchen.

Ein einzelnes Experiment mit HTB-135 (V.98) ergab für Aktivitätskonzentrationen der RI von 20 und 101 kBq/ml normierte Überlebensraten von $100\pm 16\%$ (Kontrolle), $96\pm 16\%$ und $41\pm 15\%$ (13-32 Klone). Die berechneten Werte α und k betragen hier $9,0 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$ und 3,5.

Für die beschriebenen Experimente sind die Parameter α und k mit Konfidenzintervallen in Tabelle 11 zusammengefasst. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Alle Mittelwerte der Experimente mit HSC und HTB-135 sind als Einzelpunkte mit der jeweiligen SD erfasst. Stellvertretend sind die Überlebenskurven derjenigen zwei Experimente mit den höchsten Aktivitätskonzentrationen (bis 428 kBq/ml) (V. 91: HSC, V.101: HTB-135) an Hand der berechneten α - und k-Werte aufgezeichnet.

In der Regel wurde das Überleben von HSC durch die ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate stärker reduziert als das von HTB-135 (Ausnahme: 12 kBq/ml in V.100/V.90). Dabei waren die Unterschiede bei Aktivitätskonzentrationen bis zu 140 kBq/ml stärker ausgeprägt als bei Aktivitätskonzentrationen ab 272 kBq/ml. Auch die α -Werte waren für HTB-135, entsprechend flacher verlaufenden Überlebenskurven, für alle Experimente niedriger ($3,8$ - $10,7 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$) als für HSC ($5,7$ - $12,1 \text{ ml/kBq}\cdot 10^3$). Der Unterschied entspricht der Hypothese wonach ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate Zellen mit $\Delta 9$ -E-Cadherin (HSC) spezifisch und damit stärker schädigen als Zellen ohne $\Delta 9$ -E-Cadherin (HTB-135). Jedoch ist der Unterschied angesichts der großen Streuung

der Daten als sehr gering anzusehen. Das Überleben von Zellen ohne $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression wurde nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten vergleichsweise stark reduziert. Die k-Werte, die dem natürlichen Logarithmus der klonogenen Zellen entsprechen, lagen für HTB-135 zwischen 1,46 und 3,52. Das entspricht zwischen 4 und 34 Klonen nicht bestrahlter Zellen. Diese Werte decken sich gut mit den tatsächlich ermittelten Kontrollwerten zwischen 4 und 32 Klonen/Well. Die berechnete Überlebenskurve stimmt daher gut mit den erhobenen Werten überein. Die berechneten k-Werte für HSC betragen zwischen 2,7 und 2,9. Für nicht bestrahlte Zellen ergeben sich aus diesen Werten Klonzahlen von 15 bis 18 pro Well. Diese Werte entsprechen nicht ganz den tatsächlich ermittelten Kontrollwerten (19-24 Klone/Well). Daher dürfte die Überlebenskurve an Hand der berechneten Parameter das tatsächliche Überleben eher unterschätzen. Das wiederum relativiert den geringen Unterschied des Überlebens zwischen HTB-135 und HSC.

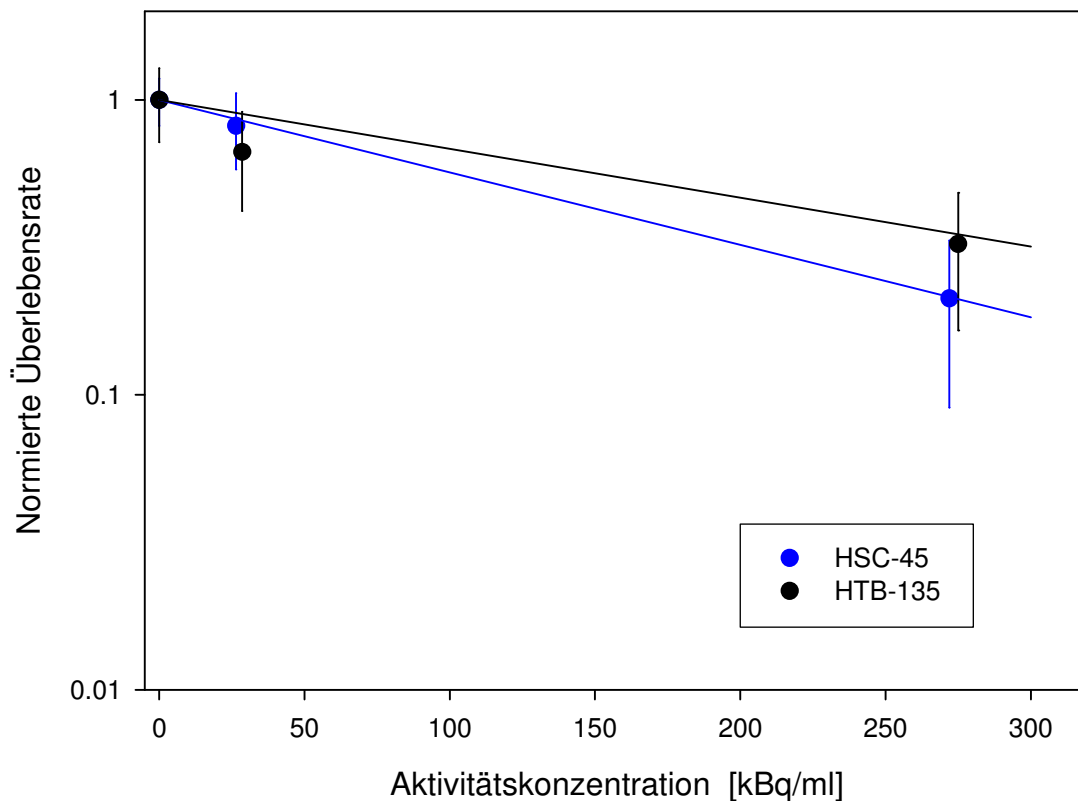


Abbildung 18: Überleben von HSC (80 Zellen/Well) und HTB-135 (500 Zellen/Well) nach 45-minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in 24-Well-Platten; Halblogarithmische Darstellung; unbehandelt, Aktivitätskonzentrationen 26 und 272 kBq/ml; Die Mittelwerte sind als Datenpunkte mit der jeweiligen SD dargestellt; die Geraden entsprechen den aus a und k berechneten Überlebenskurven; das Überleben von HSC wird stärker reduziert als das von HTB-135

Tabelle 11: Errechnete Parameter für die Überlebenskurven (mit exponentieller Dosis-Wirkungsbeziehung) von HTB-135 und HSC nach Inkubation mit bis zu 428 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten für 45 min; α ($\text{ml}/\text{kBq} \cdot 10^3$) bestimmt die Steigung der Überlebenskurve; k gibt den natürlichen Logarithmus des Überlebens an; das 95% Konfidenzintervall gibt die Schwankung der Parameter an, die mit den zu Grunde liegenden Daten (Klone/Well) in 95% der Fälle möglich sind, D1: geringste Aktivitätskonzentration D1 statt Kontrolle für die Berechnung der PE verwendet

V-Nr.	Zelllinie	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in $\text{ml}/\text{kBq} \cdot 10^3$	95% Konfidenzintervall von α	
				Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben
99	HTB-135	0,013 (D1)	1,46	1,31	1,61	10,7	8,3	13,2
100	HTB-135	0,03	2,57	2,49	2,66	3,8	3,0	4,6
101	HTB-135	0,02 (D1)	2,26	2,17	2,36	3,9	3,1	4,7
98	HTB-135	0,05	3,52	3,47	3,58	9,0	7,8	10,3
89	HSC	0,30	2,70	2,64	2,77	12,1	10,7	13,6
90	HSC	0,25	2,95	2,88	3,03	5,7	4,9	6,5
91	HSC	0,24 (D1)	2,80	2,70	2,89	9,8	8,2	11,5

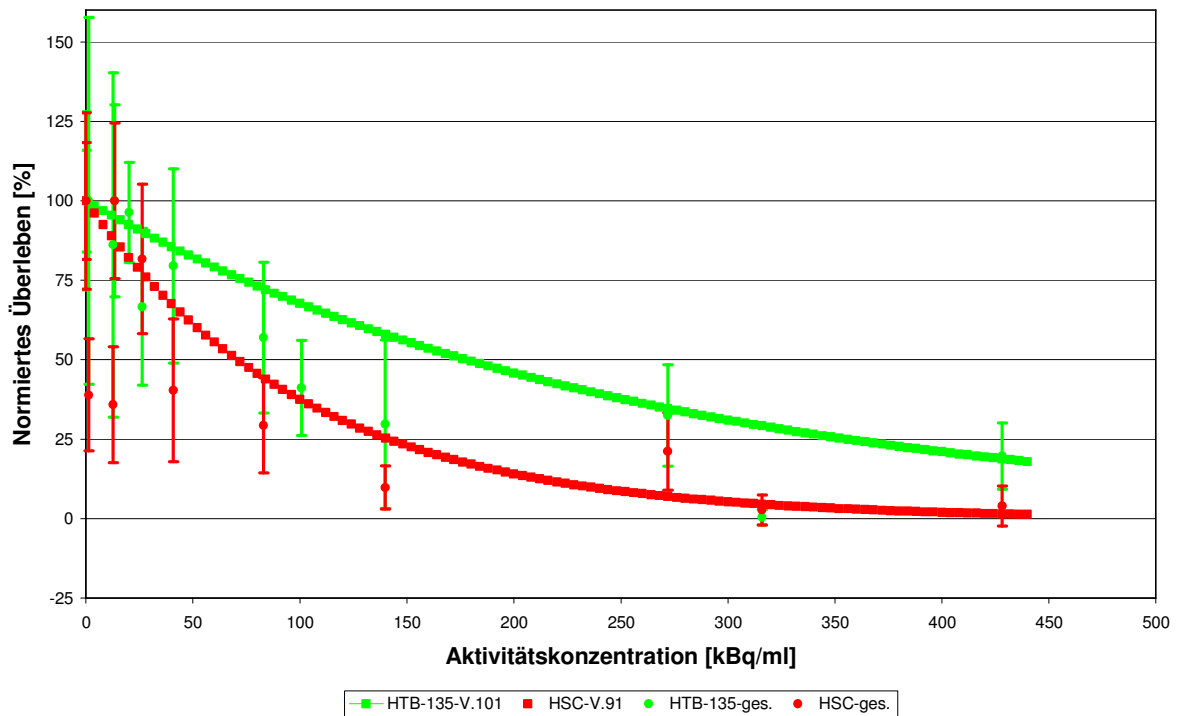


Abbildung 19: Normiertes Überleben der Zelllinien HSC (rot) und HTB-135 (grün) nach 45-minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten mit Aktivitätskonzentrationen bis 428 kBq/ml; Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte des Überlebens \pm SD dar. Die Überlebenskurven entsprechen den Werten aus V.101 und V.91 (HTB-135: $\alpha=3,9 \text{ ml}/\text{kBq} \cdot 10^3$, $k=2,3$ und HSC: $\alpha=9,8 \text{ ml}/\text{kBq} \cdot 10^3$, $k=2,8$). Das Überleben von HTB-135 wird maximal auf 20%, das von HSC maximal auf 4% eingeschränkt.

4.6.3.2 Überleben von HSC nach Inkubation mit hohen Aktivitätskonzentrationen von ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten

Für sämtliche Experimente wurden 80 Zellen/Well in 24-Well-Platten 24 h vor Inkubation mit den RI ausgesät. Die Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK) bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1-AK) erfolgte für 90 min. Die Versuche sollten zeigen, welchen Einfluss die Verwendung eines unspezifischen Antikörpers im Vergleich zu einem spezifischen AK für $\Delta 9$ -E-Cadherin an einer $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zelllinie im Hinblick auf das Überleben hat.

Es wurden jeweils 6 Experimente mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten durchgeführt. Die Aktivitätskonzentrationen betragen bis zu 1.950 kBq/ml. In den unbehandelten Kontrollen (nur Zugabe von kaltem MAK) bildeten sich zwischen 9 und 62 Klone/Well. Die für alle Experimente berechneten k-Werte lagen im Bereich zwischen 2,13 und 4,11. Das entspricht Klonzahlen von 8-61 Klonen/Well und gibt die tatsächlichen Verhältnisse damit gut wieder.

Im Folgenden ist jeweils das Überleben der höchsten Aktivitätskonzentration pro Versuch dargestellt. Die gewachsenen Klone bei jeder Aktivitätskonzentration der RI gehen in die Berechnung von α mit ein, so dass bei der Berechnung von α alle Aktivitätskonzentrationen berücksichtigt werden.

In jeweils 2 Experimenten (^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate: V.119+V.120, ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate: V.115+V.116) wurden maximale Aktivitätskonzentrationen von 150-300 kBq/ml verwendet. Dabei wurde das Überleben nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten auf maximal $33\pm 21\%$ (300 kBq/ml) und $19\pm 10\%$ (162 kBq/ml) bzw. $36\pm 28\%$ (243 kBq/ml) und $37\pm 11\%$ (150 kBq/ml) reduziert. Sowohl spezifische (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) als auch unspezifische (anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin) ^{213}Bi -Konjugate wirken gleichermaßen zytotoxisch. Dies zeigen auch die α -Werte für den entsprechenden Aktivitätsbereich (bis 300 kBq/ml), die 3,7 (V.119) und 9,9 (V.120) ml/kBq* 10^3 für ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate und 4,4 (V.115) und 6,7 (V.116) ml/kBq* 10^3 für ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate betragen.

Jeweils zwei weitere Versuche (^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate: V.111+V.112, ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate: V.108+109) wurden mit maximalen Aktivitätskonzentrationen zwischen 500 und 700 kBq/ml durchgeführt. Dabei wurde das Überleben, nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten auf maximal $0,4\pm 1\%$ (500 kBq/ml) und $18\pm 19\%$ (600 kBq/ml) bzw. $4\pm 5\%$ (700 kBq/ml) und $24\pm 20\%$ (650 kBq/ml) reduziert. Die errechneten α -Werte betragen 13,7 (V.111) und 2,9 (V.112) ml/kBq* 10^3 bzw. 3,4 (V.108) und 2,5 (V.109) ml/kBq* 10^3 . Auch in diesem Aktivitätsbereich ist kein eindeutiger Unterschied hinsichtlich des Überlebens zu konstatieren.

Bei jeweils einem Experiment (^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate: V.118, ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate: V.114) wurden bis maximal 1.000 kBq/ml der RI appliziert. Diese Aktivitätskonzentration reduzierte das Überleben auf $9\pm 9\%$ nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. auf $18\pm 11\%$ nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten. Die α -Werte betragen respektive 2,1 (V.118) und 3,0 (V.114) ml/kBq $\cdot 10^3$. Die graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 20 in halblogarithmischer Achsenteilung zeigt, dass die Zellen durch die ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate im Vergleich zu ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate geringfügig stärker geschädigt werden.

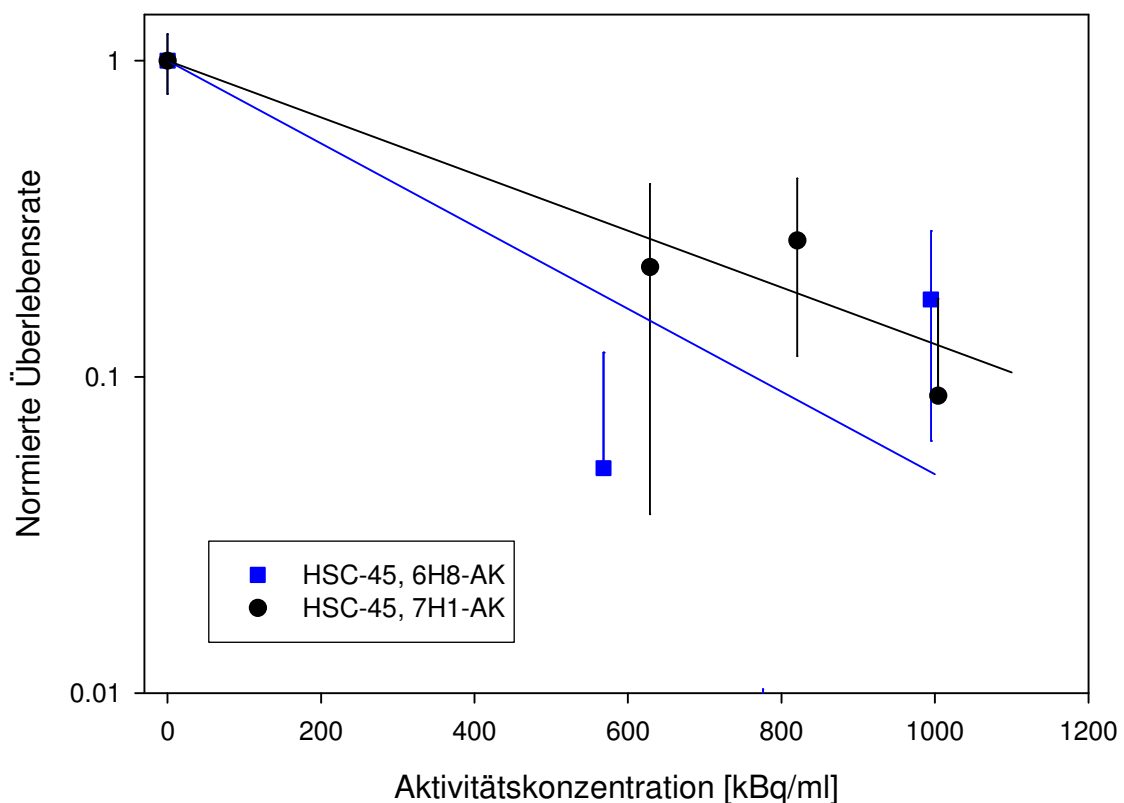


Abbildung 20: Überleben von HSC (80 Zellen/Well) nach 90-minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK, blau) und mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1-AK, schwarz) in 24-Well-Platten (halblogarithmische Darstellung); Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte \pm SD (teils nur die obere eingezeichnet) dar; Die Überlebenskurven wurden aus den berechneten α - und k -Werten erstellt. ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate reduzierten das Überleben in diesen Experimenten stärker als ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate

Die höchsten applizierten Aktivitätskonzentrationen an RI bis 2.000 kBq/ml bei ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (V.117 bzw. V.113) reduzierten das Überleben auf $3\pm 4\%$ bzw. $0,3\pm 1\%$.

Die Ergebnisse sämtlicher Experimente mit HSC und HTB-135 sind im Anhang in Tabelle 35 zusammengefasst.

Innerhalb beider Versuchsgruppen, HSC, inkubiert mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten sowie HSC, inkubiert mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten zeigten die Überlebensdaten große Schwankungen. Daher ist an Hand des normierten Überlebens kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Die Inkubation von HSC mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten führte zu Überlebenskurven mit α -Werten zwischen 1,7 (V.117) und 13,7 (V.111) ml/kBq* 10^3 . Dabei lässt sich abhängig vom verwendeten Aktivitätsbereich erkennen, dass die Werte für Experimente bis etwa 600 kBq/ml höher sind (3,7; 9,9; 13,7 und 2,9 ml/kBq* 10^3), als für Experimente mit maximalen Aktivitätskonzentrationen zwischen 600 und 2.000 kBq/ml (2,1 und 1,7 ml/kBq* 10^3). Der Durchschnittswert für alle α -Werte dieser Versuchsgruppe betrug 5,7 ml/kBq* 10^3 . Die Werte für α und k mit den entsprechenden Konfidenzintervallen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Die Überlebenskurven von HSC nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten hatten α -Werte zwischen 2,5 (V.109) und 6,7 (V.116) ml/kBq* 10^3 , mit einem Durchschnittswert von 3,8 ml/kBq* 10^3 . Auch hier zeigt sich der Trend, dass α bei zunehmender Aktivitätskonzentration kleiner wird (bis 700 kBq/ml: 2,5-6,7 ml/kBq* 10^3 ; bis 2.000 kBq/ml: 2,9-3,0 ml/kBq* 10^3). Eine zusammenfassende Darstellung der Werte für α und k mit den entsprechenden Konfidenzintervallen ist aus Tabelle 13 zu ersehen.

Tabelle 12: Errechnete Parameter für die Überlebenskurven (mit exponentieller Dosis-Wirkungsbeziehung) von HSC nach Inkubation mit bis zu 1.790 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1) für 90 min; α (ml/kBq 10^3) bestimmt die Steigung der Überlebenskurve; k gibt den natürlichen Logarithmus des Überlebens an; das 95% Konfidenzintervall gibt die Schwankung der Parameter an, die mit den zu Grunde liegenden Daten (Klone/Well) in 95% der Fälle möglich sind*

V.-Nr.	Well-Platte	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in ml/kBq* 10^3	95% Konfidenzintervall von α		Bemerkung
				Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben	
111	24	0,24	2,96	2,89	3,04	13,7	12,4	15,0	7H1-AK
112	24	0,33	3,25	3,17	3,33	2,9	2,6	3,2	7H1-AK
117	24	0,77	4,11	4,06	4,15	1,7	1,6	1,8	7H1-AK
118	24	0,56	3,81	3,77	3,85	2,1	2,0	2,2	7H1-AK
119	24	0,11	2,21	2,13	2,28	3,7	3,0	4,5	7H1-AK
120	24	0,64	3,96	3,92	3,99	9,9	9,2	10,6	7H1-AK

Tabelle 13: Errechnete Parameter für die Überlebenskurven (mit Dosis-Wirkungsbeziehung) von HSC nach Inkubation mit bis zu 1.950 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8) für 90 min; α (ml/kBq* 10^3) bestimmt die Steigung der Überlebenskurve; k gibt den natürlichen Logarithmus des Überlebens an; das 95% Konfidenzintervall gibt die Schwankung der Parameter an, die mit den zu Grunde liegenden Daten (Klone/Well) in 95% der Fälle möglich sind; Parameter, die als annähernde Werte gelten, sind mit * gekennzeichnet

V.-Nr.	Well-Platte	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in ml/kBq* 10^3	95% Konfidenzintervall von α		Bemerkung
				Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben	
108	24	0,24	2,94	2,86	3,01	3,4	2,9	4,0	6H8-AK
109	24	0,38	3,36	3,29	3,43	2,5	2,3	2,8	6H8-AK
113	24	0,77	4,03*	3,98*	4,08*	2,9*	2,7*	3,0*	6H8-AK
114	24	0,56	3,78	3,74	3,82	3,0	2,8	3,2	6H8-AK
115	24	0,11	2,13	2,05	2,21	4,4	3,4	5,3	6H8-AK
116	24	0,64	3,90	3,87	3,93	6,7	6,1	7,4	6H8-AK

In Abbildung 21 sind die Mittelwerte \pm SD aller Experimente (Punkte mit Fehlerbalken) und beispielhaft 4 Überlebenskurven von ausgewählten Versuchen (bis 648 kBq/ml: V.109 und V.112, bis 1.950 kBq/ml: V.113 und V. 117) bei linearer Achsenaufteilung dargestellt.

Während Abbildung 20 zeigt, dass das Überleben in ausgewählten Experimenten durch ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate stärker reduziert wurde als durch ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate, zeigt Abbildung 21 mit den Daten für sämtliche Experimente mit HSC, dass kaum Unterschiede im Überleben durch die verschiedenen RI erzeugt wurden. Lediglich die Überlebenskurven für die Experimente mit Aktivitätskonzentrationen über den gesamten Bereich bis 2.000 kBq/ml (V.113 und 117) zeigen, dass HSC durch ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate im Bereich von 300-900 kBq/ml etwas geringer geschädigt wurden als durch ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate.

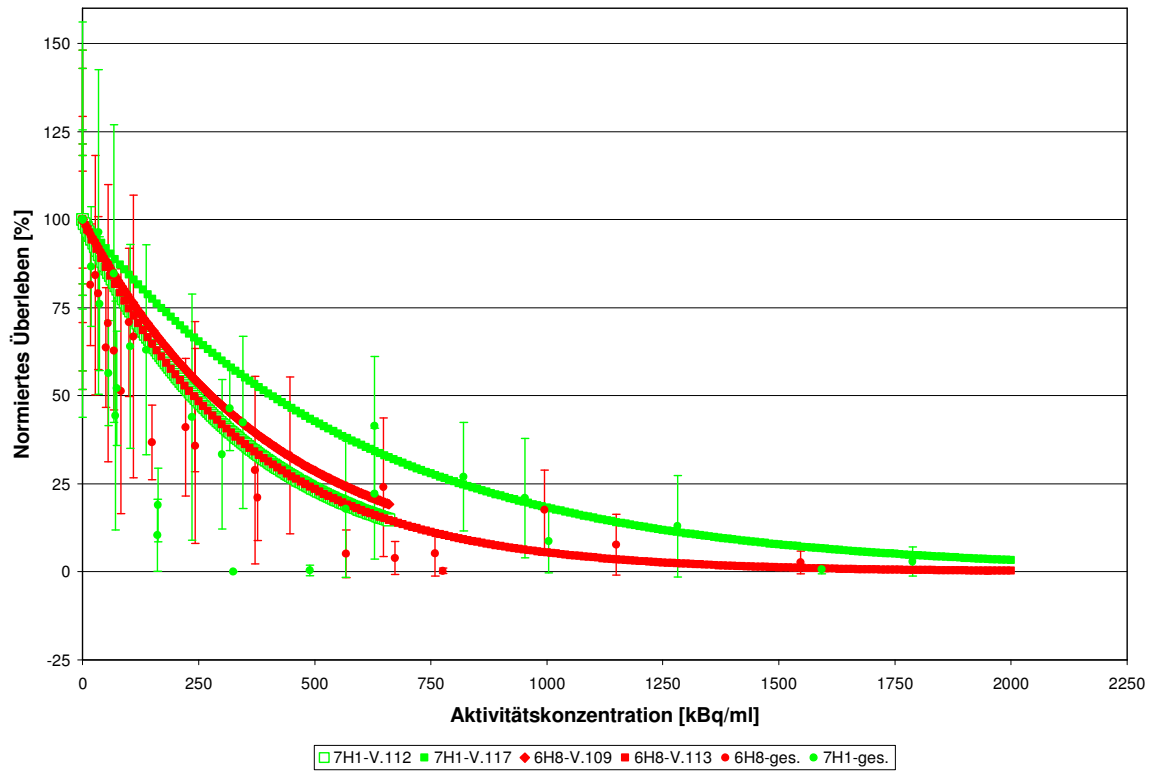


Abbildung 21: Normiertes Überleben von HSC nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK: rot) und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1-AK: grün). Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte des normierten Überlebens \pm SD dar. Die Überlebenskurven wurden aus den berechneten α - und k -Werten erstellt. Unabhängig von dem verwendeten AK wird das Überleben durch die RI in etwa gleich stark eingeschränkt.

4.6.4 Überleben von murinen Fibroblasten nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Die murinen Fibroblasten, L 929 $\Delta 9$ bzw. L 929 WT, welche $\Delta 9$ -E-Cadherin bzw. WT-E-Cadherin exprimieren, wurden in insgesamt 19 Experimenten (L 929 WT: 11, L 929 $\Delta 9$: 8) mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Aktivitätskonzentrationen bis zu 2.000 kBq/ml für 45 oder 90 min inkubiert. Die Zellzahlen/Well betragen dabei 20 und 40 Zellen/Well.

Ziel der Versuche war der Nachweis der spezifischen zytotoxischen Wirkung der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate gegenüber $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zellen (L 929 $\Delta 9$) im Gegensatz zu WT-E-Cadherin exprimierenden Zellen (L 929 WT).

Unbehandelte Kontrollen aus 12 Experimenten mit L 929 WT (inklusive der Kontrolle aus V.73) zeigten bei einer Aussaat von 10, 20 und ca. 40 Zellen/Well in 24-Well-Platten PEs zwischen 0,2 und 0,64. Die Verteilung der Häufigkeit für bestimmte Klonzahlen nach Aussaat von 40 Zellen pro Well ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Häufigkeitswerte für die verschiedenen Klonzahlen sind andeutungsweise normalverteilt. Das Häufigkeitsmaximum befindet sich ca. bei 17 Klonen/Well. Das entspricht einer PE von 0,43.

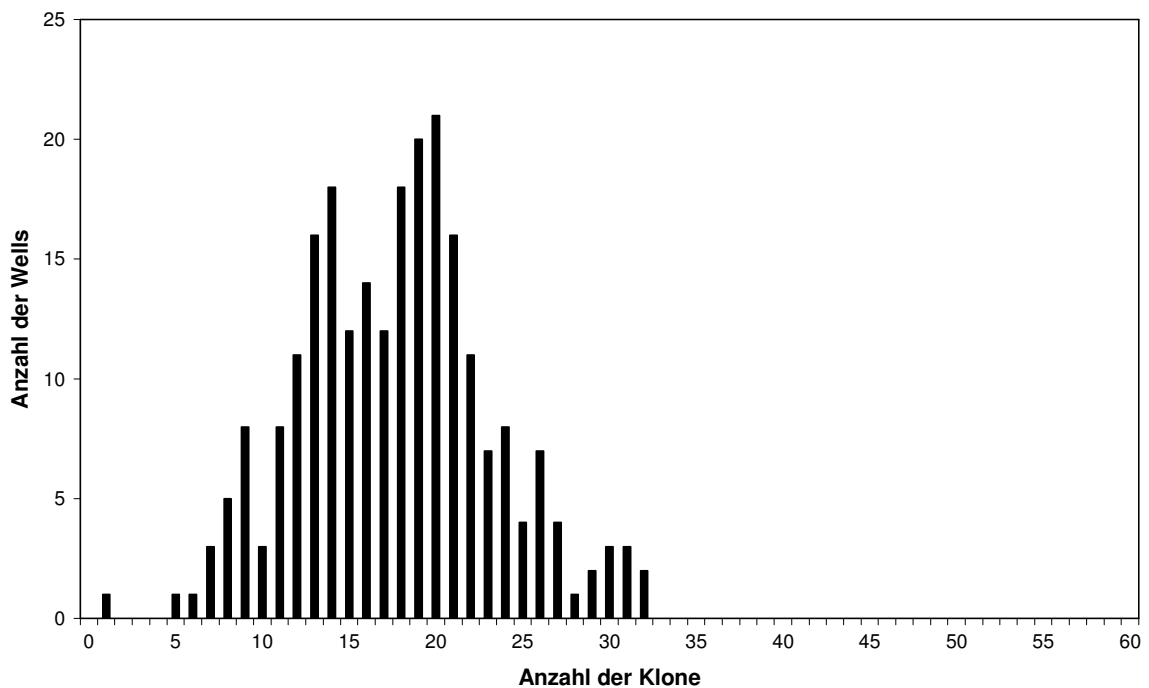


Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung von Wells mit gleicher Klonzahl bei einer Aussaat von 40 L 929 WT Zellen/Well in 24-Well-Platten (240 Einzelwerte): Annähernde Normalverteilung mit einem Maximum der Häufigkeit bei Wells mit 17 Klonen/Well

10 Experimente mit L 929 $\Delta 9$ (inklusive V.72) zeigten nach Aussaat von 10, 20 oder ca. 40 Zellen/Well in 24-Well-Platten in den Kontrollen PEs zwischen 0,5 und 0,86. In Abbildung 23 ist

die Häufigkeitsverteilung bei einer Aussaat von 40 Zellen/Well zusammengefasst. Aus der Abbildung ist eine angedeutete Normalverteilung ersichtlich, mit einem Maximum bei etwa 25 Klonen/Well entsprechend einer PE von 0,63.

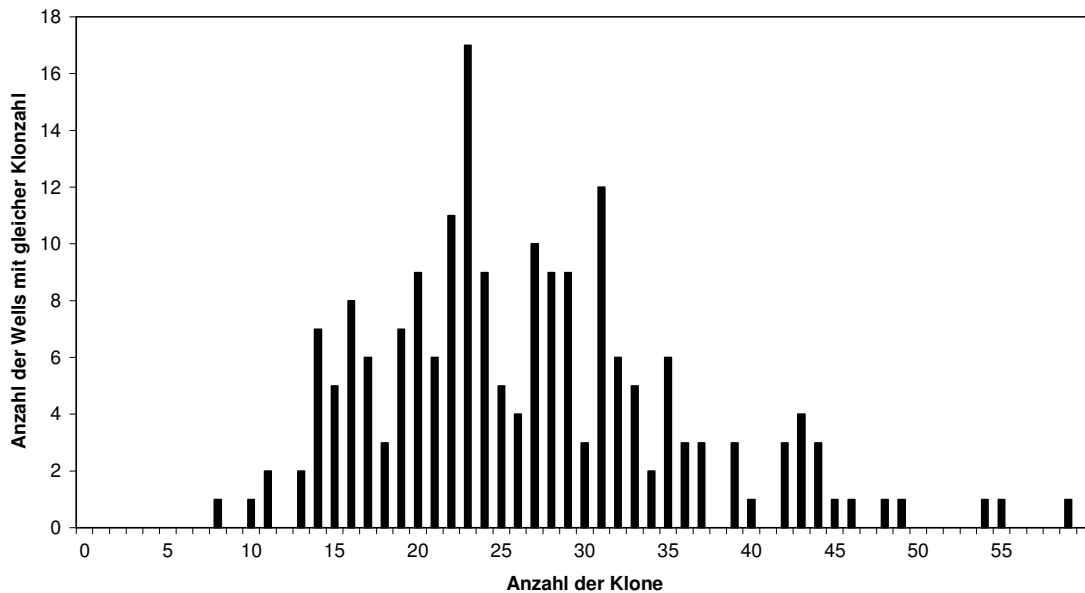


Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung von Wells mit gleicher Klonzahl bei einer Aussaat von 40 L 929 Δ 9 Zellen/Well in 24-Well-Platten (192 Einzelwerte): Annähernde Normalverteilung mit einem Maximum der Häufigkeit bei Wells mit 25 Klonen/Well

In 5 Experimenten wurden die Zellen (L 929 WT: V.94-97, L 929 Δ 9: V.92) für 45 min mit den ^{213}Bi -anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten inkubiert und vor Zugabe von frischem Medium einmal mit PBS gewaschen. Die verwendeten Aktivitätskonzentrationen betragen dabei zwischen 10 und 500 kBq/ml mit maximal 5 verschiedenen Aktivitätskonzentrationen. Zu den L 929 WT Zellen (V.95) und L 929 Δ 9 Zellen (V.92) wurden jeweils identische Aktivitätskonzentrationen von 10, 30, 50, 250 und 500 kBq/ml gegeben. Das führte zu einem Überleben von $100\pm 38\%$ (Kontrolle), $81\pm 53\%$, $98\pm 43\%$, $101\pm 37\%$, $23\pm 20\%$ und $13\pm 14\%$ für L 929 WT und $100\pm 32\%$ (Kontrolle), $49\pm 21\%$, $31\pm 32\%$, $20\pm 19\%$, $3\pm 1\%$ und $1\pm 4\%$ für L 929 Δ 9. Der berechnete α -Wert betrug entsprechend 4,8 (WT) bzw. 15,4 (Δ 9) ml/kBq $\cdot 10^3$. L 929 Δ 9 wurde also geringfügig stärker geschädigt als L 929 WT, wobei der Unterschied im Aktivitätsbereich zwischen 30 und 50 kBq/ml am größten war.

Die α -Werte der 3 Experimente mit L 929 WT, inkubiert für 45 min, mit maximalen Aktivitätskonzentrationen der RI von 370, 270 und 390 kBq/ml betragen respektive 1,8; 2,1 und 4,3 ml/kBq $\cdot 10^3$.

In jeweils 6 Experimenten wurden je 40 Zellen/Well von L 929 WT bzw. L 929 Δ 9 mit den ^{213}Bi -anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten für 90 min inkubiert.

3 Experimente wurden jeweils mit Aktivitätskonzentrationen der RI von 100-600 kBq/ml (L 929 WT: V.128, 131 und 134; L 929 Δ 9: V. 121, 124 und 127) durchgeführt. Dabei zeigten L 929 WT bzw. L 929 Δ 9 bei den jeweils höchsten Dosierungen der RI, 400, 500 und 600 kBq/ml, ein normiertes Überleben von $69\pm 26\%$, $64\pm 19\%$ und $12\pm 10\%$ bzw. $23\pm 16\%$, $32\pm 14\%$ und $1\pm 3\%$. Bei Berechnung des Parameters α als Maß für die Steigung der Überlebenskurven, wurden sämtliche verschiedene Aktivitätskonzentrationen berücksichtigt. Die α -Werte für L 929 WT betragen respektive 0,8 (400 kBq/ml: V.134); 0,9 (500 kBq/ml: V.131) und 3,6 (600 kBq/ml: V.128) ml/kBq* 10^3 und für L 929 Δ 9 4,2; 2,5; und 7,1 ml/kBq* 10^3 . Sowohl die jeweils relativ niedrigen Werte für normiertes Überleben, als auch die hohen α -Werte für L 929 Δ 9 zeigen, dass das Überleben von L 929 Δ 9 durch die ^{213}Bi -anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugate stärker reduziert wurde als von L 929 WT.

Im Aktivitätsbereich zwischen 600 und 1.000 kBq/ml wurde jeweils 1 Experiment mit beiden Zelllinien durchgeführt (L 929 WT: V.132, L 929 Δ 9: V.125). Das normierte Überleben betrug für L 929 WT bei 1.000 kBq/ml $37\pm 18\%$ und für L 929 Δ 9 $19\pm 17\%$, mit α -Werten von 1,9 (V.132) und 2,3 (V.125) ml/kBq* 10^3 . Auch diese Werte belegen eine stärkere Schädigung von L 929 Δ 9.

Weitere Versuche mit L 929 WT und L 929 Δ 9 wurden mit Aktivitätskonzentrationen der RI von 800 bis ca. 2.000 kBq/ml (V.129 und V.122) und 400 bis 2.000 kBq/ml (V.133 und V.126) durchgeführt. Für L 929 WT betrug das Überleben bei der jeweils höchsten Aktivitätskonzentration $1\pm 2\%$ und $3\pm 5\%$, mit α -Werten von 2,1 (V.129) und 1,5 (V.133) ml/kBq* 10^3 . Mit L 929 Δ 9 wurde bei den jeweils höchsten Aktivitätskonzentrationen ein normiertes Überleben von $0\pm 0\%$ und $1\pm 3\%$ ermittelt. Die Berechnung der α -Werte ergab entsprechend 3,2 (V.122) und 2,4 (V.126) ml/kBq* 10^3 . Während bezüglich des Überlebens bei ca. 2.000 kBq/ml nahezu kein Unterschied zwischen L 929 WT und L 929 Δ 9 zu verzeichnen war, zeigen die Steigungen der Überlebenskurven über den gesamten Aktivitätsbereich (α -Werte), dass L 929 Δ 9 geringfügig stärker geschädigt wurden als L 929 WT.

