

**Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. A. K. Buck

**Evaluation der PET-Tracer [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA I&T zur
nicht-invasiven Charakterisierung von Prostatakarzinomzellen und des
Ansprechens auf eine Docetaxeltherapie**

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Philipp Emanuel Hartrampf
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2018



Referent: Prof. Dr. med. Andreas Buck

Korreferent: Prof. Dr. med. Hubert Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2019

Der Promovend ist Arzt

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms	1
1.2. Wachstum und Klinik des Prostatakarzinoms	2
1.3. Histologie und Einteilung der Malignität (Grading) des Prostatakarzinoms	2
1.4. Diagnostik und Bestimmung der Tumorausbreitung (Staging).....	3
1.5. Tumormarker des Prostatakarzinoms	4
1.5.1. Prostataspezifisches Antigen (PSA).....	4
1.5.2. Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA)	5
1.6. Bildgebung des Prostatakarzinoms.....	7
1.6.1. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/CT	7
1.7. Prognose und Therapie	10
1.7.1. Wirkung und Nebenwirkungen von Docetaxel.....	11
1.7.2. Resistenzentwicklung unter Docetaxeltherapie	11
1.8. Ziele der Arbeit	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Materialien	14
2.1.1. Geräte	14
2.1.2. Software	16
2.1.3. Verbrauchsmittel	17
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.5. Kits	21
2.1.6. Antikörper	21
2.1.7. siRNA	21
2.1.8. PCR-Primer.....	22

2.1.9. Zelllinien.....	22
2.1.10. Radiotracer.....	22
2.1.11. Medien und Puffer	23
2.2. Methoden.....	25
2.2.1. Zellkultur.....	25
2.2.2. Bestimmung der mittleren letalen bzw. mittleren inhibitorischen Konzentration von Docetaxel	27
2.2.3. Durchflusszytometrische Analysen.....	28
2.2.3.1. Nicoletti-Assay	28
2.2.3.2. Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester-Färbung	29
2.2.3.3. Durchflusszytometrische Quantifizierung von PSMA.....	30
2.2.4. Aufnahme bzw. Bindung der Radiotracer	31
2.2.5. Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.5.1. RNA-Isolation.....	32
2.2.5.2. cDNA-Synthese	33
2.2.5.3. Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	33
2.2.6. Proteinbiochemische Methoden	35
2.2.6.1. Proteinisolation	35
2.2.6.2. Bestimmung der Proteinmenge	36
2.2.6.3. SDS-Page und Western-Blot	36
2.2.7. Statistische Datenauswertung und Erstellung der Graphiken	37
3. Ergebnisse	38
3.1. Vergleichende Betrachtung androgenabhängiger und androgenunabhängiger Prostatakarzinomzelllinien.....	38
3.1.1. Charakteristika der verwendeten Zelllinien.....	38
3.1.2. Ermittlung der mittleren letalen bzw. inhibitorischen Konzentration von Docetaxel	39

3.1.3. PSMA-Expression und deren Modulation durch Behandlung mit Docetaxel in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen	41
3.1.4. Aufnahme von [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]Cholin und Bindung von [⁶⁸ Ga]PSMA I&T in/an androgenabhängige und androgenunabhängige Prostatakarzinomzellen in vitro	42
3.1.5. Aufnahme von [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]Cholin und Bindung von [⁶⁸ Ga]PSMA I&T nach Behandlung der Zelllinien LNCaP und LNCaP C4-2 mit Docetaxel	44
3.1.6. Korrelation der [⁶⁸ Ga]PSMA I&T-Bindung mit der PSMA-Expression	47
3.2. Einfluss der PSMA-Expression auf die Sensitivität von androgenabhängigen LNCaP-Zellen gegen Docetaxel	49
3.2.1. Etablierung eines PSMA Knockdown-Systems in LNCaP Zellen mittels siRNA	49
3.2.2. Einfluss eines Knockdown von PSMA auf die Proliferation von LNCaP Zellen	50
3.2.3. Einfluss der Expression von PSMA auf die Sensitivität von LNCaP Zellen gegen Docetaxel	51
4. Diskussion	52
4.1. Eignung der Tracer [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]Cholin und [⁶⁸ Ga]PSMA I&T für die Bildgebung des Prostatakarzinoms und das Therapiemonitoring nach Chemotherapie mit Docetaxel	52
4.1.1. PSMA-Expression und Docetaxelsensitivität der Zelllinien LNCaP und LNCaP C4-2	52
4.1.2. Generelle Eignung der Radiotracer [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]Cholin und [⁶⁸ Ga]PSMA I&T für die Darstellung des Prostatakarzinoms	53
4.1.3. Eignung der Tracer [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]Cholin und [⁶⁸ Ga]PSMA I&T für die diagnostische Unterscheidung des androgenunabhängigen vom androgenabhängigen	

Prostatakarzinom	54
4.1.4. Eignung der Tracer [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]Cholin und [⁶⁸ Ga]PSMA I&T für das Therapiemonitoring nach Docetaxelbehandlung	56
4.2. Bedeutung der PSMA-Expression für die Docetaxelsensitivität in LNCaP Zellen.....	58
4.2.1. Höhere Resistenz von LNCaP KD Zellen gegen Docetaxel im Vergleich zu parentalen LNCaP Zellen	58
4.3. Ausblick	60
5. Zusammenfassung.....	62
6. Literaturverzeichnis/ Abbildungsverzeichnis/ Tabellenverzeichnis	64
Abkürzungsverzeichnis	81
Anhang.....	83
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist bei Männern in Deutschland die häufigste Krebserkrankung und steht bei den tödlich verlaufenden Malignomen an zweiter Stelle. Nach einer Zunahme der Neuerkrankungen über fast zwei Jahrzehnte, wurde in den letzten Jahren eine weitgehend konstante Erkrankungsrate durch das Robert-Koch-Institut registriert. Im Jahr 2014 lag sie bei 57.370 Neuerkrankungen pro Jahr, was etwa einem Viertel aller Krebserkrankungen entspricht. Die altersstandardisierte Erkrankungsrate lag bei circa 92,7/100.000 Männern pro Jahr [105]. Die bisher zunehmende Zahl der Erkrankungen wird zu einem großen Teil mit einer besseren Früherkennung, durch großflächig durchgeführte Messungen des Prostataspezifischen Antigens (PSA), im Rahmen eines Screenings, erklärt. Im Jahr 2014 verstarben in Deutschland 13.704 Männer an der Erkrankung, die Mortalität lag bei 19,7 pro 100.000 Personen. Prostatakarzinome treten selten vor Beginn des fünften Lebensjahrzehnts auf, danach steigt die Inzidenz exponentiell an und der Gipfel der Erkrankungshäufigkeit liegt im siebten und achten Lebensjahrzehnt. Das Lebenszeitrisko, jemals an einem Prostatakarzinom zu erkranken, liegt bei 11,9 %. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt momentan 91 % [105].

Es zeigen sich geographische Unterschiede in der Häufigkeit des Prostatakarzinoms. Während das Prostatakarzinom in den USA und Europa zu den häufigeren Tumoren zählt, ist es in asiatischen Ländern eher selten [73, 101].

Die genaue Ätiologie des Prostatakarzinoms ist weitgehend unbekannt. Einige Risikofaktoren scheinen jedoch zu existieren, wie z.B. höheres Alter, eine genetische Disposition, der Lebensstil und die Ernährungsweise (z.B. Konsum von rotem Fleisch) [32, 76, 120]. Interessanterweise zeigt sich auch in asiatischen Ländern eine Zunahme der Fallzahlen. Diese wird mit einer Anpassung des Lebensstils an westliche Verhältnisse (fette Ernährung, Übergewicht) erklärt [99].

Alter scheint ein erwiesener Risikofaktor für die Entwicklung von Prostatakarzinomen zu sein. Das Erkrankungsrisiko, innerhalb der nächsten 10

Jahre zu erkranken, liegt bei einem 35-jährigen unter 0,1 %, während es bei einem 75-jährigen bei etwa 5-6 % liegt [105].

1.2. Wachstum und Klinik des Prostatakarzinoms

Bereits 1941 beschrieben Huggins et al. eine Androgenabhängigkeit im Wachstum von Prostatakarzinomen [42]. Dies wird bis heute in der Therapie genutzt. Allerdings muss man davon ausgehen, dass nicht alle Tumorzellen hormonsensitiv wachsen [36].

Aufgrund des anfänglich langsamen Wachstums verlaufen die frühen Stadien des Prostatakarzinoms in der Regel symptomlos. Fortgeschrittene Erkrankungen fallen meist durch Miktionsprobleme und/oder Restharnbildung sowie Nykturie, Pollakisurie, Dysurie oder Algurie auf. Erektionsstörungen können, bedingt durch Kompression der Nerven im Sakralbereich, auftreten. Im Falle einer Metastasierung sind primär Knochen betroffen, meistens im Bereich von Becken, Wirbelsäule, Rippen oder Femur. Die Metastasen imponieren dabei durch lokale Knochenschmerzen und im schlimmsten Fall durch pathologische Frakturen. Bei Metastasen in der Wirbelsäule kann es außerdem zu neurologischen Ausfällen durch Rückenmarksverletzungen kommen. Lymphknotenmetastasen können außerdem zu Lymphödemen führen. Metastasen in Lunge und Leber sind eher selten [36].

1.3. Histologie und Einteilung der Malignität (Grading) des Prostatakarzinoms

Die Prostata wird nach McNeal in vier Zonen eingeteilt: periphere Zone, Transitionszone, zentrale Zone und anteriores fibromuskuläres Stroma. In der peripheren Zone, die circa 70 % des Drüsengewebes enthält, entstehen fast alle Prostatakarzinome [74]. Das Adenokarzinom der Prostata macht dabei über 90 % aller Prostatakarzinome aus und entsteht aus den Drüsenzellen der Prostata [36].

Für die histologische Einteilung der Malignität (Grading) wird der revidierte Gleason-Score verwendet [26], für den der histologische Aufbau des Prostatagewebes nach architektonischen Parametern bewertet wird. Die Grade

reichen von 1 (gut differenziert) bis 5 (sehr schlecht differenziert). Die Grade der beiden am häufigsten im untersuchten Biopsie- oder Operationspräparat vorkommenden Zellpopulationen werden zum Gleason-Score addiert, z.B. $3+4=7$ [26]. Der Score kann damit Werte zwischen 2 und 10 annehmen. Je höher der Gleason-Score, desto größer ist die Abweichung zum ursprünglichen Gewebe und somit die Entdifferenzierung.

1.4. Diagnostik und Bestimmung der Tumorausbreitung (Staging)

Die Früherkennung des Prostatakarzinoms erfolgt im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung, welche ab dem 45. Lebensjahr empfohlen wird. Diese umfasst die Messung des PSA-Wertes und die digital-rektale Tastuntersuchung (DRU). Bei Karzinomverdacht kann zur Primärdiagnostik ergänzend der transrektale Ultraschall (TRUS) angewendet werden. Bei begründetem Karzinomverdacht wird eine transrektale Stanzbiopsie mit zehn bis zwölf Stanzzyllindern durchgeführt. Die Präparate werden histologisch untersucht und mittels des Gleason-Scores eingestuft [66].

Die Bestimmung der Tumorausbreitung (Staging) wird nach den TNM-Kriterien durchgeführt [137]. Das T steht dabei für Tumor und beschreibt die Größe des Tumors (Tabelle 1).

Das N und M geben Lymphknoten- (N) oder Fernmetastasen (M) an. Im Bedarfsfall kann für das Staging, zusätzlich zur Primärdiagnostik, eine Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden [66].

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der Tumorkategorien beim Prostatakarzinom nach 7. Auflage TNM-Klassifikation [137].

T-Kategorie	Erläuterung
Primärtumor	
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, weder tastbar noch in der Bildgebung
T2	Tumor begrenzt durch Prostatakapsel
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T4	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen als Samenblasen

1.5. Tumormarker des Prostatakarzinoms

1.5.1. Prostataspezifisches Antigen (PSA)

Das Prostataspezifische Antigen (PSA) ist eine Serinprotease, welche im Prostatasekret enthalten ist. Sie dient der Verflüssigung der Samenflüssigkeit [36]. Momentan ist das PSA der wichtigste Marker zur Risikostratifizierung eines Prostatakarzinoms, da es hierbei häufig erhöht ist. Der Vorteil von PSA liegt in der hohen Spezifität, da es nur in der Prostata gebildet wird, nachteilig ist jedoch, dass es nicht tumorspezifisch ist. Erhöhte PSA-Spiegel werden nicht nur bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms, sondern auch bei benigner Prostatahyperplasie, bei Entzündungen der Prostata, bei Manipulationen oder anderen Reizungen der Prostata (z.B. Fahrradfahren) beobachtet [86, 119]. Es fällt somit schwer, generelle Grenzwerte für suspekta Serum-PSA-Werte zu definieren. Daher werden, neben dem Gesamtvorkommen des PSA, die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit und die PSA-Verdoppelungszeit betrachtet.

Die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit (PSA-V) gibt die Änderung des Gesamt-PSA-Wertes innerhalb eines Jahres an. Dieser Wert scheint eine Einschätzung der Aggressivität eines Tumors zu ermöglichen [19].

Die PSA-Verdoppelungszeit gibt an, in welcher Zeit sich das Gesamt-PSA

rechnerisch verdoppelt hat. Sehr kurze PSA-Verdoppelungszeiten sind mit einer aggressiveren Tumorerkrankung und einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert [3, 28].

Eine wichtige Funktion hat der PSA-Wert in der Tumornachsorge nach Prostatektomie oder Strahlentherapie. Nach erfolgreicher Therapie sollte der PSA-Wert unter die Nachweisgrenze sinken, da kein PSA produzierendes Gewebe mehr vorhanden sein sollte. Bei erneutem Ansteigen spricht man von einem biochemischen Rezidiv, welches durch ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen verursacht werden kann. Außerdem kann das PSA als Marker der Effektivität einer Antiandrogen- oder Chemotherapie eingesetzt werden [36].

1.5.2. Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA)

Das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA) ist ein Typ II Transmembran-Glykoprotein, welches ungefähr 100 kDa wiegt und aus 750 Aminosäuren (AS) besteht. Das PSMA-Protein hat eine große extrazelluläre Domäne (707 AS), eine Transmembrandomäne (24 AS) und einen kleinen zytosolischen Teil (19 AS) [45, 87]. Eine Enzymaktivität wurde für die membranständige, wie auch für die mögliche zytosolische Form von PSMA beschrieben [130]. Außerdem sind verschiedene Isoformen von PSMA identifiziert worden. Diese entstehen durch alternatives Spleißen und wurden PSM' (zytosolische Variante), PSM-C, PSM-D und PSM-E benannt [8, 85, 121]. Zumindest für PSM-E wurde eine ähnliche Funktion wie für PSMA beschrieben [9].

PSMA wird sehr spezifisch in der Prostata exprimiert. Geringe Mengen wurden aber auch in der Brust sowie den Ovarien nachgewiesen, während in der Haut, in der Leber, in den Nieren und den intestinalen Organen kaum nachweisbare Mengen gefunden wurden [116, 118]. Außerdem wurde eine PSMA-Expression in neovaskulären Endothelien von vielen weiteren soliden Tumoren gefunden [13, 12, 15, 33, 116].

Über die physiologische Funktion von PSMA ist nicht viel bekannt. PSMA besitzt eine Folathydrolaseaktivität, sodass eine Funktion im Folatstoffwechsel der Prostata angenommen wird [97]. Die N-Acetyl-L-aspartyl-L-

Glutamatpeptidase (NAALADase), eine Neuropeptidase im Glutamatstoffwechsel des Nervensystems, stimmt zu 86 % mit dem PSMA-Protein überein, weshalb eine ähnlich hydrolytische Funktion vermutet wird [11]. Ein natürlicher Ligand für PSMA konnte bislang allerdings nicht identifiziert werden [30].

Aktuell werden eine mögliche Beteiligung an der Zellmigration sowie an der Nährstoffaufnahme über die Folathydrolase und eine Beeinflussung des Zellzyklus (vorzeitiges Verlassen der Mitosephase), durch eine Assoziation des zytoplasmatischen Anteils von PSMA mit dem Zykosom, diskutiert [102, 103]. Die Beteiligung am Zellzyklus bleibt unter physiologischen Bedingungen jedoch unklar, da die betreffenden Studien an Zellen mit starker Überexpression von PSMA durchgeführt wurden.

In Prostatakarzinomen ist die PSMA-Expression sehr häufig erhöht [7, 65, 122, 138]. Dabei scheint die Expression im Primärtumor und auch in Lymphknotenmetastasen hoch zu sein, während sie in Knochenmetastasen im Vergleich dazu niedriger ist [116, 139].

Über die Bedeutung von PSMA in der Pathogenese von Prostatakarzinomen ist bisher wenig bekannt. Das PSMA scheint beispielsweise einen fördernden Effekt auf die Knochenmetastasenbildung zu haben [144]. Kontrovers diskutiert wird der Einfluss von PSMA auf die Zellmigration und die Invasivität der Tumorzellen. Die ektope Expression von PSMA in PC-3-Zellen (Prostatakarzinomzelllinie mit neuroendokrinen Merkmalen) war in einigen Studien mit einem weniger invasiven Wachstum assoziiert [9, 31]. Studien von Yao et al. zeigten jedoch gegenteilig eine Steigerung der Invasivität von PC-3 Zellen mit ektope PSMA-Expression [141]. Im Einklang damit führte eine Hemmung der PSMA-Aktivität bzw. das Ausschalten von PSMA in LNCaP Zellen zu einer verminderten Migration und Invasion [20, 143]. Doch auch hier gibt es gegenteilige Ergebnisse, die zeigen konnten, dass eine Blockade von PSMA in LNCaP Zellen zu einer höheren Invasivität führte [9].

Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen Androgenen und PSMA angenommen. Liu et al. zeigten, dass die Expression von PSMA nach einer Langzeitsuppression von Androgenen abnahm [67], während Chang et al.

keinen Einfluss einer kurzzeitigen Androgensuppression auf die PSMA-Expression nachweisen konnten [14]. Im Gegensatz dazu beobachteten andere Studien eine erhöhte PSMA-Expression durch eine antiandrogene Therapie [27, 75, 139]. Evans et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass eine Inhibition des Androgenrezeptorsignalweges eine erhöhte Aufnahme eines radioaktiv markierten PSMA-Antikörpers zur Folge hatte. Umgekehrt zeigten sie auch, dass die PSMA-Expression durch Androgene unterdrückt wird [27].

In ersten klinischen Untersuchungen korrelierte eine hohe PSMA-Expression mit einem höheren Tumorgrad, mit einer Aneuploidie und mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs [94, 106].

Das PSMA-Protein ist ein interessanter Anhaltspunkt für die Diagnose, die Behandlung und die Forschung. Abgesehen von neovaskulären Endothelien anderer Tumoren weist es eine hohe Spezifität für die Prostata auf und wird dort um ein vielfaches höher exprimiert als in anderen Geweben [30, 118]. Außerdem steht inzwischen eine Reihe von spezifischen, künstlichen PSMA-Liganden zur Verfügung [70]. Diese können beispielsweise an ein Radionuklid, ein Toxin oder anderes Pharmakon gebunden werden und somit eine Diagnostik sowie eine zielgerichtete Therapie ermöglichen [25, 38, 71, 107, 124].

1.6. Bildgebung des Prostatakarzinoms

Außerhalb von Studien spielt in der Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms die Bildgebung mittels MRT oder CT eine untergeordnete Rolle und ist speziellen Fragestellungen vorbehalten. Eine Skelettszintigraphie kann zum Nachweis von Skelettmetastasen herangezogen werden [66].

1.6.1. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/CT

In den Leitlinien zur Diagnostik und Staging des Prostatakarzinoms wird die PET/CT Untersuchung erwähnt, aber nicht standardmäßig empfohlen und soll in kontrollierten klinischen Studien durchgeführt werden. Im Rahmen der Rezidivdiagnostik kann neuerdings jedoch eine PSMA-Hybrid-Bildgebung erfolgen [66]. Diese wird mit zunehmendem Erfolg in einigen Zentren

angeboten. Die generelle Funktionsweise der PET beruht auf mit Nukliden radioaktiv markierten Molekülen (Tracern), die sich im Gewebe anreichern und deren Nuklide dort zerfallen. Dabei werden Positronen emittiert, die mit Elektronen im Gewebe reagieren und so vernichtet werden. In diesem Vorgang entstehen zwei Photonen, die sich im Winkel von ca. 180° voneinander entfernen. Diese Photonen werden in Detektoren, die ringförmig um den Patienten angebracht sind, detektiert und lassen sehr genaue Rückschlüsse auf den Ort des Zerfalls im Körper zu. Beim PET/CT werden die PET-Bilder mit Bildern einer zeitgleich durchgeführten CT fusioniert. Dadurch lassen sich die Traceranreicherungen anatomischen Strukturen zuordnen [61].

In der Nuklearmedizin existieren für die Prostatabildgebung inzwischen verschiedene Tracer. Diese sind u.a.: [¹⁸F]2'-Fluor-2'-desoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG), [¹⁸F]Cholin ([¹⁸F]Fluorethylcholin, [¹⁸F]Fluormethylcholin) und spezifische Tracer die gegen PSMA gerichtet sind (z.B. [⁶⁸Ga]Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-HBED-CC oder [⁶⁸Ga]PSMA I&T) [22, 49, 135]. Die PET mit [¹⁸F]FDG ist das Standardverfahren in der Nuklearmedizin. Dabei wird dem Patienten ein radioaktiv markierter Zucker ([¹⁸F]FDG) verabreicht. Dieser Zucker wird von den Zellen im Körper unspezifisch über Glukosetransporter aufgenommen. Der gesteigerte Glukoseumsatz von Tumorzellen führt zu einer Mehrspeicherung in diesen, sodass Tumore sichtbar gemacht werden können [34]. Jedoch ist der Nutzen der [¹⁸F]FDG-PET für die Diagnose und das Staging des Prostatakarzinoms limitiert, da die Sensitivität in verschiedenen Studien ganz unterschiedlich bei 4 %, 31 %, 64 % bzw. 83 % lag [57, 69, 91, 90, 134]. Des Weiteren muss bedacht werden, dass [¹⁸F]FDG teilweise auch von normalem Prostatagewebe, bei Prostatitis und bei benigner Prostatahyperplasie, durch erhöhten Glukoseumsatz, vermehrt aufgenommen wird [48, 54, 57, 108]. Für die Diagnose von schlecht-differenzierten Karzinomen (hoher Gleason-Score) kann das Verfahren jedoch nützlich sein [49, 48, 50, 58, 90]. Möglicherweise kann es auch zum Therapiemonitoring eingesetzt werden, da gezeigt werden konnte, dass die [¹⁸F]FDG-Aufnahme nach (chemo-)hormonaler Therapie abnimmt [49, 91].

