

# **Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factor C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Lucia Danny Beissel**

aus Bad Honnef

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Michael Muders
2. Gutachter: Prof. Dr. Guido Hartmut Fechner

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.02.2024

Aus dem Institut für Pathologie in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für  
Nuklearmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen/Prof. Dr. med. Markus Essler

**Für meine lieben Eltern,  
für meinen Freund Patrick  
&  
für meine Großmutter Elvira**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>14</b>
1.1 Allgemeiner Kontext .....	14
1.2 Das Prostatakarzinom .....	14
1.2.1 Epidemiologie .....	14
1.2.2 Pathogenese .....	15
1.2.3 Morphologie .....	17
1.2.4 Ausbreitung und Metastasierung .....	17
1.2.5 Prostataspezifisches Antigen .....	18
1.2.6 Therapie .....	18
1.3 <sup>177</sup> Lu-PSMA-Therapie .....	20
1.3.1 Allgemeine Prinzipien und Ablauf .....	20
1.3.2 Effektivität .....	22
1.3.3 Nebenwirkungen .....	23
1.4 VEGF-C und seine Rezeptoren .....	24
1.4.1 Struktur .....	24
1.4.2 VEGF-C Signalübertragung .....	25
1.4.3 VEGF-C und seinen Rezeptoren im maligne entarteten Gewebe .....	28
1.4.4 VEGF-C und VEGF-C induzierte Signalwege im Kontext von Stress und Bestrahlung .....	28
1.5 Hintergrundwissen zu ionisierender Strahlung und deren Wirkung auf Zellen ..	30
1.5.1 Ionisierende Strahlung .....	30
1.5.2 DNA-Schädigung durch Strahlung und Reparaturmechanismen .....	31
1.5.3 Bestrahlung und Zellzyklus .....	32

1.5.4	Strahleninduzierter Zelltod.....	33
1.5.5	Zellüberlebenskurve .....	34
1.6	Fragestellung und Zielsetzung .....	36
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.1	Material.....	38
2.1.1	Zelllinien .....	38
2.1.2	Kits .....	38
2.1.3	Chemikalien.....	38
2.1.4	Verbrauchsmaterial .....	40
2.1.5	siRNA .....	43
2.1.6	Primer.....	43
2.1.7	Geräte .....	44
2.1.8	Software .....	46
2.2	Methoden .....	46
2.2.1	Zellkulturbedingungen .....	46
2.2.2	Auftauen von Zellen.....	46
2.2.3	Passagieren von Zellen .....	47
2.2.4	Kryokonservierung von Zellen .....	48
2.2.5	Zellzahlbestimmungen.....	48
2.2.6	siRNA Transfektion (VEGF-C Knockdown) .....	49
2.2.7	Behandlung von LNCaP C4-2b Zellen mit rhVEGF-C .....	50
2.2.8	RNA-Isolation und RNA-Konzentrationsbestimmung .....	51
2.2.9	cDNA-Synthese.....	52
2.2.10	qRT-PCR.....	53
2.2.11	Betabestrahlung von Zellen.....	54
2.2.12	Zellzyklusanalyse .....	55

2.2.13	Koloniebildungsassay.....	56
2.2.14	Viabilitätsassay.....	59
2.2.15	Statistik.....	60
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>62</b>
3.1	PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen: VEGF-C/VEGFR-2/VEGFR-3 Expression.....	62
3.2	Einfluss von VEGF-C auf den Zellzyklus.....	63
3.2.1	Zellzyklusanalyse mit PC-3 Zellen.....	64
3.2.2	Zellzyklusanalyse mit LNCaP C4-2b Zellen.....	64
3.3	Einfluss von Lutetium-177 auf PC-3, LNCaP C42b und LNCaP Zellen.....	68
3.3.1	Anwachsen der verschiedenen Zellen unter den Versuchsbedingungen des Viabilitätsassays.....	68
3.3.2	Kurzzeiteffekte der Bestrahlung mit Lutetium-177.....	69
3.3.3	Langzeiteffekte der Bestrahlung mit Lutetium-177.....	77
3.4	Einfluss des VEGF-C Knockdowns/der rhVEGF-C Behandlung auf die Versuchsbedingungen.....	81
3.5	Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177.....	83
3.5.1	PC-3 Zellen.....	84
3.5.2	LNCaP C4-2b Zellen.....	85
3.6	Fazit/Zusammenfassung des Ergebnisteils.....	89
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
4.1	Zellzyklusanalyse.....	90
4.1.1	G2/M-Phase.....	90
4.1.2	G1-Phase und S-Phase.....	91
4.1.3	Zelllinienabhängigkeit und VEGFR-2 Expression.....	92
4.1.4	Fazit Zellzyklusanalyse.....	93

4.2	Kurzzeiteffekte der Betabestahlung an unbehandelten Zellen .....	94
4.2.1	Maximaler Effekt der Bestahlung.....	94
4.2.2	Auswirkung höherer Aktivitäten .....	95
4.2.3	Verlust der mitotischen Aktivität.....	96
4.2.4	Strahlensensibilität im Vergleich.....	97
4.2.5	Viabilität.....	98
4.3	Langzeiteffekte der Betabestahlung an unbehandelten Zellen.....	99
4.3.1	LNCaP und LNCaP C4-2b Zellen.....	99
4.3.2	PC-3 Zellen .....	99
4.3.3	Strahlenhormesis.....	100
4.3.4	Low dose Hyperradiosensitivity .....	100
4.3.5	Gibt das LQ-Modell die Daten passend wieder? .....	102
4.3.6	Die Wahl des Aktivitätsbereichs .....	105
4.4	Untersuchung des Einflusses von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestahlung .....	105
4.4.1	Methodik.....	106
4.4.2	Strahlensensibilität und VEGF-C.....	109
4.4.3	Offene Fragen und mögliche Erklärungsansätze .....	111
4.4.4	VEGFR-2, VEGFR-3 und NRP-2.....	111
4.4.5	VEGF-C Translation durch Bestahlung und allgemein.....	113
4.4.6	Autophagie .....	114
4.4.7	Wie steht es um VEGF-C als potenziellen prädiktiven Marker für die <sup>177</sup> Lu-PSMA- Therapie? .....	115
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>117</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>119</b>

<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>135</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Lungenkarzinomzelllinie
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated</i>
Bad	<i>bcl-2-antagonist of cell death</i>
Bax	<i>bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2</i>
c	Konzentration
caspase	<i>cysteiny-l-aspartate specific protease</i>
CD163	<i>cluster of differentiation 163</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CNE-2	humane Nasopharynxkarzinomzelllinie
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i>
c-terminal	carboxyterminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGN	Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOTA	<i>dodecane tetraacetic acid</i> , Dodekan-Tetraessigsäure
DU145	humane Prostatakarzinomzelllinie
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	<i>ETS-related gene</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ETS	<i>erythroblast transformation specific</i>

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FLT4	<i>fms-related tyrosine kinase 4</i> = VEGFR-3
FOXO1	<i>forkhead-box-protein O1</i>
FOXO3 (= FKHRL1)	<i>forkhead-box-protein O3</i>
FW	<i>forward</i> , vorwärts
GSK $\beta$	<i>glycogen synthase kinase <math>\beta</math></i>
HDR-Brachytherapie	High-Dose-Rate Brachytherapie
Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIFU	hochintensiver fokussierter Ultraschall
HRS	<i>hyperradiosensitivity</i>
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IGRT	<i>image guided radiotherapy</i> , bildgeführte Strahlentherapie
IRR	<i>induced radioresistance</i>
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i> = VEGFR-2
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LD50	letale Dosis 50 %
LDR-Brachytherapie	Low-Dose-Rate-Brachytherapie
LET	Linearer Energietransfer
LNCaP	humane Prostatakarzinomzelllinie
LNCaP C4-2b	humane Prostatakarzinomzelllinie
LQ-Modell	linear-quadratisches Modell
mHSPC	metastasiertes, hormonsensitives Prostatakarzinom
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
MW	Mittelwert
NF- $\kappa$ b	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'</i> of activated B cells
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NK	Negativkontrolle

NRP	Neuropilin
N-terminal	den Amino-Terminus betreffend
OC-k3	cochleäre Zelllinie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC-3	humane Prostatakarzinomzelllinie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Plattierungseffizienz
PET/CT	Positronen-Emissions- Tomographie/Computertomographie
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSMA	<i>Prostate-specific membrane antigen</i> , prostataspezifisches Membranantigen
PSMA I&T	<i>prostate-specific membrane antigen for imaging &amp; therapy</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR (qPCR)	<i>quantitative real-time PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
Rb	Retinoblastom-Protein
rhVEGF-C	<i>recombinant human vascular endothelial growth factor-C</i> , rekombinantes humanes VEGF-C
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RSK	<i>ribosomal s6 kinase</i>
RV	<i>reverse</i> , rückwärts
SD	Standardabweichung
SF	<i>surviving fraction</i> , Überlebensfraktion
siRNA	small interfering RNA
siSCR	<i>scrambled small interfering ribonucleic acid</i>
siVEGF-C	siRNA gegen VEGF-C
Tab.	Tabelle

TNM	Akronym aus „Tumor“, „Nodus“, „Metastasen“ und Klassifikation zum Staging von Tumoren
TMPRSS2	<i>transmembrane protease serine subtype 2</i>
UKB	Universitätsklinikum Bonn
UKD	Universitätsklinikum Dresden
U-251 MG	humane Glioblastomzelllinie
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-C	<i>vascular endothelial growth factor C</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
VEGFR-3	<i>vascular endothelial growth factor receptor-3</i>
WST-1 Assay	<i>water-soluble tetrazolium 1 assay</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung g (1 xg $\approx$ 9,81 m/s <sup>2</sup> )
XRCC4	<i>x-ray repair cross complementing 4</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeiner Kontext

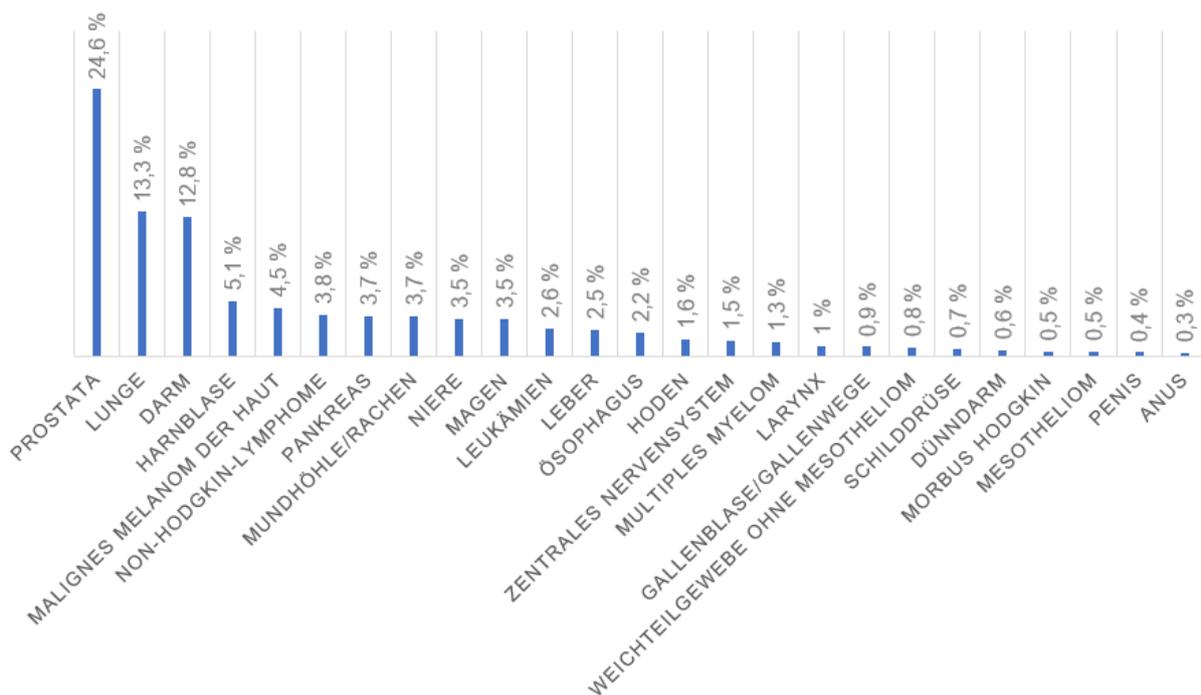
Das Prostatakarzinom stellt in Deutschland den häufigsten malignen Tumor bei Männern dar (Robert Koch-Institut, 2021). Insbesondere das metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinom ist hochmaligne und kann nach Ausschöpfen der herkömmlichen Therapieoptionen im Zuge einer sog. „*Last-Line-Indikation*“ mit dem noch experimentellen Therapieansatz der  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Therapie behandelt werden (Ahmadzadehfar et al., 2015; Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., 2021; Fendler et al., 2017; Kratochwil et al., 2015). Der Betastrahler Lutetium-177 wird dabei an einen Liganden des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) gekoppelt (z. B. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617), welches von den Prostatakarzinomzellen exprimiert und nach Ligandenbindung internalisiert wird, sodass ein hochpräzises Bestrahlen der Tumorzellen ermöglicht wird (Hartrampf et al., 2022; Kratochwil et al., 2015). Aufgrund ihrer hohen Effektivität erhielt die  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Therapie im Sommer 2021 eine *Breakthrough Therapy Designation* und im März 2022 die Zulassung durch die *U.S. Food and Drug Administration*, sodass sie immer mehr an Stellenwert gewinnen wird (Sartor et al., 2021). Noch immer sprechen jedoch bis zu 30 % aller Patienten aus bisher ungeklärten Gründen nicht auf die Therapie an (Ahmadzadehfar et al., 2017). Frühere Daten aus PD Dr. med. Michael Muders' Labor zeigten, dass der lymphangiogenetische Wachstumsfaktor *Vascular Endothelial Growth Factor C* (VEGF-C) im Zusammenhang mit Röntgenbestrahlung Bestrahlungsresistenz durch antiapoptotische Signalwege und Autophagie hervorrufen kann, sodass sich mit Blick auf die  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Therapie die klinisch relevante Frage stellt, welchen Einfluss VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 hat (Liebscher, 2017).

## 1.2 Das Prostatakarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist hierzulande die häufigste maligne Neuerkrankung bei Männern und macht 24,6 % aller Krebsneuerkrankungen beim Mann aus (s. Abb. 1) (Riede et al.,

2004; Robert Koch-Institut, 2021). Zusätzlich stellt das Prostatakarzinom mit 12,0 % die zweithäufigste Ursache der Krebssterbefälle bei deutschen Männern dar und ist damit hochrelevant. In Deutschland zählt man jährlich mehr als 65 000 Neuerkrankungen (Stand 2018), wobei das mittlere Erkrankungsalter um das 70. Lebensjahr liegt (Robert Koch-Institut, 2021).



**Abb. 1:** Lokalisation von Tumorerkrankungen bei Männern in Deutschland

Anteil der häufigsten Lokalisation von Tumorerkrankungen an allen Krebsneuerkrankungen bei Männern in Deutschland 2018, ohne nicht-melanotischen Hautkrebs. Modifiziert nach Robert Koch-Institut (2021).

### 1.2.2 Pathogenese

Die Pathogenese des Prostatakarzinoms ist vielschichtig: Bedeutend sind nicht nur hormonelle und genetische Faktoren, sondern auch Ernährungsgewohnheiten (Hammes et al., 2015). Die molekulare Pathogenese erfolgt in mehreren Stufen, in denen es zu Genverlusten, Genzugewinnen und Mutationen kommt (Riede et al., 2004). Wichtige Genläsionen sind z. B. die Überexpression des Proliferationsfaktors c-myc, des Apoptose-

Suppressorgens *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) oder auch eine *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2/neu = *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2* = ERBB2) Überexpression (Böcker et al., 2004; Riede et al., 2004; Williams et al., 2005). Eine Her2/neu Überexpression kann beispielsweise eine ligandenunabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors verursachen und somit zu einem Übergang in ein hormonrefraktäres Stadium des Prostatakarzinoms führen (Chen et al., 2004; Craft et al., 1999).

Für die Pathogenese des Prostatakarzinoms wichtige Allelverluste betreffen die Chromosomen 1p, 8p, 10q und 16q (Riede et al., 2004): Hierdurch werden Tumorsuppressor- und Differenzierungsgene beschädigt/deletiert (Böcker et al., 2004; Riede et al., 2004). Weiterhin sind Androgenrezeptormutationen von Bedeutung, wobei nicht alle Prostatakarzinome eine entsprechende Mutation aufweisen (Böcker et al., 2004; Hu et al., 2010). Eine Mutation in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Androgenrezeptors kann dazu führen, dass u. a. Östrogene oder Antiandrogene an den Rezeptor binden und wie Agonisten eine stimulierende Rezeptorantwort auslösen (Chen et al., 2004; Veldscholte et al., 1990). Insbesondere für das kastrationsresistente Prostatakarzinom spielen Androgenrezeptormutationen eine wichtige Rolle (Grasso et al., 2012; Schrecengost und Knudsen, 2013). Auch Androgenrezeptorspleißvarianten sind für die Pathogenese des Prostatakarzinoms bedeutend: AR-V7 beispielsweise ist eine der bekanntesten Spleißvarianten und mit der Entwicklung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms assoziiert (Qu et al., 2015).

Weiterhin spielt die Fusion zwischen dem androgenregulierten Gen *transmembrane protease serine subtype 2* (TMPRSS2) und Mitgliedern der *erythroblast transformatioin specific* (ETS) Transkriptionsfaktorfamilie eine bedeutende Rolle für das Prostatakarzinom (Tomlins et al., 2005). Die TMPRSS2:ERG (ERG = *ETS-related gene*) Fusion z. B. ist mit einem aggressiveren Phänotyp assoziiert (Borkowetz et al., 2020; Demichelis et al., 2007).

Abgesehen davon spielt ein PTEN-Verlust, ebenso wie auch ein Verlust der Retinoblastom-Protein (Rb) Expression oder Rb-Aktivität, auch eine Rolle bei der Entstehung des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (Schrecengost und Knudsen, 2013; Sharma et al., 2010). Mutiertes TP53 ist sowohl mit dem metastasierten

kastrationsresistenten als auch mit dem kastrationsnaiven Prostatakarzinom assoziiert und kann auch in primärem Prostatakrebs nachgewiesen werden (Teroerde et al., 2021).

### 1.2.3 Morphologie

Makroskopisch präsentiert sich das Prostatakarzinom als scharf begrenzte gelb-gräuliche derbe Herde (Böcker et al., 2004; Riede et al., 2004). Es nimmt seinen Ursprung meist in der peripheren, androgenabhängigen Zone und breitet sich von dort aus nach zentral oder in Richtung Kapsel aus (oder beides) (Böcker et al., 2004). Man unterscheidet jeweils hochdifferenzierte und wenig differenzierte glanduläre, kribriforme oder solide Karzinome (Riede et al., 2004). Mit zunehmender Karzinomgröße nimmt auch die Häufigkeit verschiedener histologischer Muster in einem Karzinom zu und man spricht von einem pluriformen Karzinom (Böcker et al., 2004; Riede et al., 2004). In weit über 90 % der Fälle liegt das Prostatakarzinom als Adenokarzinom vor. Nichtsdestotrotz sind auch histologische Sonderformen wie z. B. das Plattenepithelkarzinom oder das Urothelkarzinom bekannt (Riede et al., 2004). Zur Graduierung des Prostatakarzinoms wird der durch die *ISUP* überarbeitete Gleason-Score verwendet. Hierzu wird die Drüsenmorphologie des Prostatakarzinomgewebes histologisch beurteilt, wobei ein höherer ISUP-Score eine höhere Entartung bedeutet (Srigley et al., 2016). Insgesamt gibt es fünf Gleason-Grade, wobei die Differenzierung von Grad 1 bis Grad 5 abnimmt (Böcker et al., 2004; Riede et al., 2004). Der Gleason-Score setzt sich bei der Prostatastanzbiopsie aus dem häufigsten und dem am schlechtesten differenzierten Gleason-Grad zusammen (Epstein et al., 2016). Für das Prostataektomiepräparat werden der häufigste und der zweithäufigste Gleason-Grad betrachtet. Die Gleason-Scores können den verschiedenen ISUP-Scores zugeordnet werden (Srigley et al., 2016).

### 1.2.4 Ausbreitung und Metastasierung

Das Prostatakarzinom breitet sich zunächst intraprostatisch aus. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Infiltration der benachbarten Organe wie Samenblasen, Harnblase und Rektum. Dabei dienen die in der Prostatakapsel befindlichen Nerven häufig als Leitstrukturen.

Lymphogen metastasiert das Prostatakarzinom in die retroperitonealen Lymphknoten. Eine hämatogene Metastasierung erfolgt retrograd über den prävertebralen Venenplexus in die Wirbelsäule, das Femur und die Beckenknochen. Der Großteil der Knochenmetastasen ist vom osteoblastischen Typ (Böcker et al., 2004). Die häufigste Lokalisation für Metastasen sind die Knochen (84,4 %), gefolgt von Lymphknoten (10,6 %), Leber (10,2 %), Thorax (9,1 %) und Gehirn (3,1 %) (Gandaglia et al., 2014).

#### 1.2.5 Prostataspezifisches Antigen

Die Prostatakarzinomzellen sezernieren ebenso wie das gesunde Prostataepithel das prostataspezifische Antigen (PSA). PSA ist eine Serin-Protease, die das Ejakulat verflüssigt und kann laborchemisch nach einer Blutentnahme bestimmt werden, da es bei Zerstörung der normalen Prostatastruktur ins Serum diffundiert. Ursächlich für die erhöhten PSA-Werte beim Prostatakarzinom sind zum einen die Zerstörung der Prostatastruktur und zum anderen die erhöhte Anzahl maligne veränderter Zellen (Böcker et al., 2004). PSA kann somit als Biomarker für das Prostatakarzinom verwendet werden. Als malignomsuspekt gelten z. B. ein Gesamt-PSA > 4 ng/ml oder auch ein PSA-Anstieg von > 0,35-0,75 ng/ml pro Jahr (Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., 2021).

#### 1.2.6 Therapie

Der folgende Abschnitt gibt, sofern nicht anders gekennzeichnet, die Therapiestandards für das Prostatakarzinom gemäß der aktuellen S3-Leitlinie (Stand 2021) als Überblick wieder. Es wird sich hierbei auf die für das Grundverständnis und für das Thema der vorliegenden Dissertation wichtigsten Therapieverfahren beschränkt.

Für die Therapie des Prostatakarzinoms bedeutend ist eine Unterscheidung zwischen einem nicht-metastasierten und einem metastasierten Prostatakarzinom. Für das nicht-metastasierte Prostatakarzinom existieren zwei gleichwertige kurative Therapieansätze: Zum einen die radikale Prostatektomie und zum anderen die perkutane Strahlentherapie im Sinne einer bildgesteuerten Strahlentherapie („*image guided radiotherapy*“, „IGRT“). Je nach Befund und Risikoeinstufung werden weitere Therapiemaßnahmen (beispielsweise Lymphadenektomie) ergänzt. Je nach Tumorbefund, Alter, Komorbidität

und individuellem Patientenwunsch besteht außerdem die Möglichkeit einer sog. „*Active Surveillance*“, bei der zunächst engmaschige Kontrollen erfolgen und der Beginn der kurativen Therapie möglichst weit hinausgezögert wird. Dieser Ansatz kommt vor allem für Patienten mit lokal begrenztem Befund und geringer Risikoeinstufung infrage. Das sog. „*Watchful Waiting*“ wiederum beinhaltet ein palliatives Konzept, bei dem ein kurativer Ansatz, obwohl er möglich wäre, nicht verfolgt wird. Dies kann insbesondere bei Patienten mit einer unabhängig vom Prostatakarzinom bestehenden eingeschränkten Lebenserwartung erwogen werden oder wenn ein kurativer Ansatz nicht gewünscht oder möglich ist (Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., 2021).

Für die Therapie eines hormonsensitiven, metastasierten Prostatakarzinoms (mHSPC) stehen Patienten mit gutem Allgemeinzustand (ECOG Status 0-1) die Kombination aus Androgendeprivation und Hormontherapie bzw. Chemotherapie mit Docetaxel zur Verfügung. Patienten, die keine Kombinationstherapie erhalten können, sollen eine Androgendeprivation erhalten (Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., 2021). Nichtsdestotrotz sprechen nicht alle Patienten auf eine derartige kastrative Therapie an. Im Laufe einer Hormontherapie können Therapieresistenzen entstehen, sodass ein Wechsel auf therapeutische Maßnahmen für das androgenunabhängige oder kastrationsresistente Prostatakarzinom notwendig werden (Saraon et al., 2014). Hier kommen je nach Befund in erster Linie Abirateron plus Prednison/Prednisolon, Docetaxel und Enzalutamid zur Anwendung. Außerdem stehen ergänzend symptomorientierte und supportive Maßnahmen zur Verfügung. Bei Knochenmetastasen kann nach Indikationsstellung z. B. eine lokale perkutane Bestrahlung oder auch eine Therapie mit Radium-223, Bisphosphonat oder Denosumab durchgeführt werden. Nach Therapieversagen mit Docetaxel wird für Patienten mit gutem Allgemeinzustand von einer Zweitlinientherapie mit entweder Abirateron plus Steroid, Cabazitaxel, Enzalutamid oder unter bestimmten Voraussetzungen Radium-223 Gebrauch gemacht, die mit supportiven und symptomatischen Therapiemaßnahmen kombiniert werden kann. Für Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand stehen in Ergänzung zu der symptomatischen Therapie Abirateron plus Prednison/Prednisolon, Chemotherapie, Enzalutamid oder Steroide zur Verfügung (Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., 2021). Sind alle Therapieoptionen ausgeschöpft kann den Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem und progredientem Prostatakarzinom, die sich in einem guten Allgemeinzustand befinden, die

<sup>177</sup>Lu-PSMA-Therapie angeboten werden, die im März 2022 durch die *U.S. Food and Drug Administration* zugelassen wurde und im Oktober 2022 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur genehmigt wurde (Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., 2021; Novartis, 2022a, 2022b).

### 1.3 <sup>177</sup>Lu-PSMA-Therapie

#### 1.3.1 Allgemeine Prinzipien und Ablauf

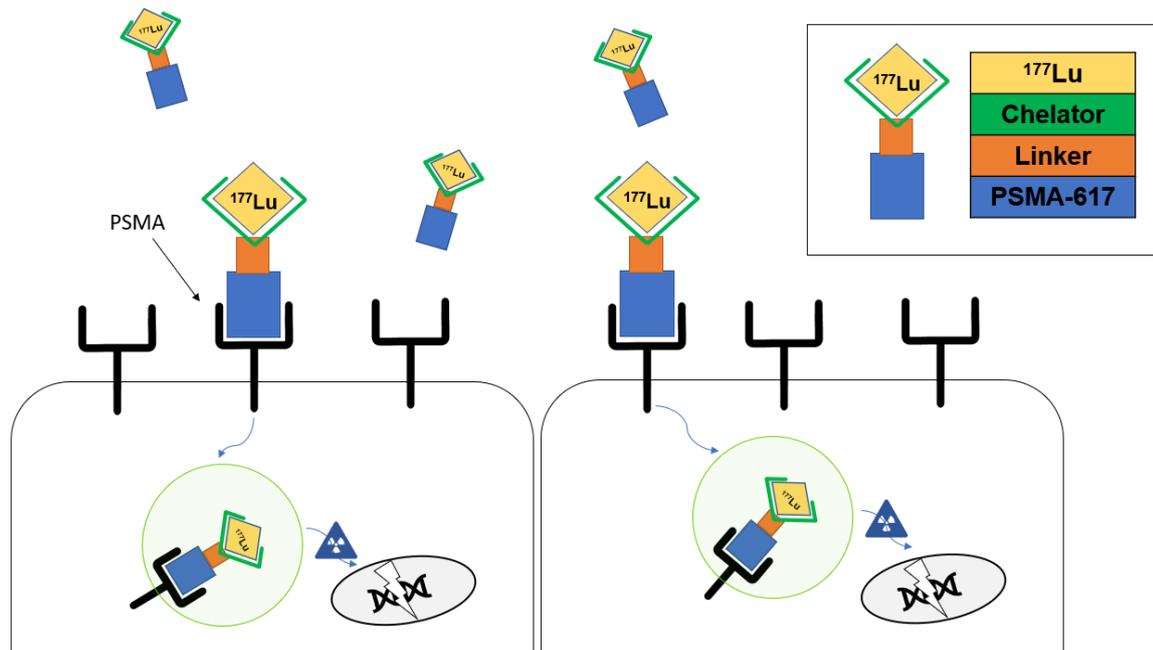
Bei Lutetium-177 handelt es sich um einen Betastrahler mittlerer Energie (490 keV), der eine maximale Energie von 0,5 MeV aufweist. Die maximale Reichweite im Gewebe beträgt weniger als zwei Millimeter. Neben Betastrahlen werden auch niedrig-energetische Gammastrahlen von 208 und 113 keV emittiert (Ranjan, 2020; Assadi et al., 2020; Emmett et al., 2017). Die Halbwertszeit liegt bei 6,73 Tagen (Emmett et al., 2017).

In Form von [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> wird Lutetium-177 an einen auf Harnstoff basierenden PSMA-Liganden gekoppelt (Ahmadzadehfar et al., 2015; Kratochwil et al., 2015). PSMA ist ein Typ-II-Transmembranglykoprotein und wird von den Prostatakarzinomzellen im Vergleich zum Normalgewebe tausendfach mehr exprimiert, wobei das hohe Expressionsniveau auch im Laufe von Therapien unverändert bleibt (Emmett et al., 2017; Fendler et al., 2017; Israeli et al., 1993; Kratochwil et al., 2015; Wright et al., 1995). Sobald der Ligand bindet, erfolgt eine Clathrin-vermittelte Endozytose. Ein gezieltes Bestrahlen der Tumorzellen, insbesondere auch der Metastasen, wird so ermöglicht (s. Abb. 2) (Fendler et al., 2017; Liu et al., 1998; Rajasekaran et al., 2003).

Unter den verschiedenen Liganden ist das PSMA-617 am besten erforscht und auch in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Bonn (UKB) wurde entsprechend [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 verwendet (Kuo et al., 2018; Rahbar et al., 2017; Yordanova et al., 2019). Ein anderer Ligand, das *prostate-specific membrane antigen for imaging and therapy* (PSMA I&T), ist weitestgehend gleichwertig zu PSMA-617 (Fendler et al., 2017). Im Vergleich zu dem monoklonalen Antikörper [<sup>177</sup>Lu]Lu-J591 sind oben genannte Liganden aufgrund eines weniger gravierenden Nebenwirkungsprofils sicherer und gleichzeitig auch wirksamer (Eyben et al., 2018).

Der Beschluss zur  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Therapie erfolgt im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz, wenn alle herkömmlichen Therapieoptionen ausgeschöpft sind und der Patient gewisse klinische Kriterien erfüllt, die den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN) entsprechen (Ahmadzadehfar et al., 2018; Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (Hrsg.), 2016). Da eine Therapie nur bei Vorhandensein einer ausreichenden PSMA Expression des Tumors sinnvoll ist, wird zunächst zur Diagnostik bzw. Indikationsstellung ein  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-PET/CT durchgeführt (Ahmadzadehfar et al., 2018; Emmett et al., 2017). Am UKB erfolgt außerdem eine Nierenfunktionsszintigraphie (MAG3), um eine obstruktive Harnabflussstörung auszuschließen (Nuklearmedizin UKB Bonn, 03.07.2022). Bei PSMA-positiven Patienten wird das Therapeutikum langsam innerhalb von 30-60 s intravenös appliziert. Anschließend erfolgt eine Infusion von einem Liter isotonischer Natriumchlorid oder Ringer-Lösung (Ahmadzadehfar et al., 2017). Je nach Patient kann eine supportive Medikation mit Diuretika oder Laxantien sinnvoll sein, um eine rasche Eliminierung des überschüssigen Radionuklids zu bewirken und auch Antiemetika oder Corticosteroide können unter Umständen verabreicht werden (Fendler et al., 2017). Außerdem werden die Speicheldrüsen etwa eine halbe Stunde vor Therapiebeginn mit Kühllakus gekühlt, um die Durchblutung zu vermindern und somit dort die Anreicherung des Radionuklids zu minimieren. Diese Kühlung kann bis zu vier Stunden lang nach Verabreichung des Radionuklids erfolgen. Vor der Entlassung des Patienten wird außerdem eine  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Aufnahme angefertigt und die Verteilung des *Tracers* im Körper dargestellt (Nuklearmedizin UKB Bonn, 03.07.2022). 48 h nach der Therapie können die Patienten entlassen werden (Ahmadzadehfar et al., 2017).

Die Therapie setzt sich in der Regel aus mehreren Zyklen zusammen. Die letztlich durchgeführte Anzahl an Zyklen richtet sich individuell nach dem Patienten (Nuklearmedizin UKB Bonn, 03.07.2022). Pro Zyklus werden am UKB im Median etwa 6 GBq appliziert und das Intervall zwischen zwei Zyklen beläuft sich auf sechs bis acht Wochen (Ahmadzadehfar et al., 2017). Die verabreichten Aktivitäten und die Dauer der Intervalle zwischen den Zyklen schwanken von Klinik zu Klinik (Fendler et al., 2017). Nach der Konsensusempfehlung der DGN liegt die Standardaktivität jedoch bei 6,0 GBq pro Zyklus (Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (Hrsg.), 2016).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Therapie

Der Betastrahler Lutetium-177 ist über einen sog. „Linker“ und einen Chelator an einen PSMA-Liganden gekoppelt (s. Schema oben rechts), sodass ein gezieltes Andocken über PSMA an die Zelle möglich ist. Über eine Clathrin-vermittelte Endozytose wird der Rezeptor-Liganden-Komplex internalisiert und es erfolgt ein gezieltes Bestrahlen der Zielzellen. Modifiziert nach Ferdinandus et al. (2018); Kempe (2019); Bergsma et al. (2012).

### 1.3.2 Effektivität

Wichtig ist, dass die Therapie keinen kurativen Ansatz verfolgt, sondern als überlebensverlängernde Maßnahme anzusehen ist (Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., 2021). Die Ergebnisse der noch recht neuen Phase III Studie „VISION“ sind derart vielversprechend, dass die U.S. Food and Drug Administration die  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617-Therapie im März 2022 zugelassen hat (Novartis, 2022a). Die  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617-Therapie plus „standard care“ wurde der „standard care“ allein gegenübergestellt. Die „standard care“ wurde laut Protokoll durch den jeweiligen Behandler im Rahmen gewisser Vorgaben bestimmt, wobei Prüfpräparate, zytotoxische Chemotherapie, andere systemische Radioisotope und Hemibody Strahlentherapie nicht erlaubt waren. Die  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617-Therapie verlängerte das bildgebungsbasierte progressionsfreie Überleben sowie das

Gesamtüberleben. Auch die mediane Zeit bis zum Auftreten symptomatischer skelettbezogener Ereignisse oder dem Tod waren für Patienten mit zusätzlicher <sup>177</sup>Lu-PSMA-617-Therapie signifikant länger. Ebenso konnte bei Patienten mit zusätzlicher <sup>177</sup>Lu-PSMA-617-Therapie ein PSA-Abfall von mindestens 50 % und 80 % gegenüber dem Ausgangswert häufiger verbucht werden. Auch weitere sekundäre Endpunkte der Studie, wie objektives Ansprechen und Krankheitskontrolle, Schmerzen oder gesundheitsbezogene Lebensqualität sprachen für die <sup>177</sup>Lu-PSMA-617-Therapie. Bezogen auf die Nebenwirkungen schnitt die <sup>177</sup>Lu-PSMA-617-Therapie vergleichsweise etwas schlechter als die „*standard care*“ ab, wobei hier methodische/auswertungsbezogene Schwächen in der Studie selbst diskutiert werden (Sartor et al., 2021).

Noch immer sprechen jedoch bis zu 30 % aller Patienten aus bisher ungeklärten Gründen nicht auf die <sup>177</sup>Lu-PSMA-617-Therapie an (Ahmadzadehfar et al., 2017). Ahmadzadehfar et al. (2017) zufolge sprechen 30 % der behandelten Patienten nicht auf den ersten Therapiezyklus an, wobei ein Therapieansprechen auf den ersten Zyklus, also ein PSA-Rückgang, eine signifikante Änderung des Gesamtüberlebens bedeute: Patienten, die bereits auf den ersten Zyklus mit einem PSA-Rückgang ansprechen, haben ein Gesamtüberleben von 68 Wochen im Vergleich zu einem Gesamtüberleben von 33 Wochen bei Patienten ohne PSA-Rückgang. Ein Nicht-Ansprechen auf den ersten Zyklus bedeutet jedoch nicht, dass die Therapie abgebrochen werden sollte, da die Hälfte der Patienten, die nicht auf den ersten Zyklus angesprochen haben, auf den zweiten oder dritten Zyklus ansprechen (Ahmadzadehfar et al., 2017). Die genauen Gründe für ein Nicht-Ansprechen auf die Therapie sind noch nicht geklärt. In einer multivariaten Analyse von Ferdinandus et al. (2017) konnte gezeigt werden, dass eine hohe Thrombozytenzahl oder ein regelmäßiger Bedarf für opioidhaltige Schmerzmittel mit einem schlechteren Ansprechen nach dem ersten Therapiezyklus vergesellschaftet sind.