Sämtliche Ergebnisse und Versuchsdaten zu den Experimenten mit L 929 Zellen sind in Tabelle 36 im Anhang zusammengefasst. In Abbildung 24 sind die Mittelwerte sämtlicher Experimente mit 90-minütiger Inkubationszeit und Überlebenskurven von 4 ausgewählten Experimenten in linearer Darstellung gezeigt. Abbildung 25 zeigt die ausgewählten Überlebenskurven mit den dazugehörigen Datenpunkten, allerdings in halblogarithmischer Darstellung. In Abbildung 25 können die Fehlerbalken der SDs aufgrund der halblogarithmischen Darstellung teils nur nach oben dargestellt werden. Die Abbildungen verdeutlichen, dass L 929 Δ 9 durch die Inkubation mit ^{213}Bi -anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten stärker geschädigt wurde als L 929 WT, wobei der Unterschied im Aktivitätskonzentrationsbereich zwischen 300 und 900 kBq/ml besonders ausgeprägt ist und mit zunehmender Aktivitätskonzentration abnimmt. Nach einer einfachen Varianzanalyse mit einem Konfidenzintervall von 90% zeigte sich, dass dieser Unterschied in den Überlebensdaten zwischen

L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT signifikant ist. Der durchschnittliche α -Wert aller Experimente beträgt für L 929 WT $2,3 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$ und für L 929 $\Delta 9$ $5,0 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$.

Diese Resultate zeigen, dass die Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten von $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zellen effektiver ist, als die Behandlung von WT-E-Cadherin exprimierenden Zellen.

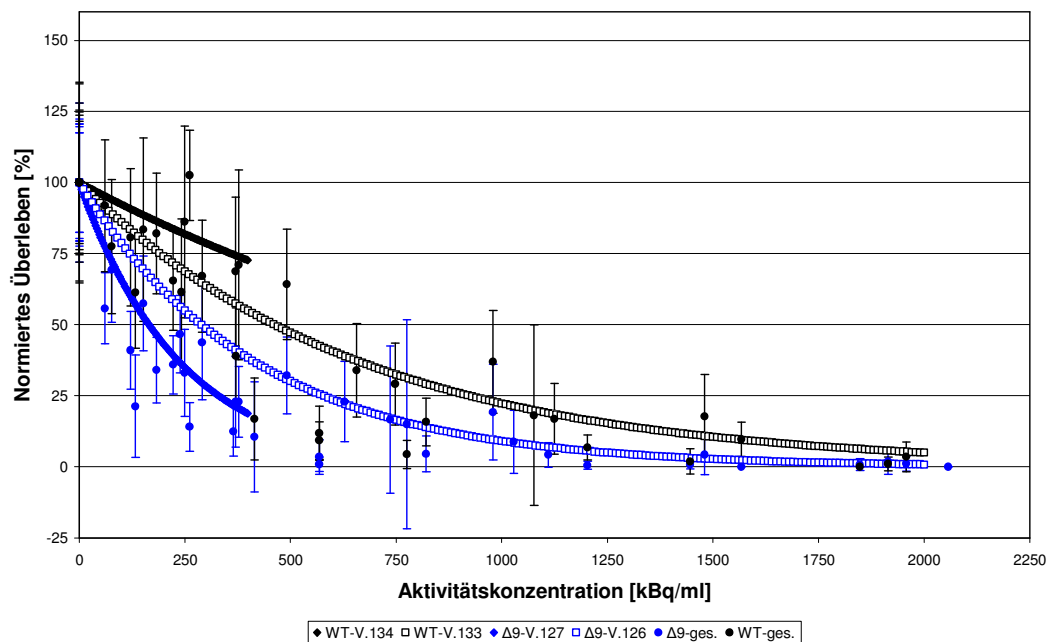


Abbildung 24: Normiertes Überleben von L 929 WT (schwarz) und L 929 $\Delta 9$ (blau) nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten für 90 min (bis 2.000 kBq/ml); Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte des Überlebens \pm SD dar. Die Überlebenschwächen wurden für verschiedene Aktivitätskonzentrationsbereiche für beide Zelllinien an Hand der α - und k -Werte (L 929 WT: $\alpha=0,8$ und $1,5 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$; L 929 $\Delta 9$: $\alpha=4,2$ und $2,4 \text{ ml/kBq} \cdot 10^3$) erstellt. In beiden Aktivitätsbereichen (bis 400 kBq/ml und bis 2.000 kBq/ml) wird das Überleben von L 929 $\Delta 9$ durch die RI stärker eingeschränkt als von L 929 WT.

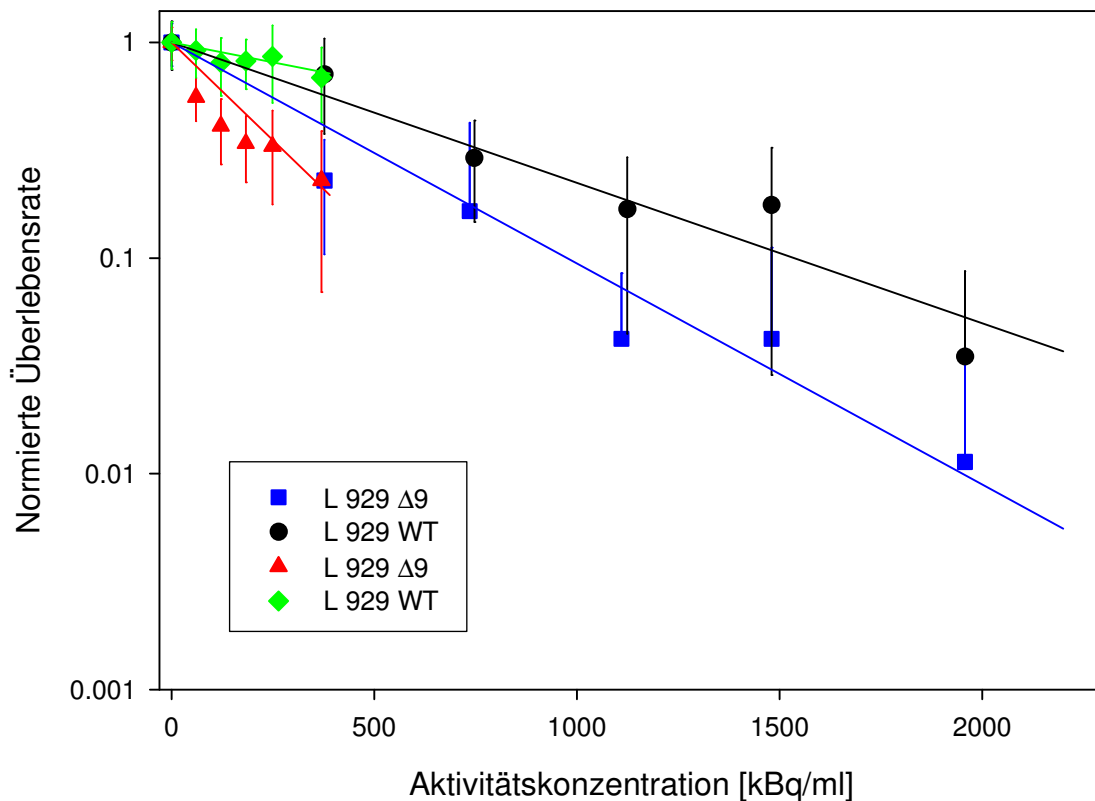


Abbildung 25: Normiertes Überleben von L 929 $\Delta 9$ (blau, rot) und L 929 WT (schwarz, grün) nach 90-minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (bis 2.000 kBq/ml) in 24-Well-Platten (halbbligarithmische Darstellung); Die Datenpunkte mit Balken stellen alle Mittelwerte des Überlebens \pm SD (teils nur die obere eingezeichnet) dar. Die Überlebenskurven repräsentieren die berechneten α - und k -Werte; ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate reduzierten das Überleben von L 929 $\Delta 9$ stärker als von L 929 WT

Die berechneten Parameter α und k sind für alle Experimente mit L 929 in Tabelle 14 dargestellt. In Experimenten mit L 929 WT betragen die k -Werte zwischen 1,54 und 3,13, entsprechend Klonzahlen von 5-23 bei unbehandelten Kontrollen (kalter MAK). Diese Werte stimmen mit den tatsächlich ermittelten Klonzahlen (5 - 23) exakt überein.

Für L 929 $\Delta 9$ stimmen die berechneten Klonzahlen von 10-29 Klonen bei k -Werten zwischen 2,35 und 3,36 nicht mit den tatsächlich ermittelten Klonzahlen von durchschnittlich 18-34 Klonen überein.

Tabelle 14: Errechnete Parameter für die Überlebenskurven (mit exponentieller Dosis-Wirkungsbeziehung) von L 929 nach Inkubation mit bis zu 2.000 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten für 45 oder 90 min, w: 1 Waschvorgang mit PBS, MW: Mediumwechsel, α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$ bestimmt die Steigung der Überlebenskurve, k gibt den natürlichen Logarithmus des Überlebens an, das 95% Konfidenzintervall gibt die Schwankung der Parameter an, die mit den zu Grunde liegenden Daten (Klone/Well) in 95% der Fälle möglich sind

V.-Nr.	Zelllinie	Inkubationszeit, Vorgehen danach	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$	95% Konfidenzintervall von α	
					Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben
94	L 929 WT	45 min Ink, w, MW	0,26	1,54	1,38	1,70	4,3	3,2	5,4
95	L 929 WT	45 min Ink, w, MW	0,33	1,91	1,83	2,00	4,8	3,9	5,7
96	L 929 WT	45 min Ink, w, MW	0,58	3,14	3,07	3,20	2,1	1,6	2,6
97	L 929 WT	45 min Ink, w, MW	0,45	2,75	2,69	2,81	1,8	1,4	2,2
128	L 929 WT	90 min Ink, MW	0,33	2,54	2,46	2,62	3,6	3,1	4,0
129	L 929 WT	90 min Ink, MW	0,43	2,85	2,75	2,95	2,1	1,9	2,3
130	L 929 WT	90 min Ink, MW	0,43	2,81	2,72	2,90	1,9	1,6	2,1
131	L 929 WT	90 min Ink, MW	0,39	2,65	2,57	2,72	0,9	0,6	1,2
132	L 929 WT	90 min Ink, MW	0,48	2,87	2,78	2,95	1,9	1,7	2,1
133	L 929 WT	90 min Ink, MW	0,54	3,12	3,04	3,19	1,5	1,4	1,6
134	L 929 WT	90 min Ink, MW	0,46	2,88	2,81	2,95	0,8	0,5	1,2
92	L 929 $\Delta 9$	45 min Ink, w, MW	0,79	2,35	2,27	2,44	15,4	12,9	18,0
121	L 929 $\Delta 9$	90 min Ink, MW	0,51	2,89	2,82	2,96	7,1	6,4	7,7
122	L 929 $\Delta 9$	90 min Ink, MW	0,67	3,28	3,21	3,36	3,2	3,0	3,5
123	L 929 $\Delta 9$	90 min Ink, MW	0,50	2,93	2,84	3,02	3,1	2,8	3,5
124	L 929 $\Delta 9$	90 min Ink, MW	0,66	3,15	3,09	3,21	2,5	2,2	2,8
125	L 929 $\Delta 9$	90 min Ink, MW	0,52	2,98	2,90	3,06	2,3	2,1	2,5
126	L 929 $\Delta 9$	90 min Ink, MW	0,64	3,14	3,06	3,22	2,4	2,2	2,5
127	L 929 $\Delta 9$	90 min Ink, MW	0,86	3,36	3,30	3,42	4,2	3,8	4,6

Das Überleben bei einer Inkubationszeit von 90 min war durchschnittlich nicht niedriger als bei einer Inkubationszeit von nur 45 min (siehe Tabelle 14). Für L 929 WT lagen die α -Werte (4 Experimente) bei 45minütiger Inkubation zwischen 1,8 und 4,8 $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$ und bei 90minütiger Inkubation (7 Experimente) zwischen 0,8 und 3,6 $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$. Für L 929 $\Delta 9$ betragen die α -Werte respektive 15,4 (V.92) und zwischen 2,3 und 7,1 $\text{ml/kBq} \cdot 10^3$ (7 Experimente).

4.6.5 Alternative Auswertung des Überlebens für ausgewählte Experimente nach „tumor cure probability“

Für einige ausgewählte Experimente wurde eine alternative Auswertungsmethode gewählt, weil in der Mehrzahl der Wells nach Applikation hoher Aktivitätskonzentrationen der RI keine Klone vorhanden waren. Der Begriff „tumor cure probability“ (tcp) bezeichnet die Wahrscheinlichkeit mit der, nach der Behandlung von Zellen mit einem schädigenden Agens, keine Klone gebildet werden. Bei dieser Methode wurden daher die Wells gezählt, in denen keine Klone gewachsen waren und zur applizierten Aktivitätskonzentration in Beziehung gesetzt. Folglich wurden für diese Auswertung Experimente mit vielen Wells ohne Klonwachstum ausgewählt. Je größer die Anzahl der Wells ohne Klonwachstum bei einer bestimmten Aktivitätskonzentration, desto höher ist die „tumor cure probability“. Die „tumor cure probability“ wird mathematisch durch Gleichung 5 (siehe Kapitel 3.8) beschrieben und ergibt graphisch eine sigmoide Kurve. Die Parameter α und k zur Beschreibung der Kurve wurden mit Hilfe des SAS-Statistik-Pakets berechnet.

Auch bei dieser Form der Auswertung sollte besonders auf die Unterschiede im Überleben der $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zelllinien (HSC, L 929 $\Delta 9$) im Vergleich zu Zelllinien ohne E-Cadherin (HTB-135) bzw. mit WT-E-Cadherin (L 929 WT) geachtet werden. Auch die Unterschiede im Überleben bei HSC-Zellen nach Applikation von ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten sollten erfasst werden.

Insgesamt wurden 10 Experimente mit Aktivitätskonzentrationen der RI bis 2.000 kBq/ml nach tumor cure probability ausgewertet.

In Experimenten mit HSC (V.89) bzw. mit HTB-135 (V.99) wurden die Zellen für 45 min mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Aktivitätskonzentrationen von 1, 10, 140 und 300 kBq/ml inkubiert. Die Anzahl der Wells ohne Klone (24-Well-Platte) betrug dabei 1, 0, 3 und 15 (HSC) bzw. 0, 1, 7 und 23 (HTB-135). Die aus diesen Werten berechneten Parameter α und k betragen für HSC 6,9 ml/kBq/ml* 10^3 und 1,6, für HTB-135 10,8 ml/kBq/ml* 10^3 und 1,4. Im Vergleich zur Auswertung nach Überleben (siehe Kapitel 4.6.3) (HSC: $\alpha=12,1$ ml/kBq/ml* 10^3 , HTB-135: $\alpha=10,8$ ml/kBq/ml* 10^3) sind diese Ergebnisse widersprüchlich. Während bei der Auswertung nach Anzahl der Klone HSC stärker geschädigt wurde, zeigt die Auswertung nach tumor cure probability, dass HTB-135 stärker geschädigt wurde.

HSC-Zellen wurden mit 350, 700, 1.000, 1.400 und 1.850 kBq/ml der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate (V.113) bzw. der ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate (V.117) inkubiert. Dabei fanden sich von jeweils 24 Wells 0, 6, 4, 10, und 21 Wells ohne Klone bzw. 0, 0, 3, 6 und 1 (Ausnahme: von nur 6 Wells) Wells ohne Klone. Die berechneten α -Werte betragen 1,6 ml/kBq/ml* 10^3 für ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bzw. 1,9 ml/kBq/ml* 10^3 für ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate. Diese Werte bedingen, dass sich der Verlauf der tumor cure probability in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration für HSC, behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten kaum unterscheidet. Das entspricht den Ergebnissen nach der Auswertung nach Überleben (siehe 4.6.3), wonach die Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten keine Unterschiede im Überleben von HSC bewirkt.

In jeweils zwei Versuchen mit L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT (V.92 und 95: 45 min Inkubation, V.126 und 133: 90 min Inkubation) unterschieden sich die sigmoiden Kurven der verschiedenen Zelllinien kaum. Die α -Werte für die Inkubationsdauer von 45 min (V.92 und 95) bei Aktivitätskonzentrationen bis zu 470 kBq/ml betragen für L 929 $\Delta 9$ 4,8 und für L 929 WT 4,6 ml/kBq/ml* 10^3 . Bei 90-minütiger Inkubationsdauer (V.126 und 133) betragen die Werte respektive 1,7 und 2,2 ml/kBq/ml* 10^3 bei Aktivitätskonzentrationen der RI von 400-2.000 kBq/ml. Bei 2.000 kBq/ml waren 22 von 24 Wells ohne Klone. L 929 $\Delta 9$ (V.121) bzw. L 929 WT (V.128) wurden 90 min mit 130 (24 Wells), 260 (6 Wells), 420 (24 Wells) und 600 kBq/ml (24 Wells) ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat inkubiert. Daraus resultierten bei L 929 $\Delta 9$ 1, 1, 11 und 21 Wells ohne Klone und bei L 929 WT 0, 0, 5 und 6 Wells ohne Klonwachstum. Die daraus berechneten α -Werte 8,5

ml/kBq/ml* 10^3 ($\Delta 9$) und 3,4 ml/kBq/ml* 10^3 (WT) unterschieden sich deutlich. Die entsprechenden sigmoiden Kurven der tumor cure probability in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration sind in Abbildung 26 dargestellt. Bei gleicher Aktivitätskonzentration wurden L 929 $\Delta 9$ stärker als L 929 WT geschädigt.

Die berechneten Parameter α und k für die Anzahl der Wells ohne Klone und deren 95% Konfidenzintervalle sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

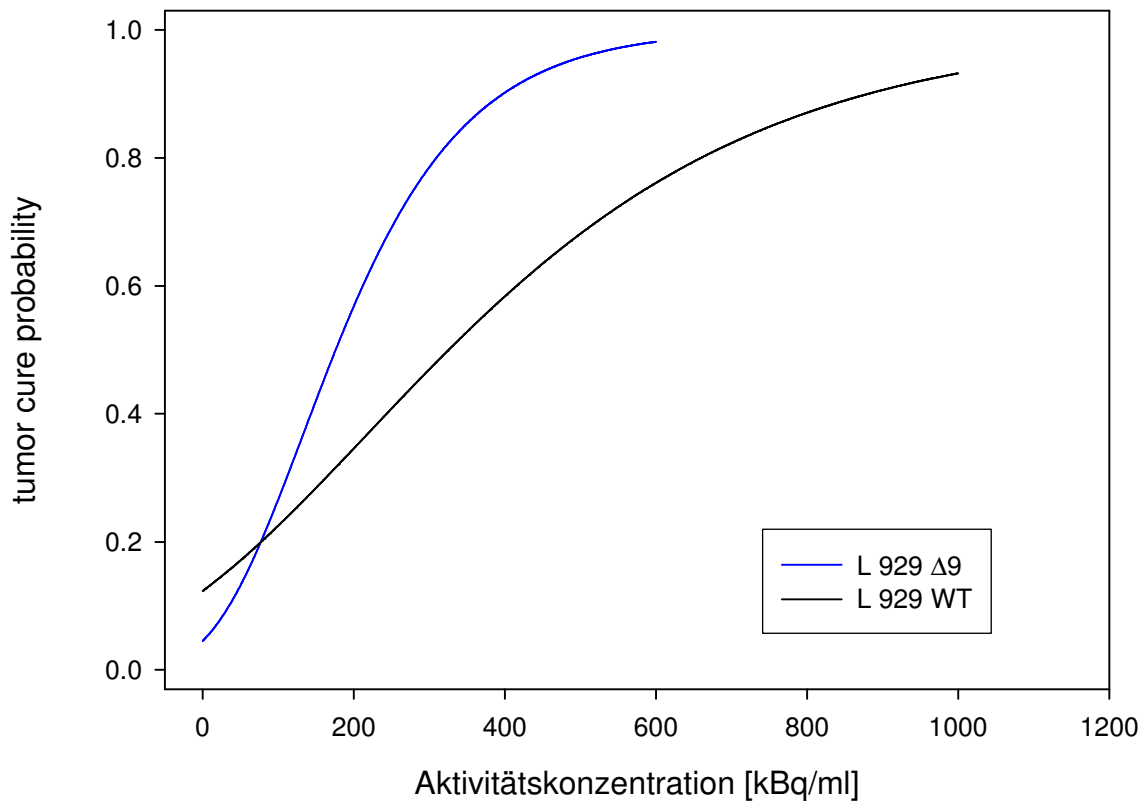


Abbildung 26: „tumor cure probability“ in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration für L 929 $\Delta 9$ (blau) und L 929 WT (schwarz) nach Inkubation mit bis zu 600 kBq/ml; Die Darstellung erfolgte aufgrund der berechneten Parameter α und k ($\Delta 9$: $\alpha=8,5$ ml/kBq/ml* 10^3 , $k=3,1$; WT: $\alpha=3,4$ ml/kBq/ml* 10^3 , $k=2,1$), Die „tumor cure probability“ ist für L 929 $\Delta 9$ höher als für L 929 WT bei gleichen Aktivitätskonzentrationen

Tabelle 15: Auswertung nach „tumor cure probability“ ausgewählter Klonogener Tests nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten (bis zu 2.000 kBq/ml) bei verschiedenen Zelllinien; Die Parameter α und k bestimmen den Verlauf der sigmoiden Kurve, die die „tumor cure probability“ in Abhängigkeit der Aktivitätskonzentration beschreibt

V-Nr.	Zelllinie	PE	k	95% Konfidenzintervall von k		α in ml/kBq/ml ¹ 0 ³	95% Konfidenzintervall von α		Inkubation
				Grenze unten	Grenze oben		Grenze unten	Grenze oben	
89	HSC-45	0,30	1,55	1,09	2,00	6,9	4,3	9,5	45 min Ink, w, MW
99	HTB-135	0,01 (D1)	1,36	0,90	1,83	10,8	7,2	14,4	45 min Ink, w, MW
113	HSC-45	0,77	2,00	1,35	2,66	1,6	1,1	2,2	90 min Ink, MW
117	HSC-45	0,77	2,70	1,65	3,76	1,9	1,1	2,8	90 min Ink, MW
92	L 929 delta 9	0,79	0,73	0,43	1,03	4,8	3,1	6,5	45 min Ink, w, MW
95	L 929 WT	0,33	1,77	1,24	2,29	4,6	2,7	6,5	45 min Ink, w, MW
121	L 929 delta 9	0,51	3,10	1,41	4,79	8,5	4,5	12,5	90 min Ink, MW
128	L 929 WT	0,33	2,09	1,11	3,08	3,4	1,2	5,6	90 min Ink, MW
126	L 929 delta 9	0,64	1,81	1,18	2,44	1,7	1,1	2,2	90 min Ink, MW
133	L 929 WT	0,54	3,64	2,14	5,14	2,2	1,2	3,2	90 min Ink, MW

4.7 Chromosomale Aberrationen nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Zur Analyse chromosomaler Aberrationen nach Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten wurden die Chromosomen mittels der Bombing-Methode (siehe Kapitel 3.9) präpariert.

Die 90-minütige Inkubation der adhärennten Zellen (HSC, HTB-135, L 929 und MDA) mit RI erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen (1,2-6,5*10⁶ Zellen/Flasche). Je nach Experiment wurden ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate (6H8-AK) bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate (7H1-AK) in Aktivitätskonzentrationen bis zu 800 kBq/ml appliziert. 18-24 h nach Inkubation wurden die Zellen in der Metaphase der Mitose mittels Colcemid arretiert. Die Chromosomenpräparation erfolgte 3 h nach Colcemidzugabe. Die Aktivitätskonzentrationen der RI wurden deshalb so niedrig gewählt, weil bereits aus klonogenen Tests bekannt war, dass die Unterschiede im Überleben bei $\Delta 9$ -E-Cadherin- bzw. WT-E-Cadherin-exprimierenden Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten ab 1.000 kBq/ml nicht beobachtbar waren.

Die Beurteilung der mikroskopisch sichtbaren Chromosomenschäden wurde an der GSF (Prof. E. Schmid) durchgeführt. Es erfolgte die Differenzierung nach Chromatid- und Chromosomenschäden und die Einteilung in verschiedene Schweregrade.

Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen bzw. mit kaltem AK behandelte Zellen verwendet. Bei den Kontrollen wurden in der Regel jeweils 100 Mitosen ausgewertet. Die in den Kontrollen gelegentlich beobachtbaren Chromatid-Schäden des Schweregrades A (in maximal bis zu 4% der Mitosen) dürfte ihre Ursache im Tumorzellcharakter der verwendeten Zelllinien haben. In Abbildung 27 ist jeweils ein Chromosomensatz von HSC und MDA WT ohne α -Emitter induzierte Chromatid- bzw. Chromosomenschäden dargestellt.

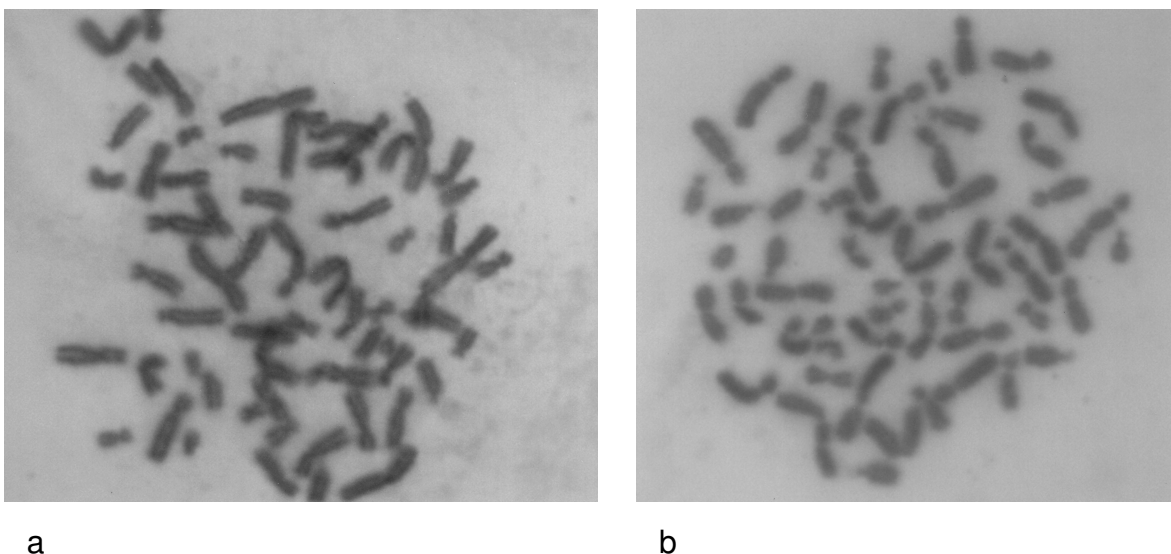


Abbildung 27: Metaphase-Chromosomen a: HSC (2*10⁶ Zellen/75 cm²) b: MDA WT (6*10⁶ Zellen/75 cm²); beide Metaphasen zeigen keine α -Emitter induzierten Chromatid- bzw. Chromosomenschäden

Zellen mit strukturellen Chromosomen-Aberrationen wurden als S-Zellen bezeichnet. Dabei wurden die Schweregrade A, B und C jeweils für Chromatidschäden sowie für Chromosomenschäden eingeführt. Im Falle von Chromatidschäden steht die leichteste Ausprägung A für Einzelstrangbrüche oder Austauschfiguren. Der nächst höhere Schweregrad B bezeichnet mehrere Einzelstrangbrüche und/oder komplexe Austauschfiguren. Der schwerste Ausprägungsgrad C steht für mehrere Einzelstrangbrüche und komplexe Austauschfiguren in Kombination mit PCC (premature chromosome condensation). Eine Austauschfigur und einen Chromatidbruch als Beispiel für Chromatidschäden der Ausprägung A zeigt Abbildung 28. Ein Chromosomensatz mit Chromatidschäden vom Schweregrad B ist in Abbildung 29 zu sehen. Bei Chromosomenaberrationen entspricht der Ausprägungsgrad A z.B. einem azentrischen Fragment oder einem dizentrischen Chromosom. Ein trizentrisches Chromosom, wie in Abbildung 30 gezeigt, stellt ebenfalls einen Chromosomenschaden der Ausprägung A dar. Beim Ausprägungsgrad B kommen die Chromosomenschäden gehäuft vor (Abbildung 31). Der Ausprägungsgrad C entspricht PCC mit weitgehend aufgehobener Struktur aller Chromosomen.

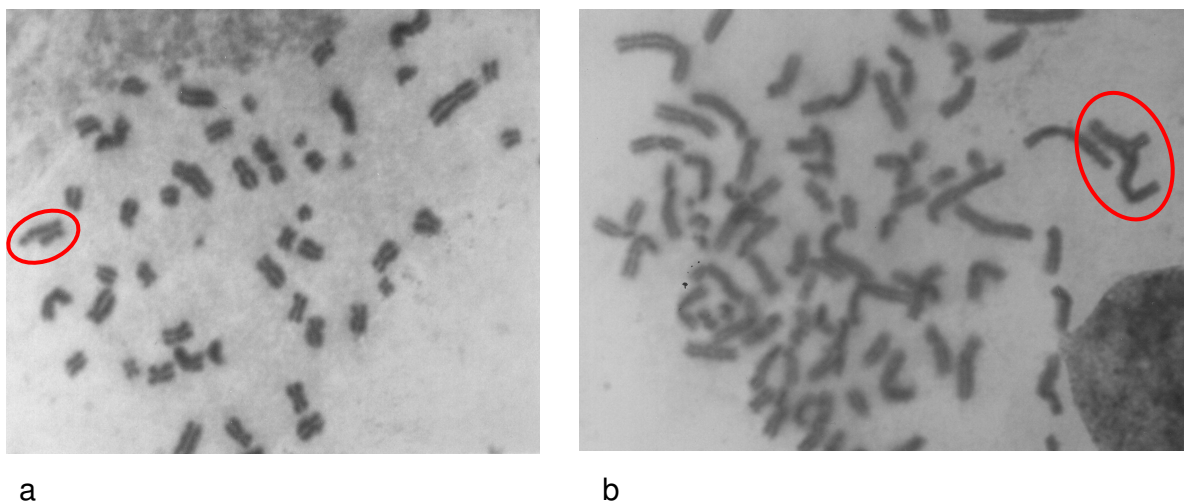


Abbildung 28: Chromatidschäden vom Schweregrad A in HSC ($2 \cdot 10^6$ Zellen/75 cm²) nach Inkubation mit ²¹³Bi-anti-Δ9-E-Cadherin-Konjugaten a: Chromatidbruch, b: Austauschfigur

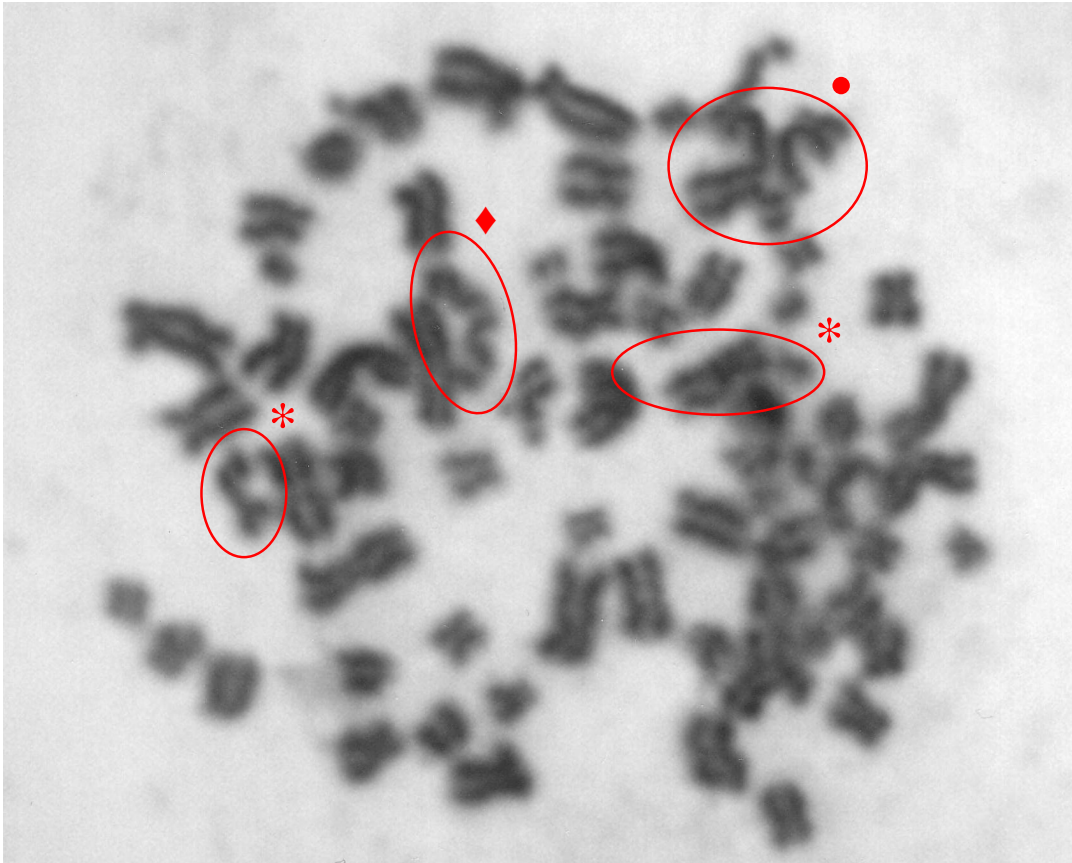


Abbildung 29: Chromatidschäden vom Schweregrad B in HSC ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ 75 cm^2) nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat: * mehrere Chromatidbrüche, ◆ Austauschfigur • inkomplette Austauschfigur

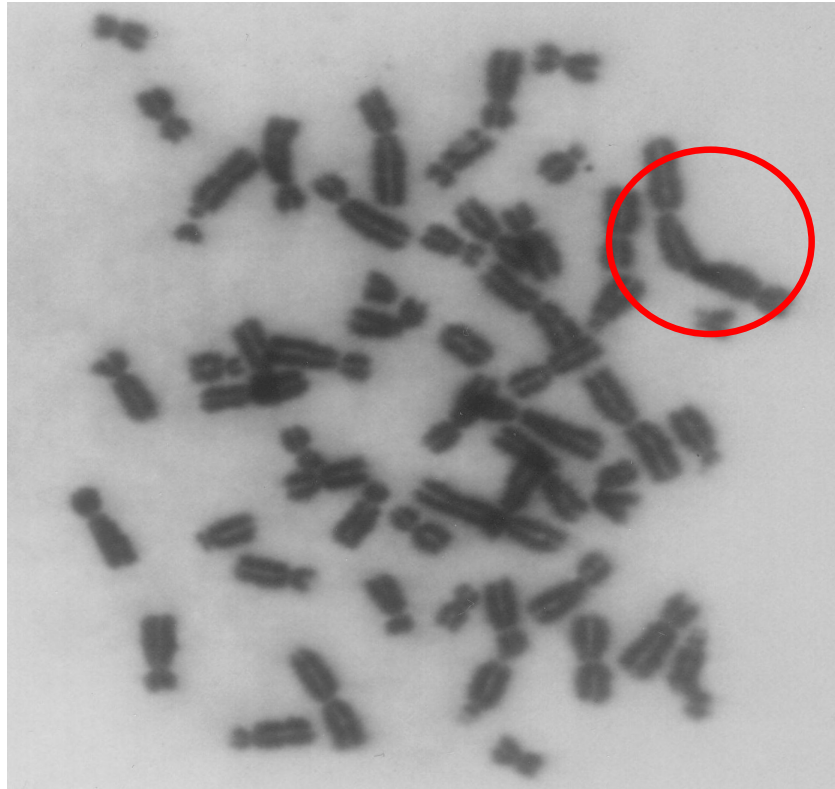


Abbildung 30: Trizentrisches Chromosom (Chromosomenschaden vom Schweregrad A) in MDA WT ($1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ 75 cm^2) nach Inkubation ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat



Abbildung 31: Mehrere polyzentrische Chromosomen (Chromosomenschaden vom Schweregrad B) in MDA WT ($6 \cdot 10^6$ Zellen/ 75 cm^2) nach Inkubation ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat, Pfeile weisen auf Zentromere

Bezüglich der strukturellen Chromosomenschäden zeigten sich die verschiedenen Zelllinien gegenüber der Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten unterschiedlich empfindlich. Bei einer Aktivitätskonzentration von 160 (± 20) kBq/ml traten bei HTB-135 94% S-Zellen auf, bei MDA $\Delta 9$ durchschnittlich 55%, bei MDA WT durchschnittlich 48% und bei L 929 $\Delta 9$ durchschnittlich 47%. Bei HSC ließen sich im gleichen Aktivitätsbereich die durchschnittlichen Schäden mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten auf 32% S-Zellen und mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten auf 22% beziffern. L 929 WT erwiesen sich als am wenigsten empfindlich und zeigten bei benannter Aktivitätskonzentration der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate nur 3% S-Zellen. Die Verteilung der Schweregrade innerhalb der S-Zellen (%) ist für alle analysierten Zelllinien in den Tabellen 37-39 im Anhang in Abhängigkeit von der jeweiligen Aktivitätskonzentration dargestellt.

4.7.1 Chromosomale Aberrationen in Magenkarzinomzelllinien

Nach der Behandlung von $6,5 \cdot 10^6$ HTB-135 (V.142) mit 160 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat wurden 94% S-Zellen gefunden, wobei die Chromatidschäden in jeder Ausprägung (A: 24%, B: 32% und C: 31%) vorkamen und gegenüber den Chromosomenschäden (A: 5% und B: 2%) deutlich überwogen. Bei HSC verursachten die ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate (V.136) bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate (V.141) in Aktivitätskonzentrationen von 40, 400 und 700 kBq/ml jeweils 3, 54 und 80% S-Zellen bzw. 1, 2 und 15% S-Zellen.