Für die Prostatabildgebung werden neben [¹⁸F]FDG auch cholinbasierte Tracer

eingesetzt, wie z.B. [^{11}C]Cholin (CHOL) und [^{18}F]Cholin ([^{18}F]Fluorethylcholin = (FEC), [^{18}F]Fluormethylcholin = (FMC)). Die Zellmembran besteht zu einem Teil aus Phosphatidylcholin, welches durch Aufnahme von Cholin synthetisiert und in die Membran eingebaut wird. Cholin wird von Prostatakarzinomzellen, im Vergleich zu normalen Prostatazellen, verstärkt aufgenommen [63]. Dies geschieht vermutlich durch eine erhöhte Cholinaseaktivität in Prostatakarzinomzellen [104] und einem somit höheren Cholinumsatz der Tumorzelle. Die Sensitivität und Spezifität der [^{18}F]Cholin-PET liegen für das initiale Staging des Prostatakarzinoms bei 84 % bzw. 79 % [131]. Jedoch wurde auch hier gezeigt, dass es zu einer Aufnahme in normales Prostatagewebe, z.B. bei Prostatitis und bei benigner Prostatahyperplasie, kommt [44]. Beim Restaging bei Rezidiv liegen die Sensitivität und Spezifität sogar bei 85 % und 88 %. Der Nutzen der [^{18}F]Cholin-PET findet sich daher eher in der Rezidiverkennung und im Restaging, als in der Primärdiagnostik und dem Primärstaging [111, 131]. Dabei ist es dem [^{18}F]FDG-PET überlegen [96, 134]. Die Werte für Spezifität und Sensitivität scheinen jedoch bei sehr niedrigen PSA-Werten deutlich schlechter zu sein [16, 43, 59, 110]. Möglicherweise lässt sich [^{18}F]Cholin zum Therapiemonitoring nach Chemotherapie mit Docetaxel einsetzen, da ein Zusammenhang in der Cholinaufnahme und der Docetaxelexposition im Zellmodell beschrieben wurde [82, 89]. In einer ersten klinischen Untersuchung überzeugte ein Cholin-Tracer jedoch nicht für die Überprüfung eines Therapieerfolgs mit Docetaxel nach klinischen Kriterien (PSA-Wert, „Response Evaluation Criteria In Solid Tumors“ (RECIST)). Das Ansprechen einzelner Läsionen konnte jedoch überprüft werden [112].

Aktueller Gegenstand der Forschung sind spezifische PSMA-Tracer. Bei einem vielversprechenden Ansatz handelt es sich dabei um einen niedermolekularen PSMA-Inhibitor, der mit der „Liganden-Bindestelle“ von PSMA interagiert. Daran wird ein Chelator gebunden und mit Gallium-68 markiert. Der fertige Tracer wird vom PSMA-Molekül gebunden, in die Zelle internalisiert und detektiert [22]. Im Falle eines schlechten Ansprechens einer kurativen Therapie, konnte für die Rezidiverkennung des Prostatakarzinoms in ersten klinischen Untersuchungen für das [^{68}Ga]PSMA-PET eine deutlich bessere Detektionsrate, als für ein

[¹⁸F]Cholin-PET, angegeben werden. Dies galt v.a. bei niedrigen PSA-Werten. Außerdem scheint das [⁶⁸Ga]PSMA-PET dem [¹⁸F]Cholin-PET hinsichtlich des Kontrasts überlegen [1, 24, 80, 93]. Zusätzlich konnte ein [⁶⁸Ga]PSMA-PET, im Falle eines vorangegangenen negativen [¹⁸F]Cholin-PETs, zu 43,8 % ein Rezidiv trotzdem erkennen [6]. Die Sensitivität bzw. die Spezifität des [⁶⁸Ga]PSMA-PETs werden in einer Metaanalyse jeweils mit 86 % angegeben [93].

Weiterführend ist ein theranostischer Ansatz, bei dem die Diagnostik und die Therapie verknüpft werden. Dabei wird zunächst die PSMA-Expression mittels einer diagnostischen [⁶⁸Ga]PSMA-PET verifiziert. Anschließend kann eine Endoradiotherapie erfolgen, für die derselbe Tracer an ein therapeutisches Nuklid, wie z.B. Lutetium-177, gekoppelt wird. Erste Ergebnisse am Patienten lassen ein großes Potential in der Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms erwarten [37, 62, 136].

1.7. Prognose und Therapie

Die Prognose ist bei früh erkannten und begrenzten Karzinomen sehr gut, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei annähernd 100 % [115]. Bei lokalen (T1 und T2) und niedrig-gradigen (Gleasonscore < 8) Karzinomen ist die Lebenserwartung kaum beeinträchtigt [56]. Im Falle einer Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose, verschlechtert sich die Prognose auf eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur noch 28 % [115].

Die Therapie des Prostatakarzinoms hängt von der Ausbreitung (TNM-Klassifikation), dem Grading (Gleason-Score), dem Allgemeinzustand des Patienten, den Begleiterkrankungen, dem Alter sowie seiner Lebenserwartung ab. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren kann zwischen einer abwartenden Haltung („aktive Überwachung“ oder „abwartendes Beobachten“), einer radikalen Prostatektomie, einer Strahlentherapie und einer antiandrogenen Hormontherapie gewählt werden, denen sich im Bedarfsfall eine Chemotherapie anschließen kann. Die antiandrogene Hormontherapie im Sinne einer systemischen Androgendeprivation kann entweder medikamentös (LHRH-Analoga, z.B. Buserelin; GnRH-Antagonisten, z.B. Degarelix) oder operativ

(Orchiektomie) erfolgen [66]. Dem androgenabhängigen Wachstum von Prostatakarzinomen wird somit die Wachstumsgrundlage genommen. Allerdings entwickeln viele Prostatakarzinome nach einiger Zeit trotz antiandrogener Therapie ein erneutes bzw. weiteres Wachstum. Dies wird als Kastrationsresistenz bezeichnet. Bei fortschreitender Erkrankung oder Kastrationsresistenz kann dem Patienten eine Chemotherapie angeboten werden, welche derzeit standardmäßig mit Docetaxel durchgeführt wird [66].

1.7.1. Wirkung und Nebenwirkungen von Docetaxel

Docetaxel gehört zur Gruppe der Taxane. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Bindung an das Tubulin der Mikrotubuli einer Zelle. Diese Bindung verhindert die Depolymerisation und somit den Abbau der Mikrotubuli. Da die Mitosespindel aus Mikrotubuli besteht, wird die Zellteilung stark gehemmt. Die Zelle verbleibt im Übergang zwischen der G2/M-Phase des Zellzyklus. Das führt zur Einleitung der Apoptose und zum Zelltod [5, 109].

In zwei prospektiven, randomisierten Zulassungsstudien verlängerten Docetaxel/Prednison bzw. Docetaxel/Estramustin im Vergleich zu Mitoxantron/Prednison das mediane Überleben signifikant um 2,9 Monate (19,2 Monate vs. 16,3 Monate) [4] bzw. um 1,9 Monate (17,5 Monate vs. 15,6 Monate) [95].

Eine Behandlung mit Docetaxel kann jedoch zu einer ausgeprägten hämatologischen Toxizität führen. Beschrieben wurden eine Anämie, Thrombozytopenie und eine (mitunter schwere) Neutropenie [127]. Des Weiteren kann es zu akuten Hypersensitivitätsreaktionen, Alopezie, Fatigue, Nausea/Emesis, Diarrhoe, Neuropathien, Nagelveränderungen, Stomatitis, peripheren Ödemen, Geschmacksveränderungen, Appetitlosigkeit, Dyspnoe, Myalgie, vermehrter Tränensekretion und Epistaxis kommen [127].

1.7.2. Resistenzentwicklung unter Docetaxeltherapie

Ein Problem der Therapie mit Docetaxel stellt die Resistenzentwicklung dar, für deren Entstehung inzwischen einige Mechanismen untersucht wurden (Abbildung 1). Vermutet werden u.a. eine Überexpression von Multidrug-

Resistenz-Proteinen (MDRP), wie z.B. p-Glykoprotein, die über eine Efflux-Pumpe den Wirkstoff aus der Zelle transportieren [88], oder eine Mutation bzw. andere Isoform des Tubulins, an dem Docetaxel andockt und dieses dann nicht mehr richtig binden kann [35, 98, 128]. Eine Überexpression oder Aktivierung von Signal Transducers and Activators of Transcription 1 (STAT1), STAT3, Clusterin, Hitzeschockproteinen (HSP) und nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) sowie eine verminderte Expression bzw. Aktivität von p53 sind auch mit einer Docetaxelresistenz assoziiert worden [17, 21, 68, 88, 92, 142]. Die Überexpression von einigen Zytokinen wie z.B. Interleukin-6, Interleukin-8, CC-Chemokinligand 2 (CCL2), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) oder macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1) scheint ebenfalls die Entwicklung einer Docetaxelresistenz zu fördern [21, 72, 78, 100, 117]. Umgekehrt führte in Zellversuchen mit LNCaP Zellen die verminderte Expression von p38, p53 oder p21 zur Sensibilisierung gegenüber Docetaxel [29].

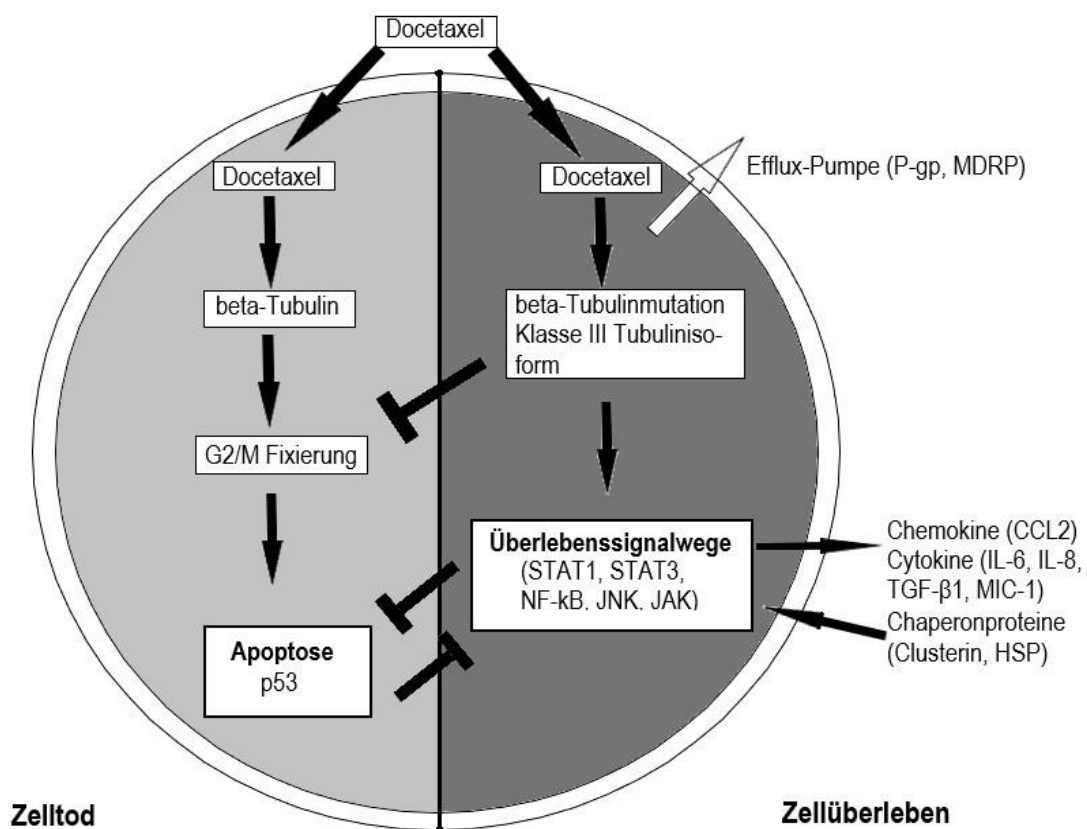


Abbildung 1: Resistenzmechanismen gegen Docetaxel, vereinfachte Darstellung nach Magadoux et al. [73]

1.8. Ziele der Arbeit

Bislang ist eine Einteilung von Prostatakarzinomen bezüglich ihrer Androgensensitivität, eine Einschätzung hinsichtlich der Aggressivität und eine Bestimmung der Tumorbiologie und dem damit verbundenen Tumorstoffwechsel ohne eine Biopsie schwer möglich. Mit einer nicht-invasiven Bildgebung, die dies frühzeitig ermöglicht, könnten individualisierte Therapiemöglichkeiten angeboten und nebenwirkungsreiche oder ineffektive und kostenintensive Therapien vermieden werden. Zusätzlich wäre die Überprüfung des Therapieansprechens, im Speziellen der Chemotherapie mit Docetaxel, beim Prostatakarzinom mittels PET-Bildgebung eine neue und schnelle Methode. Im Fokus des Interesses steht dabei die PET-Darstellung des Proteins PSMA, da dadurch die bekannten Limitationen der Tracer $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ und $[^{18}\text{F}]\text{Cholin}$ umgangen werden könnten. Mit dem in der Nuklearmedizin möglichen theranostischen Prinzip könnte aufgrund der Spezifität von PSMA für Prostatagewebe, bei positiver PSMA-Diagnostik, mit einem therapeutischen Nuklid außerdem eine sehr spezifische Therapie angeboten werden. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen, die im ersten Teil der Arbeit untersucht wurden:

Wie gut eignen sich verschiedene Tracer ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{Cholin}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA}$ I&T) zur Bildgebung von androgenunabhängigen (LNCaP C4-2 Zellen) und androgenabhängigen (LNCaP Zellen) Prostatakarzinomen? Inwiefern eignen sich die Tracer zur Differenzierung der Androgenabhängigkeit der Prostatakarzinome?

Wie gut eignen sich die Tracer $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{Cholin}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA}$ I&T für die Beurteilung des Therapieansprechens nach Docetaxeltherapie?

Wie spezifisch ist die $[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA}$ -Tracerbindung für die tatsächliche Expression von PSMA? Korreliert die Tracerbindung mit der Expression?

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Entwicklung einer Docetaxelresistenz in einem small interfering RNA (siRNA) vermittelten System untersucht, bei dem die PSMA-Expression in LNCaP Zellen gehemmt wurde (LNCaP Knockdown/KD). Diese

Hypothese basiert auf einer Studie, die einen Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der p38-Expression [143] beschreibt, sowie einer weiteren Studie, die einen Zusammenhang zwischen der p38-Expression und der Docetaxelsensitivität beschreibt [29].

Daraus ergeben sich folgende konkrete Fragestellungen:

Beeinflusst die PSMA-Expression in LNCaP Zellen die Sensitivität gegenüber Docetaxel?

Ist es möglich, vor Therapiebeginn mittels [⁶⁸Ga]PSMA-PET/CT Rückschlüsse auf die Docetaxelsensitivität zu ziehen und somit das Ansprechen einer Chemotherapie mit Docetaxel abzuschätzen?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

	Typ	Hersteller
Autoklav	Autoklav 23	MELAG Medizin-technik, Berlin
automatischer Zellzähler	Scepter™ 2.0	Merck KGaA, Darmstadt
Brutschrank	Heracell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur	BD Biosciences, New Jersey, USA
Eismaschine	AF-10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammer	Mini PROTEAN 3 cell	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Entwicklermaschine	Protec Ecomax	Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Gammacounter	2480 Wizard ²	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

Gefrierschrank	Gram bioline (-20 °C) Forma 900 series (-80 °C)	Gram Commercial A/S, Vojens, DK Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank	Öko Super Glass Line	LIEBHERR International AG, Biberach a.d. Riß
MacBook	MacBook Pro 4.1	Apple Inc., Cupertino, USA
Mechanischer Zellzähler	T120	Baumer IVO GmbH & Co. KG, Villingen- Schwenningen
Mehrfachdispenser	HandyStep	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Mikroplattenlesegerät	Plate CHAMELEON™ V	Hidex Oy, Turku, Finnland
Mikroskop	Axio Vert.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Netzteil für Elektrophoresekammer und Transfertank	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe: 0,100mm; 0,0025mm ²	Assistent® Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
PCR-Gerät	FlexCycler ²	Analytik Jena AG, Jena
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Qubit® Fluorometer		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Reagenzglaschüttler	Mixer Uzusio VTX 3000L	LMS Co. Ltd., Tokyo, Japan

Real-time PCR-Gerät	RotorGene Q	Qiagen GmbH, Hilden
Schüttler	MS1 Minishaker	IKA – Werke GmbH & Co. KG, Staufen
sterile Arbeitsbank	Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Stoppuhr		TFA, Dostmann GmbH & Co KG, Wertheim
Taumel-Rollmischer		Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Thermoschüttler	TS-100C	Biosan, Riga, Lettland
Thermostatschrank		Aqua@lytic, Dortmund
Transfertank	Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Vakuumpumpe		VWR International GmbH, Darmstadt
Waage	Sartorius BP 310 S	Data Weighing Systems, Inc., Elk Grove, USA
Wasserbad		Memmert GmbH + Co KG, Schwabach
Zentrifuge	Fresco 21 centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 2.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2. Software

BD CellQuest™ Pro	BD Biosciences, New Jersey, USA
Citavi 5	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
OriginPro 2016G	OriginLab Corporation, Northampton, USA

2.1.3. Verbrauchsmittel

	Typ	Hersteller
Blottingpapier	330 g/m ² ; GB33	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
FACS-Röhrchen	Flow cytometry tube 5 ml, 75x12 mm, PS	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen	250 ml, 75 cm ² 50 ml, 25 cm ² 250 ml, 75 cm ² cell+	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Gewebekulturplatten	6-Well, 96-Well 24-Well Cellstar	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Nitrozellulose- Membran	GE Protran BA83	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pasteurpipetten	Ca. 230 mm	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
PCR-Caps	PCR SingleCap 8er- SoftStrips 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipetten	2,5 µl Research plus 1000 µl Reference 20 µl 200 µl pipetman 200	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Brand GmbH + Co. KG, Wertheim VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen	10 µl 200 µl 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Pipettenspitzen für PCR mit Filter	10 µl Biosphere® 100 µl Biosphere® 200 µl Biosphere® 1000 µl Biosphere®	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	SafeSeal 1,5 ml 15 ml Cellstar tubes 50 ml Cellstar tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
sterile Einmalpipetten	5 ml Cell Star 10 ml Cell Star 25 ml Cell Star	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Universalfilm (Super RX)		Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES Puffer) 1M	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
5(6)-Carboxyfluorescein diacetate <i>N</i> -succinimidylester (CFSE)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid/Bis-acrylamid Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serumalbumin (Fraktion V, pH 7)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Chemolumineszenz-Lösung (Western Lightning® Plus-ECL)	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Docetaxel	Selleckchem, Houston, USA
Ethanol (96 % vergällt)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol absolut (unvergällt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung (0,5 M) pH 8	AppliChem GmbH, Darmstadt
fetales Kälberserum (FCS)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Glutamax	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HiPerFect® Transfection reagent	Qiagen GmbH, Hilden
Lämmli-Puffer 2x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumpyruvat 100 mM	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA 100x)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt

Penizillin/Streptomycin	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Ponceau S Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protein-Leiter (ColorPlus Prestained)	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main
Radioimmunpräzipitationsassay- Puffer (RIPA-Puffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase Entferner (RNase-ExitusPlus)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Roswell Park Memorial Institute- Zellmedium (RPMI 1640)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
TRIZMA®BASE	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin (10x)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
TWEEN®20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zellmedium OPTI-MEM	Gibco® by life Technologies, Darmstadt

2.1.5. Kits

	Hersteller
Inside-stain-Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Novagen® BCA Protein Assay Kit	EMD Millipore Corp., Billerica, USA
Omniscript® RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAshredder™	Qiagen GmbH, Hilden
Qubit® RNA BR Assay Kit	molecular probes® by life technologies™, Eugene, USA
RNase-free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SensiMix™ SYBR No-ROX Kit	Bioline Reagents Ltd., London, UK

2.1.6. Antikörper

	Hersteller
Esel-anti-Maus IgG H&L Alexa Fluor® 488 (ab150105)	Abcam plc, Cambridge, UK
Maus-anti-hPSMA (ab19071)	Abcam plc, Cambridge, UK
Maus-anti-hTubulin (ab56676)	Abcam plc, Cambridge, UK
Pferd-anti-mMeerrettichperoxidase (HRP) (#7076)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

2.1.7. siRNA

siRNA FOLH1 (Gene ID 2346) Sequenz: CACGAACTGAAGACTTCTTTA	Qiagen GmbH, Hilden
Fluoreszenz- und scrambled-siRNA: SignalSilence® Control siRNA (Fluorescein conjugate) (#6201)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

2.1.8. PCR-Primer

FOLH1 Primer (PPH01005B)	NM_004476.1	Qiagen GmbH, Hilden
β-Actin QuantiTect® Primer Assay	Hs_ACTB_2_SG	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.9. Zelllinien

PC-3 (ATCC CRL-1435)

LNCaP (ATCC CRL-1740)

LNCaP C4-2

Die LNCaP und PC-3 Zellen wurden freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt.

Die LNCaP C4-2 Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. A. Beer, Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Ulm, zur Verfügung gestellt.

2.1.10. Radiotracer

Die verwendeten Radiotracer stellte freundlicherweise das Interdisziplinäre PET-Zentrum (IPZ) der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung. Alle Tracersubstanzen wurden vor Anwendung jeweils mittels validierter analytischer Verfahren auf Identität und radiochemische Reinheit geprüft.

[¹⁸F]2'-Fluor-2'-desoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG) HWZ: 110 Min.

[¹⁸F]Fluormethylcholin (FMC) HWZ: 110 Min.

[⁶⁸Ga]PSMA I&T HWZ: 68 Min.

2.1.11. Medien und Puffer

Wachstumsmedium:

- 500 ml RPMI 1640 Medium
- 50 ml FCS
- 5 ml NEAA
- 5 ml Glutamax
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 5 ml Natriumpyruvat

Einfriermedium:

Wachstumsmedium versetzt mit 10 % DMSO.

Trypsin:

Zur Herstellung von 1x Trypsin wurde 10x Trypsin 1:10 in PBS verdünnt.

Docetaxelstammlösung

Eine Docetaxelstammlösung (10 mM) wurde in DMSO angesetzt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Verdünnungen wurden mit RPMI-1640 Medium hergestellt.