### 1.3.3 Nebenwirkungen

Während sich die Nebenwirkungen des monoklonalen Antikörpers [<sup>177</sup>Lu]Lu-J591 oftmals in einer starken Myelosuppression, z. B. im Sinne einer schwerwiegenden Thrombozytopenie, äußern, sind die Nebenwirkungen von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 und

[<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T weniger gravierend, sodass eine Therapie mit [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA aufgrund ihrer geringen Toxizität als sicher eingestuft werden kann (Ahmadzadehfar et al., 2016; Bander et al., 2005; Eyben et al., 2018). Da hämatologische Nebenwirkungen allerdings bei einer Verwendung von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 nicht ausgeschlossen sind, sollte eine möglicherweise myelosuppressiv wirkende Therapie sechs Wochen vor Therapiebeginn abgesetzt werden (Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (Hrsg.), 2016; Fendler et al., 2017; Rahbar et al., 2017). Zu den Nebenwirkungen zählen neben Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie und Lymphopenie außerdem Xerostomie, Übelkeit, Erbrechen, Appetitverlust, Diarrhoen, Verstopfungen, Müdigkeit, leichte Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, Gelenkschmerzen, Geschmacksverlust, Knochenschmerzen und Nephrotoxizität (Ahmadzadehfar et al., 2016; Heck et al., 2019; Sartor et al., 2021).

Ob beispielsweise aufgrund der Verstoffwechslung des Radionuklids über die Nieren bzw. aufgrund der PSMA Expression in den Nieren binnen einiger Jahre nach der Therapie eine Niereninsuffizienz auftreten kann, ist derzeit noch nicht vollends geklärt (Ahmadzadehfar et al., 2016; Heck et al., 2019). Die Ergebnisse bisheriger kürzerer Follow-Ups weisen jedoch auf keine wegweisenden negativen Einflüsse auf die Niere hin (Ahmadzadehfar et al., 2016; Yordanova et al., 2017). Trotz der genannten Nebenwirkungen ist die <sup>177</sup>Lu-PSMA-617-Therapie eine sichere Therapie und wurde als solche entsprechend von der *U.S. Food and Drug Administration* zugelassen und von der Europäischen Arzneimittel-Agentur genehmigt (Novartis, 2022a, 2022b; Sartor et al., 2021).

## 1.4 VEGF-C und seine Rezeptoren

### 1.4.1 Struktur

VEGF-C steht für „*vascular endothelial growth factor C*“ und beschreibt einen im Jahr 1996 entdeckten lymphangiogenen und angiogenen Wachstumsfaktor, der hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert ist, jedoch auch in Immun- und Tumorzellen vorkommt (Cao et al., 1998; Chen et al., 2012; Joukov et al., 1996; Karkkainen et al., 2004; Kärpänen et al., 2006; Kluger und Colegio, 2011). Er fördert unter anderem die Proliferation und Migration von Endothelzellen und beeinflusst auch die Permeabilität des Endothels (Cao

et al., 1998; Chen et al., 2012; Favier et al., 2006; Joukov et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass VEGF-C eine bedeutende Rolle im Kontext von Stress und Bestrahlung zukommt und somit ein interessanter Marker zu Erforschung von Strahlungsempfindlichkeit sein kann (s. 1.4.4).

VEGF-C kann als antiparalleles Homodimer nach einigen weiteren Prozessierungsschritten mit hoher Affinität an zwei Rezeptoren binden, welche zur Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinase gehören: Zum einen an den *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3* (VEGFR-3), wobei Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) hierbei vermutlich als Co-Rezeptoren fungieren, und zum anderen an den *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGFR-2) (Chen et al., 2012; Joukov et al., 1996; Joukov et al., 1997; Muders et al., 2009). Abb. 3 bietet eine Übersicht.

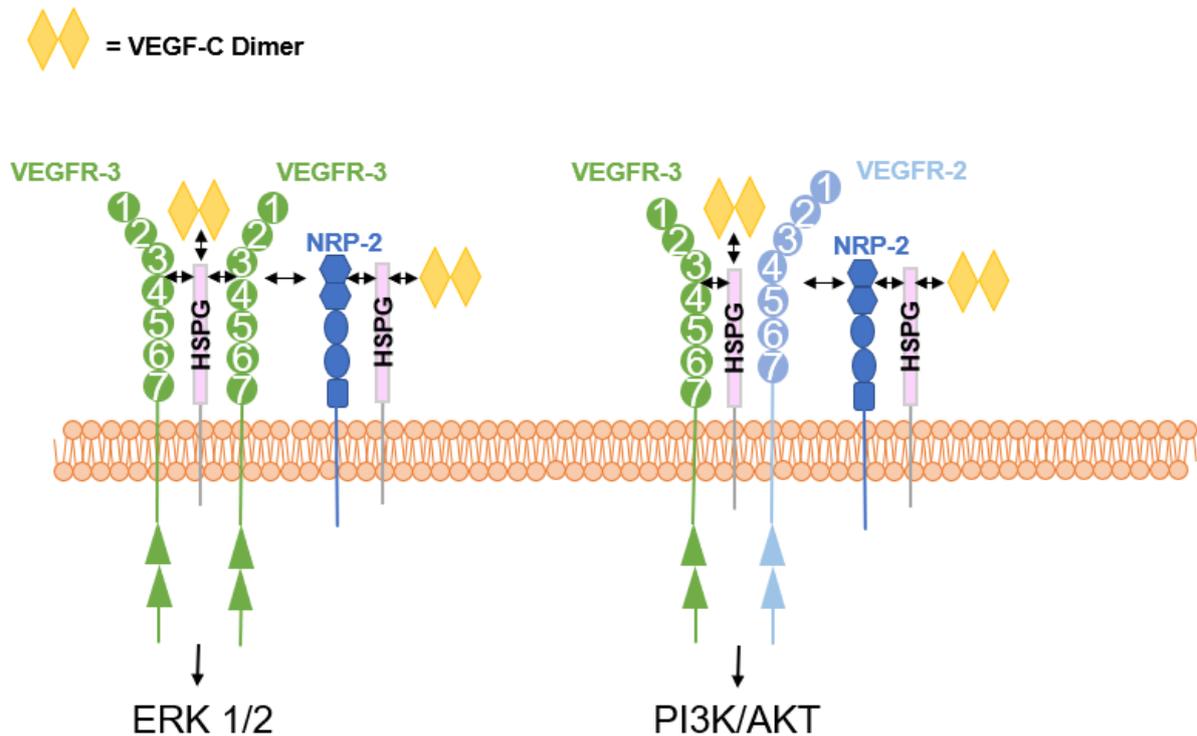
#### 1.4.2 VEGF-C Signalübertragung

Bei Bindung des Liganden bilden sich VEGFR-3 Homodimere bzw. VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimere und die Tyrosinreste des zytoplasmatischen Rezeptoranteils vollziehen eine Autophosphorylierung (Chen et al., 2012; Deng et al., 2015; Joukov et al., 1996). Während die Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2) über die VEGFR-3 Homodimere erfolgt, führt die Bildung von VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimeren zu einer Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und nachfolgend der Proteinkinase B (AKT), wobei in letztere auch Neuropilin-1 (NRP-1) involviert ist (s. Abb. 3) (Deng et al., 2015). Für die durch VEGF-C verursachte Lymphangiogenese von Tumoren ist NRP-1 jedoch nicht erforderlich (Caunt et al., 2008; Chen et al., 2012). Beide Signalwege, der ERK- und auch der AKT-Signalweg, spielen eine wichtige Rolle bei der Migration von Lymphendothelzellen. Es bedarf der Aktivierung beider Signalwege, um eine VEGF-C induzierte Migration von Lymphendothelzellen zu bewirken (Deng et al., 2015). Es wird angenommen, dass VEGF-C durch die Lymphangiogenese die lymphatische Metastasierung fördert (Karpanen et al., 2001). Sowohl der AKT- als auch der ERK1/2 Signalweg fördern darüber hinaus die Zellbeweglichkeit sowie die Metastasierung (Skvortsova et al., 2008). Dem durch die VEGFR-3 Homodimere aktivierten ERK kommt eine überlebensfördernde und Apoptose-hemmende Funktion zu: Es aktiviert die *ribosomal S6 kinase* (RSK), welche unter anderem den

Transkriptionsfaktor *cAMP response element-binding protein* (CREB) phosphoryliert (Doehn et al., 2009; Xing et al., 1996). Das aktivierte CREB fördert wiederum das Zellüberleben. Darüber hinaus wird das proapoptotisch wirkende *bcl-2-antagonist of cell death* (Bad) aus der Bcl-2 Familie durch den ERK-Signalweg phosphoryliert und gehemmt (Bonni et al., 1999). Auch für die Zellproliferation kommt ERK eine wichtige Bedeutung zu (Mebratu und Tesfaigzi, 2009). Auch der von VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimeren aktivierte AKT-Signalweg fördert das Zellüberleben und ermöglicht es den Zellen, zellschädigenden Ereignissen durch Bestrahlung zu entgehen (Gerber et al., 1998; Skvortsova et al., 2008). Letzteres gilt auch für ERK1/2 (Skvortsova et al., 2008). AKT inaktiviert ebenfalls pro-apoptotische Proteine wie Bad oder *cysteiny-l-aspartate specific protease 9* (caspase-9) durch Phosphorylierung und reguliert Transkriptionsfaktoren wie *forkhead-box protein O3* (FOXO3 = FKHL1), um das Zellüberleben zu fördern (Brunet et al., 1999; Cardone et al., 1998; Datta et al., 1997; Yamaguchi und Wang, 2001). Über den AKT-Signalweg werden weiterhin die Zellzyklusprogression gefördert und Apoptose verhindert sowie die Zellproliferation vermittelt (Thakker et al., 1999; Yamaguchi und Wang, 2001). Die Verhinderung der Apoptose erfolgt über eine durch AKT vermittelte Verhinderung der im Rahmen der Apoptose vollzogenen Konformationsänderung des pro-apoptotischen *Bcl-2-associated X protein* (Bax) aus der Familie der Bcl-2 Proteine und über die Verhinderung der Translokation von Bax in das Mitochondrium (Yamaguchi und Wang, 2001).

Eine wichtige Rolle bei der Modulation der Signalwege spielt auch Neuropilin-2 (NRP-2) (Chen et al., 2012). Wie auch NRP-1 besitzt es keine eigene katalytische Einheit und fungiert daher als Co-Rezeptor (Chen et al., 2012; Prud'homme und Glinka, 2012). NRP-2 kann an VEGF-C selbst binden und dadurch in Anwesenheit eines geeigneten signalübertragenden VEGF-Rezeptors lymphangiogene Signalkaskaden aktivieren (Caunt et al., 2008; Chen et al., 2012; Karkkainen et al., 2001; Kärpänen et al., 2006). Kärpänen et al. (2006) zufolge wird diese Bindung durch HSPGs verstärkt. Darüber hinaus kann NRP-2 mit VEGFR-2 und VEGFR-3 interagieren (Chen et al., 2012; Favier et al., 2006). Durch diese Interaktion können die VEGFR-2 und VEGFR-3 vermittelten Signalwege verstärkt werden. NRP-2 setzt außerdem die Phosphorylierungsgrenze für VEGFR-2 herab und verstärkt die Phosphorylierung von VEGFR-2 (Favier et al., 2006).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die VEGF-C/NRP-2 Achse über eine Inhibition von *mammalian target of rapamycin complex-1* (mTORC-1) Autophagie induzieren kann, die wiederum unter anderem Prostatakarzinomzellen vor chemotherapeutisch ausgelöstem Stress schützen kann (Stanton et al., 2013a; Stanton et al., 2013b).



**Abb. 3:** VEGF-C Signalübertragung

Dargestellt sind ein VEGFR-3 Homodimer (links) sowie ein VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimer (rechts) mit HSPGs sowie mit NRP-2 als Co-Rezeptor und konsekutiver Aktivierung des ERK 1/2 bzw. PI3K/AKT Signalwegs. Die Rezeptoren bestehen dabei aus einem extrazellulären Anteil aus sieben Ig-Proteindomänen, einer Transmembrandomäne, einer Juxtamembran-Domäne auf der zytoplasmatischen Seite, einer Tyrosinkinase-Domäne, die durch ein Kinase-Insert unterbrochen wird und aus einem C-terminalen Schwanz. Die extrazellulären Ig-Domänen dienen der Ligandenbindung, wobei die Schleifen 1 und 2 für VEGFR-3 und die Schleifen 2 und 3 für VEGFR-2 relevant sind. Modifiziert nach Chen et al. (2012) und inhaltlich angepasst an Kärpänen et al. (2006); Chen et al. (2012).

### 1.4.3 VEGF-C und seinen Rezeptoren im maligne entarteten Gewebe

Bezüglich der Rolle von VEGF-C für das Prostatakarzinom findet man unterschiedliche Ansichten in der Literatur: Jennbacken et al. (2005) zufolge ist die VEGF-C Expression im maligne entarteten Prostatagewebe im Vergleich zum gutartigen Drüsengewebe erhöht und korreliert überdies mit Lymphknotenmetastasen beim Prostatakarzinom. Ebenso ist VEGFR-3 in malignem Prostatagewebe exprimiert, wobei die Expression bei Lymphknotenbefall erhöht ist. Auch konnte eine Korrelation zwischen der VEGF-C und VEGFR-3 Expression und dem Gleason-Score gefunden werden (Jennbacken et al., 2005). Borkowetz et al. (2020) hingegen führten immunhistochemische Untersuchungen am Prostatakarzinomgewebe durch und konnten keinen Einfluss von VEGF-C auf das Gesamtüberleben oder das krebsspezifische Überleben feststellen. Auch konnten sie, anders als Jennbacken et al. (2005), keinen Zusammenhang mit einem hohen Gleason-Score oder mit Lymphknotenmetastasen feststellen (Borkowetz et al., 2020). Beim Kolorektalkarzinom korreliert VEGF-C unter anderem mit der Invasionstiefe und mit Lymphknotenmetastasen (Akagi et al., 2000). Auch beim Magenkarzinom zeigte sich u. a. eine Korrelation von VEGF-C und Lymphknotenmetastasen und eine erhöhte VEGF-C Expression kristallisierte sich als negativer prognostischer Faktor heraus (Yonemura et al., 1999). Keck et al. (2015) zeigten außerdem, dass VEGF-C bei Patienten mit Zustand nach transurethraler Blasenresektion und anschließender Radiochemotherapie einen negativen prognostischen Faktor in Bezug auf das Therapieansprechen darstellt. Eine VEGF-C- und VEGFR-3-Expression konnte darüber hinaus unter anderem in Glioblastomen und Hämangioblastomen nachgewiesen werden, obwohl das Gehirn keine Lymphgefäße besitzt. Hier wird angenommen, dass VEGF-C und VEGFR-3 in Entzündungsprozesse im Glioblastom involviert sind, da ein beträchtlicher Anteil der VEGF-C exprimierenden Zellen *cluster of differentiation 163* (CD163) positive Makrophagen waren (Jenny et al., 2006).

### 1.4.4 VEGF-C und VEGF-C induzierte Signalwege im Kontext von Stress und Bestrahlung

Vordergründig für die vorliegende Arbeit ist die Rolle von VEGF-C und den von VEGF-C ausgelösten Signalwegen im Kontext von Bestrahlung und dies insbesondere in Bezug

auf Prostatakarzinomzellen. Es ist allgemein bekannt, dass ionisierende Strahlung oxidativen Stress in Zellen hervorrufen kann (Herrmann et al., 2006; Muders et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass VEGF-C über den AKT/*forkhead-box protein 1* (FOXO-1) bzw. den AKT/glycogen synthase kinase  $\beta$  (GSK $\beta$ ) Signalweg Prostatakarzinomzellen im Sinne einer anti-apoptotischen Signalantwort vor oxidativem Stress schützen kann, wobei *mammalian target of rapamycin-2* (mTORC-2), welches AKT vorgeschaltet ist, eine bedeutende Rolle für die AKT-Aktivierung zukommt (Muders et al., 2009). Muders et al. (2009) und Stanton et al. (2013b) konnten des Weiteren in ihren Untersuchungen an Prostatakarzinomzellen keine Aktivierung von mTORC-1 und dem nachgeschalteten S6 Protein unter Stressbedingungen nachweisen und fanden heraus, dass die VEGF-C/NRP-2 Achse mTORC-1 inhibiert und dadurch Autophagie induziert. Dies hebt die Bedeutung der VEGF-C/NRP-2-Achse für das Überleben von malignen Zellen unter Stressbedingungen hervor (Kroemer et al., 2010; Muders et al., 2009; Stanton et al., 2013b). Darüber hinaus wird auf diese Weise eine länger anhaltende Aktivierung von AKT gewährleistet, da die S6 Kinase auch als Teil eines negativen Feedback-Mechanismus zur Inaktivierung von AKT fungiert (Muders et al., 2009).

Für die Nasopharynxkarzinomzelllinie CNE-2 konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von VEGF-C in einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit resultiert (Wang et al., 2020). Wie unter 1.4.3 erwähnt ist VEGF-C außerdem bei Patienten mit Zustand nach transurethraler Blasenresektion und anschließender Radiochemotherapie ein negativer prädiktiver Faktor in Bezug auf das Therapieansprechen (Keck et al., 2015).

In der Literatur findet man jedoch auch eine mit VEGF-C in Verbindung gebrachte Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit: Kesler et al. (2014) untersuchten den Einfluss von VEGF-C auf die Strahlenempfindlichkeit von Lymphendothelzellen und fanden heraus, dass VEGF-C diese erhöht und dass VEGF-C vorbehandelte Zellen eine erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen aufweisen. VEGF-C behält zwar seine antiapoptotischen Eigenschaften, sorgt jedoch für einen erhöhten Anteil an Zellen, die sich in Quieszenz befinden (Kesler et al., 2014).

## 1.5 Hintergrundwissen zu ionisierender Strahlung und deren Wirkung auf Zellen

### 1.5.1 Ionisierende Strahlung

Als ionisierende Strahlung bezeichnet man diejenige Strahlung, deren Energie dazu ausreicht, Elektronen aus der Atomhülle oder aus einem Molekül herauszuschlagen. Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen elektromagnetischer Strahlung und Teilchenstrahlung. Teilchenstrahlung umfasst Strahlung, die durch Teilchen wie Elektronen, Neutronen, alpha-Teilchen oder Protonen entsteht (Hall und Giaccia, 2011). Während geladene Teilchen aufgrund ihres elektrischen Felds zur direkten Ionisation fähig sind, d.h. zum direkten Herausschlagen von Elektronen aus Atomen, können ungeladene Teilchen lediglich eine indirekte Ionisation herbeiführen. Das bedeutet, dass die Energie zunächst im Atomkern aufgenommen wird und anschließend durch z. B. Photonen wieder abgegeben wird oder alternativ über Rückstoßkerne an andere Atome oder Moleküle abgegeben wird (Herrmann et al., 2006). Elektromagnetische Strahlung wie Röntgen- oder auch Gammastrahlen besteht aus Photonen und wirkt indirekt ionisierend (Hall und Giaccia, 2011; Herrmann et al., 2006). Sobald die elektromagnetische Strahlung von beispielsweise Zellen oder Geweben absorbiert wird, wird die in den Photonen vorhandene Energie an diese abgegeben (Hall und Giaccia, 2011). Dieser absorbierte Anteil der Strahlung ist der für das biologische Objekt wirksame Anteil (Herrmann et al., 2006).

Für die Strahlenbiologie von großer Bedeutung ist der sog. Lineare Energietransfer (LET). Dieser ist definiert als  $LET = \frac{\Delta E}{\Delta S}$ , wobei  $\Delta E$  den mittleren Energieverlust und  $\Delta S$  den von der Strahlung zurückgelegten Weg beschreibt (Herrmann et al., 2006). Der LET ist somit als ein Surrogatparameter für die Ionisationsdichte, sprich für die Anzahl der Ionisationen auf dem von der Strahlung zurückgelegten Weg, anzusehen (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011). Die Anzahl der Ionisationen sind dabei wiederum ein Anhaltspunkt für die biologische Wirkung der Strahlung, die umso höher ist, je höher der LET ist. Die verschiedenen Strahlenarten können in dicht ionisierende Strahlungen mit hohem LET und locker ionisierende Strahlungen mit niedrigem LET unterteilt werden (Herrmann et al., 2006). Die in dieser Arbeit vom Betastrahler Lutetium-177 emittierte Strahlung fällt als Elektronenstrahlung ( $LET = 0,2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) gemeinsam mit der Röntgen-

(LET = 2,5 keV/μm) und Gammastrahlung (LET = 0,3 keV/μm) unter die Niedrig-LET Strahlungen (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011).

Zwei wichtige Größen im Zusammenhang mit ionisierender Strahlung sind zum einen die Energiedosis und zum anderen die Aktivität (Herrmann et al., 2006). Die Energiedosis wird in Gray (Gy) angegeben und beschreibt die von einer bestimmten Masse absorbierte Energie ionisierender Strahlung, d.h.  $1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}$  (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011). Die Aktivität  $A$  wiederum wird in Becquerel (Bq) angegeben und gibt die Anzahl der Zerfälle ( $-\Delta N$ ) eines radioaktiven Stoffes pro Zeiteinheit ( $\Delta t$ ) an. Sie ist also als  $A = -\frac{\Delta N}{\Delta t}$  definiert. Es gilt:  $A = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left( -\frac{\Delta N(t)}{\Delta t} \right) = -\frac{dN(t)}{dt} = -N(t)$ . Zusammen mit dem Gesetz des radioaktiven Zerfalls  $N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$  ( $N(t)$  entspricht den zum Zeitpunkt  $t$  noch nicht zerfallenen Kernen,  $N_0$  entspricht der Anzahl der Kerne zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $\lambda$  entspricht der Zerfallskonstanten) ergibt sich  $A = \lambda N$  bzw.  $A(t) = A_0 e^{-\lambda t}$  (Grehn und Krause, 2007).

### 1.5.2 DNA-Schädigung durch Strahlung und Reparaturmechanismen

Ionisierende Strahlung kann ihre biologische Wirkung entweder durch direkte Strahlenwirkung oder durch indirekte Strahlenwirkung entfalten. Bei der direkten Strahlenwirkung finden Energieabsorption und biologische Wirkung im selben Biomolekül statt (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011). Bei der indirekten Strahlenwirkung hingegen entstehen durch die ionisierende Strahlung hochreaktive freie Wasserradikale, die durch Radikalkettenreaktionen ihre biologische Wirkung am Zielmolekül entfalten. Aufgrund seines quasi ubiquitären Vorkommens spielt Wasser als Molekül bei der Radikalbildung eine bedeutende Rolle.

Die im Zellkern lokalisierte Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein wesentlicher Angriffspunkt der ionisierenden Strahlung bei der Bestrahlung von Zellen. Es kann z. B. durch strahleninduzierte Veränderungen der DNA zu Mutationen kommen oder die Wirkung der Strahlung auf die DNA verursacht z. B. eine Zellabtötung oder eine Zellzyklusverlängerung (Herrmann et al., 2006). Die oben beschriebenen hochreaktiven Radikale können beispielsweise zu DNA-Schäden führen: Hierzu gehören unter anderem, neben Einstrang- und Doppelstrangbrüchen, Basenmodifikationen oder Basenverluste,

Zuckermolekülveränderungen, gehäufte Läsionen (mehrere nah beieinander lokalisierte Schäden) oder auch DNA-Protein-Vernetzungen. Die Reparatur der durch die Strahlung entstandenen Schäden erfolgt durch Enzyme und nimmt nur wenige Stunden Zeit in Anspruch (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011). Es existieren vereinfachend gesagt eine „schnelle Reparatur“ (Dauer: 10-20 min) und eine „langsame Reparatur“ (Dauer etwa 2 h, abgeschlossen nach etwa 6-8 h). Für die meisten Vorgänge bedeutsamer ist die „langsame Reparatur“ (Kauffmann et al., 2011).

Doppelstrangbruchreparaturen können im Eukaryonten entweder über das *non homologous end-joining* (NHEJ) oder über die homologe Rekombination (HR) erfolgen. In Säugetierzellen spielt das NHEJ eine wichtige Rolle (Herrmann et al., 2006). Beim NHEJ werden die geschädigten Stellen entfernt und die DNA-Enden werden anschließend unter Mitwirkung von Kupfer-Proteinen, der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) und der Komplex *x-ray repair cross complementing 4* (XRCC4)/DNA-Ligase (IV) wieder miteinander verknüpft. Aufgrund des Fehlens einer homologen Matrize werden hier nicht immer die korrekten DNA-Sequenzen wiederhergestellt, was zu Mutationen führen kann (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011).

Doppelstrangbrüche, die nicht oder falsch repariert wurden, werden als wichtigste Quelle für durch Strahlung induzierte biologische Schäden angesehen (Herrmann et al., 2006). Sie können Chromosomenaberrationen mit azentrischen Fragmenten oder Translokationen verursachen und so zum Zelltod bzw. zur Entartung führen (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011).

Ionisierende Strahlung kann ihre Wirkung allerdings nicht nur an der DNA entfalten, sondern auch direkt an Molekülen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Herrmann et al., 2006).

### 1.5.3 Bestrahlung und Zellzyklus

Das Thema Zellzyklus ist bei der Betrachtung von bestrahlten Zellen ein wichtiger Aspekt. Hier ist an erster Stelle zu erwähnen, dass Zellen abhängig von ihrer Zellzyklusphase unterschiedlich sensibel auf Bestrahlung reagieren (Herrmann et al., 2006). Zwar existieren in diesem Kontext teils starke zelllinienabhängige Schwankungen, jedoch kann

man allgemein die folgenden Faustregeln formulieren: Strahlensensibel sind Zellen gegen Ende der G2-Phase, d.h. im G2/M-Übergang, um dann in der Mitose die größte Strahlenempfindlichkeit vorzuweisen (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011). Die G1-Phase ist weniger strahlensensibel und bei einer langen G1-Phase weist der frühe Anteil eine Strahlenresistenz auf (Hall und Giaccia, 2011; Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011). Die G1-Phase wird zum Übergang in die S-Phase wieder sehr strahlensensibel (Hall und Giaccia, 2011; Herrmann et al., 2006). Die größte Strahlenresistenz besitzen Zellen in der späten S-Phase (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011).

Bestrahlt man Zellen, die sich zum Bestrahlungszeitpunkt in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befinden, so werden zunächst jene Zellen eliminiert, die aufgrund ihrer Zellzyklusphase vergleichsweise strahlensensibel sind. Übrig bleiben somit die Zellen in den strahlenresistenteren Zellzyklusphasen. Darüber hinaus bewirkt die Bestrahlung von Zellen die dosisabhängige Ausbildung eines G2-Blockes, sodass durch die Bestrahlung eine sog. „partielle Synchronisation“ hervorgerufen wird. Diese wird im weiteren Verlauf durch ein sog. „*reassortment*“, d.h. durch die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen, wieder aufgehoben. Dabei dauert der strahleninduzierte G2-Block je nach Zelllinie unterschiedlich lange an, wobei man grob gesagt von 2 h/Gy ausgehen kann (Herrmann et al., 2006).

#### 1.5.4 Strahleninduzierter Zelltod

Der weitere Werdegang einer Zelle nach ihrer Exposition gegenüber ionisierender Strahlung kann sich sehr unterschiedlich gestalten: Während manche Zellen sich in ihrer Teilungsfähigkeit uneingeschränkt weiter vermehren, verlieren andere Zellen ihr Reproduktionsvermögen oder gehen in eine der verschiedenen Formen des Zelltods über.

Verliert eine Zelle ihr Reproduktionsvermögen, d.h. ist sie nicht mehr dazu in der Lage sich mehrfach zu teilen und Kolonien von mindestens 50 Zellen zu generieren, dann spricht man vom „klonogenen Zelltod“. Die Ursachen hierfür sind zahlreich: Am bedeutendsten ist der Mitosetod. Der Mitosetod zeichnet sich dadurch aus, dass die

Zellen nach der Bestrahlung morphologisch unversehrt sind und auch noch metabolisch aktiv sind. Sie vollziehen noch einige Mitosen bevor sie z. B. mangels genetischen Materials und wichtiger Proteine nicht mehr teilungsfähig sind. Ein weiterer Mechanismus ist der Interphasetod, bei dem die Zelle vor der Teilung eine frühe Apoptose ausübt. Zuletzt kann es auch zur Differenzierung kommen, bei der terminale Funktionszellen entstehen, die nicht mehr zur Koloniebildung fähig sind.

Bei den Formen des Zelltods sind vor allem die Nekrose und die Apoptose zu nennen. Bei der Apoptose unterscheidet man insbesondere die klassische Apoptose von der späten Apoptose. Letztere tritt auch noch einige Tage nach der Bestrahlung auf und kann sogar erst im Anschluss an die nächste Mitose auftreten (Herrmann et al., 2006).

#### 1.5.5 Zellüberlebenskurve

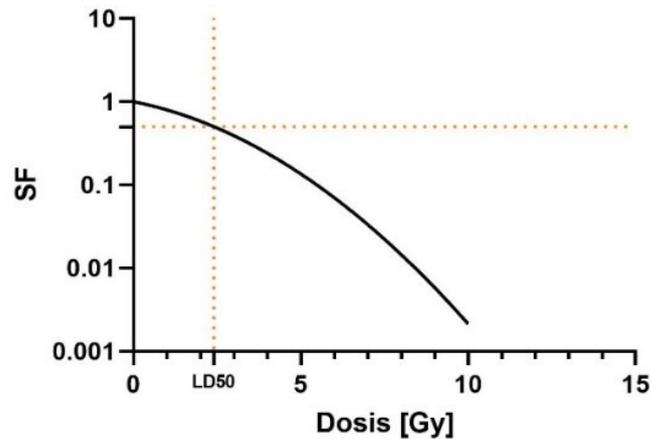
Zur Untersuchung der Auswirkungen von Strahlung auf Zellen werden häufig Koloniebildungsassays eingesetzt, für deren Auswertung Zellüberlebenskurven besonders geeignet sind (s. Abb. 4) (Herrmann et al., 2006; Puck und Marcus, 1956). Sie geben die Zellüberlebensrate in halblogarithmischer Darstellung in Abhängigkeit von der Dosis der Strahlung wieder (Herrmann et al., 2006). Dabei ist die Ordinate in der Regel logarithmisch und die Abszisse in der Regel linear skaliert (Kauffmann et al., 2011). Die entstehende „Schulterkurve“ unterteilt sich in zwei verschiedene Abschnitte (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011): Der Kurvenbeginn präsentiert sich als eine Schulter, während der weitere Verlauf der Kurve exponentiell ist (Herrmann et al., 2006). Im Diagramm mit logarithmisch skalierte Ordinate stellt sich der letztere Teil entsprechend als fallende Gerade dar (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011).

Die Zellüberlebenskurven werden durch das im Jahr 1973 durch Keller und Rossi etablierte linear-quadratische Modell (LQ-Modell) wiedergegeben, welches das Überleben der Zellen als  $\ln SF = -AD - BD^2$  ( $SF$  = Überlebensfraktion,  $D$  = eingesetzte Dosis,  $A$  = zellspezifische Konstante in  $Gy^{-1}$  und  $B$  = zellspezifische Konstante in  $Gy^{-2}$ ) zusammenfasst (Herrmann et al., 2006; Kauffmann et al., 2011; Kellerer und Rossi, 1973). Es nähert vor allem den Bereich zwischen 1 und 5 Gy sehr gut an. Der lineare Anteil  $-AD$  gibt die Anfangsneigung der Kurve wieder und der quadratische Anteil  $-BD^2$  spiegelt die

Krümmung der Kurve wider. Die Schulterregion der Zellüberlebenskurve lässt sich durch das A/B-Verhältnis charakterisieren. Das A/B-Verhältnis wird in Gy angegeben und ist diejenige Dosis, bei der der lineare und der quadratische Anteil gleichsam an der Zelltötung beteiligt sind. Fällt das A/B-Verhältnis zugunsten der linearen Komponente aus, so hat man ein großes A/B-Verhältnis und eine gering ausgeprägte Schulterregion. Fällt es zugunsten der quadratischen Komponente aus, so ist das A/B-Verhältnis klein und die Schulter entsprechend groß.

Es können jedoch auch Abweichungen vom LQ-Modell auftreten: Im Bereich sehr niedriger Dosen, insbesondere im Bereich von 0,1-0,5 Gy, konnte für einige Zelllinien gezeigt werden, dass die Überlebensrate geringer ausfällt als durch das LQ-Modell berechnet. Dieses Phänomen bezeichnet man als sog. „*low-dose-hyperradiosensitivity*“ (HRS). Sie wird dadurch erklärt, dass Reparaturprozesse, abhängig von der Zelllinie, erst ab einer gewissen Schadensmenge initiiert werden. Ihr schließt sich klassischerweise eine erhöhte Resistenz gegenüber der Strahlung im Sinne einer sog. „*induced radioresistance*“ (IRR) an, die häufig im Bereich von 0,5-1 Gy lokalisiert ist (Herrmann et al., 2006). Insbesondere in der G2-Phase ist eine HRS zu erwarten (Enns et al., 2004; Herrmann et al., 2006). Ein weiteres Phänomen, das im Bereich niedriger Dosen beobachtet werden kann ist die Strahlenhormesis: Die Strahlenhormesis besagt, dass Strahlung im Bereich niedriger Dosen durchaus vorteilhafte Effekte haben kann. Es wird vermutet, dass Strahlenhormesis nur bei Niedrig-LET Strahlung vorkommt. Da die Existenz einer Strahlenhormesis nur schwer zu beweisen ist, wird sie jedoch kontrovers diskutiert (Jolly und Meyer, 2009).

## Überlebenskurve



**Abb. 4:** Beispiel einer Überlebenskurve

Dargestellt ist ein Beispiel einer mit dem LQ-Modell angepassten Überlebenskurve nach Zellbestrahlung. Die Darstellung ist klassischerweise halblogarithmisch. Auf der Abszisse ist die Überlebensfraktion (SF) abgetragen, auf der Ordinate die Dosis. Mit gestrichelten Linien ist der LD50-Wert hervorgehoben. Modifiziert nach Herrmann et al. (2006).

### 1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Insbesondere bei einem palliativen Therapieansatz wie der  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Therapie sollte das Augenmerk auf der Lebensqualität des Patienten liegen, sodass ein genaues Abwägen des Therapienutzens vor Therapiebeginn von großer Bedeutung ist. Der Erforschung von potenziellen prädiktiven Markern für ein Therapieansprechen kommt somit ein extrem hoher Stellenwert zu. Die molekularen Mechanismen ebenso wie molekulare Marker für ein Nichtansprechen auf die  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-Therapie sind jedoch noch weitestgehend unerforscht (Heck et al., 2019).