HSC ($1,6$ - $2,5 \cdot 10^6$) wurden auch mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (V.137) bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (V.139) in Aktivitätskonzentrationen von durchschnittlich 10, 100 und 200 kBq/ml behandelt. Daraus resultierten 5, 20 und 48% S-Zellen (V.137) bzw. 5, 20 und 46% S-Zellen (V.139).

In einer dritten Versuchsserie (V.138 und V.140) mit HSC ($2,0 \cdot 10^6$) konnten nach der Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten bei Aktivitätskonzentrationen von jeweils 100, 200, 400 und 700 kBq/ml respektive 10, 23, 45 und 84% S-Zellen bzw. 1, 21, 45 und 75% S-Zellen festgestellt werden.

In allen Experimenten mit HSC wurden überwiegend Chromatidschäden in allen Schweregraden (A, B und C) beobachtet. Dabei nahm der Schweregrad der Schäden mit zunehmender Aktivitätskonzentration zu. Chromosomenschäden kamen weitaus seltener (in der Hälfte der Experimente mit einer Häufigkeit kleiner 5%) und nur in den Ausprägungen A und B vor. Die detaillierten Versuchsergebnisse nach Inkubation von Magenkarzinomzelllinien mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten sind in Tabelle 37 im Anhang dargestellt.

Der Anteil an S-Zellen (%) nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten wurde für vergleichbare Aktivitätskonzentrationen zusammengefasst in Abbildung 32 dargestellt. Die Grafik zeigt, dass die Behandlung der HSC-

Zellen mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten jeweils eine höhere Anzahl an chromosomalen Schäden hervorrief, als die Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten. Bei einer Aktivitätskonzentration von ca. 20 kBq/ml war die Anzahl der geschädigten Zellen in etwa gleich hoch, während mit steigender Aktivitätskonzentration der Unterschied ausgeprägter wurde. So betrug der Anteil an S-Zellen bei ca. 20, 100, 200, 600 und 700 kBq/ml nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten durchschnittlich 4, 15, 41, 63 und 82%, nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten 4, 11, 23, 30 und 75%. Die Anteile der Schweregrade für die Chromatidschäden betragen für ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate in 10% Typ A-Schäden, 39% Typ B-Schäden und 36% Typ C-Schäden sowie für ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate in 15% Typ A-Schäden, 18% Typ B-Schäden und in 42% Typ C-Schäden.

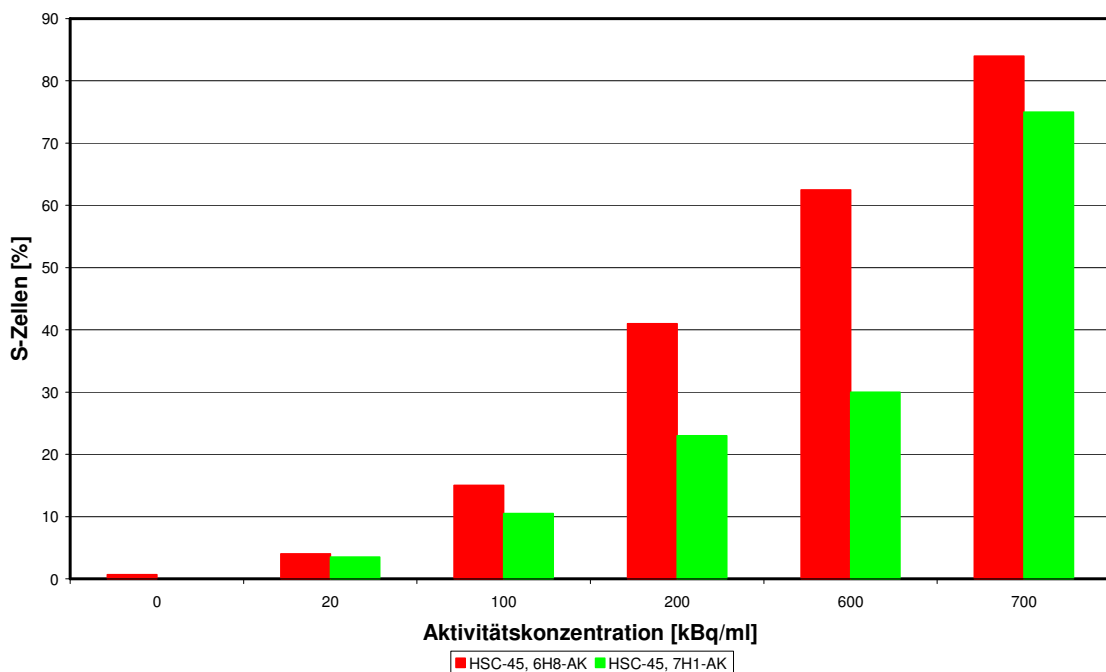


Abbildung 32: Anteil der S-Zellen in Abhängigkeit der ^{213}Bi -Aktivitätskonzentration nach Inkubation von HSC mit ^{213}Bi - $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8) bzw. ^{213}Bi - $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1); dargestellt sind die Mittelwerte der S-Zellen in %

4.7.2 Chromosomale Aberrationen in Fibroblasten

L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT wurden zur Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bis zu einer Aktivitätskonzentration von 160 kBq/ml verwendet.

Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ bzw. $6,0 \cdot 10^6$ L 929 $\Delta 9$ (V.143 bzw.144) und L 929 WT (V.147 bzw. 148) wurden mit 50 und 160 kBq/ml der RI inkubiert. L 929 $\Delta 9$ zeigten je nach Zellzahl bei 50 kBq/ml 15 bzw. 17% S-Zellen und nach 160 kBq/ml 50 bzw. 40% S-Zellen. L 929 WT wiesen bei $1,5 \cdot 10^6$ bzw. $6,0 \cdot 10^6$ Zellen nach Behandlung mit 50 kBq/ml 2 bzw. 0 % und nach 160 kBq/ml 0 bzw. 2% S-Zellen auf.

In einer anderen Versuchsserie (V.145 bzw. V.149) führte die Behandlung von L 929 $\Delta 9$ ($2,0 \cdot 10^6$) bzw. L 929 WT ($2,0 \cdot 10^6$) mit Aktivitätskonzentrationen der RI von 10, 50 und 160 kBq/ml zu 2, 13 und 52% S-Zellen bzw. zu 1, 1 und 6% S-Zellen.

Die Aktivitätskonzentrationen 10, 60, 185 und 370 kBq/ml der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate führten bei L 929 $\Delta 9$ (V.146, $2,0 \cdot 10^6$) zu 0, 0, 2 und 15% S-Zellen. Bei L 929 WT (V.150, $2,0 \cdot 10^6$) verursachten 10 und 60 kBq/ml 0% S-Zellen, nach Behandlung mit 185 und 370 kBq/ml waren keine Mitosen zu finden.

Zusammenfassend überwogen bei L 929 $\Delta 9$ die Chromatidschäden mit maximal 38% für Typ A (160 kBq/ml), 42% für Typ B (160 kBq/ml) und 5% für Typ C (370 kBq/ml). Dabei waren Typ A-Schäden bei 9 von 11 Mitosen bei verschiedenen Aktivitätskonzentration am häufigsten, Typ B-Schäden waren in sieben Aktivitätskonzentrationen und Typ C-Schäden in den Mitosen von 3 Aktivitätskonzentrationen vorhanden. Chromosomenschäden kamen in 4 von 11 Mitosen mit maximal 7% für Typ A und 1% für Typ B bei einer Aktivitätskonzentration von 50 kBq/ml vor, während bei den Aktivitätskonzentrationen von 160 und 370 kBq/ml gar keine Chromosomenschäden zu finden waren.

Im Gegensatz zu L 929 $\Delta 9$ kamen bei L 929 WT die Chromatidschäden in 5 von 9 Proben mit maximal 4% bei einer Aktivitätskonzentration von 160 kBq/ml vor. Typ B-Schäden waren nur einmal mit einer Häufigkeit von 2% ebenfalls bei 160 kBq/ml zu finden. Chromatidschäden der Ausprägung C kamen genauso wie Chromosomenschäden der Ausprägungen B und C nicht vor. Die Chromosomenschäden vom Typ A kamen mit 1% bei einer Aktivitätskonzentration von 50 kBq/ml einmal vor.

Die detaillierten Versuchsergebnisse nach Inkubation von murinen Fibroblasten mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten sind in Tabelle 38 im Anhang zusammengestellt.

Die Anteile an S-Zellen nach Inkubation von L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT mit den unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen der RI sind in Abbildung 33 zusammengestellt. Der Prozentsatz an S-Zellen bei L 929 $\Delta 9$ ist für ca. 50 und 160 kBq/ml mit durchschnittlich 11 und 47% viel höher als

bei L 929 WT mit 1 und 3%. Dieser große Unterschied kommt dadurch zu Stande, dass die ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate spezifisch an $\Delta 9$ -E-Cadherin Molekülen von L 929 $\Delta 9$ binden, während die Bindung an den WT-E-Cadherinen von L 929 WT nur unspezifisch ist und damit weniger häufig stattfindet. Gebunden an die E-Cadherine ist die Wahrscheinlichkeit, dass ^{213}Bi -Atome der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate die Zellen treffen und zytotoxisch wirken höher als für den Fall, dass die ^{213}Bi -Atome der RI im Medium frei umher schwimmen.

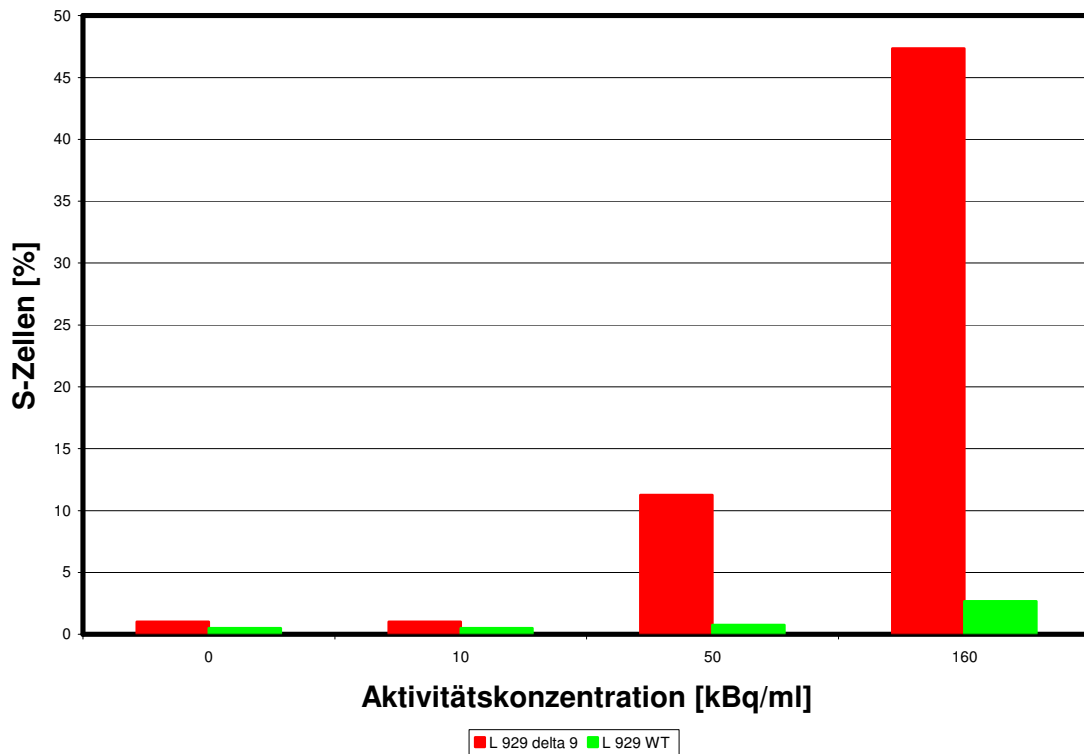


Abbildung 33: Anteil der S-Zellen bei L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten; dargestellt sind Mittelwerte der S-Zellen in %

4.7.3 Chromosomale Aberrationen in MDA-Zellen

Jeweils $1,5 \cdot 10^6$ bzw. $6,0 \cdot 10^6$ Zellen von MDA WT (V.151 bzw. V.152) und MDA $\Delta 9$ (V.154 bzw. V.155) wurden mit jeweils 50 und 160 kBq/ml ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat inkubiert. Das führte bei MDA $\Delta 9$ zu 35% bzw. 32% S-Zellen (50 kBq/ml) und zu 80% bzw. 66% S-Zellen (160 kBq/ml). Bei MDA WT waren respektive 58% bzw. 71% S-Zellen und 66% bzw. 60% S-Zellen zu finden.

In einer weiteren Versuchsserie (V.153 und V.156) wurden jeweils $2,0 \cdot 10^6$ MDA $\Delta 9$ bzw. MDA WT mit Aktivitätskonzentrationen von 10, 50 und 160 kBq/ml inkubiert. Nach dieser Behandlung konnten bei MDA $\Delta 9$ 3, 8 und 18% S-Zellen und bei MDA WT 1, 8 und 18% an S-Zellen gefunden werden.

Mit der Ausnahme bei 50 kBq/ml unterschieden sich die Häufigkeiten der S-Zellen bei den beiden Zelllinien kaum.

Chromatidschäden waren in allen Schweregraden zu beobachten. Bei MDA $\Delta 9$ waren maximal 24% Typ A-, 24% Typ B- und 31% Typ C-Schäden bei einer Aktivitätskonzentration von 160 kBq/ml vorhanden. Die Schäden lagen bei MDA WT bei gleicher Aktivitätskonzentration für Typ A bei 42%, für Typ B bei 16% und für Typ C bei 6%. Chromosomenschäden waren sehr viel seltener und kamen nur als Typ A und B vor (MDA $\Delta 9$: 9% und 1%, MDA WT: 12% und 0%).

Die detaillierten Häufigkeiten von Chromosomenaberrationen nach Inkubation von MDA-Zellen mit ^{213}Bi - $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten sind in Tabelle 39 im Anhang zusammengefasst.

4.8 Abschätzung der ^{213}Bi -Dosis für die Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Die Berechnung der Dosis wurde an Hand eines vereinfachenden Modells jeweils für klonogene Tests mit HSC, L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT und für Versuche zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen mit HSC, HTB-135, L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT mit einer Inkubationszeit von jeweils 90 min durchgeführt.

Die Dosis, als absorbierte Energie pro Masseneinheit, wurde ausgehend von der Anzahl der ^{213}Bi -Atome berechnet, die während der Inkubationszeit zerfallen. Dabei wurde unterschieden zwischen den ^{213}Bi -Immunkonjugaten, die sich nicht an Zellen gebunden im Medium befanden, die an die Zelloberfläche über $\Delta 9$ -E-Cadherin-Moleküle gebunden waren und die von Zellen internalisiert worden waren. Die Anzahl der gebundenen RI wurde an Hand des Massenwirkungsgesetz und der Assoziationskonstanten K_a des verwendeten AKs berechnet. Dabei gingen auch die Anzahl der E-Cadherin-Moleküle pro Zelle, die Zellkonzentration und die AK-Konzentration in die Berechnung mit ein. Die spezifische Aktivität lieferte die Information wie viele ^{213}Bi -Atome an den besetzten E-Cadherinen innerhalb der Inkubationszeit zerfallen. Die Anzahl der internalisierten RI wurde aus den Ergebnissen der Internalisierungs-Experimente gewonnen. Der von den Zellen absorbierte Anteil der Energie der α -Teilchen, wurde mittels geometrischer Daten (Zellgröße, Reichweite der α -Teilchen) und des linearen Energie Transfers (LET) berechnet. Die Berechnung erfolgte unter folgenden Annahmen: die Zellen sind kugelförmig, die Masse und Dichte von Zellen sind gleich der von Wasser und der LET ist konstant. Der detaillierte Rechenweg ist in Kapitel 3.10 beschrieben.

4.8.1 Dosen der ^{213}Bi -Immunkonjugate in klonogenen Tests

Die Dosis in Gy wurde für HSC, sowohl behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten als auch behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten, berechnet. Bei applizierten Aktivitätskonzentrationen von 1-1.900 kBq/ml resultierten Dosen zwischen 0,02 und 17,1 Gy (^{213}Bi -6H8-Konjugat) bzw. zwischen 0,02 und 7,4 Gy (^{213}Bi -7H1-Konjugat). Die spezifische Aktivität betrug für ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate sowie für ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate zwischen 200 und 1.200 kBq/ μg . Bei Verwendung der verschiedenen RI waren respektive 0,2-67% und 0,1-1,7% der E-Cadherin-Moleküle besetzt.

Nach Behandlung von L 929 $\Delta 9$ bzw. L 929 WT mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Aktivitätskonzentrationen von 60-2.000 kBq/ml konnten Dosen von 1,1-16,6 Gy bzw. 0,3-7,9 Gy berechnet werden. Die spezifischen Aktivitäten der RI unterschieden sich für die beiden Zelllinien mit jeweils 550-1.700 kBq/ μg nicht. An L 929 $\Delta 9$ waren minimal 8% und maximal 72% der E-Cadherine besetzt, während bei L 929 WT nur minimal 0,1% und maximal 3% der E-Cadherine besetzt waren.

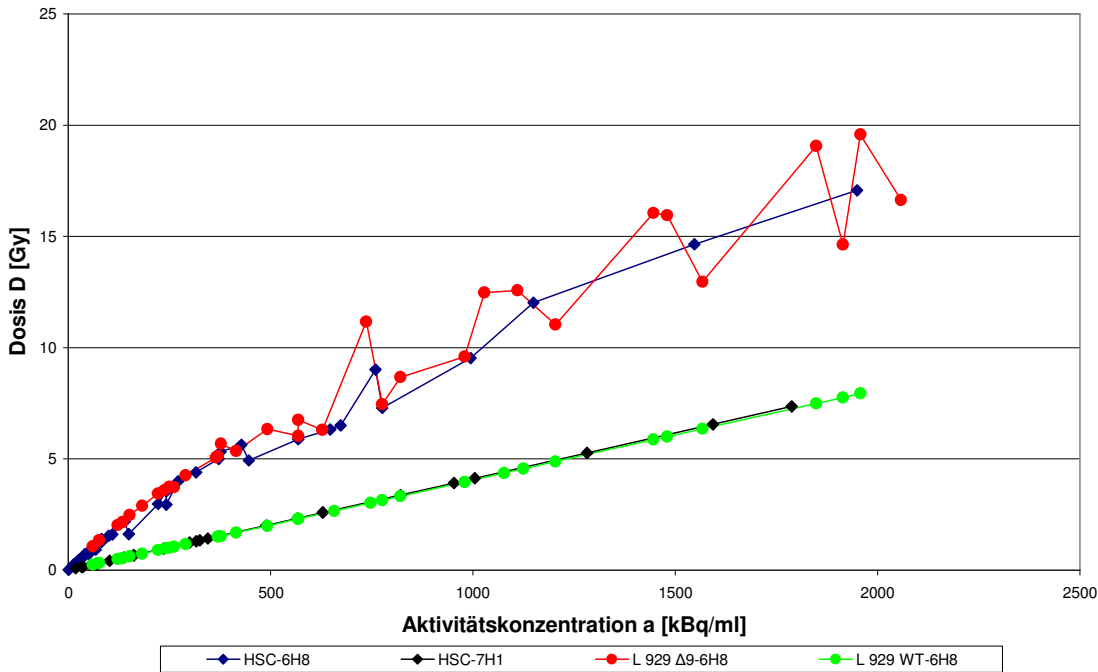


Abbildung 34: Berechnete Dosis der verschiedenen Zelllinien nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration in klonogenen Tests; HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8); HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1); L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT jeweils behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten

Alle Einzelergebnisse der Dosisberechnung für die verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von der applizierten Aktivitätskonzentration zeigt Abbildung 34. Mit steigender Aktivitätskonzentration nimmt auch die Dosis zu. Eine Aktivitätskonzentration von etwa 2.000 kBq/ml entspricht einer Dosis von ca. 8 Gy bei Inkubation von L 929 WT mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. von HSC mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten sowie einer Dosis von ca. 17 Gy bei Inkubation von L 929 $\Delta 9$ mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. von HSC mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten. Das bestätigt, dass sowohl Bindung als auch Internalisierung der ^{213}Bi -Immunkonjugate die Dosis bestimmen. Da sich die untersuchten Zelllinien nur geringfügig hinsichtlich Zelldurchmesser und Anzahl der E-Cadherin-Moleküle pro Zelle unterscheiden, tragen diese Parameter kaum zu den Unterschieden bei der Dosis bei. Auch bei Applikation von RI, die nicht am Zielantigen binden, steigt die Dosis mit der Aktivitätskonzentration erheblich an. Dies ist dadurch zu erklären, dass auch RI, die frei im Medium schwimmen, bzw. unspezifisch binden eine nicht zu vernachlässigende Dosis verursachen.

4.8.2 Dosen der ^{213}Bi -Immunkonjugate zur Induktion von Chromosomenaberrationen

HSC wurden sowohl mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten, als auch mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten in Aktivitätskonzentrationen zwischen 5 und 750 kBq/ml behandelt. Aus diesen Aktivitätskonzentrationen konnten Dosen zwischen 0,1 und 8,0 Gy (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) sowie zwischen 0,01 und 3,0 Gy (anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin) bei spezifischen Aktivitäten zwischen 700-1.400 kBq/ μg bzw. 700-1.000 kBq/ μg errechnet werden. Mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten waren jeweils 0,4-55% und mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten 0,07-1,3% der E-Cadherin-Moleküle besetzt. HTB-135 wurden mit einer Aktivitätskonzentration von 100 kBq/ml behandelt, mit einer spezifischen Aktivität von 700 kBq/ μg . Die resultierende Dosis errechnete sich zu 0,42 Gy.

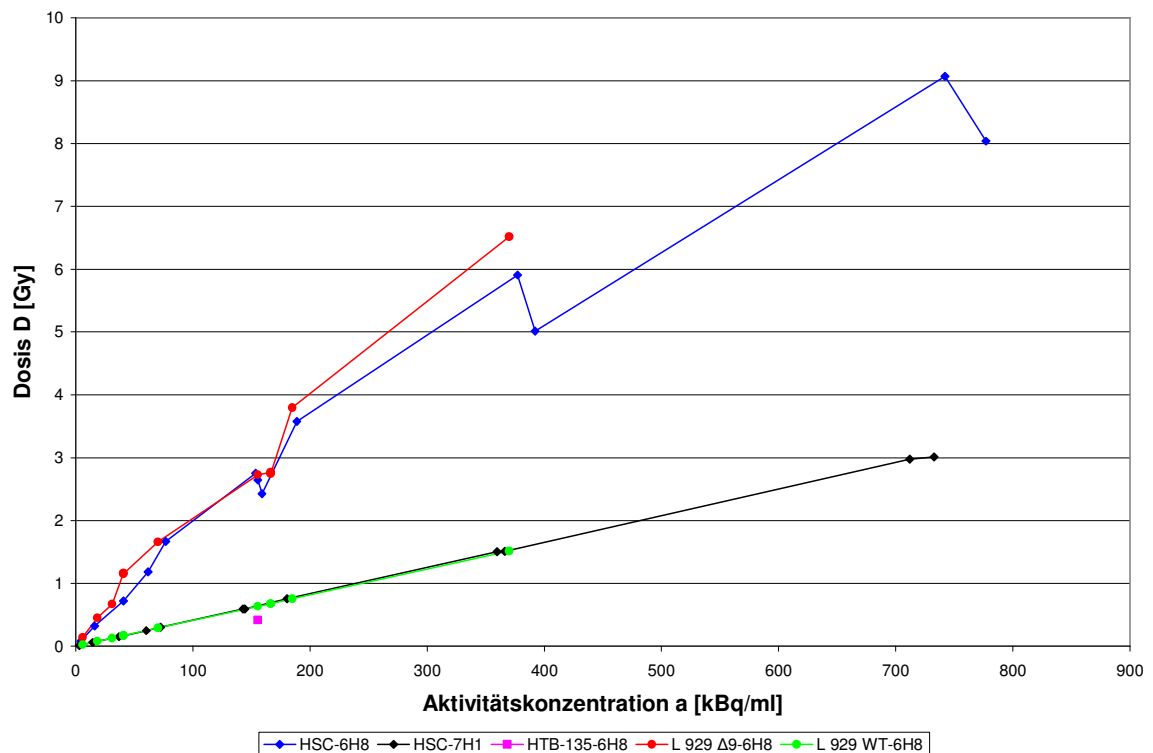


Abbildung 35: Berechnete Dosis der ^{213}Bi -Immunkonjugate in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration (bis zu 750 kBq/ml) zur Induktion von Chromosomenschäden mit verschiedenen Zelllinien: HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8); HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1), HTB-135 behandelt mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten; L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT behandelt mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten

L 929 $\Delta 9$ bzw. L 929 WT wurden mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Aktivitätskonzentrationen von 10-370 kBq/ml behandelt. Die errechneten Dosen betragen hier 0,14-6,5 Gy ($\Delta 9$) bzw. 0,02-1,5 Gy (WT) bei einer spezifischen Aktivität zwischen 650 und 1.230

kBq/ μ g. Es waren mindestens 1,4 % und maximal 34 % der E-Cadherin-Moleküle an L 929 Δ 9 und mindestens 0,01 % und maximal 0,5 % der E-Cadherin-Moleküle an L 929 WT mit RI besetzt.

Abbildung 35 zeigt die an Hand des Näherungsmodells (siehe Kapitel 3.10) berechnete Dosis in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration. Mit steigender Aktivitätskonzentration nimmt auch die Dosis zu. Dabei ergibt eine Aktivitätskonzentration von etwa 350 kBq/ml bei L 929 WT, behandelt mit ^{213}Bi -anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten, und bei HSC, behandelt mit ^{213}Bi -anti- Δ 8-E-Cadherin-Konjugaten, jeweils eine Dosis von etwa 1,5 Gy. Die gleiche Aktivitätskonzentration ergibt bei HSC und L 929 Δ 9, behandelt mit ^{213}Bi -anti- Δ 9-E-Konjugaten, jeweils eine Dosis von etwa 6 Gy. Bei HTB-135 entspricht eine Aktivitätskonzentration von 155 kBq/ml einer Dosis von 0,4 Gy nach der Modellrechnung.

In den Tabellen 47-50 (Klonogene Tests) und den Tabellen 51 und 52 (Induktion von Chromosomenaberrationen) im Anhang sind die Ergebnisse der Dosisabschätzung für die einzelnen Experimente aufgelistet. Dabei sind auch Variablen, die in die Dosisberechnung mit eingehen, wie Aktivitätskonzentration, spezifische Aktivität, besetzter Anteil der E-Cadherine und Anzahl der AK-Moleküle als Vielfaches der E-Cadherin-Anzahl dargestellt. Die Aktivitätskonzentration korreliert mit der verwendeten MAK-Menge, dem besetzten Anteil der Cadherin-Moleküle und der daraus errechneten Dosis. Die spezifische Aktivität der RI beeinflusst ebenfalls das Ausmaß der Dosis. Dabei kann eine gleich hohe Dosis mit geringerer AK-Konzentration erreicht werden, wenn die spezifische Aktivität entsprechend größer ist.

Bei den klonogenen Tests waren die applizierten Aktivitätskonzentrationen mit bis zu maximal 2.057 kBq/ml deutlich höher als die in den Versuchen zur Induktion von Chromosomenaberrationen (bis maximal 777 kBq/ml). Die Aktivitätskonzentrationen der RI wurden deshalb so niedrig gewählt, weil bereits aus klonogenen Tests bekannt war, dass die Unterschiede im Überleben bei Δ 9-E-Cadherin- bzw. WT-E-Cadherin-exprimierenden Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- Δ 9-E-Cadherin-Konjugaten ab 1.000 kBq/ml nicht beobachtbar waren. Der Überschuss an AK-Molekülen im Vergleich zu Antigen-Molekülen war in den klonogenen Tests viel größer (bis maximal 1 Millionfach) als in den Experimenten zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen (maximal 102fach). Das ist durch die geringere Zellkonzentration in den klonogenen Tests bedingt. Als Folge war die Bestrahlung der Zellen durch nicht gebundene RI, der sogenannte Cross fire effect, in den klonogenen Tests ausgeprägter.

5. Diskussion

5.1 Zur Ermittlung von Zellproliferationsraten und plating efficiencies

Alle Experimente dieser Arbeit wurden in-vitro mit etablierten Zelllinien durchgeführt. Für die verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche Verdopplungszeiten ermittelt. Am schnellsten proliferierten die MDA-Zellen und die murinen Fibroblasten (L 929) mit Verdopplungszeiten von 22 bis 26 h. Die Magenkarzinomzellen HSC und HTB-135 benötigten durchschnittlich 36 bzw. 49 h um sich zu verdoppeln.

Abhängig von der Grundfläche der Zellkulturgefäße von 2 bis 75 cm² wurden zwischen 20 und 6,5*10⁶ Zellen ausgesät.

Bei Aussaat einer jeweils identischen Anzahl von Zellen bildeten sich bei den verschiedenen Zelllinien jeweils unterschiedliche Anzahlen von Kolonien. Diese Unterschiede werden durch die unterschiedlichen PEs wiedergegeben.

Die PE ist für jede Zelllinie charakteristisch und gibt das Verhältnis gebildeter Klone zu ausgesäter Zellzahl wieder. Sie ist abhängig von der ausgesäten Zellzahl im Bezug zur vorhandenen Fläche. Am aussagekräftigsten sind klonogene Tests in dem Bereich, in dem PE und ausgesäte Zellzahl linear korrelieren. In anderem Fall kann das Überleben geringer ausfallen als im optimalen PE-Bereich (Pomp et al, 1996). In Versuchen zur Ermittlung der optimalen Zellzahl in 24-Well-Platten stieg die PE bei HSC (40-320 Zellen/Well), L 929 Δ 9 (10-80 Zellen/Well) und MPE-600 (30-200 Zellen/Well) in etwa mit der ausgesäten Zellzahl linear an. Dagegen blieb sie bei den Zelllinien L 929 WT (40-200 Zellen/Well) und HTB-135 (70-560 Zellen/Well) über den gesamten untersuchten Bereich weitgehend konstant (siehe Tabelle 19).

Die PEs verschiedener Passagen von ein und derselben Zelllinie zeigten ebenfalls Unterschiede. Am stärksten ausgeprägt waren diese Unterschiede bei der Zelllinie HTB-135.

Mit HTB-135 ergab eine Aussaat von ca. 300 Zellen/Well in einen Experiment (Passage 12) durchschnittlich 7 Klone/Well (PE 0,02) und in einem anderen Versuch (Passage 16) durchschnittlich 16 Klone/Well (PE 0,06). Bei HSC stimmte die PE bei gleicher Aussaat in verschiedenen Experimenten in etwa überein. Bei den murinen Fibroblasten (L 929) zeigte die grafische Darstellung der Häufigkeiten der Klonzahlen/Well bei Aussaat von 40 Zellen/Well eine angedeutete Normalverteilung, während sich die Häufigkeit der Klonzahlen bei HSC eher bandförmig über einen bestimmten Bereich erstreckte (Abbildungen 17, 22 und 23).

Schwankungen der PE oder der ermittelten Verdopplungszeiten könnten folgende Ursache haben: Die Passagierung der Zellen beeinflusst das Proliferationsverhalten. Beim Passagieren der Zellen über einen längeren Zeitraum zeigte sich insbesondere bei HSC eine Abnahme der Verdopplungszeit entsprechend einer beschleunigten Proliferation. Bei MDA-Zellen, L 929 und

HTB-135 war dieser Effekt geringer ausgeprägt als bei HSC. Die Ursache für beschleunigte Proliferation könnte die Steigerung der Zellteilung, vermittelt durch Zellkontakte bei höherer Zelldichte, sein.

5.2 Zur Markierung der Antikörper mit Radionukliden

Folgende Qualitätsmerkmale hinsichtlich der Markierung seien hier nochmals erläutert:

Die Markierungseffizienz (%) beziffert den Anteil des zur Markierung verwendeten Nuklids, der sich unmittelbar nach der Markierung am MAK befindet. Die radiochemische Reinheit gibt an, welcher Prozentsatz des Radionuklids nach der Gelfiltration über die PD-10 Säule am MAK gebunden vorliegt. Nach der Markierung soll der Anteil an freiem Radionuklid möglichst gering sein, d.h. es sollen möglichst nur Radioimmunkonjugate vorliegen. Zu diesem Zweck wurde die Gelfiltration durchgeführt, die den Anteil des freien Radionuklids von vorher (Markierungseffizienz) zu nachher (Radiochemische Reinheit) im Bezug zur Gelfiltration vermindert. Für die Markierung des anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin mit ^{111}In betrug der Median der Markierungseffizienz $91 \pm 9\%$ und der radiochemischen Reinheit $93 \pm 8\%$. Die Mediane für Markierungseffizienz bzw. für radiochemische Reinheit nach der Markierung der MAK mit ^{213}Bi betragen $93 \pm 13,6\%$ bzw. $97 \pm 11\%$ bei 42 Markierungen.

Die spezifische Aktivität der Radioimmunkonjugate wird sowohl durch den Aktivitätsverlust, als auch durch den Verlust von MAK bei der Gelfiltration beeinflusst. An Beispielen von verschiedenen Markierungsvorgängen des MAKs mit ^{213}Bi sei dies näher erläutert. Ein Markierungsvorgang bei dem $75 \mu\text{g}$ MAK und $230 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ eingesetzt wurden, führte zu einer spezifischen Aktivität der RI im Bereich der durchschnittlich erreichten von etwa $800 \text{ kBq}/\mu\text{g}$. Dabei waren vor der Markierung 330mal und nach der Markierung 1.200mal mehr AK-Moleküle als ^{213}Bi -Atome vorhanden. Der AK-Verlust durch die Gelfiltration betrug 57% und der Aktivitätsverlust 76% . Bei einem anderen Markierungsvorgang, bei dem $130 \mu\text{g}$ MAK und $110 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ eingesetzt wurden, wurde ebenfalls die durchschnittliche spezifische Aktivität erreicht. Vor der Markierung waren dabei 1.200mal und nach der Markierung 1.400mal mehr AK-Moleküle als ^{213}Bi -Atome vorhanden, wobei der AK-Verlust 29% und der Aktivitätsverlust durch die Gelfiltration 47% betrug. Diese Beispiele machen deutlich, dass die Gelfiltration sehr unterschiedliche AK-Verluste und Aktivitätsverluste bedingen kann, die jeweils in einem großen Bereich zwischen 30 und 70% liegen. Die beschriebenen Aktivitätsverluste sind alleinig durch die Aufnahme der PD-10 Säule von ^{213}Bi bzw. ^{213}Bi -Immunkonjugaten bedingt, die Verluste durch radioaktiven Zerfall sind dabei noch nicht berücksichtigt.

Da die erreichbaren Aktivitäten von ^{213}Bi durch Elution am $^{213}\text{Bi}/^{225}\text{Ac}$ -Generatorsystem durch die Beladung vorgegeben sind, ist eine Steigerung der spezifischen Aktivität nur durch Verringerung der AK-Menge möglich. Die Beladung des Generators mit ^{225}Ac durch das Institut für Transurane mit Aktivitäten zwischen 370 und 600 MBq führten zu Aktivitätsausbeuten von 20 bis 240 MBq ^{213}Bi bei der Elution. Die Aktivitätsausbeute wurde auch durch die Zeitpunkte der Elution nach Beladung des Generators beeinflusst.

In der Lösung der Radioimmunkonjugate sind neben den Radioimmunkonjugaten, unmarkierten AK-Molekülen und freiem Radionuklid jeweils auch die Zerfallsprodukte der Radionuklide vorhanden. ^{213}Bi zerfällt zu stabilem ^{209}Bi , das jeweils vor einer Elution durch Spülung entfernt wurde. ^{111}In wurde bis maximal 3 d nach dem Kalibrierungsdatum verwendet. Demnach war nach 3 d entsprechend der $t_{1/2}$ von 2,8 d minimal 1,1fach so viel stabiles ^{111}Cd wie ^{111}In in der Lösung vorhanden. Das ^{111}Cd wie auch das ^{209}Bi verringern die spezifische Aktivität der entsprechenden Radioimmunkonjugate durch Bindung an die Chelate.

Bei ^{213}Bi (Zerfallsenergie 8,4 MeV) ist eine Radiolyse des chelatierten MAKs durch α -Partikel nicht ausgeschlossen.

5.3 Zur Quantifizierung der Antigene pro Zelle

Die Anzahl der E-Cadherin-Moleküle pro Zelle der verwendeten Zelllinien wurde sowohl mittels FACS als auch mittels Scatchard-Analyse ermittelt. Dabei zeigten sich deutlich unterschiedliche Ergebnisse. Werden die Zelllinien nach Anzahl der E-Cadherin-Moleküle pro Zelle sortiert, so sind die Reihenfolgen, ermittelt mit FACS bzw. Scatchard-Analyse, identisch. Die absoluten Zahlen der E-Cadherin-Moleküle pro Zelle weichen je nach Methode stark voneinander ab.

Für die untersuchten Zelllinien (MDA $\Delta 9$, MDA WT, L 929 $\Delta 9$, L 929 WT, HSC) wurden mit FACS zwischen 126.000 und 357.000 E-Cadherin-Moleküle pro Zelle ermittelt. Die Scatchard-Analysen lieferten dagegen Zahlen von 16.000 bis 120.000 E-Cadherin-Molekülen pro Zelle. Die Ergebnisse der Scatchard-Analysen variierten von Experiment zu Experiment um bis zu 500%, z.B. wurden für MDA $\Delta 9$ zwischen 28.000 und 98.000 Antigene pro Zelle ermittelt. Miederer (Miederer et al, 2003) bestimmte die Anzahl der E-Cadherin pro MDA-Zelle mittels Scatchard zu 40.000-60.000.

Die durch FACS ermittelten Daten weisen dagegen nur eine Streuung $<10\%$ auf.