Puffer

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tris-gepufferten Salzlösung (TBS)

20 mM Tris Base	24,2 g
150 mM NaCl	87,6 g
H ₂ O	1 l

für TBS-T: Zugabe von 0,1 % Tween

FACS-Puffer: PBS + 3 % FCS

MACS-Puffer: PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA

Blocking-Puffer: TBS-T + 5 % Magermilchpulver

Laufpuffer und Transferpuffer für Western-Blot:

Tabelle 3: Zusammensetzung der Puffer für Western-Blot

Menge für 1l	10x Laufpuffer	10x Transferpuffer
25 mM Tris Base	30,3 g	30,3 g
190 mM Glycin	144 g	144 g
SDS	10 g (1 %)	1 g
H ₂ O	1 l	1 l

1x Laufpuffer: 1:10 mit Wasser verdünnt

1x Transferpuffer: 1:10 mit 20 % Methanol/Wasser verdünnt

SDS-Gel

Tabelle 4: Zusammensetzung der 10 % SDS-Gele für Western-Blot

10 % SDS-Gel	10 ml Laufgel	3 ml Sammelgel
H ₂ O	4 ml	2,1 ml
Acrylamid 30 %	3,3 ml	0,5 ml
TRIS 1,5 mM	2,5 ml (pH 8,8)	0,38 ml (pH 6,8)
SDS 10 %	0,1 ml	0,03 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	0,004 ml	0,003 ml

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Kultivierung und Passagieren der Zelllinien:

Es wurde stets eine sterile Arbeitsbank mit vertikalem Luftstrom (Heracell) verwendet sowie auf eine sterile Arbeitsweise geachtet. Für die Experimente wurden die Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3, LNCaP und LNCaP C4-2 verwendet. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium bei 37 °C bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde nach 48 h – 96 h erneuert, sofern die Zellen nicht passagiert oder für Versuche verwendet wurden.

Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium aus der Zellkulturflasche mit einer Pasteurpipette abgesaugt, anschließend wurde mit PBS gewaschen. Die Flasche wurde nun mit 1 ml 1x Trypsin für einige Min. im Brutschrank inkubiert, damit sich die adhärennten Zellen von der Flaschenoberfläche ablösen. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde frisches Medium zugegeben, der Inhalt der Flasche in ein Reaktionsgefäß überführt und 4 Min. bei 400 xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abschließend wurde wieder eine gewisse Zahl an Zellen in eine neue Zellkulturflasche ausgesät und im Brutschrank inkubiert.

Bestimmung der Zellzahl:

Es wurden 10 µl einer Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{Zahl der ausgezählten Kammern}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Alternativ wurde die Zellzahl mit dem Scepter™ 2.0, einem automatischen Zellzähler, ermittelt.

Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff im Wasserbad kurz angetaut, sodass noch eine kleine Eisformation zu sehen war. Dann wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in 10 ml frischem Wachstumsmedium aufgenommen und 4 Min. bei 400 xg abzentrifugiert. Abschließend wurde das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert.

Zum Einfrieren wurden ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert. Das DMSO verhindert die Eiskristallbildung und somit das Platzen der Zellen beim Einfrier- bzw. Auftauvorgang. Die Zellsuspension wurde dann in speziellen Kryoröhrchen in einem Isopropanolkühler bei einer Kühlungsrate von 1 °C/Min. auf -80 °C gekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Transfektion der Zelllinien

Um die spezifische Funktion eines Proteins zu untersuchen, kann dieses Protein gezielt ausgeschaltet werden. Dazu bringt man eine für die mRNA-Sequenz des Proteins spezifische small interfering RNA (siRNA) in die Zellen ein (Transfektion). Von der doppelsträngigen siRNA wird ein Strang in den sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut. Der RISC erkennt die komplementäre natürliche mRNA in der Zelle und spaltet diese.

Die Transfektion und die Aussaat der Zellen wurden in einem Arbeitsschritt an einem Tag durchgeführt. Für die Transfektion einer siRNA in LNCaP Zellen wurden $3,5 - 4 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6-Lochplatte in 2,3 ml Wachstumsmedium (ohne P/S), oder $1 \cdot 10^5$ Zellen in einer 24-Lochplatte in 500 µl Medium ausgesät. Für 6-Lochplatten wurde anschließend 150 ng siRNA in 100 µl OPTI-MEM Medium verdünnt und 24 µl HiPerFect-Transfektionsreagenz zugegeben, für 24-Lochplatten wurde alles 1:4 runterskaliert. Dieser Ansatz wurde gründlich gemischt und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Transfektionskomplexe bilden konnten. Die komplexierte siRNA wurde anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und gleichmäßig durch

Bewegung der Lochplatte verteilt. Bei jeder Transfektion wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt, um unspezifische Effekte der Transfektion bzw. der siRNA ausschließen zu können: (i) eine Transfektion ohne siRNA („MOCK“), (ii) Transfektion einer siRNA, die nachgewiesenermaßen keinen Effekt auf kodierende Sequenzen innerhalb der Zelle hat („scrambled siRNA“). Nach 72 h wurde der Knockdown überprüft (Western Blot, qPCR) und die Zellen für Versuche verwendet.

Überprüfung der Transfektionseffizienz

Die Effizienz der Transfektion wurde mit Hilfe einer fluoreszenzmarkierten siRNA überprüft. 24 h nach der Transfektion wurde der Prozentsatz fluoreszierender Zellen fluoreszenzmikroskopisch beurteilt und anschließend durchflusszytometrisch im FACS im FL-1 Kanal quantifiziert.

2.2.2. Bestimmung der mittleren letalen bzw. mittleren inhibitorischen Konzentration von Docetaxel

Docetaxel gehört zur Gruppe der Taxane. Die Wirkung der Substanz beruht auf einer Stabilisierung von Mikrotubuli. Dies führt zu einer Unterbindung der Reorganisation des mikrotubulären Netzwerks während der Mitose und damit letztlich zum Zelltod.

Um die halbletale Dosis, bei der 50 % der Zellen sterben (LD50 Wert), für Docetaxel zu definieren, wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit Hilfe des Nicoletti-Assay (siehe Nicoletti-Assay) erstellt. Analog dazu wurde die inhibitorische Konzentration, bei der die Proliferation der Zellen um 50 % vermindert ist (IC50), mittels CFSE-Färbung ermittelt (siehe CFSE Färbung).

Dafür wurden

- LNCaP: $1 \cdot 10^5$ Zellen
- LNCaP C4-2: $1 \cdot 10^5$ Zellen
- PC-3: $3 \cdot 10^4$ Zellen

in 500 μ l Medium pro Kavität auf eine 24-Lochplatte ausgesät und für 24 h inkubiert, damit sich die Zellen absetzen und am Plattenboden anheften konnten.

Aus der Docetaxelstammlösung [10 mM] wurde eine Verdünnungsreihe in der doppelten gewünschten Endkonzentration hergestellt. Jeweils 500 µl einer Verdünnung bzw. 500 µl Wachstumsmedium (Kontrolle, unbehandelt) wurden jeweils zum vorhandenen Medium in einer Kavität zugegeben und für 48 h inkubiert.

2.2.3. Durchflusszytometrische Analysen

2.2.3.1. Nicoletti-Assay

Der Nicoletti-Assay wurde von Nicoletti et al. 1991 [84] eingeführt. Damit lässt sich eine Zellzyklusanalyse und eine Quantifizierung apoptotischer Zellen durchführen. Ein wichtiger Bestandteil der Methode ist Propidiumiodid, ein Farbstoff, der in Nukleinsäuren interkaliert. Wird die RNA vorher mittels RNase verdaut, ist die Menge des eingelagerten Propidiumiodids proportional zum DNA-Gehalt der Zelle.

Da hier die Zahl der toten Zellen quantifiziert werden sollte, wurden sowohl Zellen als auch das Medium aus der 24-Lochplatte in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (4 Min, 400 xg) wurde das Zellpellet durch tropfenweise Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol (-20 °C), während beständigem Mischen fixiert. Die Zellen wurden mindestens über Nacht bei 4 °C gelagert.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die fixierten Zellen mit etwa 2 ml 38 mM Na-Citrat gewaschen und anschließend mit 200 µl Färbelösung (50 µg/ml PI und 10 µg/ml RNase A in 38 mM Na-Citrat (pH 7,4)) versetzt und für 20 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die FACS-Messung erfolgte im Kanal FL-2A unter Verwendung des Duplettendiskriminierungsmoduls.

Die charakteristische Verteilung der Fluoreszenzintensität und damit des DNA-Gehalts im Histogramm stellt die einzelnen Zellzyklusphasen dar: Dabei stellt die sogenannte „sub-G1“ Fraktion die toten Zellen dar (Abbildung 2).

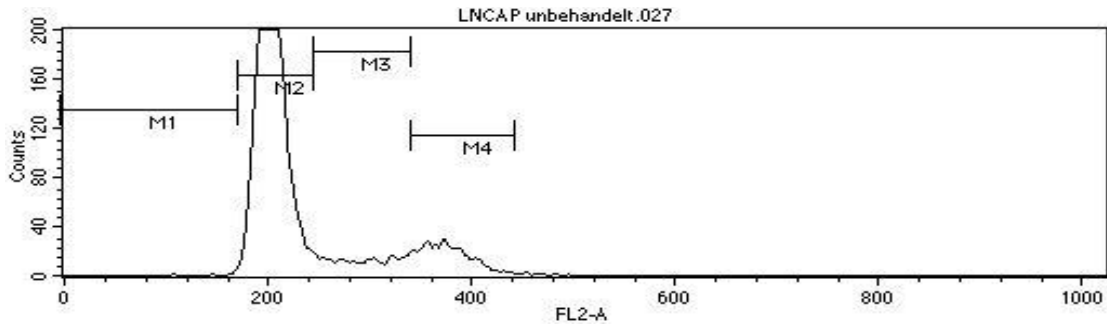


Abbildung 2: Histogrammdarstellung einer Zellzyklusanalyse nach Nicoletti, M1 = subG1: apoptotische Zellen ($< 2n$), M2 = G1-Phase ($2n$), M3 = Synthesephase ($2n-4n$), M4 = G2/M-Phase: $4n$; (n = Chromosomensatz), FL2-A gibt die Fluoreszenzintensität an.

2.2.3.2. Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester-Färbung

Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) ist ein zellpermeables, nicht fluoreszierendes Molekül, das in lebenden Zellen durch intrazelluläre Esterasen gespalten und in Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) umgewandelt wird. CFSE hingegen fluoresziert und ist zellimpermeabel. Bei der Zellteilung wird CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt. Die Fluoreszenzintensität nimmt also mit jeder Zellteilung ab, was mittels Durchflusszytometrie im FL-1 Kanal detektiert werden kann (Abbildung 3).

$1 \cdot 10^6$ Zellen wurden abzentrifugiert und in PBS/ 5 % FCS resuspendiert. Nach Zugabe von CFDA-SE in einer Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ wurden die Zellen für 3 Min. in der abgedunkelten Sterilbank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4 Min., $400 \times g$) und zweimal mit PBS/5 % FCS gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Pellet mit Medium resuspendiert und die Zellen ausgesät.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen geerntet und in FACS-Puffer resuspendiert.

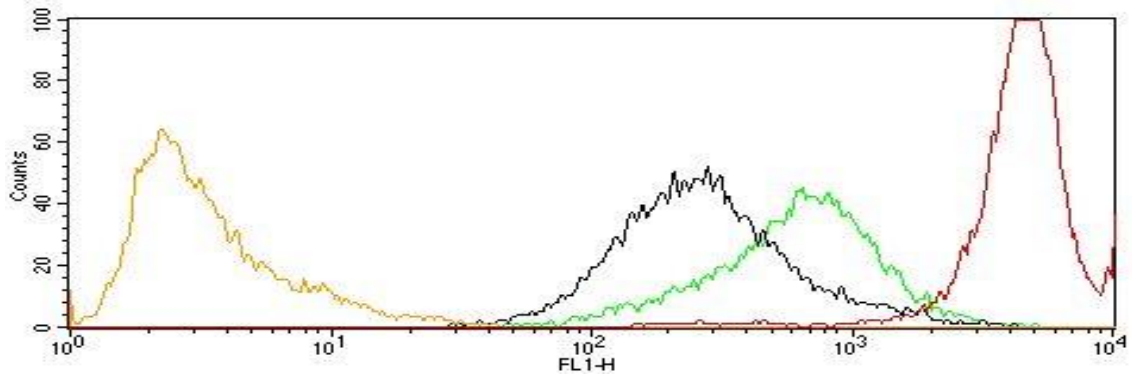


Abbildung 3: Histogrammdarstellung einer CFSE-Färbung im FACS. Rot = Farbintensität der Zellen direkt nach der Färbung, grün/schwarz/orange = Farbintensität der Zellen im Verlauf, FL1-H gibt die Fluoreszenzintensität an.

Zur Bestimmung der Proliferation wird der geometrische Mittelwert (Geo-Mean-Wert), der die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen abbildet, verwendet. Der Geo-Mean von unbehandelten Zellen wird als 100 % definiert. Die Proliferationshemmung berechnet sich dann wie folgt:

$$100 - \left[\frac{\text{Geo-Mean}(\text{unbehandelt})}{\text{Geo-Mean}(\text{behandelt})} * 100 \right]$$

2.2.3.3. Durchflusszytometrische Quantifizierung von PSMA

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der PSMA-Expression wurde der Inside Stain Kit (Miltenyi) nach Herstellerangabe verwendet sowie ein unkonjugierter Maus-anti-hPSMA (Primärantikörper) und ein anti-Maus-AlexaFluor488 Antikörper (Sekundärantikörper). In der Regel wurden Zellen aus für [⁶⁸Ga]PSMA-Bindungsstudien (s.u.) vorbereiteten Kulturen verwendet, um eine direkte Korrelation der PSMA-Expression und Tracer-Bindung zu ermöglichen. Es wurde immer zwei Negativkontrollen mitgeführt: (i) eine ungefärbte Probe und (ii) eine nur mit dem Sekundärantikörper gefärbte Probe, um einen „Hintergrundwert“ bzw. eine Kontrolle für eine mögliche unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu haben.

Die Zellen wurden geerntet, zwei Mal mit MACS-Puffer gewaschen (400 xg, 4 Min.), in 250 µl MACS-Puffer aufgenommen und durch Zugabe von 250 µl Inside-Fix (20 Min., RT) fixiert. Nach erfolgter Fixierung wurden die Zellen mit 1

ml MACS-Puffer gewaschen (400 xg, 4 Min.) und anschließend mit 1 µl anti-PSMA-AK/100 µl Inside-Perm für 15 Min. bei Raumtemperatur (im Dunkeln) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 ml Inside-Perm (400 xg, 4 Min.) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:2000 in 100 µl Inside-Perm) für 15 Min. bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Abschließend wurde mit 1ml Inside-Perm gewaschen (400 xg, 4 Min.) und das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte im FL-1 Kanal, zur Auswertung wurde der Geo-Mean herangezogen.

2.2.4. Aufnahme bzw. Bindung der Radiotracer

Um die Aufnahme ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{Cholin}$) beziehungsweise Bindung ($[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA}$) von Radiotracern durch/an Zellen zu quantifizieren, wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen/T25-Flasche oder $6 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät, für 24 h inkubiert und anschließend mit der jeweiligen IC50 für Docetaxel behandelt oder unbehandelt gelassen.

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und in PBS ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -, $[^{18}\text{F}]\text{Cholin}$ -Uptake) oder Medium/5 % BSA ($[^{68}\text{Ga}]\text{PSMA}$ -Bindung) aufgenommen.

200.000 Zellen in 500 µl PBS oder Medium/5 % BSA wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, pro Messzeitpunkt wurden Triplikate angefertigt. Die zu den Proben zugegebene Aktivitätsmenge an Radiotracer betrug ca. 10^6 Zerfälle/Min. in 50 µl PBS bzw. Medium/5 % BSA. Als Referenzwert wurde ein Triplikat welches nur Tracer (keine Zellen) enthielt mitgeführt. Die Proben wurden für 60 Min. bei 37 °C inkubiert.

Um den Tracer-Uptake bzw. die Tracer-Bindung zu stoppen, wurden die Proben anschließend für 2 Min. auf Eis gestellt und zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen (1500 xg, 2 Min., 4 °C).

Abschließend wurde die im Zellpellet gespeicherte bzw. gebundene Radioaktivität im Gammazähler gemessen. Dieser führte automatisch eine Korrektur für Hintergrund und Halbwertszeit durch. Zur Auswertung wurden dann die Mittelwerte der gemessenen Triplikate verwendet und in Relation zum Referenzwert, also der initial zugegebenen Aktivität, gesetzt.

$$\text{Aufnahme bzw. Bindung (\%)} = \frac{\text{Uptake (Zellpellet)}}{\text{Uptake (Referenzwert)}} * 100$$

2.2.5. Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1. RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA wurde das QIAshredder-Kit und das RNeasy-Kit von Qiagen nach Herstellerangabe verwendet.

Im ersten Schritt wurden die Zellen geerntet, das Zellpellet mit 350 µl RLT-Puffer resuspendiert, zum Zellaufschluss in ein QIAshredder Gefäß überführt und bei 8000 xg für 3 Min. zentrifugiert. Die resultierende Zellsuspension wurde anschließend mit 350 µl 70 % Ethanol gemischt und über die Säule eines RNeasy-Gefäß zentrifugiert (8000 xg für 15 Sek.), damit die RNA an die Säule bindet. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde die abzentrifugierte Lösung verworfen und nur die Säule weiterverwendet. Die Säule wurde dann mit 350 µl RW-Puffer gewaschen und bei 8000 xg 15 Sek. zentrifugiert. Die Entfernung von genomischer DNA erfolgte durch Inkubation mit 10 µl DNase/70 µl RD-Puffer (beides aus RNase-free DNase-Kit) für 15 Min. bei Raumtemperatur. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 350 µl RW-Puffer. Anschließend wurde 500 µl RLP-Puffer auf die Säule gegeben und bei 8000 xg für 15 Sek. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, jedoch wurde diesmal für 2 Min. zentrifugiert. Zur Lösung der RNA aus der Säule wurde abschließend die Säule in ein neues Gefäß überführt, mit ca. 30-40 µl RNase-freiem Wasser versetzt und durch Zentrifugation (8000 xg, 1 Min.) eluiert. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung des RNA-Gehalts wurde das Qubit RNA BR Assay Kit nach Herstellerangabe verwendet. Zur Kalibrierung des Qubit Fluorometers wurden zwei Standards verwendet, von denen 10 µl mit 190 µl Arbeitslösung verdünnt wurde. Anschließend wurde 1 µl der zu messenden Probe mit 199 µl der Arbeitslösung verdünnt und im Programm RNA BR Assay gemessen.

2.2.5.2. cDNA-Synthese

Für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) wurden stets 500 ng RNA mit dem Omniscript-Kit (Qiagen) nach Herstellerangabe umgeschrieben. Es wurde ein Mastermix mit folgenden Komponenten hergestellt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese

Mastermix	Volumen
10x Puffer RT	2 µl
dNTP Mix (5 mM von jedem dNTP)	2 µl
Oligo-dT Primer (10 µM)	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNase freies Wasser	variabel, je nach RNA-Template-Menge
Gesamtvolumen	20 µl

Die RNA wurde vorgelegt und anschließend der Mastermix zugegeben und die Reaktionsgefäße im Flexcycler bei 37 °C für 60 Min. inkubiert. Gelagert wurde die fertige cDNA bei -80 °C.

2.2.5.3. Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative real-time PCR ermöglicht es in Echtzeit die Vervielfältigung der cDNA-Transkripte durch ein Fluoreszenzsignal zu messen. Zur Erzeugung dieses Signals wird meist der Farbstoff SYBR Green verwendet, welcher an doppelsträngige DNA bindet und von speziellen Detektoren gemessen wird.

Für die quantitative real-time PCR wurden jeweils Triplikate hergestellt. Um Kontaminationen in Mastermix oder Wasser auszuschließen wurde stets eine

Leerprobe (Triplikate) mit Wasser mitgeführt. Zur Normalisierung wurden Primer für ein „Housekeeping-Gen“ (β -Aktin) verwendet.

Pro Ansatz wurde die cDNA (aus 500 ng mRNA) 1:20 in einem Gesamtvolumen von 2,5 μ l verdünnt und in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Es wurde der Mastermix (SensiMix, Wasser, Primer) zugegeben und die Proben anschließend in die PCR-Maschine RotorGene gestellt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung eines Versuchsansatzes für qPCR

	Endkonzentration	Volumen
2x SensiMix Mastermix	1x	12,5 μ l
Wasser		9,37 μ l
Primer (10 μ M)	250 nM	0,63 μ l
Gesamtvolumen		22,5 μl

Das Programm startete mit einer Aktivierung von 10 Min. bei 95 °C, danach folgten 40 Zyklen mit folgender Abfolge:

Denaturierung 15 Sek.	95 °C
Annealing 15 Sek.	55 °C
Elongation 15 Sek.	72 °C

Nach Beendigung des letzten Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird die Temperatur konstant mit einer Heizrate von 0,1 °C/Sek. von 72 °C auf 95 °C erhöht und es werden die Schmelzpunkte der Primer ermittelt.

Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der Schwellenwertzyklus (C_t -Wert) verwendet. Der C_t -Wert beschreibt den Wert in der Kurve, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

Zuerst wurde eine Normalisierung durchgeführt. Dazu wurde der ΔC_t -Wert aus

dem C_t -Wert des Housekeeping-Gens (HKG) und dem C_t -Wert des untersuchten Gens (GI) mit folgendem Schema gebildet:

$$\Delta ct = ct(HKG) - ct(GI)$$

Dieser normalisierte Wert ist wichtig, da er die Werte verschiedener Proben untereinander vergleichbar macht.

Für die weitere Auswertung wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Dabei wird eine Differenz zwischen dem ΔC_t -Wert der unbehandelten und dem der behandelten Proben gebildet:

$$\Delta\Delta ct = \Delta ct(unbehandelt) - \Delta ct(behandelt)$$

Differenzen in der Expressionsstärke des Zielgens, z.B. aufgrund eines Knockdowns, werden durch Logarithmieren des $\Delta\Delta C_t$ -Werts zur Basis 2 ermittelt.

$$2^{(-\Delta\Delta ct)} = n\text{-fache Expression}$$

Aus der Kontrollgruppe gewonnene Werte zum Genexpressionslevel werden gleich 1 gesetzt. Damit ergibt ein Wert < 1 eine Verminderung und ein Wert > 1 eine Erhöhung der Genexpression in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

2.2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1. Proteinisolation

Zum spezifischen Nachweis des PSMA-Proteins wurden Zelllysate hergestellt. Dazu wurden mindestens $5 \cdot 10^5$ Zellen verwendet und zwei Mal mit PBS gewaschen (1000 xg, 4 Min.). Das Pellet wurde mit 50 μ l RIPA-Puffer resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 Min. bei 8000 xg zentrifugiert und der Überstand als Lysat direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. Für die Protein-Auftrennung mittels SDS-PAGE

wurden die Lysate mit 2x Lämmli Puffer im Verhältnis 1:1 für 5 Min. bei 95 °C aufgeköcht.