Die vorliegende Arbeit soll daher als erste gezielte Annäherung an dieses wichtige Thema den Einfluss von VEGF-C als prädiktivem Marker im Kontext von Stress und Bestrahlung auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 untersuchen. Um den Einfluss von VEGF-C als prädiktivem Marker funktionell zu belegen, sollten die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- a) Nimmt VEGF-C über eine mögliche Zellzyklusmodifikation Einfluss auf die Strahlensensibilität von Prostatakarzinomzellen im Sinne eines Mehranteils VEGF-C negativer Zellen gegenüber VEGF-C positiven Zellen in der radiosensitiven G2/M-Phase?
- b) Welche Effekte ruft die Bestrahlung von Prostatakarzinomzellen mit Lutetium-177 hervor (Etablierung von Bestrahlungsversuchen)?
- c) Ist generell von einem Einfluss von VEGF-C auf die Strahlensensibilität von Prostatakarzinomzellen bei Bestrahlung mit Lutetium-177 auszugehen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

**Tab. 1:** Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
LNCaP C4-2b	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. K. Datta, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, US
LNCaP	DMSZ, Braunschweig, DE
PC-3	DMSZ, Braunschweig, DE
U-251 MG	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. T. Pietsch, Institut für Neuropathologie, UKB, DE

#### 2.1.2 Kits

**Tab. 2:** Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Propidium Iodide Flow Cytometry Kit for Cell Cycle Analysis	Abcam, Cambridge, GB
RNA-free DNase I Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE

#### 2.1.3 Chemikalien

**Tab. 3:** Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Herstellerangaben
Coomassie Brilliant Blue G-250 ultrapure	VWR Chemicals, LCC, Solon, OH, US
Dharmafect 2	Dharmacon, GE Healthcare Dharmacon Inc., Lafayette, CO, US
Dimethylsulfoxid	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE

Chemikalie	Herstellerangaben
dNTP-Mix (je 10 mM)	Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, LT
DOTA	ABX Radeberg, Radeberg, DE
Eisessig 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol absolut	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, FR
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US bzw. Life Technologies Limited (gibco), Paisley, GB
Gentisinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
HCl 30 % Suprapur (nur für Lutetium-177)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen, DE
[ <sup>177</sup> Lu]LuCl <sub>3</sub>	IDB Holland bv, Baarle Nassau, NL
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 2X	Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, LT
2-Mercaptoethanol >99 %	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, DE
Methanol 99,9 %	Acros Organics, Geel, BE
NaAscorbat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US bzw. Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, US
Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4, 1X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US bzw. Life Technologies Limited (gibco), Paisley, GB
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Baltics UAB, Vilnius, LT
Reaction Buffer, 5X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US

Chemikalie	Herstellerangaben
rekombinantes humanes VEGF-C	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, US
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, LT
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, LT
RNase Away	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, DE
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, DE
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US bzw. Life Technologies Limited (gibco), Paisley, GB
Salzsäure 20 %	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, DE
0,5 % Trypsin-EDTA, 10X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US bzw. Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, US

#### 2.1.4 Verbrauchsmaterial

**Tab. 4:** Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Herstellerangaben
Abfallbeutel 300x200 mm, autoklavierbar	BRAND GMBH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Aluminiumfolie	Wanit Universal GmbH & Co. KG, Ditzgenbach – Steinberg, DE
Aluminium-Pipettenbüchse	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Autoklavierband stericlin	Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, Feuchtwangen, DE
BacilloI AF	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, DE
Einmalhandschuhe	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, DE

Verbrauchsmaterial	Herstellerangaben
Nitra-Touch Einmalhandschuhe	Ansell Healthcare Europe NV, Brüssel, BE
FACS-Röhre, 5 ml, 75 x 12 mm	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Filterspitze PP natur 0,1-10µl, graduiert	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen (Luhe), DE
Filterspitze PP natur 0-100µl, graduiert	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen (Luhe), DE
Filterspitze PP natur 100-1250µl, graduiert	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen (Luhe), DE
Halipac	Hammerlit GmbH, Leer, DE
Konisches Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
Konisches Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
Kryobox-Rastereinsatz	Ratiolab GmbH, Dreieich, DE
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Kryoröhrchen-Ständer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Icepur Konzentrat	IC Products SA, Gordola, CH
MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems by life technologies, Foster City, CA, US
Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml/2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Parafilm	Bemis Company, Neenah, WI, US
Pasteurpipetten	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
PCR-Versiegelungsfolie	Corning Incorporated (Axygen), Corning, NY, US
Verbrauchsmaterial	Herstellerangaben

Pipettenspitze 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Pipettenspitze 10-200 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Pipettenspitze 20 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Rack für 24 Falcon Tubes 50 ml	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, US
Reinigungstuch für Nanophotometer (Präzisionswischtücher)	Kimberly-Clark Inc., Mississauga, CA
Serologische Pipette, 5 ml/10 ml/25 ml	Corning Incorporated, Corning, NY, US
Serologische Pipette, 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Serologische Pipette, 2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Six-Well Platten	Corning Incorporated, Corning, NY, US
8er-Softstripes, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
T-75 Zellkulturflasche	Corning Incorporated, Corning, NY, US
T-25 Zellkulturflasche	Corning Incorporated, Corning, NY, US
Via-1 Cassette	Chemometec A/S, Allerød, DK
Wasserbadstabilisator ThermoClean DC	Bioanalytic GmbH, Umkirch/Freiburg, DE
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt, Inc., Newton, NC, US

## 2.1.5 siRNA

**Tab. 5:** siRNA Pools

siRNA	Sequenz	Hersteller
human VEGFC	CCAAUUACAUGUGGAAUAA; GAAGUUCCACCACCAAACA; UCAGCAAGACGUUAUUUGA; GUACAAGUGUCAGCUAAGG	Dharmacon, GE Healthcare Dharmacon Inc., Lafayette, CO, US
Non-targeting siRNA	UGGUUUACAUGUCGACUAA; UGGUUUACAUGUUGUGUGA; UGGUUUACAUGUUUUCUGA; UGGUUUACAUGUUUCCUA	Dharmacon, GE Healthcare Dharmacon Inc., Lafayette, CO, US

## 2.1.6 Primer

Alle Primer wurden bei Eurofins Genomics, Ebersberg, DE bestellt. Das Primerdesign und die Validierung wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Thomas Mayr durchgeführt.

**Tab. 6:** Verwendete Primer

Primer	Sequenz
FLT4-1FW	GTGTACACCACGCAGAGTGA
FLT4-1RV	CATCCTTGTGCCGTCTCTCA
KDR-FW1	CGGTCAACAAAGTCGGGAGA (20)
KDR-RV1	CAGTGCACCACAAAGACACG (20)
PPIA FW	GCTGGACCCAACACAAATGG
PPIA RV	GGCCTCCACAATATTCATGCCT
VEGFC-FW	TTGCCAATCACACTTCCTGC
VEGFC-RV	CCATCTGTTGAGTCATCTCC

## 2.1.7 Geräte

**Tab. 7:** Verwendete Geräte

Gerät	Herstellerangaben
Absaugsystem Biovac 106	Welch by Gardner Denver bzw. Gardner Denver Thomas GmbH, Ilmenau, DE
Auflichtmikroskop Wild Makroskop M420 1,25x	Wild Heerbrugg, Heerbrugg, CH
Autoklav Laboklav 55-MSV	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, DE
BD FACS Canto II	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-230AIC	Panasonic Healthcare Co., Ltd., 1-1-1 Sakata, Oizumi-Machi, Ora-Gun, Gunma 370-0596, JP
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Nuklearmedizin)	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE
Eismaschine	Scotsman Ice Srl, Mailand, IT
Gefrierschrank -80 °C VIP ECO MDF-DU702VH	Panasonic Healthcare Co., Ltd., 1-1-1 Sakata, Oizumi-Machi, Ora-Gun, Gunma 370-0596, JP
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, CH
Handzähler zum Zählen von 1-9999	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, US
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heizschüttler HTM	HTA-BioTec, Bovenden, DE
Invertmikroskop CKX41SF	Olympus Corporation, Tokyo, JP
Kolbenhubpipetten Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Bulle, CH bzw. Liebherr-Hausgeräte Marica EOOD, Radinovo, BG
Magnetrührer Phoenix Instrument RSM-01HS	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, DE

Messzylinder 100 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Messzylinder 1000 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Minizentrifuge NG002B	NIPPON GENETICS EUROPE GmbH, Düren, DE
Nanophotometer N60 Touch	Implen GmbH, München, DE
NucleoCounter NC-200	ChemoMetec A/S, Allerød, DK
PCR-Thermocycler 7500 Fast RealTime PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, US
Gerät	Herstellerangaben
Pipettierhilfe Pipetboy acu-jet pro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
Präzisionswaage Sartorius ENTRIS	Sartorius Lab Instruments GmbH und Co. KG, Göttingen, DE
Sicherheitswerkbank Mars GS, Mars Pro GS 900, 1200, 1500, 1800, Class 2	LaboGene ApS, Lyngø, DK
Thermocycler Biometra TRIO	Biometra GmbH/ Analytik Jena AG, Göttingen, DE
Zentrifuge 1-16 K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, DE
Zentrifuge 2-7	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, DE
Zentrifuge für 96-Well Platten (Multifuge 3 s-r)	Heraeus, Hanau, DE
Vortexer Phoenix Instrument RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, DE
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE

## 2.1.8 Software

**Tab. 8:** Verwendete Software

Software	Firma
BD FACSDiva Flow Cytometry Software 8.0.1	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FlowJo 10	FlowJo, LLC, Ashland, OR, US
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corp., Redmond, WA, US
7500 Fast RealTime PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, US
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, US

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturbedingungen

Sämtliche Experimente der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen und wurden unter einer monatlich mit Bacillol AF gereinigten Sicherheitswerkbank mit speziellem Belüftungssystem durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien wurden vor Beginn der Arbeit einmalig authentifiziert und regelmäßig auf Mycoplasmen untersucht. Inkubiert wurden die Zellen in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Alle verwendeten Zelllinien wurden in RPMI-Komplettmedium kultiviert, welches sich aus RPMI 1640 + 10 % Fetalem Kälberserum (FKS) + 1 % Penicillin-Streptomycin zusammensetzt. Durch Zugabe von 10 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zum RPMI-Komplettmedium wurde entsprechend das Kryokonservierungsmedium hergestellt, welches für das Einfrieren der Zellen benötigt wurde.

### 2.2.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden zunächst 9 ml RPMI-Komplettmedium in ein konisches Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Fassungsvermögen vorgelegt. Anschließend wurde das Kryoröhrchen zügig und ggf. auf Trockeneis zum Wasserbad transportiert und darin aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen

überführt und die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 200 xg und Raumtemperatur für 4 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer biovac 106 Absaugpumpe abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert und dann in eine Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (T-25) überführt, in der die Zellsuspension durch vorsichtiges Bewegen der Zellkulturflasche gleichmäßig verteilt wurde.

### 2.2.3 Passagieren von Zellen

Unter Zuhilfenahme eines Invertmikroskops wurde zunächst die Konfluenz der Zellen beurteilt. Eine Konfluenz von etwa 70-80 % entsprach dabei einer idealen Bedingung für das Passagieren der Zellen: Für das Passagieren der Zellen eigneten sich bei den für diese Dissertation verwendeten Zelllinien am besten Aufteilungsverhältnisse von 1:2, 1:3 und 1:6. Zunächst wurde das alte Medium mit Hilfe einer biovac 106 Absaugpumpe abgesaugt. Anschließend wurden vorsichtig 10 ml 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) in die T-75 Zellkulturflasche gegeben (für T-25 Zellkulturflaschen wurden stets die Hälfte der jeweils angegebenen Volumina verwendet, s. Tab. 9). Das PBS wurde hiernach wieder abgesaugt und 3 ml 2x Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin/EDTA; 10X in PBS verdünnt) wurden auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturflasche wurde verschlossen und für 2-5 min in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis ein vollständiges Ablösen der Zellen von der Plastikoberfläche erreicht wurde. Inwieweit der Ablösungsprozess vorangeschritten bzw. abgeschlossen war, wurde mit einem Invertmikroskop beurteilt.

Im nächsten Schritt wurden 7 ml RPMI-Komplettmedium hinzugegeben, um mit Hilfe des darin enthaltenen FKS die enzymatische Aktivität des Trypsins zu stoppen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml fassendes konisches Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei 200 xg und Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5-10 ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert, sodass entsprechende Volumina für die gewünschten Aufteilungsverhältnisse entnommen und in eine Zellkulturflasche gegeben werden konnten. Das Volumen von T-

75 Zellkulturflaschen wurde auf 12 ml und das von T-25 Zellkulturflaschen auf 5 ml Gesamtvolumen mit RPMI-Komplettmedium ergänzt.

**Tab. 9:** Volumina für das Passagieren von Zellen

Kulturgefäß	Gesamtfüllvolumen [ml]	PBS [ml]	2x Trypsin/EDTA [ml]	Medium zum Abstoppen des Trypsins [ml]
T-75 Zellkulturflasche	12	10	3	7
T-25 Zellkulturflasche	5	5	1,5	3,5
Six-Well Platte	2	2	0,5	1

#### 2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Auch für die Kryokonservierung von Zellen besaßen die Zellen idealerweise eine Konfluenz von etwa 70-80 %, die zunächst, neben Zellmorphologie, Farbe/Transparenz des Zellkulturmediums und Sterilität, mit Hilfe eines Invertmikroskops beurteilt wurde. Im Anschluss erfolgten die Schritte wie unter 2.2.3 mit dem Unterschied, dass nach dem Absaugen des Überstandes am Ende das Zellpellet in 1-3 ml Kryokonservierungsmedium aufgenommen wurde und je 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen pipettiert wurde. Diese wurde bei -80 °C bzw. in einem Flüssigstickstoffbehälter bei -196 °C gelagert und enthielt idealerweise etwa  $1-2 \times 10^6$  Zellen.

#### 2.2.5 Zellzahlbestimmungen

Zellzahlbestimmungen wurden mit einem automatischen Zellzählgerät, dem NucleoCounter NC-200, durchgeführt. Mit einer Via1-Cassette wurden 60 µl der auszuzählenden Zellsuspension aufgenommen, die dann mitsamt der Messkassette in die vorgesehene Messkammer gesteckt wurde. Dabei lag die Zellkonzentration optimalerweise zwischen  $5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^6$  Zellen/ml, da dies dem optimalen Messbereich des Gerätes entspricht. Mithilfe der beigefügten Farbstoffe Acridinorange und 4',6-

Diamidin-2-phenylindol (DAPI) konnten simultan Zellzahl und Viabilität bestimmt werden. Nach einer Messdauer von wenigen Sekunden erhielt man Messwerte zur Viabilität (%), zu der absoluten Zahl der lebenden Zellen (Zellen/ml), den absoluten Zahl der toten Zellen (Zellen/ml), der Gesamtzellzahl (Zellen/ml), dem geschätzten Zelldurchmesser ( $\mu\text{m}$ ) inklusive Zelldurchmesser-Standardabweichung ( $\mu\text{m}$ ) sowie dem prozentualen Anteil an Zellen, die als zu fünf oder mehr Zellen aggregiert vorlagen (%).

### 2.2.6 siRNA Transfektion (VEGF-C Knockdown)

Zur Herunterregulierung von VEGF-C in PC-3 Zellen wurde eine *small interfering ribonucleic acid (siRNA)* Transfektion durchgeführt. In Vorversuchen, in denen der Effekt verschiedener siRNA-Konzentrationen (10 nM, 25 nM und 50 nM) ausgetestet wurde, zeigte sich für die untersuchten Konzentrationen kein Unterschied in der Effizienz des VEGF-C Knockdowns, sodass die Entscheidung für alle weiteren Versuche auf eine Konzentration von 10 nM fiel, um mögliche *Off-Target* Effekte, wie beispielsweise das *Silencing* nicht vollständig übereinstimmender *messenger RNAs* (mRNAs), zu vermeiden.

Vor der eigentlichen Transfektion im engeren Sinne wurden zunächst PC-3 Zellen in antibiotikafreiem RPMI-Medium (+ 10 % FBS) in Six-Well Platten ausgesät und über Nacht im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In Vorversuchen erwies sich dabei eine Zellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen/Well als sinnvoll. Zur Transfektion wurde am Folgetag der Zellaussaat zunächst die 20  $\mu\text{M}$  siRNA Stammlösung mit Ribonuklease-freiem (RNase-freiem) Wasser auf eine 5  $\mu\text{M}$  siRNA-Lösung verdünnt. Für eine Zielkonzentration von 10 nM wurden pro Well entsprechend 4  $\mu\text{l}$  der 5  $\mu\text{M}$  Lösung mit 196  $\mu\text{l}$  serumfreiem RPMI-Medium durch Auf- und Abpipettieren vermischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Weiterhin wurden pro Well 5  $\mu\text{l}$  Dharmafect2 mit 195  $\mu\text{l}$  serumfreiem RPMI-Medium vermischt und ebenfalls 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden das siRNA-Gemisch und das Dharmafect2-Gemisch zusammengefügt, durch Auf- und Abpipettieren vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es ergab sich ein Volumen von insgesamt 400  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz pro Probe (Well). Während der zwanzigminütigen Inkubationszeit wurde das alte Medium vorsichtig von den Zellen abgesaugt und durch 1600  $\mu\text{l}$  antibiotikafreies RPMI-Medium (+10 % FBS) ersetzt. Mit Ablauf der Inkubationszeit

wurden die 400 µl Transfektionsreagenz langsam und tropfenweise auf das vorgelegte Medium geträufelt. Anschließend wurden die Six-Well Platten geschlossen und vorsichtig auf der Sterilwerkbank in diverse Richtungen geschoben, um eine gleichmäßige Verteilung des Transfektionsreagenzes zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Knockdown-Effizienz überprüft.

#### 2.2.7 Behandlung von LNCaP C4-2b Zellen mit rhVEGF-C

Um Effekte von VEGF-C in Experimenten mit LNCaP C4-2b Zellen zu untersuchen, ist eine Behandlung der Zellen mit rekombinantem humanen VEGF-C (rhVEGF-C) erforderlich, da LNCaP C4-2b ein niedriges endogenes VEGF-C Expressionslevel aufweisen (s. 3.1). Je nach Versuch wurden morgens bis zu  $3 \times 10^5$  Zellen/Well in Six-Well Platten in RPMI-Komplettmedium ausgesät und anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Abends wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch serumfreies RPMI-Medium ersetzt. Anschließend wurden die Platten wieder in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit einer rhVEGF-C-Konzentration von 150 ng/ml behandelt. Die Stammlösung (rhVEGF-C aufgelöst in einem Volumen von 100 µl einer 4 mM HCl, 15 min Inkubation unter Schwenken) besaß eine Konzentration von 250 µg/ml und wurde 1:10 mit serumfreiem RPMI-Medium verdünnt. Zur Behandlung der Zellen mit einer Zielkonzentration von 150 ng/ml wurden 12 µl der verdünnten Lösung auf jeweils ein zu behandelndes Well gegeben. Die Six-Well Platten wurden anschließend verschlossen und vorsichtig auf der Sterilwerkbank hin- und hergeschoben, um das rhVEGF-C gleichmäßig zu verteilen. Als Negativkontrolle (NK) wurde 1:10 mit serumfreiem RPMI-Medium verdünnte 4 mM Salzsäure verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> war die Behandlung mit rhVEGF-C erfolgreich abgeschlossen und die Zellen wurden für weitere Versuche verwendet. Für Koloniebildungsassays mit rhVEGF-C behandelten Zellen wurden die für den Koloniebildungsassay ausgesäten Zellen mit rhVEGF-C behandelt, damit das Ende der 48-stündigen Inkubationszeit mit dem Bestrahlungszeitpunkt zusammenfällt.

### 2.2.8 RNA-Isolation und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Gewinnung von RNA aus Zellen der jeweiligen Zielzelllinie wurden nach gründlicher Reinigung der Arbeitsflächen und Pipetten mit RNase Away unter Verwendung des RNeasy Mini Kits von Qiagen zunächst 350 µl RLT Puffer, der zuvor mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt wurde, auf die Proben, die entweder als Zellpellet oder als Zellen auf einer Six-Well Platte vorlagen, nach Waschen der Zellen/des Pellets mit PBS gegeben. Anschließend wurden die Proben, die sich spätestens zu diesem Zeitpunkt in einem 1,5 ml fassenden Mikroreaktionsgefäß befanden, kräftig für 10 Sekunden auf einem Vortexer durchmischt. Daraufhin wurden die Proben mit 350 µl Ethanol (70 %) versetzt und auf- und abpipettiert, bevor sie dann in eine im Kit enthaltene sog. „*RNeasy Spin Column*“, die zuvor in ein Sammeltube platziert wurde, überführt wurden. Die „*RNeasy Spin Column*“ und das Sammeltube wurden anschließend gemeinsam 15 Sekunden lang bei 10 000 xg in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um evtl. mitgeführte DNA zu zerstören, wurde im Anschluss ein DNaseI Verdau durchgeführt. Es wurden 350 µl RW1 Puffer auf die „*RNeasy Spin Column*“ pipettiert. Es folgten ein Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 10 000 xg und ein Verwerfen der herunterzentrifugierten Flüssigkeit. Dann wurde die „*RNeasy Spin Column*“ für 15 min bei Raumtemperatur mit 80 µl eines Gemisches für den DNaseI Verdau, bestehend aus 10 µl DNaseI Stammlösung und 70 µl RDD Puffer, inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden erneut 350 µl RW1 Puffer auf die „*RNeasy Spin Column*“ gegeben und es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 10 000 xg, an dessen Ende das Verwerfen der herunterzentrifugierten Flüssigkeit stand.

Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt mit 500 µl RPE Puffer wurden nochmals 500 µl RPE Puffer eingesetzt, wobei dieses Mal für 2 min zentrifugiert wurde. Danach wurde die „*RNeasy Spin Column*“ in ein neues Sammeltube platziert und in einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt getrocknet. Zum Schluss wurde die „*RNeasy Spin Column*“ zur Elution in ein 1,5 ml fassendes Sammeltube gesteckt, die Säulenmembran wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser benetzt und eine Minute lang bei 10 000 xg zentrifugiert, sodass die aufgereinigte RNA schlussendlich im 1,5 ml fassenden Sammeltube aufgefangen wurde. Die isolierte RNA wurde entweder unmittelbar nach Gewinnung weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert. Unter Zuhilfenahme des NanoPhotometers N60 konnte die RNA-Konzentration verschiedener Proben

photometrisch ausgemessen werden, indem 1,5 µl der jeweiligen Probe auf die vorgesehene Messfläche des Gerätes pipettiert wurden.

### 2.2.9 cDNA-Synthese

Vor Durchführung der Synthese der *complementary DNA* (cDNA) wurden Arbeitsfläche und Pipetten sorgfältig mit RNase Away gereinigt. Anschließend wurde ein Mastermix auf Eis vorbereitet, der sich aus den folgenden Ingredienzien zusammensetzt:

**Tab. 10:** Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Chemikalie	Menge [µl]
5x Reaction Buffer	4
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,5
Random Hexamer Primer	1
dNTP Mix (10 nM)	2
RevertAid HMinus Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1
RNase-freies Wasser	0,5

Insgesamt ergaben sich somit 9 µl Mastermix pro Probe, denen 11 µl RNA-Probe beigefügt wurden, wobei sich die 11 µl aus 1 µg RNA in RNase-freiem Wasser zusammensetzten. Nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurde die Probe kurz herunterzentrifugiert, um anschließend in einem Thermocycler ein vorgefertigtes cDNA-Syntheseprogramm zu durchlaufen. Dieses wiederum bestand aus den folgenden Schritten:

**Tab. 11:** Inkubationsschritte des cDNA-Syntheseprogramms

Temperatur [°C]	Dauer des Inkubationsschrittes [min]
25	10
42	60
70	10

Die erhaltene cDNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

### 2.2.10 qRT-PCR

Sämtliche Schritte der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Außerdem wurde darauf geachtet, die Lichtexposition des Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 2X möglichst gering zu halten, um einer ungewollten frühzeitigen Aktivierung des Farbstoffes vorzubeugen. In sterilen Nuklease-freien 0,2 ml fassenden Mikroreaktionsgefäßen (8er-Softstipes) wurde ein Reaktionsgemisch auf Eis angesetzt, welches pro Probe die folgenden Komponenten enthielt:

**Tab. 12:** Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die qRT-PCR

Chemikalie	Menge [µl]
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5
Forward Primer	0,25 (= 0,25 µM)
Reverse Primer	0,25 (= 0,25 µM)
Nuklease-freies Wasser	2,5

Nach erfolgreichem Pipettieren aller Bestandteile des Reaktionsgemisches wurde dieses noch einmal durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Beladung der 96-Well Platte erfolgte mit je 8 µl Reaktionsgemisch und 2 µl (= 5 ng) cDNA pro Well. Danach wurde jedes Well durch Auf- und Abpipettieren

gemischt und die 96-Well Platte mit einer PCR-Versiegelungsfolie versiegelt, sodass sie anschließend in einer Zentrifuge für zwei Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert werden konnte. Im letzten Schritt wurde die 96-Well Platte in das 7500 Fast RealTime PCR System platziert und das folgende Programm wurde durchlaufen:

**Tab. 13:** Ablaufplan des verwendeten qRT-PCR Programmes

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 s	40
63	2 s	
60	1 min	
95	15 s	1
60	1 min	
95	30 s	
60	15 s	

Sämtliche qRT-PCR Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode unter Zuhilfenahme der unten angegebenen Formeln mit Excel ausgewertet ( $C_T = \text{cycle threshold}$ ):

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - \text{Housekeeping-Gen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ behandelt} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Als Referenzgen wurde Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) verwendet.

### 2.2.11 Betabestrahlung von Zellen

Die Betabestrahlung von Zellen wurde mit Lutetium-177 durchgeführt, welches im Institut für Nuklearmedizin des UKB durch Dr. rer. nat. Stefan Kürpig und seinem Team jeweils

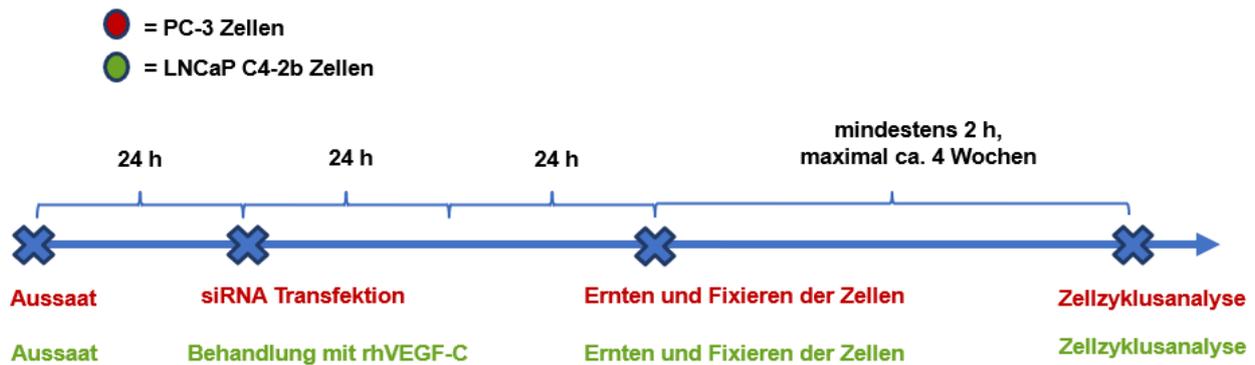
frisch für die entsprechenden Versuche vorbereitet wurde. Hierzu wurden 300-600 MBq [ $^{177}\text{Lu}$ ] $\text{LuCl}_3$  mit 50  $\mu\text{g}$  Dodekan-Tetraessigsäure (DOTA) und 800  $\mu\text{L}$  Puffer (42 mg Gentisinsäure, 210 mg NaAscorbat in 1000  $\mu\text{L}$  0,05 N HCl) bei 95 °C für 60 min erhitzt. Zur Gewährleistung einer rein oberflächlichen Bestrahlung wurde der Komplexbildner DOTA verwendet, um so zu verhindern, dass Lutetium-177 unbeabsichtigt in Ionenkanäle der Zelle gelangt. Das Lutetium-177 lag, mit Natriumchlorid verdünnt, für verschiedene Aktivitätsbereiche in unterschiedlichen Stammlösungen vor und wurde in Volumina von 3-25  $\mu\text{l}$  auf ein Gesamtvolumen von 2 ml/Well einer Six-Well Platte vorsichtig und tropfenweise pipettiert und anschließend durch Bewegungen der Six-Well Platte gleichmäßig verteilt. Es wurde mit Aktivitäten im Bereich von 0,1-20 MBq gearbeitet.

#### 2.2.12 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse erfolgte 48 h nach Behandlung mit rhVEGF-C-behandelten LNCaP C4-2b Zellen sowie mit transfizierten PC-3 Zellen. Geerntet, fixiert und gefärbt wurden die Zellen gemäß „Propidium Iodide (PI) Flow Cytometry Kit for Cell Cycle Analysis“. Es wurden jeweils etwa eine Million Einzelzellen für die Zellzyklusanalyse eingesetzt. Während des dreißigminütigen Inkubationsschritts in der Färbelösung im Dunkeln wurden die Proben alle zehn Minuten kurz auf einem Vortexer durchmischt, um ein gleichmäßiges Verteilen der PI-Färbelösung zu gewährleisten. Anzumerken ist, dass das Vortexen nicht Teil der Anleitung des Kits ist, sondern auf Grundlage von freundlicherweise geteilten Erfahrungswerten der Flow Cytometry Core Facility des UKB durchgeführt wurde.

Im nächsten Schritt wurden, ebenfalls zusätzlich zur Anleitung des Kits, 50  $\mu\text{l}$  FKS sowie 750  $\mu\text{l}$  PBS hinzugegeben. Das FKS diente dabei der Vermeidung von Zellaggregaten.

Die Proben wurden auf Eis in einer geschlossenen Styroporbox in die Core Facility des UKB transportiert und dort mit der FACS Canto II ausgemessen. Die Auswertung der Messdaten inklusive Erstellung der Histogramme wurde mit Hilfe der FlowJo Software (Version 10) unter Verwendung des Watson Pragmatic Modells ebenfalls in der Core Facility des UKB durchgeführt. Abb. 5 fasst den Versuchsaufbau zusammen.



**Abb. 5:** Versuchsaufbau der Zellzyklusanalyse

PC-3 bzw. LNCaP C4-2b Zellen wurden 24 h nach Aussaat behandelt ( $C_{\text{siVEGF-C}} = 10 \text{ nM}$ ;  $C_{\text{rhVEGF-C}} = 150 \text{ ng/ml}$ ) und 48 h nach Behandlung geerntet und fixiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 h wurden die Proben mit PI gefärbt und mit der FACS Canto II ausgemessen. Die weitere Auswertung erfolgte mit FlowJo (Watson Pragmatic Modell).

### 2.2.13 Koloniebildungsassay

Der im Rahmen dieser Dissertation etablierte Koloniebildungsassay dient der Untersuchung des klonogenen Überlebens von Einzelzellen in einer zweidimensionalen Kultur nach Bestrahlung mit dem Betastrahler Lutetium-177 (s. Abb. 6). Das klonogene Überleben ist dabei als Fähigkeit einer Einzelzelle, nach Behandlung eine Kolonie einer Größe von mindestens 50 Zellen zu generieren, definiert (Herrmann et al., 2006). Die verwendeten Zellen besaßen eine Konfluenz von etwa 70-80 %. Transfizierte Zellen wurden 24 h nach stattgehabter Transfektion für den Koloniebildungsassay ausgesät. Die Zellen wurden wie unter 2.2.3 beschrieben, trypsinisiert und als Zellsuspension in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 4 min bei 200 xg, in dessen Anschluss der Überstand abgesaugt wurde. Das Zellpellet wurde in etwa 1,5 ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert. Zur Herstellung einer Stammlösung mit Einzelzellen wurden der Zellsuspension 100 000 Zellen entnommen und in 10 ml RPMI-Komplettmedium überführt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden Zellaggregate aufgelöst, sodass die Zellen als Einzelzellen vorlagen. Die gewünschten Zellzahlen (s.Tab.14), die in Vorversuchen ermittelt wurden, wurden in Six-Well Platten pipettiert und jedes Well wurde mit RPMI-Komplettmedium auf 2 ml aufgefüllt. Mittels Auf- und Abpipettieren sowie Hin- und Herschieben der Platte in der Horizontalebene wurde für

eine gleichmäßige Verteilung von Einzelzellen gesorgt. Die Six-Well Platten wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und etwa 4-5 h später, d.h. nach ihrem Anwachsen an die Kunststoffoberfläche des jeweiligen Wells, mit auf 37 °C vorgewärmten Kühlpacks in einer Styroporbox in das Institut für Nuklearmedizin des UKB transportiert. Dort wurden sie über Nacht im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Somit konnten die Zellen 24 h nach Aussaat mit Lutetium-177 bestrahlt werden. Weitere 24 h später wurden die Zellen dreimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und für die restliche, zelllinienspezifische Anzahl an Tagen (PC-3 und LNCaP C4-2b: 10 d, LNCaP: 14 d) in 2 ml neuem RPMI-Komplettmedium inkubiert.

Zum Stoppen der Koloniebildungsassays wurden die Six-Well Platten mit PBS gewaschen, zur Fixierung zehn Minuten in 80 % Ethanol (800 ml Ethanol auf 1 l vollentsalztes Wasser) und zur Färbung 30 min in Coomassie Brilliant Blue (20 % Methanol, 7,5 % Eisessig, 0,5 g Coomassie G250 auf 1 l) inkubiert. Ausgezählt wurden die Kolonien mit  $\geq 50$  Zellen unter einem Auflichtmikroskop. Für die Versuchsauswertung wurden folgende Größen verwendet:

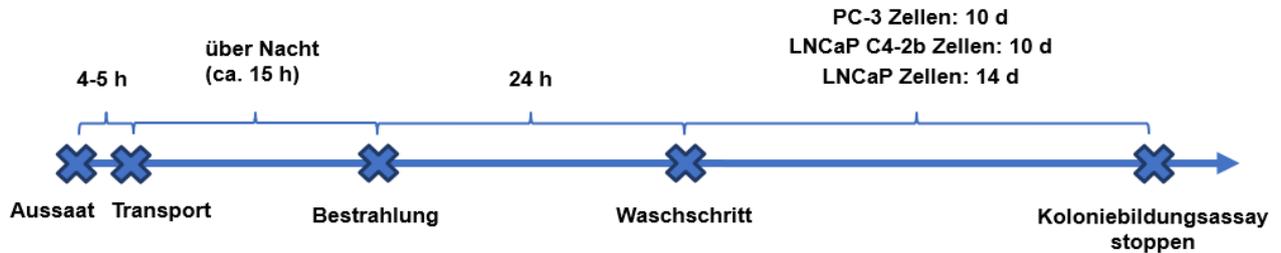
$$\text{Plattierungseffizienz (PE)} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Kolonien}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen}} \cdot 100$$

$$\text{Überlebensfraktion (SF)} = \frac{PE(\text{bestrahlt})}{PE(\text{unbestrahlt})}$$

Für die vorliegende Arbeit wurde uns durch das Institut für Nuklearmedizin zum Vergleich von Versuchen, die mit Röntgenstrahlung am UKD und mit einem Betastrahler (Lutetium-177) hier durchgeführt wurden, eine Annäherung eines Zusammenhangs zwischen Dosis und Aktivität für die Bedingungen der hier verwendeten Koloniebildungsassays freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Dieser ergibt sich wie folgt: Ein Well hat die Fläche  $F = 10 \text{ cm}^2$  und ein Füllvolumen  $V = 2 \text{ cm}^3$ . Daraus berechnet sich die Füllhöhe zu  $h = 0,2 \text{ cm}$ . Der mittlere Abstand der Zellen in der Flüssigkeit wurde auf 1 mm geschätzt. Mithilfe der Olinda-Software wurde der S-Wert (mittlere absorbierte Dosis/Aktivität) als  $S = 0,77 \text{ Gy/MBq} \cdot \text{h}$  ermittelt. Für die Dosis  $D$  gilt  $D = \int_0^T A_0 e^{-\lambda t} dt \cdot S = \frac{A_0}{\lambda} (1 - e^{-\lambda T}) \cdot S$ , wobei  $T$  die Inkubationszeit ist und die Zerfallskonstante für Lutetium-177 etwa  $0,00429 \frac{1}{\text{h}}$  beträgt.

Es ergibt sich:  $D = A_0 \left(1 - e^{-0,00429 \frac{1}{h} T}\right) \cdot 179,49 \text{ Gy/MBq}$ .



**Abb. 6:** Versuchsaufbau des Koloniebildungsassays

Definierte Zellzahlen wurden als Einzelzellen ausgesät. Nach einer Inkubation von 4-5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Six-Well Platten in das Institut für Nuklearmedizin transportiert und über Nacht inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), um am nächsten Morgen mit Lutetium-177 bestrahlt zu werden. Nach 24 h wurde das Lutetium-177-haltige Medium entfernt, die Zellen dreimal mit je 2 ml 1X PBS gewaschen und mit 2 ml neuem RPMI-Komplettmedium versorgt. Nach einer zelllinienspezifischen Inkubationszeit (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), wurden die Zellen mit 80 % Ethanol fixiert und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Das Auszählen der Kolonien (≥ 50 Zellen) erfolgte unter einem Auflichtmikroskop.