Die Scatchard-Analysen wurden in der Regel mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten durchgeführt. Daher variierte die spezifische Aktivität von Versuch zu Versuch aus den unter 5.2 beschriebenen Gründen. Unterschiedliche spezifische Aktivitäten der RI bedingen bei unterschiedlichen AK-Konzentrationen identische Aktivitäten. Da aus den gemessenen Aktivitäten zur Bildung des Scatchard-Plots ein Quotient gebildet wird, ist nicht die absolute Höhe der Aktivität entscheidend. Die Lage der gebildeten Quotienten zueinander im Scatchard-Plot bestimmt die Steigung der Regressionsgeraden und damit deren Schnittpunkt mit der x-Achse. Aus diesem Schnittpunkt wird an Hand der verwendeten AK-Konzentrationen die Anzahl der Bindungsstellen berechnet. Die Schwankung der spezifischen Aktivität sollte sich aber auswirken, wenn sie die Sättigungsverhältnisse der Bindungsstellen an den Zellen verändert. Nach Repke (Repke und Liebmann; 1987) ist das Ergebnis einer Scatchard-Analyse nur dann aussagekräftig, wenn 20-80% der potentiellen Bindungsstellen abgesättigt werden. Eine 90%ige Absättigung wird als ideal angesehen. Der Prozentsatz der mit anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin abgesättigten $\Delta 9$ -E-Cadherine wurde mit Hilfe der Assoziationskonstante $K_a (=1,82 \cdot 10^8 \text{ l/mol})$ von anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin berechnet (siehe 3.11.1). Demnach waren zwischen 5 und 45% der Antigene abgesättigt. Die Variation der AK-Konzentrationen sollte zeigen, ob eine 32-87%ige Absättigung der Antigene die Ergebnisse verändert. Obwohl sich der Sättigungsgrad hier im optimalen Bereich befand, wich das entsprechende Ergebnis nicht von den übrigen ab.

Bei der Scatchard-Analyse dient als Basis zur Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen eine aus den Messwerten extrapolierte Regressionsgerade. Maßgeblich für die Anzahl der Bindungsstellen ist dabei die Steigung der Geraden. Bereits geringe Schwankungen der Steigung, die durch Interpolation zu Stande kommen, bedingen große Veränderungen der Anzahl der ermittelten Bindungsstellen pro Zelle.

Demgegenüber wird bei der quantitativen FACS-Analyse für jeden Versuch eine Standardgerade erstellt, mit deren Hilfe die gemessenen Fluoreszenz-Werte direkt in Bezug zu einer definierten Anzahl von Antigenen gesetzt werden. Dadurch sind verschiedene Experimente gut miteinander vergleichbar. Beispielsweise konnten in unabhängigen Experimenten (persönliche Mitteilung Dr. Jörg Mages) mit Zellen einer jeweils anderen Passage durchschnittlich für HSC 270.000 ± 10.000 , für MPE-600 290.000 ± 12.500 , für MDA $\Delta 8$ 89.000 ± 3.000 , für MDA $\Delta 9$ 200.000 ± 600 und für MDA WT 240.000 ± 36.000 E-Cadherine an der Oberfläche einer Zelle an Hand der Messung berechnet werden. Die Erstellung einer Standardgerade für jedes Experiment bei der quantitativen FACS-Analyse entspräche bei der Durchführung von Scatchard-Analysen nach Sättigungsexperimenten einer Durchführung mit stets der gleichen Absättigung der Bindungsstellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels FACS-Analyse ermittelten Ergebnisse waren reproduzierbar und daher mit deutlich geringeren Schwankungen behaftet als die mittels Scatchard-Analyse. Dementsprechend wurden die mittels FACS ermittelten Werte als repräsentativ angesehen.

5.4 Zur Kinetik der Bindung und Internalisierung von Radioimmunkonjugaten

Folgende Fragen galt es an Hand der Kinetikversuche zu beantworten:

1. Unterscheiden sich die Internalisierungskinetiken von ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bei Zellen mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression und Zellen mit WT-E-Cadherin-Expression bzw. ohne E-Cadherin-Expression?
2. Welchen Einfluss hat die Inkubationstemperatur auf die Internalisierungskinetik der RI?
3. Wie verhalten sich bereits gebundene und internalisierte RI nach Entfernung der ungebundenen RI?

Zu 1. In sämtlichen Experimenten, durchgeführt bei 4°C , 25°C bzw. 37°C , bewegte sich der internalisierte Anteil der verabreichten RI bei $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zellen zwischen 0,2 und 18,8 %, bei WT-E-Cadherin exprimierenden Zellen und Zellen ohne E-Cadherin-Expression zwischen 0,01-19,7 %. Diese Versuchsergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Internalisierung abhängig von der Expression des $\Delta 9$ -E-Cadherins bzw. des WT-E-Cadherins. Mittels der Bindung des F_c -Teils an Zelloberflächenantigenen, können auch für bestimmte Antigene unspezifische Antikörper an Zelloberflächen binden. Untersuchungen in Bindungstests nach Inkubation von HSC mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten zeigten, dass $14 \pm 3,2\%$ bzw. nur $2,9 \pm 0,7\%$ der RI an den Zellen ($5 \cdot 10^6/\text{ml}$) gebunden hatten (Seidl et al, 2005). Nach erfolgreicher Bindung ist davon auszugehen, dass eine nachfolgende Internalisierung möglich ist. Die zitierte Arbeit zeigte jedoch Unterschiede bezüglich des Ausmaßes der Bindung, während die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Internalisierung der verschiedenen Zelllinien in gleich hohem Ausmaß hinweisen.

Zu 2. Die deutliche Zunahme der Internalisierung bei 25°C (0,1-3,4%) im Vergleich zu 4°C (0,4-0,7%) am Beispiel von L 929 $\Delta 9$ entspricht der Erwartung aufgrund höherer Stoffwechselaktivität. Bei 37°C war der internalisierte Anteil höher als bei 4°C und niedriger als bei 25°C (1,3-1,6%). Die Zunahme des internalisierten Anteils der RI war im Versuchszeitraum viel geringer als bei 25°C . Ebenso unerwartet ist die Tatsache, dass bei 4°C auch Bindung und Internalisierung stattfinden können. So betrug beispielsweise der internalisierte Anteil der RI bei HSC bei 4°C zwischen 1,2 und 1,7% während er bei 25°C 0,2-2,0% betrug.

Die Bindung von AK an Antigenen ist ein dynamischer Prozess, der gemäß dem Massenwirkungsgesetz in einem Gleichgewicht zwischen Hin- und Rückreaktion endet. Auf welchem Niveau sich das Gleichgewicht einstellt, hängt von der Assoziationskonstanten K_a ab. Da die Voraussetzung für Internalisierung die Bindung der AK an Zelloberflächen-Antigenen ist, wird auch die Internalisierung von dem Ausmaß und der Dynamik der Bindung beeinflusst. Die Geschwindigkeit der Prozesse hängt von der Temperatur ab. Die Dynamik von Bindung und Internalisierung wurde für verschiedene Zelllinien jeweils mit $\Delta 9$ -E-Cadherin bzw. mit WT-E-

Cadherin oder ohne E-Cadherin bei 4°C, 25°C und 37°C untersucht. Dabei war auffallend, dass die Werte über den Zeitverlauf bei 4°C und 37°C weitgehend konstant blieben, während sich die Werte bei 25°C über den gemessenen Zeitraum (0-3 h) stark veränderten (bis zu 30fach höher als der Ausgangswert). Eine Erklärung dafür könnte möglicherweise sein, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei 4°C so langsam ist, dass das betrachtete Zeitintervall zu kurz war um die stattfindenden Änderungen der Konzentrationsverhältnisse darzustellen. Dem entsprechend fanden die Veränderungen bei 37°C möglicherweise vor dem eigentlichen Beobachtungsintervall statt. In einer Untersuchung an EGFR-III-Rezeptor exprimierenden Zellen wurde die Internalisierung von radioaktiv markiertem AK bei 37°C nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4°C bzw. 37°C verglichen. Dabei wurden von den Zellen nach der Inkubation bei 37°C mehr RI internalisiert als bei 4°C (Foulon et al, 2001). Die stärksten Veränderungen waren in den ersten 5 h der Kinetik über 24 h bezüglich der Bindung unabhängig von der Inkubationstemperatur zu Anfang zu verzeichnen.

Zu 3. Die Versuche zur Bindung und Internalisierung nach Entfernung von ungebundenen RI sollten Aufschluss darüber geben, in wie weit das Verhältnis von gebundenen zu internalisierten RI konstant bleibt.

Die Ergebnisse der Versuche mit ¹²⁵I-Immunkonjugaten bzw. ¹¹¹In-Immunkonjugaten sind dabei getrennt zu betrachten, da die gebundenen ¹²⁵I-Immunkonjugate mit Glycin und die gebundenen ¹¹¹In-Immunkonjugate mit Natriumacetat von der Zelloberfläche abgelöst wurden. Bei den Versuchen mit ¹²⁵I-Immunkonjugaten wurden genauso viele RI-Moleküle eingesetzt, wie Antigenmoleküle vorhanden waren. In den Experimenten mit ¹¹¹In-Immunkonjugaten dagegen wurden ca. 30-40mal so viele RI-Moleküle eingesetzt, wie E-Cadherin-Moleküle an der Zelloberfläche vorhanden waren.

Die Ergebnisse der ¹²⁵I-Immunkonjugat-Experimente bei 37°C zeigten für MDA Δ9 und L 929 Δ9 jeweils höhere Werte für Internalisierung (61-72% und 55-88%) als für Bindung (25-33% und 12-45%). Dagegen waren bei MDA WT und L 929 WT die Werte für Bindung (60-75% und 48-69%) höher als für Internalisierung (21-43% und 31-52%). Die RI-Menge entsprechend der Anzahl der E-Cadherin-Moleküle verursachte eine 3- bzw. 4-%ige Absättigung der Δ9-E-Cadherine (MDA Δ9 bzw. L 929 Δ9). Bei MDA WT und L 929 WT waren dagegen nur 0,04% und 0,05% der WT-E-Cadherine durch die RI abgesättigt. In den Experimenten mit ¹¹¹In-Immunkonjugaten führte ein 17-166facher Überschuss im Vergleich zur Antigenanzahl bei unspezifischer AK-Antigen-Wechselwirkung dazu, dass 1,5-2,7 % der Antigene mit MAK abgesättigt waren und für eine spezifische AK-Antigen-Wechselwirkung zu einer Absättigung von 61-73 % der Antigene.

Bei 25°C betrug der gebundene Anteil der ¹¹¹In-Immunkonjugate bei Zellen mit Δ9-E-Cadherin-Expression zwischen 6 und 21%. Diese Werte unterschieden sich kaum von den entsprechenden

Werten bei Zellen mit WT-E-Cadherin oder ohne E-Cadherin von 1-23%. Internalisiert wurden 5-70% ($\Delta 9$) bzw. 2-52% (WT, HTB-135).

Bei 4°C wurden von Zellen mit $\Delta 9$ -E-Cadherin 1-7% der RI gebunden und 4-30% internalisiert. Von Zellen ohne E-Cadherin oder mit WT-E-Cadherin wurden 1-36% der RI gebunden und 0,2-70% internalisiert. Die Ergebnisse bei 4°C bzw. 25°C unterscheiden sich demnach kaum. Expression bzw. fehlende Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin scheint daher bezüglich Bindung und Internalisierung der ^{111}In -Immunkonjugate an $\Delta 9$ -E-Cadherinen nicht von Bedeutung zu sein. Die ermittelten Werte zeigen nur den relativen Verlauf während des Beobachtungszeitraumes ausgehend von dem Zeitpunkt vor dem Entfernen der ungebundenen RI. Absolute Aussagen zur Menge der internalisierten RI sind nicht zu treffen, weil die Menge zu Beginn der Kinetik nicht bestimmt wurde.

Bei Experimenten, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach identischem Protokoll durchgeführt wurden, traten teilweise erhebliche Unterschiede im Ausmaß von Bindung und Internalisierung der RI auf. Als Beispiele seien die Ergebnisse von L 929 WT mit Mediumwechsel nach einer Inkubation bei 25° für 5 min und die von HSC ohne Mediumwechsel bei 25° genannt. In den Experimenten mit Mediumwechsel und Zellen mit WT-E-Cadherin unterschieden sich die Werte folgendermaßen: Die Werte für Bindung und Internalisierung betragen im einen Fall zwischen 5-11 % und 4-13 %, im anderen Fall 10-16 % und 33-49 %. Bei HSC betragen die Werte für Bindung 0,1-0,6 % und die Werte für Internalisierung 0,2-2,4 % in einem Experiment, während sie in einem anderen Experiment 0,1-3,1 % und 0,4-12,4 % betragen. Dabei ist auffallend, dass die absoluten Werte sich zwar stark unterscheiden, jedoch das Verhältnis zwischen gebundenem und internalisiertem Anteil jeweils ähnlich ist. Als Ursachen dafür, dass die absoluten Werte sowohl für Bindung als auch für Internalisierung sich stark unterscheiden, könnten unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten der Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien sowie Unterschiede in der spezifischen Aktivität der RI in Frage kommen. Ungenauigkeiten in der Versuchsdurchführung können die aufgetretenen Schwankungen nicht erklären. Dafür spricht auch, dass die Standardabweichungen der Werte prozentual immer in etwa gleich hoch sind.

Die Schwankungen der spezifischen Aktivität der RI (1-147 kBq/ μg) und die Tatsache, dass die absolute Menge der zu Beginn der Kinetik gebundenen und internalisierten RI nicht bestimmt wurde, scheinen die auftretenden Schwankungen hauptsächlich zu erklären. Unterschiedliche spezifische Aktivitäten bedingen unterschiedliche Sättigungsgrade der E-Cadherin-Moleküle, die bei dem unmittelbaren Zusammenhang von Bindung und Internalisierung einen maßgeblichen Einfluss auf die Internalisierung haben könnten.

In der Literatur werden Internalisierungskinetiken mittels sehr verschiedener Methoden durchgeführt. Darunter sind Experimente nach Inkubation mit RI mit Messung der

freien/gebundenen und internalisierten RI (Vaidyanathan et al, 2001) ebenso wie fluoreszenzvermittelte Färbemethoden mit nachfolgender mikroskopischer Darstellung (Henderikx et al, 2002).

In ersteren Experimenten werden zur Ablösung der RI verschiedene Puffer (HCl-Puffer, Na-Acetat-Puffer bzw. Glycin-Puffer) verwendet. Die Kinetiken werden sowohl während der Inkubationzeit (McDevitt et al, 2000) als auch nach Entfernung von ungebundenen Radioimmunkonjugaten durchgeführt (McDevitt et al, 2001).

Die Kinetik wird in den meisten experimentellen Ansätzen über 24 h, aber auch über kürzere Zeiträume (z.B. 120 min) untersucht (Schottelius et al, 2005). Die vielen verschiedenen experimentellen Methoden weisen darauf hin, dass es bis jetzt keine Standardmethode gibt, die sich ausreichend bewährt hat. Insofern ist die Relevanz bzw. Interpretierbarkeit von Internalisierungsexperimenten grundsätzlich in Frage zu stellen.

5.5 Vergleich der Strahlensensibilitäten der untersuchten Zelllinien gegenüber ^{137}Cs -Bestrahlung und Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Die Überlebensraten von HSC nach ^{137}Cs -Bestrahlung bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten als Maß für die Strahlensensibilität lassen sich nicht miteinander vergleichen, da im ersten Fall mit einer Dosis (Gy) und im anderen Fall mit Aktivitätskonzentrationen (kBq/ml) gearbeitet wurde. Um die verwendeten ^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen definierten Dosen zuordnen zu können, wurde ein vereinfachtes Modell zur Berechnung der Dosis zu Grunde gelegt. Die genaue Vorgehensweise und deren Ergebnisse sind in den Kapiteln 3.10 und 4.8 dargestellt. Die Dosis, als absorbierte Energie pro Masseneinheit, wurde ausgehend von der Anzahl der ^{213}Bi -Atome, die während der Inkubationszeit zerfallen sind, berechnet. Dabei wurde unterschieden zwischen den ^{213}Bi -Immunkonjugaten, die sich frei im Medium befanden, die an E-Cadherinen gebunden waren und die von Zellen internalisiert worden waren. Die Anzahl der gebundenen RI wurde an Hand vom Massenwirkungsgesetz und der Assoziationskonstanten K_a des verwendeten AKs berechnet. Dabei gingen auch die Anzahl der E-Cadherine pro Zelle, die Zellkonzentration und die AK-Konzentration in die Berechnung mit ein. Die spezifische Aktivität lieferte die Information wie viele ^{213}Bi -Atome an den besetzten E-Cadherinen zerfallen sind. Die Anzahl der internalisierten RI wurde aus den Ergebnissen der Internalisierungs-Experimente gewonnen. Welcher Anteil der Energie der α -Teilchen von den Zellen absorbiert worden ist, wurde mittels geometrischen Daten (Zelldurchmesser, Reichweite der α -Teilchen) und des linearen Energie Transfers (LET) berechnet. Die vereinfachenden Annahmen zur Annäherung waren u.a., dass die Zellen kugelförmig sind, die Masse und Dichte von Zellen gleich der von Wasser sind und der LET konstant ist.

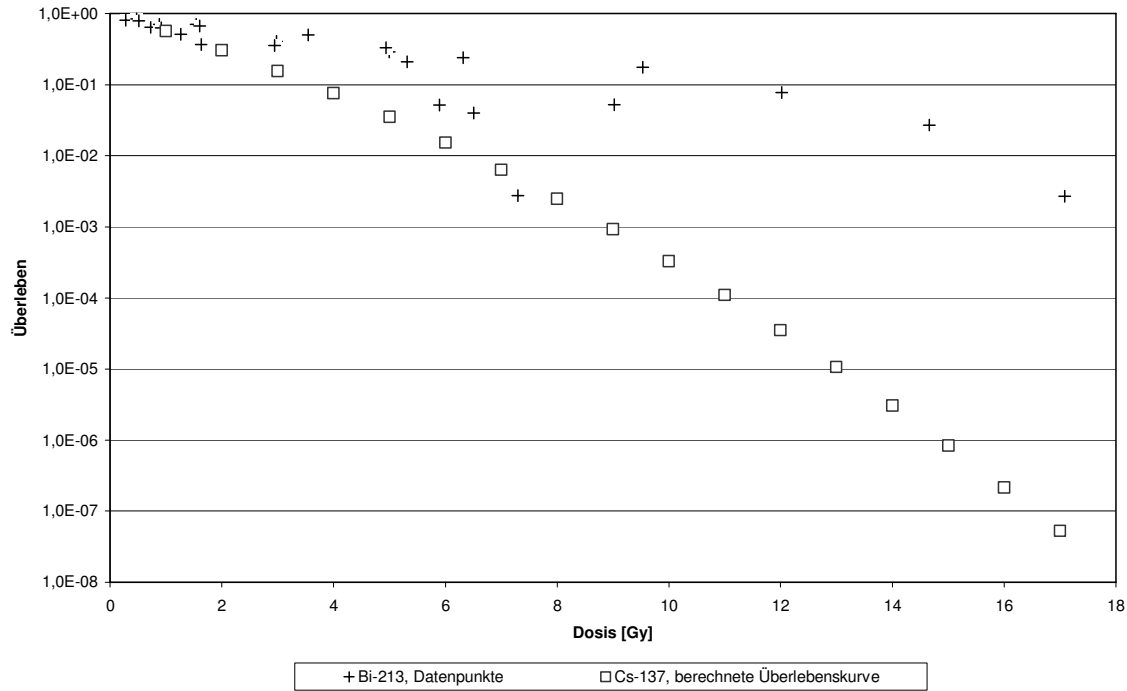


Abbildung 36: Überleben von HSC nach ^{137}Cs -Bestrahlung bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Abhängigkeit von der Dosis (Gy)

Nach Umrechnung der verwendeten ^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen in Dosis-Werte konnten die Überlebensdaten nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten mit den Überlebensdaten nach ^{137}Cs -Bestrahlung dosisabhängig dargestellt werden. Die Überlebensdaten nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten und die an Hand der Daten berechneten Parameter der Überlebenskurve nach Bestrahlung mit ^{137}Cs (Kapitel 4.5) sind jeweils für die Zelllinien HSC, L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT in den Abbildungen 36-38 dargestellt. An Hand der Überlebensdaten nach ^{137}Cs -Behandlung wurden die Parameter für eine Überlebenskurve nach dem linear-quadratischen Modell, das für γ -Strahlung Gültigkeit hat, berechnet. Die Anzahl der Datenpunkte zur Berechnung der Überlebenskurve nach ^{137}Cs -Bestrahlung war gering (2-8) im Vergleich zur Anzahl der Datenpunkte nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (25-32). Unter der Annahme, dass die Daten bei häufigerer Durchführung für ^{137}Cs -Bestrahlung genauso stark streuen, wie die Datenpunkte nach Behandlung mit den ^{213}Bi -Immunkonjugaten, gibt die berechnete Überlebenskurve für die ^{137}Cs -Bestrahlung nicht das tatsächliche Überleben wieder.

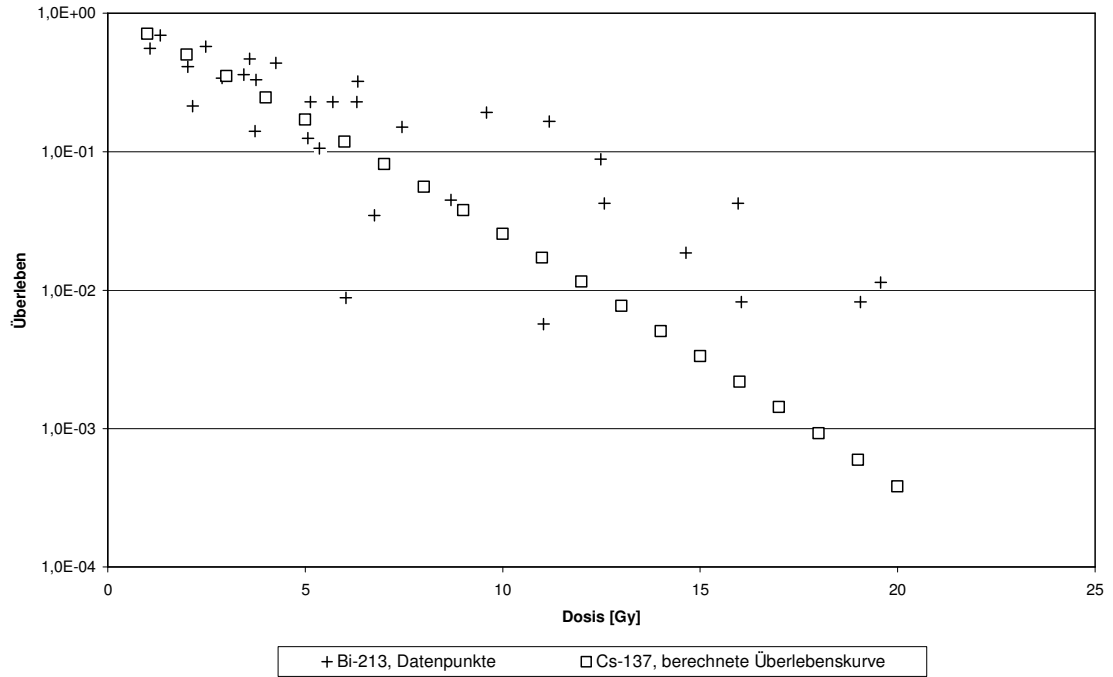


Abbildung 37: Überleben von L 929 $\Delta 9$ nach ^{137}Cs -Bestrahlung bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Abhängigkeit von der Dosis

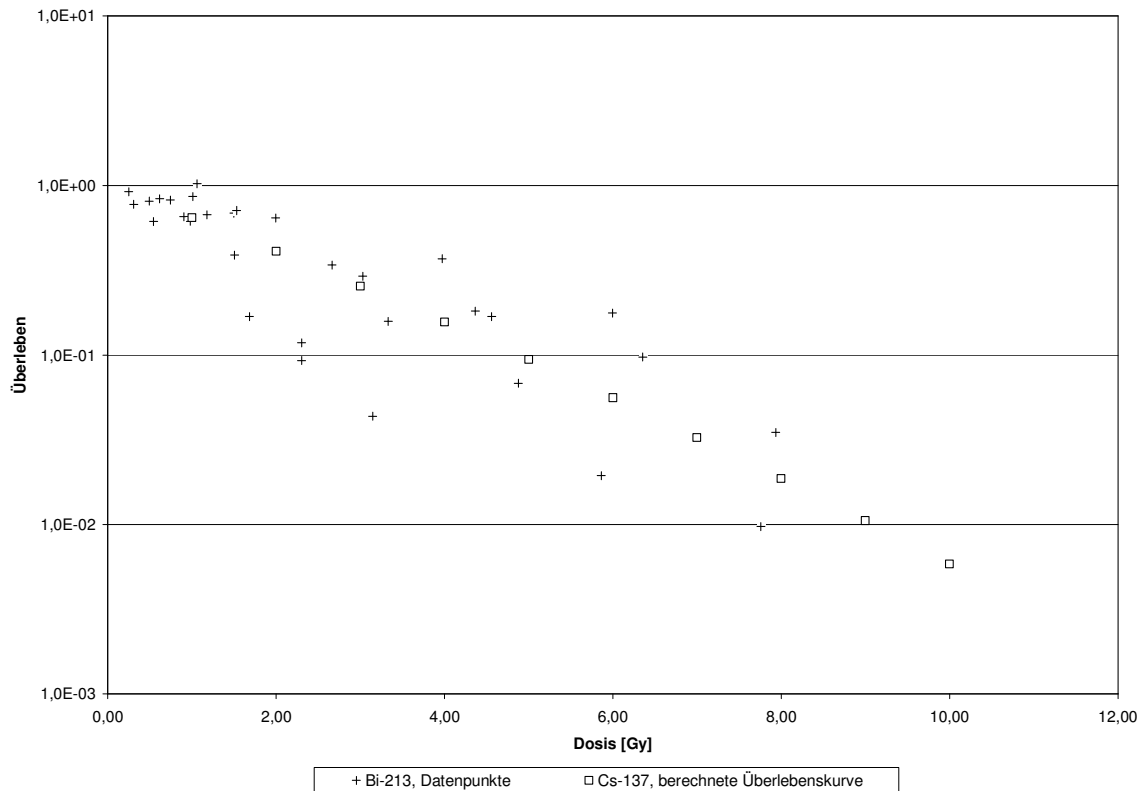


Abbildung 38: Überleben von L 929 WT nach ^{137}Cs -Bestrahlung bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Abhängigkeit von der Dosis

Bei in etwa gleichen Dosen resultiert nach ^{137}Cs -Bestrahlung (γ) bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (α) bei L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT ein etwa identisches Überleben (Abbildungen 37 und 38).

Für HSC ergibt die Modellrechnung, dass bei identischen Dosen α -Strahlung das Überleben der Zellen weniger stark reduziert als γ -Strahlung (Abbildung 36).

Da die relative biologische Wirksamkeit von α -Strahlung ca. um den Faktor 15 höher liegt, als die von γ -Strahlung (Schmid et al, 1996), muss das dosimetrische Modell, das den berechneten Daten für ^{213}Bi zu Grunde liegt, die tatsächliche Dosis deutlich überschätzen.

5.6 Bewertung der Überlebenskurven nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Überlebenskurven werden in der Strahlenbiologie als Dosis-Effekt-Kurven zur Einschätzung der zytotoxischen Wirkung verwendet. Dabei wird unter Überleben die Fähigkeit zur Proliferation verstanden. Die Datengrundlage liefern daher klonogene Tests: Es werden bei unterschiedlichen Strahlendosen die jeweiligen Überlebensraten bestimmt. Die Überlebensrate errechnet sich aus der Anzahl der gebildeten Klone dividiert durch das Produkt aus ausgesäter Zellzahl und PE. Traditionell werden die Überlebensraten auf der y-Achse in logarithmischem und die Strahlendosen auf der x-Achse in linearem Maßstab aufgetragen. Diese Methode ist etwa seit Mitte der fünfziger Jahre etabliert (Puck und Marcus, 1953).

Für Strahlung unterschiedlicher Ionisationsdichte gibt es unterschiedliche mathematische Modelle für den Verlauf der Überlebenskurve. Für leicht ionisierende Strahlung beschreibt das linear-quadratische Modell (Gleichung 3, siehe auch Kapitel 3.7) die Überlebensdaten am besten.

$$y = e^{-\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2} = e^{-\alpha \cdot D - \frac{\alpha \cdot D^2}{\beta}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Für stark ionisierende Strahlung wie Neutronen- und α -Strahlung gilt ein rein lineares Modell bei halblogarithmischer Darstellung (Gleichung 4, siehe auch Kapitel 3.8).

$$y = e^{k-x\alpha} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Beide Modelle werden der Vorstellung gerecht, dass bei leicht ionisierender Strahlung reparable (quadratische Komponente) und irreparable (lineare Komponente) Schäden auftreten, während bei stark ionisierender Strahlung weitgehend alle Schäden als irreparabel angenommen werden (Kauffmann G. et al, 1996). Der Begriff irreparabel umfasst auch Schäden, die fehlerhaft repariert werden. Fehlerhafte Reparatur bedingt in der Regel den Tod einer Zelle.

Für die Überlebensdaten der Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten ist die Berechnung der Überlebenskurven nach dem linearen Modell gerechtfertigt, da ^{213}Bi stark ionisierende α -Partikel emittiert. Nach der Berechnung der Parameter α und k für die Überlebenskurven, werden diese für die verschiedenen Versuche verglichen. Der k -Wert (dimensionslos) bezeichnet den natürlichen Logarithmus der klonogenen Zellzahl pro Well. Der α -Wert ($\text{ml/kBq} \cdot 10^3$) ist ein Maß für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit.

Zielführende Fragestellung

Die klonogenen Tests wurden durchgeführt, um das Ausmaß der Zytotoxizität der ^{213}Bi -Immunkonjugate abschätzen zu können. Dabei war insbesondere von Interesse, ob ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate Zelllinien mit Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin bzw. WT-E-Cadherin

unterschiedlich schädigen. Desweiteren, ob die Schäden, die ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate an einer $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zelllinie (HSC) verursachen, sich in ihrem Ausmaß unterscheiden. Da ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate spezifisch an $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierende Zellen binden, sollten letztere selektiv stärker geschädigt werden als WT-E-Cadherin-exprimierende Zellen.

Ausmaß der Zytotoxizität

Für jede Zelllinie konnte eine zytotoxische Wirkung der ^{213}Bi -Immunkonjugate nachgewiesen werden. Das Ausmaß des Zelltods war dabei immer direkt proportional zur applizierten Aktivität. Extrapoliert man die Datenpunkte für das Überleben, gemäß einer exponentiellen Dosis-Wirkungsbeziehung und ermittelt diejenige Aktivität, die das Überleben auf 37% einschränkt, erhält man Werte zwischen 9 (MPE-600) und 482 (MDA WT) kBq nach Behandlung der Zellen mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (HSC) und ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (HSC und alle anderen verwendeten Zelllinien). Die Werte wurden von kBq/ml an Hand des vorhandenen Volumens in kBq umgerechnet, um sie mit Daten aus anderen wissenschaftlichen Arbeiten vergleichen zu können. Dabei ist nicht gewährleistet, dass die verwendeten Aktivitäten in einem ähnlichen Volumen verabreicht worden sind. Somit ist der direkte Vergleich als problematisch zu betrachten. In einer Untersuchung an CD33 positiven HL 60 Zellen mit ^{213}Bi -anti-CD33-Konjugaten (Abbas Rizvi et al, 2002) zeigte sich eine Reduktion des Überlebens auf 37% bei 81,4 kBq (XTT-Test) und 99,9 kBq (^3H -Thymidin-Inkorporation). Bei der Anwendung von freiem ^{213}Bi war eine Aktivität von 104 MBq (XTT-Test) bzw. 11 MBq (^3H -Thymidin-Inkorporation) notwendig, um das Überleben der Zellen auf 37% zu reduzieren. Ranson et al. untersuchten die zytotoxische Wirkung von ^{213}Bi -markiertem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2 (^{213}Bi -PAI-2) an den Mammakarzinomzelllinien MDA MB-231 und MCF-7. Das Überleben von MDA MB-231 und MCF-7 wurde bei 77 kBq und 85 kBq jeweils auf 37 % reduziert (Ranson et al, 2002). Bei den vorgestellten Daten befindet sich die zytotoxische Wirkung von ^{213}Bi -PAI-2 in der gleichen Größenordnung im Vergleich zu den Experimenten dieser Arbeit, während bei Inkubation mit freiem ^{213}Bi mindestens um das 10fach höhere Aktivitäten für den gleichen zytotoxischen Effekt benötigt werden als mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten.

Selektiv zytotoxische Wirkung von ^{213}Bi -Immunkonjugaten, vermittelt durch spezifische Bindung der Radioimmunkonjugate an $\Delta 9$ -E-Cadherin

Die Selektivität der zytotoxischen Wirkung der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate gegenüber $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierenden Zellen wurde an MDA WT/ $\Delta 9$ und L 929 WT/ $\Delta 9$, jeweils ohne/mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression, untersucht. Abhängig von der $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression zeigten sich relevante Unterschiede im Überleben. Zur Vergleichbarkeit mit obigen Literaturstellen, wird weiter die Aktivität (umgerechnet aus der Aktivitätskonzentration) angegeben. Eine Reduktion des

Überlebens auf 37% wurde bei MDA $\Delta 9$ mit 27 kBq, bei MDA WT mit 482 kBq, bei L 929 $\Delta 9$ mit 86 kBq und bei L 929 WT mit 380 kBq der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate erreicht. Obwohl sich MDA WT und MDA $\Delta 9$ bzw. L 929 WT und L 929 $\Delta 9$ hinsichtlich des E-Cadherin-Gens (WT- bzw. $\Delta 9$ -Mutante) unterscheiden, lässt sich die Frage stellen, ob damit auch Veränderungen in der Strahlensensibilität einhergehen. L 929 $\Delta 9$ Zellen unterscheiden sich morphologisch deutlich von L 929 WT (siehe Abbildungen 39 und 40). L 929 $\Delta 9$ zeigen reduzierte Zelladhärenz resultierend aus dem Verlust von tight-junctions auf Grund fehlender Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit (Fukudome et al, 2000). Hinsichtlich γ -Bestrahlung mit ^{137}Cs erwies sich die Zelllinie L 929 WT strahlensensibler als L 929 $\Delta 9$ (siehe Kapitel 4.5). Ob dieser Unterschied mit der unterschiedlichen Zelladhärenz zusammenhängt, bleibt offen.

Die Tatsache, dass das Überleben von L 929 $\Delta 9$ durch Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten stärker reduziert wird als dasjenige von L 929 WT entspricht der Erwartung, wonach ^{213}Bi -Immunkonjugate selektiv an $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierenden Zellen binden. Bezüglich der Unterschiede in der Strahlensensibilität gegenüber niedrig ionisierender γ -Bestrahlung wäre wohl eher anzunehmen, dass ein ursprünglich noch größerer Unterschied im Überleben hinsichtlich der Inkubation mit ^{213}Bi zwischen den Zelllinien L 929 WT und L 929 $\Delta 9$ maskiert wird.

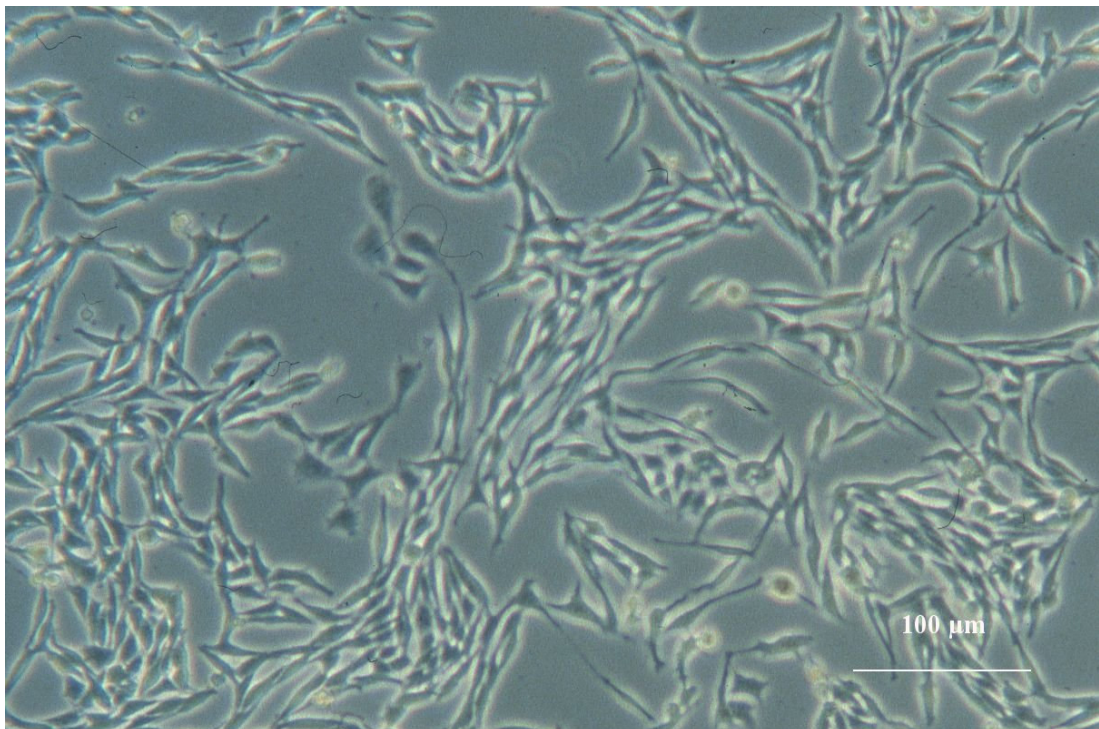


Abbildung 39: L 929 WT in Kultur mit strangförmiger Zelladhärenz

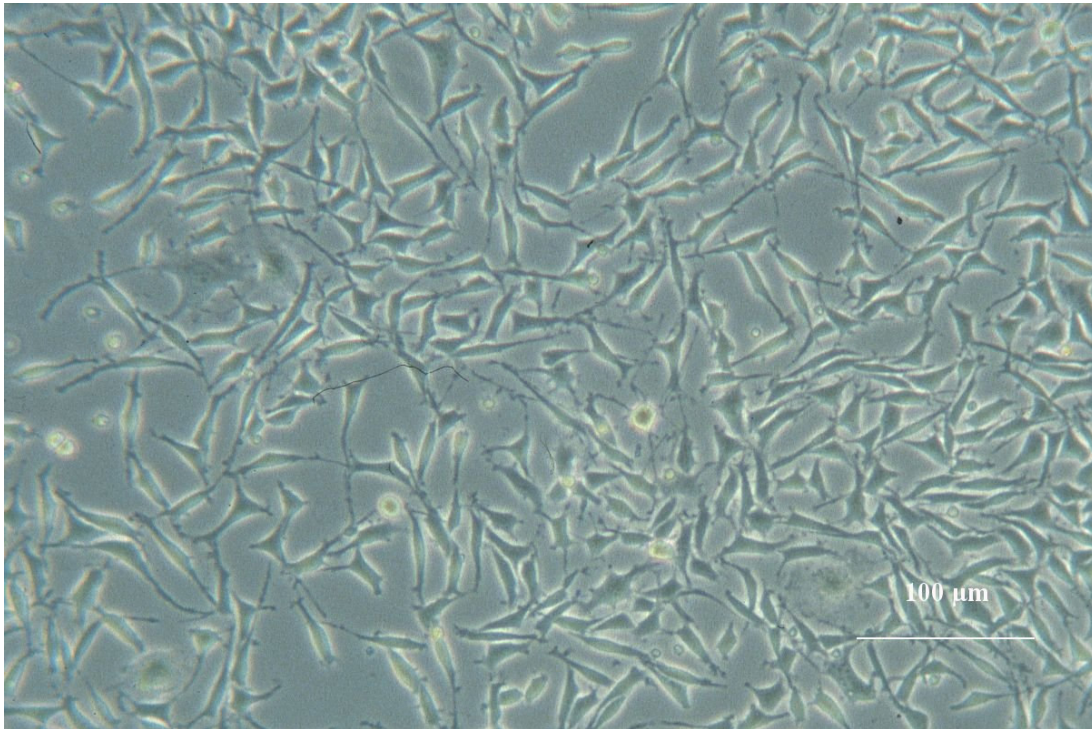


Abbildung 40: L 929 $\Delta 9$ in Kultur mit verminderter Zelladhärenz

Die vorliegenden Ergebnisse mit HSC konnten eine selektive Wirkung der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate nicht bestätigen. HSC Zellen wurden mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten behandelt. Erstere binden spezifisch an $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierende HSC-Zellen, letztere zeigen nur eine geringe unspezifische Bindung. Die extrapolierten Ergebnisse für ein auf 37% reduziertes Überleben zeigen hier zwar einen kleinen Unterschied (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin: 196 kBq, anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin: 233 kBq), jedoch ist dieser Unterschied bei der starken Streuung der Ergebnisse nicht als signifikant anzusehen.