2.2.6.2. Bestimmung der Proteinmenge

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde das BCA Protein Assay Kit verwendet.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe von 0-25-125-250-500-1000 µg/ml BSA (Stammlösung 2 mg/ml) angefertigt. Die zu messenden Proben wurden in PBS verdünnt (1:60 – 1:100). Anschließend wurden 25 µl dieser Verdünnungen in eine 96-Lochplatte pipettiert und 200 µl der BCA Arbeitslösung (200 µl BCA Lösung + 4 µl Kupfersulfat) zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde die Platte für 30 Min. bei 37 °C inkubiert und schließlich die Extinktion photometrisch im Mikroplattenleser bei 562 nm gemessen. Mithilfe der Standardgeraden konnte nun die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.6.3. SDS-Page und Western-Blot

Für die Auftrennung im SDS-Gel wurden 10 - 20 µg Proteinlysate verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Lysat in einem 10 % SDS-Gel bei 90 V im Sammelgel und 130 V im Laufgel in der Elektrophoresekammer im Laufpuffer aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (nasser Transfer). Dazu wurde ein „Sandwich“ in folgender Reihenfolge gebildet:

Schwamm | Blotting-Papier | Nitrocellulosemembran | SDS-Gel | Blotting-Papier
| Schwamm

Der Transfer geschah bei 80 V für 60 Min. bei gleichzeitiger Kühlung im Transfertank mit Transferpuffer. Nach erfolgtem Transfer wurde mit einer Ponceau-S Färbung (Ponceau-S für 5 Min auf die Membran gegeben, anschließend Entfärbung mit TBS) die Proteinauftrennung sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Darauf folgte die Blockade der unspezifischen Bindestellen der Membran mit 5 % Magermilch in TBS-T für eine Stunde auf dem Taumelrollmischer. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-PSMA, ab19071) wurde in einer Verdünnung von 1:1500 in Magermilch über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelrollmischer durchgeführt. Nach Waschen der Membran mit TBS-T (0,1 %) für 3x 5 Min. erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus HRP) in einer Verdünnung von 1:2000 in Magermilch für 1h auf dem Taumelrollmischer. Anschließend wurde 4x 5 Min. mit TBS-T (0,1 %) gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran eine Min. in ECL-Lösung gelegt und von Hand leicht geschüttelt. Die feuchte Membran wurde dann in eine Kassette zwischen zwei Plastikfolien gelegt. Die Auswertung folgte mittels Fotodetektion in der Dunkelkammer. Dazu wurde im Dunkeln ein Film auf die Membran in der Kassette aufgelegt und diese fest verschlossen. Nach erfolgter Belichtung wurde der Film in der Entwicklermaschine entwickelt.

2.2.7. Statistische Datenauswertung und Erstellung der Graphiken

Für die statistische Datenauswertung sowie die Erstellung der Diagramme wurde das Programm Origin verwendet.

Die Traceraufnahme/-bindungsversuche bestanden aus Triplikaten (in Ausnahme: Duplikaten), aus denen für einen Versuchstag der Mittelwert gebildet wurde. Anschließend wurden diese Werte miteinander verglichen und mittels eines Mann-Whitney-U Tests auf Signifikanz überprüft. Das gilt auch für den Vergleich der PSMA-Expression. Im Ergebnisteil werden, soweit nicht anders angegeben, jeweils der Median mit dem höchsten und niedrigsten Wert angegeben.

Für die Korrelationsversuche wurde die Korrelation mittels der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman überprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleichende Betrachtung androgenabhängiger und androgenunabhängiger Prostatakarzinomzelllinien

3.1.1. Charakteristika der verwendeten Zelllinien

Für den Vergleich androgenabhängiger und androgenunabhängiger Prostatakarzinomzelllinien, hinsichtlich der Expression von PSMA und Bildgebungscharakteristika, wurden die Zelllinien LNCaP und die sub-Linie LNCaP C4-2 ausgewählt. Für einige Untersuchungen wurden zudem PC-3 Zellen als PSMA-negative Vergleichszellen verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Charakteristika der verwendeten Prostatakarzinomzelllinien

	LNCaP	LNCaP C4-2	PC-3
Art	Adenokarzinom [125]	Adenokarzinom	kleinzelliges neuroendokrines Karzinom [125]
Ursprung	Lymphknotenmetastase [40]	sub-Linie von LNCaP [140]	Knochenmetastase [53]
Androgenrezeptor	+ [40, 132]	+ (vermindert im Vgl. zu LNCaP) [140]	- [53, 132]
Androgensensitivität	sensitiv [40, 41]	unabhängig [140]	unabhängig [53]
PSMA-Expression	+ [46]	+ (evtl. etwas vermindert) [133]	- [46]
PSA	+ [132]	+ [140]	- [132]
Kanzerogenität	niedrig [140]	mittel [140]	hoch [53]
funktionelles p53	+ (Wildtyp) [47]	+ (Wildtyp) [47]	- [47]

3.1.2. Ermittlung der mittleren letalen bzw. inhibitorischen Konzentration von Docetaxel

Zur Ermittlung der optimalen Behandlungsdosis für die Zellen mit Docetaxel, wurde eine Konzentration ermittelt, bei der 50 % der Zellen abstarben (mittlere letale Dosis, LD50).

Dafür wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve für LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen erstellt. Eine Behandlung der Zellen für 48 Stunden mit 100 μM (LNCaP) und 125 μM (LNCaP C4-2) Docetaxel führte zu einer Abnahme der Viabilität um 50 % (Abbildung 4).

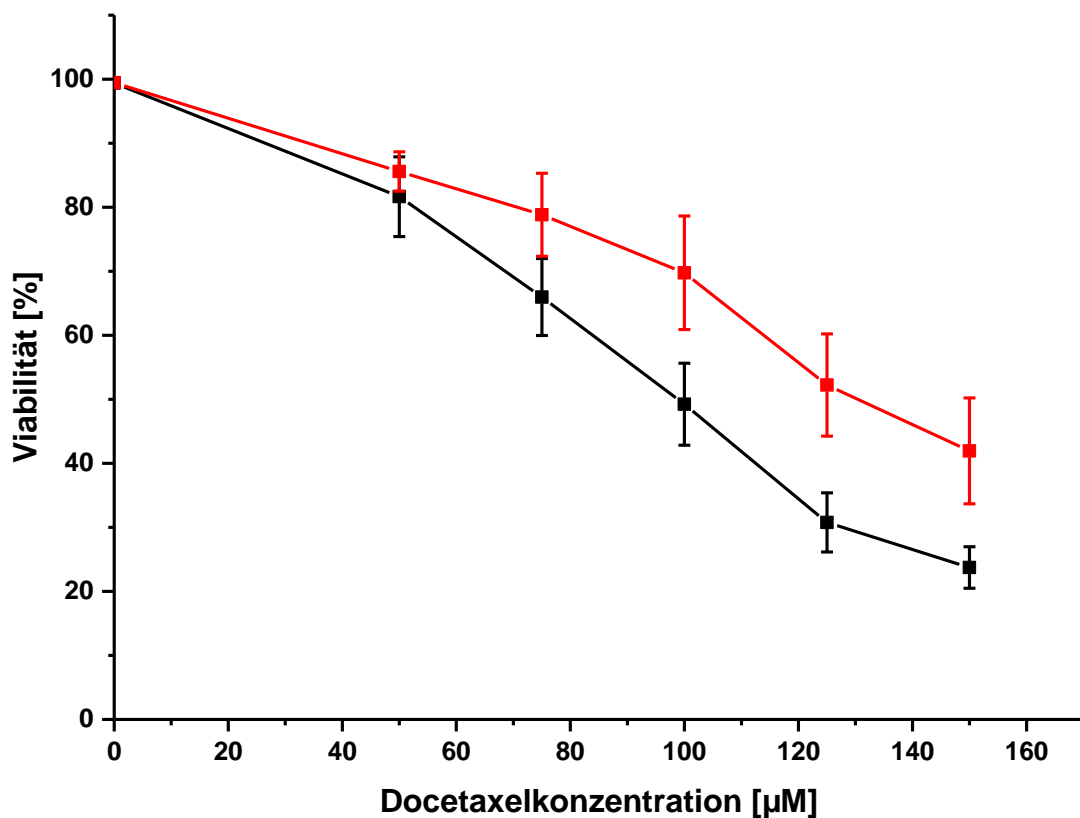


Abbildung 4: Reduktion der Viabilität von LNCaP (schwarz) und LNCaP C4-2 (rot) Zellen nach Docetaxelbehandlung. Der Prozentsatz lebender/toter Zellen wurden mittels Nicoletti-Assay nach 48 h Docetaxelbehandlung erhoben; Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=5

Mikroskopisch zeigten sich jedoch bei diesen Docetaxelkonzentrationen morphologisch veränderte Zellen sowie eine Zellverklumpung. Ab einer Konzentration von 150 μM war die Löslichkeit für Docetaxel überschritten und

es fiel aus der Lösung aus.

Docetaxel bindet während der Mitose an Mikrotubuli und verhindert deren Depolymerisierung, sodass die Zelle zunächst nur im Zellzyklus arretiert und erst im Anschluss in die Apoptose geht. Aufgrund der oben genannten Ergebnisse und des Wirkmechanismus, wurde daher die Docetaxelkonzentration, die zu einer Reduktion der Proliferationsrate um 50 % führt, ermittelt. Für LNCaP Zellen lag die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) bei 15 nM und für LNCaP C4-2 Zellen bei 20 nM (Abbildung 5). Diese Werte bildeten die Grundlage für alle weiteren Experimente in denen Docetaxel verwendet wurde.

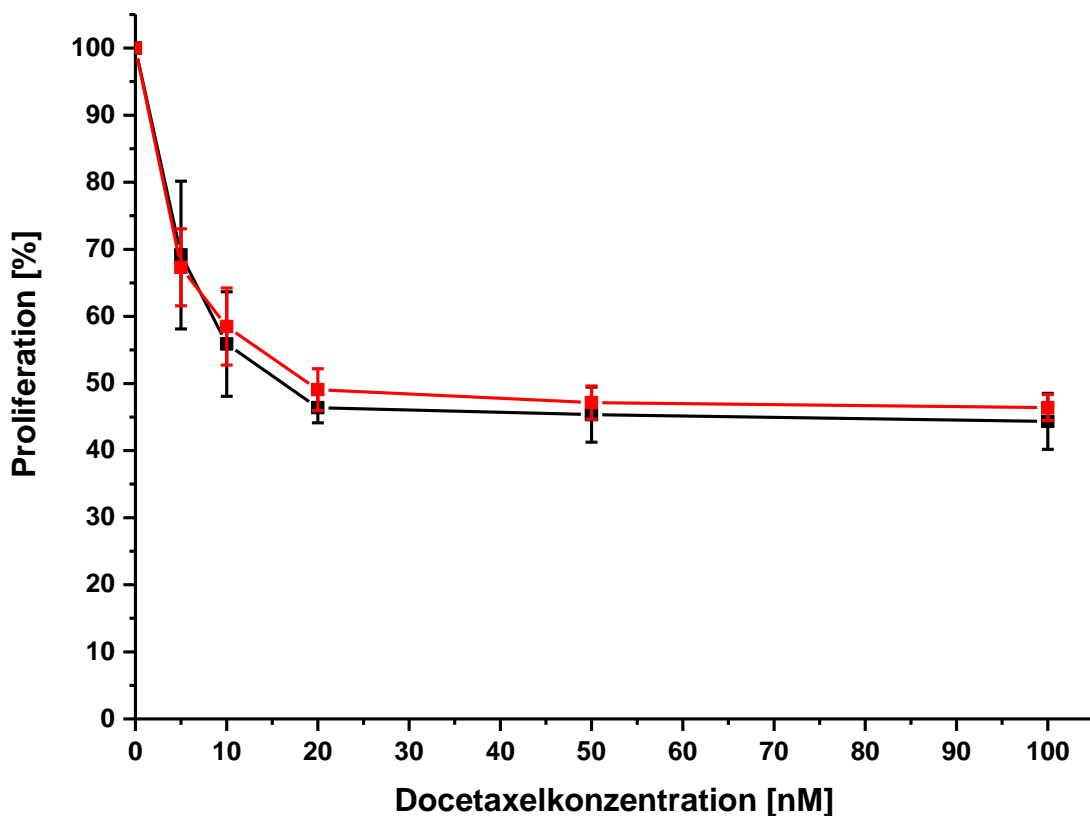


Abbildung 5: Reduktion der Proliferation von LNCaP (schwarz) und LNCaP C4-2 (rot) Zellen nach Docetaxelbehandlung. Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde mittels CFSE-Assay nach 48 h Docetaxelbehandlung ermittelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=5

3.1.3. PSMA-Expression und deren Modulation durch Behandlung mit Docetaxel in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen

Die Expression von PSMA und eine Modulation der PSMA-Expressionsstärke durch Docetaxel wurden mittels Western-Blot und genauer mittels Durchflusszytometrie untersucht (zytoplasmatisches und membranständiges Vorkommen). Zur Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten PSMA-Expression wurde eine Kastengrafikdarstellung gewählt. Diese zeigt den Medianwert als mittleren Strich des Kastens. Dieser definiert sich durch die 25. und 75. Perzentile und stellt in seiner Höhe 50 % der Messwerte dar. Der 1,5-fache Interquartilabstand wird durch Antennen dargestellt, während die Ausreißer als Raute zu sehen sind. Die angegebenen Messwerte stellen jeweils den Medianwert und den zugehörigen Bereich dar.

Während die mit Western-Blot bestimmte PSMA-Gesamtproteinmenge der beiden Zelllinien ähnlich war (Abbildung 6), zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine tendenziell höhere PSMA-Expression in LNCaP Zellen (**11,52** (4,49 – 23,02) [MFI] vs. **7,4** (2,83 – 22,96) [MFI] in LNCaP C4-2, p = n.s.) (Abbildung 7).

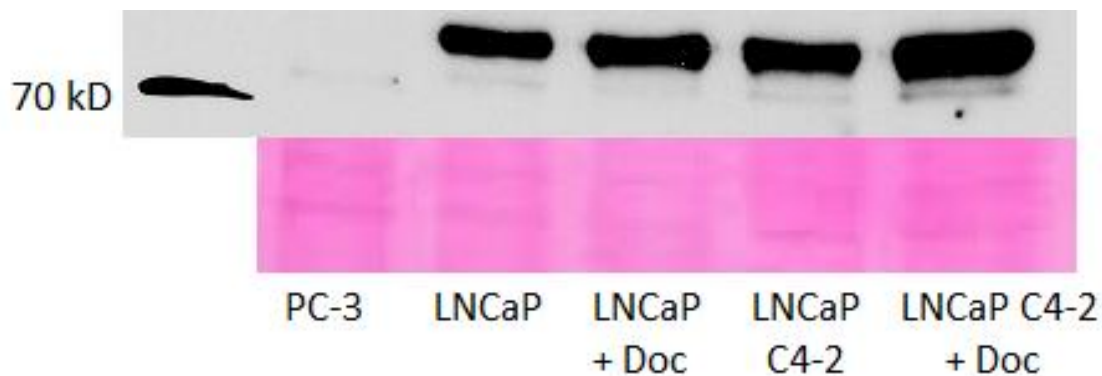


Abbildung 6: exemplarische Darstellung (1 von 3) der Expression von PSMA in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit (+) und ohne Docetaxelbehandlung (PC-3 Zellen dienen als Negativkontrolle) im Western-Blot; die Ponceau-S Färbung (zweite Reihe) färbt Proteine reversibel an und ermöglicht einen Proteinmengenabgleich, hier zeigt die Ponceau-S Färbung gleiche Proteinmengen

Eine Behandlung mit Docetaxel (48 Stunden) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die PSMA-Expression (Abbildung 7). (Die PSMA-Gesamtproteinmenge

schien bei den LNCaP C4-2 nach Behandlung im Western-Blot jedoch leicht erhöht (Abbildung 6).)

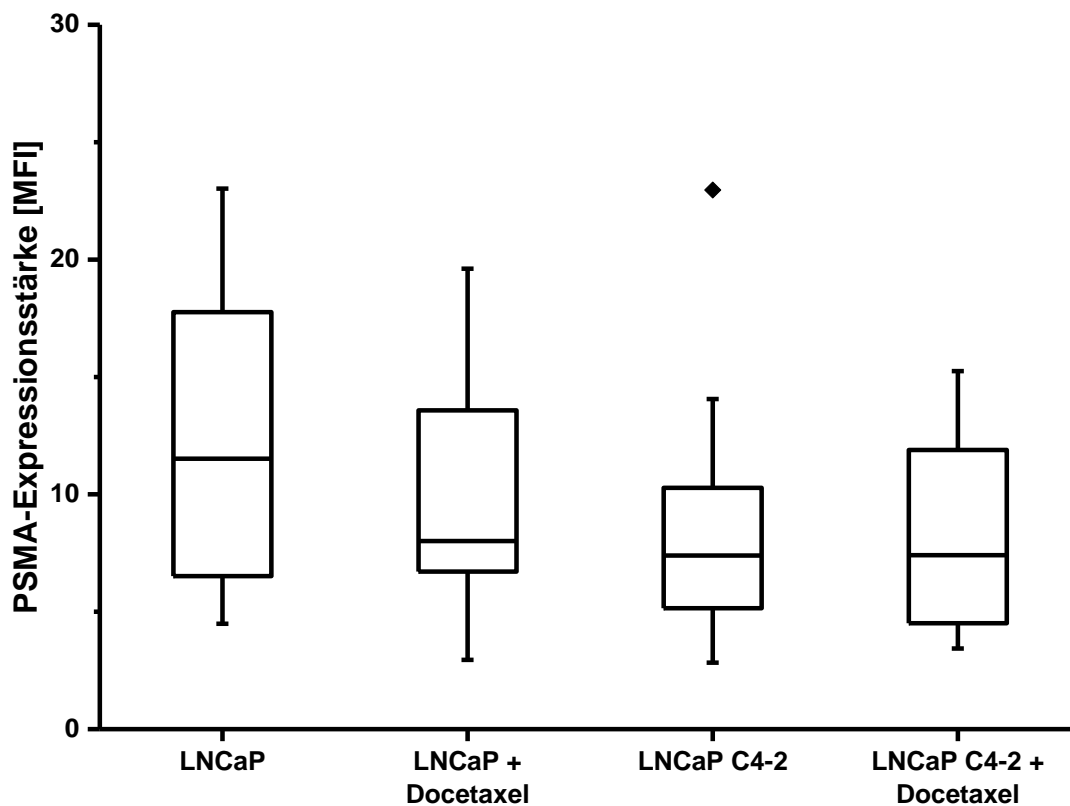


Abbildung 7: Kastengrafikdarstellung der Quantifizierung der PSMA-Expression mittels Durchflusszytometrie in LNCaP (n=16), LNCaP mit Docetaxel (n=11), LNCaP C4-2 (n=17) und LNCaP C4-2 mit Docetaxel (n=11)

3.1.4. Aufnahme von [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und Bindung von [⁶⁸Ga]PSMA I&T in/an androgenabhängige und androgenunabhängige Prostatakarzinomzellen in vitro

Für die graphische Darstellung der Aufnahme/Bindung der einzelnen Tracer wurden Kastengrafiken verwendet. Die angegebenen Messwerte stellen im Folgenden jeweils Medianwerte mit zugehörigem Bereich dar, eine Übersichtstabelle befindet sich im Anhang.

In den Versuchen wurde sowohl [¹⁸F]FDG, wie auch [¹⁸F]Cholin von LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen aufgenommen. In LNCaP Zellen zeigte sich eine deutlich höhere [¹⁸F]Cholin-Aufnahme im Vergleich zur [¹⁸F]FDG-Aufnahme (**9,76 %** (5,21 – 12,9) vs. **4,45 %** (2,55 – 6,23); p <0,01), während sich bei LNCaP C4-2

Zellen kein Unterschied zeigte (**7,64 %** (5,04 – 13,08) vs. **7,29 %** (5,33 – 11,7); $p = \text{n.s.}$) (Abbildung 8).

Im Vergleich der Zelllinien untereinander nahmen LNCaP C4-2 Zellen ca. 50 % mehr [^{18}F]FDG auf, als LNCaP Zellen ($p < 0,01$). Die Aufnahme von [^{18}F]Cholin unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 8).

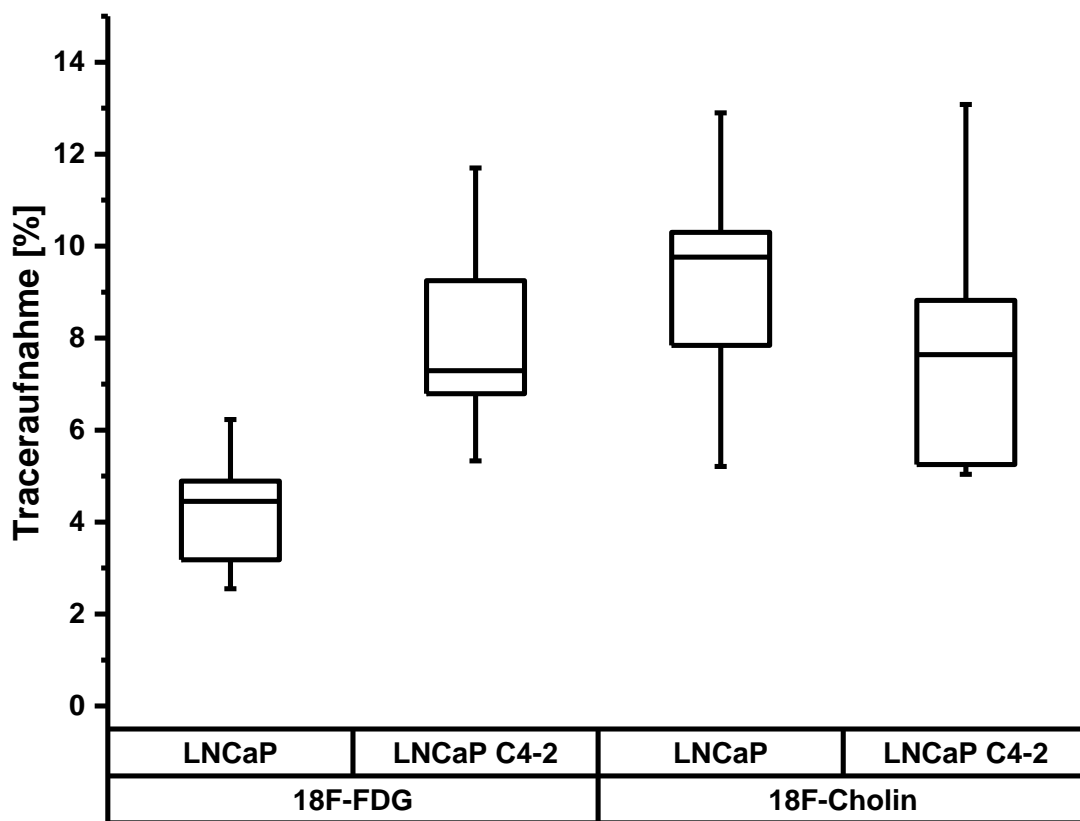


Abbildung 8: Kastengrafikdarstellung der [^{18}F]FDG- und [^{18}F]Cholin-Aufnahme in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen. Dargestellt wird die relative Aufnahme des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.