**Tab. 14:** Für den Koloniebildungsassay ausgesäte Zellzahlen in Abhängigkeit von der Aktivität

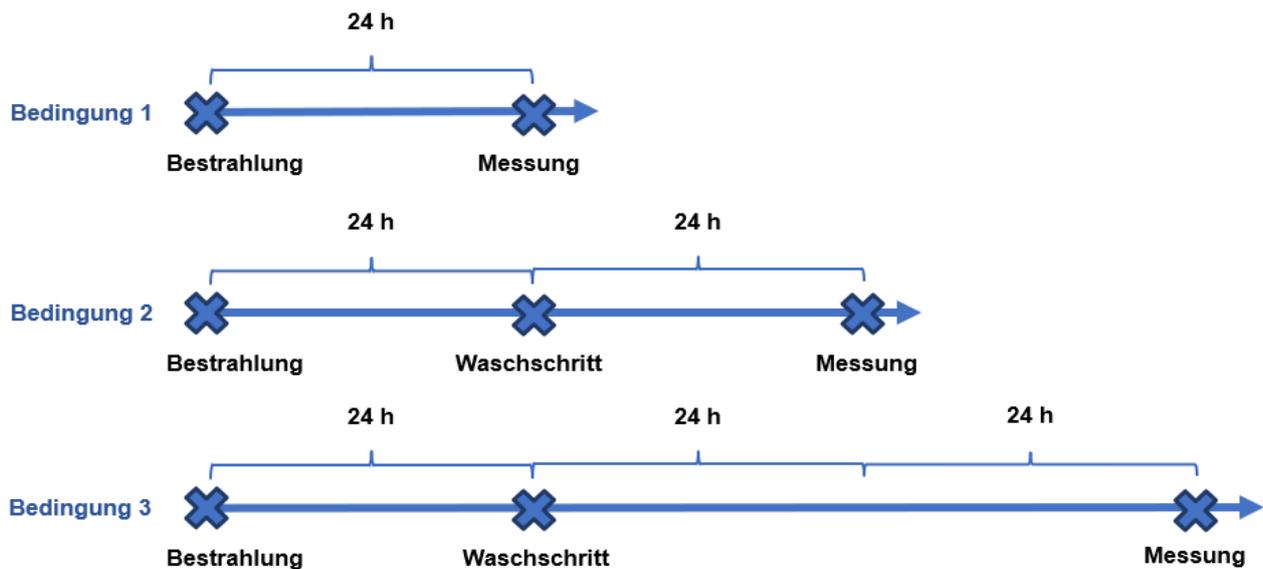
Aktivität [MBq]	Ausgesäte Zellzahl
0	550
0,1	900
0,5	900
1	900
2,5	900
5	5000
10	15.000
20	15.000

#### 2.2.14 Viabilitätsassay

Um Kurzzeiteffekte der Betabestahlung von Zellen zu untersuchen, wurde ein sog. „Viabilitätsassay“ konzipiert, welcher die Auswirkungen der durch das Lutetium-177 emittierten ionisierenden Strahlung auf die Zellviabilität greifbar macht (s. Abb. 7). Die Viabilität errechnet sich dabei als prozentualer Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl und wurde in dieser Arbeit von einem automatischem Zellzählgerät, dem NucleoCounter NC-200 erfasst (s. 2.2.5). In Vorversuchen zeigte sich eine Zellzahl von 100 000 Zellen/Well einer Six-Well Platte als geeignet, um eine angemessene Konfluenz der Zellen zu erzielen. Anschließend wurden die Zellen nach Durchlaufen der Schritte wie unter 2.2.14 beschrieben im Institut für Nuklearmedizin mit Lutetium-177 mit den Aktivitäten 0/1/2,5/5/10/20 MBq bestrahlt (s. 2.2.11).

Unter Bedingung 1 inkubierten die Zellen anschließend 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, um im nächsten Schritt geerntet, d.h. trypsiniert und als Zellsuspension in 2 ml fassende Mikroreaktionsgefäße überführt, zu werden. Pro Probe wurde jeweils eine Via1-Cassette beladen und ausgemessen (s. 2.2.5).

Für Bedingung 2 und 3 erfolgten nach 24 h zunächst drei Waschschrte mit je 2 ml PBS, bevor die Zellen dann für Bedingung 2 weitere 24 h und für Bedingung 3 weitere 48 h in jeweils 2 ml neuem RPMI-Komplettmedium bis zum Zeitpunkt der Ernte und Ausmessung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.



**Abb. 7:** Versuchsaufbau des Viabilitätsassays

100 000 Zellen/Well wurden in Six-Well Platten ausgesät und am nächsten Tag im Institut für Nuklearmedizin mit Lutetium-177 bestrahlt. Nach 24 h Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen für Bedingung 1 geerntet und mit einem Nucleocounter NC-200 ausgemessen. Für Bedingung 2 und 3 folgten 24 h nach Bestrahlung jeweils drei Waschschrte mit je 2 ml 1X PBS sowie ein anschließendes Versorgen der Zellen mit neuem RPMI-Komplettmedium. Für Bedingung 2 inkubierten die Zellen hiernach weitere 24 h und für Bedingung 3 weitere 48 h bevor sie geerntet und ausgemessen wurden.

### 2.2.15 Statistik

Für sämtliche Versuche wurden Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) berechnet. Versuche, in denen zwei Gruppen verglichen wurden, wurden mit Microsoft Excel und dem t-Test für unabhängige Stichproben (zweiseitig, homoskedastisch) ausgewertet. Für Versuche, in denen mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, wurde eine *analysis of variance* (ANOVA) inklusive *multiple comparisons* mit GraphPad Prism durchgeführt. Für die statistische Auswertung der Koloniebildungsassays wurde der F-Test verwendet.

Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von  $p \leq 0,05$  (\*) definiert. Es gilt die folgende Einstufung der Signifikanzniveaus (s. Tab. 15):

**Tab. 15:** Signifikanzniveaus

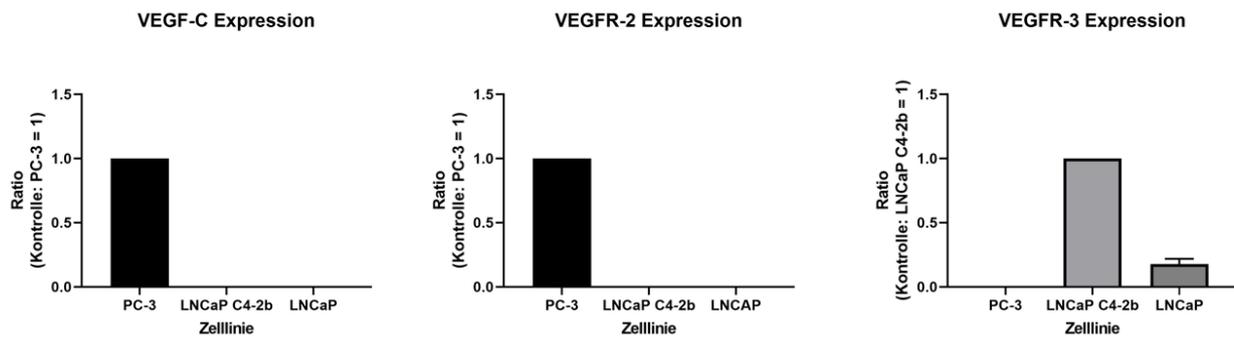
p-Wert	Symbol
$p \leq 0,05$	*
$p \leq 0,01$	**
$p \leq 0,001$	***
$p = 0,0001$	****

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen: VEGF-C/VEGFR-2/VEGFR-3 Expression

Thema dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit dem radioaktiven Isotop Lutetium-177. Vor diesem Hintergrund ist zunächst die Kenntnis der Unterschiede in der VEGF-C und VEGFR-2/VEGFR-3 Expression der eingesetzten Zelllinien zur korrekten Versuchsplanung und -auswertung unabdingbar. Entsprechend wurde die Expression von VEGF-C in den verwendeten Zelllinien durch qRT-PCR bestimmt. Die eingesetzten Proben wurden mittels RNA-Isolation aus PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen und daran anschließender cDNA-Synthese gewonnen. Die Auswertung erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode und PC-3 als Kontrollzelllinie. Die Expression von VEGFR-2 und VEGFR-3 wurde in analoger Vorgehensweise ermittelt. Als Kontrollzelllinie diente PC-3 für VEGFR-2 und LNCaP C4-2b für VEGFR-3. Wir entschieden uns somit aus den uns vorrätigen Zelllinien jeweils für die Zelllinie mit der höchsten relativen Expression als Kontrollzelllinie.

Wie in Abb. 8 zu erkennen ist, wiesen PC-3 Zellen ein hohes Expressionslevel von VEGF-C auf (Ratio =  $1,00 \pm 0,00$ ). LNCaP C4-2b Zellen (Ratio =  $0,00 \pm 0,00$ ) und LNCaP Zellen (Ratio =  $0,00 \pm 0,00$ ) hingegen exprimierten kein VEGF-C. PC-3 Zellen wiesen zudem ein hohes Expressionslevel von VEGFR-2 auf (Ratio =  $1,00 \pm 0$ ) und exprimierten keinen VEGFR-3 (Ratio =  $0,00 \pm 0,04$ ). LNCaP C4-2b Zellen wiesen ein hohes Expressionslevel an VEGFR-3 (Ratio =  $1,00 \pm 0,00$ ) auf und exprimierten keinen VEGFR-2 (Ratio =  $0,00 \pm 0,00$ ).



**Abb. 8:** Relative VEGF-C/VEGFR-2/VEGFR-3 Expression in PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen

RNA aus den jeweiligen Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Ausgewertet wurde anschließend mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode und PC-3 bzw. LNCaP C4-2b als Kontrollzelllinie. Dargestellt sind die relative VEGF-C Expression, die relative VEGFR-2 Expression und die relative VEGFR-3 Expression. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; n = 3.

### 3.2 Einfluss von VEGF-C auf den Zellzyklus

Arbeitshypothese: VEGF-C hat durch eine mögliche Zellzyklusmodulation einen Einfluss auf die Strahlensensibilität von Prostatakarzinomzellen.

Nach Aufdeckung der Unterschiede in der VEGF-C und VEGFR-2/VEGFR-3 Expression der verwendeten Zelllinien erfolgte zur ersten Annäherung an die zentrale Fragestellung dieser Arbeit die Untersuchung eines möglichen Einflusses von VEGF-C auf den Zellzyklus, insbesondere auf die G2/M-Phase. Da die verschiedenen Zellzyklusphasen eine unterschiedliche Strahlensensibilität besitzen (s.1.5.3), ist es von Bedeutung zu klären, inwieweit VEGF-C eine Zellzyklusmodifikation vornehmen kann. Bekanntermaßen stellt die G2/M-Phase des Zellzyklus eine besonders radiosensitive Phase dar (Pawlik und Keyomarsi, 2004). Hintergrund ist außerdem, dass die für die Tumorprogression essenzielle ungehemmte Zellproliferation u. a. durch Modifikationen auf Zellzyklusebene ermöglicht wird (Gutschner und Diederichs, 2012). Noch unpublizierte Daten aus PD Dr. med. Michael Muders' Labor wiesen zudem auf eine potenzielle Zellzyklusmodifikation durch VEGF-C hin. Mit Blick auf diese Ergebnisse wurde insbesondere eine mögliche Zellzyklusmodifikation in der G2/M-Phase durch VEGF-C untersucht, die wiederum einen

möglicherweise vorhandenen Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 erklären könnte.

### 3.2.1 Zellzyklusanalyse mit PC-3 Zellen

Nach Auswertung der Versuchsdaten mittels *one-way* ANOVA zeigte sich bei keiner Zellzyklusphase ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen und den mit *srcambled small interfering ribonucleic acid* (siSCR) behandelten Zellen (s. Abb. 9), sodass nachfolgend nur die Unterschiede zwischen siSCR und siVEGF-C behandelten Zellen betrachtet werden. Die G2-Phase wurde als Surrogatparameter für die in ihr mit gemessene G2/M-Phase (G2/M Übergang) verwendet, da sich wegweisende prozentuale Verschiebungen mit Wirkung auf die G2/M-Phase als solche in logischer Konsequenz auch in der G2-Phase zeigen würden.

Im Vergleich zur Kontrolle wurde bei VEGF-C Depletion eine signifikante Erhöhung an Zellen in der G1-Phase sowie eine Reduktion des Zellanteils in der S-Phase beobachtet (s. Abb. 9B-C) Eine Veränderung der Zellfraktion in der G2-Phase des Zellzyklus war, entgegen den o.g. Voruntersuchungen, allerdings nicht zu erkennen (s. Abb. 9D).

### 3.2.2 Zellzyklusanalyse mit LNCaP C4-2b Zellen

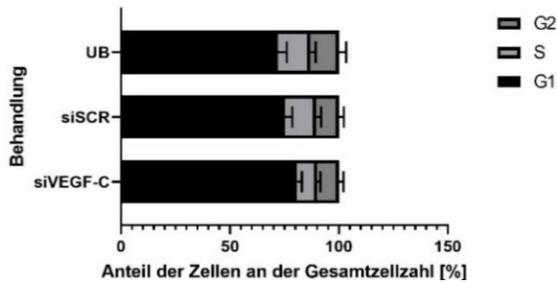
Auch hier zeigte sich nach Auswertung der Versuchsdaten mittels *one-way* ANOVA bei keiner Zellzyklusphase ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen und den Negativkontrollen, sodass nachfolgend die Unterschiede zwischen Negativkontrolle und rhVEGF-C behandelten Zellen betrachtet werden. Passend zu den Ergebnissen für die Zellzyklusanalyse mit PC-3 konnte ebenfalls bei den LNCaP C4-2b Zellen in der G2-Phase kein signifikanter Unterschied in den Häufigkeitsverteilungen zwischen rhVEGF-C behandelten Zellen und Zellen der Negativkontrolle dokumentiert werden. Anders als bei den PC-3 Zellen zeigte sich hier jedoch weder in der G1- noch in der S-Phase ein signifikanter Unterschied zwischen rhVEGF-C behandelten Zellen und Zellen der Negativkontrolle (s. Abb. 10).

Es zeigen sich also zelllinienabhängig unterschiedliche Ergebnisse, sodass VEGF-C auf der Grundlage der Resultate aus der Zellzyklusanalyse nicht als potentieller prädiktiver Marker für die <sup>177</sup>Lu-PSMA-Therapie herausgestellt werden kann. Um die Eignung VEGF-

Cs als prädiktiven Marker besser einzuschätzen, wurde im Weiteren losgelöst von einem potenziellen Mechanismus der Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Bestrahlung mit Lutetium-177 untersucht.

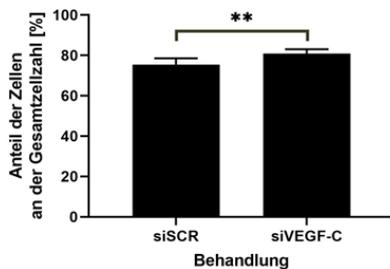
A

## PC-3 Zellen: Übersicht Zellzyklusanalyse



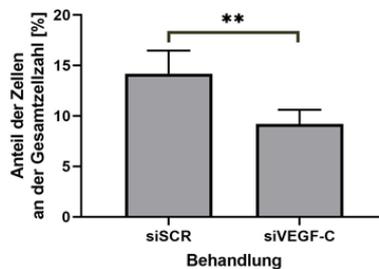
B

## PC-3 Zellen: G1



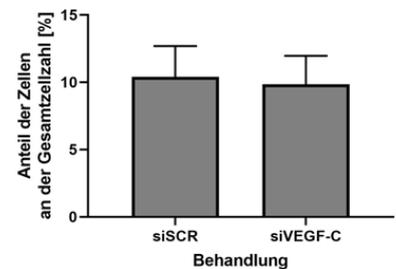
C

## PC-3 Zellen: S



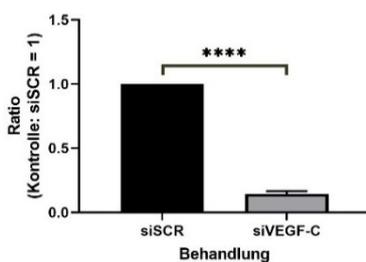
D

## PC-3 Zellen: G2



E

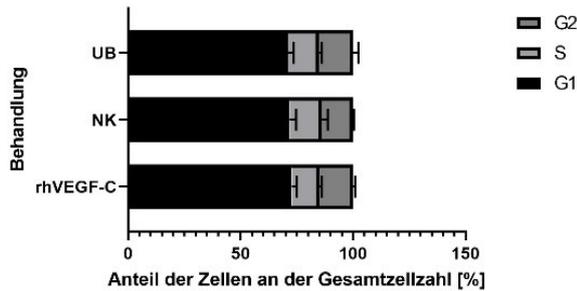
## VEGF-C Knockdown in PC-3 Zellen

**Abb. 9:** Zellzyklusanalyse mit PC-3 Zellen

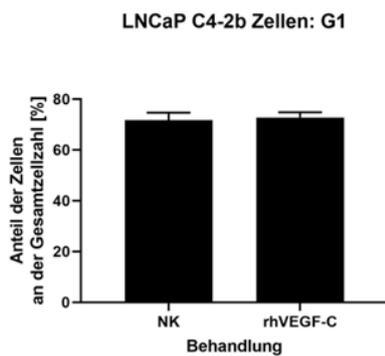
PC-3 Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit siVEGF-C bzw. siSCR (c = 10 nM) behandelt, 48 h nach Behandlung geerntet, fixiert und im nächsten Schritt mit der FACS Canto II ausgemessen. A zeigt den Anteil der Zellen an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der Behandlung für jede Zellzyklusphase. B-D stellt die Ergebnisse nach Zellzyklusphase geordnet dar. E stellt den erfolgreichen und signifikanten VEGF-C Knockdown dar. Die G1-Phase zeigte eine signifikante Erhöhung, die S-Phase eine signifikante Erniedrigung der siVEGF-C behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die G2-Phase zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; n = 6 (t-test).

A

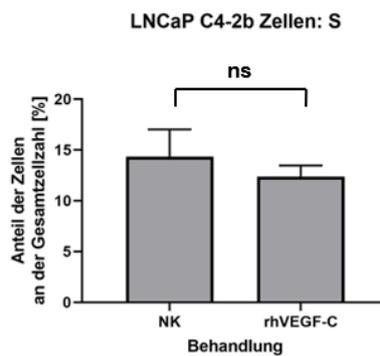
## LNCaP C4-2b Zellen: Übersicht Zellzyklusanalyse



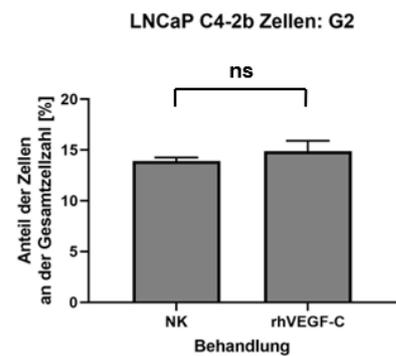
B



C



D

**Abb. 10:** Zellzyklusanalyse mit LNCaP C4-2b

LNCaP C4-2b Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit 150 ng/ml rhVEGF-C bzw. 1:10 mit serumfreiem Medium verdünnter 4 nM Salzsäure (NK) behandelt. Die Zellen wurden 48 h nach Behandlung geerntet, fixiert und im nächsten Schritt mit der FACS Canto II ausgemessen. Es besteht in keiner Zellzyklusphase ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen. A zeigt den Anteil der Zellen an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der Behandlung für jede Zellzyklusphase. B stellt die Ergebnisse nach Zellzyklusphase geordnet dar. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; n=3 (t-test), ns = nicht signifikant.

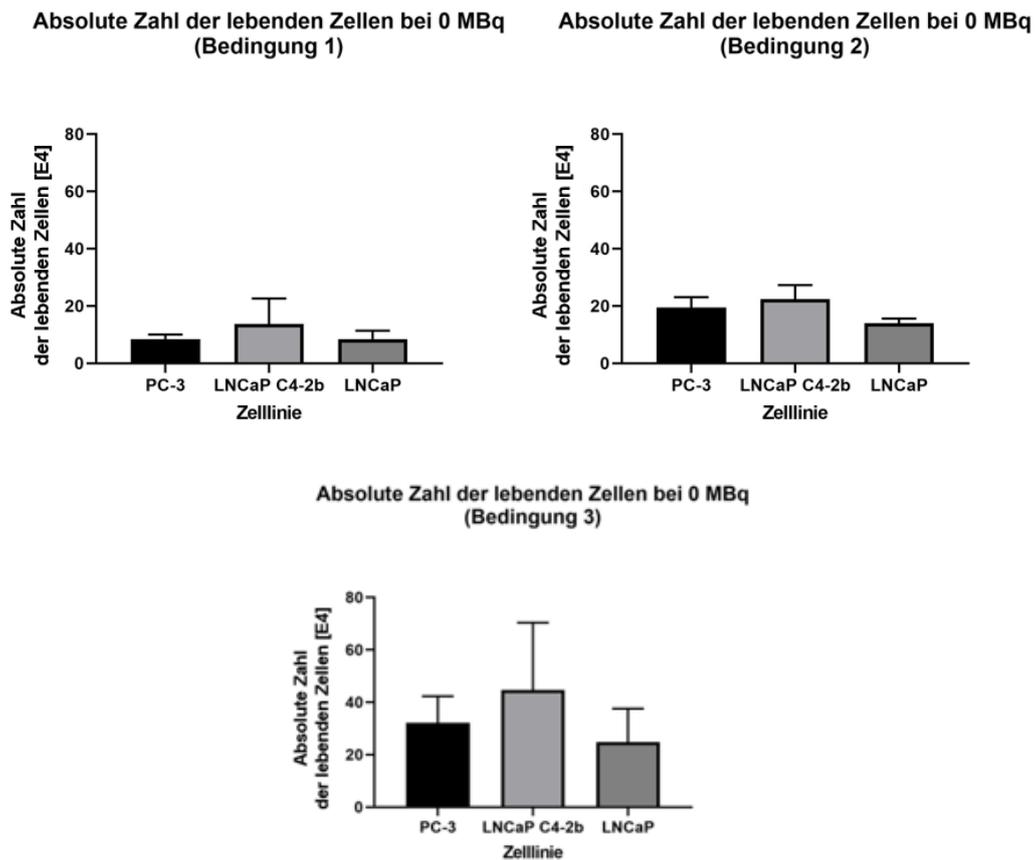
### 3.3 Einfluss von Lutetium-177 auf PC-3, LNCaP C42b und LNCaP Zellen

Arbeitsziel: Etablierung von Bestrahlungsversuchen mit Prostatakarzinomzellen und Lutetium-177

Bevor eine Investigation der Rolle von VEGF-C bei Betabestrahlung von Prostatakarzinomzellen mit Lutetium-177 durchgeführt werden konnte, war es zunächst von zentraler Bedeutung, den Einfluss der ionisierenden Strahlung losgelöst vom Kontext einer VEGF-C Vorbehandlung der Zellen zu untersuchen, um ein besseres Bild der Auswirkungen dieser speziellen Bestrahlungsart allein auf das Zellüberleben zu erhalten. Es wurde schrittweise eine bislang für das UKB neue experimentelle Methode etabliert. Es wurden Kurzzeiteffekte mit dem unter 2.2.14 beschriebenen Viabilitätsassay und Langzeiteffekte mit dem unter 2.2.13 beschriebenen Koloniebildungsassay betrachtet. Mithilfe der Kurzzeiteffekte sollte ein erster Eindruck gewonnen werden, welchen Effekt Lutetium-177 hinsichtlich der absoluten Zahl der lebenden Zellen und der Viabilität auf die verwendeten Zelllinien besitzt.

#### 3.3.1 Anwachsen der verschiedenen Zellen unter den Versuchsbedingungen des Viabilitätsassays

Unterschiedliches Anwachsen der verschiedenen Zelllinien kann die nachfolgenden Versuchsergebnisse beeinflussen. Daher wurde in einem ersten Schritt das Anwachsen dieser Zelllinien untersucht. Abb. 7 fasst die Versuchsbedingungen zusammen. Wie Abb. 11 zu entnehmen ist, bestanden im nativen, unbestrahlten Zustand (0 MBq) zwischen den Zelllinien PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die absolute Zahl der lebenden Zellen 48 h (Bedingung 1), 72 h (Bedingung 2) und 96 h (Bedingung 3) nach Aussaat. Die Zelllinien hielten den Versuchsbedingungen somit in vergleichbarem Maße stand, sodass von vergleichbaren Startbedingungen ausgegangen werden konnte.



**Abb. 11:** Anwuchsbedingungen der Zelllinien unter den Versuchsbedingungen des Viabilitätsassays

Betrachtet wurden die absolute Zahl der lebenden Zellen aller Zelllinien für die verschiedenen Messbedingungen bei 0 MBq. Die Diagramme sind nach Messbedingungen (Bedingung 1 = 48 h nach Aussaat, Bedingung 2 = 72 h nach Aussaat, Bedingung 3 = 96 h nach Aussaat) und dementsprechend nach der Zeit nach Aussaat sortiert. Es zeigte sich für keinen Zeitpunkt nach Aussaat ein signifikanter Unterschied in der absoluten Zahl der lebenden Zellen zwischen den verschiedenen Zelllinien. Die Ergebnisse sind als  $MW \pm SD$  dargestellt;  $n = 3$  (*one-way ANOVA*).

### 3.3.2 Kurzzeiteffekte der Bestrahlung mit Lutetium-177

Um eine Ersteinschätzung über einen sinnvollen Behandlungszeitraum sowie über den Einfluss der Bestrahlung auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien zu gewinnen, wurden zunächst Kurzzeiteffekte der Bestrahlung mit Lutetium-177 untersucht. Zellen wurden 24 h mit Lutetium-177 behandelt und die Wirkung auf die Zellen im direkten Anschluss oder nach 24 h bzw. 48 h Regenerationszeit gemessen (Bedingung 1 = 24 h

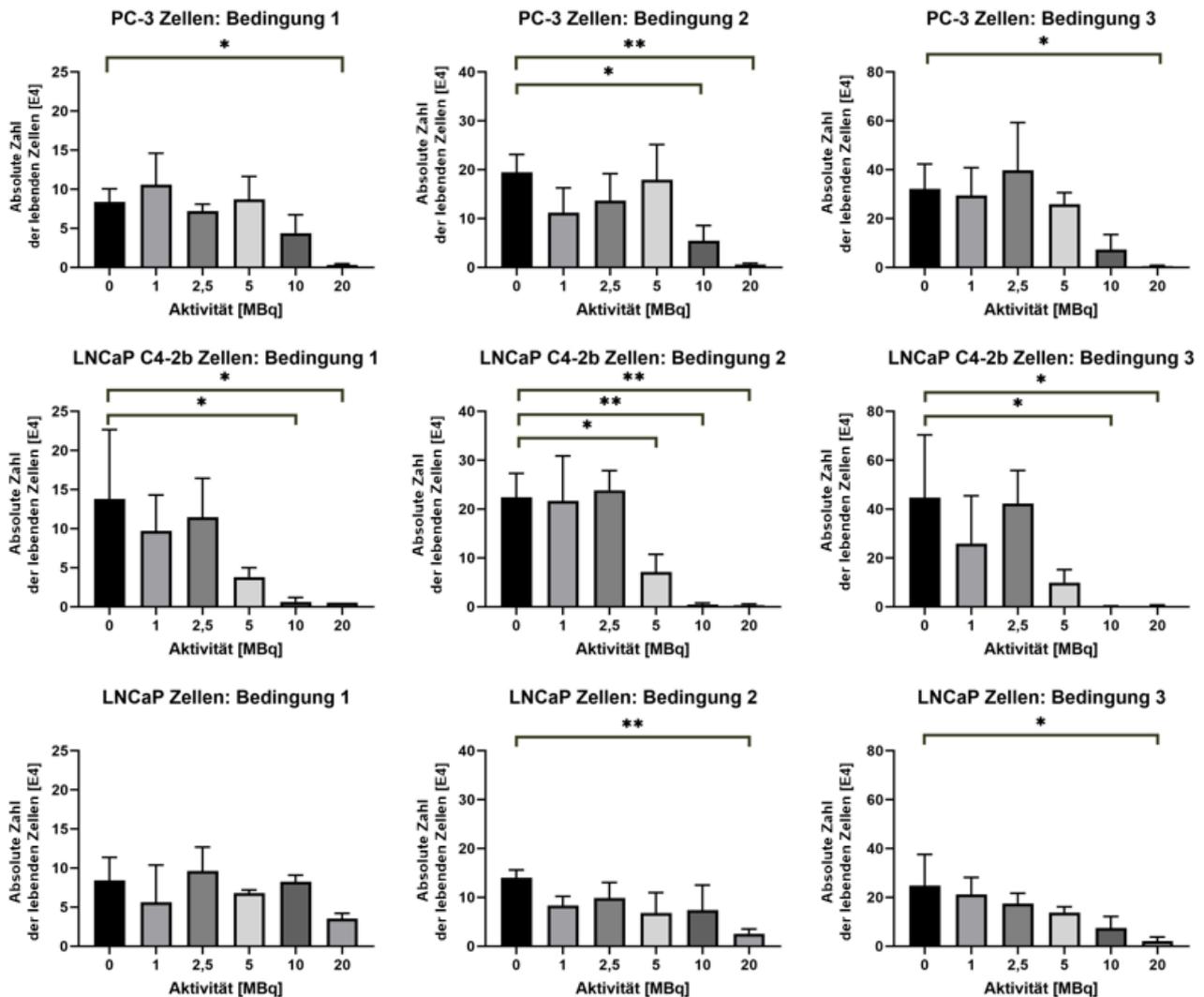
nach Bestrahlung, Bedingung 2 = 48 h nach Bestrahlung, Bedingung 3 = 72 h nach Bestrahlung). Zelllinienunabhängig zeigte sich in Bezug auf die Kurzzeiteffekte bei allen drei Messbedingungen ein signifikanter Abfall der gemessenen absoluten Zahl der lebenden Zellen erst bei höheren Aktivitäten im Bereich von 5 bis 20 MBq. Bei allen drei Zelllinien wurden die Effekte größter Signifikanz unter Bedingung 2 gemessen. Auch konnten die Effekte bei Bedingung 2 bereits bei niedrigeren Aktivitäten als bei Bedingung 1 und 3 gemessen werden (Ausnahme: LNCaP-Zellen). Die Zelllinien verhielten sich hinsichtlich der strahleninduzierten Kurzzeiteffekte unter den verschiedenen Messbedingungen insgesamt ähnlich (s. Abb. 12).

PC-3 Zellen zeigten einen signifikanten Abfall der absoluten Zahl der lebenden Zellen frühestens bei einer Aktivität von 10 MBq bei Bedingung 2. Bei Bedingung 1 und 3 konnte ein solcher Abfall erst bei 20 MBq beobachtet werden. Weiterhin erwähnenswert ist, dass der Abfall der absoluten Zahl der lebenden Zellen von 0 MBq auf 20 MBq zwar bei allen drei Bedingungen signifikant war, doch die höchste Signifikanz bei Bedingung 2 besaß. Bei einer durch lineare Regression ermittelten Verdopplungszeit für PC-3 Zellen von etwa 43,73 h entsprach die Inkubationszeit maximal 1,65 Mitosen. Somit konnte zusätzlich zu den Direktschäden ein sich im Laufe der ersten bis beginnenden zweiten Mitose entwickelnder strahleninduzierter Effekt beobachtet werden. In Bedingung 3, d.h. näherungsweise im weiteren Verlauf der zweiten Mitose, konnte dieser zusätzliche Effekt nicht mehr beobachtet werden.

Der Viabilitätsassay mit LNCaP C4-2b Zellen zeigte ebenfalls einen signifikanten Abfall der absoluten Zahl der lebenden Zellen erst bei höheren Aktivitäten. Es zeigten sich hier jedoch bei Bedingung 2 bereits ab einer Aktivität von 5 MBq signifikante Effekte und für Bedingung 1 und 3 konnte ein signifikanter Abfall der absoluten Zahl der lebenden Zellen bereits bei 10 MBq verbucht werden. Insgesamt sprachen die LNCaP C4-2b Zellen in Bezug auf die Kurzzeiteffekte folglich stärker als die PC-3 Zellen (und auch als die LNCaP Zellen, siehe unten) auf die Bestrahlung mit Lutetium-177 an. Bei einer durch lineare Regression ermittelten Verdopplungszeit für LNCaP C4-2b Zellen von etwa 30,22 h entsprach die Inkubationszeit maximal 2,38 Mitosen. Es konnte auch hier, wie bei den PC-3 Zellen, zusätzlich zu den Direktschäden ein sich erst im Laufe der Mitosen entwickelnder strahleninduzierter Effekt beobachtet werden. Auch hier entsprach die

Latenzzeit bis zu den zusätzlichen Strahlenschäden ebenfalls etwa einer bis zwei Mitosen und die Effekte konnten ebenfalls bei dieser Zelllinie etwa ab dem Übergang von der zweiten zur dritten Mitose, also bei Bedingung 3, nicht mehr beobachtet werden.

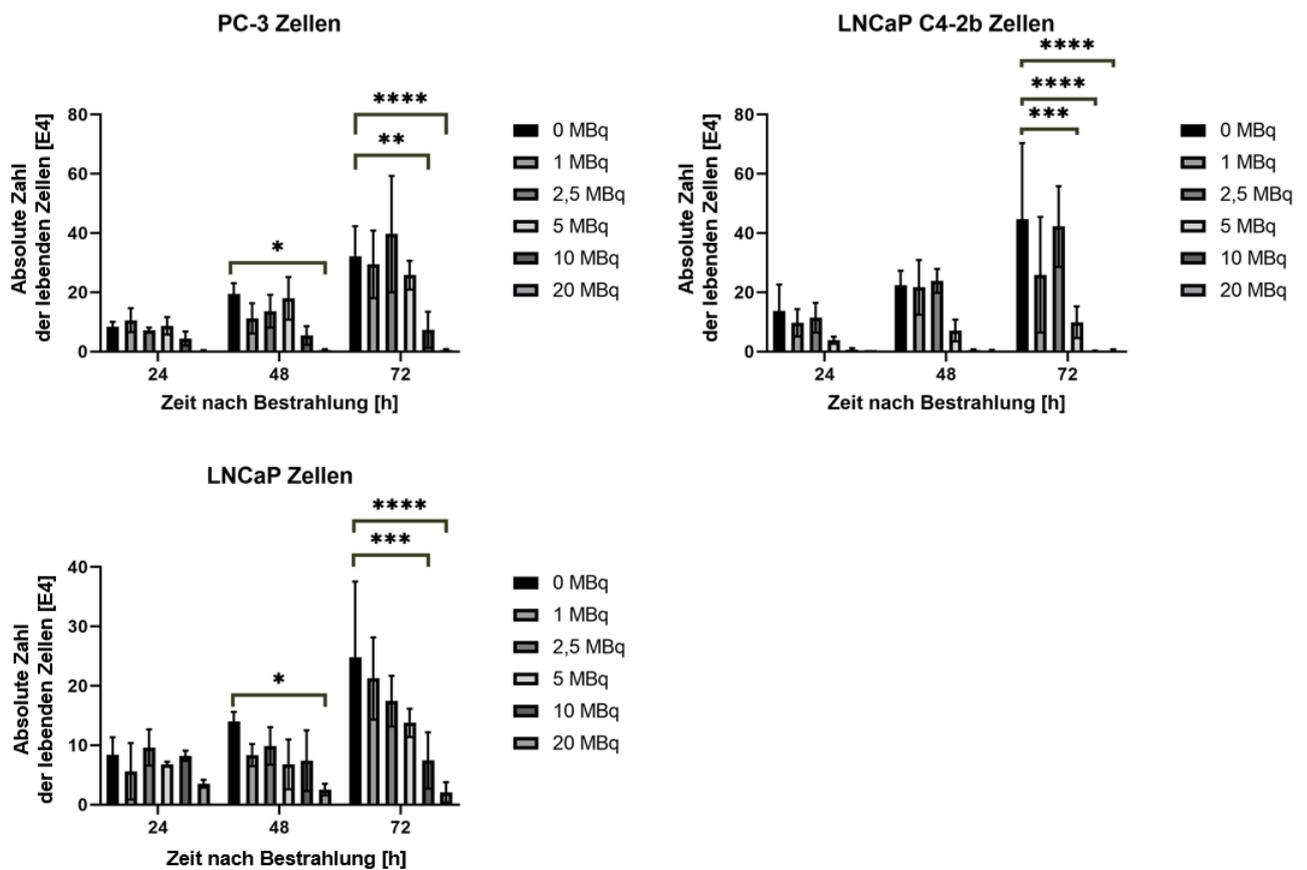
Schließlich zeigte auch der Viabilitätsassay für LNCaP Zellen einen signifikanten Abfall der absoluten Zahl der lebenden Zellen erst bei hohen Aktivitäten. Bei Bedingung 1 konnte hier im Gegensatz zu den anderen Zelllinien kein signifikanter Abfall der absoluten Zahl der lebenden Zellen festgestellt werden. Erst bei längeren Inkubationszeiten (Bedingung 2 und 3) zeigten sich signifikante Effekte ab einer Aktivität von 20 MBq, wobei auch hier die Effekte bei Bedingung 2 am stärksten waren. Bei einer durch lineare Regression ermittelten Verdopplungszeit für LNCaP Zellen von etwa 63,49 h unterzog sich der Großteil der Zellen am ehesten erst in Bedingung 3 einer vollständigen Zellteilung. Ein zusätzlich zu den Direktschäden, sich erst im Laufe dieser Mitose(n) entwickelnder strahleninduzierter Effekt ist somit aufgrund der langen Verdopplungszeit nicht hinreichend beurteilbar. Verglichen mit den beiden anderen Zelllinien und bezogen auf die Kurzzeiteffekte imponierten die LNCaP Zellen als die strahlenresistentesten Zellen. Abb. 12 fasst die Ergebnisse zusammen.