Die spezifische Bindung des anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin an HSC ist mit 14 % deutlich höher als die unspezifische des anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin mit 3 %. Die geringe Bindung von anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin ist durch die unspezifische Wechselwirkung des F_c -Teils des MAKs mit Zelloberflächenproteinen zu erklären (Seidl et al, 2005). Jedoch könnte auch diese unspezifische Bindung der ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate eine zytotoxische Wirkung bedingen. Entsprechend der Annahme, dass die Assoziationskonstante für die unspezifische Bindung zwei Zehnerpotenzen niedriger ist als für die spezifische Bindung (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin: $K_a = 1,82 \cdot 10^8$ l/mol), konnte für HSC berechnet werden, dass bei Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten 0,25-4,7% der E-Cadherine durch die RI abgesättigt wurden, im Gegensatz zu 0,58-87% bei Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten. Trotz dieses großen Unterschiedes bezüglich der Antigen-Absättigung wurden die Zellen in allen Experimenten nahezu gleich stark geschädigt. Die Ursache dafür könnte im sogenannten „Cross fire“-Effekt liegen. Beim „Cross fire“-Effekt werden die Zellen von Radioimmunkonjugaten, die frei im Medium umherschwimmen, bestrahlt. Bei der Reichweite der von ^{213}Bi ausgesandten α -Teilchen von ca. 100 μm können daher auch im Medium frei umher

schwimmende Radioimmunkonjugate Schäden an Zellen bewirken. Bei den klonogenen Tests mit HSC-Zellen befanden sich nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (unspezifisch) 0,5-4 RI gebunden pro Zelle, während frei im Medium pro Zelle 10^5 - 10^7 RI vorhanden waren. Bei Inkubation mit spezifischen RI (^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate) waren pro Zelle 35-154 RI gebunden, frei umherschwimmend im Medium auch 10^4 - 10^7 RI pro Zelle vorhanden.

Die Berechnung der Anzahl der frei umherschwimmenden bzw. gebundenen RI wurde auch für die Zelllinien MDA WT, MDA $\Delta 9$, L 929 WT, L 929 $\Delta 9$, HSC und HTB-135 für ausgewählte klonogene Tests und alle Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenaberrationen durchgeführt (Gleichungen 6-9 in Kapitel 3.10.1). Die Ergebnisse der Berechnungen sind im Anhang in den Tabellen 40-43 für die klonogenen Tests und in den Tabellen 44-46 für die Untersuchungen zu den Chromosomenaberrationen dargestellt.

In den Experimenten zur Induktion von Chromosomenaberrationen war das Verhältnis von AK-Molekülen zur Anzahl der Antigene niedriger als bei den klonogenen Tests. Das hatte zur Folge, dass frei schwimmende RI in den Experimenten zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen bis zu $2,6 \cdot 10^4$ pro Zelle vorkamen, während die Anzahl der freien RI in den klonogenen Tests mit bis zu $1,6 \cdot 10^8$ pro Zelle vielfach höher war. Dies scheint die Erklärung dafür zu sein, dass in den Experimenten zur Induktion von Chromosomenaberrationen im mittleren Dosisbereich, HSC, behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten, deutlich mehr Chromosomenschäden aufweisen als HSC, die mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten behandelt wurden. Dagegen war in den Ergebnissen der klonogenen Tests mit HSC nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten kein signifikanter Unterschied im Zellüberleben festzustellen. Übersteigt die Anzahl der freien RI einen Grenzwert, überwiegt der Crossfire-Effekt.

In den klonogenen Tests könnte das Verhältnis von AK-Molekülen zur Anzahl der Antigene verringert werden. Dazu wäre notwendig, dass eine vergleichsweise hohe Anzahl an Zellen erst nach der Behandlung mit RI in anschließend ausreichend hohen Verdünnungsstufen zum klonogenen Test ausgesät wird. Dieser experimentelle Ansatz könnte die zytotoxische Wirkung durch Crossfire-Effekt verringern.

Die Zelllinien L 929 WT und L 929 $\Delta 9$ wurden jeweils nur mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten behandelt. Unterschiede im Überleben von Zelllinien mit WT-E-Cadherin-Expression gegenüber den Zelllinien mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression sind trotz großer Anzahl von freien ^{213}Bi -Immunkonjugaten pro Zelle im Medium signifikant im Gegensatz zu HSC, inkubiert mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten. Dies ist am ehesten

darauf zurückzuführen, dass die Standardabweichungen beim Überleben von L 929, sowie auch in den Kontrollen dieser Zelllinien wesentlich geringer sind als bei HSC.

Höhere zytotoxische Wirkung im niedrigen Aktivitätsbereich

Auffällig ist bei den Überlebenskurven innerhalb einer Zelllinie, insbesondere für L 929 $\Delta 9$ und HSC, dass die α -Werte (Parameter zur mathematischen Beschreibung der Überlebenskurve) für Experimente mit niedrigerem Aktivitätskonzentrationsbereich höher sind als für Experimente im Bereich mit den hohen bis höchsten Aktivitätskonzentrationen der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate. Das spricht für eine stärker ausgeprägte zytotoxische Wirkung im Niedrigdosisbereich. Dies könnte durch den Bystander Effect bedingt sein, der für α -Strahlung im Niedrigdosisbereich beschrieben ist. Der Bystander Effect bezeichnet eine Beeinträchtigung von Zellen, die bei Chemo- oder Radiotherapie vorkommt, aber nicht direkt durch dieses Agens verursacht ist, sondern vielmehr durch Zellkommunikation vermittelt wird. Dieser Effekt wird beobachtet nach Bestrahlung oder viral induzierten Veränderungen der Erbsubstanz (Djordjevic, 2000). An Hand von niedrigdosierter α -Strahlung (^{238}Pu) wurde in vitro untersucht, ob Folgeschäden nur in Zellen vorhanden waren, die von einem α -Teilchen durchquert worden sind oder auch in sogenannten „bystander“- Zellen. Auch die nicht direkt von α -Teilchen getroffenen Zellen wiesen die typischen Schäden im Genom (Mikronuklei) und Veränderungen der Genexpression (p21^{waf1} und p53) auf. Diese Veränderungen traten jedoch nur in Zellen mit intakten gap-junctions auf, ein Hinweis dafür, dass der Bystander effect in Folge von α -Bestrahlung über die Zellkommunikation bei intakten gap-junctions vermittelt wird (Azzam et al, 2001). Aus diesen Kenntnissen lässt sich folgern, dass die zytotoxische Wirkung durch den Bystander Effekt im Fall von α -Bestrahlung nur bei hoher Zelldichte stattfindet, wie für CH310T Zellen nach Behandlung mit „Microbeams“ gezeigt wurde (Mitchell et al, 2004).

Da in der vorliegenden Arbeit vereinzelt liegende Zellen mit den ^{213}Bi -Immunkonjugaten behandelt wurden, erscheint das Vorliegen vom, wie erwähnt, gap-junctions vermittelten Bystander Effekt unwahrscheinlich.

Auswertung im Hinblick auf tumor cure probability

Die Auswertung nach tumor cure probability (siehe Kapitel 4.6.5) war nur sinnvoll, wenn in möglichst vielen Wells der Well-Platten keine Klone gewachsen waren. Deshalb wurden nur wenige Experimente mit entsprechenden Ergebnissen für diese Art der Auswertung ausgewählt. Darunter waren nur Experimente mit L 929 WT und L 929 $\Delta 9$. Die Berechnung der Parameter für die sigmoide Kurve der tcp lässt sich mit „limited dilution assays“ vergleichen. Hier wird der Berechnung der Daten auch eine Poisson-Verteilung zu Grunde gelegt. Dabei werden nicht die gewachsenen Klone quantifiziert, sondern die Anzahl der „geheilten“ Wells mit 0 Klonen. Es sollte

festgestellt werden, ob die Ergebnisse nach der alternativen Auswertung anders ausfallen, als nach der Bestimmung des normierten Überlebens. Die Auswertung nach tcp zeigt, im Vergleich zur Berechnung der Parameter der Überlebenskurve nach der exponentiellen Dosis-Wirkungsbeziehung, keine wesentliche Veränderung der Ergebnisse.

5.7 Chromosomale Schäden nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

Die Untersuchung strahlungsinduzierter Chromosomenaberrationen wurde ca. ab 1930 zunächst nur an Pflanzen und Invertebraten (z.B. *Drosophila*) durchgeführt. Wegweisend für die Analyse der Chromosomen menschlicher Lymphozyten war die Methode von Moorhead (1960) zur Kultivierung von Lymphozyten aus peripherem Blut. Diese Technik ermöglichte es, die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Chromosomen von peripheren Lymphozyten des Menschen zu untersuchen. So ist die Untersuchung von Chromosomenaberrationen in Lymphozyten heute als Methode der biologischen Dosimetrie etabliert. Die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen wird in Bezug zur Ganzkörperdosis in Gy gesetzt. Dabei zeigt sich ein linear-quadratischer Zusammenhang (Hall, 2000).

In dieser Arbeit wurden Chromosomenaberrationen humaner und muriner Tumorzellen nach Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi untersucht.

Die strukturellen Chromosomenaberrationen lassen sich in Chromosomen- und Chromatid-Aberrationen gliedern. Welche Art von Aberration aus der Schädigung des Chromatinfadens hervorgeht, hängt vom Stadium der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung ab. Wird im Zeitraum von der späten Prophase der Mitose bis zum Beginn der S-Phase bestrahlt, vor der Duplikation der Chromatiden, resultieren daraus Chromosomenaberrationen. Erfolgt die Bestrahlung im Zeitraum vom Ende der G_1 -Phase bis zur Prophase, also nach der DNA-Replikation, entstehen Chromatidaberrationen.

Abbildung 41 veranschaulicht diesen Zusammenhang zwischen Aberrationstyp und Stadium im Zellzyklus zum Bestrahlungszeitpunkt (Buckton und Evans, 1973).

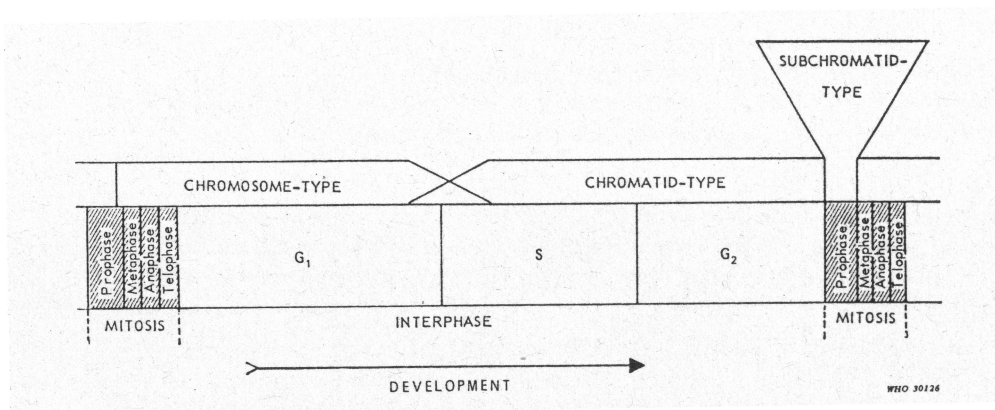


Abbildung 41: Zusammenhang zwischen Aberrationstyp und Stadium im Zellzyklus zum Bestrahlungszeitpunkt (Buckton und Evans, 1973)

Zytologisch lassen sich nach Giemsa-Färbung folgende Chromosomenschäden an Mitosechromosomen differenzieren:

- paarige Chromatidstücke ohne Zentromer: azentrische Fragmente
- paarige Chromosomenstücke ohne Zentromer, die sich zu einem Ring verbunden haben: azentrische Ringe
- gepaarte Chromatiden mit Zentromer verbunden zu einem Ring: zentrische Ringe.

Diese Aberrationen betreffen jeweils ein Chromosom. Zu Aberrationsfiguren, an denen mehrere Chromosomen beteiligt sind, gehören z.B. Chromosomen mit zwei oder mehr Zentromeren (di-/trizentrische Chromosomen).

Azentrische Fragmente und Azentrische Ringe werden in der Mitose nicht auf Tochterkerne verteilt und schließlich im Zytoplasma resorbiert.

Unter Chromatidaberrationen werden Chromatidbrüche, Chromatidaustausch und sogenannte „gaps“ zusammengefasst. „Gaps“ sind achromatische Läsionen, die Lücken in den Chromosomen vortäuschen, eine Diskontinuität besteht jedoch nicht. Sie sind leicht verwechselbar mit Artefakten und deshalb zur quantitativen Dosimetrie nicht geeignet. Chromatidbrüche werden typischerweise von alkylierenden Substanzen hervorgerufen. Sie treten nur bei teilungsfähigen Zellen auf. Das Auftreten dieses Aberrationstyps hängt stark davon ab, in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Zelle zum Zeitpunkt der Bestrahlung befindet. In dieser Arbeit traten entgegen der Erwartung deutlich mehr Chromatidschäden als Chromosomenschäden auf (siehe unten). Daher wird die quantitative Dosimetrie nur an Hand einer Kontrollgruppe möglich, die ähnlich kultiviert wurde (Buckton und Evans, 1973).

An humanen peripheren Lymphozyten wurde, unabhängig vom Zellzyklus und bei gleichen Bestrahlungs- und Kulturbedingungen, gezeigt, dass α -Strahlung (^{241}Am) im Vergleich zur γ -Strahlung (^{137}Cs) hauptsächlich Chromosomenschäden verursacht und dabei besonders effektiv bei der Induktion von dizentrischen Chromosomen ist. Das könnte damit zusammenhängen, dass α -Strahlung vor allem Doppelstrangbrüche und γ -Strahlung vorwiegend Einzelstrangbrüche verursacht. In der gleichen Studie wurde die relative biologische Wirksamkeit der verwendeten α -Strahlung im Vergleich zur γ -Strahlung mit 15 bestimmt (Schmid et al, 1996).

Die verursachten chromosomalen Schäden durch ^{213}Bi -Immunkonjugate in dieser Arbeit sind hauptsächlich Chromatidschäden. Die verwendeten Zelllinien zeigten sich unterschiedlich empfindlich gegenüber ^{213}Bi -Behandlung, wobei die Chromosomen von HTB-135 prozentual am stärksten geschädigt waren und bei L 929 WT die chromosomalen Schäden am geringsten ausgeprägt waren.

Für alle Zelllinien war gültig, dass der Schweregrad der Schäden mit steigender Aktivitätskonzentration zunahm. Besonderes Augenmerk sollte darauf gelegt werden, wie der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Wirkung, d.h. der Unterschied zwischen L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. HSC, die

mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8) und mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1) behandelt wurden, ausfiel. Bei L 929 $\Delta 9$ zeigte sich bei Aktivitätskonzentrationen von 50 und 160 kBq/ml eine 15fach stärkere Schädigung der Chromosomen als bei L 929 WT. Die Schädigung der Chromosomen bei HSC, behandelt mit spezifischen ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten, fiel dagegen nur etwa doppelt so hoch aus, wie nach Behandlung mit unspezifischen ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten bei 600 kBq/ml.

Bei MDA-Zellen war das Ausmaß der chromosomalen Schädigung bei allen Aktivitätskonzentrationen von ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten für Zellen mit $\Delta 9$ -E-Cadherin und WT-E-Cadherin in etwa gleich. Der Prozentsatz an chromosomalen Schäden betrug bei einer Aktivitätskonzentration von ca. 160 kBq/ml für MDA WT zwischen 18 und 66% und für MDA $\Delta 9$ zwischen 18 und 71%. Lediglich der Schweregrad der Schäden war bei MDA $\Delta 9$ gering ausgeprägter als bei MDA WT. So waren z.B. Chromatidschäden des Ausprägungsgrades C bei MDA $\Delta 9$ in 31% zu finden und bei MDA WT nur in 6%, während die Schäden der Ausprägungsgrade A und B weniger Unterschiede aufwiesen (MDA WT: 42 und 16%, MDA $\Delta 9$: 24 und 24%).

Bezüglich MDA-Zellen sind Daten über die chromosomale Schädigung nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in höheren Aktivitätskonzentrationen (0,74; 1,48; 4,81 MBq/ml) von Miederer (Miederer; 2002) vorhanden. Im Vergleich zu den Experimenten dieser Arbeit überwogen in der zitierten Arbeit Chromosomenschäden. Dies liegt möglicherweise an der anders gewählten Kulturzeit (Zeitraum zwischen Bestrahlung und Chromosomenpräparation). Während die Kulturzeit in vorliegender Arbeit 18-24 h betrug, betrug sie in den Experimenten von Miederer 3 d.

Beginnen die Zellen während der Kulturzeit bereits mit einer Mitose, so können bestimmte sogenannte instabile Chromosomenaberrationen (azentrische Ringe, azentrische Fragmente, zentrische Ringe und dizentrische Chromosomen) während der Mitose verloren gehen. Dies kann, wenn die Kulturzeit deutlich länger als die Verdopplungszeit ist, dazu führen, dass Chromosomenaberrationen, die vorhanden waren, in der Mitose nicht mehr nachweisbar sind. Unter anderem deshalb, weil Chromosomenbruchstücke ohne Zentromer nicht auf die Tochterkerne verteilt werden. Zudem spielt die Verlängerung des Teilungsvorganges der Zellen nach Bestrahlung möglicherweise eine Rolle.

5.8 Zur Dosisabschätzung

Aus der Anwendung von α -Emittern in der Radioimmuntherapie ergibt sich die Notwendigkeit, die aus der applizierten Aktivität resultierende Dosis zu ermitteln, um die Effekte der Therapie zum einen mit externen Bestrahlungsmethoden und zum anderen mit der Radioimmuntherapie mit β -Strahlern vergleichen zu können.

Die Probleme bei der Dosisabschätzung mit α -Emitter-Immunkonjugaten, sind vornehmlich durch die ungleiche Verteilung der Radioimmunkonjugate bedingt, die im Gegensatz zu externer Bestrahlung mit exakt definierter Dosisleistung, nicht präzise steuerbar ist. Erschwerend kommt der stochastische Zerfall von Nukliden allgemein hinzu sowie die Tatsache dass, der LET über die Wegstrecke von α -Teilchen nicht konstant ist. Diese Gegebenheiten gestalten die Berechnung zusätzlich komplex.

In dieser Arbeit wurde die Dosis, verursacht von ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -Konjugaten für ausgewählte Versuche (Inkubationszeit 90 min, Fibroblasten und HSC-Zellen) mit vereinfachenden Annahmen berechnet.

In der Rechnung wurden die Anzahl der Antigene pro Zelle, die Assoziationskonstante des Antikörpers, Bindung und Internalisierung der Antikörper und die verschiedenen Zelldurchmesser (abgelöste Zellen) berücksichtigt. Bezüglich der von ^{213}Bi emittierten α -Partikel ist zu beachten, dass der lineare Energietransfer (LET) von der Energie des jeweiligen Teilchens abhängt, die sich entlang seiner Wegstrecke ändert. Für die Berücksichtigung der Änderung des LET über die Wegstrecke gibt es zwei Möglichkeiten: Erstens die durchschnittliche Verteilung der α -Zerfälle nach einer geometrischen Anordnung und zweitens die sogenannte Monte-Carlo-Simulation, bei der computergestützt alle einzelnen Energieabgaben entlang der Wegstrecke des α -Teilchens simuliert werden. Die Berechnungen wurden unter Verwendung von Daten aus der Arbeit von Bardies und Meyers zur Dosimetrie bei Radioimmuntherapie durchgeführt (Bardies und Myers, 1990), in der die einfachere geometrische Methode verwendet wurde. In der zitierten Arbeit wurde für Zellen oder Zellcluster mit verschiedenen Radien (5-200 μm) errechnet, welcher Anteil der Energie eines α -Partikels von den Zellen absorbiert wird. Diese Daten wurden für verschiedene Energien von α -Teilchen (1-10 MeV) berechnet. Dabei gibt es optimale Zelldurchmesser abhängig von der Teilchen-Energie für die maximal mögliche Energieabsorption. Bei einer Energie von 8,4 MeV, wie bei ^{213}Bi der Fall, wird bei einem Zellcluster- oder Sphäroiddurchmesser von 70 μm der größtmögliche Anteil der Energie absorbiert.

Die Ergebnisse der Dosisabschätzung für die RI in den durchgeführten Experimenten zeigen, dass die Assoziationskonstante eines Antikörpers den wichtigsten Einfluss auf die Dosis (Gy) darstellt. Zum Beispiel ist die Dosis der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate in verschiedenen Experimenten trotz verschiedener Zelllinien (L 929 WT, HSC: unspezifische Bindung der AK) ähnlich hoch. Nach diesen Berechnungen zeigen die verschiedenen Zellen mit angegebenem AK bei folgender Dosis (Gy) ein Überleben von 37%: L 929 $\Delta 9$ (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-AK): 1,5 Gy, L 929 WT (anti-

$\Delta 9$ -E-Cadherin-AK): 1,95 Gy, HSC (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-AK): 1,2 Gy, HSC (anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-AK): 3,0 Gy. Die Zellen, die mit spezifisch bindenden RI inkubiert worden sind (HSC und L 929 $\Delta 9$, behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten) wurden durch geringere Dosen abgetötet, als die Zellen, an deren Oberfläche die RI unspezifisch binden (HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten und L 929 WT behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten). Der Unterschied der jeweiligen Assoziationskonstanten betrug 2 Zehnerpotenzen. Der Wert für die Assoziationskonstante stand aus einem früheren Scatchard-Experiment an MDA-Zellen (persönliche Mitteilung Christoph Adam, $K_a=1,82 \cdot 10^8$ l/mol) zur Verfügung. Wurde für die Dosisberechnung ein ca. 2fach höherer Wert ($K_a=4,8 \cdot 10^8$ l/mol) aus einem anderen Scatchard-Experiment (Miederer et al, 2003) an MDA-Zellen verwandt, erhöhten sich die berechneten Dosiswerte um 3 bis 20% bei der jeweils höchsten Aktivitätskonzentration. Diese Ergebnisse entsprechen der Erwartung, da bei spezifischer Bindung der RI an der Zelloberfläche die Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit von ^{213}Bi -Atomen getroffen werden. Einschränkend ist jedoch festzustellen, dass die Unterschiede zwischen den entsprechenden Zelllinien und RI sehr gering sind. Das könnte dadurch bedingt sein, dass die Dosis, die aus RI resultiert, die frei im Medium schwimmen, unterschätzt wird. Insbesondere α -Partikel, die im Medium schwimmen und zufällig Zellen treffen wurden bei der Modellrechnung nicht berücksichtigt. Da das Volumen der Zellen im Vergleich zum Mediumvolumen verschwindend gering ist, wurde dieser Fehler als gering eingeschätzt, was die vorliegenden Daten nicht bestätigen.

Genauere Berechnungen, die miteinbeziehen, welche Dosis den Zellkern trifft, wurden an murinen Zellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten spezifisch für CD44 durchgeführt (Kennel et al, 1999). Die Dosen, die dabei für die Zelllinien EMT-6 oder Line-1 ermittelt wurden, um das Überleben auf 37% zu reduzieren, waren 1,7 und 1,4 Gy. Diese Daten stimmen gut mit den in dieser Arbeit berechneten überein. Die Vergleichbarkeit der Versuche wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass in dieser Arbeit Einzelzellen verwendet wurden und die absorbierte Energie für die gesamte Zelle berechnet wurde. In der Arbeit von Kennel dagegen bezieht sich die Dosis auf den Zellkern und die Experimente wurden an Monolayern (mit 80% Konfluenz) durchgeführt. Die Dosis, die aus der abgegebenen Energie von γ - und β -Strahlung der Tochternuklide von ^{213}Bi selbst resultiert, ist kleiner als 1% der Gesamtdosis und deshalb zu vernachlässigen. Auch die Dosis durch die Radioimmunkonjugate aus dem Medium wurde in der Arbeit von Kennel nicht miteinbezogen, weil sie weniger als 1% der Gesamtdosis ausmachte.

Die Monte-Carlo-Simulation zur Dosimetrie wurde für ^{211}At -Immunkonjugate an Gliom- und Melanomzellen (Antigen Tenascin) durchgeführt. Die errechneten Dosen für ein Überleben von 37% lagen hier deutlich niedriger mit 0,24-0,29 Gy, während die entsprechenden Aktivitätskonzentrationen mit 50-151 kBq/ml in der gleichen Größenordnung lagen wie die Aktivitätskonzentrationen aus den vorliegenden klonogenen Tests, die das Überleben der Zellen auf 37 % reduzierten. Mit ^{211}At -Immunkonjugaten wurden Monolayer behandelt und die Dosis

wurde für das Medium sowie für die Zellen berechnet. Je nach Zelllinie wurde dabei zwischen Zelloberfläche und Zellmatrix unterschieden (Larsen et al, 1998). Um das normierte Überleben auf 37% einzuschränken, wurde aufgrund der Berechnungen angegeben, dass 1-2 Partikel den Kern treffen müssten. Aus den Daten dieser Arbeit lässt sich eine entsprechende Angabe nur für die an der Zelloberfläche gebundenen ^{213}Bi -Immunkonjugate machen. Diese beträgt für L 929 $\Delta 9$ in etwa 14 α -Partikel und für HSC (^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate) in etwa 47 α -Partikel pro Zelle. Um das Modell zur Dosisberechnung genauer zu überprüfen, müssen mehr Daten mit ^{137}Cs gewonnen werden. Wenn sich der hier gezeigte Trend bestätigt, dass der Schaden, verursacht durch γ -Bestrahlung in ähnlicher Größenordnung liegt, wie der, verursacht durch α -Bestrahlung, ist anzunehmen, dass das Modell nicht zu vernachlässigende Ungenauigkeiten in sich birgt.

Bei der Dosisberechnung wird von kugelförmigen Zellen ausgegangen, obwohl sie adhärent am Zellkulturgefäß sind und dabei vermutlich eine eher flache Form annehmen. Der dabei entstehende Fehler ist als sehr groß einzustufen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der adhären Zellen könnten wertvolle Informationen liefern, um die Dosisberechnung hinsichtlich der Zellgeometrie entscheidend zu verfeinern.

Die Ungenauigkeiten bei der Dosimetrie kommen mit dadurch zu Stande, dass der Crossfire-Effekt nicht ausreichend berücksichtigt werden kann. Der Crossfire-Effekt ist wohl auch für die fehlenden Unterschiede bezüglich der Bestrahlungswirkung durch ^{213}Bi -Immunkonjugate bei spezifischer bzw. unspezifischer Antigen-Antikörper-Wechselwirkung verantwortlich.

6. Zusammenfassung

Die Radioimmuntherapie stellt gegenüber operativer, Strahlen- und Chemotherapie eine alternative Malignomtherapie dar, bei der Tumorzellen über tumorspezifische Antigene als Zielstruktur mit Antikörper-gekoppelten Radionukliden selektiv abgetötet werden. Speziell α -Strahler wie ^{211}At oder ^{213}Bi werden, nach Kopplung an geeignete Carrier, in der Therapie des malignen Glioms bzw. der myeloischen Leukämie eingesetzt.

Die Radioimmuntherapie mit dem α -Emitter ^{213}Bi stellt auch beim Magenkarzinom mit Peritonealkarzinose eine Therapieoption dar. Ca. 10 % aller diffusen Magenkarzinome exprimieren mutiertes E-Cadherin ($\Delta 9$ -E-Cadherin). Gegen $\Delta 9$ -E-Cadherin wurde ein monoklonaler Antikörper entwickelt (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin), der selektiv an Tumorzellen, nicht aber an Normalgewebe bindet. Anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin ist daher ein viel versprechender Carrier für Radionuklide zum Einsatz in der Radioimmuntherapie. ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate haben sich als sehr erfolgreich bei der Therapie der Peritonealkarzinose im Mausmodell erwiesen. Dabei konnte das Überleben von Nacktmäusen mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierenden intraperitonealen Magenkarzinomzellclustern mittels ^{213}Bi -Immuntherapie signifikant verlängert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Zelllinien nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten (max. 1.700 kBq) im Hinblick auf das Überleben untersucht werden. Dazu wurden murine Fibroblasten, L 929 WT bzw. L 929 $\Delta 9$, sowie humane Mammakarzinomzellen, MDA WT bzw. MDA $\Delta 9$, mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten inkubiert, die spezifisch an $\Delta 9$ -E-Cadherin, nicht aber an WT-E-Cadherin binden. $\Delta 9$ -E-Cadherin exprimierende HSC und MPE-600 Zellen wurden mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (unspezifisch) inkubiert. Die Überlebenskurven, ermittelt an Hand klonogener Tests, zeigten für alle Zelllinien eine exponentielle Dosis-Wirkungsbeziehung. Bei MDA und bei L 929 wurden die $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierenden Zellen jeweils stärker geschädigt als WT-E-Cadherin-exprimierende Zellen. Die Reduktion des Überlebens auf 37% wurde für MDA $\Delta 9$ mit 27 kBq, für L 929 $\Delta 9$ mit 86 kBq, für MDA WT mit 482 kBq und für L 929 WT mit 380 kBq der ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate erreicht. Die Behandlung von HSC mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten zeigte keine signifikanten Unterschiede: 37% Überleben wurde mit ^{213}Bi -Aktivitäten von 196 bzw. 233 kBq erreicht.

Chromosomale Aberrationen als Folge der Inkubation der Zellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten konnten in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Bei einer Aktivitätskonzentration von 740 kBq/ml zeigten sich strukturelle Chromosomenaberrationen in bis zu 84% der behandelten Zellen. Deutliche Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von Zellen mit Chromosomenaberrationen zeigten sich jeweils zwischen L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten, sowie zwischen HSC inkubiert mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten.

Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich Schädigung von HSC Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten, einerseits im klonogenen Test zur Ermittlung des Überlebens, andererseits bei der Quantifizierung chromosomaler Aberrationen, haben ihre Ursache im Verhältnis der vorhandenen Antigen-Moleküle zu den applizierten Antikörpermolekülen. Aufgrund relativ geringer Zellzahlen waren in den klonogenen Tests zwischen $1,0 \cdot 10^4$ - $1,6 \cdot 10^8$ freie ^{213}Bi -Immunkonjugate pro Zelle im Medium vorhanden, während bei den Experimenten zur Untersuchung der Chromosomen-Aberrationen zwischen $1,1 \cdot 10^2$ - $2,6 \cdot 10^4$ freie ^{213}Bi -Immunkonjugate pro Zelle im Medium vorhanden waren. Je höher die Anzahl an nicht gebundenen ^{213}Bi -Immunkonjugaten im Medium, desto größer ist der Anteil der Zellen, die aufgrund des Crossfire-Effekts geschädigt werden.

Mit Hilfe eines vereinfachten Modells wurden die aus den applizierten ^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen resultierenden Dosen berechnet. Für die Berechnungen wurden Zelldurchmesser, Anzahl der $\Delta 9$ -E-Cadherin-Moleküle pro Zelle sowie das Ausmaß der zellulären Internalisierung der ^{213}Bi -Immunkonjugate berücksichtigt. Die aus der Inkubation mit verschiedenen Aktivitätskonzentrationen der ^{213}Bi -Immunkonjugate errechneten Dosen, die eine Reduktion des Überlebens auf 37% verursachten, lagen zwischen 1,2 und 3,0 Gy. Diese Dosen liegen in der gleichen Größenordnung wie diejenigen, die in der Literatur für murine Systeme nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten beschrieben sind. Die ermittelten Dosen für HSC, nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten, decken sich dagegen nicht mit den Überlebenskurven. Die Ursache hierfür könnte die Unterschätzung der Dosis durch nicht gebundene ^{213}Bi -Immunkonjugate nach dem hier vorliegenden Modell zur Dosisabschätzung sein. Die Anzahl der frei im Medium schwimmenden, nicht gebundenen ^{213}Bi -Immunkonjugate verringert sich mit zunehmender Zellzahl. Die Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität der zytotoxischen Wirkung der verschiedenen ^{213}Bi -Immunkonjugate - d.h. zunehmende Spezifität bei abnehmendem Verhältnis von Antikörpermolekülen zu Antigenmolekülen – stehen in Einklang mit Ergebnissen aus Therapieversuchen am Mausmodell. Die Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten stellt auch aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine viel versprechende Option für die Therapie des Magenkarzinoms mit Tumorzell dissemination im Intraoperitonealraum dar.

7. Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 16: Versuchsaufbau zur "Scatchard"-Analyse (V.1-V.18) mit verschiedenen Zelllinien und ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bzw. ^{125}I -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten

Versuch-Nr. (V.-Nr.)	Zelllinie	Nuklid	AK/Charge	Konzentration der AK-Verdünnungen in ng/ml	Proben-Anzahl	Inkubationszeitraum und -temperatur
1	L 929 $\Delta 9$	^{125}I	6H8	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
2	MDA $\Delta 8$	^{125}I	6H8	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
3	MDA $\Delta 9$	^{125}I	6H8	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
4	MDA $\Delta 9$	^{125}I	6H8	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
5	MPE-600	^{125}I	6H8	50-800 ng/ml	1	30 min bei 37°C
6	HSC	^{213}Bi	6H8/3	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
7	HSC	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 4°C
8	HTB-135	^{213}Bi	6H8/3	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
9	L 929 $\Delta 9$	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
10	L 929 WT	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
11	MDA $\Delta 9$	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
12	MDA $\Delta 9$	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
13	MDA $\Delta 9$	^{213}Bi	6H8/3	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
14	MDA $\Delta 9$	^{213}Bi	6H8/3	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
15	MDA WT	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
16	MDA WT	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C
17	MPE-600	^{213}Bi	6H8/2	500-6000 ng/ml	3	30 min bei 37°C
18	MPE-600	^{213}Bi	6H8/2	50-800 ng/ml	3	30 min bei 37°C

Tabelle 17: Versuchsaufbau zu Kinetikexperimenten während der Inkubation mit RI (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) mit verschiedenen Zelllinien (V.19-44)

V.-Nr.	Zelllinie	Zellzahl	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Inkubations-temperatur	Zeitpunkte in min	Werte/ Zeitpunkt
19	HSC	200.000	30fach	4 °C	10, 30, 60, 120	2, 2, 2, 2
20	L 929 $\Delta 9$	300.000	40fach	4 °C	10, 30, 60, 120, 180, 240	3, 2, 3, 3, 6, 6
21	L 929 WT	400.000	36fach	4 °C	10, 30, 60, 120, 180, 240	6, 6, 6, 6, 6, 6
22	HSC	290.000	19fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 2, 3, 3, 3, 3, 2, 3, 3, 3
23	L 929 $\Delta 9$	400.000	28fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	2, 2, 3, 3, 3, 1, 3, 3, 3, 3
24	L 929 WT	410.000	33fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	2, 2, 3, 3, 6, 5, 6, 6, 5, 6
25	HSC	283.000	17fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3
26	L 929 $\Delta 9$	405.000	23fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 6, 6, 6, 6, 6, 5
27	L 929 WT	404.000	28fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 1, 3, 3, 3, 3
28	HSC	210.000	27fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 6, 6, 6, 6, 6, 6
29	L 929 $\Delta 9$	400.000	28fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3
30	L 929 WT	400.000	34fach	25 °C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3
31	HSC	129.000	47fach	37 °C	10, 30, 60, 120, 240	3, 2, 3, 3, 3
32	L 929 $\Delta 9$	134.000	90fach	37 °C	10, 30, 60, 120, 240	3, 3, 3, 3, 2
33	L 929 WT	208.000	69fach	37 °C	10, 30, 60, 120, 240	3, 3, 3, 3, 2
34	HSC	125.000	35fach	37 °C	10, 20, 30, 60, 120, 240	3, 3, 3, 3, 3
35	HTB-135	80.000	166fach	37 °C	10, 30, 60, 120	3, 3, 3, 3
36	L 929 $\Delta 9$	125.000	71fach	37 °C	10, 20, 30, 60, 120, 240	6, 6, 5, 6, 6, 6
37	HSC	132.000	46fach	37 °C	10, 20, 30, 60, 120, 180, 240	5, 6, 6, 6, 6, 6, 6
38	L 929 $\Delta 9$	125.000	96fach	37 °C	10, 20, 30, 60, 120, 180, 240	3, 3, 2, 2, 3, 3, 3
39	L 929 WT	185.000	78fach	37 °C	10, 20, 30, 60, 120, 180, 240	2, 1, 3, 3, 3, 3, 3
40	MDA $\Delta 9$	12.000.000	1fach	37 °C	0, 60, 120, 180, 300	2, 2, 2, 2, 2
41	MDA WT	16.000.000	1fach	37 °C	0, 60, 120, 180, 300, 420	2, 2, 2, 2, 2, 2
42	L 929 $\Delta 9$	22.000.000	1fach	37 °C	0, 60, 120, 180, 300, 420	2, 2, 2, 2, 2, 2
43	L 929 WT	19.000.000	1fach	37 °C	0, 60, 120, 180, 300, 420	2, 2, 2, 2, 2, 2
44	L 929 WT	9.500.000	33fach	37 °C	0, 60, 120, 240	2, 2, 2, 2

Tabelle 18: Versuchsaufbau zu Kinetikexperimenten nach Entfernung der ¹¹¹In-anti-Δ9-E-Cadherin-Konjugate mit verschiedenen Zelllinien (V. 45-60)

V.-Nr.	Zelllinie	Zellzahl	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Inkubationstemperatur und -dauer	Zeitpunkte in min	Werte/Zeitpunkt	Vorgehen nach Inkubation
45	HSC	213.000	21fach	4°C, 60 min	10, 104, 120	2, 3, 3	Mediumwechsel (MW)
46	L 929 Δ9	330.000	28fach	4°C, 60 min	10, 30, 104, 120	5, 1, 6, 6	MW
47	L 929 WT	276.000	40fach	4°C, 60 min	10, 104, 120	2, 3, 3	MW
48	L 929 Δ9	300.000	40fach	4°C, 60 min	10, 30, 60, 120, 180	3, 3, 3, 3, 3	MW
49	L 929 WT	300.000	48fach	4°C, 60 min	10, 30, 60, 120, 180	3, 3, 3, 3, 3	MW
50	HSC	196.000	31fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3	MW und 1x Waschen
51	L 929 Δ9	400.000	30fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 6, 6, 6, 6, 6, 6	MW und 1x Waschen
52	L 929 WT	400.000	36fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3	MW und 1x Waschen
53	HSC	307.000	24fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3	MW und 1x Waschen
54	HTB-135	108.000	204fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3	MW und 1x Waschen
55	L 929 Δ9	400.000	37fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3	MW und 1x Waschen
56	L 929 WT	400.000	44fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 3, 3, 2, 3	MW und 1x Waschen
57	HSC	270.000	22fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 1, 3, 3, 3, 3, 2	MW und 1x Waschen
58	HTB-135	100.000	118fach	25°C, 5 min	60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 2	MW und 1x Waschen
59	L 929 Δ9	400.000	29fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 3, 3	MW und 1x Waschen
60	L 929 WT	400.000	35fach	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2	MW und 1x Waschen

Tabelle 19: Ergebnisse klonogener Tests verschiedener Zelllinien in 24-Well-Platten

Zelllinie	Zellzahl/Well	Klone		n	Wachstumszeit (d)	PE
		Mittelwert	Standardabweichung (SD)			
L 929 Δ9	10	2,7	1,1	12	11	0,27
L 929 Δ9	20	7,8	2,6	12	11	0,39
L 929 Δ9	40	19,7	5,1	12	11	0,49
L 929 Δ9	80	34,4	6,1	12	11	0,43
L 929 WT	40	31,3	4,6	6	10	0,78
L 929 WT	80	46,2	3,4	6	10	0,58
L 929 WT	120	77,5	8,9	6	10	0,65
L 929 WT	200	112,8	12,5	6	10	0,56
MPE-600	30	0,2	0,5	5	18	0,01
MPE-600	50	2,1	2,6	11	18	0,04
MPE-600	70	1,5	1,1	6	18	0,02
MPE-600	100	8,3	5,7	12	18	0,08
MPE-600	150	11,8	5,2	6	18	0,08
MPE-600	200	25,5	5,3	6	18	0,13
MDA Δ8	30	16,3	5	6	17	0,54
MDA Δ8	50	19,3	4,7	12	17	0,39
MDA Δ8	70	29,4	3,4	5	17	0,42
HTB-135	200	3	2,6	3	11	0,02
HTB-135	300	6,7	2,1	3	11	0,02
HTB-135	400	6,3	0,6	3	11	0,02
HTB-135	600	14,7	2,3	3	11	0,02
HTB-135	900	28,7	5,5	3	11	0,03
HTB-135	1200	25	2,6	3	11	0,02
HTB-135	70	3,7	1,6	6	9	0,05
HTB-135	140	6,5	1,2	6	9	0,05
HTB-135	210	8,5	1,5	6	9	0,04
HTB-135	280	16,3	5,1	6	9	0,06
HTB-135	350	22,7	5,7	6	9	0,06
HTB-135	420	22,8	6,7	6	9	0,05
HTB-135	490	26	4,1	6	9	0,05
HTB-135	560	28,2	5	6	9	0,05
HSC	40	9,3	2,7	6	8-10	0,23
HSC	80	26,2	6,7	6	8-10	0,33
HSC	120	46,5	7,3	6	8-10	0,39
HSC	160	50,3	11,3	6	8-10	0,31
HSC	40	5,2	1,5	6	8-10	0,13
HSC	80	24,5	7,6	6	8-10	0,31
HSC	120	37	6,1	6	8-10	0,31
HSC	160	42,2	9,8	6	8-10	0,26
HSC	200	43,7	7,1	6	8-10	0,22
HSC	240	110	9,7	6	8-10	0,46
HSC	280	119,5	21,1	6	8-10	0,43
HSC	320	123,5	21,2	6	8-10	0,39

Tabelle 20: Versuchsaufbau der Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in 96-Well-Platten für klonogene Tests (V.74-78)

V.-Nr.	Zelllinie	MAK /Charge	MAK-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Ausgesäte Zellen pro Well	^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen in kBq/ml	Gesamtanzahl der Wells
74	MPE-600	6H8/1	0,03-1,33	50, 100	2, 36, 113	96, 83, 63
75	MDA-WT	6H8/1	0,91-9,17	20	17, 18, 59, 64	25, 25, 25, 17
76	MDA $\Delta 9$	6H8/1	0,91-9,17	50, 100	54, 58, 193, 210	33, 24, 36, 24
77	MDA-WT	6H8/3	0,17-0,68	150	121, 462	72, 96
78	MDA $\Delta 9$	6H8/3	0,17-0,68	70	121, 462	84, 67

Tabelle 21: Versuchsaufbau der Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten in 24-Well-Platten ohne Mediumwechsel (V. 80-82)

V.-Nr.	Zelllinie	MAK /Charge	MAK-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Ausgesäte Zellen pro Well	^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen in kBq/ml	Gesamtanzahl der Wells
80	MPE-600	7H1/5	0,07-0,72	10, 20	5, 15	20, 24
81	MDA-WT	6H8/3	0,19;0,37	180	9, 17	24, 24
82	MDA $\Delta 9$	6H8/3	0,19;0,37	120	9, 17	24, 24

Tabelle 22: Versuchsaufbau der Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in 24-Well-Platten für 30 min (V. 83 und 84)

V.-Nr.	Zelllinie	MAK /Charge	MAK-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Ausgesäte Zellen pro Well	^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen in kBq/ml	Gesamtanzahl der Wells
83	MDA-WT	6H8/2	0,14; 0,27	400	52, 103	24, 24
84	MDA $\Delta 9$	6H8/2	0,14; 0,27	400	52, 103	24, 24

Tabelle 23: Versuchsaufbau der Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in 24-Well-Platten für 45 min (V. 85-106)

V.-Nr.	Zelllinie	MAK /Charge	MAK-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Ausgesäte Zellen pro Well	^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen in kBq/ml	Gesamtanzahl der Wells
85	HSC	6H8/3	0,41-1,95	300	297, 1558	20, 24
86	HSC	6H8/3	0,05; 0,25	300	20, 101	24, 24
87	HSC	6H8/3	0,004-0,72	80	3, 28, 296, 630	24, 23, 24, 24
88	HSC	6H8/3	0,11-0,44	80	103, 212, 218, 456	24, 24, 24, 24
89	HSC	6H8/3	0,002-0,36	80	1, 13, 140, 316	24, 24, 24, 24
90	HSC	6H8/3	0,027-0,27	80	26, 272	24, 24
91	HSC	6H8/3	0,015-0,091	80	13, 41, 83, 428	24, 24, 24, 24
92	L 929 $\Delta 9$	6H8/3	0,012-0,5	20	6, 27, 52, 245, 473	24, 24, 24, 24, 24
93	L 929 $\Delta 9$	6H8/3	0,006-0,2	40	12, 41, 73, 374	24, 24, 24, 24
94	L 929 WT	6H8/3	0,15-0,6	20	93, 189, 387	24, 24, 24
95	L 929 WT	6H8/3	0,012-0,5	20	6, 27, 52, 245, 473	24, 24, 24, 24, 24
96	L 929 WT	6H8/3	0,027-0,27	40	26, 268	24, 24
97	L 929 WT	6H8/3	0,006-0,2	40	12, 41, 73, 374	24, 24, 24, 24
98	HTB-135	6H8/3	0,05-0,25	600	20, 101	24, 24
99	HTB-135	6H8/3	0,002-0,36	300	1, 13, 140, 316	24, 24, 24, 24
100	HTB-135	6H8/3	0,027-0,27	500	26, 272	24, 24
101	HTB-135	6H8/3	0,015-0,46	500	13, 41, 83, 428	24, 24, 24, 24
102	MDA WT	6H8/3	0,005-2,27	200	3, 31, 330, 1780	23, 24, 24, 24
103	MDA WT	6H8/3	0,001-3,95	180	2, 4, 8, 16, 31	6, 6, 6, 30, 30
104	MDA WT	6H8/3	0,007-0,29	200	7, 61, 313	24, 24, 22
105	MDA $\Delta 9$	6H8/3	0,001-3,95	120	2, 4, 8, 16, 31	3, 3, 3, 27, 27
106	MDA $\Delta 9$	6H8/3	0,007-0,29	400	7, 61, 313	24, 24, 24

Tabelle 24: Versuchsaufbau der Inkubation von Zellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten in 24-Well-Platten für 90 min (V. 107-134)

V.-Nr.	Zelllinie	MAK /Charge	MAK-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Ausgesäte Zellen pro Well	^{213}Bi -Aktivitätskonzentrationen in kBq/ml	Gesamtanzahl der Wells
107	HSC	6H8/4	0,33-1,13	80	193, 389, 563, 770, 973, 1269	24, 24, 9, 18, 18, 18
108	HSC	6H8/4	0,21-1,24	80	100, 222, 446, 673	8, 8, 8, 8
109	HSC	6H8/4	0,28-1,21	80	242, 371, 648	24, 24, 24
110	HSC	7H1/6	0,22-1,52	80	140, 434, 568, 843, 994	24, 24, 18, 18, 18
111	HSC	7H1/6	0,24-1,43	80	71, 162, 325, 490	24, 24, 24, 24
112	HSC	7H1/6	0,48-1,18	80	236, 365, 567	24, 24, 24
113	HSC	6H8/3	0,67-1,64	80	376, 760, 1150, 1547, 1950	24, 24, 24, 24, 24
114	HSC	6H8/3	1,02-1,80	80	568, 776, 995	19, 24, 24
115	HSC	6H8/3	0,07-2,00	80	28, 55, 83, 109, 243	24, 24, 24, 24, 24
116	HSC	6H8/3	0,10-0,90	80	17, 33, 50, 68, 150	24, 24, 24, 24, 24
117	HSC	7H1/7	0,26-1,5	80	317, 629, 953, 1282, 1593, 1787	24, 24, 24, 24, 17, 6
118	HSC	7H1/7	0,84-1,38	80	629, 821, 1004	24, 24, 24
119	HSC	7H1/7	0,079-1,55	80	34, 68, 102, 137, 300	24, 24, 24, 24, 24
120	HSC	7H1/7	0,093-0,81	80	18, 37, 55, 73, 162	24, 24, 24, 23, 24
121	L 929 Δ 9	6H8/4	0,18-0,72	37,5	134, 261, 415, 568	24, 6, 24, 24
122	L 929 Δ 9	6H8/4	0,67-2,50	40	821, 1029, 1203, 1446, 1568, 1848, 1914, 2057	24, 8, 13, 18, 6, 18, 6, 3
123	L 929 Δ 9	6H8/4	0,28-1,19	40	238, 365, 628	24, 24, 24
124	L 929 Δ 9	6H8/3	0,081-2,00	40	76, 152, 223, 291, 492	24, 24, 24, 24, 24
125	L 929 Δ 9	6H8/3	1,02-1,80	40	568, 776, 980	18, 24, 24
126	L 929 Δ 9	6H8/3	0,23-1,67	40	377, 736, 1110, 1480, 1957	24, 24, 24, 24, 24
127	L 929 Δ 9	6H8/3	0,072-0,41	40	61, 122, 183, 249, 370	24, 24, 24, 24, 24
128	L 929 WT	6H8/4	0,18-0,72	37,5	134, 261, 415, 568	24, 6, 24, 24
129	L 929 WT	6H8/4	0,00-2,50	40	821, 1077, 1203, 1446, 1568, 1848, 1914	24, 18, 6, 18, 6, 18, 6
130	L 929 WT	6H8/4	0,28-1,19	40	242, 371, 657	22, 26, 24
131	L 929 WT	6H8/3	0,081-2,00	40	76, 152, 223, 291, 492	24, 24, 24, 24, 24
132	L 929 WT	6H8/3	1,02-1,80	40	568, 776, 980	18, 24, 24
133	L 929 WT	6H8/3	0,23-1,67	40	377, 747, 1125, 1480, 1957	24, 24, 24, 24, 24
134	L 929 WT	6H8/3	0,072-0,41	40	61, 122, 183, 249,	24, 24, 24, 24,

					370	24
--	--	--	--	--	-----	----

Tabelle 25: Versuchsbedingungen zur Analyse von Chromosomenaberrationen nach Inkubation von Magenkarzinomzellen mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten (V. 136-142)

V.-Nr.	Zelllinie	MAK Art/Charge	Zellzahl/ Flasche	Spezifische Aktivität in kBq/ μg MAK	^{213}Bi -Aktivitäts- konzentrationen in kBq/ml
136	HSC	6H8/3	$2,0 \cdot 10^6$	0, 770	0, 41, 159, 392, 777
137	HSC	6H8/4	$1,6-2,5 \cdot 10^6$	0, 1361	0, 4, 16, 62, 154
138	HSC	6H8/4	$2,0 \cdot 10^6$	887	77, 189, 377, 742
139	HSC	7H1/6	$1,6-2,1 \cdot 10^6$	1035	15, 60, 143
140	HSC	7H1/6	$2,0 \cdot 10^6$	0, 955	0, 73, 180, 360, 712
141	HSC	7H1/7	$2,0 \cdot 10^6$	0, 664	0, 37, 366, 733
137/139	HSC	-	$1,2 \cdot 10^6$	0	0
138/140	HSC	-	$2,0 \cdot 10^6$	0	0
142	HTB-135	6H8/3	$6,5 \cdot 10^5$	0, 692	0, 155

Tabelle 26: Versuchsbedingungen zur Analyse von Chromosomenaberrationen nach Inkubation von Fibroblasten mit ^{213}Bi - $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (V. 143-150)

Versuch-Nr.	Zelllinie	MAK Art/Charge	Zellzahl/ Flasche	Spezifische Aktivität in kBq/ μg MAK	^{213}Bi -Aktivitäts- konzentrationen in kBq/ml
143	L 929 $\Delta 9$	6H8/3	$1,5 \cdot 10^6$	0, 636, 801	0, 41, 167
144	L 929 $\Delta 9$	6H8/3	$6,0 \cdot 10^5$	0, 636, 801	0, 41, 167
145	L 929 $\Delta 9$	6H8/3	$2,0 \cdot 10^6$	0, 692	0, 6, 31, 155
146	L 929 $\Delta 9$	6H8/3	$2,0 \cdot 10^6$	0, 1230	0, 19, 70, 185, 370
147	L 929 WT	6H8/3	$1,5 \cdot 10^6$	0, 636, 801	0, 41, 167
148	L 929 WT	6H8/3	$6,0 \cdot 10^5$	0, 636, 801	0, 41, 167
149	L 929 WT	6H8/3	$2,0 \cdot 10^6$	0, 692	0, 6, 31, 155
150	L 929 WT	6H8/3	$2,0 \cdot 10^6$	0, 1230	0, 19, 70, 185, 370

Tabelle 27: Versuchsbedingungen zur Analyse von Chromosomenaberrationen nach Inkubation von MDA-Zellen mit ^{213}Bi - $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (V. 151-156)

Versuch-Nr.	Zelllinie	MAK Art/Charge	Zellzahl/ Flasche	Spezifische Aktivität in kBq/ μg MAK	^{213}Bi -Aktivitäts- konzentrationen in kBq/ml
151	MDA $\Delta 9$	6H8/3	$1,5 \cdot 10^6$	0, 636, 801	0, 41, 167
152	MDA $\Delta 9$	6H8/3	$6,0 \cdot 10^5$	0, 636, 801	0, 41, 167
153	MDA $\Delta 9$	6H8/3	$2,0 \cdot 10^6$	0, 692	0, 6, 31, 155
154	MDA WT	6H8/3	$1,5 \cdot 10^6$	0, 636, 801	0, 41, 167
155	MDA WT	6H8/3	$6,0 \cdot 10^5$	0, 636, 801	0, 41, 167
156	MDA WT	6H8/3	$2,0 \cdot 10^6$	0, 692	0, 6, 31, 155

Tabelle 28: Verdopplungszeiten und die Daten zu deren Berechnung für verschiedene Zelllinien, *a* Zellzahl grafisch ermittelt, *b* Exponent der Wachstumsgleichung grafisch ermittelt, r^2 Korrelationskoeffizient der Trendlinie für die einzelnen Datenpunkte, x_2-x_1 Verdopplungszeit

Zelllinie	Gefäß	a	b	r^2	x_2-x_1 (h)	Mittelwert x_2-x_1 (h)
HSC	75-cm ² -Flasche	529563	0,0185	0,9540	37	36
HSC	10 ml TBB-R.	136511	0,008	0,8865	87	
HSC	75-cm ² -Flasche	1069630	0,0205	0,9954	34	
HTB-135	75-cm ² -Flasche	253635	0,0141	0,9906	49	49
L 929 Δ9	75-cm ² -Flasche	436934	0,0364	0,9616	19	22
L 929 Δ9	10 ml TBB-R.	85744	0,0342	0,9795	20	
L 929 Δ9	75-cm ² -Flasche	355303	0,0294	0,9837	24	
L 929 Δ9	75-cm ² -Flasche	633459	0,029	0,9807	24	
L 929 WT	75-cm ² -Flasche	442600	0,0264	0,8808	26	26
MDA Δ9	75-cm ² -Flasche	670739	0,0309	0,9870	22	23
MDA Δ9	10 ml TBB-R.	102506	0,0283	0,9205	24	
MDA WT	75-cm ² -Flasche	562326	0,0279	0,9969	25	25
MDA WT	10 ml TBB-R.	79475	0,0268	0,9430	26	

Tabelle 29: Quantitative Ergebnisse der FACS-Analyse verschiedener Zelllinien

Zelllinie	Probe	mfi	Antigene
MDA Δ9	Kontrolle	8,6	1381
	1	271,8	281583
MDA WT	Kontrolle	0	
	1	253,4	261995
L 929 Δ9	Kontrolle	1,6	2869
	1	80,4	165942
	2	80,7	166583
L 929 WT	Kontrolle	2,2	3990
	1	63,3	129532
HSC	Kontrolle	4,5	8954
	1	173	367023
	2	171,6	363947

Tabelle 30: Ergebnisse der Scatchard-Plots mit negativer Steigung der Regressionsgeraden (B/F gegen B aufgetragen)

Versuch-Nr.	Zelllinie	Nuklid	B_{max} in ng	Anzahl der Δ9-E-Cadherine pro Zelle
1	L 929 Δ9	¹²⁵ I	10,96	4,4E+04
3	MDA Δ9	¹²⁵ I	21,34	8,6E+04
4	MDA Δ9	¹²⁵ I	19,37	7,8E+04
6	HSC	²¹³ Bi	30,08	1,2E+05
7	HSC	²¹³ Bi	7,18	2,9E+04
9	L 929 Δ9	²¹³ Bi	4,88	2,0E+04
10	L 929 WT	²¹³ Bi	4,07	1,6E+04
11	MDA Δ9	²¹³ Bi	7,07	2,8E+04
12	MDA Δ9	²¹³ Bi	22,51	9,0E+04
13	MDA Δ9	²¹³ Bi	24,47	9,8E+04
17	MPE-600	²¹³ Bi	26,53	7,8E+04
18	MPE-600	²¹³ Bi	20,59	8,2E+04

Tabelle 31: Ergebnisse der Kinetikexperimente während der Inkubation mit RI (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) von Zellen mit $\Delta 9$ -E-Cadherin

V.-Nr.	Zelllinie	Inkubations-temperatur	Zeitpunkte in min nach Inkubationsbeginn	Bindung		Internalisierung	
				Mittelwerte* 10^{-3}	Stabw. * 10^{-3}	Mittelwerte* 10^{-3}	Stabw. * 10^{-3}
19	HSC	4°C	10, 30, 60, 120	8, 6, 8, 6	0,3; 0,2; 0,3; 0,2	12, 10, 16, 17	0,2; 3; 3; 1
22	HSC	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	2, 1, 4, 4, 4, 4, 4, 6, 4, 5	1; 0,0; 1; 1; 1; 1; 0,3; 1; 0,2; 1	2, 3, 8, 11, 14, 14, 16, 18, 18, 24	0,1; 0,1; 0,2; 1; 1; 1; 0,4; 0,4; 1
25	HSC	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	1, 3, 5, 7, 11, 14, 15, 31, 20, 26	0,3; 1; 1; 1; 0,4; 1; 2; 5; 1; 2	4, 10, 22, 33, 64, 88, 103, 106, 124, 120	0,4; 1; 1; 0,2; 2; 5; 4; 8; 4; 5
28	HSC	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	1, 2, 3, 3, 3, 9, 6, 6, 7, 7	1; 0,3; 1; 1; 0,2; 1; 1; 1; 1; 1	2, 2, 4, 6, 10, 15, 17, 20, 20, 20	0,2; 0,1; 0,4; 0,2; 0,3; 0,2; 0,6; 2; 0,4; 1
31	HSC	37°C	10, 30, 60, 120, 240	11, 7, 9, 13, 10	2, 2, 2, 8, 2	7, 14, 9, 9, 11	0,4; 8; 0,4; 1; 2
34	HSC	37°C	10, 20, 30, 60, 120, 240	9, 13, 13, 12, 12, 12	2, 1, 2, 2, 3	9, 4, 6, 7, 7, 7	1; 1; 0,4; 0,3; 1
37	HSC	37°C	10, 20, 30, 60, 120, 180, 240	11, 16, 13, 19, 12, 6, 7	2, 5, 3, 3, 3, 1, 3	13, 15, 15, 15, 16, 16, 11	1, 2, 2, 1, 1, 1, 2
20	L 929 $\Delta 9$	4°C	10, 30, 60, 120, 180, 240	3, 6, 14, 6, 10, 10	1; 0,1; 4; 2; 3; 5	4, 5, 7, 4, 7, 5	1, 1, 1, 2, 5, 1
23	L 929 $\Delta 9$	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	1, 4, 5, 9, 5, 5, 4, 5, 8, 6	0,2; 1; 1; 2; 1; 1; 1; 1; 1	11, 1, 16, 33, 21, 24, 25, 25, 27, 34	1; 1; 1; 7; 1; 0,3; 2; 1; 2
26	L 929 $\Delta 9$	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	2, 5, 9, 15, 18, 26, 29, 35, 32, 39	0,1; 0,1; 0,4; 1; 1; 2; 3; 1; 1; 4	9, 27, 52, 84, 106, 142, 176, 188, 159, 166	0,4; 1; 3; 3; 5; 10; 6; 7; 21; 20
29	L 929 $\Delta 9$	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	1, 2, 4, 6, 4, 6, 7, 8, 12, 11	1; 1; 0,4; 0,1; 0,3; 1; 0,2; 1, 2, 1	3, 6, 9, 14, 12, 18, 24, 26, 29, 20	0,4; 0,4; 0,2; 0,4; 0,3; 1; 1; 2; 4; 1
32	L 929 $\Delta 9$	37°C	10, 30, 60, 120, 240	8, 8, 10, 9, 10	4, 2, 3, 4, 1	7, 10, 10, 8, 10	0,3; 1; 1; 1; 4
36	L 929 $\Delta 9$	37°C	10, 20, 30, 60, 120, 240	10, 10, 11, 11, 11, 10	1, 3, 3, 4, 4, 2	13, 16, 14, 13, 13, 15	1; 1; 0,3; 1; 1; 1
38	L 929 $\Delta 9$	37°C	10, 20, 30, 60, 120, 180, 240	12, 17, 12, 16, 14, 10, 11	9; 4; 2; 0,2; 0,0; 2; 2	13, 15, 13, 16, 15, 17, 11	1; 2; 6; 0,1; 3; 3; 1
40	MDA $\Delta 9$	4°C für 30 min, danach 37°C	0, 120, 180, 300	330, 290, 320, 250	10, 20, 30, 50	690, 720, 610, 680	30, 10, 110, 110
42	L 929 $\Delta 9$	4°C für 30 min, danach 37°C	0, 60, 120, 180, 300, 420	450, 350, 310, 290, 150, 120	10, 10, 50, 10, 10, 20	550, 650, 690, 710, 850, 880	10, 10, 50, 7, 20, 4

Tabelle 32: Ergebnisse der Kinetikexperimente während der Inkubation mit RI (anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin) von Zellen ohne $\Delta 9$ -E-Cadherin

V.-Nr.	Zelllinie	Inkubations-temperatur	Zeitpunkte in min nach Inkubationsbeginn	Bindung		Internalisierung	
				Mittelwerte* 10^{-3}	Stabw. * 10^{-3}	Mittelwerte* 10^{-3}	Stabw. * 10^{-3}
35	HTB-135	37°C	10, 30, 60, 120	10, 14, 11, 12	1, 11, 1, 3	3, 2, 2, 2	0,4; 0,4; 0,2; 1
21	L 929 WT	4°C	10, 30, 60, 120, 180, 240	4, 3, 4, 6, 6, 4	2, 1, 2, 1, 3, 1	1, 1, 1, 2, 2, 1	0,2; 0,1; 0,3; 0,2; 1; 0,2
24	L 929 WT	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 2, 1	0,3; 0,3; 1; 1; 0,3; 0,3; 1; 0,4; 1; 0,4	0,1; 0,2; 0,3; 0,2; 1; 1; 1; 1; 2	0,0; 0,2; 0,0; 0,1; 1; 0,0; 0,1; 0,3; 0,4; 0,3
27	L 929 WT	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	1, 4, 7, 10, 15, 20, 28, 33, 31, 39	0,1; 0,2; 1; 0,3; 1; 2; 1; 2; 10	6, 23, 44, 69, 87, 126, 146, 175, 197, 185	1; 1; 4; 2; 0,3; 11; 5; 27; 6
30	L 929 WT	25°C	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	1, 2, 3, 6, 4, 6, 7, 7, 8, 10	0,2; 0,2; 0,2; 4; 0,1; 1; 0,4; 1; 1; 3	2, 3, 6, 7, 9, 15, 17, 20, 21, 20	0,2; 0,3; 1; 4; 1; 1; 1; 0,2; 1; 1
33	L 929 WT	37°C	10, 30, 60, 120, 240	8, 18, 11, 11, 7	4; 14; 5; 7; 0,2	3, 3, 4, 4, 4	1; 1; 0,4; 0,4; 0,0
39	L 929 WT	37°C	10, 20, 30, 60, 120, 180, 240	11, 6, 8, 12, 8, 5, 11	3; 0,3; 3; 2; 1; 2	1; 1; 1; 1; 1; 0,3; 1	0,1; 0,2; 0,2; 0,3; 0,1; 0,2
41	MDA WT	4°C für 30 min, danach 37°C	0, 60, 120, 180, 300, 420	710, 670, 650, 700, 600, 750	130, 120, 260, 120, 60, 20	330, 320, 390, 300, 430, 210	40, 20, 60, 10, 50, 50
43	L 929 WT	4°C für 30 min, danach 37°C	0, 60, 120, 180, 300, 420	690, 620, 560, 590, 480, 490	50, 40, 210, 230, 50, 50	310, 380, 440, 410, 520, 510	10, 10, 10, 10, 1, 10

Tabelle 33: Ergebnisse der Kinetikexperimente nach Entfernung der 111 In-anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate von Zellen mit $\Delta 9$ -E-Cadherin

V.-Nr.	Zelllinie	Inkubations-temperatur und -dauer	Zeitpunkte nach Inkubationsbeginn (min)	Bindung		Internalisierung	
				Mittelwerte* 10^{-2}	Stabw. * 10^{-2}	Mittelwerte* 10^{-2}	Stabw. * 10^{-2}
45	HSC	4°C, 60 min	10, 104, 120	2, 1, 1	0,2; 0,3; 0,4	13, 4, 5	0,0; 0,6; 0,7
50	HSC	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	9, 8, 8, 7, 6, 10, 7, 9, 9, 10	0,4; 2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 3; 1; 0,1; 0,1	33, 30, 34, 34, 33, 47, 34, 41, 38, 42	2, 6, 2, 2, 4, 4, 11, 3, 2, 2
53	HSC	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	15, 12, 11, 11, 7, 9, 8, 6, 7, 8	2; 2; 2; 2; 1; 1; 1; 0,6; 0,2; 0,5	11, 8, 8, 8, 15, 12, 14, 12, 15, 15	3; 1; 2; 2; 1; 2; 1; 1; 2; 0,4
57	HSC	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	18, 17, 14, 11, 16, 12, 9, 12, 11, 12	3; 2; 1; 1; 1; 0,6; 1; 1; 2	29, 34, 35, 30, 33, 38, 33, 36, 33, 33	6; 2; 2; 2; 1; 2; 0,3; 2; 3
46	L 929 $\Delta 9$	4°C, 60 min	10, 30, 104, 120	7, 1, 1, 1	2; 0,2; 0,2	30, 19, 17, 13	9, 4, 2
48	L 929 $\Delta 9$	4°C, 60 min	10, 30, 60, 120, 180	3, 2, 2, 1, 2	0,5; 0,2; 0,3; 0,1; 0,2	14, 13, 12, 12, 12	1; 0,4; 1; 1
51	L 929 $\Delta 9$	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	16, 15, 21, 21, 12, 14, 15, 17, 14, 19	2, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1	55, 57, 70, 69, 46, 45, 45, 51, 45, 48	2, 3, 1, 1, 7, 5, 3, 2, 4, 2
55	L 929 $\Delta 9$	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	9, 15, 9, 13, 7, 7, 5, 6, 6, 7	6, 3, 2, 1, 3, 2, 1, 1, 1, 1	9, 16, 10, 13, 10, 12, 5, 7, 7, 8	4, 4, 2, 2, 7, 3, 2, 1, 1, 2
59	L 929 $\Delta 9$	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	14, 16, 16, 17, 11, 11, 5, 12, 16, 16	1; 0,3; 1; 0,4; 0,4; 1; 7; 0,5; 4; 1	46, 50, 53, 46, 38, 38, 15, 40, 40, 41	4, 3, 3, 1, 2, 3, 20, 2, 10, 3

Tabelle 34: Ergebnisse der Kinetikexperimente nach Entfernung der ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate von Zellen ohne $\Delta 9$ -E-Cadherin

V.-Nr.	Zelllinie	Inkubations-temperatur und -dauer	Zeitpunkte nach Inkubationsbeginn (min)	Bindung		Internalisierung	
				Mittelwerte* 10^{-2}	Stabw. * 10^{-2}	Mittelwerte* 10^{-2}	Stabw. * 10^{-2}
54	HTB-135	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	23, 20,23, 18, 5, 5, 5, 4, 4, 4	0,4; 2; 0,4; 2; 0,5; 0,1; 0,2; 1; 1; 0,1	31, 27, 32, 26, 15, 16, 15, 17, 14, 16	2, 3, 2, 1, 1, 1, 1, 9, 1, 1
58	HTB-135	25°C, 5 min	60, 90, 120, 150, 180	15, 13, 13, 1, 16	1; 1; 0,3; 8; 2	40, 43, 41, 2, 45	3, 3, 2, 23, 1
44	L 929 WT	4°C, 80 min	0, 60, 120, 240	36, 32, 30	4, 3, 1	64, 68, 70	4, 2, 1
47	L 929 WT	4°C, 60 min	10, 104, 120	1, 1, 1	0,3; 0,2; 0,0	1; 0,2; 0,3	0,2; 0,1; 0,1
49	L 929 WT	4°C, 60 min	10, 30, 60, 120, 180	1, 1, 2, 1, 1	1; 0,2; 0,3; 0,2; 0,3	0,4; 1; 1; 0,4; 2	0,1; 0,2; 0,0; 0,1; 2
52	L 929 WT	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 150, 180	16, 16, 14, 14, 13, 13, 12, 15, 14	2; 0,3; 1; 1; 1; 1; 2; 1; 1	43, 52, 49, 47, 47, 41, 10, 45, 41	4, 2, 2, 3, 2, 2, 3, 3, 5
56	L 929 WT	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 35, 60, 90, 120, 150, 180	11, 8, 9, 11, 9, 6, 7, 5, 5, 6	2; 1; 1; 2; 3; 2; 0,1; 1; 1; 1	7, 7, 6, 8, 6, 13, 7, 4, 4, 5	2, 1, 2, 1, 1, 2, 4, 1, 1, 1
60	L 929 WT	25°C, 5 min	0, 2, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180	15, 15, 14, 14, 12, 10, 11, 12, 16, 16	0,4; 1; 1; 1; 2, 1; 0,4; 1; 1; 0,4	49; 48, 46, 47, 38, 33, 35, 37, 45, 39	5, 2, 4, 4, 5, 5, 4, 1, 1, 2

Tabelle 35: Ergebnisse von klonogenen Tests nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8) und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1) mit 80 HSC-Zellen/Well und 300-600 HTB-135-Zellen/Well mit verschiedenen Inkubationszeiten

V.-Nr.	Zelllinie	MAK	Inkubationsdauer, Vorgehen danach	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	Klone pro Well		Reproduktion in %	
					\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
89	HSC	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 1, 13, 140, 316	24, 9, 9, 2, 1	7, 4, 4, 2, 1	100, 39, 36, 10, 3	28, 18, 18, 7, 5
90	HSC	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 26, 272	20, 16, 4	4, 5, 2	100, 82, 21	18, 24, 12
91	HSC	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	13, 41, 83, 428	19, 8, 6, 1	5, 4, 3, 1	100, 40, 29, 4	24, 22, 15, 6
98	HTB-135	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 20, 101	32, 31, 13	5, 5, 5	100, 96, 41	16, 16, 15
99	HTB-135	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	1, 13, 140, 316	4, 4, 1, 0	2; 2; 1; 0,1	100; 86; 30; 0,5	58, 54, 26, 2
100	HTB-135	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 26, 272	15, 10, 5	4, 4, 2	100, 67, 32	28, 25, 16
101	HTB-135	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	13, 41, 83, 428	10, 8, 6, 2	3, 3, 2, 1	100, 80, 57, 20	30, 31, 24, 10
108	HSC	6H8	90 min, MW	0, 100, 222, 446, 673	19, 13, 8, 6, 1	8, 4, 4, 4, 1	100, 71, 41, 33, 4	43, 21, 20, 22, 5
109	HSC	6H8	90 min, MW	0, 242, 371, 648	30, 15, 9, 7	9, 6, 8, 6	100, 50, 29, 24	29, 21, 27, 20
113	HSC	6H8	90 min, MW	0, 376, 760, 1150, 1547, 1950	62, 14, 3, 5, 2, 0	8; 7; 4; 5; 2; 0,5	100; 21; 5; 8; 3; 0,3	14, 12, 6, 9, 3, 1
114	HSC	6H8	90 min, MW	0, 568, 776, 995	45, 2, 0, 8	10; 3; 0,3; 5	100, 5, 0, 18	21, 7, 1, 11
115	HSC	6H8	90 min, MW	0, 28, 55, 83, 109, 243	9, 7, 6, 5, 6, 3	4, 3, 3, 3, 4, 2	100, 84, 71, 51, 67, 36	48, 34, 39, 35, 40, 28
116	HSC	6H8	90 min, MW	0, 17, 33, 50, 68, 150	51, 42, 40, 33, 32, 19	9, 11, 9, 9, 5, 8	100, 81, 79, 64, 63, 37	18, 17, 22, 17, 17, 11
111	HSC	7H1	90 min, MW	0, 71, 162, 325, 490	19, 8, 2, 0, 0	8; 6; 2; 0; 0,3	100; 44; 10; 0; 0,4	43, 32, 10, 0, 1
112	HSC	7H1	90 min, MW	0, 236, 346, 567	26, 11, 11, 5	15, 9, 6, 5	100, 44, 42, 18	56, 35, 24, 19
117	HSC	7H1	90 min, MW	0, 317, 629, 953, 1282, 1593, 1787	62, 29, 26, 13, 8, 0, 2	16, 7, 12, 10, 9, 1, 3	100, 46, 41, 21, 13, 1, 3	25, 12, 20, 17, 14, 1, 4
118	HSC	7H1	90 min, MW	0, 629, 821, 1004	45, 10, 12, 4	10, 8, 7, 4	100, 22, 27, 9	21, 19, 15, 9
119	HSC	7H1	90 min, MW	0, 34, 68, 102, 137, 300	9, 9, 8, 6, 6, 3	4, 4, 4, 3, 3, 2	100, 96, 85, 64, 63, 33	48, 46, 42, 29, 30, 21
120	HSC	7H1	90 min, MW	0, 18, 37, 55, 73, 162	51, 44, 39, 29, 27, 10	9, 9, 10, 8, 8, 5	100, 87, 76, 56, 52, 19	18, 17, 19, 15, 16, 10

Tabelle 36: Ergebnisse von klonogenen Tests mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in 24-Well-Platten mit 20-40 L 929/Well mit verschiedenen Inkubationszeiten