Im Gegensatz zu den metabolischen Tracern ([^{18}F]FDG, [^{18}F]Cholin), die über entsprechende Transporter in die Zelle eingeschleust werden, bindet der [^{68}Ga]PSMA-Tracer an PSMA auf der Zelloberfläche. Die metabolischen Tracer werden deshalb in einem höheren Messbereich gemessen als [^{68}Ga]PSMA.

Entsprechend der im Western-Blot und Durchflusszytometrie nachgewiesenen PSMA-Expression, wurde der [^{68}Ga]PSMA-Tracer sowohl von LNCaP als auch von LNCaP C4-2 gebunden. Im Einklang mit der tendenziell höheren Expressionsstärke von PSMA in LNCaP Zellen, zeigte sich eine signifikant

höhere Tracer-Bindung durch LNCaP Zellen im Vergleich zu LNCaP C4-2 Zellen (**0,9 %** (0,65 – 1,5) vs. **0,74 %** (0,35 – 1,15); $p < 0,04$) (Abbildung 9).

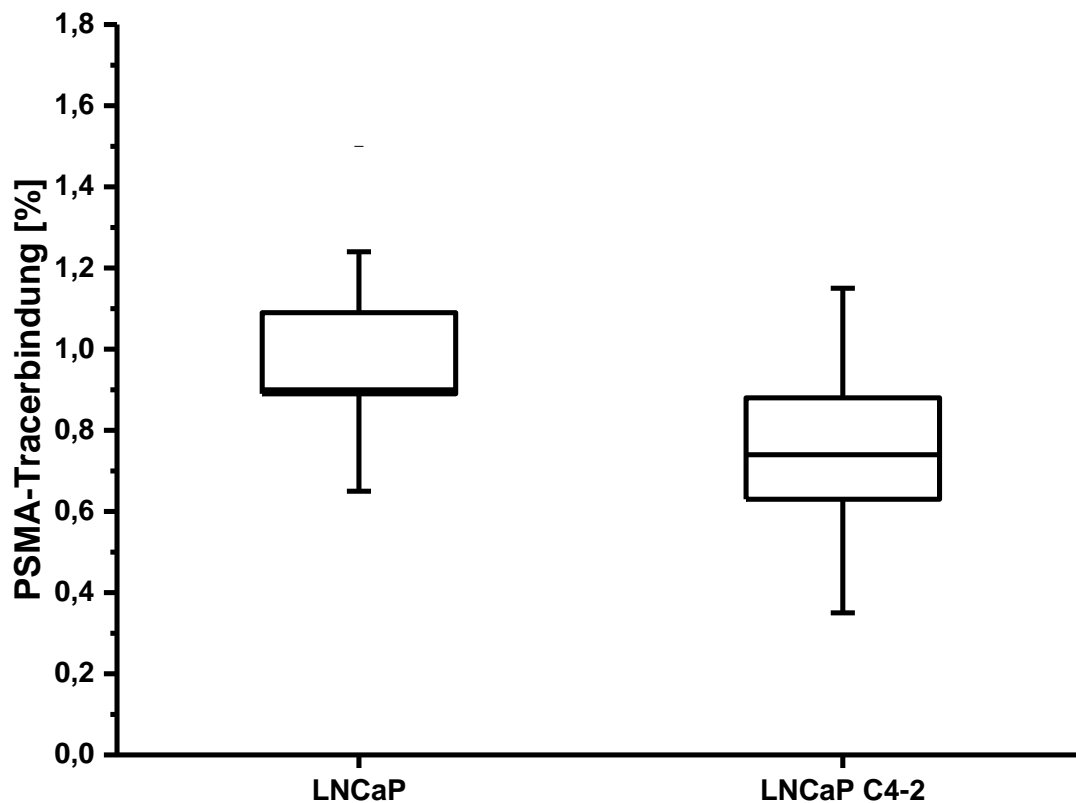


Abbildung 9: Kastengrafikdarstellung der $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA-Tracerbindung an LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen. Dargestellt wird die relative Bindung des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.

3.1.5. Aufnahme von $[^{18}\text{F}]$ FDG, $[^{18}\text{F}]$ Cholin und Bindung von $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA I&T nach Behandlung der Zelllinien LNCaP und LNCaP C4-2 mit Docetaxel

Die Eignung von $[^{18}\text{F}]$ FDG, $[^{18}\text{F}]$ Cholin und dem $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA-Tracer zur Beurteilung eines Therapieansprechens bei Docetaxelgabe wurde untersucht. Dazu wurden jeweils LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit Docetaxel behandelt oder unbehandelt gelassen und anschließend die Traceraufnahme gemessen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der $[^{18}\text{F}]$ FDG-Aufnahme in LNCaP Zellen um 40 % (**4,45 %** (2,55 – 6,23) vs. **2,65 %** (1,65 – 4,5); $p < 0,03$) bzw. 52% in LNCaP C4-2 Zellen (**7,29 %** (5,33 – 11,7) vs. **3,48 %** (1,5 – 6,42); $p < 0,01$) nach Behandlung mit Docetaxel (Abbildung 10).

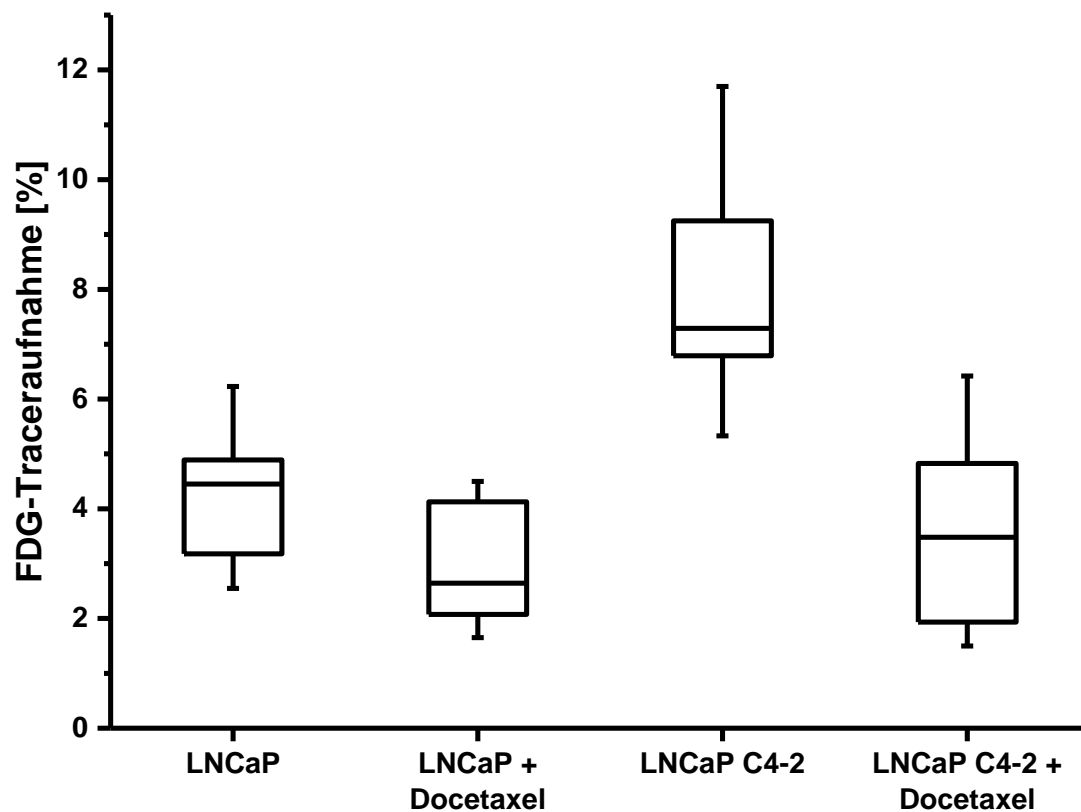


Abbildung 10: Kastengrafikdarstellung der [¹⁸F]FDG-Aufnahme in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit und ohne Docetaxelbehandlung. Dargestellt wird die relative Aufnahme des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.

Die [¹⁸F]Cholin-Aufnahme (Abbildung 11) war nach Docetaxelbehandlung in LNCaP Zellen um ca. 44 % vermindert (**9,76 %** (5,21 – 12,9) vs. **5,44 %** (3,59 – 8,57); $p < 0,03$). In LNCaP C4-2 Zellen war sie sogar um ca. 62 % reduziert (**7,64 %** (5,04 – 13,08) vs. **2,88 %** (0,15 – 6,88); $p < 0,01$).

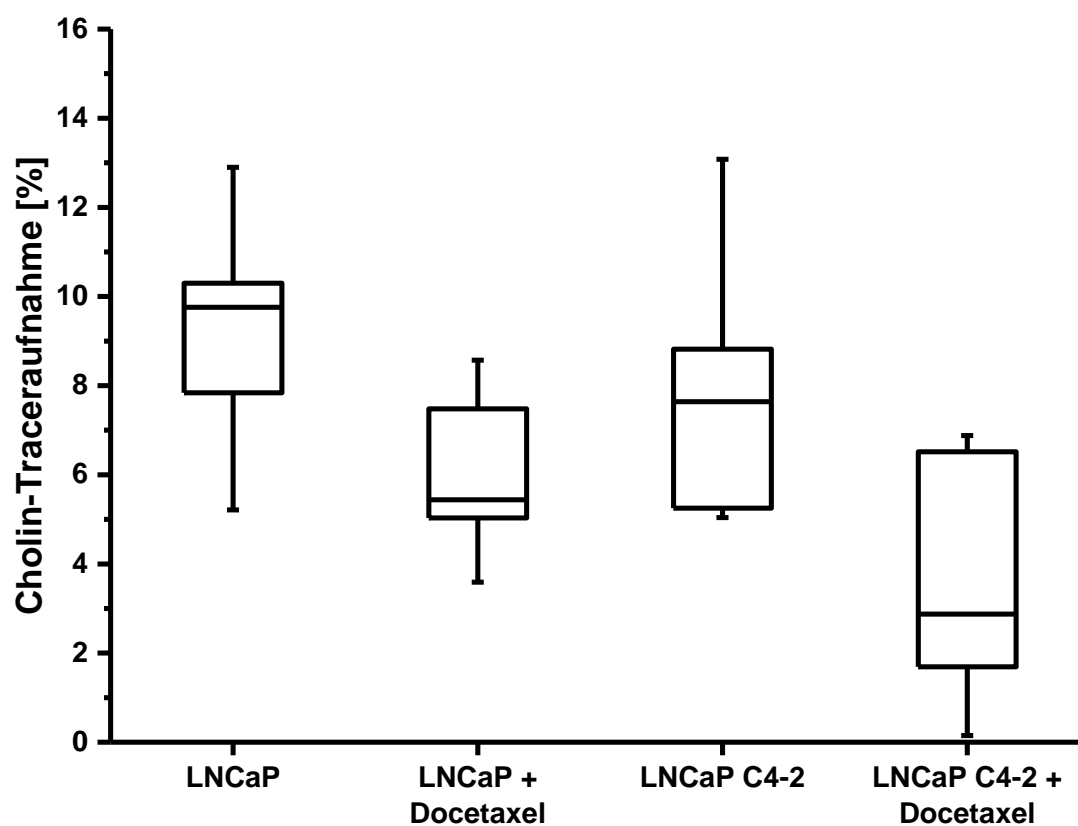


Abbildung 11: Kastengrafikdarstellung der [¹⁸F]Cholin-Aufnahme in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit und ohne Docetaxelbehandlung. Dargestellt wird die relative Aufnahme des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.

Es zeigte sich weder bei LNCaP Zellen (**0,9 %** (0,65 – 1,5) vs. **1,12 %** (0,78 – 1,51; p = n.s.), noch bei LNCaP C4-2 Zellen (**0,74 %** (0,35 – 1,15) vs. **0,82 %** (0,57 – 0,83); p = n.s.) ein signifikanter Unterschied in der Bindung des [⁶⁸Ga]PSMA-Tracers nach Docetaxelbehandlung (Abbildung 12).

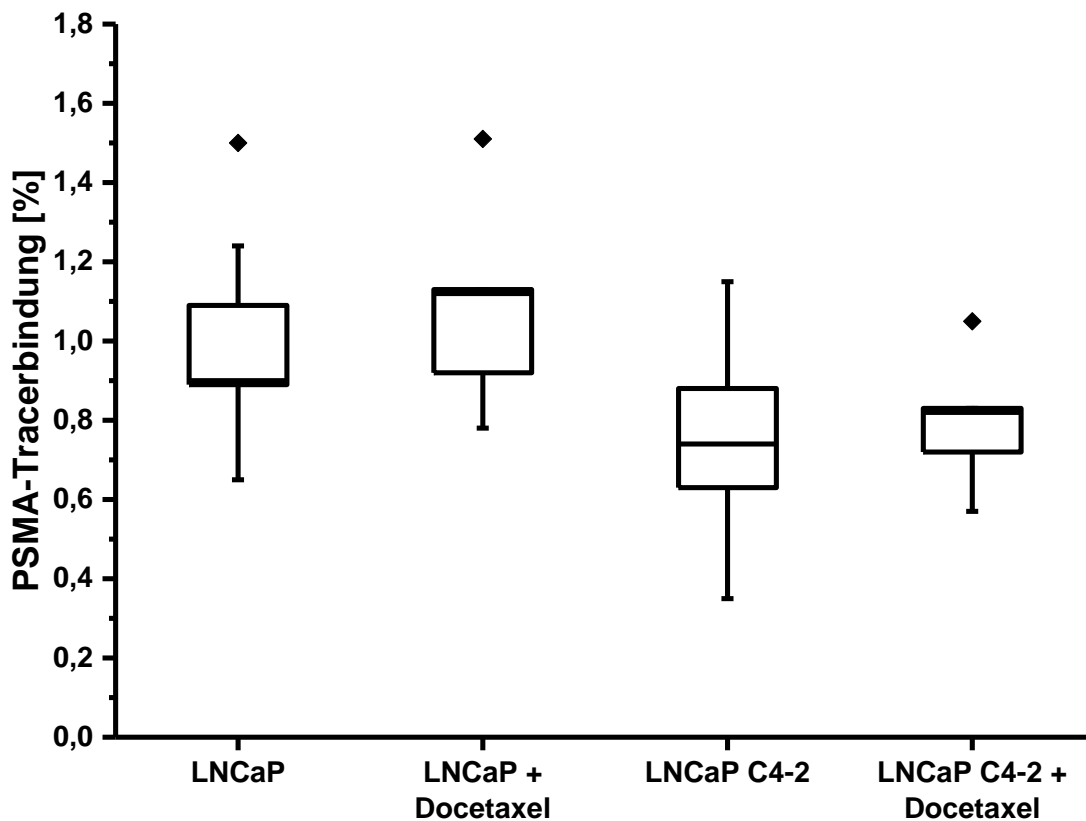


Abbildung 12: Kastengrafikdarstellung der $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA-Tracer-Bindung in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit und ohne Docetaxelbehandlung. Dargestellt wird die relative Bindung des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.

3.1.6. Korrelation der $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA I&T-Bindung mit der PSMA-Expression

Bei der Überprüfung der Spezifität des $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA-Tracers wurde die durchflusszytometrisch quantifizierte Expression von PSMA mit der prozentualen Tracer-Bindung korreliert. Hierbei zeigte sich eine positive Korrelation bei LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen: eine höhere $[^{68}\text{Ga}]$ PSMA-Bindung ging mit einer höheren PSMA-Expressionsintensität einher (LNCaP: $r = 0,89$, $p = 0,02$; LNCaP C4-2: $r = 0,90$, $p = 0,04$) (Abbildung 13).

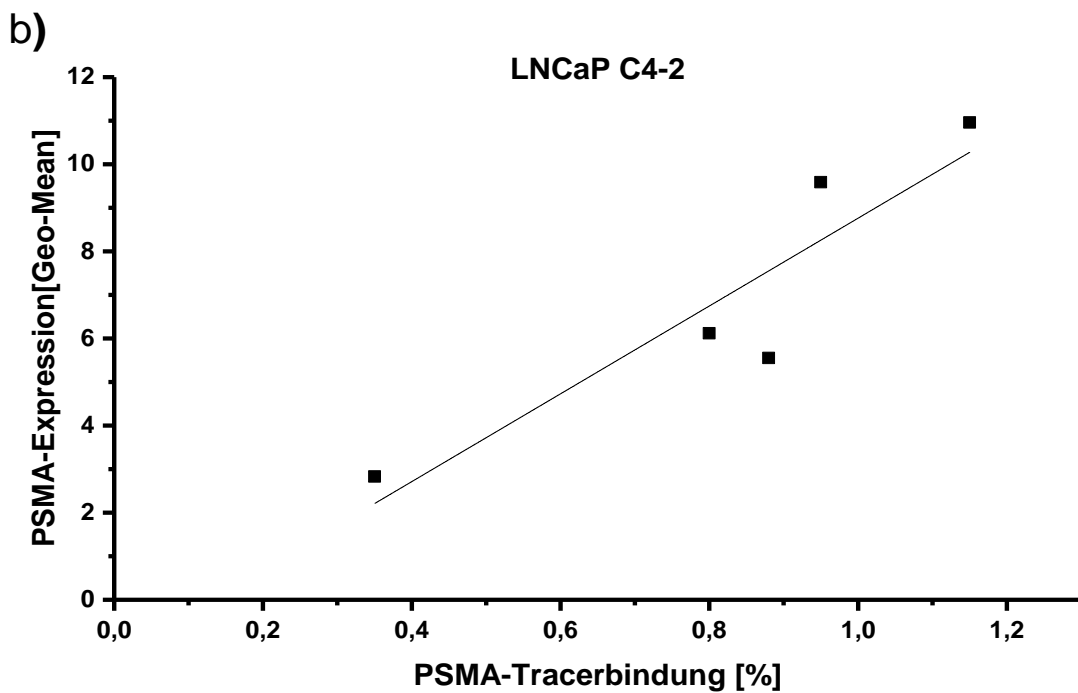
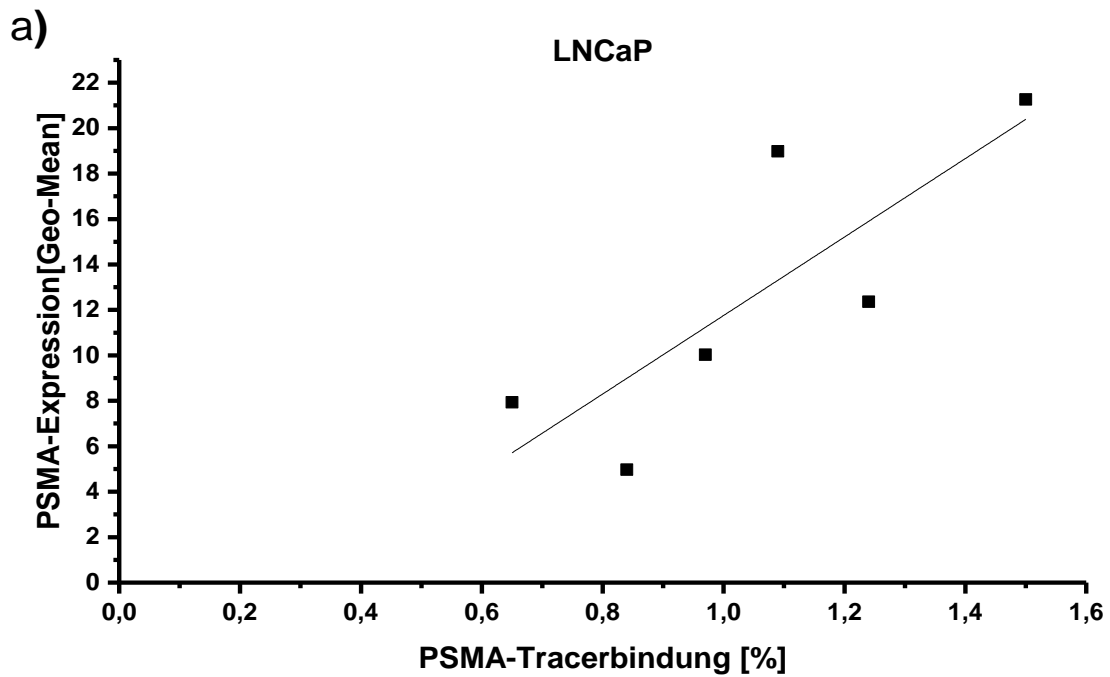


Abbildung 13 a+b: Auftragung der Korrelation der durchflusszytometrisch bestimmten PSMA-Expression (MFI/Geo-Mean) mit der relativen ^{68}Ga PSMA-Tracer-Bindung von LNCaP (10a; $r = 0,89$, $p = 0,02$) und LNCaP C4-2 Zellen (10b; $r = 0,90$, $p = 0,04$). Dargestellt wird die relative Bindung des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität. Korrelation (r) mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman überprüft

3.2. Einfluss der PSMA-Expression auf die Sensitivität von androgenabhängigen LNCaP-Zellen gegen Docetaxel

3.2.1. Etablierung eines PSMA Knockdown-Systems in LNCaP Zellen mittels siRNA

Um den Einfluss von PSMA auf die Sensitivität gegen Docetaxel in LNCaP Zellen zu untersuchen, wurde ein siRNA vermittelter, transients Knockdown etabliert.