**Abb. 12:** Viabilitätsassays mit PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP nach Messbedingung sortiert

Je 100 000 Zellen/Well wurden in Six-Well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit Lutetium-177 bestrahlt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen für Bedingung 1 geerntet und mit Hilfe eines Nucleocounters NC-200 ausgemessen. Für Bedingung 2 und 3 folgten 24 h nach Bestrahlung jeweils drei Waschschritte sowie ein anschließendes Versorgen der Zellen mit neuem RPMI-Komplettmedium. Für Bedingung 2 inkubierten die Zellen hiernach weitere 24 h und für Bedingung 3 weitere 48 h bevor sie geerntet und ausgemessen wurden. Die absolute Zahl der lebenden Zellen ist sortiert nach Versuchsbedingung in Abhängigkeit von der Aktivität gezeigt. Ein signifikanter Abfall der gemessenen absoluten Zahl der lebenden Zellen wurde erst bei höheren Aktivitäten beobachtet. Bei allen drei Zelllinien wurden die stärksten Effekte unter Bedingung 2 gemessen. Die Ergebnisse sind als MW ± SD dargestellt; Signifikanzen nur auf 0 MBq bezogen; n = 3 (*one-way ANOVA*).

Bei Betrachtung der absoluten Zahl der lebenden Zellen im zeitlichen Verlauf (Zeit nach der Bestrahlung in Stunden) erkannte man bei allen Zelllinien deutlich einen Verlust der mitotischen Aktivität der bestrahlten Zellen bei größeren Aktivitäten (s. Abb. 13). Führt man eine *2way ANOVA* mit *multiple comparisons (within each column, compare rows)* durch, so erhält man einen (aufgrund statistischer Schwankungen) groben Anhaltspunkt dafür, ab wann die Zellen ihre mitotische Aktivität verlieren: Bei LNCaP Zellen war ab 2,5 MBq kein signifikantes Zellwachstum mehr zu dokumentieren, bei LNCaP C4-2b ab 5 MBq und bei PC-3 Zellen ab 10 MBq. Bezogen auf die Teilungsfähigkeit imponierten daher LNCaP Zellen als empfindlichste Zellen und PC-3 Zellen als robusteste. Die lineare Regression der Werte für die absoluten Zahlen der lebenden Zellen in Abhängigkeit von der Zeit ergab bei allen drei Zelllinien erstmals eine negative Steigung ab 10 MBq. Die Zellen verloren ihre mitotische Aktivität folglich näherungsweise im Bereich zwischen 5 MBq und 10 MBq. Dies ist auch anhand der Balkendiagramme (s. Abb. 13) nachvollziehbar.



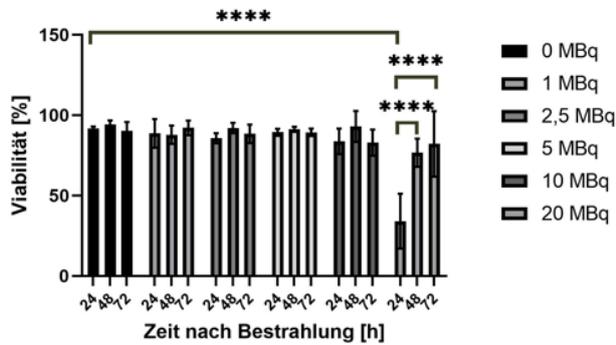
**Abb. 13:** Absolute Zahl lebender Zellen im zeitlichen Verlauf

Die absolute Zahl lebender Zellen ist im zeitlichen Verlauf (Zeit nach der Bestrahlung) dargestellt. Zu erkennen ist ein Erhalt der mitotischen Aktivität der Zellen bei niedrigeren Aktivitäten, während höhere Aktivitäten mit einem größeren Verlust der mitotischen Aktivität einhergingen. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; Signifikanzen nur auf 0 MBq bezogen;  $n = 3$  (2way ANOVA, multiple comparisons: within each row, compare columns).

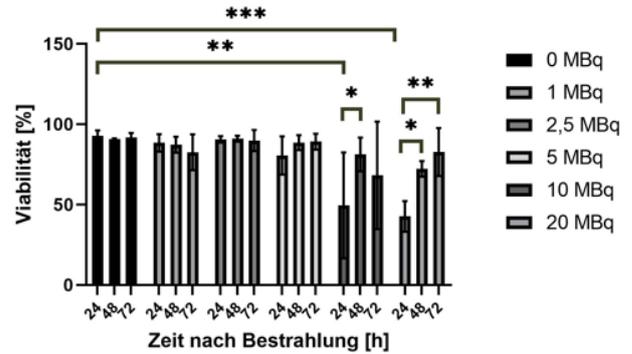
Im Gegensatz zur absoluten Zahl lebender Zellen im zeitlichen Verlauf unterlag die Viabilität bis zu Aktivitäten von einschließlich 5-10 MBq kaum signifikanten Schwankungen bezogen auf die Ausgangswerte bei 0 MBq. Vereinzelt Schwankungen konnten erst vermehrt ab Aktivitäten von 10-20 MBq beobachtet werden. Auch im zeitlichen Verlauf konnten erst vermehrt ab Aktivitäten von 10-20 MBq vereinzelt Schwankungen in der Viabilität dokumentiert werden. Bei 20 MBq konnte bei PC-3 Zellen 24 h nach Bestrahlung eine signifikant niedrigere Viabilität im Vergleich zu der sonst recht

konstanten Viabilität gemessen werden. Bei LNCaP C4-2b Zellen konnte man 24 h nach Bestrahlung eine signifikant niedrigere Viabilität im Vergleich zu der sonst recht konstanten Viabilität bei 10 MBq und 20 MBq dokumentieren. Bei LNCaP Zellen konnte man bei 10 MBq 48 h nach der Bestrahlung eine im Vergleich signifikant niedrigere Viabilität beobachten. Außerdem lag eine vergleichsweise niedrigere Viabilität bei LNCaP Zellen bei 20 MBq 24 bzw. 48 h nach der Bestrahlung vor. Bei der scheinbar in Bezug auf die strahlenbedingten Kurzzeiteffekte weniger sensibel reagierenden LNCaP Zellen waren die beobachteten Effekte insgesamt weniger signifikant als bei den anderen beiden Zelllinien. Bei den PC-3 Zellen waren die Effekte im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien erst bei höheren Aktivitäten zu beobachten. Abb. 14 fasst die Ergebnisse zusammen.

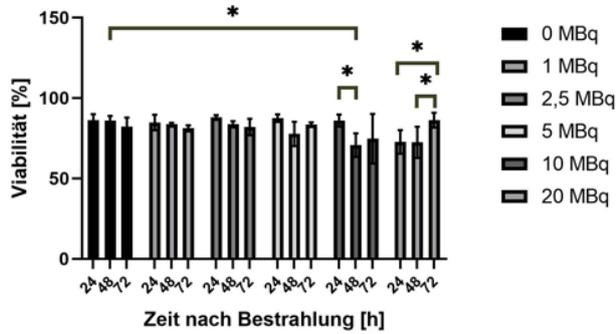
PC-3 Zellen: Viabilität im zeitlichen Verlauf



LNCaP C4-2b Zellen: Viabilität im zeitlichen Verlauf



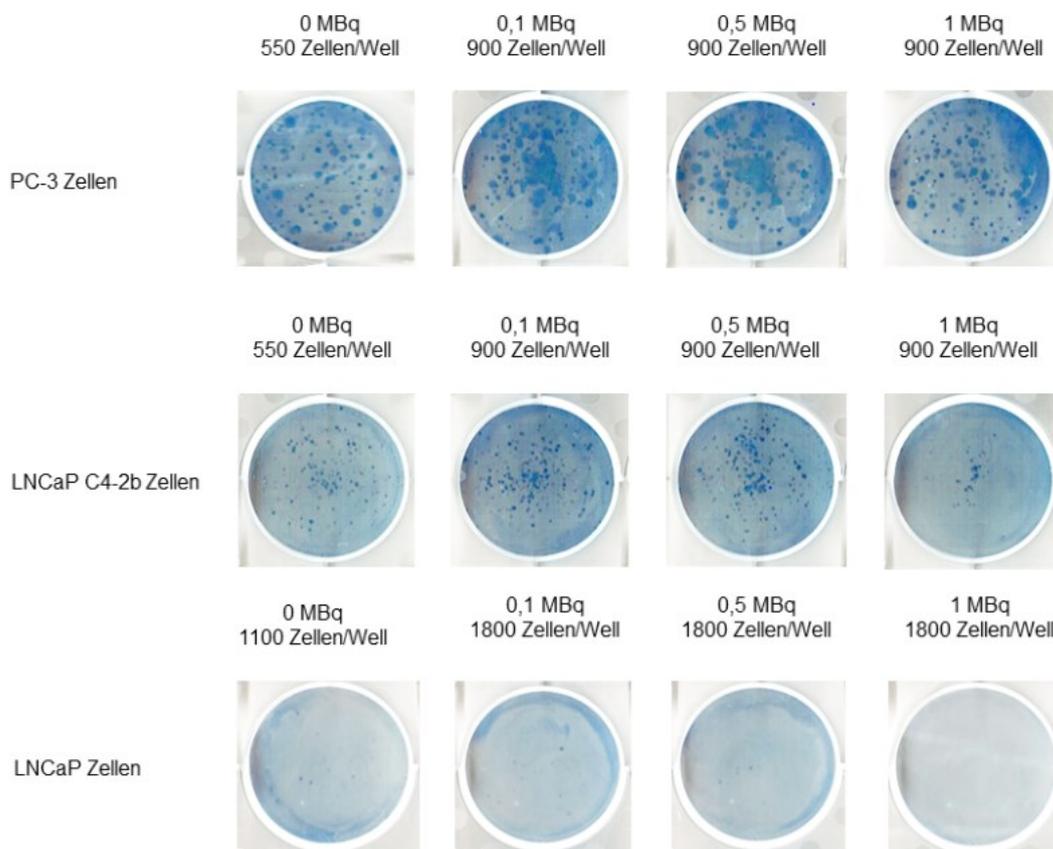
LNCaP Zellen: Viabilität im zeitlichen Verlauf

**Abb. 14:** Viabilität im zeitlichen Verlauf

Die Viabilität ist im zeitlichen Verlauf (Zeit nach der Bestrahlung) und nach Aktivität aufsteigend sortiert dargestellt. Erkennbar sind mit steigender Aktivität Schwankungen in der Viabilität in Bezug auf die Viabilitäten bei 0 MBq als Ausgangswerte sowie Schwankungen im zeitlichen Verlauf. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; Signifikanzen nur auf 0 MBq oder zeitl. Verlauf bezogen;  $n = 3$  (2way ANOVA, *multiple comparisons: within each row, compare columns; within each column, compare rows*).

### 3.3.3 Langzeiteffekte der Bestrahlung mit Lutetium-177

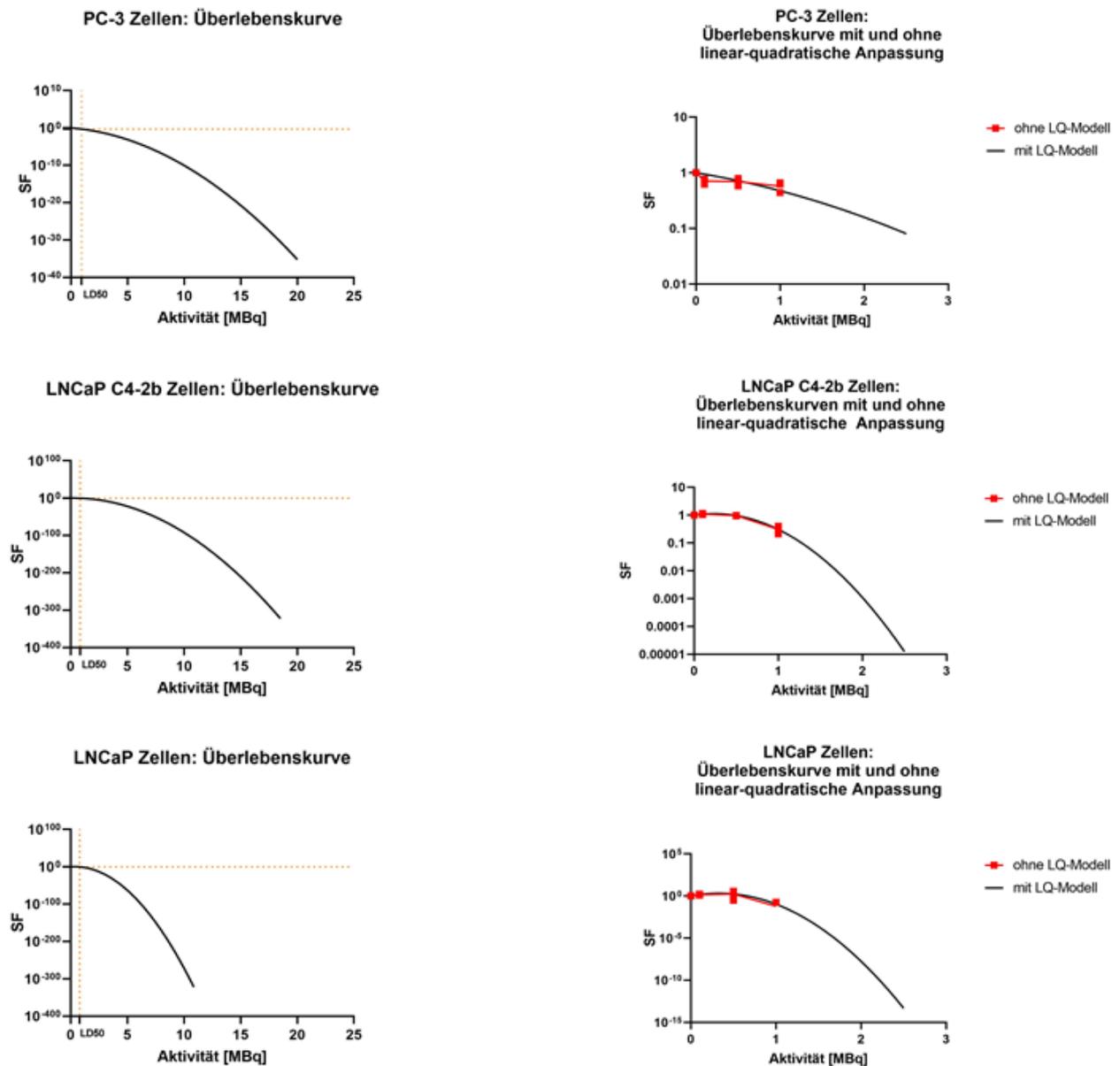
Zur Untersuchung der Langzeiteffekte wurden Koloniebildungsassays angesetzt und nach Fixation, wie unter 2.2.13 dargestellt, ausgezählt und anschließend ausgewertet. Erkennbar sind zarte, filigrane Kolonien bei den Schwesterzelllinien LNCaP C4-2b und LNCaP und im Vergleich plump imponierende Kolonien bei PC-3 Zellen (s. Abb. 15). Insbesondere die Kolonien der LNCaP Zellen sind mit bloßem Auge kaum erkennbar.



**Abb. 15:** Fotografische Dokumentation von Koloniebildungsassays mit PC-3 Zellen, LNCaP C4-2b Zellen und LNCaP Zellen und Betabestrahlung mit Lutetium-177

Neben gewünschten Einzelkolonien variabler Größe sind teilweise konfluierende Kolonien zu sehen. Dargestellt sind die Six-Well Platten für die Behandlung mit bis zu 1 MBq, da in diesem Versuch bei einer Aktivität  $>1$  MBq keine Kolonien mehr vorhanden waren.

Der klonogene Zelltod wurde in Form von Überlebenskurven quantitativ erfasst. Die Ergebnisse wurden in Diagrammen mit klassischerweise logarithmisch skalierte y-Achse ( $\log_{10}$ ) dargestellt. Die Kurvenanpassung erfolgte in Anlehnung an das LQ-Modell mittels nichtlinearer Regression für den linear quadratischen Zelltod (*linear quadratic cell death* (*Y is fraction of cells surviving*)). Auch die nicht angepassten Überlebenskurven wurden zum Vergleich in Teilen dargestellt (s. Abb. 16). Eine Übersicht über die Charakterisierung der einzelnen Überlebenskurven inklusive der A/B-Verhältnisse und der mittleren letalen „Dosen“ 50 % (LD50-Werte) liefert Tab. 16. Der Begriff „LD50-Wert“ wird hier der Einfachheit halber als bereits etablierter Begriff verwendet. Gemeint ist jedoch nicht die Dosis, sondern die Aktivität. Eine detaillierte Beschreibung der Kurvenverläufe mit entsprechender Interpretation findet sich in der Diskussion unter 4.3.



**Abb. 16:** Überlebenskurven von PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen bei Betabestahlung mit Lutetium-177

Links sind die mittels LQ-Modell angepassten Überlebenskurven bei Betabestahlung mit Lutetium-177 dargestellt. Der LD50-Wert ist eingetragen und kann anhand der gestrichelten Linien nachvollzogen werden. Rechts sieht man einen kleineren Ausschnitt aus dem Bereich der Aktivitäten bis maximal 2,5 MBq einmal als mit dem LQ-Modell angepasste Kurve (schwarz) und einmal als nicht angepasste Kurve (rot). Die y-Achsen sind logarithmisch ( $\log_{10}$ ) skaliert. Die Ergebnisse ohne Anpassung durch das LQ-Modell sind als Einzelpunkte dargestellt;  $n = 3$ , SF = Überlebensfraktion.

**Tab. 16:** Charakterisierung der Überlebenskurven

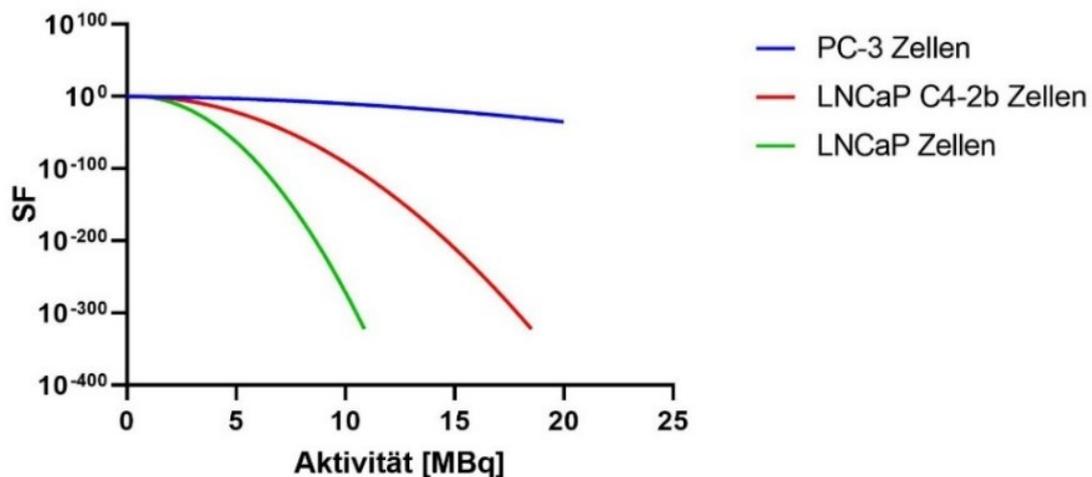
Zelllinie	A [MBq <sup>-1</sup> ]	B [MBq <sup>-2</sup> ]	A/B- Verhältnis [MBq]	Hauptkomponente	LD50- Wert [MBq]
PC-3	0,5735	0,1740	3,30	linear	0,94
LNCaP C4-2b	-1,033	2,220	-0,47	quadratisch	0,84
LNCaP	-4,451	6,686	-0,67	quadratisch	0,80

Die Überlebenskurven für die Schwesterzelllinien LNCaP C4-2b und LNCaP verhielten sich untereinander vergleichsweise ähnlich. Während bei LNCaP C4-2b Zellen und bei LNCaP Zellen die quadratische Komponente der Zellabtötung dominierte, stand bei PC-3 Zellen die lineare Komponente der Zellabtötung im Vordergrund. Bei LNCaP Zellen zeigte sich im Bereich geringer Aktivitäten ein Anstieg der Überlebensfraktion, dem mit steigender Aktivität wiederum ein Abfall der Überlebensfraktion folgte (s. Abb. 16). Bei LNCaP C4-2b Zellen konnte man Ähnliches beobachten, insbesondere in der nicht angepassten Kurve (s. Abb. 16). Der Vergleich der angepassten mit der nicht angepassten Kurve bei PC-3 Zellen zeigte eine Senke im Bereich niedriger Aktivitäten in der nicht angepassten Kurve. Im Gesamtvergleich zeigten sich, bezogen auf die Langzeiteffekte, LNCaP Zellen als am empfindlichsten gegenüber der Bestrahlung mit Lutetium-177 (s. Abb. 17). Als im direkten Vergleich resistensteste Zelllinie demaskierte sich PC-3. Der Vergleich der linear quadratisch angepassten Überlebenskurven in einem Diagramm verdeutlicht das Überwiegen der linearen Komponente in der Überlebenskurve für PC-3 Zellen bei eher geringem Betrag der Steigung. Weiterhin verdeutlicht die Darstellung die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Zellen bezogen auf die Langzeiteffekte.

Hinsichtlich der Langzeiteffekte lässt sich insgesamt sagen, dass – anders als bei den Kurzzeiteffekten – die untersuchten Zelllinien jeweils mit größeren Unterschieden auf die Behandlung mit Lutetium-177 reagierten. Hinzu kam, dass, bedingt durch die lange Inkubationszeit als Einzelzellen, nicht jede Zelllinie für einen Koloniebildungsassay geeignet war. So war es – passend zur Strahlenempfindlichkeit – mit LNCaP Zellen nur bedingt möglich, einen aussagekräftigen Koloniebildungsassay zu etablieren, da ein

Großteil der Zellen die Inkubation als Einzelzellen für mehrere Tage nicht überstand. Allen Zelllinien gemeinsam war das Fehlen von Kolonien bei Aktivitäten > 1 MBq.

### Überlebenskurven im Überblick



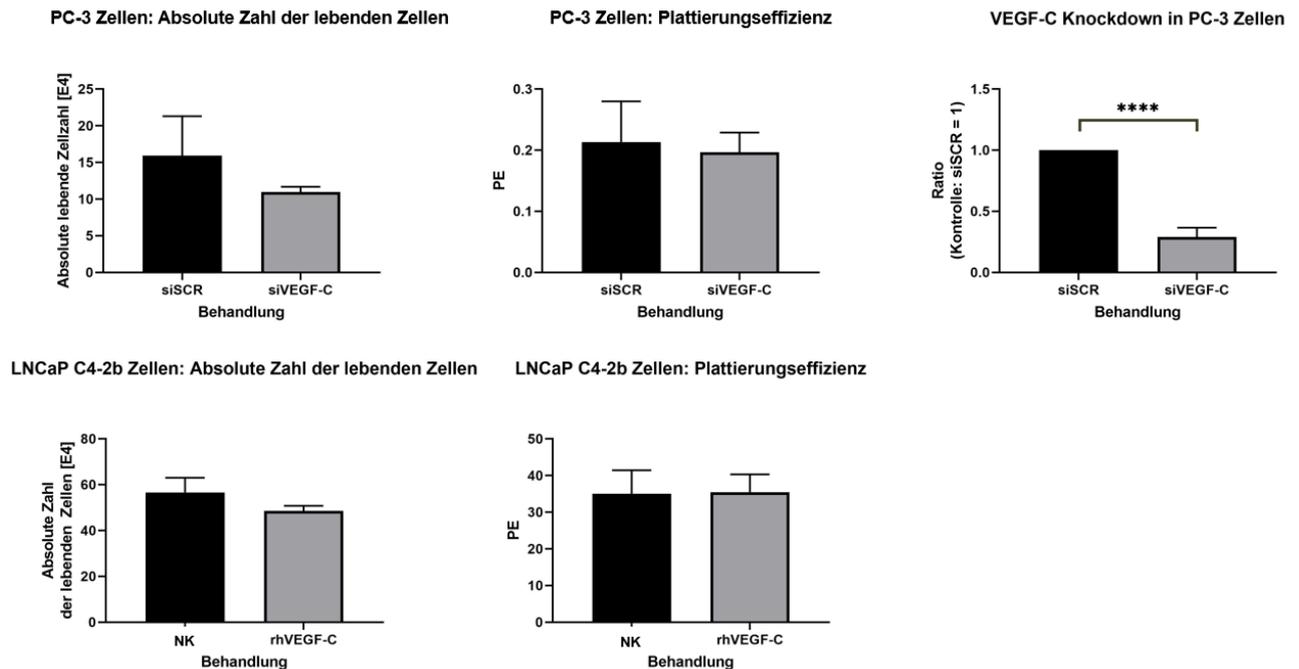
**Abb. 17:** Mit dem LQ-Modell angepasste Überlebenskurven für PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen bei Betabestahlung mit Lutetium-177 im Überblick

Die Übersicht verdeutlicht insbesondere im direkten Vergleich mit den anderen Zelllinien das Überwiegen der linearen Komponente des LQ-Modells bei PC-3 Zellen sowie die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der betrachteten Zelllinien. Die y-Achsen sind logarithmisch ( $\log_{10}$ ) skaliert;  $n = 3$ .

#### 3.4 Einfluss des VEGF-C Knockdowns/der rhVEGF-C Behandlung auf die Versuchsbedingungen

Eine Untersuchung des Einflusses der alleinigen siRNA Transfektion bzw. der Behandlung mit rhVEGF-C auf die absolute Zahl lebender Zellen und den Koloniebildungsassay ist von zentraler Bedeutung, um mögliche Effekte durch die Behandlung zu kennen und entsprechend in Auswertungen von Bestrahlungsversuchen mit vorbehandelten Zellen einbeziehen zu können.

Vor diesem Hintergrund wurden entsprechend Viabilitätsassays mit 100 000 Zellen/Well und Koloniebildungsassays mit 550 Zellen/Well ohne jedwede Betabestrahlung mit PC-3 bzw. LNCaP C4-2b Zellen durchgeführt, die, wie unter 2.2.6 und 2.2.7 aufgeführt, zuvor entweder mit siVEGF-C/siSCR bzw. rhVEGF-C/Negativkontrolle behandelt wurden. Da diese Versuche keine Bestrahlungskomponente beinhalteten, wurde hier folglich auf den im Teil 2.2.13 bzw. 2.2.14 beschriebenen Transport in das Institut für Nuklearmedizin verzichtet. Die Messungen für den Viabilitätsassay erfolgten für PC-3 Zellen 24 h nach Aussaat der Zellen für den Viabilitätsassay, was bei einem Viabilitätsassay mit Betabestrahlung dem Tag der Bestrahlung entspräche. Entsprechend erfolgten die Messungen für den Viabilitätsassay für LNCaP C4-2b Zellen 72 h nach Aussaat. Die Koloniebildungsassays wurden am zwölften (PC-3 Zellen) bzw. 14. (LNCaP C4-2b Zellen) Tag nach der Aussaat gestoppt (entspricht der Inkubationszeit der bestrahlten Koloniebildungsassays). Wie in Abb. 18 gezeigt, hatten die Behandlungen weder einen signifikanten Einfluss auf die absolute Zahl der lebenden Zellen noch auf die Plattierungseffizienz des Koloniebildungsassays.



**Abb. 18:** Untersuchung der siRNA-Transfektion bzw. rhVEGF-C Behandlung und deren Einfluss auf die absolute Zahl der lebenden Zellen und die Plattierungseffizienz

Die siRNA-Transfektion bzw. rhVEGF-C Behandlung besitzen weder einen Einfluss auf die absolute Zahl der lebenden Zellen noch auf die PE. Die siRNA-Transfektion führt zudem zu einer signifikanten Herunterregulierung von VEGF-C. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; n = 3 (t-test).

### 3.5 Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177

Arbeitshypothese: VEGF-C hat – losgelöst von der Betrachtung einer (molekular)biologischen Ursache – einen Einfluss auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Bestrahlung mit Lutetium-177.

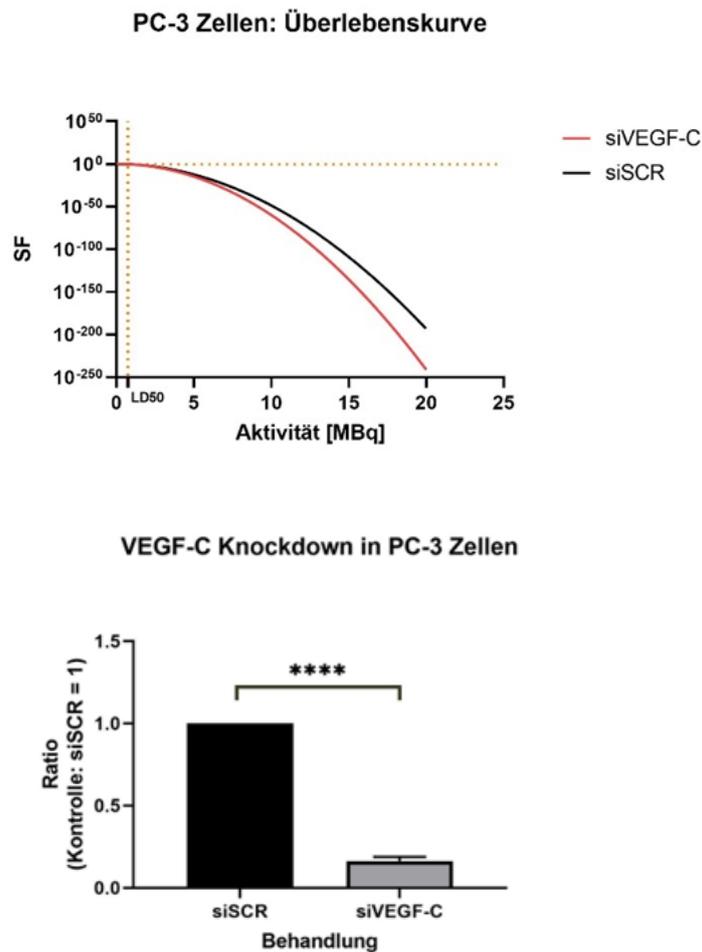
Um nun letztlich den Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 zu untersuchen, wurden Koloniebildungsassays mit einer VEGF-C betreffenden Vorbehandlung angesetzt und ausgewertet. Nach Auswertung der unter 3.3.2 und 0 aufgeführten Versuche, zeigten sich die Viabilitätsassays mit vergleichsweise geringen Effekten unter Verwendung hoher

Aktivitäten als im Vergleich zu den Koloniebildungsassays weniger sensitiv, sodass letztere das geeignetere Mittel zur Untersuchung der Fragestellung darstellen.

### 3.5.1 PC-3 Zellen

Die knochenmetastatische Zelllinie PC-3 eignete sich für die Investigation dieser Fragestellung besonders gut, da es sich nicht nur bei rund 84 % aller Metastasen des Prostatakarzinoms um Knochenmetastasen handelt (Gandaglia et al., 2014), sondern die PC-3 Zellen auch den erschwerten Versuchsbedingungen des Koloniebildungsassays am besten standhalten konnten. Gleichzeitig erwies sich die der VEGF-C Knockdown mittels siRNA-Transfektion in zahlreichen Vorversuchen als zuverlässig und effektiv, da sich der hohe VEGF-C Gehalt der PC-3 Zellen (s. Abb. 1) sehr leicht mit siRNA herunterregulieren ließ. Auf eine Untersuchung der Kurzzeiteffekte wurde an dieser Stelle verzichtet, da diese im Vergleich zu den Langzeiteffekten von geringerer klinischer Relevanz sind und darüber hinaus zeitlich in den Langzeiteffekten enthalten sind.

Wie erwartet waren der Kurvenverlauf aus 0 und der Kurvenverlauf dieses Bestrahlung und VEGF-C Knockdown kombinierenden Versuches vergleichbar. Im F-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Kurven. Auch ließ sich hier der anfängliche Abfall der Überlebensfraktion bei niedrigeren Aktivitäten im nicht-angepassten Diagramm beobachten. Vergleicht man die Kurve der mit siVEGF-C behandelten Zellen mit der der Negativkontrollen, so lässt sich sagen, dass trotz erfolgreichem VEGF-C Knockdown VEGF-C im Rahmen der Messgenauigkeit keinen Effekt auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 zu haben schien (s. Abb. 19). Die Kurvenverläufe unterschieden sich im F-Test nicht annähernd signifikant voneinander. Passend zum LD50-Wert der PC-3 Zellen aus 0 lag der LD50-Wert für siSCR behandelte PC-3 Zellen mit 0,71 MBq ebenfalls unter 1 MBq und der LD50-Wert für siVEGF-C behandelte PC-3 Zellen lag bei 0,77 MBq. Es zeigt sich somit kein signifikanter Effekt von VEGF-C auf das Überleben von PC-3 Zellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177.



**Abb. 19:** Koloniebildungsassay mit transfizierten PC-3 Zellen und Lutetium-177

Mit dem LQ-Modell angepasste Überlebenskurven für PC-3 Zellen bei Betabestahlung mit Lutetium-177 ( $n = 3$ ). Die roten Kurven stellen die Ergebnisse für siVEGF-C behandelte Zellen dar, die schwarzen Kurven bilden die Ergebnisse der siSCR behandelten Zellen ab. Die y-Achsen sind logarithmisch ( $\log_{10}$ ) skaliert. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven (F-Test). Rechts ist die signifikante Herunterregulierung von VEGF-C nach siRNA Transfektion zu sehen, wobei die Ergebnisse als  $MW \pm SD$  dargestellt sind;  $n = 3$  (t-test).

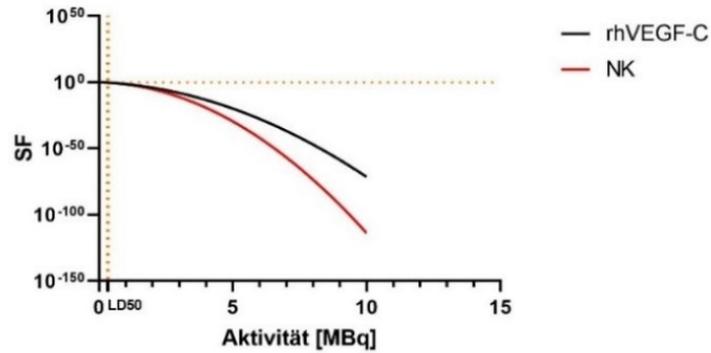
### 3.5.2 LNCaP C4-2b Zellen

In Ergänzung zu den Versuchen mit PC-3 Zellen begannen wir die Etablierung von Koloniebildungsassays mit LNCaP C4-2b Zellen, die mit rhVEGF-C bzw. mit einer Negativkontrolle behandelt wurden und mit Lutetium-177 bestrahlt wurden. Im ersten Protokoll erfolgte am Morgen der rhVEGF-C Behandlung ein Wechsel auf serumfreies

RPMI-Medium („Protokoll A“). Hierbei dokumentierten wir wider Erwarten in zwei von zunächst drei unabhängigen Versuchen ein Zellwachstum bis einschließlich 10 MBq. Da die beiden Versuche mit dem Zellwachstum bis 10 MBq sehr zeitnah hintereinander durchgeführt wurden und sich das Wachstum bis in den Bereich hoher Aktivitäten insbesondere auch mit Blick auf die unter 0 dargestellten Ergebnisse nicht sinnvoll erklären ließ, halten wir die applizierte Aktivität für die wahrscheinlichste Fehlerquelle und schlossen die beiden Versuche von der Auswertung aus (s. Abb. 20 A). Vergleicht man die Kurve der mit rhVEGF-C behandelten Zellen mit der der Negativkontrollen, so lässt sich auch hier feststellen, dass VEGF-C im Rahmen der Messgenauigkeit keinen Effekt auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestahlung mit Lutetium-177 zu haben schien. Die Kurvenverläufe unterschieden sich im F-Test nicht annähernd signifikant voneinander. Passend zum LD50-Wert der LNCaP C4-2b Zellen aus 0 lag der LD50-Wert für rhVEGF-C behandelte LNCaP C4-2b Zellen mit 0,30 MBq ebenfalls unter 1 MBq und der LD50-Wert für die mit der Negativkontrolle behandelten LNCaP C4-2b Zellen lag bei 0,36 MBq.