V.-Nr.	Zelllinie	MAK	Inkubationsdauer, Vorgehen danach	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	Klone pro Well		Reproduktion in %	
					\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
94	L 929 WT	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 93, 189, 387	5, 3, 2, 1	2, 1, 1, 1	100, 49, 31, 23	40, 25, 21, 20
95	L 929 WT	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 6, 27, 52, 245, 473	7, 5, 6, 7, 2, 1	3, 3, 3, 2, 1, 1	100, 81, 98, 101, 23, 13	38, 53, 43, 37, 20, 14
96	L 929 WT	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 26, 268	23, 21, 13	5, 3, 4	100, 92, 57	20, 13, 18
97	L 929 WT	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 12, 41, 73, 374	18, 14, 14, 12, 8	4, 2, 3, 3, 3	100, 80, 80, 68, 46	22, 13, 16, 19, 17
128	L 929 WT	6H8	90 min, MW	0, 134, 261, 415, 568	12, 8, 13, 2, 1	4, 2, 2, 2, 1	100, 61, 103, 17, 12	35, 20, 16, 14, 10
129	L 929 WT	6H8	90 min, MW	0, 821, 1077, 1203, 1446, 1568, 1848, 1914	17, 3, 3, 1, 0, 2, 0, 0	5; 1; 5; 1; 1; 1; 0; 0,4	100, 16, 18, 7, 2, 10, 0, 1	28, 8, 32, 4, 4, 6, 0, 2
130	L 929 WT	6H8	90 min, MW	0, 242, 371, 657	17, 11, 7, 6	6, 4, 3, 3	100, 62, 39, 34	35, 26, 17, 16
131	L 929 WT	6H8	90 min, MW	0, 76, 152, 223, 291, 492	16, 12, 13, 10, 10, 10	4, 4, 5, 3, 3, 3	100, 78, 83, 66, 67, 64	24, 24, 32, 18, 20, 19
132	L 929 WT	6H8	90 min, MW	0, 568, 776, 980	19, 2, 1, 7	4, 1, 1, 3	100, 9, 4, 37	21, 7, 5, 18
133	L 929 WT	6H8	90 min, MW	0, 377, 747, 1125, 1480, 1957	21, 15, 6, 4, 4, 1	5, 7, 3, 3, 3, 1	100, 71, 29, 17, 18, 3	25, 33, 14, 12, 15, 5
134	L 929 WT	6H8	90 min, MW	0, 61, 122, 183, 249, 370	18, 17, 15, 15, 16, 13	5, 4, 4, 4, 6, 5	100, 92, 81, 82, 86, 69	25, 23, 24, 21, 34, 26
92	L 929 $\Delta 9$	6H8	45 min, 1x waschen mit PBS	0, 6, 27, 52, 245, 473	16, 8, 5, 3, 1, 0	5, 3, 5, 3, 1, 1	100, 49, 31, 20, 3, 1	32, 21, 32, 19, 7, 4
121	L 929 $\Delta 9$	6H8	90 min, MW	0, 134, 261, 415, 568	19, 4, 3, 2, 0	5; 3; 2; 4; 0,5	100, 21, 14, 11, 1	28, 18, 9, 19, 3
122	L 929 $\Delta 9$	6H8	90 min, MW	0, 821, 1029, 1203, 1446, 1568, 1848, 1914, 2057	27, 1, 2, 0, 0, 0, 0, 1, 0	5; 2; 3; 0,4; 0,4; 0; 1; 1; 0	100; 4, 9, 1, 1, 0, 1, 2, 0	20, 6, 11, 1, 2, 0, 2, 5, 0
123	L 929 $\Delta 9$	6H8	90 min, MW	0, 238, 365, 628	20, 9, 3, 5	4, 3, 2, 3	100, 47, 13, 23	21, 14, 9, 14
124	L 929 $\Delta 9$	6H8	90 min, MW	0, 76, 152, 224, 291, 492	26, 18, 15, 10, 12, 9	5, 5, 4, 3, 5, 4	100, 69, 57, 36, 44, 32	18, 19, 17, 10, 20, 14
125	L 929 $\Delta 9$	6H8	90 min, MW	0, 568, 776, 980	21, 1, 3, 4	4, 1, 8, 4	100, 3, 15, 19	21, 6, 37, 17
126	L 929 $\Delta 9$	6H8	90 min, MW	0, 377, 736, 1110, 1480, 1957	26, 6, 4, 1, 1, 0	6, 3, 7, 1, 2, 1	100, 23, 17, 4, 4, 1	22, 12, 26, 4, 7, 3
127	L 929 $\Delta 9$	6H8	90 min, MW	0, 61, 122, 183, 249, 370	34, 19, 14, 12, 11, 8	6, 4, 5, 4, 5, 5	100, 56, 41, 34, 33, 23	18, 13, 14, 12, 15, 16

Tabelle 37: Chromosomenaberrationen bei Magenkarzinomzellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

V-Nr.	Zelllinie	AK	Aktivitäts-Konzentration in kBq/ml	Anzahl gezählter Zellen	S-Zellen in %	Chromatid-Schäden in %			Chromosomen-Schäden in %		
						A	B	C	A	B	C
136	HSC	6H8	41	100	3	2	0	0	1	0	0
136	HSC	6H8	159	100	15	6	1	0	4	4	0
136	HSC	6H8	392	100	54	6	12	12	14	8	0
136	HSC	6H8	777	100	80	10	26	32	6	6	0
137	HSC	6H8	4	100	5	2	2	0	1	0	0
137	HSC	6H8	16	100	5	4	0	0	1	0	0
137	HSC	6H8	62	100	20	8	6	6	0	0	0
137	HSC	6H8	154	100	48	25	15	4	4	0	0
138	HSC	6H8	77	100	10	5	2	3	0	0	0
138	HSC	6H8	189	100	23	10	7	6	0	0	0
138	HSC	6H8	377	100	45	13	21	11	0	0	0
138	HSC	6H8	742	100	84	9	39	36	0	0	0
139	HSC	7H1	15	100	6	4	2	0	0	0	0
139	HSC	7H1	60	100	20	10	7	3	0	0	0
139	HSC	7H1	143	100	46	23	18	5	0	0	0
140	HSC	7H1	73	100	1	1	0	0	0	0	0
140	HSC	7H1	180	100	21	9	9	3	0	0	0
140	HSC	7H1	360	100	45	21	15	9	0	0	0
140	HSC	7H1	712	100	75	15	18	42	0	0	0
141	HSC	7H1	37	100	1	1	0	0	0	0	0
141	HSC	7H1	366	100	2	1	0	0	0	1	0
141	HSC	7H1	733	100	15	6	5	1	3	0	0
142	HTB-135	6H8	155	100	94	24	32	31	5	2	0

Tabelle 38: Chromosomenaberrationen bei murinen Fibroblasten nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

V-Nr.	Zelllinie	AK	Aktivitäts-Konzentration in kBq/ml	Anzahl gezählter Zellen	S-Zellen in %	Chromatid-Schäden in %			Chromosomen-Schäden in %		
						A	B	C	A	B	C
143	L 929 Δ 9	6H8	41	100	15	3	5	0	7	0	0
143	L 929 Δ 9	6H8	167	50	50	38	8	2	2	0	0
144	L 929 Δ 9	6H8	41	100	17	4	6	0	6	1	0
144	L 929 Δ 9	6H8	167	50	40	30	10	0	0	0	0
145	L 929 Δ 9	6H8	6	100	2	2	0	0	0	0	0
145	L 929 Δ 9	6H8	31	100	13	9	3	0	1	0	0
145	L 929 Δ 9	6H8	155	50	52	8	42	2	0	0	0
146	L 929 Δ 9	6H8	19	20	0	0	0	0	0	0	0
146	L 929 Δ 9	6H8	70	20	0	0	0	0	0	0	0
146	L 929 Δ 9	6H8	185	50	2	2	0	0	0	0	0
146	L 929 Δ 9	6H8	370	20	15	5	5	5	0	0	0
147	L 929 WT	6H8	41	100	2	1	0	0	1	0	0
147	L 929 WT	6H8	167	50	0	0	0	0	0	0	0
148	L 929 WT	6H8	41	100	0	0	0	0	0	0	0
148	L 929 WT	6H8	167	50	2	2	0	0	0	0	0
149	L 929 WT	6H8	6	100	1	1	0	0	0	0	0
149	L 929 WT	6H8	31	100	1	1	0	0	0	0	0
149	L 929 WT	6H8	155	100	6	4	2	0	0	0	0
150	L 929 WT	6H8	19	20	0	0	0	0	0	0	0
150	L 929 WT	6H8	70	20	0	0	0	0	0	0	0
150	L 929 WT	6H8	185	keine Mitosen							
150	L 929 WT	6H8	370	keine Mitosen							

Tabelle 39: Chromosomenaberrationen bei MDA-Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten

V-Nr.	Zelllinie	AK	Aktivitäts-Konzentration in kBq/ml	Anzahl gezählter Zellen	S-Zellen in %	Chromatid-Schäden in %			Chromosomen-Schäden in %		
						A	B	C	A	B	C
151	MDA Δ 9	6H8	41	100	35	18	9	2	6	0	0
151	MDA Δ 9	6H8	167	100	80	16	24	31	9	0	0
152	MDA Δ 9	6H8	41	100	32	15	10	1	5	1	0
152	MDA Δ 9	6H8	167	100	66	24	15	21	6	0	0
153	MDA Δ 9	6H8	6	100	3	3	0	0	0	0	0
153	MDA Δ 9	6H8	31	100	8	2	2	0	4	0	0
153	MDA Δ 9	6H8	155	100	18	6	12	0	0	0	0
154	MDA WT	6H8	41	50	58	24	22	0	12	0	0
154	MDA WT	6H8	167	50	66	42	12	6	6	0	0
155	MDA WT	6H8	41	100	71	40	23	4	4	0	0
155	MDA WT	6H8	167	50	60	36	16	4	4	0	0
156	MDA WT	6H8	6	100	1	0	1	0	0	0	0
156	MDA WT	6H8	31	100	8	6	0	0	2	0	0
156	MDA WT	6H8	155	100	18	6	10	0	2	0	0

Tabelle 40: Anzahl der freien und gebundenen ^{213}Bi -Immunkonjugate bei klonogenen Tests mit MDA-Zellen

V.-Nr.	Zelllinie, Well-plate	Aktivitäts-konzentration (kBq/ml)	Überleben	spezifische Aktivität (kBq/μg)	Anzahl freier Radioimmunkonjugate pro Zelle	Anzahl gebundener Radioimmunkonjugate pro Zelle
77	MDA-WT, 96	0	1,000	0	0,00E+00	0,0000
77	MDA-WT, 96	461,5	0,156	677	1,94E+06	1,0916
77	MDA-WT, 96	120,8	0,634	709	5,08E+05	0,2875
103	MDA-WT, 24	0	1,000	0	0,00E+00	0,0000
103	MDA-WT, 24	0,219	1,000	286	7,35E+03	0,0005
103	MDA-WT, 24	0,438	0,605	286	1,47E+04	0,0010
103	MDA-WT, 24	0,876	0,964	286	2,94E+04	0,0021
103	MDA-WT, 24	1,753	0,982	286	5,88E+04	0,0042
103	MDA-WT, 24	3,51	0,875	286	1,18E+05	0,0084
103	MDA-WT, 24	7,81	0,705	319	2,62E+05	0,0186
103	MDA-WT, 24	15,6	0,805	318	5,23E+05	0,0372
103	MDA-WT, 24	15,62	0,890	319	5,24E+05	0,0372
103	MDA-WT, 24	31,2	0,648	318	1,05E+06	0,0743
103	MDA-WT, 24	31,23	1,064	319	1,05E+06	0,0744
78	MDA Δ9, 96	0	1,000	0	0,00E+00	0,0000
78	MDA Δ9, 96	120,8	0,301	709	1,09E+06	23,8760
78	MDA Δ9, 96	461,5	0,042	677	4,16E+06	60,2575
105	MDA Δ9, 96	0	1,000	0	0,00E+00	0,0000
105	MDA Δ9, 24	0,219	1,000	286	1,10E+04	0,0522
105	MDA Δ9, 24	0,438	1,571	286	2,20E+04	0,1043
105	MDA Δ9, 24	0,876	1,429	286	4,41E+04	0,2081
105	MDA Δ9, 24	1,753	0,750	286	8,82E+04	0,4150
105	MDA Δ9, 24	3,51	0,536	286	1,77E+05	0,8249
105	MDA Δ9, 24	7,81	0,464	319	3,93E+05	1,8089
105	MDA Δ9, 24	15,6	0,323	318	7,85E+05	3,5117
105	MDA Δ9, 24	15,62	0,321	319	7,86E+05	3,5162
105	MDA Δ9, 24	31,2	0,161	318	1,57E+06	6,6500
105	MDA Δ9, 24	31,23	0,393	319	1,57E+06	6,6564

Tabelle 41: Anzahl der freien und gebundenen ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bei klonogenen Tests mit HSC und HTB-135 im Vergleich

V.-Nr.	Zelllinie	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	Überleben	spezifische Aktivität (kBq/ μg)	Anzahl freier Radioimmunkonjugate pro Zelle	Anzahl gebundener Radioimmunkonjugate pro Zelle
100	HTB-135	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
100	HTB-135	26,38	0,667	962	3,14E+05	0,09
100	HTB-135	271,94	0,325	992	3,24E+06	0,97
90	HSC	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
90	HSC	26,38	0,817	962	1,96E+06	9,13
90	HSC	271,94	0,212	992	2,03E+07	73,00

Tabelle 42: Anzahl der freien und gebundenen ^{213}Bi -Immunkonjugate bei klonogenen Tests mit HSC

V.-Nr.	Zelllinie, MAK	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	Überleben	spezifische Aktivität (kBq/ μg)	Anzahl freier Radioimmunkonjugate pro Zelle	Anzahl gebundener Radioimmunkonjugate pro Zelle
115	HSC, 6H8	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
115	HSC, 6H8	27,5	0,842	381	1,09E+06	9,05
115	HSC, 6H8	54,6	0,706	381	2,18E+06	16,64
115	HSC, 6H8	82,6	0,513	387	3,32E+06	23,47
115	HSC, 6H8	109,4	0,668	386	4,42E+06	29,13
115	HSC, 6H8	242,6	0,358	392	1,01E+07	49,59
114	HSC, 6H8	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
114	HSC, 6H8	567,9	0,051	559	2,28E+07	91,03
114	HSC, 6H8	775,9	0,003	577	3,14E+07	105,45
114	HSC, 6H8	994,7	0,176	780	4,05E+07	139,69
119	HSC, 7H1	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
119	HSC, 7H1	33,9	0,965	431	1,35E+06	0,12
119	HSC, 7H1	67,5	0,847	431	2,70E+06	0,24
119	HSC, 7H1	102,1	0,640	438	4,10E+06	0,36
119	HSC, 7H1	137,4	0,631	445	5,56E+06	0,49
119	HSC, 7H1	300	0,334	445	1,25E+07	1,06
118	HSC, 7H1	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
118	HSC, 7H1	1004,1	0,087	728	4,09E+07	3,53
118	HSC, 7H1	820,5	0,270	739	3,32E+07	2,90
118	HSC, 7H1	628,7	0,222	751	2,53E+07	2,23

Tabelle 43: Anzahl der freien und gebundenen ²¹³Bi-Immunkonjugate bei klonogenen Tests mit murinen Fibroblasten

V.-Nr.	Zelllinie	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	Überleben	spezifische Aktivität (kBq/μg)	Anzahl freier Radioimmunkonjugate pro Zelle	Anzahl gebundener Radioimmunkonjugate pro Zelle
127	L 929 Δ9	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
127	L 929 Δ9	60,7	0,557	838	4,85E+06	9,98
127	L 929 Δ9	121,7	0,410	851	9,84E+06	18,55
127	L 929 Δ9	183,1	0,340	864	1,50E+07	26,05
127	L 929 Δ9	249,3	0,330	893	2,07E+07	33,31
127	L 929 Δ9	369,9	0,229	904	3,14E+07	44,21
126	L 929 Δ9	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
126	L 929 Δ9	736	0,166	1661	7,58E+07	99,51
126	L 929 Δ9	1110	0,042	1326	9,08E+07	98,48
126	L 929 Δ9	377,4	0,229	1560	2,89E+07	50,53
126	L 929 Δ9	1480	0,042	1584	1,17E+08	121,56
126	L 929 Δ9	1957,3	0,011	1627	1,64E+08	142,32
134	L 929 WT	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
134	L 929 WT	60,7	0,918	838	4,85E+06	0,09
134	L 929 WT	121,7	0,807	851	9,84E+06	0,18
134	L 929 WT	183,1	0,821	864	1,50E+07	0,27
134	L 929 WT	249,3	0,862	893	2,07E+07	0,37
134	L 929 WT	369,9	0,687	904	3,14E+07	0,55
133	L 929 WT	0	1,000	0	0,00E+00	0,00
133	L 929 WT	747,4	0,291	1327	6,05E+07	1,11
133	L 929 WT	1124,8	0,169	1347	9,22E+07	1,66
133	L 929 WT	377,4	0,711	1560	2,89E+07	0,54
133	L 929 WT	1480	0,177	1584	1,17E+08	2,09
133	L 929 WT	1957,3	0,035	1627	1,64E+08	2,87

Tabelle 44: Gebundene und freie ^{213}Bi -Immunkonjugate bei der Untersuchung der Chromosomenaberrationen bei HSC

V.-Nr.	Zelllinie, MAK	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	spezifische Aktivität (kBq/ μg)	Anzahl freier Radioimmunkonjugate pro Zelle	Anzahl gebundener Radioimmunkonjugate pro Zelle	S-Zellen (%)
135	HSC, 6H8	0	0	0,00E+00	0	2
135	HSC, 6H8	155	692	6,42E+03	51	keine Mitosen
136	HSC, 6H8	0	0	0,00E+00	0	1
136	HSC, 6H8	41	770	9,91E+02	14	3
136	HSC, 6H8	159	770	3,75E+03	45	15
136	HSC, 6H8	392	770	9,46E+03	87	54
136	HSC, 6H8	777	770	1,89E+04	124	80
137	HSC, 6H8	0	0	0,00E+00	0	0
137	HSC, 6H8	4	1361	1,51E+02	2	5
137	HSC, 6H8	16	1361	5,07E+02	6	5
137	HSC, 6H8	62	1361	1,96E+03	24	20
137	HSC, 6H8	154	1361	3,87E+03	54	48
138	HSC, 6H8	77	887	2,63E+03	34	10
138	HSC, 6H8	189	887	6,58E+03	71	23
138	HSC, 6H8	377	887	1,32E+04	111	45
138	HSC, 6H8	742	887	2,64E+04	154	84
139	HSC, 7H1	3	1035	1,14E+02	0	3
139	HSC, 7H1	15	1035	5,38E+02	0	6
139	HSC, 7H1	60	1035	2,02E+03	0	20
139	HSC, 7H1	143	1035	4,53E+03	1	46
140	HSC, 7H1	0	0	0,00E+00	0	1
140	HSC, 7H1	73	955	2,62E+03	0	1
140	HSC, 7H1	180	955	6,58E+03	1	21
140	HSC, 7H1	360	955	1,32E+04	2	45
140	HSC, 7H1	712	955	2,63E+04	4	75
141	HSC, 7H1	0	0	0,00E+00	0	0
141	HSC, 7H1	37	664	9,45E+02	0	1
141	HSC, 7H1	144	664	3,53E+03	1	0
141	HSC, 7H1	366	664	8,96E+03	1	2
141	HSC, 7H1	733	664	1,79E+04	3	15

Tabelle 45: Gebundene und freie ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bei der Untersuchung der Chromosomenaberrationen bei L 929

V.-Nr.	Zelllinie	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	spezifische Aktivität (kBq/ μg)	Anzahl freier Radioimmunkonjugate pro Zelle	Anzahl gebundener Radioimmunkonjugate pro Zelle	S-Zellen (%)
143	L 929 $\Delta 9$	0	0	0,00E+00	0,00	1
143	L 929 $\Delta 9$	41	801	2,99E+03	12,11	15
143	L 929 $\Delta 9$	167	636	7,80E+03	25,43	50
144	L 929 $\Delta 9$	0	0	0,00E+00	0,00	2
144	L 929 $\Delta 9$	41	801	7,38E+02	11,98	17
144	L 929 $\Delta 9$	167	636	1,93E+03	25,25	40
145	L 929 $\Delta 9$	0	0	0,00E+00	0,00	1
145	L 929 $\Delta 9$	6	692	2,34E+02	1,40	2
145	L 929 $\Delta 9$	31	692	1,17E+03	6,62	13
145	L 929 $\Delta 9$	155	692	5,67E+03	25,50	52
146	L 929 $\Delta 9$	0	0	0,00E+00	0,00	0
146	L 929 $\Delta 9$	19	1230	6,26E+02	4,61	0
146	L 929 $\Delta 9$	70	1230	2,44E+03	16,71	0
146	L 929 $\Delta 9$	185	1230	6,21E+03	37,03	2
146	L 929 $\Delta 9$	370	1230	1,24E+04	61,01	15
147	L 929 WT	0	0	0,00E+00	0,00	0
147	L 929 WT	41	801	3,00E+03	0,11	2
147	L 929 WT	167	636	7,83E+03	0,29	0
148	L 929 WT	0	0	0,00E+00	0,00	2
148	L 929 WT	41	801	7,49E+02	0,11	0
148	L 929 WT	167	636	1,96E+03	0,29	2
149	L 929 WT	0	0	0,00E+00	0,00	0
149	L 929 WT	6	692	2,35E+02	0,01	1
149	L 929 WT	31	692	1,18E+03	0,06	1
149	L 929 WT	155	692	5,69E+03	0,28	6
150	L 929 WT	0	0	0,00E+00	0,00	0
150	L 929 WT	19	1230	6,31E+02	0,04	0
150	L 929 WT	70	1230	2,46E+03	0,15	0
150	L 929 WT	185	1230	6,25E+03	0,39	keine Mitosen
150	L 929 WT	370	1230	1,24E+04	0,77	keine Mitosen

Tabelle 46: Gebundene und freie ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bei der Untersuchung der Chromosomenaberrationen bei MDA-Zellen

V.-Nr.	Zelllinie	Aktivitätskonzentration (kBq/ml)	spezifische Aktivität (kBq/ μg)	Anzahl freier Radioimmunkonjugate pro Zelle	Anzahl gebundener Radioimmunkonjugate pro Zelle	S-Zellen (%)
151	MDA $\Delta 9$	0	0	0,00E+00	0,00	0
151	MDA $\Delta 9$	41	801	2,98E+03	16,13	35
151	MDA $\Delta 9$	167	636	7,79E+03	33,88	80
152	MDA $\Delta 9$	0	0	0,00E+00	0,00	1
152	MDA $\Delta 9$	41	801	7,34E+02	15,90	32
152	MDA $\Delta 9$	167	636	1,92E+03	33,56	66
153	MDA $\Delta 9$	0	0	0,00E+00	0,00	2
153	MDA $\Delta 9$	6	692	2,34E+02	1,86	3
153	MDA $\Delta 9$	31	692	1,17E+03	8,81	8
153	MDA $\Delta 9$	155	692	5,66E+03	33,96	18
154	MDA WT	0	0	0,00E+00	0,00	1
154	MDA WT	41	801	3,00E+03	0,18	58
154	MDA WT	167	636	7,83E+03	0,47	66
155	MDA WT	0	0	0,00E+00	0,00	4
155	MDA WT	41	801	7,49E+02	0,18	71
155	MDA WT	167	636	1,96E+03	0,47	60
156	MDA WT	0	0	0,00E+00	0,00	2
156	MDA WT	6	692	2,35E+02	0,02	1
156	MDA WT	31	692	1,18E+03	0,09	8
156	MDA WT	155	692	5,69E+03	0,45	18

Tabelle 47: Ergebnis der Dosisabschätzung für klonogene Tests mit HSC und ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten

Versuchs-Nr.	Aktivitätskonzentration a in kBq/ml	spezifische Aktivität P in kBq/ μg	besetzter Anteil der Antigene x	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Dosis D in Gy
89	1,3	741,17	0,002	457	0,02
89	12,8	706,33	0,021	4567	0,23
91	13,3	884,69	0,018	2548	0,24
116	16,7	163,01	0,111	13796	0,28
90	26,4	962,17	0,032	6925	0,47
115	27,5	381,30	0,080	9712	0,47
116	33,1	162,55	0,198	27592	0,51
91	40,9	895,32	0,053	7720	0,72
116	50,1	165,03	0,269	41388	0,72
115	54,6	380,88	0,148	19424	0,88
116	67,5	167,78	0,328	55184	0,92
115	82,6	386,50	0,206	29136	1,27
91	83,1	909,11	0,100	15440	1,40
108	100,2	471,67	0,205	35715	1,54
115	109,4	386,29	0,256	38848	1,60
89	139,9	773,81	0,180	45668	2,20
116	149,5	170,20	0,516	124164	1,63
108	221,8	524,63	0,339	71429	2,98
109	242,1	861,15	0,254	28687	3,54
115	242,6	392,32	0,429	87408	2,95
90	271,9	991,86	0,250	69255	4,00
89	316,0	879,71	0,304	91336	4,40
109	371,4	887,94	0,337	43031	5,00
113	376,3	1121,93	0,289	45166	5,32
91	428,2	937,12	0,357	77200	5,64
108	446,0	532,69	0,504	142858	4,93
114	567,9	559,39	0,552	138408	5,89
109	647,6	534,32	0,595	126716	6,32
108	672,7	540,89	0,601	214288	6,51
113	759,5	1139,25	0,447	90332	9,02
114	775,9	576,72	0,620	184544	7,30
114	994,7	779,95	0,607	176007	9,53
113	1149,6	1156,70	0,547	135498	12,02
113	1546,8	1174,42	0,615	180664	14,66
113	1949,5	1191,36	0,665	225830	17,08

Tabelle 48: Ergebnis der Dosisabschätzung für klonogene Tests mit HSC und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten

Versuchs-Nr.	Aktivitätskonzentration a in kBq/ml	spezifische Aktivität P in kBq/ μg	besetzter Anteil der Antigene x	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Dosis D in Gy
120	18,4	197,49	0,001	12546	0,08
119	33,9	430,73	0,001	10598	0,14
120	36,5	197,10	0,002	25092	0,15
120	55,3	200,31	0,003	37638	0,23
119	67,5	431,48	0,002	21197	0,28
111	70,8	294,63	0,003	40399	0,29
120	73,3	200,35	0,004	50184	0,30
119	102,1	437,79	0,003	31795	0,42
119	137,4	444,58	0,004	42394	0,57
111	161,5	337,71	0,006	80797	0,66
120	162,4	203,30	0,010	112915	0,67
112	235,8	487,59	0,006	49348	0,97
119	300,0	444,57	0,008	95386	1,23
117	316,6	1228,26	0,003	34711	1,30
111	324,7	342,85	0,011	161594	1,34
112	345,5	480,19	0,009	74022	1,42
111	489,7	348,10	0,017	242391	2,01
112	566,6	480,17	0,014	123370	2,33
118	628,7	750,76	0,010	114170	2,59
117	629,3	1228,27	0,006	69422	2,59
118	820,5	739,35	0,013	152226	3,38
117	952,6	1247,18	0,009	104133	3,92
118	1004,1	728,25	0,016	190283	4,13
117	1281,7	1266,26	0,012	138844	5,27
117	1592,5	1266,33	0,015	173555	6,55
117	1787,4	1191,60	0,018	208266	7,35

Tabelle 49: Ergebnis der Dosisabschätzung für klonogene Tests mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten an L 929 $\Delta 9$

Versuchs-Nr.	Aktivitätskonzentration a in kBq/ml	spezifische Aktivität P in kBq/ μg	besetzter Anteil der Antigene x	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Dosis D in Gy
127	60,7	838,31	0,08	39244	1,07
124	76,3	937,93	0,09	43818	1,33
127	121,7	850,76	0,15	78489	2,02
121	133,6	731,84	0,18	153096	2,15
124	151,6	937,57	0,16	87637	2,48
127	183,1	863,73	0,20	117733	2,89
124	222,6	923,45	0,23	131455	3,44
123	238,2	861,17	0,25	114750	3,59
127	249,3	892,63	0,25	156977	3,75
121	261,4	719,00	0,31	306192	3,73
124	290,5	909,39	0,28	175274	4,26
123	365,4	887,80	0,33	172125	5,07
127	369,9	903,99	0,33	235466	5,14
126	377,4	1559,73	0,22	125827	5,69
121	414,9	764,03	0,40	459288	5,36
124	491,8	895,84	0,40	306729	6,33
125	567,9	559,39	0,55	553633	6,03
121	567,9	787,65	0,47	612384	6,75
123	627,8	526,27	0,59	506863	6,30
126	736,0	1661,04	0,41	309547	11,17
125	775,9	576,72	0,62	738177	7,45
122	821,2	800,21	0,55	418873	8,69
125	979,6	768,11	0,61	704028	9,59
122	1028,6	1527,99	0,45	277018	12,48
126	1110,0	1326,48	0,50	464321	12,57
122	1203,3	788,10	0,65	628310	11,04
122	1445,7	1623,79	0,52	369358	16,05
126	1480,0	1583,55	0,52	503306	15,96
122	1567,5	776,24	0,71	837746	12,97
122	1848,0	1673,91	0,57	461697	19,06
122	1914,3	764,50	0,75	1047183	14,64
126	1957,3	1627,45	0,59	683472	19,58
122	2057,2	957,90	0,72	905328	16,63

Tabelle 50: Ergebnis der Dosisabschätzung für klonogene Tests mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten an L 929 WT

Versuchs-Nr.	Aktivitätskonzentration a in kBq/ml	spezifische Aktivität P in kBq/ μg	besetzter Anteil der Antigene x	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Dosis D in Gy
134	60,7	838,31	0,001	47093	0,25
131	76,3	937,93	0,001	52582	0,31
134	121,7	850,76	0,002	94186	0,49
128	133,6	731,84	0,002	183715	0,54
131	151,6	937,57	0,002	105164	0,61
134	183,1	863,73	0,003	141279	0,74
131	222,6	923,45	0,003	157746	0,90
130	241,9	874,55	0,003	137700	0,98
134	249,3	892,63	0,003	188372	1,01
128	261,4	719,00	0,004	367431	1,06
131	290,5	909,39	0,004	210328	1,18
134	369,9	903,99	0,005	282559	1,50
130	371,0	901,40	0,005	206550	1,50
133	377,4	1559,73	0,003	150992	1,53
128	414,9	764,03	0,007	551146	1,68
131	491,8	895,84	0,007	368075	1,99
128	567,9	787,65	0,009	734861	2,30
132	567,9	559,39	0,012	664360	2,30
130	657,1	550,84	0,014	608236	2,66
133	747,4	1326,57	0,007	371457	3,03
132	775,9	576,72	0,016	885813	3,15
129	821,2	800,21	0,012	502648	3,33
132	979,6	768,11	0,015	844834	3,97
129	1076,6	1599,30	0,008	332422	4,37
133	1124,8	1346,81	0,010	557185	4,56
129	1203,3	788,10	0,018	753972	4,88
129	1445,7	1623,79	0,011	443229	5,86
133	1480,0	1583,55	0,011	603967	6,00
129	1567,5	776,24	0,024	1005295	6,35
129	1848,0	1673,91	0,013	554037	7,49
129	1914,3	764,50	0,029	1256619	7,76
133	1957,3	1627,45	0,014	820167	7,94

Tabelle 51: Ergebnis der Dosisabschätzung für Versuche zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen bei Magenkarzinomzellen

Versuchs-Nr.	Zelllinie und AK	Aktivitätskonzentration a in kBq/ml	spezifische Aktivität P in kBq/ μ g	besetzter Anteil der Antigene x	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Dosis D in Gy
137	HSC-45 6H8	4,07	1360,6	0,004081	0,4	0,08
137	HSC-45 6H8	16,28	1360,6	0,015863	1,3	0,32
136	HSC-45 6H8	40,70	769,5	0,061826	4,4	0,72
137	HSC-45 6H8	61,79	1360,6	0,058820	5,0	1,19
138	HSC-45 6H8	76,59	886,7	0,130960	10,2	1,67
137	HSC-45 6H8	153,55	1360,6	0,134358	9,7	2,75
135	HSC-45 6H8	155,40	691,7	0,249377	31,5	2,64
136	HSC-45 6H8	159,10	769,5	0,198647	16,7	2,43
138	HSC-45 6H8	188,70	886,7	0,272025	25,4	3,58
138	HSC-45 6H8	377,00	886,7	0,424116	50,9	5,91
136	HSC-45 6H8	392,20	769,5	0,382529	42,1	5,01
138	HSC-45 6H8	741,90	886,7	0,588209	101,7	9,07
136	HSC-45 6H8	777,00	769,5	0,548663	83,8	8,04
139	HSC-45 7H1	2,96	1034,6	0,000041	0,4	0,01
139	HSC-45 7H1	14,54	1034,6	0,000203	1,8	0,06
141	HSC-45 7H1	37	663,8	0,000728	4,8	0,15
139	HSC-45 7H1	60,2	1034,6	0,000845	6,6	0,25
140	HSC-45 7H1	72,52	954,8	0,001399	9,3	0,30
139	HSC-45 7H1	142,7	1034,6	0,002059	15,0	0,59
141	HSC-45 7H1	144,3	663,8	0,002704	18,1	0,59
140	HSC-45 7H1	180,2	954,8	0,003476	23,4	0,75
140	HSC-45 7H1	359,6	954,8	0,006845	46,7	1,51
141	HSC-45 7H1	366,3	663,8	0,006767	45,8	1,51
140	HSC-45 7H1	711,9	954,8	0,013262	93,3	2,98
141	HSC-45 7H1	732,6	663,8	0,013214	91,3	3,01
142	HTB-135	155,40	691,70	0,003337	86,5	0,42

Tabelle 52: Ergebnisse der Dosisabschätzung für Versuche zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen mit Fibroblasten

Versuchs-Nr.	Zelllinie	Aktivitätskonzentration a in kBq/ml	spezifische Aktivität P in kBq/µg	besetzter Anteil der Antigene x	AK-Moleküle als Vielfaches der Antigene	Dosis D in Gy
145	L 929 delta 9	5,92	691,7	0,0137	2,3	0,14
146	L 929 delta 9	18,50	1230	0,0254	3,5	0,45
145	L 929 delta 9	31,08	691,7	0,0649	11,6	0,67
143	L 929 delta 9	40,70	800,5	0,1027	25,4	1,16
144	L 929 delta 9	40,70	800,5	0,1015	6,4	1,15
146	L 929 delta 9	70,30	1230	0,0921	13,6	1,66
145	L 929 delta 9	155,40	691,7	0,2500	55,8	2,73
143	L 929 delta 9	166,50	635,6	0,2714	83,5	2,77
144	L 929 delta 9	166,50	635,6	0,2695	20,9	2,74
146	L 929 delta 9	185,00	1230	0,2042	34,4	3,80
146	L 929 delta 9	370,00	1230	0,3364	68,5	6,52
149	L 929 WT	5,92	691,70	0,0001	2,8	0,02
150	L 929 WT	18,50	1230,00	0,0003	4,2	0,08
149	L 929 WT	31,08	691,70	0,0007	13,9	0,13
148	L 929 WT	40,70	800,50	0,0011	7,6	0,17
147	L 929 WT	40,70	800,50	0,0011	30,5	0,17
150	L 929 WT	70,30	1230,00	0,0010	16,3	0,29
149	L 929 WT	155,40	691,70	0,0033	67,0	0,63
148	L 929 WT	166,50	635,60	0,0037	25,1	0,68
147	L 929 WT	166,50	635,60	0,0037	100,2	0,68
150	L 929 WT	185,00	1230,00	0,0026	41,3	0,76
150	L 929 WT	370,00	1230,00	0,0051	82,3	1,51

7.2 Literaturverzeichnis

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch; Walter de Gruyter; Berlin; 2005; 260. Auflage

Abbas Rizvi S.M., Henniker A.J., Goozee G., und Allen B.J.; In vitro testing of the leukaemia monoclonal antibody WM-53 labeled with alpha and beta emitting radioisotopes; *Leuk. Res.*; (26); 2002; 37-43

Andersson H., Elgqvist J., Horvath G., Hultborn R., Jacobsson L., Jensen H., Karlsson B., Lindegren S., und Palm S.; Astatine-211-labeled antibodies for treatment of disseminated ovarian cancer: an overview of results in an ovarian tumor model; *Clin. Cancer Res.*; (9); 2003; 3914S-3921S

Apostolidis C., Carlos-Marquez R., Janssen W., Molinet R., Nikula T., und Quadli A.; Cancer treatment using Bi-213 and Ac-225 in radioimmunotherapy; *Nuclear News*; (44); 2001; 29-33

Azzam E.I., de Toledo S.M., und Little J.B.; Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; (98); 2001; 473-478

Ballangrud A.M., Yang W.H., Palm S., Enmon R., Borchardt P.E., Pellegrini V.A., McDevitt M.R., Scheinberg D.A., und Sgouros G.; Alpha-particle emitting atomic generator (Actinium-225)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression; *Clin. Cancer Res.*; (10); 2004; 4489-4497

Bardies M. und Myers M.J.; A simplified approach to alpha dosimetry for small spheres labelled on the surface; *Phys. Med. Biol.*; (35); 1990; 1551-1561

Barrandon Y. und Green H.; Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; (82); 1985; 5390-5394

Becker I., Becker K.F., Kremmer E., Eulitz M., Handschuh G., und Hofler H.; [Novel mutation-specific monoclonal E-cadherin antibodies make possible allele differentiation at the protein level in tumors]; *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*; (83); 1999a; 233-239

Becker K.F., Atkinson M.J., Reich U., Becker I., Nekarda H., Siewert J.R., und Hofler H.; E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas; *Cancer Res.*; (54); 1994; 3845-3852

Becker K.F., Kremmer E., Eulitz M., Becker I., Handschuh G., Schuhmacher C., Muller W., Gabbert H.E., Ochiai A., Hirohashi S., und Hofler H.; Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation- specific monoclonal antibody; *Am. J. Pathol.*; (155); 1999b; 1803-1809

Becker N., Wahrendorf J., und Holzmeier S.; "Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland"; Springer Verlag; Berlin; 2002;

Beckers H.; Non-Hodgkin-Lymphome in "Innere Medizin"; Gerd Herold; Köln; 2001; 61-63

Borchardt P.E., Yuan R.R., Miederer M., McDevitt M.R., und Scheinberg D.A.; Targeted actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer; *Cancer Res.*; (63); 2003; 5084-5090