In einem ersten Schritt wurde die Effizienz der siRNA Transfektion mittels einer fluoreszenzmarkierten Kontroll-siRNA überprüft. Die durchflusszytometrische Quantifizierung der Transfektionseffizienz ergab 80 % (Abbildung 14).

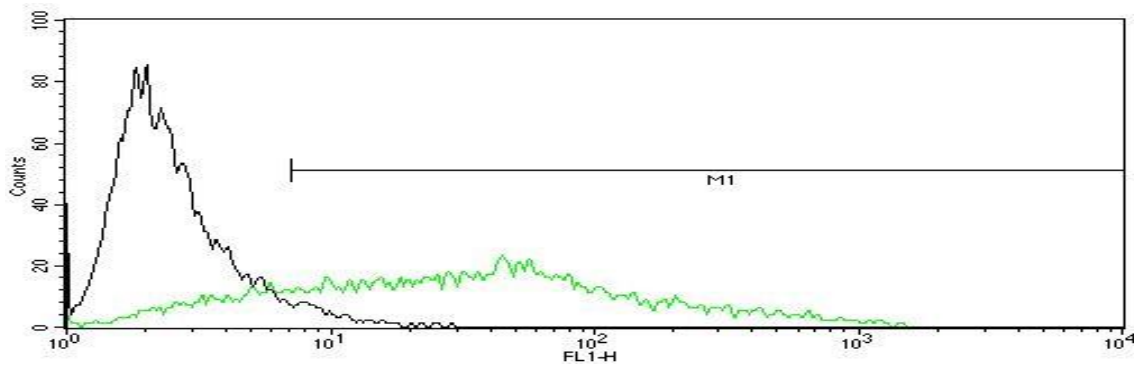


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Quantifizierung der mit fluoreszierender siRNA markierten Zellen, schwarze Kurve entspricht den unmarkierten Zellen, grün entspricht den mit Fluoreszenz markierten Zellen, der Marker M1 entspricht dem Anteil fluoreszierenden Zellen an allen Zellen und ist > 80 %, 1 von 1 gezeigt, die X-Achse gibt die Fluoreszenzintensität an

Im Weiteren wurde die siRNA vermittelte Reduktion der PSMA-mRNA mittels qPCR und die Reduktion der Protein-Menge mittels Western-Blot verifiziert. Auf Ebene der mRNA wurde eine Reduktion zwischen 56 % und 71 % erzielt.

Auf Proteinebene zeigte sich eine signifikante Verringerung der Expression des PSMA- Proteins (Abbildung 15).

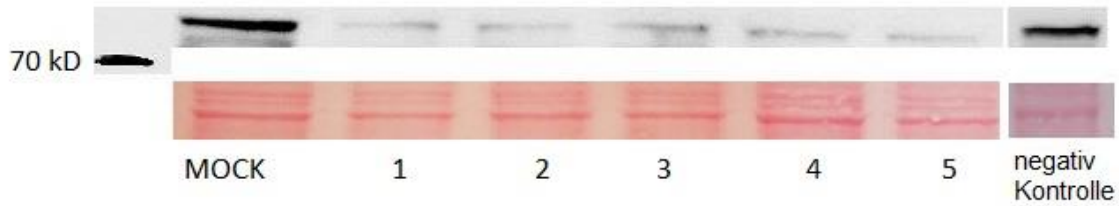


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung (5 von 8) des PSMA-Knockdown in LNCaP Zellen im Western-Blot. MOCK bezeichnet untransfizierte Zellen, Negativkontrolle wurde mit scrambled siRNA durchgeführt; die Ponceau-S Färbung (zweite Reihe) färbt Proteine reversibel an und ermöglicht einen Proteinmengenabgleich, hier zeigt die Ponceau-S Färbung gleiche Proteinmengen

3.2.2. Einfluss eines Knockdown von PSMA auf die Proliferation von LNCaP Zellen

Die Proliferationsrate von parentalen LNCaP Zellen wurde mit solchen nach PSMA Knockdown verglichen. Es zeigte sich, dass die Proliferation nicht beeinträchtigt war (Abbildung 16).

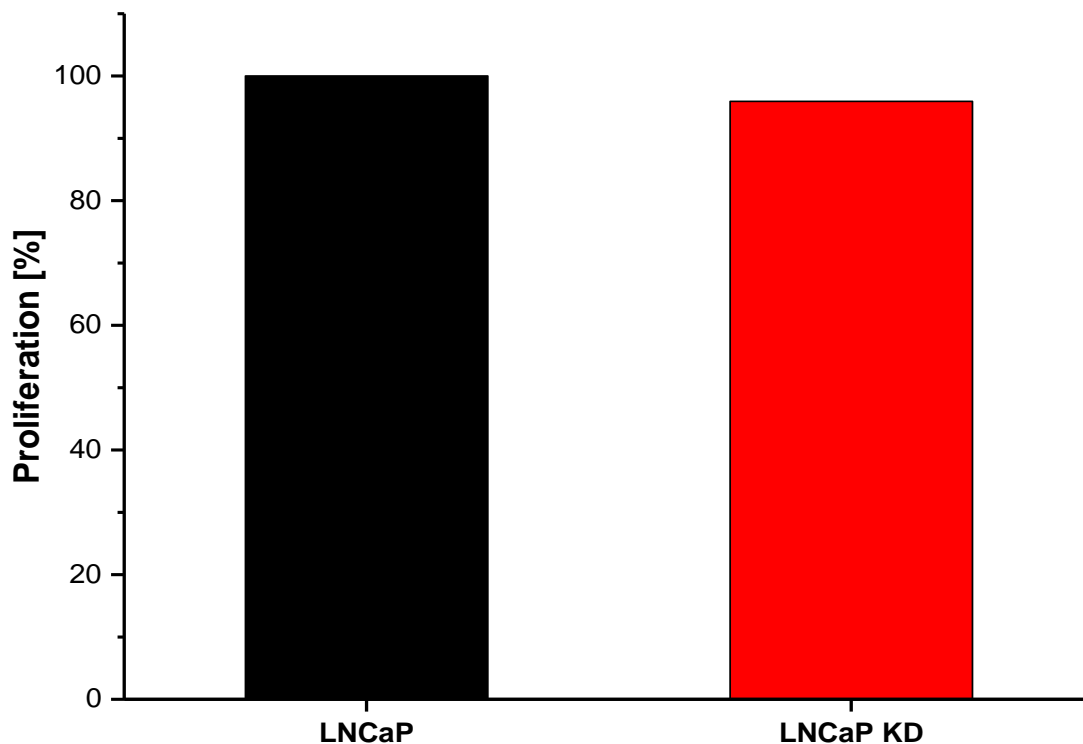


Abbildung 16: Relative Proliferationsrate von LNCaP und LNCaP KD Zellen. Die Proliferationsrate wurde für beide Zelllinien mittels CFSE für 72 Stunden bestimmt und verglichen (n=4).

3.2.3. Einfluss der Expression von PSMA auf die Sensitivität von LNCaP Zellen gegen Docetaxel

Die Docetaxelsensitivität von LNCaP Zellen, vor und nach PSMA Knockdown, wurde in Dosis-Wirkungs-Studien verglichen. Der Knockdown von PSMA führte zu einer um ca. 25 % verminderten Sensitivität gegen Docetaxel ab einer Konzentration von 10 nM Docetaxel ($p = 0,03$; nach 48 Stunden) (Abbildung 17). LNCaP Zellen mit PSMA Knockdown waren jedoch auch deutlich resistenter gegenüber Docetaxel, als die PSMA-negativen PC-3 Zellen, die ein ähnliches Profil wie die parentalen LNCaP zeigten.

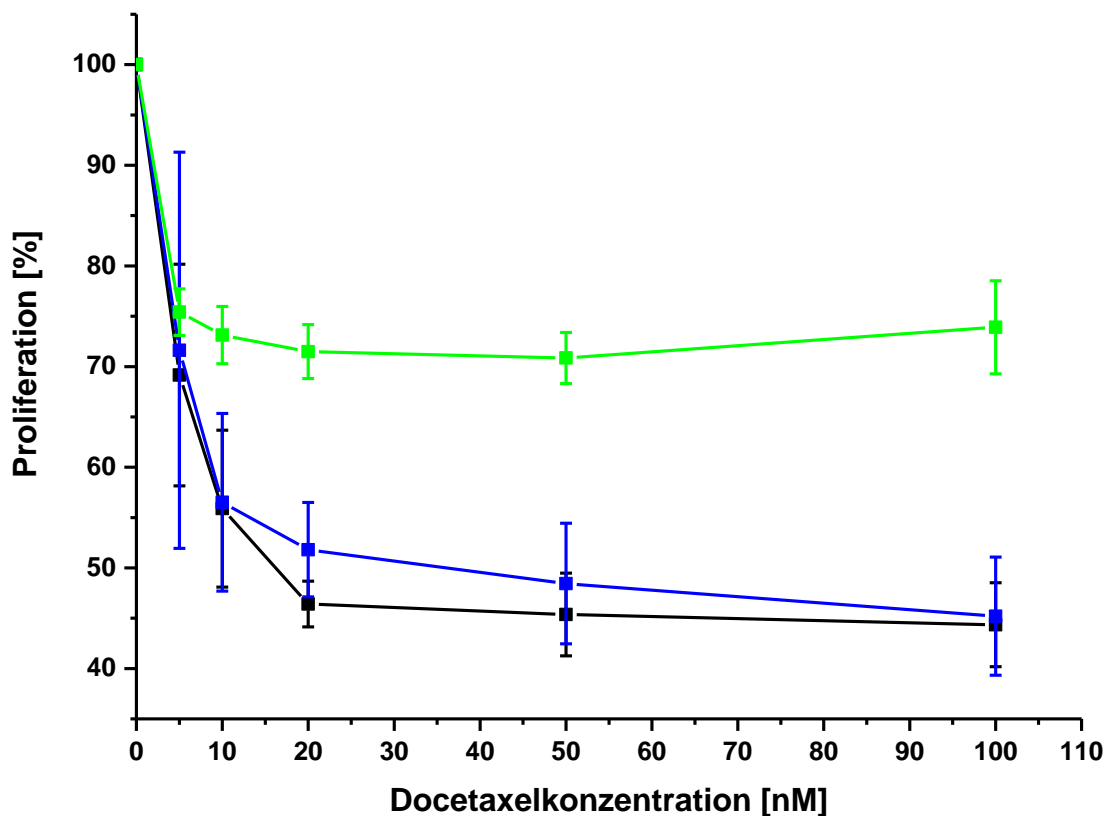


Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurve für LNCaP (schwarz), LNCaP Knockdown (grün) und PC-3 Zellen (blau). Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde mittels CFSE-Assay nach 48 h Docetaxelbehandlung ermittelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=5$

4. Diskussion

4.1. Eignung der Tracer [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA I&T für die Bildung des Prostatakarzinoms und das Therapiemonitoring nach Chemotherapie mit Docetaxel

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potential der Tracer [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA I&T hinsichtlich der Abbildung der Androgensensitivität von Prostatakarzinomzelllinien untersucht sowie die Möglichkeit mit ihnen das Ansprechen einer Chemotherapie mit Docetaxel zu überprüfen. Dazu wurden Aufnahmeversuche mit allen Tracern durchgeführt. Für [⁶⁸Ga]PSMA I&T wurde außerdem die Bindung des Tracers an die Zellen mit den Werten der durchflusszytometrisch bestimmten PSMA-Expression korreliert.

4.1.1. PSMA-Expression und Docetaxelsensitivität der Zelllinien LNCaP und LNCaP C4-2

LNCaP Zellen und ihre Subzelllinie LNCaP C4-2 unterscheiden sich in einigen Details. Während LNCaP Zellen androgenabhängig wachsen, haben LNCaP C4-2 Zellen ihre Androgenabhängigkeit verloren. Des Weiteren sind LNCaP C4-2 *in vivo* (orthotopes Xenograft-Mausmodell) etwas kanzerogener und bilden im Unterschied zu den LNCaP Zellen im Xenograftmodell Metastasen aus [129, 140]. LNCaP C4-2 Zellen stellen somit ein Modell einer fortgeschrittenen Stufe eines Prostatakarzinoms dar.

Im Einklang mit existierender Literatur [46, 133] wurden in den hier präsentierten Untersuchungen signifikante Mengen PSMA in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen, nicht jedoch in PC-3 Zellen (Negativkontrolle) detektiert. Die PSMA-Expression und die Sensitivität gegenüber Docetaxel waren bei LNCaP Zellen tendenziell etwas höher als bei LNCaP C4-2 Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien [68, 83, 133]. Dies ist ein erster Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Docetaxelsensitivität im untersuchten Zellsystem.

Der Unterschied in der PSMA-Expression zwischen den beiden Zelllinien könnte auf verschiedenen Faktoren und Signalwegen beruhen, u.a. möglicherweise auf der Androgensensitivität. Frühere Untersuchungen zeigten

eine höhere PSMA-Expression für LNCaP Zellen in androgenreduziertem bzw. androgenfreiem Medium, im Vergleich zu androgenhaltigem Medium. Umgekehrt konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass eine Behandlung von LNCaP Zellen mit Androgenen zu einer verminderten PSMA-Expression führt [27, 139]. Die Regulation der PSMA-Expression geschieht Evans et al. zufolge in Abhängigkeit vom Androgenrezeptor [27]. In diesem Fall könnte durch den Versuchsaufbau (ohne Zusätze von Androgenen) ein gewisser Mangel vorherrschen, der die LNCaP Zellen zu einer erhöhten PSMA-Expression anreizt, während die LNCaP C4-2 Zellen darauf, aufgrund ihres androgenunabhängigen Wachstums und ihres verminderten Androgenrezeptors [140], nicht reagieren.

4.1.2. Generelle Eignung der Radiotracer [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA I&T für die Darstellung des Prostatakarzinoms

Die im klinischen Alltag genutzten Tracer zur Prostatabildgebung sind [¹⁸F]Cholin-Tracer, [⁶⁸Ga]PSMA-Tracer und, für spezielle Fragestellungen, [¹⁸F]FDG. [¹⁸F]FDG hat sich für die Bildgebung des Prostatakarzinoms, obwohl sonst Standardtracer für viele andere Tumore, im klinischen Alltag aufgrund seiner insgesamt relativ niedrigen Sensitivität und Spezifität nicht bewähren können [69, 91, 90, 134]. Für die Diagnostik von höhergradigen Karzinomen (Gleasonscore > 7) könnte es jedoch von Nutzen sein [49, 48, 50, 58, 90].

Im Gegensatz dazu erlaubt die [¹⁸F]Cholin-PET die Erkennung von Rezidiven und ein Restaging mit guter Sensitivität und Spezifität, allerdings ist sie für die Primärdiagnostik aufgrund einer niedrigeren Sensitivität und Spezifität weniger geeignet [111, 131]. Die [⁶⁸Ga]PSMA-PET scheint der [¹⁸F]Cholin-PET hinsichtlich der Rezidiverkennung und des Restagings überlegen, v.a. bei niedrigen PSA-Werten unter 0,5ng/ml bzw. 1,0 ng/ml [24, 80]. In einer aktuellen Untersuchung wurde bei Patienten mit biochemischem Rezidiv eine Bildgebung mit [¹⁸F]Cholin durchgeführt. Bei negativem Befund wurde anschließend eine [⁶⁸Ga]PSMA-PET angeboten. Die duale Bildgebung aus [⁶⁸Ga]PSMA- und [¹⁸F]Cholin-PET wies eine höhere Detektionsrate im Vergleich zur alleinigen [¹⁸F]Cholin-PET (85,6 % vs. 74,4 %) auf. Zusätzlich zeigte die [⁶⁸Ga]PSMA-PET

im Falle einer negativen [^{18}F]Cholin-PET in 43,8 % der Fälle ein Rezidiv an [6]. Im Zellversuch zeigte sich, dass alle untersuchten Tracer von beiden Zelllinien aufgenommen wurden. Die höchsten Aufnahmewerte zeigte dabei der [^{18}F]Cholin-Tracer. Die gute Aufnahme in Prostatazellen ist auch der Grund dafür, warum Cholin-Tracer momentan ein Standard in der klinischen Verwendung bei Prostatakarzinomen sind. Der [^{68}Ga]PSMA-Tracer hatte prozentual gesehen eine sehr geringe Bindung, was sich auch schon in Untersuchungen, von z.B. Meller et al. gezeigt hatte [75]. Dies könnte daran liegen, dass der Tracer von PSMA an der Zelloberfläche gebunden wird und die Bindungsstellen irgendwann besetzt sind. Im Unterschied dazu werden [^{18}F]FDG und [^{18}F]Cholin als metabolische Tracer für Stoffwechselforgänge und Energiegewinnung gebraucht. Eine Zelle benötigt relativ viele Metabolite und nimmt somit auch viel mehr von diesen Tracern auf.

Der [^{68}Ga]PSMA-Tracer ermöglichte jedoch eine nicht-invasive Quantifizierung der PSMA-Expression: Die durchflusszytometrisch bestimmte PSMA-Expression korrelierte sowohl für LNCaP, als auch für LNCaP C4-2 Zellen direkt mit der Tracerbindung. Im Einklang damit konnten Evans et al. zeigen, dass Änderungen der PSMA-Expression mit dem radioaktiv-markierten PSMA-Antikörper [^{64}Cu]-J591 im PET quantifiziert werden können [27].

Der [^{68}Ga]PSMA-Tracer könnte, im Gegensatz zu den metabolischen Tracern [^{18}F]FDG und [^{18}F]Cholin, eine tumorspezifische Bildgebung ermöglichen. Die Bedeutung der Rückschlüsse auf den Zellstoffwechsel und die Tumorbilogie, die sich daraus möglicherweise ziehen lassen, sind momentan noch unklar, da die Bedeutung der PSMA-Expression in Prostatakarzinomen nicht ausreichend erforscht ist. So wird z.B. der Einfluss einer erhöhte PSMA-Expression auf die Invasivität und Aggressivität von Prostatakarzinomzellen kontrovers diskutiert [9, 20, 31, 138, 141, 143].

4.1.3. Eignung der Tracer [^{18}F]FDG, [^{18}F]Cholin und [^{68}Ga]PSMA I&T für die diagnostische Unterscheidung des androgenunabhängigen vom androgenabhängigen Prostatakarzinom

Es stellte sich die Frage, ob eine Unterscheidung des androgenunabhängig und

androgenabhängig wachsenden Prostatakarzinoms im verwendeten Zellmodell, mittels der in der klinischen Anwendung verwendeten Tracer, möglich ist. Übertragen auf den Menschen würde dies möglicherweise die frühzeitige und nicht-invasive Einordnung in das Entwicklungsstadium des Prostatakarzinoms durch die PET-Bildgebung erlauben.

Die ca. 1,5-fach höhere [¹⁸F]FDG-Aufnahme in LNCaP C4-2 vs. LNCaP Zellen zeigt eine eindeutige Unterscheidung der beiden Zellmodelle. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein höherer Glukosestoffwechsel der weiter entarteten, androgenunabhängigen LNCaP C4-2 Zellen. Bereits Effert et al. berichteten über eine gesteigerte Expression des Glukosetransporter GLUT-1 in fortgeschrittenen und schlecht differenzierten Prostatakarzinomzellen [23]. In Übereinstimmung damit wurde bereits eine erhöhte [¹⁸F]FDG-Aufnahme in androgenunabhängig wachsenden und fortgeschrittenen Prostatakarzinomstadien berichtet sowie die Möglichkeit, damit eine beginnende Hormonunabhängigkeit zu erkennen [51, 90].

In der Aufnahme von [¹⁸F]Cholin zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. Dieser Tracer scheint folglich keine Unterscheidung von androgenabhängigen und androgenunabhängigen Prostatakarzinomen zuzulassen. Eine ältere Untersuchung der Cholinaufnahme in einem Xenograft-Mausmodell mit LNCaP und LNCaP C4-2 Tumoren lieferte ähnliche Ergebnisse, die Aufnahmewerte von LNCaP und LNCaP C4-2 Tumoren unterschieden sich nicht [145].

Die höhere Bindung des [⁶⁸Ga]PSMA-Tracers an androgenabhängige LNCaP Zellen, als an androgenunabhängige LNCaP C4-2 Zellen, legt nahe, dass eine Unterscheidung der Androgensensitivität anhand der [⁶⁸Ga]PSMA-PET möglich ist. Dabei spricht eine höhere [⁶⁸Ga]PSMA-Traceraufnahme für eine Androgenabhängigkeit. Damit wäre eine Unterscheidung der Androgensensitivität der beiden Zelllinien und somit evtl. eines Prostatakarzinoms mittels einer quantitativen PSMA-Bestimmung durch ein entsprechendes PET möglich.

4.1.4. Eignung der Tracer [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA I&T für das Therapiemonitoring nach Docetaxelbehandlung

Bisher gibt es wenige publizierte und aussagekräftige Studien zum klinischen Einsatz von [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin oder [⁶⁸Ga]PSMA für das Monitoring einer Therapie mit Docetaxel bei Prostatakarzinomen. Lediglich Morris et al. beschrieben in ihrer Arbeit die Möglichkeit des Therapiemonitorings einer Docetaxeltherapie mittels [¹⁸F]FDG zu einem frühen Zeitpunkt nach 12 Wochen [81]. In den Zellversuchen zeigten sowohl [¹⁸F]FDG als auch Cholin eine deutlich verminderte Aufnahme in behandelten LNCaP bzw. LNCaP C4-2 Zellen. Beide Tracer zeigen also *in vitro* ein Therapieansprechen von Docetaxel zuverlässig an.

In vitro Daten für die Beurteilung des Ansprechens auf eine Therapie mit Docetaxel mittels [¹⁸F]FDG gibt es momentan nur für Brustkrebszelllinien. Diese zeigen, dass sich der Effekt von Taxanen auf die Zellphysiologie mithilfe der Aufnahme von [¹⁸F]FDG darstellen lässt [79]. Damit könnte [¹⁸F]FDG für die spezielle Fragestellung des Therapieansprechens eingesetzt werden.

Zum Einfluss von Docetaxel auf die Cholinaufnahme in Prostatazellen gibt es bereits einige Studien. Oprea-Lager et al. zeigten, dass sich die Cholinaufnahme im Prostatazellmodell nach Docetaxelbehandlung verringerte und sich Cholin somit gut für das Therapiemonitoring von Docetaxel eignet [89]. Weitere Arbeiten beschrieben, dass mittels [¹¹C]-Cholin-PET ein Nachweis des Therapieansprechens auf Docetaxel in LNCaP-Xenograft sowie PC-3-Xenograft Tumoren in Mäusen möglich ist [60, 113]. Dagegen fanden Müller et al. eine erhöhte Gesamtaufnahme von Cholin in LNCaP Zellen nach Behandlung mit Docetaxel. Vermutet wurde eine erhöhte Cholinaufnahme für die Zellmembransynthese, aufgrund des Zellstresses durch die Docetaxelbehandlung, oder die erhöhte Permeabilität der Zellmembran durch den Apoptoseprozess. Die Autoren gaben aber auch an, dass dies zu einem anderen Messzeitpunkt abweichen könnte, da sie bereits nach 10 Minuten Inkubation mit Cholin gemessen hatten [82].