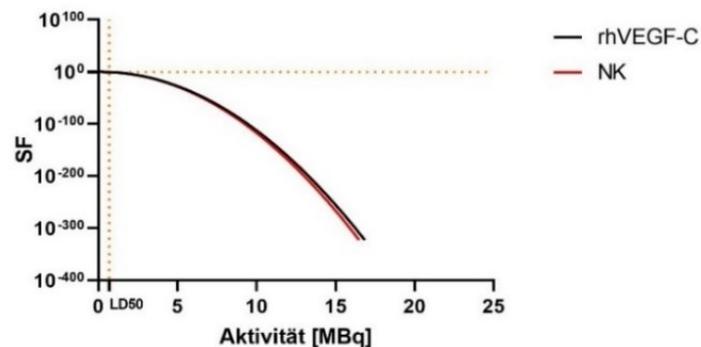
A

## LNCaP C4-2b Zellen: Überlebenskurve



B

## LNCaP C4-2b Zellen: Überlebenskurve



**Abb. 20:** Koloniebildungsassay mit LNCaP C4-2b Zellen (+ rhVEGF-C oder Negativkontrolle (NK)) und Lutetium-177, A = Protokoll A, B = Protokoll B

Mit dem LQ-Modell angepasste Überlebenskurven für LNCaP C4-2b Zellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177. Die rote Kurve stellt die Ergebnisse für NK behandelte Zellen dar, die schwarze Kurve bildet die Ergebnisse der rhVEGF-C behandelten Zellen ab. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen NK und rhVEGF-C (F-Test). Die y-Achsen sind logarithmisch ( $\log_{10}$ ) skaliert; jeweils  $n = 1$ .

Zur weiteren Etablierung des Protokolls wurde eine Versuchsreihe ergänzt, in der der Wechsel auf serumfreies Medium bereits am Abend vor der Behandlung der Zellen mit rhVEGF-C bzw. Negativkontrolle erfolgte, was dem unter 2.2.7 beschriebenen Standardprotokoll entspricht. Hier zeigte sich jedoch, dass die zusätzlich verlängerte Serumdeprivation eine noch stärkere Auswirkung auf das Zellwachstum besaß und eher zu einem Überleben selektierter Zellen führte, zumal bereits im ersten Protokoll eher niedrigere Plattierungseffizienzen vorlagen. Diese Versuchsreihe war daher nicht sinnvoll auswertbar und führte zu dem Schluss, dass eine Serumdeprivation hier praktisch nicht sinnvoll umsetzbar ist. Vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse gehen wir davon aus, dass die etwas kürzere Serumdeprivation in der ersten Versuchsreihe keinen Einfluss auf das Ergebnis bezüglich eines VEGF-C induzierten Effekts auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 besitzt. Zur Sicherheit ergänzten wir jedoch einen weiteren Versuch, in dem wir – wie auch Frau Dr. Liebscher – gänzlich auf eine Serumdeprivation verzichteten („Protokoll B“) (Liebscher, 2017). Hier bestätigte sich ebenfalls das Fehlen eines VEGF-C induzierten Effekts auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 (s. Abb. 20 B). Passend zum LD50-Wert der LNCaP C4-2b Zellen aus 0 lag der LD50-Wert für rhVEGF-C behandelte LNCaP C4-2b Zellen mit 0,68 MBq ebenfalls unter 1 MBq und der LD50-Wert für die mit der Negativkontrolle behandelten LNCaP C4-2b Zellen lag bei 0,70 MBq.

Wir entschieden uns aufgrund der sehr hohen Materialkosten pro Versuch und aufgrund der bereits aussagekräftigen Ergebnisse der anderen Versuche gegen eine intensivere Etablierung des Protokolls für LNCaP C4-2b Zellen und eine Ergänzung der Versuche ohne Serumdeprivation. Diese hätte für die Fragestellung/Zielsetzung dieser Dissertation nach Kosten-Nutzen-Abwägung mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen nennenswerten zusätzlichen Mehrwert geliefert (s. Diskussion). Die Diskussion liefert dennoch Ideen und Anregungen zur Optimierung des Protokolls.

### 3.6 Fazit/Zusammenfassung des Ergebnisteils

Insgesamt lässt sich also sagen, dass sich im Rahmen dieser Arbeit weder eine relevante Zellzyklusmodifikation der G2/M-Phase durch VEGF-C noch ein eindeutiger Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 nachweisen ließ. In den Zellzyklusexperimenten konnten einzig bei PC-3 Zellen in der G1- und der S-Phase signifikante Ergebnisse erzielt werden, jedoch zeigte auch hier die besonders radiosensitive G2/M Phase keinen signifikanten Unterschied zwischen VEGF-C positiven und VEGF-C negativen Zellen. In den Koloniebildungsassays zeigten die Zelllinien jeweils unterschiedliche Strahlensensitivitäten, allerdings nicht VEGF-C abhängig. Die Kurz- und Langzeiteffekte der Bestrahlung mit Lutetium-177 auf Prostatakarzinomzellen konnten als Grundlage für die durchgeführten Versuche und künftige Versuche auf diesem Gebiet herausgearbeitet werden.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit diente der Untersuchung des Einflusses von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestahlung mit dem radioaktiven Isotop Lutetium-177. Es wurden Methoden zur sukzessiven Annäherung an die in der Einleitung formulierten Fragestellungen etabliert. Die Vor- und Nachteile werden im Folgenden gemeinsam mit den jeweiligen Ergebnissen diskutiert.

### 4.1 Zellzyklusanalyse

#### 4.1.1 G2/M-Phase

Im Zuge der Untersuchung eines möglichen Einflusses von VEGF-C auf die G2/M-Phase des Zellzyklus stellte sich heraus, dass die vorliegenden Ergebnisse die Eingangshypothese eines Mehranteils an VEGF-C negativen gegenüber VEGF-C positiven Zellen in der radiosensitiven G2/M-Phase nicht bestätigten (s.3.2). Dass trotz allem kein Effekt in der G2/M-Phase beobachtet werden konnte, könnte die folgende Begründung haben: Insbesondere die späte S-Phase ist als strahlenresistent anzusehen, nicht zuletzt da hier zusätzlich zum NHEJ die Möglichkeit der Homologen Rekombination zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen besteht (Hall und Giaccia, 2011; Herrmann et al., 2006; McMahon, 2018). Der G2/M-Übergang wiederum zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Strahlenschäden aus (Herrmann et al., 2006). Da die späte G2-Phase gewissermaßen Teil des empfindlichen G2/M-Übergangs ist und die späte S-Phase wie oben erwähnt als resistent gilt, ist es naheliegend, dass insbesondere die frühe G2-Phase im Vergleich zum G2/M-Übergang auch strahlenresistentere Zellen enthält. Es ist denkbar, dass hierdurch eine Mehrverteilung von Zellen auf den G2/M-Übergang nicht erkannt werden konnte, da im Zuge einer Zellzyklusanalyse die gesamte G2-Phase und die gesamte M-Phase gemeinsam als Einheit erfasst werden, die lediglich unter anderem die besonders radiosensitive G2/M-Phase (d.h. den Übergang der G2- zur M-Phase) enthält. Es ist nicht auszuschließen, dass ein größerer relativer Anteil an Zellen in der früheren G2-Phase die Effekte, die potenziell sichtbar gewesen wären, wenn man den G2/M-Übergang allein gemessen hätte, obskuriert hat. Dies hinge davon ab, wie groß der

relative Anteil an Zellen im G2/M-Übergang und wie groß der relative Anteil an Zellen in der früheren G2-Phase zum Zeitpunkt der Messung war. Diese Hypothese wäre auch in Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zu bringen, da hier in allen untersuchten Zelllinien in Bezug auf die G2/M-Phase keine Unterschiede zwischen VEGF-C positiven und VEGF-C negativen Zellen vorlagen.

#### 4.1.2 G1-Phase und S-Phase

Ein Blick auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten anderen beiden Zellzyklusphasen der verschiedenen Zelllinien wirft interessante Aspekte auf: So zeigt sich bei PC-3 Zellen in der G1-Phase eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Erhöhung des Anteils an siVEGF-C behandelten Zellen (s. 3.2.1). Herrmann et al. (2006) zufolge ist die frühe G1-Phase bei einer insgesamt langen G1-Phase strahlenresistent und der G1/S-Übergang gilt als sehr strahlenempfindlich. Sollte ein VEGF-C induzierter Effekt in der G2/M Phase aus methodischen Gründen verborgen geblieben sein, wäre dies mit Blick auf die vorliegenden Ergebnisse somit z. B. mit einer recht kurzen G1-Phase für PC-3 Zellen vereinbar. Passend dazu konnte in der S-Phase bei PC-3 Zellen ein signifikant erniedrigter Anteil VEGF-C herunterregulierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle ausgemacht werden (s. 3.2.1). In der späten S-Phase ist, wie bereits erläutert, die Strahlenresistenz am größten (Herrmann et al., 2006). Dies würde die Hypothese stützen, dass VEGF-C zumindest bei PC-3 Zellen als überlebensförderndes Protein möglicherweise durchaus einen Einfluss auf den Zellzyklus haben könnte.

Bei LNCaP C4-2b Zellen konnten im Gegensatz dazu jedoch in keiner Zellzyklusphase signifikante Unterschiede zwischen VEGF-C positiven und negativen Zellen demaskiert werden (s. 3.2.2). Somit legen die Ergebnisse dieser Zelllinie wiederum nahe, dass ein Einfluss von VEGF-C auf die G2/M-Phase und auch auf die übrigen Phasen des Zellzyklus als unwahrscheinlich anzusehen ist. Dies könnte durchaus mit einer schlechteren Messgenauigkeit bei der Zellzyklusanalyse mit LNCaP C4-2b Zellen in Zusammenhang gebracht werden, zumal hier auch eine geringere Versuchsanzahl zugrunde lag ( $n = 3$  im Vergleich zu  $n = 6$ ).

#### 4.1.3 Zelllinienabhängigkeit und VEGFR-2 Expression

Eine Möglichkeit, das unterschiedliche Verhalten der untersuchten Zelllinien zu interpretieren, bietet die Rezeptorexpression der beiden Zelllinien: Wie unter 3.1 dargestellt, exprimieren PC-3 Zellen den VEGFR-2 und nicht den VEGFR-3, während es sich bei LNCaP C4-2b Zellen genau andersherum verhält. Letztlich ist es denkbar, dass der Einfluss von VEGF-C auf den Zellzyklus zelllinienabhängig/rezeptorabhängig ist (Liebscher, 2017). Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse für PC-3 Zellen und LNCaP C4-2b Zellen könnte das VEGFR-2 bzw. VEGFR-3 Expressionslevel sein. Ein Blick auf die G1- und die S-Phase der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien liefert hierbei wertvolle Aspekte: Dunk und Ahmed (2001) zeigten, dass eine Neutralisation von VEGFR-2 eine Progression des Zellzyklus von der G1 in die S-Phase verhinderte, sodass sich die Zellen in der G1-Phase ansammelten. Michaelsen et al. (2018) konnten darüber hinaus einen derartigen verzögerten Übergang von der G1 in die S-Phase für siVEGF-C behandelte Glioblastomzellen sowie eine Beeinflussung des Zellzyklus durch VEGF-C/VEGFR2 zeigen. Dies passt dazu, dass bei PC-3 Zellen der Anteil siVEGF-C behandelter Zellen in der G1-Phase signifikant über dem der Kontrollen lag, während bei LNCaP C4-2b Zellen kein derartiger Effekt beobachtet werden konnte (s. 3.2). Weiterhin fanden Knizetova et al. (2008) für zwei Astrozytom-Modelle heraus, dass VEGF den Eintritt in die S-Phase, vermittelt über den VEGFR-2, fördert. Auch dies ist in Einklang mit den hier vorliegenden Ergebnissen zu bringen, da sich in der S-Phase bei PC-3 Zellen signifikant weniger siVEGF-C behandelte Zellen im Vergleich zur Kontrolle befanden, während sich bei LNCaP C4-2b Zellen auch hier kein Unterschied zwischen behandelten und Kontrollzellen zeigte (s. 3.2). Passend dazu konnte das UKD bei PC-3 Zellen, nicht aber bei LNCaP C4-2b Zellen oder DU145 Zellen, einen Effekt von VEGF-C auf den Zellzyklus nachweisen (Liebscher, 2017). Zudem ist beschrieben, dass eine VEGF/VEGFR-2 Blockade zu einem G2/M Block führen kann (Huang et al., 2014; Liebscher, 2017). Zum anderen zeigten Michaelsen et al. (2016), dass eine Herunterregulierung VEGF-C zu einem verringerten Wachstum VEGFR-2 exprimierender Zellen führte, was mit einer VEGF-C induzierten Apoptose korrelierte und auf Zellzyklusebene mit einem G2/M Block einherging. Auch dies würde die Hypothese eines VEGFR-2-abhängigen Effekts bestärken.

Bei den LNCaP-C4-2b Zellen zeigte sich in keiner Zellzyklusphase ein signifikanter VEGF-C induzierter Effekt. Jerafi-Vider et al. (2021) fanden heraus, dass VEGF-C über den

VEGFR-3 einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase hervorrufen kann. Li et al. (2021) wiederum beschreiben, dass eine Inhibition des über VEGFR-3 vermittelten Signalwegs in Brustkrebszellen einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirken kann. Gleichzeitig ist bekannt, dass eine ERK-Aktivierung selbst in ein und derselben Zelllinie unterschiedliche Signalantworten hervorrufen kann, beispielsweise in Abhängigkeit von der Stärke oder Dauer der ERK-Aktivierung (Ebisuya et al., 2005). Dies ist, neben der oben diskutierten potenziellen VEGFR-2-Abhängigkeit, eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten VEGF-C induzierten Effekte auf den Zellzyklus beobachtet werden konnten.

Die gefundenen Ergebnisse geben somit zu der Vermutung Anlass, dass VEGF-C möglicherweise einen VEGFR-2 vermittelten Einfluss auf den Zellzyklus zu haben scheint, der sich in logischer Konsequenz abhängig vom VEGFR-2 Gehalt nicht in jeder Zelllinie zeigt. Die Beobachtbarkeit dieses Effekts scheint zudem stark von der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen zu Versuchsbeginn abzuhängen. Ein über den VEGFR-3 vermittelter Effekt konnte nicht nachgewiesen werden, was in Zusammenhang mit dem ERK-Signalweg gebracht werden könnte.

#### 4.1.4 Fazit Zellzyklusanalyse

Eine Bestrahlung der Zellen vor der Zellzyklusanalyse war aus Strahlenschutzgründen im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht möglich. Abgesehen davon wäre ein durchgreifender und relevanter Einfluss VEGF-Cs auf den Zellzyklus auch ohne vorangehende Bestrahlung zu erwarten gewesen. Zur endgültigen Klärung der Frage nach einem VEGF-C induzierten Effekt auf den Zellzyklus könnte jedoch eine Synchronisierung der Zellen mittels Nocodazol von akademischem Interesse sein. Auch könnte man beispielsweise in PC-3 Zellen den VEGFR-2 herunterregulieren und erneut eine Zellzyklusanalyse veranlassen, um die Abhängigkeit der beobachteten Ergebnisse vom VEGFR-2 zu überprüfen. Ebenso könnte man mittels lentiviralem Ansatz VEGFR-2 positive LNCaP C4-2b Zellen generieren und diese einer Zellzyklusanalyse unterziehen.

Nach Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse stellt sich jedoch die Frage nach einer generellen Relevanz eines VEGF-C induzierten Effektes auf den Zellzyklus, da dieser für

die Klinik vermutlich nicht allzu bedeutend ist, wenn er bereits bei im Rahmen liegenden Messungenauigkeiten nicht mehr zu beobachten ist bzw. wenn dieser zelllinienabhängig wäre. Ein möglicherweise derartig zelllinienabhängiger und eher schwach ausgeprägter Effekt lässt die Frage offen, ob VEGF-C dennoch, eventuell über einen anderen zusätzlichen und möglicherweise bedeutenderen Mechanismus, im Kontext der Betabestrahlung von Prostatakarzinomzellen eine radioprotektive Wirkung zukommt. Entsprechend wurden in dieser Arbeit weitere Untersuchungen angestellt, die einen generellen Einfluss VEGF-Cs auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 betrachten sollten.

#### 4.2 Kurzzeiteffekte der Betabestrahlung an unbehandelten Zellen

Die in dieser Arbeit untersuchten Kurzzeiteffekte der Betabestrahlung auf unbehandelte Zellen lieferten zusätzlich zu den im klinischen Alltag relevanteren Langzeiteffekten wichtige Aufschlüsse über die Wirkung von Lutetium-177 auf Prostatakarzinomzellen. Damit diene ihre Untersuchung einem tiefergreifenden Verständnis der Wirkung der in der vorliegenden Arbeit angewandten Bestrahlung. Da die hier verwendete Methode nach unserem Kenntnisstand eine neue Methode darstellt, finden sich keine gut vergleichbaren Versuche mit Prostatakarzinomzellen und/oder Lutetium-177 in der Literatur, die zur Diskussion herangezogen werden könnten. Aus diesem Grund konzentriert sich die Diskussion auf den Vergleich mit dem aus der Literatur bekannten Wissen über ionisierende Strahlung (s. 1.5).

##### 4.2.1 Maximaler Effekt der Bestrahlung

Bei der Untersuchung der Kurzzeiteffekte zeigte sich unabhängig von der Zelllinie ein maximaler Effekt der Bestrahlung bei Bedingung 2 (48 h nach Bestrahlung). Im weiteren Verlauf, d.h. bei Bedingung 3 (72 h nach Bestrahlung) klang der zytoletale Effekt der Bestrahlung wieder ab (s. 3.3.2). Weiterhin konnten signifikante Effekte durch die Bestrahlung erst bei höheren Aktivitäten beobachtet werden (s. 3.3.2). Passenderweise war die Aktivität, ab der ein signifikanter Effekt zu beobachten war, bei Bedingung 2 jeweils am niedrigsten (s. 3.3.2). Die Daten weisen somit darauf hin, dass neben der

schnellen bzw. klassischen Apoptose, die ohne größere Latenzzeit auftritt, auch eine späte Apoptose, welche mit einer Latenz von in der Regel ein bis zwei Tagen nach der Bestrahlung auftritt, eine Rolle spielt (Herrmann et al., 2006). Denkbar wäre ebenfalls ein verzögerter Zelltod als Folge einer sog. „*mitotic catastrophe*“ (Herrmann et al., 2006). Auch andere Arbeitsgruppen konnten bei der Bestrahlung von diversen Zellen strahleninduzierte Effekte beobachten, die erst mit einer gewissen Latenzzeit auftraten, so z. B. einen Anstieg der Apoptoserate bei Glioblastomzellen 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung mit einer Cobalt-60 Quelle (Murad et al., 2018). Cobalt-60 Quellen emittieren Gammastrahlung, die ebenfalls wie die von Lutetium-177 emittierte Betastrahlung eine Niedrig-LET-Strahlung und damit gut vergleichbar ist (Hall und Giaccia, 2011; Herrmann et al., 2006). Low et al. (2006) zeigten außerdem, dass nicht allein eine steigende Bestrahlungsdosis für die Zellviabilität relevant ist, sondern auch der Zeitpunkt nach Bestrahlung, zu dem gemessen wird. Es zeigte sich hier, dass vor allem nach einer gewissen Latenzzeit (hier 72 h nach Bestrahlung) Effekte auftraten, was die hier beobachteten Resultate untermauert (Low et al., 2006).

Interessanterweise konnte eine (vermeintliche) Abschwächung der strahleninduzierten Effekte von Bedingung 2 auf Bedingung 3 beobachtet werden (s. 3.3.2). Die Erklärung hierfür ist am ehesten statistischer Natur, da die absolute Zahl der lebenden Zellen bei 0 MBq in Bedingung 3 in den untersuchten Zelllinien zum Teil einer vergleichsweise großen Standardabweichung unterliegen. Auf den ersten Blick ließe sich vermuten, dass möglicherweise zwischen Bedingung 2 und Bedingung 3 DNA-Reparaturmechanismen stattgefunden haben könnten. Dies könnte als Ursache für die Abschwächung der strahleninduzierten Effekte von Bedingung 2 auf Bedingung 3 interpretiert werden. Tatsächlich erfolgt die Reparatur von DNA-Strahlenschäden jedoch deutlich schneller, nämlich innerhalb von bis zu 8 h nach Schadenserkennung (Kauffmann et al., 2011).

#### 4.2.2 Auswirkung höherer Aktivitäten

Die erst bei höheren Aktivitäten beobachtete signifikante Abnahme der absoluten Zahl der lebenden Zellen ist zum einen logisch nachvollziehbar und zum anderen vereinbar mit den Resultaten von Low et al. (2006), die OC-k3 Zellen mit Gamma-Strahlung bestrahlten und zeigten, dass mit größer werdenden Dosen ein größeres Ausmaß an Apoptose

beobachtet werden konnte. Dabei ist ein Vergleich zwischen Beta- und Gammastrahlung durchaus vertretbar, da es sich in beiden Fällen um Niedrig-LET-Strahlung mit nahezu gleichen LET-Werten handelt (Herrmann et al., 2006). Elgqvist et al. (2016) zeigten zudem explizit, dass sich bei Prostatakarzinomzellen keine nennenswerten Unterschiede in der Bestrahlung mit Beta- oder Gammastrahlen ergaben. Gleichzeitig passen die Beobachtungen auch generell zu der Tatsache, dass es sich bei der hier eingesetzten Betastrahlung um eine Niedrig-LET-Bestrahlung handelt, deren biologische Wirkung schwächer als die einer Hoch-LET-Bestrahlung ist: Größere Effekte wie der sofortige Zelltod in einem größeren Ausmaß bedürfen auch einer größeren Aktivität (Herrmann et al., 2006). Dass erst bei höheren Aktivitäten Effekte sichtbar wurden ist zusätzlich damit in Einklang zu bringen, dass geringe Dosen (und damit auch geringe Aktivitäten) von Niedrig-LET-Strahlung, unter die auch die durch Lutetium-177 vermittelte Betastrahlung fällt, unter bestimmten Voraussetzungen verstärkt antioxidative Mechanismen oder DNA-Reparaturmechanismen in Gang setzen, was möglicherweise zu einem gewissen Grad die in den Kurzzeiteffekten zu erwartenden Direktschäden durch die Strahlung eindämmt (Azzam et al., 2012; Toledo et al., 2006). Hinzu kommt, dass Doppelstrangbrüche, die nicht oder nicht hinreichend repariert wurden, die bedeutendste Ursache für das Sterben von Zellen nach Bestrahlung darstellen. Diese treten mit höherer Aktivität bzw. Dosis in größerem Ausmaß auf, sodass die Wahrscheinlichkeit für den Zelltod mit steigender Aktivität steigt (Herrmann et al., 2006). Auch dies ist mit den vorliegenden Ergebnissen sehr gut vereinbar.

#### 4.2.3 Verlust der mitotischen Aktivität

Der über die Kurzzeiteffekte ermittelte Verlust der mitotischen Aktivität der Zellen lag in der vorliegenden Arbeit zwischen 5 und 10 MBq (s. 3.3.2). Hall und Giaccia (2011) zufolge beträgt die mittlere letale Dosis für den Verlust der proliferativen Kapazität in der Regel weniger als 2 Gy. In einer freundlicherweise vom Institut für Nuklearmedizin zur Verfügung gestellten Formel über den Dosis-Aktivitäts-Zusammenhang (s. 1.5.1) entsprechen 5 MBq bei den gegebenen Versuchsbedingungen grob genähert etwa 88 Gy. 10 MBq entsprechen etwa 351 Gy. Dabei ist zu betonen, dass es sich lediglich um eine zwar möglichst genaue, aber dennoch sehr grobe Einschätzung und keinesfalls um eine

präzise Umrechnung handelt, zumal hier zwei verschiedene physikalische Größen vorliegen. Dennoch liefert die Formel eine Vorstellung über die eingesetzten Dosen und macht deutlich, dass der hier experimentell ermittelte Wert für die mittlere letale Dosis für die proliferative Kapazität mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit über den angegebenen 2 Gy liegt. Dies ist am ehesten darin begründet, dass einige strahleninduzierte Effekte erst nach einer gewissen Latenzzeit deutlich werden und untermauert somit die je nach Messzeitpunkt unterschiedlich starken strahleninduzierten Effekte: So tritt insbesondere auch der Mitosetod häufig erst nach noch einigen regelrechten Mitosen auf (Herrmann et al., 2006). Eine Bestrahlung kann weiterhin auch eine Differenzierung von Zellen bewirken, sodass, teils auch erst nach einigen Zellteilungen, „terminale Funktionszellen“ (Herrmann et al., 2006) entstehen (Herrmann et al., 2006). Somit ist es durchaus schlüssig, dass der ermittelte Wert für die mittlere letale Dosis für die proliferative Kapazität umgerechnet über den 2 Gy aus der Literatur liegt, da hier nur Kurzzeiteffekte untersucht wurden. Der deutliche Unterschied in der Größenordnung kann dabei sicherlich unter anderem auch auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass der Dosis-Aktivitäts-Zusammenhang unvermeidbar auf zahlreichen Annahmen fußen muss und daher einen nicht zu vernachlässigenden Grad an Ungenauigkeit besitzt.

#### 4.2.4 Strahlensensibilität im Vergleich

Ein direkter Vergleich der Strahlenempfindlichkeit der unterschiedlichen Zelllinien zeigte, dass PC-3 Zellen in Bezug auf die Kurzzeiteffekte empfindlicher sind als LNCaP Zellen (s. 3.3.2). Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen von Elgqvist et al. (2016), die PC-3 und LNCaP Zellen mit Lutetium-177 bestrahlten und zu vergleichbaren Zeitpunkten nach der Bestrahlung die Überlebensfraktion mittels WST-1 Assay ermittelten. Die Überlebensfraktionen für PC-3 Zellen lagen dabei unter jenen für LNCaP Zellen (Elgqvist et al., 2016). Insgesamt zeigten sich in der vorliegenden Arbeit LNCaP C4-2b Zellen als radiosensitivste Zelllinie, gefolgt von PC-3 und LNCaP Zellen (s. 3.3.2). Dies ist auch dadurch erklärbar, dass die Strahlenempfindlichkeit mit steigender Proliferationsrate der Zellen steigt, was durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden konnte, da LNCaP C4-2b Zellen die kürzeste Verdopplungszeit besaßen, während jene für LNCaP

Zellen die längste war (s. 3.3.2) (Hall und Giaccia, 2011; Elgqvist et al., 2016). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Verdopplungszeit für LNCaP Zellen (Verdopplungszeit laut Hersteller ca. 60 h) von 63,49 h lässt sich zudem durch Literaturrecherche, die eine Verdopplungszeit von 60 h ergibt, sehr gut bestätigen (Horoszewicz et al., 1983). Für die in der Arbeit verwendeten und von DMSZ erworbenen PC-3 Zellen beträgt die Verdopplungszeit laut Hersteller ca. 50 h, was gut zu den hier ermittelten 43,73 h passt. Für LNCaP C4-2b Zellen ist in den ATCC-Produktinformationen eine Verdopplungszeit von 24-36 h angegeben, was mit den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls konform ist.

#### 4.2.5 Viabilität

Die Tatsache, dass die Viabilität im zeitlichen Verlauf keine nennenswerten Schwankungen zeigte, kann darauf zurückgeführt werden, dass die toten Zellen bzw. jene Zellen, die nicht mehr dazu in der Lage waren, anzuheften, bereits weitestgehend im Zuge der Waschschriffe entfernt wurden. Interessanterweise sieht man insbesondere bei PC-3 Zellen und LNCaP C4-2b Zellen Einbrüche in der Viabilität im Bereich der höheren Aktivitäten (s. 3.3.2). Letztlich wiesen diese beiden Zelllinien auch ein besseres Anhaftungsverhalten als die LNCaP-Zellen, sodass nach den Waschschriffen hier, anders als bei den LNCaP-Zellen möglicherweise auch noch deutlich mehr tote Zellen anhafteten. Insbesondere bei 20 MBq und 24 h nach Bestrahlung sind diese Einbrüche sehr deutlich. Bei LNCaP Zellen war dies zumindest nicht in einem so deutlichen Ausmaß zu beobachten. Passenderweise waren die LNCaP Zellen jedoch auch die in den Kurzzeiteffekten am resistentesten imponierende Zelllinie (s. 3.3.2). Möglicherweise besitzt die Kombination aus einer sehr hohen Aktivität und einer eher kurzen Regenerationszeit einen Einfluss auf das Anhaftungsvermögen der Zellen, abhängig von der Strahlensensibilität der Zelllinie. Hierzu passt, dass insbesondere bei PC-3 und LNCaP C4-2b Zellen bei den höheren Aktivitäten 48 h und 72 h nach Bestrahlung wieder Viabilitäten in der Größenordnung der Ausgangsviabilitäten zu beobachten waren. Um genauere Informationen über die Viabilität der Zellen zu erhalten, bietet sich bei tiefergehendem Interesse ein MTT-Assay an. Dieser konnte zum einen aus Strahlenschutzgründen nicht durchgeführt werden, zum anderen liegt der Fokus dieser

Dissertation auf den Langzeiteffekten durch die Bestrahlung mit Lutetium-177 in Abhängigkeit von VEGF-C.

#### 4.3 Langzeiteffekte der Betabestrahlung an unbehandelten Zellen

Es zeigten sich für die verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Verläufe der Überlebenskurven:

##### 4.3.1 LNCaP und LNCaP C4-2b Zellen

Das A/B Verhältnis (vgl. 1.5.5) für LNCaP C4-2b Zellen lag bei -0,47 MBq. Für LNCaP Zellen lag es bei -0,67 MBq (s. 0). Damit konnte bei beiden Zelllinien ein im Vergleich zu den PC-3 Zellen geringer Wert für das A/B Verhältnis beobachtet werden. Entsprechend überwog bei diesen Zelllinien auch, anders als bei den PC-3 Zellen, die quadratische Komponente der Zellabtötung. Dies wiederum spiegelte sich entsprechend in der jeweils breiten Schulterregion beider Überlebenskurven wider (s. Abb. 16). Eine ausladendere Schulterregion, auch im Vergleich zu der von PC-3 Zellen, zeigte sich ebenfalls in der von van Oorschot et al. (2013) angefertigten Überlebenskurve für einen mit LNCaP Zellen durchgeführten Koloniebildungsassay, was in Einklang mit den hier vorliegenden Ergebnissen zu bringen ist.

Niedrige A/B Werte für Prostatakarzinomzellen sind außerdem in der Literatur vorbeschrieben, was die hier generierten Daten untermauert (Hegemann et al., 2014; Vogelius und Bentzen, 2013).

##### 4.3.2 PC-3 Zellen

In der Überlebenskurve für PC-3 Zellen zeigte sich lediglich eine sehr kleine Schulterregion (s. Abb. 16). Eine gering ausgeprägte Schulterregion zeigte sich auch im Kurvenverlauf des von van Oorschot et al. (2013) durchgeführten Koloniebildungsassays, was die Plausibilität der hier generierten Überlebenskurve untermauert. Das A/B-Verhältnis der in der vorliegenden Arbeit generierten Überlebenskurve war mit 3,30 MBq entsprechend groß, was bedeutet, dass der lineare Anteil der Zellabtötung hier überwog.

Das A/B Verhältnis für PC-3 ist im Vergleich zu den A/B Verhältnissen von LNCaP C4-2b und LNCaP recht groß (s. 0). Vogelius und Bentzen (2013) machen jedoch in ihrer Studie deutlich, dass auch größere A/B Verhältnisse für das Prostatakarzinom bereits vorbeschrieben sind.

#### 4.3.3 Strahlenhormesis

In der Überlebenskurve für LNCaP und LNCaP C4-2b Zellen fiel ein leichter Anstieg der Überlebensfraktion im Bereich geringer Aktivitäten auf, dem bei weiterer Erhöhung der Aktivitäten jedoch ein deutlicher Abfall folgte (s. Abb. 16). Dies könnte im Sinne einer Strahlenhormesis gedeutet werden, deren Existenz als wahrscheinlich angesehen wird, auch wenn die ihr zugrundeliegenden Mechanismen nach derzeitigem Stand der Forschung noch nicht vollends verstanden sind (Jolly und Meyer, 2009; Kauffmann et al., 2011). Dass bei PC-3 Zellen im Rahmen dieser Dissertation keine Hinweise auf eine Strahlenhormesis gefunden werden konnten ist vereinbar mit den Ergebnissen von Li et al. (2018), die ebenfalls keine Strahlenhormesis bei PC-3 Zellen beobachteten. Li et al. (2018) führten dies auf eine durch Strahlung im Niedrigdosisbereich bedingte Aktivierung des *ataxia teleangiectasia mutated/p21* (ATM/p21) Signalwegs und dessen inhibitorische Wirkung auf die Proliferation bei Zellen, denen das Tumorsuppressorgen p53 fehlt, zurück. PC-3 Zellen exprimieren passenderweise kein p53 (He et al., 2012). Van Oorschot et al. (2013) zeigten passend dazu und unabhängig von den durch Li et al. (2018) generierten Ergebnissen mittels Western Blot, dass bei PC-3 Zellen vier Stunden nach Bestrahlung mit vier Gray kein p53 induziert wurde, bei LNCaP Zellen jedoch sehr wohl. Auch Chappell et al. (2012) beziehen sich auf einen positiven p53 Status in LNCaP Zellen. Der positive p53 Status in LNCaP Zellen kann in Zusammenschau mit den Resultaten von Li et al. (2018) als eine mögliche Begründung für das Auftreten einer Strahlenhormesis in LNCaP Zellen gedeutet werden. Karanika et al. (2017) zufolge haben LNCaP C4-2b Zellen ebenfalls einen positiven p53-Status, was durchaus mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit vereinbar ist.

#### 4.3.4 Low dose Hyperradiosensitivity

Bei den PC-3 Zellen fiel im Vergleich der linear quadratisch angepassten Überlebenskurve mit der nicht-angepassten Überlebenskurve eine Senke letzterer im

Bereich geringer Aktivitäten auf, auf die wiederum eine leichte Steigung folgte (s. Abb. 16). Dieser Verlauf passt grundsätzlich zu einer „*low-dose Hyperradiosensitivity*“ (HRS) mit nachfolgender „*increased radioresistance*“ (IRR). Das Phänomen einer solchen erhöhten Strahlensensibilität ist für gewisse Zelllinien beschrieben und tritt Enns et al. (2004) zufolge bei Dosen  $<50$  cGy auf. Im Bereich zwischen 50 cGy und 100 cGy stellt sich Enns et al. (2004) zufolge dann eine IRR ein. Betrachtet man Abb. 16 so sieht man insbesondere im Bereich bis 0,1 MBq einen Abfall der Überlebensfraktion, dem ein Anstieg im Bereich von 0,1 MBq bis etwa 0,5 MBq folgt. Der Formel für den Dosis-Aktivität-Zusammenhang zufolge entspricht eine Aktivität von 0,1 MBq in grober Näherung einer Dosis von etwa 1,75 Gy. Eine Aktivität von 0,5 MBq entspricht näherungsweise einer Dosis von 8,78 Gy. Da die Formel jedoch wie bereits erwähnt lediglich eine sehr grobe Einschätzung liefert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die den jeweiligen Aktivitäten entsprechenden Dosen in Wahrheit doch etwas niedriger liegen. Folglich ist es durchaus denkbar, dass hier eine HRS mit nachfolgender IRR beobachtet wurde. Ein Blick in die Literatur lässt unterschiedliche Ansichten zu: Die von Enns et al. (2004) erhobenen Daten weisen darauf hin, dass HRS mit einer p53-abhängigen Apoptose assoziiert ist. Dies wiederum würde das Vorliegen einer HRS für PC-3 Zellen zunächst eher unwahrscheinlich machen, da diese kein p53 exprimieren (He et al., 2012). Andererseits beobachteten Hermann et al. (2008) eine HRS bei PC-3 Zellen, was wiederum für eine Interpretation des oben beschriebenen Kurvenverlaufs als HRS sprechen würde. Möglicherweise existiert ein die p53-abhängige Apoptose ergänzender Mechanismus, welcher der HRS zugrunde liegt. Zhao et al. (2013) konnten beispielsweise für die Lungenkarzinomzelllinie A549 einen Zusammenhang zwischen strahleninduzierter Autophagie und einer HRS feststellen, nämlich dass eine Inhibition der Autophagie zu einer gesteigerten HRS führt.