Buckton K.E. und Evans H.J.; "Methods for the analysis of human chromosome aberrations"; World Health Organization; 1973

Budach W., Hoffmann W., und Bamberg M.; Stellenwert der Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom; *Verdauungskrankheiten*; (16); 1998; 156-166

Chappell L.L., Deal K.A., Dadachova E., und Brechbiel M.W.; Synthesis, conjugation, and radiolabeling of a novel bifunctional chelating agent for (225)Ac radioimmunotherapy applications; *Bioconjug. Chem.*; (11); 2000; 510-519

Chen H.C., Chu R.Y., Hsu P.N., Hsu P.I., Lu J.Y., Lai K.H., Tseng H.H., Chou N.H., Huang M.S., Tseng C.J., und Hsiao M.; Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas; *Cancer Lett.*; (201); 2003; 97-106

Djordjevic B.; Bystander effects: a concept in need of clarification; *Bioessays*; (22); 2000; 286-290

Erbar et al; Kapitel Chemotherapie; Allgemeines in "Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren"; Schattauer Verlag; 2002; 4. Auflage; 114

Foulon C.F., Welsh P.C., Bigner D.D., und Zalutsky M.R.; Positively charged templates for labeling internalizing antibodies: comparison of N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate and the D- amino acid peptide KRYRR; *Nucl. Med. Biol.*; (28); 2001; 769-777

Freund M.; "Thiemes Innere Medizin"; Thieme Verlag; Stuttgart; 1999; 865-870

Fukudome Y., Yanagihara K., Takeichi M., Ito F., und 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

Gadal F., Bastias J., Wei M.X., und Crepin M.; "Suicide" gene therapy of breast cancer cells is only cytostatic in vitro but anti-tumoral in vivo on breast MCF7-ras tumor; *In Vivo*; (18); 2004; 813-818

- Gall F.P., Altendorf A., Hermanek P., und Gentsch H.H.; [Surgical therapy of stomach cancer-stagnation or progress? Results of 2665 stomach cancer patients]; Fortschr. Med.; (100); 1982; 1876-1882
- Glehen O., Schreiber V., Cotte E., Sayag-Beaujard A.C., Osinsky D., Freyer G., Francois Y., Vignal J., und Gilly F.N.; Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia for peritoneal carcinomatosis arising from gastric cancer; Arch. Surg.; (139); 2004; 20-26
- Goetz C., Riva P., Poepperl G., Gildehaus F.J., Hischa A., Tatsch K., und Reulen H.J.; Locoregional radioimmunotherapy in selected patients with malignant glioma: experiences, side effects and survival times; J. Neurooncol.; (62); 2003; 321-328
- Goldenberg D.M.; Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies; J. Nucl. Med.; (43); 2002; 693-713
- Hall E.J.; "Radiobiology for the radiologist"; Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia; 2000; 5th ed; 18-42
- Handschuh G., Candidus S., Lubert B., Reich U., Schott C., Oswald S., Becke H., Hutzler P., Birchmeier W., Hofler H., und Becker K.F.; Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility; Oncogene; (18); 1999; 4301-4312
- Harder F. und von Flüe M.; Kolon in "Chirurgie"; Allgöwer, M.; Springer Verlag; Berlin Heidelberg New York; 2001; 7.Auflage; 633-654
- Henderikx P., Coolen-van Neer N., Jacobs A., van der L.E., Arends J.W., Mullberg J., und Hoogenboom H.R.; A human immunoglobulin G1 antibody originating from an in vitro- selected Fab phage antibody binds avidly to tumor-associated MUC1 and is efficiently internalized; Am. J. Pathol.; (160); 2002; 1597-1608
- Hennessy B.T., Hanrahan E.O., und Daly P.A.; Non-Hodgkin lymphoma: an update; Lancet Oncol.; (5); 2004; 341-353
- Hieber L., Beck H.P., und Lucke-Huhle C.; G2-delay after irradiation with alpha-particles as studied in synchronized cultures and by the bromodeoxyuridine-33258H technique; Cytometry; (2); 1981; 175-178
- Hölzel D., Engel J., Schmidt M., und Sauer H.; Modell zur primären und sekundären Metastasierung beim Mammkarzinom und dessen klinische Bedeutung; Strahlenther. Onkol.; (1); 2001; 10-23
- Huber R., Seidl C., Schmid E., Seidenschwang S., Becker K.F., Schuhmacher C., Apostolidis C., Nikula T., Kremmer E., Schwaiger M., und Senekowitsch-Schmidtke R.; Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody; Clin. Cancer Res.; (9); 2003; 3922S-3928S

Junginger Th., Schmoll H.-J., und Höffken K.; Prinzipien in "Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2004: Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen"; Zuckschwerdt Verlag; Frankfurt; 2004; 4.Auflage; 3-45

Junginger T., Kettelhack C., Schonfelder M., Saeger H.D., Rieske H., Krummenauer F., und Hermanek P.; [Therapeutic strategies in malignant soft tissue tumors. Results of the soft tissue tumor register study of the Surgical Oncology Working Group]; Chirurg; (72); 2001; 138-148

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., und Scheinberg D.A.; Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia; Blood; (100); 2002; 1233-1239

Kabbinavar F., Hurwitz H.I., Fehrenbacher L., Meropol N.J., Novotny W.F., Lieberman G., Griffing S., und Bergsland E.; Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer; J. Clin. Oncol.; (21); 2003; 60-65

Kauffmann G., Moser E., und Sauer R.; "Radiologie, Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin"; Urban und Schwarzenberg; München-Wien-Baltimore; 1996; 1.Auflage; 31-62

Kellerer A.M.; Chord-length Distributions and related Quantities for Spheroids; Radiat. Res.; (98); 1984; 425-437

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., und Mirzadeh S.; Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroid cultures of tumor cells; Radiat. Res.; (151); 1999; 244-256

Kwekkeboom D.J., Mueller-Brand J., Paganelli G., Anthony L.B., Pauwels S., Kvols L.K., O'dorisio T.M., Valkema R., Bodei L., Chinol M., Maecke H.R., und Krenning E.P.; Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs; J. Nucl. Med.; (46 Suppl 1); 2005; 62S-66S

Larsen R.H., Akabani G., Welsh P., und 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

Lee C.C., Lo S.S., Wu C.W., Shen K.H., Li A.F., Hsieh M.C., und Lui W.Y.; Peritoneal recurrence of gastric adenocarcinoma after curative resection; Hepatogastroenterology; (50); 2003; 1720-1722

Luftner D., Pollmann D., Schildhauer S., Sehoul J., und Possinger K.; Perspectives of immunotherapy in metastatic breast cancer; Anticancer Res.; (25); 2005; 4599-4604

Macklis R.M., Kinsey B.M., Kassis A.I., Ferrara J.L., Atcher R.W., Hines J.J., Coleman C.N., Adelstein S.J., und Burakoff S.J.; Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates; *Science*; (240); 1988; 1024-1026

McDevitt M.R., Barendswaard E., Ma D., Lai L., Curcio M.J., Sgouros G., Ballangrud A.M., Yang W.H., Finn R.D., Pellegrini V., Geerlings M.W., Jr., Lee M., Brechbiel M.W., Bander N.H., Cordon-Cardo C., und Scheinberg D.A.; An alpha-particle emitting antibody (^{213}Bi J591) for radioimmunotherapy of prostate cancer; *Cancer Res.*; (60); 2000; 6095-6100

McDevitt M.R., Finn R.D., Sgouros G., Ma D., und Scheinberg D.A.; An $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation; *Appl. Radiat. Isot.*; (50); 1999; 895-904

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., und Scheinberg D.A.; Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators; *Science*; (294); 2001; 1537-1540

Miederer M.; In vitro Untersuchungen des zytotoxischen Effekts der alpha-emittierenden Nuklide Bi-213, Terbium-149 und Actinium 225 gekoppelt an monoklonale Antikörper und Bewertung der physikalischen und biologischen Eigenschaften der Nuklide und Antikörper; 2002

Miederer M., McDevitt M.R., Sgouros G., Kramer K., Cheung N.K., und Scheinberg D.A.; Pharmacokinetics, dosimetry, and toxicity of the targetable atomic generator, ^{225}Ac -HuM195, in nonhuman primates; *J. Nucl. Med.*; (45); 2004; 129-137

Miederer M., Seidl C., Beyer G.J., Charlton D.E., Vranjes-Duric S., Comor J.J., Huber R., Nikula T., Apostolidis C., Schuhmacher C., Becker K.F., und Senekowitsch-Schmidtke R.; Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, terbium-149 and bismuth-213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-cadherin adhesion protein; *Radiat. Res.*; (159); 2003; 612-620

Milenic D.E., Roselli M., Mirzadeh S., Pippin C.G., Gansow O.A., Colcher D., Brechbiel M.W., und Schlom J.; In vivo evaluation of bismuth-labeled monoclonal antibody comparing DTPA-derived bifunctional chelates; *Cancer Biother. Radiopharm.*; (16); 2001; 133-146

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

Mitchell S.A., Randers-Pehrson G., Brenner D.J., und Hall E.J.; The bystander response in C3H 10T1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact; *Radiat. Res.*; (161); 2004; 397-401

Nagayama H., Sato K., Morishita M., Uchimar K., Oyaizu N., Inazawa T., Yamasaki T., Enomoto M., Nakaoka T., Nakamura T., Maekawa T., Yamamoto A., Shimada S., Saida T., Kawakami Y., Asano S., Tani K., Takahashi T.A., and Yamashita N.; Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2; *Melanoma Res.*; (13); 2003; 521-530

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

Nikula T.K., McDevitt M.R., Finn R.D., Wu C., Kozak R.W., Garmestani K., Brechbiel M.W., Curcio M.J., Pippin C.G., Tiffany-Jones L., Geerlings M.W., Sr., Apostolidis C., Molinet R., Geerlings M.W., Jr., Gansow O.A., und 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

Ott K., Sandler A., Becker K., Dittler H.J., Helmberger H., Busch R., Kollmannsberger C., Siewert J.R., und Fink U.; Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, 5-FU, and leucovorin (PLF) in locally advanced gastric cancer: a prospective phase II study; *Gastric. Cancer*; (6); 2003; 159-167

Paukovits P., Himmler G., und Loibner H.; [Immunotherapy of malignant diseases--developments and prospects]; *Wien. Med. Wochenschr.*; (154); 2004; 235-241

Pomp J., Wike J.L., Ouwerkerk I.J., Hoogstraten C., Davelaar J., Schrier P.I., Leer J.W., Thames H.D., und Brock W.A.; Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays; *Radiother. Oncol.*; (40); 1996; 121-125

Puck und Marcus; *J. Exp. Med.*; (103); 1953; 653-666

Purrott R.J., Edwards A.A., Lloyd D.C., und Stather J.W.; The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by in vitro irradiation with alpha-particles from plutonium-239; *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*; (38); 1980; 277-284

Rainov N.G. und Ren H.; Gene therapy for human malignant brain tumors; *Cancer J.*; (9); 2003; 180-188

Ranson M., Tian Z., Andronicos N.M., Rizvi S., und Allen B.J.; In vitro cytotoxicity of bismuth-213 (213Bi)-labeled-plasminogen activator inhibitor type 2 (alpha-PAI-2) on human breast cancer cells; *Breast Cancer Res. Treat.*; (71); 2002; 149-159

Reardon D.A., Akabani G., Coleman R.E., Friedman A.H., Friedman H.S., Herndon J.E., Cokgor I., McLendon R.E., Pegram C.N., Provenzale J.M., Quinn J.A., Rich J.N., Regalado L.V., Sampson J.H.,

Shafman T.D., Wikstrand C.J., Wong T.Z., Zhao X.G., Zalutsky M.R., und Bigner D.D.; Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas; *J. Clin. Oncol.*; (20); 2002; 1389-1397

Repke H. und Liebmann C.; *Quantitative Analyse der Ligand-Bindungskinetik in "Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme"*; VCH-Verlag; Weinheim, Deutschland; 1987; 83-87

Rosenberg S.A., Tepper J., Glatstein E., Costa J., Baker A., Brennan M., DeMoss E.V., Seipp C., Sindelar W.F., Sugarbaker P., und Wesley R.; The treatment of soft-tissue sarcomas of the extremities: prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy; *Ann. Surg.*; (196); 1982; 305-315

Roth J.A. und Grammer S.F.; Gene replacement therapy for non-small cell lung cancer: a review; *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*; (18); 2004; 215-229

Satoh T., Irie A., Egawa S., und Baba S.; In situ gene therapy for prostate cancer; *Curr. Gene Ther.*; (5); 2005; 111-119

Schmid E., Hieber L., Heinzmann U., Roos H., und Kellerer A.M.; Analysis of chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes induced by in vitro alpha-particle irradiation; *Radiat. Environ. Biophys.*; (35); 1996; 179-184

Schottelius M., Reubi J.C., Eltschinger V., Schwaiger M., und Wester H.J.; N-terminal sugar conjugation and C-terminal Thr-for-Thr(ol) exchange in radioiodinated Tyr³-octreotide: effect on cellular ligand trafficking in vitro and tumor accumulation in vivo; *J. Med. Chem.*; (48); 2005; 2778-2789

Schuhmacher C.P., Fink U., Becker K., Busch R., Dittler H.J., Mueller J., und Siewert J.R.; Neoadjuvant therapy for patients with locally advanced gastric carcinoma with etoposide, doxorubicin, and cisplatin. Closing results after 5 years of follow-up; *Cancer*; (91); 2001; 918-927

Seidl C., Schrock H., Seidenschwang S., Beck R., Schmid E., Abend M., Becker K.F., Apostolidis C., Nikula T.K., Kremmer E., Schwaiger M., und Senekowitsch-Schmidtke R.; Cell death triggered by alpha-emitting (213)Bi-immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death; *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*; (32); 2005; 274-285

Siewert J.R., Sendler A., Bumm R., und Roder J.D.; *Magen und Duodenum in "Chirurgie"*; Allgöwer, M.; Berlin Heidelberg New York; 2001; 7. Auflage; 583-619

Talmadge J.E.; Gene therapy of cancer - 12th International Conference; *IDrugs.*; (7); 2004; 100-104

Taylor G.N., Mays C.W., Lloyd R.D., Gardner P.A., Talbot L.R., McFarland S.S., Pollard T.A., Atherton D.R., VanMoorhem D., Brammer D., Brammer T.W., Ayoroa G., and Taysum D.H.; Comparative toxicity of ²²⁶Ra, ²³⁹Pu, ²⁴¹Am, ²⁴⁹Cf, and ²⁵²Cf in C57BL/Do black and albino mice; *Radiat. Res.*; (95); 1983; 584-601

Ueda Y., Itoh T., Nukaya I., Kawashima I., Okugawa K., Yano Y., Yamamoto Y., Naitoh K., Shimizu K., Imura K., Fuji N., Fujiwara H., Ochiai T., Itoi H., Sonoyama T., Hagiwara A., Takesako K., and Yamagishi H.; Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas; *Int. J. Oncol.*; (24); 2004; 909-917

Vaidyanathan G., Affleck D.J., Li J., Welsh P., and Zalutsky M.R.; A polar substituent-containing acylation agent for the radioiodination of internalizing monoclonal antibodies: N-succinimidyl 4- guanidinomethyl-3-[¹³¹I]iodobenzoate ([¹³¹I]SGMIB); *Bioconj. Chem.*; (12); 2001; 428-438

Vose J.M.; Bexxar: novel radioimmunotherapy for the treatment of low-grade and transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma; *Oncologist.*; (9); 2004; 160-172

Wang E., Panelli M.C., Monsurro V., Ping J., Zavaglia K., and Marincola F.M.; Immune monitoring of cancer vaccines; *Yonsei Med. J.*; (45 Suppl); 2004; S71-S72

Witzig T.E., Gordon L.I., Cabanillas F., Czuczman M.S., Emmanouilides C., Joyce R., Pohlman B.L., Bartlett N.L., Wiseman G.A., Padre N., Grillo-Lopez A.J., Multani P., and White C.A.; Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma; *J. Clin. Oncol.*; (20); 2002; 2453-2463

Wood A.M.; Rituximab: an innovative therapy for non-Hodgkin's lymphoma; *Am. J. Health Syst. Pharm.*; (58); 2001; 215-229

Wysocki P.J., Karczewska A., and Mackiewicz A.; [Gene modified tumor vaccines in therapy of malignant melanoma]; *Otolaryngol. Pol.*; (56); 2002; 147-153

Zalutsky M.R., Zhao X.G., Alston K.L., and Bigner D.; High-level production of alpha-particle-emitting (²¹¹At) and preparation of (²¹¹At)-labeled antibodies for clinical use; *J. Nucl. Med.*; (42); 2001; 1508-1515

Zhou Y.N., Xu C.P., Han B., Li M., Qiao L., Fang D.C., and Yang J.M.; Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival; *World J. Gastroenterol.*; (8); 2002; 987-993

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisch dargestellte Bindung des Chelats SCN-CHX-A''-DTPA an den AK	26
Abbildung 2: HTB-135, 200-fach	27
Abbildung 3: HSC, 200-fach	28
Abbildung 4: L 929 WT, 200-fach	28
Abbildung 5: L 929 $\Delta 9$, 200-fach	29
Abbildung 6: Aufbau des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator-Systems (Einzelheiten siehe Text)	32
Abbildung 7: Zerfallsschema von ^{225}Ac nach ICRU	33
Abbildung 8: Proliferationskinetiken verschiedener Zelllinien (Einzelheiten siehe Text 4.2)	54
Abbildung 9: Plating efficiency (PE) nach Klonogenem Test (Wachstumszeit 8 d) in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl (40, 80, 120 und 160 Zellen/Well) bei HSC in 24-Well-Platten mit bzw. ohne Mediumwechsel nach 24 h: Der Mediumwechsel bewirkte eine deutliche Erhöhung der PE	55
Abbildung 10: Nachweis der $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression mittels Cy3-Immunfluoreszenz an HSC-Zellen	57
Abbildung 11: Nachweis der $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression mittels Cy3-Immunfluoreszenz an L 929 $\Delta 9$ Zellen	58
Abbildung 12: Internalisierungskinetik von ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten bei 37°C (V. 37-39) bei Zelllinien mit $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression (L 929 $\Delta 9$, HSC) bzw. ohne $\Delta 9$ -E-Cadherin-Expression (L 929 WT)	61
Abbildung 13: Internalisierungskinetik der ^{111}In -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate bei 37°C von MDA-Zellen und murinen Fibroblasten mit Expression von $\Delta 9$ -E-Cadherin bzw. WT-E-Cadherin (Versuche 40-43)	63
Abbildung 14: Überlebenskurven nach Bestrahlung mit ^{137}Cs (Maximaldosis 8,4-11,7 Gy) für L 929 $\Delta 9$ (schwarz), L 929 WT (blau), HSC (rot) und HTB-135 (grün), die Symbole repräsentieren die einzelnen Datenpunkte, die Linien die Überlebenskurven nach Berechnung der Parameter α und α/β (linear-quadratisches Modell)	67
Abbildung 15: L 929 $\Delta 9$ nach Bestrahlung mit ^{137}Cs : a unbestrahlter Kontroll-Klon, b Klon nach Bestrahlung mit 3,9 Gy, rot umrandet sind stark vergrößerte teilungsunfähige Zellen	68
Abbildung 16: Überleben von MDA WT bzw. MDA $\Delta 9$ nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate; $\Delta 9$ -E-Cadherin-exprimierende Zellen zeigen deutlich geringeres Überleben als WT-E-Cadherin-exprimierende Zellen. Die Datenpunkte mit Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SD (teilweise wegen logarithmischer Darstellung nur Darstellung der oberen SD möglich). Die Überlebenskurven wurden an Hand des berechneten α -Wertes erstellt a Versuche in 24-Well-Platten mit Aktivitätskonzentrationen bis 31 kBq/ml und Inkubation für 45 min b Versuche in 96-Well-Platten mit Aktivitätskonzentrationen bis 462 kBq/ml und ohne Entfernung der RI	75
Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung von Wells mit gleicher Klonzahl bei Aussaat von 80 HSC- Zellen/Well aus den Kontrollen (325 Einzelwerte): Annähernd bandförmige Verteilung der Klonzahlhäufigkeit zwischen 0 und 65 Klonen/Well	78

- Abbildung 18: Überleben von HSC (80 Zellen/Well) und HTB-135 (500 Zellen/Well) nach 45-minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in 24-Well-Platten; Halblogarithmische Darstellung; unbehandelt, Aktivitätskonzentrationen 26 und 272 kBq/ml; Die Mittelwerte sind als Datenpunkte mit der jeweiligen SD dargestellt; die Geraden entsprechen den aus α und k berechneten Überlebenskurven; das Überleben von HSC wird stärker reduziert als das von HTB-135 80
- Abbildung 19: Normiertes Überleben der Zelllinien HSC (rot) und HTB-135 (grün) nach 45-minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten mit Aktivitätskonzentrationen bis 428 kBq/ml; Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte des Überlebens \pm SD dar. Die Überlebenskurven entsprechen den Werten aus V.101 und V.91 (HTB-135: $\alpha=3,9$ ml/kBq* 10^3 , $k=2,3$ und HSC: $\alpha=9,8$ ml/kBq* 10^3 , $k=2,8$). Das Überleben von HTB-135 wird maximal auf 20%, das von HSC maximal auf 4% eingeschränkt. 81
- Abbildung 20: Überleben von HSC (80 Zellen/Well) nach 90minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK, blau) und mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1-AK, schwarz) in 24-Well-Platten (halblogarithmische Darstellung); Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte \pm SD (teils nur die obere eingezeichnet) dar; Die Überlebenskurven wurden aus den berechneten α - und k -Werten erstellt. ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate reduzierten das Überleben in diesen Experimenten stärker als ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugate 83
- Abbildung 21: Normiertes Überleben von HSC nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8-AK: rot) und ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1-AK: grün), Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte des normierten Überlebens \pm SD dar. Die Überlebenskurven wurden aus den berechneten α - und k -Werten erstellt. Unabhängig von dem verwendeten AK wird das Überleben durch die RI in etwa gleich stark eingeschränkt. 86
- Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung von Wells mit gleicher Klonzahl bei einer Aussaat von 40 L 929 WT Zellen/Well in 24-Well-Platten (240 Einzelwerte): Annähernde Normalverteilung mit einem Maximum der Häufigkeit bei Wells mit 17 Klonen/Well 87
- Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung von Wells mit gleicher Klonzahl bei einer Aussaat von 40 L 929 $\Delta 9$ Zellen/Well in 24-Well-Platten (192 Einzelwerte): Annähernde Normalverteilung mit einem Maximum der Häufigkeit bei Wells mit 25 Klonen/Well 88
- Abbildung 24: Normiertes Überleben von L 929 WT (schwarz) und L 929 $\Delta 9$ (blau) nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten für 90 min (bis 2.000 kBq/ml); Die Datenpunkte mit Fehlerbalken stellen alle Mittelwerte des Überlebens \pm SD dar. Die Überlebenskurven wurden für verschiedene Aktivitätskonzentrationsbereiche für beide Zelllinien an Hand der α - und k -Werte (L 929 WT: $\alpha=0,8$ und $1,5$ ml/kBq* 10^3 ; L 929 $\Delta 9$: $\alpha=4,2$ und $2,4$ ml/kBq* 10^3) erstellt. In beiden Aktivitätsbereichen (bis 400 kBq/ml und bis 2.000 kBq/ml) wird das Überleben von L 929 $\Delta 9$ durch die RI stärker eingeschränkt als von L 929 WT. 90
- Abbildung 25: Normiertes Überleben von L 929 $\Delta 9$ (blau, rot) und L 929 WT (schwarz, grün) nach 90-minütiger Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (bis 2.000 kBq/ml) in 24-Well-Platten (halblogarithmische Darstellung); Die Datenpunkte mit Balken stellen alle Mittelwerte des Überlebens \pm SD (teils nur die obere eingezeichnet) dar. Die

- Überlebenskurven repräsentieren die berechneten α - und k -Werte; ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugate reduzierten das Überleben von L 929 $\Delta 9$ stärker als von L 929 WT 91
- Abbildung 26: „tumor cure probability“ in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration für L 929 $\Delta 9$ (blau) und L 929 WT (schwarz) nach Inkubation mit bis zu 600 kBq/ml; Die Darstellung erfolgte aufgrund der berechneten Parameter α und k ($\Delta 9$: $\alpha=8,5$ ml/kBq/ml $\cdot 10^3$, $k=3,1$; WT: $\alpha=3,4$ ml/kBq/ml $\cdot 10^3$, $k=2,1$), Die „tumor cure probability“ ist für L 929 $\Delta 9$ höher als für L 929 WT bei gleichen Aktivitätskonzentrationen 94
- Abbildung 27: Metaphase-Chromosomen a: HSC ($2\cdot 10^6$ Zellen/75 cm 2) b: MDA WT ($6\cdot 10^6$ Zellen/75 cm 2); beide Metaphasen zeigen keine α -Emitter induzierten Chromatid- bzw. Chromosomenschäden 96
- Abbildung 28: Chromatidschäden vom Schweregrad A in HSC ($2\cdot 10^6$ Zellen/75 cm 2) nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten a: Chromatidbruch, b: Austauschfigur 97
- Abbildung 29: Chromatidschäden vom Schweregrad B in HSC ($2\cdot 10^6$ Zellen/75 cm 2) nach Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat: * mehrere Chromatidbrüche, \blacklozenge Austauschfigur • inkomplette Austauschfigur 98
- Abbildung 30: Trizentrisches Chromosom (Chromosomenschaden vom Schweregrad A) in MDA WT ($1,5\cdot 10^6$ Zellen/75 cm 2) nach Inkubation ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat 99
- Abbildung 31: Mehrere polyzentrische Chromosomen (Chromosomenschäden vom Schweregrad B) in MDA WT ($6\cdot 10^6$ Zellen/75 cm 2) nach Inkubation ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugat, Pfeile weisen auf Zentromere 99
- Abbildung 32: Anteil der S-Zellen in Abhängigkeit der ^{213}Bi -Aktivitätskonzentration nach Inkubation von HSC mit ^{213}Bi - $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8) bzw. ^{213}Bi - $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1); dargestellt sind die Mittelwerte der S-Zellen in % 101
- Abbildung 33: Anteil der S-Zellen bei L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT nach Behandlung mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten; dargestellt sind Mittelwerte der S-Zellen in % 103
- Abbildung 34: Berechnete Dosis der verschiedenen Zelllinien nach Inkubation mit ^{213}Bi -Immunkonjugaten in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration in klonogenen Tests; HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8); HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1); L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT jeweils behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten 106
- Abbildung 35: Berechnete Dosis der ^{213}Bi -Immunkonjugate in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration (bis zu 750 kBq/ml) zur Induktion von Chromosomenschäden mit verschiedenen Zelllinien: HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten (6H8); HSC behandelt mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 8$ -E-Cadherin-Konjugaten (7H1), HTB-135 behandelt mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten; L 929 $\Delta 9$ und L 929 WT behandelt mit ^{213}Bi -6H8-Konjugaten 107
- Abbildung 36: Überleben von HSC nach ^{137}Cs -Bestrahlung bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Abhängigkeit von der Dosis (Gy) 120
- Abbildung 37: Überleben von L 929 $\Delta 9$ nach ^{137}Cs -Bestrahlung bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Abhängigkeit von der Dosis 121
- Abbildung 38: Überleben von L 929 WT nach ^{137}Cs -Bestrahlung bzw. Inkubation mit ^{213}Bi -anti- $\Delta 9$ -E-Cadherin-Konjugaten in Abhängigkeit von der Dosis 121

Abbildung 39: L 929 WT in Kultur mit strangförmiger Zelladhärenz	125
Abbildung 40: L 929 $\Delta 9$ in Kultur mit verminderter Zelladhärenz	126
Abbildung 41: Zusammenhang zwischen Aberrationstyp und Stadium im Zellzyklus zum Bestrahlungszeitpunkt (Buckton und Evans, 1973)	130

7.4 Versuchsverzeichnis

V.-Nr.	Versuch	Zelllinie	Nuklid	Gefäß	Zellzahl	AK/Charge
1	Scatchard	L 929 Δ9	¹²⁵ I	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8
2	Scatchard	MDA Δ8	¹²⁵ I	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8
3	Scatchard	MDA Δ9	¹²⁵ I	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8
4	Scatchard	MDA Δ9	¹²⁵ I	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8
5	Scatchard	MPE-600	¹²⁵ I	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8
6	Scatchard	HSC	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/3
7	Scatchard	HSC	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
8	Scatchard	HTB-135	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/3
9	Scatchard	L 929 Δ9	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
10	Scatchard	L 929 WT	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
11	Scatchard	MDA Δ9	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
12	Scatchard	MDA Δ9	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
13	Scatchard	MDA Δ9	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/3
14	Scatchard	MDA Δ9	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/3
15	Scatchard	MDA WT	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
16	Scatchard	MDA WT	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
17	Scatchard	MPE-600	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
18	Scatchard	MPE-600	²¹³ Bi	Röhrchen	1,00*10 ⁶	6H8/2
19	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,00*10 ⁵	6H8/8
20	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	3,00*10 ⁵	6H8/8
21	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/8
22	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,90*10 ⁵	6H8/8
23	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/8
24	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,10*10 ⁵	6H8/8
25	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,83*10 ⁵	6H8/9
26	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,05*10 ⁵	6H8/9
27	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,04*10 ⁵	6H8/9
28	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,10*10 ⁵	6H8/9
29	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
30	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
31	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,29*10 ⁵	6H8/3
32	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,34*10 ⁵	6H8/3
33	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,08*10 ⁵	6H8/3
34	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,25*10 ⁵	6H8/3
35	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HTB-135	¹¹¹ In	24-Well-Platte	8,00*10 ⁴	6H8/3
36	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,25*10 ⁵	6H8/3
37	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,32*10 ⁵	6H8/3
38	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,25*10 ⁵	6H8/3
39	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,85*10 ⁵	6H8/3
40	Bindungs-und Internalisierungskinetik	MDA Δ9	¹²⁵ I	Röhrchen	1,20*10 ⁷	6H8/8unchel.
41	Bindungs-und Internalisierungskinetik	MDA WT	¹²⁵ I	Röhrchen	1,60*10 ⁷	6H8/8unchel.
42	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹²⁵ I	Röhrchen	2,20*10 ⁷	6H8/8unchel.
43	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹²⁵ I	Röhrchen	1,90*10 ⁷	6H8/8unchel.
44	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	Röhrchen	9,50*10 ⁶	6H8
45	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,13*10 ⁵	6H8/8
46	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	3,30*10 ⁵	6H8/8
47	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,76*10 ⁵	6H8/8
48	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	3,00*10 ⁵	6H8/8
49	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	3,00*10 ⁵	6H8/8
50	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,96*10 ⁵	6H8/9
51	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
52	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
53	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	3,07*10 ⁵	6H8/9

V.-Nr.	Versuch	Zelllinie	Nuklid	Gefäß	Zellzahl	AK/ Charge
54	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HTB-135	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,08*10 ⁵	6H8/9
55	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
56	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
57	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HSC	¹¹¹ In	24-Well-Platte	2,70*10 ⁵	6H8/9
58	Bindungs-und Internalisierungskinetik	HTB-135	¹¹¹ In	24-Well-Platte	1,00*10 ⁵	6H8/9
59	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 Δ9	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
60	Bindungs-und Internalisierungskinetik	L 929 WT	¹¹¹ In	24-Well-Platte	4,00*10 ⁵	6H8/9
63	¹³⁷ Cs-Bestrahlung	HSC		25 cm ² -Flasche	1000-100000	
64	¹³⁷ Cs-Bestrahlung	HTB-135		25 cm ² -Flasche	5000-500000	
65	¹³⁷ Cs-Bestrahlung	L 929 Δ9		25 cm ² -Flasche	200-20000	
66	¹³⁷ Cs-Bestrahlung	L 929 Δ9		25 cm ² -Flasche	5000-500000	
67	¹³⁷ Cs-Bestrahlung	L 929 WT		25 cm ² -Flasche	200-20000	
68	¹³⁷ Cs-Bestrahlung	HSC		25 cm ² -Flasche	700-70000	
69	¹³⁷ Cs-Bestrahlung	L 929 WT		25 cm ² -Flasche	180-18000	
72	Klonogener Test	L 929 Δ9	¹²⁵ I	24-Well-Platte	10	6H8/1
73	Klonogener Test	L 929 WT	¹²⁵ I	24-Well-Platte	10	6H8/1
74	Klonogener Test	MPE-600	²¹³ Bi	96-Well-Platte	50	6H8/1
74	Klonogener Test	MPE-600	²¹³ Bi	96-Well-Platte	100	6H8/1
75	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	96-Well-Platte	20	6H8/1
75	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	96-Well-Platte	200	6H8/1
75	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	96-Well-Platte	20	6H8/1
75	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	96-Well-Platte	200	6H8/1
76	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	96-Well-Platte	50	6H8/1
76	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	96-Well-Platte	100	6H8/1
76	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	96-Well-Platte	50	6H8/1
76	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	96-Well-Platte	100	6H8/1
77	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	96-Well-Platte	150	6H8/3
78	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	96-Well-Platte	70	6H8/3
80	Klonogener Test	MPE-600	²¹³ Bi	24-Well-Platte	10	7H1/5
80	Klonogener Test	MPE-600	²¹³ Bi	24-Well-Platte	20	7H1/5
80	Klonogener Test	MPE-600	²¹³ Bi	24-Well-Platte	10	7H1/5
80	Klonogener Test	MPE-600	²¹³ Bi	24-Well-Platte	20	7H1/5
81	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	180	6H8/3
82	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	120	6H8/3
83	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	400	6H8/3
84	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	400	6H8/3
85	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	300	6H8/3
86	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	300	6H8/3
87	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
88	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
89	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
90	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
91	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
92	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	200	6H8/3
93	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	400	6H8/3
94	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	20	6H8/3
95	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	20	6H8/3
96	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
97	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
98	Klonogener Test	HTB-135	²¹³ Bi	24-Well-Platte	600	6H8/3
99	Klonogener Test	HTB-135	²¹³ Bi	24-Well-Platte	300	6H8/3
100	Klonogener Test	HTB-135	²¹³ Bi	24-Well-Platte	500	6H8/3
101	Klonogener Test	HTB-135	²¹³ Bi	24-Well-Platte	500	6H8/3

V.-Nr.	Versuch	Zelllinie	Nuklid	Gefäß	Zellzahl	AK/ Charge
102	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	200	6H8/3
103	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	180	6H8/3
104	Klonogener Test	MDA- WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	200	6H8/3
105	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	120	6H8/3
106	Klonogener Test	MDA Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	400	6H8/3
107	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/4
108	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/4
109	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/4
110	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	7H1/6
111	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	7H1/6
112	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	7H1/6
113	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
114	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
115	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
116	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	6H8/3
117	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	7H1/7
118	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	7H1/7
119	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	7H1/7
120	Klonogener Test	HSC	²¹³ Bi	24-Well-Platte	80	7H1/7
121	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	37,5	6H8/4
122	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/4
123	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/4
124	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
125	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
126	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
127	Klonogener Test	L 929 Δ9	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
128	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	37,5	6H8/4
129	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/4
130	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/4
131	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
132	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
133	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
134	Klonogener Test	L 929 WT	²¹³ Bi	24-Well-Platte	40	6H8/3
136	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	HSC	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/3
137	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	HSC	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	1,60*10 ⁶	6H8/4
138	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	HSC	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/4
139	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	HSC	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	1,60*10 ⁶	7H1/6
140	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	HSC	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	7H1/6
141	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	HSC	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	7H1/7
142	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	HTB-135	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	6,46*10 ⁶	6H8/3
143	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 Δ9	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	1,50*10 ⁶	6H8/3
144	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 Δ9	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	6,00*10 ⁶	6H8/3
145	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 Δ9	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/3
146	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 Δ9	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/3
147	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 WT	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	1,50*10 ⁶	6H8/3
148	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 WT	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	6,00*10 ⁶	6H8/3
149	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 WT	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/3
150	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	L 929 WT	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/3
151	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	MDA Δ9	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	1,50*10 ⁶	6H8/3
152	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	MDA Δ9	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	6,00*10 ⁶	6H8/3
153	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	MDA Δ9	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/3
154	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	MDA WT	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	1,50*10 ⁶	6H8/3
155	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	MDA WT	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	6,00*10 ⁶	6H8/3
156	Untersuchung der Chr.-Aberrationen	MDA WT	²¹³ Bi	75-cm ² -Flasche	2,00*10 ⁶	6H8/3

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Nuklearmedizin der Technischen Universität München unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke durchgeführt.

Für die Einführung in den Umgang mit Zellkulturen und Handhabung der radioaktiven Stoffe danke ich Frau Stephanie Alam ebenso wie Herrn Dr. Christof Seidl.

Herr Jörg Mages hat bei der Durchführung der FACS-Analyse am Institut für Pathologie der TUM unter der Leitung von Herrn Dr. Karl-Friedrich Becker mitgeholfen, dafür sei beiden gedankt.

Herr PD Dr. Dr. med. habil. Johann Kummermehr ermöglichte die Bestrahlung der Zellen mit ^{137}Cs an der GSF in Neuherberg und half bei der Auswertung der gewonnenen Daten. Ich möchte ihm meinen großen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Ernst Schmid möchte ich für die Auswertung der Chromosomenaberrationen danken, seine technische Assistentin Fr. Haney erstellte die Chromosomenpräparate, ihr sei ebenfalls gedankt.

Die Markierung von MAK mit ^{125}I wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Reidel und Herrn Dr. Haubner durchgeführt, ihnen sei ebenso gedankt.

Die Erstellung eines Modells zur Dosimetrie wurde von Herrn Dr. rer. nat. Hartmut Roos der Ludwig-Maximilians-Universität München maßgeblich beeinflusst. Wichtige Überlegungen wurden gemeinsam mit Herrn Ingo Wolf zur Dosimetrie angestellt.

Die statistischen Auswertungen wurden gemeinsam mit Dr. Raymonde Busch durchgeführt.

Den allergrößten Anteil am Fortgang und Gelingen der Arbeit hatten meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke und mein Betreuer Herr Dr. Christof Seidl. Die geduldige Unterstützung und die wertvollen Verbesserungsvorschläge haben die Arbeit positiv beeinflusst. Dafür möchte ich beiden sehr herzlich danken.