Cholin würde somit, auch dank seiner weiten Verbreitung in der PET-Bildgebung, einen interessanten Ansatz zur Überprüfung einer

Docetaxeltherapie darstellen. Allerdings zeigte eine Untersuchung von Schwarzenböck et al. an 32 Menschen, dass sich die [¹¹C]-Cholin-PET nur eingeschränkt zur Beurteilung eines Therapieansprechens nach klinischen Kriterien (z.B. PSA-Wert) eignet. Für einzelne Läsionen, wie z.B. Knochenmetastasen, konnte jedoch nach Therapie eine verminderte Cholinaufnahme gezeigt werden [112].

Weitere klinischen Untersuchungen am Menschen *in vivo* wären notwendig um den genauen Nutzen eines Cholin-PETs für die Überprüfung einer Therapie mit Docetaxel zu evaluieren.

Der [⁶⁸Ga]PSMA-Tracer zeigte keine verminderte Bindung nach Behandlung mit Docetaxel in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen. Das deckt sich mit der Beobachtung einer weitgehend unveränderten PSMA-Expression nach Docetaxelbehandlung (Durchflusszytometrie, Western-Blot), was auch bereits Kuroda et al. nachgewiesen hatten. Interessanterweise scheint Docetaxel jedoch die Spiegel von PSA und Androgenrezeptor zu beeinflussen [64]. Eine Docetaxeltherapie lässt sich somit nicht mit dem [⁶⁸Ga]PSMA-Tracer überprüfen.

Die Bindung des [⁶⁸Ga]PSMA-Tracers wurde nicht durch eine Docetaxeltherapie beeinflusst, während sich die Aufnahme von [¹⁸F]FDG und [¹⁸F]Cholin deutlich verringerte. Aufgrund dessen könnte der [⁶⁸Ga]PSMA-Tracer geeignet sein, nach der Chemotherapie noch existierende Tumorzellen aufzuspüren, die durch die (therapiebedingte) metabolische Suppression mit [¹⁸F]Cholin und [¹⁸F]FDG nicht dargestellt werden können. Des Weiteren ergibt sich daraus die Möglichkeit einer Kombinationstherapie von Docetaxel und einer zielgerichteten Endoradiotherapie mit einem PSMA-Liganden. Nach dem theranostischen Ansatz ist der therapeutische PSMA-Tracer, bis auf das gebundene Nuklid, identisch mit dem diagnostischen, und sollte bei positiver Bildgebung zuverlässig binden. Erste Versuche mit therapeutischen PSMA-Liganden zeigen ein großes Potential [62, 136]. Dreiviertel der Patienten einer Untersuchung von Heck et al. hatten einen klinischen Nutzen und zeigten eine klinisch kontrollierte Krankheit. In einem Fall konnte als Fünfrangtherapie (u.a. nach Docetaxeltherapie) eine komplette Remission nach vier Zyklen PSMA-

Endoradiotherapie erreicht werden. Allerdings gab es auch einige Patienten, die trotz positivem PSMA-PET nicht ausreichend auf die PSMA-Endoradiotherapie ansprachen [37].

Für einige Tumorzelllinien konnte ein sensitivierender Effekt von Docetaxel für Bestrahlung nachgewiesen werden [18, 77, 123]. Kelly et al. konnten eine erhöhte Sensitivität für Lutetium-177, im Rahmen einer Radionuklidtherapie, durch Docetaxel in einem Xenograft-Mausmodell mit Prostatakarzinomzellen nachweisen [55]. Dies würde einen synergistischen Effekt von Docetaxel und einer PSMA-Endoradiotherapie bedeuten und die Therapie unter Umständen effektiver gestalten.

4.2. Bedeutung der PSMA-Expression für die Docetaxelsensitivität in LNCaP Zellen

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung der PSMA-Expression in Prostatakarzinomen genauer untersucht werden und dabei eine mögliche Beeinflussung der Docetaxelsensitivität durch PSMA dargestellt werden. Dafür wurde ein Zellsystem mit LNCaP Zellen, deren PSMA-Expression stark vermindert wurde (LNCaP Knockdown/KD), etabliert und mit den parentalen LNCaP Zellen verglichen.

4.2.1. Höhere Resistenz von LNCaP KD Zellen gegen Docetaxel im Vergleich zu parentalen LNCaP Zellen

Nach einer Verminderung der PSMA-Expression in LNCaP Zellen zeigte sich eine deutlich niedrigere Sensitivität für Docetaxel. Ein IC50-Wert konnte nicht erreicht werden. Die PSMA-Expression scheint daher ein entscheidender Faktor für die Sensitivität von LNCaP Zellen gegenüber Docetaxel zu sein. Interessanterweise ist jedoch die Docetaxelsensitivität von PSMA-negativen PC-3 Zellen höher, als die von LNCaP Zellen, die ihre PSMA-Expression verloren haben (LNCaP KD Zellen). Eine Studie von Dassie et al. verglich die Sensitivität von PC-3 Zellen und die von PSMA-überexprimierenden PC-3 Zellen für Docetaxel. Dabei ergaben sich keine Unterschiede [20]. Das legt nahe, dass das alleinige Vorhandensein von PSMA nicht ausschließlich für die

erhöhte Resistenz verantwortlich sein kann. Dagegen scheint eher der Verlust von PSMA, wie im Knockdown-Modell induziert, im Vergleich zum generellen Nichtvorhandensein von PSMA (PC-3 Zellen), eine wichtige Rolle zu spielen. Dazu kommen weitere Co-Faktoren, in denen sich PC-3 Zellen von LNCaP Zellen unterscheiden, wie z.B. im Vorhandensein eines Androgenrezeptors sowie von p53. PC-3-Zellen besitzen, im Gegensatz zu den LNCaP Zellen, keinen funktionierenden Androgenrezeptor und auch kein funktionelles p53 [2, 10, 39, 53].

Eine etwaige Regulation der Docetaxelsensitivität von LNCaP Zellen über den Signalweg p38, p53 und p21 wurde bereits in Zellversuchen untersucht. Konkret führte ein Ausschalten von p38, p53 oder p21 zur Sensibilisierung von LNCaP Zellen gegenüber Docetaxel [29]. Eine andere Arbeit befasste sich mit dem Zusammenspiel von PSMA und p38. Dabei wurde eine Beeinflussung und sogar die Aktivierung des p38 MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase) Signalwegs durch PSMA beschrieben [143], während einige weitere Arbeiten eine direkte Beteiligung von p38 im Auslösen der Apoptose über den p38 MAPK Signalweg vermuten lassen [52, 114, 126]. Daher wäre eine Beeinflussung der Docetaxelsensitivität durch die PSMA-Expression über einen Signalweg mit p38 und weiterer Proteine, wie p53 und p21, denkbar. Allerdings ist ein direkter Rückschluss auf die Beeinflussung der Docetaxelsensitivität durch PSMA momentan nicht ohne weitere Untersuchungen möglich. Diese weiteren Untersuchungen sind Gegenstand einer aktuellen Studie in unserer Arbeitsgruppe, bei der u.a. auch die PSMA-Expression im Prozess der Resistenzentwicklung gegen Docetaxel in LNCaP Zellen untersucht wird. Ein weiterer Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression, der Docetaxelsensitivität und der Androgenabhängigkeit wäre denkbar und müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Eine eindeutige Einordnung der Eignung des PSMA-Tracers für die frühe Abschätzung des Erfolgs einer Docetaxeltherapie ist somit momentan noch nicht möglich.

4.3. Ausblick

Die Bedeutung von PSMA erscheint unter mehreren Gesichtspunkten interessant. In der klinischen Anwendung stellt sich häufig die Frage, was die genaue Bedeutung eines „leuchtenden“ Areal in der PET ist? Welche Aussage kann man mittels PSMA über die Tumorbiologie treffen? Falls die Entwicklung der Invasivität von Prostatakarzinomen mit der Höhe der PSMA-Expression korreliert, könnte mittels eines PSMA-Tracers frühzeitig eine Abschätzung der Invasivität und somit auch der potentiellen Metastasenbildung vorgenommen werden. Eine sequentielle Bildgebung mit [¹⁸F]FDG und einem PSMA-Tracer, könnte unter Umständen sogar eine Prognose hinsichtlich der Aggressivität des Tumors und eine Einordnung in eine Risikogruppe ermöglichen. Interessant erscheint auch die Möglichkeit mithilfe einer mehrfachen Bildgebung durch beispielweise PSMA-Tracer + [¹⁸F]FDG, oder PSMA-Tracer + [¹⁸F]Cholin Läsionen zu charakterisieren. Läsionen könnten für beide Tracer positiv sein, für einen Tracer positiv sein und für den anderen negativ und umgekehrt. Falls solche Läsionen in der PET auffallen, könnten diese gezielt, mit der Frage nach den Unterschieden, biopsiert werden und daraus weitere Hinweise auf die Tumorbiologie bzw. Tumorerheterogenität gewonnen werden. In Zukunft wäre dann mit der kombinierten Bildgebung aus verschiedenen Tracern eine Charakterisierung des Prostatakarzinoms möglich.

Außerdem wäre, wenn sich ein Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Sensitivität für eine Docetaxeltherapie nachweisen lässt, eine nicht-invasive und schnelle Einschätzung der Eignung für eine solche Therapie gegeben.

Zusätzlich wäre PSMA als möglicher Indikator für Androgensensitivität und den Therapieerfolg antiandrogener Therapie vorstellbar. Für die klinische Anwendung ergeben sich hiermit interessante Möglichkeiten. Ein Patient mit unklarer Androgensensitivität seines Prostatakarzinoms würde ein Ausgangs-PSMA-PET erhalten und anschließend mit einer antiandrogenen Therapie behandelt werden. Bei einem stärker positiven PET wäre von einem höher exprimierten PSMA und einem Ansprechen auf die Therapie auszugehen. Dies könnte auf einen androgenabhängigen Tumor hinweisen. Bei einem

gleichbleibendem PET müsste man dann von einem therapierefraktären und somit androgenunabhängigen Tumor ausgehen.

Mit den Erkenntnissen über die Tumorbilogie, die möglicherweise durch eine einfache (zusätzliche) Bildgebung mit einem PSMA-Tracer gewonnen würden, könnte anschließend die Therapie individualisiert werden.

5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt derzeit in Deutschland die häufigste Krebserkrankung der männlichen Bevölkerung dar und steht bei den tödlich verlaufenden Malignomen an zweiter Stelle. Aktuell umfasst die Diagnostik immer öfter auch eine molekulare Bildgebung mittels PET/CT und den Tracern [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA. Letzterer detektiert selektiv das prostata-spezifische Membranantigen (PSMA), welches in Prostatakarzinomzellen häufig überexprimiert ist. Das Wachstum von PCa geschieht in der Regel androgenabhängig, wobei sich auch teilweise eine androgenunabhängige Entwicklung findet. Für das bei kastrationsresistenten Karzinomen und fortgeschrittenen Stadien eingesetzte Chemotherapeutikum Docetaxel, werden immer wieder Resistenzentwicklungen beobachtet, wodurch dieses nur unzureichend effektiv ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung verschiedener PET-Tracer ([¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA) zur Bildgebung androgenabhängiger und -unabhängiger Prostatakarzinomzellen zu testen sowie ihr Potential zur Beurteilung des Therapieansprechens auf Docetaxel zu untersuchen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die [⁶⁸Ga]PSMA-Retention mit der PSMA-Expression korreliert. Im zweiten Teil wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA und der Resistenzentwicklung gegen Docetaxel untersucht.

Für die in-vitro Experimente wurden die hormonabhängige Zelllinie LNCaP sowie die hormonunabhängige Zelllinie LNCaP C4-2 verwendet. Im zweiten Teil wurden zusätzlich PSMA-negative PC-3 Zellen eingesetzt. Die aufgenommene bzw. gebundene Traceraktivität wurde mittels Gammacounter gemessen. Die Untersuchung der PSMA-Expression erfolgte mit Western-Blot und Durchflusszytometrie. Ein PSMA-Knockdown-System wurde mittels siRNA in LNCaP-Zellen etabliert.

Die PSMA-Expression und die Sensitivität gegenüber Docetaxel waren bei LNCaP Zellen tendenziell erhöht gegenüber der LNCaP C4-2 Zelllinie. Nach Docetaxelbehandlung zeigte sich in beiden Zellreihen eine unveränderte PSMA-Expression. Der PSMA-spezifische PET-Tracer zeigte, im Vergleich zu den metabolischen Tracern [¹⁸F]FDG und [¹⁸F]Cholin, eine nur sehr geringe

Retention. Im Vergleich der Zelllinien untereinander nahmen LNCaP C4-2 Zellen ca. 50 % mehr [¹⁸F]FDG auf als LNCaP Zellen. Die Aufnahme von [¹⁸F]Cholin unterschied sich nicht signifikant. Der Tracer [⁶⁸Ga]PSMA zeigte eine höhere Bindung an LNCaP Zellen im Vergleich zu LNCaP C4-2 Zellen. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl [¹⁸F]FDG als auch [¹⁸F]Cholin, nicht jedoch [⁶⁸Ga]PSMA *in vitro* ein Therapieansprechen auf Docetaxel durch verminderte Traceraufnahme in beiden Zelllinien aufzeigen. Es konnte zudem eine direkte Korrelation zwischen der [⁶⁸Ga]PSMA-Bindung und der PSMA-Expression nachgewiesen werden.

Nach einer siRNA-vermittelten Verminderung der PSMA-Expression in LNCaP Zellen (Knockdown-Zellen) zeigte sich eine deutlich geringere Sensitivität für Docetaxel. Gleichzeitig war jedoch die Docetaxelsensitivität von PSMA-negativen PC-3 Zellen höher als die von LNCaP Knockdown-Zellen.

Insgesamt zeigten unsere Untersuchungen, dass sich die PET-Tracer [¹⁸F]FDG und [⁶⁸Ga]PSMA zur Unterscheidung des androgenabhängigen Zellmodells vom androgenunabhängigen Modell eignen. Damit ist eine Differenzierung der Androgenabhängigkeit möglich. Außerdem ermöglicht der [⁶⁸Ga]PSMA-Tracer eine Einschätzung der PSMA-Expression. Die Tracer [¹⁸F]FDG und [¹⁸F]Cholin eignen sich für die Beurteilung des Therapieansprechens einer Docetaxeltherapie, [⁶⁸Ga]PSMA dagegen nicht. Die PSMA-Expression scheint ein entscheidender, aber nicht alleinstehender Faktor für die Sensitivität von LNCaP Zellen gegenüber Docetaxel zu sein. Unsere Versuche konnten die Diskrepanz zwischen der Sensitivität von LNCaP Knockdown-Zellen und PC-3 Zellen nicht erklären. Es scheinen hierbei eher der Verlust von PSMA, wie im Knockdown-Modell induziert, sowie bislang unbekannte Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Diese sollten in weiteren Versuchen näher charakterisiert werden, um den Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Docetaxelsensitivität zu entschlüsseln.

6. Literaturverzeichnis/ Abbildungsverzeichnis/ Tabellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Afshar-Oromieh A., Zechmann C. M., Malcher A. et al (2014) Comparison of PET imaging with a (68)Ga-labelled PSMA ligand and (18)F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41(1): 11–20
2. Alimirah F., Chen J., Basrawala Z. et al (2006) DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett* 580(9): 2294–2300
3. Armstrong A. J., Garrett-Mayer E. S., Yang Y.-C. O. et al (2007) A contemporary prognostic nomogram for men with hormone-refractory metastatic prostate cancer: a TAX327 study analysis. *Clin. Cancer Res.* 13(21): 6396–6403
4. Berthold D. R., Pond G. R., Soban F. et al (2008) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol* 26(2): 242–245
5. Bhalla K. N. (2003) Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 22(56): 9075–9086
6. Bluemel C., Krebs M., Polat B. et al (2016) 68Ga-PSMA-PET/CT in Patients With Biochemical Prostate Cancer Recurrence and Negative 18F-Choline-PET/CT. *Clin Nucl Med* 41(7): 515–521
7. Bostwick D. G., Pacelli A., Blute M. et al (1998) Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer* 82(11): 2256–2261
8. Cao K.-Y., Mao X.-P., Wang D.-H. et al (2007) High expression of PSM-E correlated with tumor grade in prostate cancer: a new alternatively spliced variant of prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 67(16): 1791–1800
9. Cao K.-Y., Xu L., Zhang D.-M. et al (2012) New alternatively spliced variant of prostate-specific membrane antigen PSM-E suppresses the proliferation, migration and invasiveness of prostate cancer cells. *Int J Oncol* 40(6): 1977–1985

10. Carroll A. G., Voeller H. J., Sugars L. et al (1993) p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 23(2): 123–134
11. Carter R. E., Feldman A. R., Coyle J. T. (1996) Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 749–753
12. Chang S. S., Reuter V. E., Heston W. D. et al (1999) Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res.* 59(13): 3192–3198
13. Chang S. S., O'Keefe D. S., Bacich D. J. et al (1999) Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin. Cancer Res.* 5(10): 2674–2681
14. Chang S. S., Reuter V. E., Heston W. D. et al (2000) Short term neoadjuvant androgen deprivation therapy does not affect prostate specific membrane antigen expression in prostate tissues. *Cancer* 88(2): 407–415
15. Chang S. S., Reuter V. E., Heston W. D. et al (2001) Metastatic renal cell carcinoma neovasculature expresses prostate-specific membrane antigen. *Urology* 57(4): 801–805
16. Cimitan M., Bortolus R., Morassut S. et al (2006) 18Ffluorocholine PET/CT imaging for the detection of recurrent prostate cancer at PSA relapse: experience in 100 consecutive patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33(12): 1387–1398
17. Codony-Servat J., Marin-Aguilera M., Visa L. et al (2013) Nuclear factor-kappa B and interleukin-6 related docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 73(5): 512–521
18. Creane M., Seymour C. B., Colucci S. et al (1999) Radiobiological effects of docetaxel (Taxotere): a potential radiation sensitizer. *Int J Radiat Biol* 75(6): 731–737
19. D'Amico A. V., Chen M.-H., Roehl K. A. et al (2004) Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med* 351(2): 125–135

20. Dassie J. P., Hernandez L. I., Thomas G. S. et al (2014) Targeted inhibition of prostate cancer metastases with an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen. *Mol Ther* 22(11): 1910–1922
21. Domingo-Domenech J., Oliva C., Rovira A. et al (2006) Interleukin 6, a nuclear factor-kappaB target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor-kappaB inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* 12(18): 5578–5586
22. Eder M., Schäfer M., Bauder-Wüst U. et al (2012) ⁶⁸Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug. Chem.* 23(4): 688–697
23. Effert P., Beniers A. J., Tamimi Y. et al (2004) Expression of glucose transporter 1 (Glut-1) in cell lines and clinical specimens from human prostate adenocarcinoma. *Anticancer Res* 24(5A): 3057–3063
24. Eiber M., Maurer T., Souvatzoglou M. et al (2015) Evaluation of Hybrid (68)Ga-PSMA Ligand PET/CT in 248 Patients with Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *J. Nucl. Med.* 56(5): 668–674
25. Elsasser-Beile U., Buhler P., Wolf P. (2009) Targeted therapies for prostate cancer against the prostate specific membrane antigen. *Curr Drug Targets* 10(2): 118–125
26. Epstein J. I., Allsbrook, William C Jr, Amin M. B. et al (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29(9): 1228–1242
27. Evans M. J., Smith-Jones P. M., Wongvipat J. et al (2011) Noninvasive measurement of androgen receptor signaling with a positron-emitting radiopharmaceutical that targets prostate-specific membrane antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(23): 9578–9582
28. Freedland S. J., Humphreys E. B., Mangold L. A. et al (2005) Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* 294(4): 433–439

29. Gan L., Wang J., Xu H. et al (2011) Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling. *Prostate* 71(11): 1158–1166
30. Ghosh A., Heston, Warren D W (2004) Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 91(3): 528–539
31. Ghosh A., Wang X., Klein E. et al (2005) Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness. *Cancer Res.* 65(3): 727–731
32. Giovannucci E., Rimm E. B., Colditz G. A. et al (1993) A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85(19): 1571–1579
33. Haffner M. C., Kronberger I. E., Ross J. S. et al (2009) Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. *Hum Pathol* 40(12): 1754–1761
34. Hanahan D., Weinberg R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646–674
35. Hara T., Ushio K., Nishiwaki M. et al (2010) A mutation in beta-tubulin and a sustained dependence on androgen receptor signalling in a newly established docetaxel-resistant prostate cancer cell line. *Cell Biol Int* 34(2): 177–184
36. Hautmann R., Gschwend J. (2014) *Urologie*, 5. Auflage. Berlin: Springer
37. Heck M. M., Retz M., D'Alessandria C. et al (2016) Systemic Radioligand Therapy with (177)Lu Labeled Prostate Specific Membrane Antigen Ligand for Imaging and Therapy in Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *J. Urol.* 196(2): 382–391
38. Henry M. D., Wen S., Silva M. D. et al (2004) A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* 64(21): 7995–8001

39. Herrmann J. L., Briones F., JR, Brisbay S. et al (1998) Prostate carcinoma cell death resulting from inhibition of proteasome activity is independent of functional Bcl-2 and p53. *Oncogene* 17(22): 2889–2899
40. Horoszewicz J. S., Leong S. S., Chu T. M. et al (1980) The LNCaP cell line - a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* 37: 115–132
41. Horoszewicz J. S., Leong S. S., Kawinski E. et al (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43(4): 1809–1818
42. Huggins C., Hodges C. V. (2002) Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J. Urol.* 167(2 Pt 2): 948-51; discussion 952
43. Husarik D. B., Miralbell R., Dubs M. et al (2008) Evaluation of (18)F-choline PET/CT for staging and restaging of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35(2): 253–263
44. Igerc I., Kohlfurst S., Gallowitsch H. J. et al (2008) The value of 18F-choline PET/CT in patients with elevated PSA-level and negative prostate needle biopsy for localisation of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35(5): 976–983
45. Israeli R. S., Powell C. T., Fair W. R. et al (1993) Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* 53(2): 227–230
46. Israeli R. S., Powell C. T., Corr J. G. et al (1994) Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* 54(7): 1807–1811
47. Jackson P., Grimm M.-O., Kingsley E. A. et al (2002) Relationship between expression of KAI1 metastasis suppressor gene, mRNA levels and p53 in human bladder and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* 7(3): 99–104
48. Jadvar H. (2011) Prostate cancer: PET with 18F-FDG, 18F- or 11C-acetate, and 18F- or 11C-choline. *J. Nucl. Med.* 52(1): 81–89
49. Jadvar H. (2013) Imaging evaluation of prostate cancer with 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT: utility and limitations. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 40 Suppl 1: 10