Der jeweilige Vergleich der linear quadratisch angepassten mit den nicht angepassten Überlebenskurven zeigte sowohl bei LNCaP C4-2b Zellen als auch bei LNCaP Zellen keinen wesentlichen Unterschied der Kurvenverläufe im Bereich niedriger Aktivitäten (und damit niedriger Dosen), die im Sinne einer sogenannten HRS zu interpretieren wäre (s. Abb. 16). Enns et al. (2004) Theorie zufolge müssten LNCaP und LNCaP C4-2b Zellen zumindest die Voraussetzungen für eine HRS erfüllen, da sie einen positiven p53 Status besitzen (Chappell et al., 2012; Enns et al., 2004; Karanika et al., 2017). Hermann et al.

(2008) beschreiben zudem eine HRS für LNCaP Zellen. Es ist durchaus denkbar, dass eine möglicherweise vorhandene HRS im vorliegenden Fall durch den Effekt der Strahlenhormesis überdeckt wurde. Gleichzeitig kann die HRS auch unterschiedlich stark ausgeprägt sein, je nachdem wie groß der Anteil an Zellen in der G2-Phase im Verhältnis zur Gesamtpopulation ist: Eine Zellpopulation mit einem großen Anteil an Zellen in der G2-Phase lässt Enns et al. (2004) zufolge mehr Apoptose erwarten als eine Zellpopulation mit einem Großteil der Zellen in der G1 oder S-Phase. Möglicherweise befanden sich die Zellen also auch zum Zeitpunkt der Bestrahlung vermehrt in der G1 oder S-Phase, sodass eine mögliche HRS nicht so stark ausgeprägt war.

#### 4.3.5 Gibt das LQ-Modell die Daten passend wieder?

Bei der Anwendung eines Modells auf bestimmte Versuchsdaten sollte stets diskutiert werden, wie gut das verwendete Modell zu den generierten Daten passt. Da Modelle nur eine Annäherung an die Realität darstellen, besitzt auch das LQ-Modell natürlicherweise Schwächen. Diskutiert wird häufig, ob das LQ-Modell auch den höheren Dosisbereich passend wiedergeben kann, wobei wirklich gute Alternativen fehlen (McMahon, 2018). Bekannt ist beispielsweise auch, dass das LQ-Modell Phänomene wie eine HRS nicht wiedergibt (Andisheh et al., 2013). Dies hat sich auch für die mit dem LQ-Modell angepasste Überlebenskurve für PC-3 Zellen so gezeigt (s. Abb. 16). Im Folgenden soll diskutiert werden, wie gut und wie plausibel die hier generierten Daten vom LQ-Modell wiedergegeben werden.

Als ein Aspekt ist das negative Vorzeichen der A/B Verhältnisse für LNCaP C4-2b Zellen und LNCaP Zellen zu nennen. In den meisten Fällen handelt es sich beim A/B Verhältnis um eine positive Zahl (Herrmann et al., 2006). Jedoch sind auch negative A/B Verhältnisse beschrieben, die in einem Review von van Leeuwen et al. (2018) als Ergebnis eines negativen Bs durch statistische Phänomene interpretiert werden. Die Frage, ob das verwendete Modell dennoch auf die generierten Daten logisch anwendbar ist, wird im Folgenden eruiert: Die mittels LQ-Modell generierte Kurve für das Zellüberleben wird im Allgemeinen durch  $\ln SF = -AD - BD^2$  beschrieben, wobei D die verwendete Dosis, SF die Überlebensfraktion und A und B je nach Zelle und Gewebe spezifische Konstanten darstellen (Herrmann et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit

wurde die Gleichung angepasst zu:  $\ln SF = -AM - BM^2$ . M steht in dieser Formel für die verwendete Aktivität, wobei diese Anpassung dadurch gerechtfertigt ist, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Dosis und Aktivität besteht (s. 1.5.1). Die Grundzüge der Gleichung bleiben somit in Form von einer linearen (- AM) und einer quadratischen (-  $BM^2$ ) Komponente erhalten. Das negative A/B Verhältnis ergab sich jeweils aus einem negativen A bei positivem B. Entsprechend lässt sich das Ergebnis durch ein durch die lineare Komponente bestimmtes Wachstum der Zellen trotz Bestrahlung interpretieren. Ein solches Wachstum konnte in der Tat bei LNCaP C4-2b Zellen und LNCaP Zellen im Bereich niedriger Aktivitäten beobachtet werden, sodass das negative Vorzeichen einen mathematischen Ausdruck des beobachteten Zellwachstums darstellt (s. 0). Der Faktor A spiegelt nämlich den Niedrigdosisbereich wider, was mit dem hier beobachteten Anstieg der Überlebensfraktion im Niedrigdosisbereich zu vereinbaren ist (Franken et al., 1997; van Oorschot et al., 2013). Van Oorschot et al. (2013) schreiben weiterhin, dass die sog. „*potentially lethal damage repair*“ ebenfalls durch den Faktor A widergespiegelt wird, was die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse umso mehr stützt, da eine Schadensreparatur neben der Strahlenhormesis grundsätzlich auch ein denkbarer Erklärungsansatz für ein erhaltenes/gesteigertes Überleben darstellen kann. Hinzu kommt, dass van Oorschot et al. (2013) die „*potentially lethal damage repair*“ in LNCaP Zellen, nicht jedoch in PC-3 Zellen beobachten konnten, was die hier generierten Ergebnisse einmal mehr plausibel erscheinen lässt. Das anschließende Abfallen der Kurve kann dadurch erklärt werden, dass ab einer gewissen Aktivität der quadratische Teil der Kurve stärker ins Gewicht fällt und den Kurvenverlauf dominiert. Somit zeigt sich, dass das Modell in dieser Hinsicht die Daten sehr passend wiedergibt.

Dass die durch das LQ-Modell angepassten Kurven die generierten Ergebnisse gut wiedergeben, lässt sich auch durch die ermittelten LD50-Werte untermauern, deren Zahlenwerte gut mit den experimentellen Beobachtungen in Einklang zu bringen sind (s. 0). Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir außerdem anhand der rechnerischen LD50-Werte feststellen, dass in Bezug auf die Langzeiteffekte die LNCaP Zellen am sensibelsten auf die Bestrahlung ansprachen (LD50: 0,80 MBq), gefolgt von den LNCaP C4-2b Zellen (LD50: 0,84 MBq) und danach gefolgt von den PC-3 Zellen (LD50: 0,94 MBq), was ebenfalls zu den experimentellen Beobachtungen passt. Mit Blick auf die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Verdopplungszeiten der verwendeten Zelllinien

überrascht zunächst die hohe Empfindlichkeit der LNCaP Zellen, da LNCaP Zellen die längste Verdopplungszeit besaßen. Letztlich eigneten sich LNCaP Zellen jedoch nur bedingt für die eher härteren Versuchsbedingungen des Koloniebildungsassays, die ein Aussäen der Zellen als Einzelzellen sowie lange Inkubationszeiten vorsehen.

Interessanterweise ist das LQ-Modell sogar in der Lage, eine Kurve bis 20 MBq aufzuzeigen, obwohl bei Aktivitäten  $> 1$  MBq keine Kolonien wuchsen. Passend zu den beobachteten Ergebnissen nimmt die Überlebensfraktion in dem Bereich der höheren Aktivitäten auch verschwindend geringe Werte an, die mit der Zahl 0 gleichzusetzen sind. In Abb. 17 führt dies dazu, dass es so scheint, als seien die PC-3 Zellen gegen die Strahlung weitestgehend resistent und als hätten sie eine sehr breite Schulterregion, obwohl es sich eigentlich um einen eher linearen Abfall der Überlebensfraktion handelt. Bei genauerem Betrachten der y-Achse wird jedoch deutlich, dass dies der Tatsache geschuldet ist, dass die Kurvenanpassungen für LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen bis 20 MBq mit Überlebensfraktionen im Bereich von  $10^{-400}$  einhergehen, während dieser Bereich bei PC-3 Zellen in die Größenordnung  $10^{-40}$  fällt. Praktisch betrachtet sind jedoch sowohl  $10^{-400}$  als auch  $10^{-40}$  mit der Zahl 0 gleichzusetzen. Die Werte erklären sich unter anderem dadurch, dass der Logarithmus von 0 nicht definiert ist und somit keine 0 auf der y-Achse abgetragen werden kann. Letztlich muss dazu gesagt werden, dass der Bereich, in dem die Zellen zwar Schäden davontragen, aber dennoch fähig sind, Kolonien zu bilden im Vergleich zu jenem, ab dem keine Kolonien mehr wachsen für die Fragestellung dieser Arbeit interessanter ist. Zur Kontrolle, ob die Ergebnisse im Bereich der höheren Aktivitäten einen Einfluss auf die Kurvenanpassung des relevanteren Bereichs haben, wurden die Kurven versuchsweise jeweils im Bereich von 0 MBq bis 20 MBq und von 0 MBq bis 2,5 MBq angepasst. Hier ergaben sich jeweils dieselben Werte für A und B, sodass die zusätzlichen Werte im Bereich der größeren Aktivitäten keinen negativen Einfluss auf die Kurvenanpassung besitzen. Lässt man sich die Kurven von 0 MBq bis 1 MBq jeweils mittels Kurvenanpassung darstellen, so präsentieren sich außerdem deutlich schlechter angepasste Kurvenverläufe, die nicht dem typischen Verlauf einer Überlebenskurve entsprechen. Bezieht man hingegen die höheren Aktivitäten mit ein, so ergibt sich eine deutlich plausiblere Kurve. Dies deutet darauf hin, dass die Kurven im Bereich von 0 MBq bis 1 MBq allein nicht gut angepasst sind und dass diese Diskrepanz durch Einbeziehen der vermeintlich uninteressanteren höheren Aktivitäten ausgeglichen

wird und zu einer sinnvollen Überlebenskurve führt. Darüber hinaus geben die angepassten Kurven den zu einer Niedrig-LET Strahlung passenden Kurvenverlauf gut wieder (Hall und Giaccia, 2011). Insgesamt lässt sich also sagen, dass das LQ-Modell die generierten Daten durchaus sinnvoll wiedergibt.

#### 4.3.6 Die Wahl des Aktivitätsbereichs

Ein weiterer diskussionswürdiger Aspekt ist der eingesetzte Aktivitätsbereich von 0 MBq bis 20 MBq. Hier ist anzumerken, dass der Großteil der Methoden für diese Arbeit von Grund auf neu etabliert wurde und es entsprechend keine Vorerfahrungen gab. Der Aktivitätsbereich wurde daher großzügig gewählt, um sichergehen zu können, dass man ein Abtöten aller Zellen in jedem Falle erreicht. Retrospektiv lässt sich sagen, dass die Ergebnisse zeigen, dass eine Anpassung des Aktivitätsbereichs für künftige Experimente auf diesem Gebiet sinnvoll ist. Sinnvoll wäre beispielsweise ein Verzicht auf Aktivitäten größer als 5 MBq, dafür aber eine Ausweitung des Bereiches von 0 MBq bis 2,5 MBq mit weiteren, kleinschrittigeren Messpunkten. Mit der im Nachhinein zur Ergebnisauswertung durch das Institut für Nuklearmedizin zur Verfügung gestellten Umrechnungsformel zeigte sich, dass 20 MBq unter den vorliegenden Versuchsbedingungen in sehr grober Näherung etwa 351,22 Gy entsprechen, was einer sehr hohen Dosis entspricht. Darüber, für welchen Aktivitäts- oder Dosisbereich das LQ-Modell seine Daseinsberechtigung hat, ist man sich in der Forschung nicht einig: Während einige Stimmen postulieren, dass 5 Gy oder mehr bereits zu viel für das LQ-Modell seien, erzielen andere noch bei „tens of Gy“ (McMahon, 2018) gute Ergebnisse (McMahon, 2018). Die letztere Erfahrung kann nach Auswertung dieser Arbeit geteilt werden (siehe oben). Eine ausführliche Diskussion der Methode selbst findet sich unter 4.1.1.

#### 4.4 Untersuchung des Einflusses von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung

Es zeigte sich in den durchgeführten Versuchen wider Erwarten kein relevanter Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von PC-3 oder LNCaP C4-2b Zellen bei Betabestrahlung

mit Lutetium-177. Mögliche Gründe hierfür sollen im Folgenden eruiert werden, beginnend mit der tiefergehenden Diskussion der Methodik:

#### 4.4.1 Methodik

Da die Methoden und somit auch der Koloniebildungsassay speziell für diese Arbeit neu etabliert wurden, soll auf die Hintergründe sowie auf die Vor- und Nachteile dieser Methode eingegangen werden. Hinsichtlich des Versuchsablaufs lässt sich sagen, dass es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten gibt, diesen zu gestalten. Einen wichtigen Unterscheidungspunkt stellt beispielsweise der Zeitpunkt der Zellaussaat in Bezug zum Bestrahlungszeitpunkt dar. So kann die Zellaussaat für den Koloniebildungsassay entweder vor oder nach der Bestrahlung erfolgen. Die Aussaat nach der Bestrahlung ermöglicht vor allem auch eine Untersuchung der Reparatur potenziell letaler und subletaler DNA-Schäden, indem man die Zellen entweder unmittelbar oder mit einer Verzögerung nach der Behandlung für den Koloniebildungsassay aussät. Auch kann man auf diese Weise beispielsweise zusätzlich noch das Anheftungsverhalten der bestrahlten Zellen an die Oberfläche der Six-Well Platte untersuchen. Sät man die Zellen bereits vor der Behandlung für den Koloniebildungsassay aus, so erhält man relativ schnell eine Einschätzung der Sensibilität der Zellen gegenüber der Behandlung bzw. Bestrahlung (Franken et al., 2006). Aus mehreren Gründen entschieden wir uns für die vorliegende Arbeit dazu, die Zellen zunächst für den Koloniebildungsassay auszusäen und anschließend zu bestrahlen: Zum einen lautete die Fragestellung an den Koloniebildungsassay im ersten Schritt, wie sensibel die untersuchten Zelllinien auf die Bestrahlung mit Lutetium-177 reagieren, um eine Ersteinschätzung darüber zu erlangen, welchen Effekt die Bestrahlung allein auf die Zellen hat. Die spezielle Untersuchung potenziell letaler oder subletaler Schäden stand hierbei nicht im Fokus der Fragestellung. Im zweiten Schritt sollte, vergleichbar mit einem Screening, geschaut werden, ob es einen VEGF-C induzierten Effekt auf die Sensibilität von Prostatakarzinomzellen gegenüber einer Bestrahlung mit Lutetium-177 gibt. Weiterhin sollte der Versuchsaufbau in etwa mit jenem von Frau Dr. Liebscher vergleichbar sein, die den Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei externer Bestrahlung in ähnlicher Weise untersuchte (Liebscher, 2017). Zu guter Letzt war es auch aus reinen

Strahlenschutzgründen nicht möglich, die Zellen zuerst zu bestrahlen und anschließend für den Koloniebildungsassay auszusäen, da für bestimmte Schritte des Versuchsaufbaus Gerätschaften notwendig sind, die ausschließlich im nicht-radioaktiven Labor im Biomedizinischen Zentrum I zur Verfügung stehen. Vor diesen Aspekten erschien die gewählte Abfolge von Aussaat und Bestrahlung am geeignetsten und sinnvollsten, auch wenn dadurch mit Sicherheit Schritte wie beispielsweise die Fähigkeit der Zellen, nach Bestrahlung anzuwachsen, nicht untersucht wurden. Hierauf lag jedoch in dieser Arbeit auch nicht der Fokus der Fragestellung.

Weiterhin ist es wichtig, auf die Grenzen der Messgenauigkeit hinzuweisen, die hier anhand von ausgewählten Beispielen erläutert werden sollen:

Mit Blick auf die Auswertung der Koloniebildungsassays ist an erster Stelle die durchaus gegebene Fehleranfälligkeit der Auszählmethode zu erwähnen, zumal das manuelle Auszählen der Kolonien unter einem Auflichtmikroskop zwangsläufig auch der Subjektivität des Untersuchers unterliegt. Darüber hinaus birgt auch die Genauigkeit der Aussaat der Zellen für den Koloniebildungsassay potenzielle Fehlerquellen. Trotz größter Sorgfalt können weder Schwankungen in der ausgesäten Zellzahl noch das mangelnde Vorliegen mancher Zellen als Einzelzellen ausgeschlossen werden. Auch die lange Dauer und zahlreichen Versuchsschritte der Koloniebildungsassays erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Fehlerquellen. Vor diesem Hintergrund entschieden wir uns mit Blick auf den Koloniebildungsassay mit Bestrahlung allein dazu, auf die Zelllinie LNCaP für die Kombination aus einer VEGF-C Behandlung und Bestrahlung zu verzichten. Diese Zelllinie hatte sich als generell eher untauglich für einen Koloniebildungsassay gezeigt, da bereits das Generieren der Daten aus den Langzeiteffekten aufgrund der eingeschränkten Koloniebildungsfähigkeit der Zellen und einer sehr niedrigen PE bei Aussaat der Zellen als Einzelzellen recht schwierig war. Über ähnliche Erfahrungen mit LNCaP Zellen und ihrer eingeschränkten Fähigkeit zur Koloniebildung findet man auch Berichte in der Literatur (Leith, 1994). Die hier generierte Zellüberlebenskurve der LNCaP Zellen weist damit einen hohen Grad an statistischer Unsicherheit auf. Daher beschränkten wir uns für die Untersuchung der Frage nach einem VEGF-C induzierten Effekt auf die Zelllinien PC-3 und die LNCaP-Schwesterzelllinie LNCaP C4-2b, die in den Vorversuchen zuverlässige Ergebnisse lieferten und auch leicht

Kolonien bildeten. Für zukünftige Projekte könnte beispielsweise eine Fibronectin-Beschichtung der Six-Well Platte vorgenommen werden, um bessere Wachstumsbedingungen für LNCaP Zellen zu schaffen. Bei LNCaP C4-2b Zellen könnte man darüber hinaus die ausgesäte Zellzahl etwas erhöhen, um die PE weiter zu optimieren.

Hinsichtlich der Versuchsetablierung eines Koloniebildungsassays mit LNCaP C4-2b Zellen und rhVEGF-C Behandlung wurde bereits im Ergebnisteil auf die Schwierigkeiten der Versuchsetablierung eingegangen (s. 3.5.2). Eine Stellschraube im Versuchsprotokoll wäre die Serumdeprivation, der wiederum das von Serum abhängige Zellwachstum gegenübersteht. In der vorliegenden Arbeit konnte herausgefunden werden, dass eine Serumdeprivation vom Abend des Aussaattages bis zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung für die LNCaP C4-2b Zellen zu lang ist, sodass einerseits kaum Kolonien wachsen konnten und jene Zellen, die noch Kolonien bildeten, bereits einer gewissen Selektion unterlagen. Weiterhin besteht beim aufgrund der langen Inkubationszeit zwangsläufig notwendigem Wechsel auf serumhaltiges Medium die Gefahr, die Ergebnisse durch einen Wachstumsschub der Zellen durch das Serum zu verfälschen. Gänzlich auf eine Serumdeprivation zu verzichten bedeutetet potenzielle Störfaktoren zu tolerieren. Da Frau Dr. Liebscher jedoch auch ohne Serumdeprivation arbeitete und dennoch valide Ergebnisse erzielte, halten wir das Ausmaß potenzieller Störfaktoren für gering (Liebscher, 2017). Letztlich halten wir es außerdem mit Blick auf die in dieser Arbeit generierten Daten für unwahrscheinlich, auch bei Anwendung einer Serumdeprivation einen Effekt zu beobachten, zumal Frau Dr. Liebscher keine Serumdeprivation durchführte und dennoch einen signifikanten Effekt bei ihren Versuchen mit Röntgenstrahlung beobachtete (Liebscher, 2017).

Nach ausführlicher Diskussion halten wir das Protokoll ohne Serumdeprivation nach wie vor für die sinnvollste Variante. Eine Wiederholung dreier unabhängiger Versuche könnte sicherlich mehr Aufschlüsse geben. Vor dem Hintergrund der bereits generierten Daten, verzichteten wir jedoch nach Kosten-Nutzen-Abwägung auf die weitere Etablierung/Umsetzung dieses Protokolls. In Zusammenschau all dieser Aspekte besteht die Möglichkeit, dass ein eventuell vorhandener, jedoch geringfügiger Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen methodisch bedingt verborgen blieb.

Inwiefern ein derartig geringer Einfluss eine klinische Relevanz besäße, bliebe allerdings fragwürdig.

#### 4.4.2 Strahlensensibilität und VEGF-C

Eine VEGF-C induzierte Erhöhung der Strahlenresistenz, wie wir sie im Rahmen der Arbeitshypothese vermuteten, konnten wir mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Versuchsdaten nicht bestätigen. Die vorliegenden Ergebnisse (insbesondere die Koloniebildungsassays) deuten darauf hin, dass VEGF-C keinen Einfluss auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 hat. Dies wurde zum einen anhand der Überlebenskurven für siSCR und siVEGF-C behandelte PC-3 Zellen deutlich (s. 3.5.1). Zum anderen ergaben auch die Versuche mit rhVEGF-C bzw. Negativkontrolle behandelten LNCaP C4-2b Zellen und Lutetium-177 keinen Anhalt für einen Einfluss von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 (s. 3.5.2). Diese Daten sind zudem mit dem in der Zellzyklusanalyse demonstrierten fehlenden bzw. fraglichen VEGF-C induzierten Effekt auf die G2/M Phase des Zellzyklus in Einklang zu bringen (s. 3.2).

Über den Zusammenhang von Strahlensensibilität und VEGF-C finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Einträge: Frau Dr. Liebscher konnte in ihren Koloniebildungsassays mit Prostatakarzinomzellen und Röntgenstrahlung einen positiven Einfluss von VEGF-C auf die Bestrahlungsresistenz herausarbeiten (Liebscher, 2017). Wang et al. (2020) untersuchten die Nasopharynxkrebszelllinie CNE-2 auf eine VEGF-C Abhängigkeit der Strahlensensibilität und fanden heraus, dass eine VEGF-C Unterdrückung mit Bestrahlung die Proliferation und Klonogenität der Zellen inhibiert und die Apoptose und DNA-Schaden erhöht. Sie demonstrierten dabei, dass eine VEGF-C Unterdrückung die Strahlensensibilität über den NF-kb Signalweg erhöht (Wang et al., 2020). Ionisierende Strahlung sorgt jedoch für eine Aktivierung der anti-apoptotischen Mechanismen von NF-kb, sodass es denkbar wäre, dass sich die strahleninduzierte Aktivierung von NF-kb in den Versuchen der vorliegenden Dissertation und der VEGF-C bezogene NF-kb Signalweg ausglich (Anderson et al., 2012; Kaltschmidt et al., 2000; Wang et al., 1996). Abgesehen davon verwendeten Wang et al. (2020) (ebenso wie das UKD) im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit, Röntgenstrahlung (Liebscher, 2017).

Möglicherweise spielt auch die Art der Bestrahlung eine entscheidende Rolle für die Auswirkungen eines VEGF-C induzierten Effekts auf die Strahlensensibilität. So fanden Kaltschmidt et al. (2000) heraus, dass je nach „apoptotischem Stimulus“ eine NF-kB vermittelte pro- oder antiapoptotische Antwort in ein und derselben Zelllinie hervorgerufen werden kann. Bezogen auf die vorliegenden Ergebnisse könnte man somit auch vermuten, dass die unterschiedlichen Arten der Bestrahlung in Frau Dr. Liebschers Arbeit und in der vorliegenden Dissertation auf zellulärer Ebene unterschiedliche Antworten bezüglich der NF-kB vermittelten Apoptose hervorrufen (Kaltschmidt et al., 2000; Liebscher, 2017).

Kesler et al. (2014) zeigten sogar eine durch VEGF-C erhöhte Strahlensensibilität in Lymphendothelzellen. Besagte mit VEGF-C behandelten Lymphendothelzellen zeigten außerdem einen erhöhten Anteil an Zellen in der G2/M und S Phase des Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung (Kesler et al., 2014). Mit Blick auf die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zur Zellzyklusanalyse erscheint es daher verständlich, dass bei LNCaP C4-2b Zellen kein Zusammenhang zwischen VEGF-C und der Strahlensensibilität gefunden wurde, da wir für diese Zelllinie auch keinen VEGF-C induzierten Effekt auf den Zellzyklus beobachteten. Bezüglich der PC-3 Zellen beobachteten wir zwar ebenso (wie Kesler et al. (2014) für Lymphendothelzellen) einen erhöhten Anteil an VEGF-C positiven Zellen in der S-Phase, jedoch nicht in der G2/M-Phase. Letzteres entspräche auch nicht den in der Arbeitshypothese formulierten Erwartung und könnte damit zusammenhängen, dass Kesler et al. (2014) Lymphendothelzellen und keine Prostatakarzinomzellen betrachteten. Möglicherweise ist außerdem der VEGF-C induzierte Effekt auf den Zellzyklus als Grundlage für eine VEGF-C induzierte veränderte Strahlensensibilität bei PC-3 Zellen zu gering ausgeprägt, um im Koloniebildungsassay einen Effekt beobachten zu können.

Homer et al. (2001) untersuchten an strahlensensiblen bzw. strahlenresistenten Kehlkopfkrebspräparaten sowie auch an Normalgewebe die VEGF und VEGF-C Expression mittels Immunhistochemie. Hierbei fanden sie keinen Unterschied in der VEGF oder VEGF-C Expression zwischen strahlensensiblen und strahlenresistenten Proben (Homer et al., 2001). Auch Ye et al. (2006) konnten bei einer immunhistochemischen Untersuchung strahlensensibler und strahlenresistenter

Nasopharynxpräparate keinen Unterschied in der VEGF-C Expression zwischen den beiden Gruppen finden. Hierdurch kommt wieder eine andere Seite des Zusammenhangs von VEGF-C und Strahlensensibilität zum Vorschein: Unter bestimmten Voraussetzungen hat VEGF-C keinen prädiktiven Wert in Bezug auf die Strahlensensibilität. Dieser Zusammenhang ist grundsätzlich auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang zu bringen. Um diesem Aspekt genauer nachzugehen, wäre die Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen bezüglich VEGF-C (und seiner Rezeptoren) an *Responder*- und *Non-Responder* Prostatakarzinompräparaten der <sup>177</sup>Lu-PSMA-Therapie interessant.

#### 4.4.3 Offene Fragen und mögliche Erklärungsansätze

Wie in der Einleitung beschrieben, existieren zahlreiche Publikationen über eine VEGF-C vermittelte gesteigerte Tumoraggressivität. Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Hypothese eines Einflusses von VEGF-C auf die Strahlensensibilität von Prostatakarzinomzellen konnte nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten auf einen fehlenden Zusammenhang zwischen VEGF-C und der Strahlensensibilität der untersuchten Zelllinien bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 hin, was auch durch Literaturrecherche gestützt werden kann (s. 4.4.2). Somit stellt sich die Frage nach weiteren potenziellen molekularbiologischen Erklärungsansätzen, die in dieser Arbeit nicht speziell betrachtet wurden und als Anhaltspunkt für zukünftige Projekte dienen können:

#### 4.4.4 VEGFR-2, VEGFR-3 und NRP-2

Während PC-3 Zellen nur den VEGFR-2 exprimieren, besitzen LNCaP C4-2b Zellen lediglich den VEGFR-3 (s. 3.1). Unveröffentlichte Daten aus unserem Labor zeigten, dass PC-3 Zellen und LNCaP C4-2b Zellen allenfalls sehr wenig NRP-2 exprimieren. Bezugnehmend auf Vordaten aus dem UKD (hier Verwendung von Röntgenstrahlung) führten wir die oben beschriebenen Versuche mit Lutetium-177 durch (Liebscher, 2017). Wie unter 1.4.2 beschrieben, kann VEGF-C VEGFR-3 Homodimere oder VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimere induzieren. Chen et al. (2012) beschreiben, dass VEGFR-2

über VEGF-C keine Homodimere bilden kann und auch Nilsson et al. (2010) konnten in ihren *in situ proximity ligation assays* zum einen keine VEGFR-2 Homodimerisierung durch VEGF-C und zum anderen auch nur eine sehr schwach ausgeprägte VEGFR-2 Phosphorylierung durch VEGF-C nachweisen. Das wiederum wäre eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der Versuche mit PC-3, da diese nur über VEGFR-2 und nicht über VEGFR-3 verfügen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass beispielsweise die Phosphorylierungsgrenze von VEGFR-2 durch NRP-2 herabgesetzt wird und dass NRP-2 die Aktivierung von VEGFR-2 und VEGFR-3 begünstigt (Caunt et al., 2008; Favier et al., 2006). Darüber hinaus ist NRP-2 für bestimmte durch VEGF-C induzierte Vorgänge notwendig, so z. B. für das Sprießen von Lymphgefäßen. Hierbei konnten Xu et al. (2010) zeigen, dass NRP-2 für das Sprießen von Lymphgefäßen insbesondere mit VEGFR-3 interagiert. Eine mögliche Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse könnte somit auch in der sehr geringen Expression von NRP-2 in den verwendeten Zellen liegen. Zum einen ist es denkbar, dass die VEGF-C Signalübertragung hierdurch lediglich in einem geringeren Maße stattfinden konnte. Zum anderen ist es denkbar, dass auch andere VEGF-C induzierte Vorgänge, die das Zellüberleben fördern, in ähnlicher Weise auf eine Interaktion zwischen NRP-2 und VEGFR-3 angewiesen sind. Auch abgesehen davon ist die Rolle von NRP-2 für das maligne Potenzial von Tumoren nicht zu verkennen: Borkowetz et al. (2020) zeigten beispielsweise, dass NRP-2 auch ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor für das krebsspezifische Überleben bei Prostatakarzinompatienten ist. NRP-2 kann außerdem die Zellmigration, die Proliferation und das Überleben von Krebszellen fördern und spielt eine bedeutende Rolle bei Stress (Dutta et al., 2016; Stanton et al., 2013b). Für das Blasenkarzinom konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass auch die Co-Expression von NRP-2 und VEGF-C einen prognostischen Wert besitzt (Keck et al., 2015). Analog dazu ist eine NRP-2 Expression kombiniert mit einer geringen VEGF-C Expression mit einem kürzeren krebsspezifischen Überleben beim Prostatakarzinom vergesellschaftet (Borkowetz et al., 2020). Es ist also durchaus denkbar, dass das NRP-2 Expressionslevel der verwendeten Zellen einen Einfluss auf die Ergebnisse der durchgeführten Versuche hatte.

Deng et al. (2015) konnten zeigen, dass es zur VEGF-C induzierten Migration von Lymphendothelzellen sowohl der Aktivierung des ERK als auch des AKT Signalwegs bedarf. Die ERK-Aktivierung erfolgt dabei über VEGFR-3 Homodimere, die AKT-Aktivierung über VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimere (Deng et al., 2015). Hierdurch wird die Bedeutung des Zusammenspiels der beiden Rezeptoren deutlich, sodass die berechnete Frage besteht, ob es möglicherweise beider Rezeptoren bedarf, um einen VEGF-C induzierten Effekt auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Betabestahlung mit Lutetium-177 auszumachen. Eine exogene Expression der fehlenden Rezeptoren z. B. könnte in zukünftigen Projekten wichtige Erkenntnisse über den Einfluss von bestimmten Rezeptor- und Corezeptorkombinationen auf die Funktionsentfaltung von VEGF-C, auch im Kontext mit der Induktion einer Bestrahlungsresistenz, liefern.

#### 4.4.5 VEGF-C Translation durch Bestrahlung und allgemein

Chen et al. (2014) beschrieben des Weiteren, dass Bestrahlung einen Anstieg der VEGF-C-Translation bewirkt und dass dies unter anderem durch den PI3K/AKT/*mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg vermittelt wird. Je nach Stärke dieses Effektes wäre es denkbar, dass jedwede VEGF-C Behandlung, sei es der VEGF-C Knockdown oder die Behandlung der Zellen mit rhVEGF-C dadurch überdeckt wurde, was als eine mögliche Erklärung für die ausgeblieben Beobachtbarkeit eines Effektes von VEGF-C herangezogen werden könnte. Dies könnte auch dazu passen, dass sich ggf. schwache VEGF-C induzierte Effekte in Bezug auf den Zellzyklus in den Koloniebildungsassays nicht widerspiegeln, da letztere eine Bestrahlungskomponente beinhalten. In zukünftigen Experimenten dieser Form ähnlich wie Chen et al. (2014) zusätzlich den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg mit dem PI3/AKT-Inhibitor LY294002 oder mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin zu blockieren und somit die den strahleninduzierten VEGF-C Anstieg zu unterbinden wäre jedoch nur bedingt sinnvoll: Da AKT nämlich eine wesentliche Rolle bei der VEGF-C induzierten Signalvermittlung spielt, wäre dieser Ansatz zumindest nicht optimal. Man könnte jedoch in zukünftigen Projekten untersuchen, in welchem Maße die Bestrahlung mit Lutetium-177 die VEGF-C Translation bei Prostatakarzinomzellen erhöht und anhand dessen die Relevanz dieses Effektes abschätzen.

Der Aspekt der Translation ist – wie die Arbeit von Chen et al. (2014) zeigt – allgemein sehr wichtig. Zwar konnten wir mittels qRT-PCR bei PC-3 Zellen einen positiven VEGF-C Status nachweisen, doch wäre es für zukünftige Projekte möglicherweise auch interessant diese Ergebnisse mittels ELISA zu verifizieren. Die Menge an translatiertem und sezerniertem VEGF-C könnte so untersucht werden und möglicherweise ergäben sich dadurch weitere wertvolle Erkenntnisse.

#### 4.4.6 Autophagie

Der Wachstumsfaktor VEGF-C besitzt neben (lymph-)angiogenetischen Funktionen vor allem das Potenzial zur Steigerung der Tumoraggressivität (Coso et al., 2012). Letzteres wird beispielsweise durch die VEGF-C/NRP-2/AKT-1 Achse hervorgerufen und beinhaltet diverse Mechanismen wie u. a. die Induktion von Autophagie (Muders et al., 2009; Stanton et al., 2013b; Stanton et al., 2013a).

Es gibt unterschiedliche Berichte darüber, ob Autophagie die Zelle bei Bestrahlung schützt oder sich eher negativ auf die Zellviabilität auswirkt (Li et al., 2020; Sharma et al., 2014). Auch für Prostatakarzinomzellen findet man in der Literatur sowohl Ansichten dazu, dass Autophagie zu einer Strahlenresistenz führt als auch Ansichten dazu, dass Autophagie die Zellen für Strahlung sensibilisiert (Li et al., 2020). Verschiedene Arbeitsgruppen fanden jedoch heraus, dass Autophagie bei PC-3 Zellen mit einem verminderten klonogenen Überleben vergesellschaftet ist (Cao et al., 2006; He et al., 2012). Gleichzeitig beobachteten Stanton et al. (2013b) ein durch VEGF-C induzierte Autophagie gesteigertes Überleben.

Neben VEGF-C kann auch ionisierende Strahlung Autophagie hervorrufen, sowohl im Sinne einer zellschützenden als auch einer zytotoxischen Autophagie (Li et al., 2020; Sharma et al., 2014). Eine denkbare Erklärung für die fehlende Beobachtbarkeit eines Einflusses von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen wäre eine Interaktion von strahleninduzierter Autophagie durch Lutetium-177 und VEGF-C induzierter Autophagie. Dies könnte dazu führen, dass die Beobachtungen von Stanton et al. (2013b) in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden konnten. Hierzu passt auch die Theorie des „*autophagic switch*“, d.h. eines Wechsels zwischen

schützender und nicht schützender Autophagie durch z. B. kleine Veränderungen im experimentellen Setting (Gewirtz, 2020; Sharma et al., 2014). Zweifelsohne bleibt Autophagie ein komplexes und teils paradox wirkendes Phänomen, das weiterer Forschung bedarf. Es ist auch nicht ohne Weiteres möglich, allgemeine Voraussagen über die Auswirkungen von Autophagie auf das Zellüberleben zu treffen (Sharma et al., 2014). Sicherlich wäre es interessant, die Versuche einmal genauer unter dem Aspekt der Autophagie zu betrachten, beispielsweise zunächst unter Verwendung von Bafilomycin A1 und mit und ohne Lutetium-177.

#### 4.4.7 Wie steht es um VEGF-C als potenziellen prädiktiven Marker für die <sup>177</sup>Lu-PSMA-Therapie?

Abschließend soll noch ein direkter Bezug zur <sup>177</sup>Lu-PSMA-Therapie geschaffen werden, deren *Non-Responder* Quote den klinischen Bezug dieser Arbeit herstellt. Hintergrund der Erforschung der Rolle von VEGF-C auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen ist die Suche nach einer möglichen Erklärung für ebendiese therapeutische Resistenz. Die Hypothese, dass VEGF-C als ein möglicher prädiktiver Marker in der <sup>177</sup>Lu-PSMA-Therapie fungieren könnte, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Dennoch ist es durchaus möglich, dass VEGF-C beispielsweise über seine in der Literatur beschriebene Förderung in Bezug auf die Ausbildung von Metastasen einen Einfluss auf das Therapie-Outcome hat (Achen et al., 2006; Chen et al., 2012). So beschreiben auch Jennbacken et al. (2005) einen Zusammenhang zwischen der VEGF-C und VEGFR-3 Expression in Prostatakarzinomzellen und regionalen Lymphknotenmetastasen. Auch Karpanen et al. (2001) beschrieben den Zusammenhang zwischen VEGF-C lymphatischen Metastasen. Hoshida et al. (2006) konnten durch Betrachtung von Lymphknotenmetastasen sogar zeigen, dass VEGF-C den Transport von Krebszellen zu den Lymphknoten fördert und somit das Metastasenwachstum steigert und auch Chen et al. (2012) erläutern den Zusammenhang zwischen der VEGF-C induzierten Lymphangiogenese und der Tumormetastasierung. Dazu passt auch, dass Tsurusaki et al. (1999) eine erhöhte VEGF-C Expression bei Prostatakarzinompatienten mit Lymphknotenmetastasen fanden verglichen mit jenen ohne. Auch gibt es mehrere Arbeiten, die zeigen, dass eine VEGF-C Überexpression nicht das Tumorwachstum

steigert, sondern gezielt die Tumormetastasen fördert (Hoshida et al., 2006; Skobe et al., 2001; Su et al., 2007). Denkbar wäre also beispielsweise, dass VEGF-C ein Metastasenwachstum verursacht, welches schneller als die Wirkung der Therapie ist. Ein solcher Mechanismus wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet und ist mit Sicherheit ein interessanter Aspekt für die zukünftige Forschung auf diesem Gebiet. Hierzu wäre als Erstes die bereits erwähnte immunhistochemische Untersuchung interessant, gefolgt von Experimenten am Mausmodell.

Nichtsdestotrotz können alternative Ursachen für das Vorliegen einer *Non-Response*, wie zum Beispiel ein schlechteres Binden und schnelleres Auswaschen des Tracers bei den Therapieversagern, nicht ausgeschlossen werden.

## 5. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich ein VEGF-C induzierter Effekt auf die Strahlensensibilität von Prostatakarzinomzellen bei Bestrahlung mit Lutetium-177 in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigte. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse deuten auf einen allenfalls schwachen, zelllinienabhängigen Einfluss von VEGF-C auf den Zellzyklus hin, welcher entsprechend eine geringe klinische Relevanz besäße. In den Koloniebildungsassays konnte passend dazu kein VEGF-C bezogener Einfluss auf das Überleben von Prostatakarzinomzellen bei Bestrahlung mit Lutetium-177 dokumentiert werden. Mit Blick auf die unter 4.4.7 diskutierte Rolle VEGF-Cs auf die Tumormetastasierung ist es für zukünftige Forschungsprojekte auf diesem Gebiet sicherlich interessant, den Aspekt der Metastasierung mit einzubeziehen. Die in der vorliegenden Dissertation neu etablierten Protokolle dienen als Grundlage für weitere Forschungsprojekte auf diesem Gebiet.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Lokalisation von Tumorerkrankungen bei Männern in Deutschland.....	15
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung der <sup>177</sup> Lu-PSMA-Therapie.....	22
<b>Abb. 3:</b> VEGF-C Signalübertragung .....	27
<b>Abb. 4:</b> Beispiel einer Überlebenskurve .....	36
<b>Abb. 5:</b> Versuchsaufbau der Zellzyklusanalyse .....	56
<b>Abb. 6:</b> Versuchsaufbau des Koloniebildungsassays .....	58
<b>Abb. 7:</b> Versuchsaufbau des Viabilitätsassays.....	60
<b>Abb. 8:</b> Relative VEGF-C/VEGFR-2/VEGFR-3 Expression in PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen.....	63
<b>Abb. 9:</b> Zellzyklusanalyse mit PC-3 Zellen .....	66
<b>Abb. 10:</b> Zellzyklusanalyse mit LNCaP C4-2b.....	67
<b>Abb. 11:</b> Anwuchsbedingungen der Zelllinien unter den Versuchsbedingungen des Viabilitätsassays.....	69
<b>Abb. 12:</b> Viabilitätsassays mit PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP nach Messbedingung sortiert.....	72
<b>Abb. 13:</b> Absolute Zahl lebender Zellen im zeitlichen Verlauf .....	74
<b>Abb. 14:</b> Viabilität im zeitlichen Verlauf .....	76
<b>Abb. 15:</b> Fotografische Dokumentation von Koloniebildungsassays mit PC-3 Zellen, LNCaP C4-2b Zellen und LNCaP Zellen und Betabestrahlung mit Lutetium-177 .....	77
<b>Abb. 16:</b> Überlebenskurven von PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 .....	79
<b>Abb. 17:</b> Mit dem LQ-Modell angepasste Überlebenskurven für PC-3, LNCaP C4-2b und LNCaP Zellen bei Betabestrahlung mit Lutetium-177 im Überblick.....	81
<b>Abb. 18:</b> Untersuchung der siRNA-Transfektion bzw. rhVEGF-C Behandlung und deren Einfluss auf die absolute Zahl der lebenden Zellen und die Plattierungseffizienz .....	83
<b>Abb. 19:</b> Koloniebildungsassay mit transfizierten PC-3 Zellen und Lutetium-177.....	85
<b>Abb. 20:</b> Koloniebildungsassay mit LNCaP C4-2b Zellen (+ rhVEGF-C oder Negativkontrolle (NK)) und Lutetium-177, A = Protokoll A, B = Protokoll B.....	87

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Verwendete Zelllinien .....	38
<b>Tab. 2:</b> Verwendete Kits .....	38
<b>Tab. 3:</b> Verwendete Chemikalien.....	38
<b>Tab. 4:</b> Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	40
<b>Tab. 5:</b> siRNA Pools .....	43
<b>Tab. 6:</b> Verwendete Primer .....	43
<b>Tab. 7:</b> Verwendete Geräte .....	44
<b>Tab. 8:</b> Verwendete Software .....	46
<b>Tab. 9:</b> Volumina für das Passagieren von Zellen .....	48
<b>Tab. 10:</b> Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.....	52
<b>Tab. 11:</b> Inkubationsschritte des cDNA-Syntheseprogramms.....	53
<b>Tab. 12:</b> Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die qRT-PCR .....	53
<b>Tab. 13:</b> Ablaufplan des verwendeten qRT-PCR Programmes.....	54
<b>Tab. 14:</b> Für den Koloniebildungsassay ausgesäte Zellzahlen in Abhängigkeit von der Aktivität .....	58
<b>Tab. 15:</b> Signifikanzniveaus .....	61
<b>Tab. 16:</b> Charakterisierung der Überlebenskurven .....	80

## 8. Literaturverzeichnis

Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer* 2006; 94: 1355–1360

Ahmadzadehfar H, Albers P, Bockisch A, Boegemann M, Böhme C, Burchert W, Dietlein M, Drzezga A, Fabry U, Feldmann G, Heidenreich A, Heinzl A, Herrmann K, Heyll A, Höhling C, Kreuzer C, Laufer D, Mengel R, Mottaghy FM, Müller H-W, Müller SC, Ost E, Rahbar K, Reifenhäuser W, Schäfers M, Schlenkhoff C, Schmidt M, Schmidt-Wolf I, Wildenhain C, Zimmer B, Essler M. Lutetium-177-PSMA-Radioligandentherapie. *Urologe A* 2018; 57: 709–713

Ahmadzadehfar H, Eppard E, Kürpig S, Fimmers R, Yordanova A, Schlenkhoff CD, Gärtner F, Rogenhofer S, Essler M. Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with <sup>177</sup>Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 12477–12488

Ahmadzadehfar H, Rahbar K, Kürpig S, Bögemann M, Claesener M, Eppard E, Gärtner F, Rogenhofer S, Schäfers M, Essler M. Early side effects and first results of radioligand therapy with <sup>177</sup>Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Res* 2015; 5: 36

Ahmadzadehfar H, Wegen S, Yordanova A, Fimmers R, Kürpig S, Eppard E, Wei X, Schlenkhoff C, Hauser S, Essler M. Overall survival and response pattern of castration-resistant metastatic prostate cancer to multiple cycles of radioligand therapy using [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017; 44: 1448–1454

Akagi, K., Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, Sugimachi K. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000; 83: 887-891

Anderson PD, McKissic SA, Logan M, Roh M, Franco OE, Wang J, Doubinskaia I, van der Meer R, Hayward SW, Eischen CM, Eltoum I-E, Abdulkadir SA. Nkx3.1 and Myc crossregulate shared target genes in mouse and human prostate tumorigenesis. *J Clin Invest* 2012; 122: 1907–1919

Andisheh B, Edgren M, Belkić D, Mavroidis P, Brahme A, Lind BK. A Comparative Analysis of Radiobiological Models for Cell Surviving Fractions at High Doses. *Technol Cancer Res Treat* 2013; 12: 183–192

- Assadi M, Rezaei S, Jafari E, Rekabpour SJ, Ravanbod MR, Zohrabi F, Amini A, Keshmiri S, Dadgar H, Ahmadzadehfar H. Potential application of lutetium-177-labeled prostate-specific membrane antigen-617 radioligand therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer in a limited resource environment: Initial clinical experience after 2 years. *World J Nucl Med* 2020; 19: 15–20
- Azzam EI, Jay-Gerin J-P, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 2012; 327: 48–60
- Bander NH, Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. Phase I Trial of <sup>177</sup>Lutetium-Labeled J591, a Monoclonal Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen, in Patients With Androgen-Independent Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4591–4601
- Bergsma H, van Vliet EI, Teunissen JJM, Kam BLR, Herder WW de, Peeters RP, Krenning EP, Kwekkeboom DJ. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) for GEP-NETs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26: 867–881
- Böcker W, Denk H, Heitz, Philipp U. (Hrsg.). *Pathologie*. München, Jena: Elsevier Urban und Fischer 2004
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms. *Science* 1999; 286: 1358–1362
- Borkowetz A, Froehner M, Rauner M, Conrad S, Erdmann K, Mayr T, Datta K, Hofbauer LC, Baretton GB, Wirth M, Fuessel S, Toma M, Muders MH. Neuropilin-2 is an independent prognostic factor for shorter cancer-specific survival in patients with acinar adenocarcinoma of the prostate. *Int J Cancer* 2020; 146: 2619–2627
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* 1999; 96: 857–868
- Cao C, Subhawong T, Albert JM, Kim KW, Geng L, Sekhar KR, Gi YJ, Lu B. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin or Apoptotic Pathway Induces Autophagy and Radiosensitizes PTEN Null Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 2006; 66: 10040–10047
- Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi J-H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14389–14394

- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318–1321
- Caunt M, Mak J, Liang W-C, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, Berry L, Kasman I, Zlot C, Cheng Z, Le Couter J, Filvaroff EH, Plowman G, Peale F, French D, Carano R, Koch AW, Wu Y, Watts RJ, Tessier-Lavigne M, Bagri A. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer cell* 2008; 13: 331–342
- Chappell WH, Lehmann BD, Terrian DM, Abrams SL, Steelman LS, McCubrey JA. p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell cycle* 2012; 11: 4579–4588
- Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 2004; 10: 33–39
- Chen J-C, Chang Y-W, Hong C-C, Yu Y-H, Su J-L. The role of the VEGF-C/VEGFRs axis in tumor progression and therapy. *Int J Mol Sci* 2012; 14: 88–107
- Chen Y-H, Pan S-L, Wang J-C, Kuo S-H, Cheng JC-H, Teng C-M. Radiation-induced VEGF-C expression and endothelial cell proliferation in lung cancer. *Strahlenther Onkol* 2014; 190: 1154–1162
- Coso S, Zeng Y, Opeskin K, Williams ED. Vascular endothelial growth factor receptor-3 directly interacts with phosphatidylinositol 3-kinase to regulate lymphangiogenesis. *PloS one* 2012; 7: e39558
- Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 1999; 5: 280–285
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 1997; 91: 231–241
- Demichelis F, Fall K, Perner S, Andrén O, Schmidt F, Setlur SR, Hoshida Y, Mosquera J-M, Pawitan Y, Lee C, Adami H-O, Mucci LA, Kanthoff PW, Andersson S-O, Chinnaiyan AM, Johansson J-E, Rubin MA. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful cohort. *Oncogene* 2007; 26: 4596–4599

- Deng Y, Zhang X, Simons M. Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 421–429
- Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (Hrsg.). 2016. Therapie mit Lu-177-PSMA, Dosimetrie und Nachsorge beim metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom. Verfügbar unter [https://www.nuklearmedizin.de/docs/Lu-177-PSMA\\_160224.pdf](https://www.nuklearmedizin.de/docs/Lu-177-PSMA_160224.pdf) (Zugriffsdatum: 12.03.2023)
- Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V. 2021. S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2, 2021. Verfügbar unter <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/> (Zugriffsdatum: 05.05.2023)
- Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen JV, Cohen MS, Johansen JV, Winther BR, Lund LR, Winther O, Taunton J, Hansen SH, Frödin M. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol Cell* 2009; 35: 511–522
- Dunk C, Ahmed A. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2-Mediated Mitogenesis Is Negatively Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Tumor Epithelial Cells. *Am J Pathol* 2001; 158: 265–273
- Dutta S, Roy S, Polavaram NS, Stanton MJ, Zhang H, Bhola T, Hönscheid P, Donohue TM, Band H, Batra SK, Muders MH, Datta K. Neuropilin-2 Regulates Endosome Maturation and EGFR Trafficking to Support Cancer Cell Pathobiology. *Cancer Res* 2016; 76: 418–428
- Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 2005; 118: 2997–3002
- Elgqvist J, Timmermand OV, Larsson E, Strand S-E. Radiosensitivity of Prostate Cancer Cell Lines for Irradiation from Beta Particle-emitting Radionuclide <sup>177</sup>Lu Compared to Alpha Particles and Gamma Rays. *Anticancer Res* 2016; 36: 103–110
- Emmett L, Willowson K, Violet J, Shin J, Blanksby A, Lee J. Lutetium <sup>177</sup> PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. *J Med Radiat Sci* 2017; 64: 52–60
- Enns L, Bogen KT, Wizniak J, Murtha AD, Weinfeld M. Low-Dose Radiation Hypersensitivity Is Associated With p53-Dependent Apoptosis. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 557–566

- Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: 244–252
- Eyben FE von, Roviello G, Kiljunen T, Uprimny C, Virgolini I, Kairemo K, Joensuu T. Third-line treatment and <sup>177</sup>Lu-PSMA radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: a systematic review. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018; 45: 496–508
- Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault J-P, Neufeld G, Savi P, Herbert J-M, Bono F. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 2006; 108: 1243–1250
- Fendler WP, Rahbar K, Herrmann K, Kratochwil C, Eiber M. <sup>177</sup>Lu-PSMA Radioligand Therapy for Prostate Cancer. *J Nucl Med* 2017; 58: 1196–1200
- Ferdinandus J, Eppard E, Gaertner FC, Kürpig S, Fimmers R, Yordanova A, Hauser S, Feldmann G, Essler M, Ahmadzadehfar H. Predictors of Response to Radioligand Therapy of Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer with <sup>177</sup>Lu-PSMA-617. *J Nucl Med* 2017; 58: 312–319
- Ferdinandus J, Violet J, Sandhu S, Hofman MS. Prostate-specific membrane antigen theranostics: therapy with lutetium-177. *Curr Opin Urol* 2018; 28: 197–204
- Franken NA, van Bree CV, Kipp JB, Barendsen GW. Modification of potentially lethal damage in irradiated Chinese hamster V79 cells after incorporation of halogenated pyrimidines. *Int J Radiat Biol* 1997; 72: 101–109
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006; 1: 2315–2319
- Gandaglia G, Abdollah F, Schiffmann J, Trudeau V, Shariat SF, Kim SP, Perrotte P, Montorsi F, Briganti A, Trinh Q-D, Karakiewicz PI, Sun M. Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. *Prostate* 2014; 74: 210–216
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336–30343

- Gewirtz DA. The Switch between Protective and Nonprotective Autophagy; Implications for Autophagy Inhibition as a Therapeutic Strategy in Cancer. *Biology (Basel)* 2020; 9: 12
- Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC, Asangani IA, Ateeq B, Chun SY, Siddiqui J, Sam L, Anstett M, Mehra R, Prensner JR, Palanisamy N, Ryslik GA, Vandin F, Raphael BJ, Kunju LP, Rhodes DR, Pienta KJ, Chinnaiyan AM, Tomlins SA. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2012; 487: 239–243
- Grehn J, Krause J. Metzler Physik. Braunschweig: Schroedel 2007
- Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol* 2012; 9: 703–719
- Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia: Wolters Kluwer Health 2011
- Hammes C, Heinrich E, Lingenfelder T, Cotic C. BASICS Urologie. München: Elsevier 2015
- Hartrampf PE, Weinzierl F-X, Buck AK, Rowe SP, Higuchi T, Seitz AK, Kübler H, Schirbel A, Essler M, Bundschuh RA, Werner RA. Matched-pair analysis of <sup>177</sup>LuLu-PSMA I&T and <sup>177</sup>LuLu-PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022; 49: 3269–3276
- He Z, Mangala LS, Theriot CA, Rohde LH, Wu H, Zhang Y. Cell killing and radiosensitizing effects of atorvastatin in PC3 prostate cancer cells. *J Radiat Res* 2012; 53: 225–233
- Heck MM, Tauber R, Schwaiger S, Retz M, D'Alessandria C, Maurer T, Gafita A, Wester H-J, Gschwend JE, Weber WA, Schwaiger M, Knorr K, Eiber M. Treatment Outcome, Toxicity, and Predictive Factors for Radioligand Therapy with <sup>177</sup>Lu-PSMA-I&T in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* 2019; 75: 920–926
- Hegemann N-S, Guckenberger M, Belka C, Ganswindt U, Manapov F, Li M. Hypofractionated radiotherapy for prostate cancer. *Radiat Oncol* 2014; 9: 275
- Hermann RM, Wolff HA, Jarry H, Thelen P, Gruendker C, Rave-Fraenk M, Schmidberger H, Christiansen H. In vitro studies on the modification of low-dose hyper-radiosensitivity in prostate cancer cells by incubation with genistein and estradiol. *Radiat Oncol* 2008; 3: 19
- Herrmann T, Baumann M, Dörr W. Klinische Strahlenbiologie. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer 2006

- Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in early laryngeal cancer: relationship with radioresistance. *Clin Otolaryngol* 2001; 26: 498–504
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983; 43: 1809–1818
- Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, Di Tomaso E, Chen Y-L, Pytowski B, Fukumura D, Padera TP, Jain RK. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Res* 2006; 66: 8065–8075
- Hu S-Y, Liu T, Liu Z-Z, Ledet E, Velasco-Gonzalez C, Mandal DM, Koochekpour S. Identification of a novel germline missense mutation of the androgen receptor in African American men with familial prostate cancer. *Asian J Androl* 2010; 12: 336–343
- Huang Y, Luo Y, Zheng W, Chen T. Rational design of cancer-targeted BSA protein nanoparticles as radiosensitizer to overcome cancer radioresistance. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014; 6: 19217–19228
- Israeli RS, Powell CT, Fair, William R.M Heston, Warren D. W... Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 1993; 53: 227–230
- Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber J-E. Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* 2005; 65: 110–116
- Jenny B, Harrison JA, Baetens D, Tille J-C, Burkhardt K, Mottaz H, Kiss JZ, Dietrich P-Y, Tribolet N de, Pizzolato GP, Pepper MS. Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas. *J Pathol* 2006; 209: 34–43
- Jerafi-Vider A, Bassi I, Moshe N, Tevet Y, Hen G, Splittstoesser D, Shin M, Lawson ND, Yaniv K. VEGFC/FLT4-induced cell-cycle arrest mediates sprouting and differentiation of venous and lymphatic endothelial cells. *Cell Rep* 2021; 35: 109255
- Jolly D, Meyer J. A brief review of radiation hormesis. *Australas Phys Eng Sci Med* 2009; 32: 180–187

- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 290–298
- Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997; 16: 3898–3911
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Dröge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF- $\kappa$ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 2000; 267: 3828–3835
- Karanika S, Karantanos T, Li L, Wang J, Park S, Yang G, Zuo X, Song JH, Maity SN, Manyam GC, Broom B, Aparicio AM, Gallick GE, Troncoso P, Corn PG, Navone N, Zhang W, Li S, Thompson TC. Targeting DNA Damage Response in Prostate Cancer by Inhibiting Androgen Receptor-CDC6-ATR-Chk1 Signaling. *Cell Rep* 2017; 18: 1970–1981
- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5: 74–80
- Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Ylä-Herttuala S, Findegold DN, Ferrell RE, Alitalo K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12677–12682
- Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K. Vascular Endothelial Growth Factor C Promotes Tumor Lymphangiogenesis and Intralymphatic Tumor Growth. *Cancer Res* 2001; 61: 1786–1790
- Kärpänen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, Tamagnone L, Alitalo K. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J* 2006; 20: 1462–1472
- Kauffmann G, Sauer R, Weber, Wolfgang (Hrsg.). *Radiologie*. München: Elsevier Urban & Fischer 2011
- Keck B, Wach S, Taubert H, Zeiler S, Ott OJ, Kunath F, Hartmann A, Bertz S, Weiss C, Hönscheid P, Schellenburg S, Rödel C, Baretton GB, Sauer R, Fietkau R, Wullich B, Krause FS, Datta K, Muders MH. Neuropilin-2 and its ligand VEGF-C predict treatment

- response after transurethral resection and radiochemotherapy in bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2015; 136: 443–451
- Kellerer AM, Rossi HH. The biophysical properties of 3.9-GeV nitrogen ions. Interpretation of results. *Radiat Res* 1973; 55: 447–456
- Kempe S. Reserveoption für das metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinom. *Im Focus Onkologie* 2019; 22: 72–73
- Kesler CT, Kuo AH, Wong H-K, Masuck DJ, Shah JL, Kozak KR, Held KD, Padera TP. Vascular endothelial growth factor-C enhances radiosensitivity of lymphatic endothelial cells. *Angiogenesis* 2014; 17: 419–427
- Kluger MS, Colegio OR. Lymphangiogenesis linked to VEGF-C from tumor-associated macrophages: accomplices to metastasis by cutaneous squamous cell carcinoma? *J Invest Dermatol* 2011; 131: 17–19
- Knizetova P, Ehrmann J, Hlobilkova A, Vancova I, Kalita O, Kolar Z, Bartek J. Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell cycle* 2008; 7: 2553–2561
- Kratochwil C, Giesel FL, Eder M, Afshar-Oromieh A, Benešová M, Mier W, Kopka K, Haberkorn U. [<sup>177</sup>Lu]Lutetium-labelled PSMA ligand-induced remission in a patient with metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015; 42: 987–988
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40: 280–293
- Kuo H-T, Merkens H, Zhang Z, Uribe CF, Lau J, Zhang C, Colpo N, Lin K-S, Bénard F. Enhancing Treatment Efficacy of <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 with the Conjugation of an Albumin-Binding Motif: Preclinical Dosimetry and Endoradiotherapy Studies. *Mol Pharm* 2018; 15: 5183–5191
- Leith JT. In vitro radiation sensitivity of the LNCaP prostatic tumor cell line. *Prostate* 1994; 24: 119–124
- Li L, Liu W-L, Su L, Lu Z-C, He X-S. The Role of Autophagy in Cancer Radiotherapy. *Curr Mol Pharmacol* 2020; 13: 31–40
- Li S-J, Liang X-Y, Li H-J, Yang G-Z, Li W, Li Z, Zhou L, Wen X, Yu D-H, Cui J-W. Low-dose irradiation inhibits proliferation of the p53null type human prostate cancer cells through the ATM/p21 pathway. *Int J Mol Med* 2018; 41: 548–554

- Li Y, Yang G, Zhang J, Tang P, Yang C, Wang G, Chen J, Liu J, Zhang L, Ouyang L. Discovery, Synthesis, and Evaluation of Highly Selective Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 (VEGFR3) Inhibitor for the Potential Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Med Chem* 2021; 64: 12022–12048
- Liebscher S. Die Bedeutung von VEGF-C und NRP-2 für die Strahlenresistenz im Prostatakarzinom. Dresden 2017
- Liu H, Rajasekaran AK, Moy P, Xia Y, Kim S, Navarro V, Rahmati R, Bander NH. Constitutive and Antibody-induced Internalization of Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res* 1998; 58: 4055–4060
- Low W-K, Tan MGK, Sun L, Chua AWC, Goh L-K, Wang D-Y. Dose-dependant radiation-induced apoptosis in a cochlear cell-line. *Apoptosis* 2006; 11: 2127–2136
- McMahon SJ. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. *Phys Med Biol* 2018; 64: 01TR01
- Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle* 2009; 8: 1168–1175
- Michaelsen SR, Nedergaard MK, Broholm H, Bartkova J, Staberg M, Aghi M, Lucacova S, Perryman L, Poulsen HS, Hamerlik P. VEGF-C contributes to autocrine VEGF Receptor 2 signaling and cellular maintenance in Glioblastoma. *Neuro Oncol* 2016; 18: iv20-iv21
- Michaelsen SR, Staberg M, Pedersen H, Jensen KE, Majewski W, Broholm H, Nedergaard MK, Meulengracht C, Urup T, Villingshøj M, Lukacova S, Skjøth-Rasmussen J, Brennum J, Kjær A, Lassen U, Stockhausen M-T, Poulsen HS, Hamerlik P. VEGF-C sustains VEGFR2 activation under bevacizumab therapy and promotes glioblastoma maintenance. *Neuro Oncol* 2018; 20: 1462–1474
- Muders MH, Zhang H, Wang E, Tindall DJ, Datta K. Vascular endothelial growth factor-C protects prostate cancer cells from oxidative stress by the activation of mammalian target of rapamycin complex-2 and AKT-1. *Cancer Res* 2009; 69: 6042–6048
- Murad H, Alghamian Y, Aljapawe A, Madania A. Effects of ionizing radiation on the viability and proliferative behavior of the human glioblastoma T98G cell line. *BMC Res Notes* 2018; 11: 330
- Nilsson I, Bahram F, Li X, Gualandi L, Koch S, Jarvius M, Söderberg O, Anisimov A, Kholová I, Pytowski B, Baldwin M, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Kreuger J, Claesson-Welsh

L. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J* 2010; 29: 1377–1388

Novartis. 2022a. Novartis Pluvicto™ approved by FDA as first targeted radioligand therapy for treatment of progressive, PSMA positive metastatic castration-resistant prostate cancer. Verfügbar unter <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-pluvictotm-approved-fda-first-targeted-radioligand-therapy-treatment-progressive-psma-positive-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer>

(Zugriffsdatum: 13.08.2022)

Novartis. 2022b. Novartis receives European Commission approval for Pluvicto® as the first targeted radioligand therapy for treatment of progressive PSMA–positive metastatic castration-resistant prostate cancer. Verfügbar unter <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-receives-european-commission-approval-pluvicto-first-targeted-radioligand-therapy-treatment-progressive-psma-positive-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer> (Zugriffsdatum: 11.02.2023)

Nuklearmedizin UKB Bonn. Lu-177-PSMA Therapie beim hormonrefraktären Prostatakarzinom. Verfügbar unter <https://www.nuklearmedizin-ukbonn.de/deutsch/therapiestation/lu-177-psma-therapie/> (Zugriffsdatum: 03.07.2022)

Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 928–942

Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012; 3: 921–939

Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 1956: 653–669

Qu Y, Dai B, Ye D, Kong Y, Chang K, Jia Z, Yang X, Zhang H, Zhu Y, Shi G. Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Sci Rep* 2015; 5: 7654

Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, Haberkorn U, Schäfers M, Essler M, Baum RP, Kulkarni HR, Schmidt M, Drzezga A, Bartenstein P, Pfestroff A, Luster M, Lützen U, Marx M, Prasad V, Brenner W, Heinzel A, Mottaghy FM, Ruf J, Meyer PT, Heuschkel M, Eveslage M, Bögemann M, Fendler WP, Krause BJ. German Multicenter Study Investigating 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med* 2017; 58: 85–90

- Rajasekaran SA, Anilkumar G, Oshima E, Bowie JU, Liu H, Heston W, Bander NH, Rajasekaran AK. A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 4835–4845
- Ranjan SK. Lutetium-177 prostate-specific membrane antigen-617 theranostics: New therapeutic hope in metastatic castrate-resistant prostate cancer? *Indian J Urol* 2020; 36: 227–228
- Riede U-N, Werner M, Schaefer, Hans-Eckart (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme 2004
- Robert Koch-Institut. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Verfügbar unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf?__blob=publicationFile) (Zugriffsdatum: 12.03.2023)
- Saraon P, Drabovich AP, Jarvi KA, Diamandis EP. Mechanisms of androgen-independent prostate cancer. *EJIFCC* 2014; 25: 42–54
- Sartor O, Bono J de, Chi KN, Fizazi K, Herrmann K, Rahbar K, Tagawa ST, Nordquist LT, Vaishampayan N, El-Haddad G, Park CH, Beer TM, Armour A, Pérez-Contreras WJ, DeSilvio M, Kpamegan E, Gericke G, Messmann RA, Morris MJ, Krause BJ. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2021; 385: 1091–1103
- Schrecengost R, Knudsen KE. Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin Oncol* 2013; 40: 244–258
- Sharma A, Yeow W-S, Ertel A, Coleman I, Clegg N, Thangavel C, Morrissey C, Zhang X, Comstock CES, Witkiewicz AK, Gomella L, Knudsen ES, Nelson PS, Knudsen KE. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest* 2010; 120: 4478–4492
- Sharma K, Le N, Alotaibi M, Gewirtz DA. Cytotoxic autophagy in cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 10034–10051
- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192–198

- Skvortsova I, Skvortsov S, Stasyk T, Raju U, Popper B-A, Schiestl B, Guggenberg E von, Neher A, Bonn GK, Huber LA, Lukas P. Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. *Proteomics* 2008; 8: 4521–4533
- Srigley JR, Delahunt B, Egevad L, Samaratunga H, Yaxley J, Evans AJ. One is the new six: The International Society of Urological Pathology (ISUP) patient-focused approach to Gleason grading. *Can Urol Assoc J* 2016; 10: 339–341
- Stanton MJ, Dutta S, Polavaram NS, Roy S, Muders MH, Datta K. Angiogenic growth factor axis in autophagy regulation. *Autophagy* 2013a; 9: 789–790
- Stanton MJ, Dutta S, Zhang H, Polavaram NS, Leontovich AA, Hönscheid P, Sinicrope FA, Tindall DJ, Muders MH, Datta K. Autophagy control by the VEGF-C/NRP-2 axis in cancer and its implication for treatment resistance. *Cancer Res* 2013b; 73: 160–171
- Su J-L, Yen C-J, Chen P-S, Chuang S-E, Hong C-C, Kuo I-H, Chen H-Y, Hung M-C, Kuo M-L. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007; 96: 541–545
- Teroerde M, Nientiedt C, Duensing A, Hohenfellner M, Stenzinger A, Duensing S. Revisiting the Role of p53 in Prostate Cancer. *Prostate Cancer* 2021: 8
- Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 10002–10007
- Toledo SM de, Asaad N, Venkatachalam P, Li L, Howell RW, Spitz DR, Azzam EI. Adaptive responses to low-dose/low-dose-rate gamma rays in normal human fibroblasts: the role of growth architecture and oxidative metabolism. *Radiat Res* 2006; 166: 849–857
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644–648
- Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, Kanetake H, Saito Y, Alitalo K, Koji T. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999; 80: 309–313
- van Leeuwen CM, Oei AL, Crezee J, Bel A, Franken NAP, Stalpers LJA, Kok HP. The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiat Oncol* 2018; 13: 96

- van Oorschot B, Hovingh SE, Rodermond H, Güçlü A, Losekoot N, Geldof AA, Barendsen GW, Stalpers LJ, Franken NAP. Decay of  $\gamma$ -H2AX foci correlates with potentially lethal damage repair in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29: 2175–2180
- Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper, G. G. J. M., Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij HCJ, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 534–540
- Vogelius IR, Bentzen SM. Meta-analysis of the alpha/beta ratio for prostate cancer in the presence of an overall time factor: bad news, good news, or no news? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 85: 89–94
- Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 784–787
- Wang F, Peng L, Wang Y, Liu X. Silencing vascular endothelial growth factor C increases the radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. *J Cell Biochem* 2020; 121: 1182–1191
- Williams K, Fernandez S, Stien X, Ishii K, Love HD, Lau Y-FC, Roberts RL, Hayward SW. Unopposed c-MYC expression in benign prostatic epithelium causes a cancer phenotype. *Prostate* 2005; 63: 369–384
- Wright GL, Haley C, Beckett ML, Schellhammer PS. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urol Oncol* 1995; 1: 18–28
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK Pathway to Gene Activation by RSK2, a Growth Factor-Regulated CREB Kinase. *Science* 1996; 273: 959–963
- Xu Y, Yuan L, Mak J, Pardanaud L, Caunt M, Kasman I, Larrivée B, Del Toro R, Suchting S, Medvinsky A, Silva J, Yang J, Thomas J-L, Koch AW, Alitalo K, Eichmann A, Bagri A. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J Cell Biol* 2010; 188: 115–130
- Yamaguchi H, Wang H-G. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 2001; 20: 7779–7786

- Ye W-J, Min H-Q, Cao X-P, Chen K-T, Hou J-H, Li Y. Correlations of biomolecular markers, such as P53 protein and vascular endothelial growth factor, to radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer* 2006; 25: 1168–1172
- Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T. Role of Vascular Endothelial Growth Factor C Expression in the Development of Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1823–1829
- Yordanova A, Becker A, Eppard E, Kürpig S, Fisang C, Feldmann G, Essler M, Ahmadzadehfar H. The impact of repeated cycles of radioligand therapy using <sup>177</sup>LuLu-PSMA-617 on renal function in patients with hormone refractory metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017; 44: 1473–1479
- Yordanova A, Linden P, Hauser S, Meisenheimer M, Kürpig S, Feldmann G, Gaertner FC, Essler M, Ahmadzadehfar H. Outcome and safety of rechallenge <sup>177</sup>LuLu-PSMA-617 in patients with metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019; 46: 1073–1080
- Zhao Y-X, Cheng C, Zhu F, Wu H-G, Ren J-H, Chen W-H, Cheng J. Suppression of low-dose hyper-radiosensitivity in human lung cancer cell line A549 by radiation-induced autophagy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013; 33: 770–774

## 9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Michael Muders bedanken, der mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglichte. Den immerzu motivierenden sowie konstruktiven wissenschaftlichen Austausch mit ihm habe ich stets sehr geschätzt. Auch bei Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ralph Bundschuh möchte ich mich für die Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin und die große Unterstützung bei der Planung und Umsetzung meiner Dissertation bedanken.

Ein außerordentlich großer und herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Sarah Förster, die mir stets mit Rat und Tat sowie aufmunternden Worten hilfreich zur Seite stand, für ihre wirklich hervorragende Betreuung. Auch bei Dr. rer. nat. Thomas Mayr bedanke ich mich ebenso herzlich für seine großartige wissenschaftliche und moralische Unterstützung und stets motivierende und optimistische Betreuung.

Ebenfalls gilt mein Dank der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, insbesondere Prof. Dr. med. Markus Essler, Dr. rer. nat. Stefan Kürpig mit seinem Team und Nadine Veit sowie dem Institut für Pathologie, insbesondere der AG Toma und Herrn Dr. Dietmar Hofmann für die Kooperation. Auch bei Prof. Dr. Pietsch und Prof. Dr. Datta bedanke ich mich für die Bereitstellung der Zelllinien.

Ich danke außerdem dem Scimed-Promotionskolleg für die finanzielle und auch wissenschaftliche Förderung im Rahmen des Scimed-Promotionsstipendiums.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern Yunbin Beissel und Marco Beissel und meinem Freund Patrick bedanken, die mich zu jeder Zeit unterstützen und immer für mich da sind. Insbesondere meiner wundervollen und selbstlosen Mutter danke ich für ihr schon jahrzehntelanges unermüdliches Engagement und für alles, was sie in mich und meine Ausbildung investiert und mir damit ermöglicht hat.