50. Jadvar H. (2016) Is There Use for FDG-PET in Prostate Cancer? *Semin Nucl Med* 46(6): 502–506
51. Jadvar H., Xiankui L., Shahinian A. et al (2005) Glucose metabolism of human prostate cancer mouse xenografts. *Mol Imaging* 4(2): 91–97
52. Joo S. S., Yoo Y.-M. (2009) Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J Pineal Res* 47(1): 8–14
53. Kaighn M. E., Narayan K. S., Ohnuki Y. et al (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17(1): 16–23
54. Kao P.-F., Chou Y.-H., Lai C.-W. (2008) Diffuse FDG uptake in acute prostatitis. *Clin Nucl Med* 33(4): 308–310
55. Kelly M. P., Lee S. T., Lee F.-T. et al (2009) Therapeutic efficacy of ¹⁷⁷Lu-CHX-A"-DTPA-hu3S193 radioimmunotherapy in prostate cancer is enhanced by EGFR inhibition or docetaxel chemotherapy. *Prostate* 69(1): 92–104
56. Ketchandji M., Kuo Y.-F., Shahinian V. B. et al (2009) Cause of death in older men after the diagnosis of prostate cancer. *J Am Geriatr Soc* 57(1): 24–30
57. Kitajima K., Murphy R. C., Nathan M. A. et al (2014) Update on positron emission tomography for imaging of prostate cancer. *Int. J. Urol.* 21(1): 12–23
58. Kitajima K., Yamamoto S., Fukushima K. et al (2016) Update on advances in molecular PET in urological oncology. *Jpn J Radiol* 34(7): 470–485
59. Krause B. J., Souvatzoglou M., Tuncel M. et al (2008) The detection rate of ¹¹Ccholine-PET/CT depends on the serum PSA-value in patients with biochemical recurrence of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35(1): 18–23
60. Krause B. J., Souvatzoglou M., Herrmann K. et al (2010) ¹¹CCholine as pharmacodynamic marker for therapy response assessment in a prostate cancer xenograft model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(10): 1861–1868

61. Krebsinformationsdienst, Krebsforschungszentrum D. PET - Grundlagen [Internet]. 02/2015 [Zugriff am 20.12.2015]. URL: <https://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/pet-technik.php>
62. Kulkarni H. R., Singh A., Schuchardt C. et al (2016) PSMA-Based Radioligand Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The Bad Berka Experience Since 2013. *J. Nucl. Med.* 57(Suppl 3): 97–104
63. Kurhanewicz J., Vigneron D. B., Nelson S. J. (2000) Three-dimensional magnetic resonance spectroscopic imaging of brain and prostate cancer. *Neoplasia* 2(1-2): 166–189
64. Kuroda K., Liu H., Kim S. et al (2009) Docetaxel down-regulates the expression of androgen receptor and prostate-specific antigen but not prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cell lines: implications for PSA surrogacy. *Prostate* 69(14): 1579–1585
65. Lapidus R. G., Tiffany C. W., Isaacs J. T. et al (2000) Prostate-specific membrane antigen (PSMA) enzyme activity is elevated in prostate cancer cells. *Prostate* 45(4): 350–354
66. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 4.0, 2016, AWMF-Register-Nummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html> [Zugriff am 1.12.2017]
67. Liu T., Wu L. Y., Fulton M. D. et al (2012) Prolonged androgen deprivation leads to downregulation of androgen receptor and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 41(6): 2087–2092
68. Liu C., Zhu Y., Lou W. et al (2013) Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *Prostate* 73(4): 418–427
69. Liu I. J., Zafar M. B., Lai Y. H. et al (2001) Fluorodeoxyglucose positron emission tomography studies in diagnosis and staging of clinically organ-confined prostate cancer. *Urology* 57(1): 108–111

70. Lütje S., Heskamp S., Cornelissen A. S. et al (2015) PSMA Ligands for Radionuclide Imaging and Therapy of Prostate Cancer: Clinical Status. *Theranostics* 5(12): 1388–1401
71. Ma D., Hopf C. E., Malewicz A. D. et al (2006) Potent antitumor activity of an auristatin-conjugated, fully human monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen. *Clin. Cancer Res.* 12(8): 2591–2596
72. Marin-Aguilera M., Codony-Servat J., Kalko S. G. et al (2012) Identification of docetaxel resistance genes in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 11(2): 329–339
73. Matsuda T., Saika K. (2007) Comparison of time trends in prostate cancer incidence (1973–1997) in East Asia, Europe and USA, from *Cancer Incidence in Five Continents Vols IV–VIII*. *Jpn J Clin Oncol* 37(7): 556–557
74. McNeal J. E. (1981) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 2(1): 35–49
75. Meller B., Bremmer F., Sahlmann C. O. et al (2015) Alterations in androgen deprivation enhanced prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer cells as a target for diagnostics and therapy. *EJNMMI Res* 5(1): 66
76. Michaud D. S., Augustsson K., Rimm E. B. et al (2001) A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* 12(6): 557–567
77. Milas L., Milas M. M., Mason K. A. (1999) Combination of taxanes with radiation: preclinical studies. *Semin Radiat Oncol* 9(2 Suppl 1): 12–26
78. Mimeault M., Johansson S. L., Batra S. K. (2013) Marked improvement of cytotoxic effects induced by docetaxel on highly metastatic and androgen-independent prostate cancer cells by downregulating macrophage inhibitory cytokine-1. *Br J Cancer* 108(5): 1079–1091
79. Monazzam A., Razifar P., Simonsson M. et al (2006) Multicellular tumour spheroid as a model for evaluation of ¹⁸F-FDG as biomarker for breast cancer treatment monitoring. *Cancer Cell Int* 6: 6
80. Morigi J. J., Stricker P. D., van Leeuwen P. J. et al (2015) Prospective Comparison of ¹⁸F-Fluoromethylcholine Versus ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT in

Prostate Cancer Patients Who Have Rising PSA After Curative Treatment and Are Being Considered for Targeted Therapy. *J. Nucl. Med.* 56(8): 1185–1190

81. Morris M. J., Akhurst T., Larson S. M. et al (2005) Fluorodeoxyglucose positron emission tomography as an outcome measure for castrate metastatic prostate cancer treated with antimicrotubule chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11(9): 3210–3216
82. Muller S. A., Holzapfel K., Seidl C. et al (2009) Characterization of choline uptake in prostate cancer cells following bicalutamide and docetaxel treatment. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36(9): 1434–1442
83. Musende A. G., Eberding A., Jia W. et al (2010) Rh2 or its aglycone aPPD in combination with docetaxel for treatment of prostate cancer. *Prostate* 70(13): 1437–1447
84. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M. C. et al (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139(2): 271–279
85. O'Keefe D. S., Bacich D. J., Heston W. D. W. (2001) Prostate Specific Membrane Antigen. In: Chung L. W. K., Isaacs W. B., Simons J. W. (Hrsg.) *Prostate Cancer*. Humana Press, Totowa, NJ, S. 307–326
86. Oesterling J. E. (1991) Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J. Urol.* 145(5): 907–923
87. O'Keefe D. S., Su S. L., Bacich D. J. et al (1998) Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1443(1-2): 113–127
88. O'Neill A. J., Prencipe M., Dowling C. et al (2011) Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines. *Mol Cancer* 10: 126
89. Oprea-Lager D. E., van Kantén M. P., van Moorselaar R. J. et al (2015) ¹⁸F-fluoromethylcholine as a chemotherapy response read-out in prostate cancer cells. *Mol Imaging Biol* 17(3): 319–327

90. Oyama N., Akino H., Suzuki Y. et al (1999) The increased accumulation of ¹⁸Ffluorodeoxyglucose in untreated prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol* 29(12): 623–629
91. Oyama N., Akino H., Suzuki Y. et al (2001) FDG PET for evaluating the change of glucose metabolism in prostate cancer after androgen ablation. *Nucl Med Commun* 22(9): 963–969
92. Patterson S. G., Wei S., Chen X. et al (2006) Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells. *Oncogene* 25(45): 6113–6122
93. Perera M., Papa N., Christidis D. et al (2016) Sensitivity, Specificity, and Predictors of Positive (68)Ga-Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol* 70(6): 926-937
94. Perner S., Hofer M. D., Kim R. et al (2007) Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol* 38(5): 696–701
95. Petrylak D. P., Tangen C. M., Hussain M. H. A. et al (2004) Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 351(15): 1513–1520
96. Picchio M., Messa C., Landoni C. et al (2003) Value of ¹¹Ccholine-positron emission tomography for re-staging prostate cancer: a comparison with ¹⁸Ffluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *J. Urol.* 169(4): 1337–1340
97. Pinto J. T., Suffoletto B. P., Berzin T. M. et al (1996) Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 2(9): 1445–1451
98. Ploussard G., Terry S., Maille P. et al (2010) Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. *Cancer Res.* 70(22): 9253–9264
99. Pu Y. S., Chiang H. S., Lin C. C. et al (2004) Changing trends of prostate cancer in Asia. *Aging Male* 7(2): 120–132

100. Qian D. Z., Rademacher B. L. S., Pittsenbarger J. et al (2010) CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. *Prostate* 70(4): 433–442
101. Quinn M., Babb P. (2002) Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 90(2): 162–173
102. Rajasekaran S. A., Christiansen J. J., Schmid I. et al (2008) Prostate specific membrane antigen associates with anaphase promoting complex and induces chromosomal instability. *Mol Cancer Ther* 7(7): 2142–2151
103. Rajasekaran A. K., Anilkumar G., Christiansen J. J. (2005) Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 288(5): 81
104. Ramirez de Molina A., Rodriguez-Gonzalez A., Gutierrez R. et al (2002) Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 296(3): 580–583
105. Krebs in Deutschland 2013/2014, 11. Ausgabe. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017
106. Ross J. S., Sheehan C. E., Fisher, Hugh A G et al (2003) Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 9(17): 6357–6362
107. Russell P. J., Hewish D., Carter T. et al (2004) Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: in vitro and in vivo studies. *Cancer Immunol Immunother* 53(5): 411–421
108. Salminen E., Hogg A., Binns D. et al (2002) Investigations with FDG-PET scanning in prostate cancer show limited value for clinical practice. *Acta Oncol* 41(5): 425–429
109. Schiff P. B., Horwitz S. B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(3): 1561–1565

110. Schreiter V., Reimann C., Geisel D. et al (2016) Nuclear Medicine Imaging of Prostate Cancer. *Rofo* 188(11): 1037–1044
111. Schuster D. M., Nanni C., Fanti S. (2016) PET Tracers Beyond FDG in Prostate Cancer. *Semin Nucl Med* 46(6): 507–521
112. Schwarzenbock S. M., Eiber M., Kundt G. et al (2016) Prospective evaluation of ¹¹CCholine PET/CT in therapy response assessment of standardized docetaxel first-line chemotherapy in patients with advanced castration refractory prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 43(12): 2105–2113
113. Schwarzenböck S., Sachs D., Souvatzoglou M. et al (2013) Ansprechen auf eine Docetaxeltherapie im LNCaP-Prostatakarzinom-Xenograft-Mausmodell. Untersuchung mit der [¹¹C]Cholin-Kleintier-PET/CT. *Nuklearmedizin* 52(4): 141–147
114. Shimada K., Nakamura M., Ishida E. et al (2003) Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis* 24(6): 1067–1075
115. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. (2015) Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65(1): 5–29
116. Silver D. A., Pellicer I., Fair W. R. et al (1997) Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin. Cancer Res.* 3(1): 81–85
117. Singh R. K., Lokeshwar B. L. (2009) Depletion of intrinsic expression of Interleukin-8 in prostate cancer cells causes cell cycle arrest, spontaneous apoptosis and increases the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Mol Cancer* 8: 57
118. Sokoloff R. L., Norton K. C., Gasior C. L. et al (2000) A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine. *Prostate* 43(2): 150–157
119. Stamey T. A., Yang N., Hay A. R. et al (1987) Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 317(15): 909–916

120. Steinberg G. D., Carter B. S., Beaty T. H. et al (1990) Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17(4): 337–347
121. Su S. L., Huang I. P., Fair W. R. et al (1995) Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression. *Cancer Res.* 55(7): 1441–1443
122. Sweat S. D., Pacelli A., Murphy G. P. et al (1998) Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology* 52(4): 637–640
123. Tabuchi S., Ozawa S., Koyanagi K. et al (2011) Radiation-sensitizing effect of low-concentration docetaxel on human esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Exp Ther Med* 2(4): 601–606
124. Tagawa S. T., Milowsky M. I., Morris M. et al (2013) Phase II study of lutetium-177 labeled anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 19(18): 5182–5191
125. Tai S., Sun Y., Squires J. M. et al (2011) PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 71(15): 1668–1679
126. Tanaka Y., Gavrielides M. V., Mitsuuchi Y. et al (2003) Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J Biol Chem* 278(36): 33753–33762
127. Tannock I. F., Wit R. de, Berry W. R. et al (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351(15): 1502–1512
128. Terry S., Ploussard G., Allory Y. et al (2009) Increased expression of class III beta-tubulin in castration-resistant human prostate cancer. *Br J Cancer* 101(6): 951–956
129. Thalmann G. N., Anezinis P. E., Chang S. M. et al (1994) Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* 54(10): 2577–2581

130. Tiffany C. W., Lapidus R. G., Merion A. et al (1999) Characterization of the enzymatic activity of PSM: comparison with brain NAALADase. *Prostate* 39(1): 28–35
131. Umbehr M. H., Muntener M., Hany T. et al (2013) The role of 11C-choline and 18F-fluorocholine positron emission tomography (PET) and PET/CT in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 64(1): 106–117
132. van Bokhoven A., Varella-Garcia M., Korch C. et al (2003) Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 57(3): 205–225
133. Wang X., Ma D., Olson W. C. et al (2011) In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen. *Mol Cancer Ther* 10(9): 1728–1739
134. Watanabe H., Kanematsu M., Kondo H. et al (2010) Preoperative detection of prostate cancer: a comparison with 11C-choline PET, 18F-fluorodeoxyglucose PET and MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 31(5): 1151–1156
135. Weineisen M., Schottelius M., Simecek J. et al (2014) Development and first in human evaluation of PSMA I&T - A ligand for diagnostic imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 55(supplement 1): 1083
136. Weineisen M., Schottelius M., Simecek J. et al (2015) 68Ga- and 177Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J. Nucl. Med.* 56(8): 1169–1176
137. Wittekind C., Meyer H.-J. (2013) *TNM, 7. Auflage*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
138. Wright, G L Jr, Haley C., Beckett M. L. et al (1995) Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urol Oncol* 1(1): 18–28

139. Wright, G L Jr, Grob B. M., Haley C. et al (1996) Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology* 48(2): 326–334
140. Wu H. C., Hsieh J. T., Gleave M. E. et al (1994) Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int. J. Cancer* 57(3): 406–412
141. Yao V., Parwani A., Maier C. et al (2008) Moderate expression of prostate-specific membrane antigen, a tissue differentiation antigen and folate hydrolase, facilitates prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 68(21): 9070–9077
142. Zemsanova M., Sahakian E., Bashkurova S. et al (2008) The PIM1 kinase is a critical component of a survival pathway activated by docetaxel and promotes survival of docetaxel-treated prostate cancer cells. *J Biol Chem* 283(30): 20635–20644
143. Zhang Y., Guo Z., Du T. et al (2013) Prostate specific membrane antigen (PSMA): a novel modulator of p38 for proliferation, migration, and survival in prostate cancer cells. *Prostate* 73(8): 835–841
144. Zhao L.-Y., Mao X.-P., Chao K.-Y. et al (2012) Prostate-specific membrane antigen can promote in vivo osseous metastasis of prostate cancer cells in mice. *Braz J Med Biol Res* 45(8): 737–745
145. Zheng Q.-H., Gardner T. A., Raikwar S. et al (2004) ¹¹CCholine as a PET biomarker for assessment of prostate cancer tumor models. *Bioorg Med Chem* 12(11): 2887–2893

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Resistenzmechanismen gegen Docetaxel, vereinfachte Darstellung nach Magadoux et al. [73].....	12
Abbildung 2: Histogrammdarstellung einer Zellzyklusanalyse nach Nicoletti, M1 = subG1: apoptotische Zellen (< 2n), M2 = G1-Phase (2n), M3 = Synthesephase (2n-4n), M4 = G2/M-Phase: 4n; (n = Chromosomensatz), FL2-A gibt die Fluoreszenzintensität an.	29
Abbildung 3: Histogrammdarstellung einer CFSE-Färbung im FACS. Rot = Farbintensität der Zellen direkt nach der Färbung, grün/schwarz/orange = Farbintensität der Zellen im Verlauf, FL1-H gibt die Fluoreszenzintensität an.....	30
Abbildung 4: Reduktion der Viabilität von LNCaP (schwarz) und LNCaP C4-2 (rot) Zellen nach Docetaxelbehandlung. Der Prozentsatz lebender/toter Zellen wurden mittels Nicoletti-Assay nach 48 h Docetaxelbehandlung erhoben; Mittelwerte ± Standardabweichung, n=5	39
Abbildung 5: Reduktion der Proliferation von LNCaP (schwarz) und LNCaP C4-2 (rot) Zellen nach Docetaxelbehandlung. Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde mittels CFSE-Assay nach 48 h Docetaxelbehandlung ermittelt. Mittelwerte ± Standardabweichung, n=5	40
Abbildung 6: exemplarische Darstellung (1 von 3) der Expression von PSMA in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit (+) und ohne Docetaxelbehandlung (PC-3 Zellen dienen als Negativkontrolle) im Western-Blot; die Ponceau-S Färbung (zweite Reihe) färbt Proteine reversibel an und ermöglicht einen Proteinmengenabgleich, hier zeigt die Ponceau-S Färbung gleiche Proteinmengen.....	41
Abbildung 7: Kastengrafikdarstellung der Quantifizierung der PSMA-Expression mittels Durchflusszytometrie in LNCaP (n=16), LNCaP mit Docetaxel (n=11), LNCaP C4-2 (n=17) und LNCaP C4-2 mit Docetaxel (n=11).....	42
Abbildung 8: Kastengrafikdarstellung der [¹⁸ F]FDG- und [¹⁸ F]Cholin-Aufnahme in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen. Dargestellt wird die relative Aufnahme des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.....	43
Abbildung 9: Kastengrafikdarstellung der [⁶⁸ Ga]PSMA-Tracerbindung an LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen. Dargestellt wird die relative Bindung des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.	44
Abbildung 10: Kastengrafikdarstellung der [¹⁸ F]FDG-Aufnahme in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit und ohne Docetaxelbehandlung. Dargestellt wird die relative Aufnahme des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.	45

Abbildung 11: Kastengrafikdarstellung der [¹⁸ F]Cholin-Aufnahme in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit und ohne Docetaxelbehandlung. Dargestellt wird die relative Aufnahme des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.	46
Abbildung 12: Kastengrafikdarstellung der [⁶⁸ Ga]PSMA-Tracer-Bindung in LNCaP und LNCaP C4-2 Zellen mit und ohne Docetaxelbehandlung. Dargestellt wird die relative Bindung des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität.	47
Abbildung 13 a + b: Auftragung der Korrelation der durchflusszytometrisch bestimmten PSMA-Expression (MFI/Geo-Mean) mit der relativen [⁶⁸ Ga]PSMA-Tracer-Bindung von LNCaP (10a; r = 0,89, p = 0,02) und LNCaP C4-2 Zellen (10b; r = 0,90, p = 0,04). Dargestellt wird die relative Bindung des Tracers in Bezug auf die initial zugegebene Aktivität. Korrelation (r) mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman überprüft	48
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Quantifizierung der mit fluoreszierender siRNA markierten Zellen, schwarze Kurve entspricht den unmarkierten Zellen, grün entspricht den mit Fluoreszenz markierten Zellen, der Marker M1 entspricht dem Anteil fluoreszierenden Zellen an allen Zellen und ist > 80 %, 1 von 1 gezeigt, die X-Achse gibt die Fluoreszenzintensität an	49
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung (5 von 8) des PSMA-Knockdown in LNCaP Zellen im Western-Blot. MOCK bezeichnet untransfizierte Zellen, Negativkontrolle wurde mit scrambled siRNA durchgeführt; die Ponceau-S Färbung (zweite Reihe) färbt Proteine reversibel an und ermöglicht einen Proteinmengenabgleich, hier zeigt die Ponceau-S Färbung gleiche Proteinmengen	50
Abbildung 16: Relative Proliferationsrate von LNCaP und LNCaP KD Zellen. Die Proliferationsrate wurde für beide Zelllinien mittels CFSE für 72 Stunden bestimmt und verglichen (n=4).	50
Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurve für LNCaP (schwarz), LNCaP Knockdown (grün) und PC-3 Zellen (blau). Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde mittels CFSE-Assay nach 48 h Docetaxelbehandlung ermittelt. Mittelwerte ± Standardabweichung, n=5	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der Tumorkategorien beim Prostatakarzinom nach 7. Auflage TNM-Klassifikation [137].....	4
Tabelle 2: Zusammensetzung der Tris-gepufferten Salzlösung (TBS)	23
Tabelle 3: Zusammensetzung der Puffer für Western-Blot.....	24
Tabelle 4: Zusammensetzung der 10 % SDS-Gele für Western-Blot	24
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese.....	33
Tabelle 6: Zusammensetzung eines Versuchsansatzes für qPCR	34
Tabelle 7: Charakteristika der verwendeten Prostatakarzinomzelllinien	38
Tabelle 8: Medianwerte mit höchstem und niedrigstem Wert (Bereich) der Tracer-Aufnahme-/Bindeversuche mit [¹⁸ F]FDG, [¹⁸ F]Cholin und [⁶⁸ Ga]PSMA; Anzahl der Versuchswiederholungen ist mit n angegeben.	83

Abkürzungsverzeichnis

[¹⁸ F]FDG	[¹⁸ F]2'-Fluor-2'-desoxy-D-glucose
[⁶⁸ Ga]PSMA	[⁶⁸ Ga]PSMA I&T
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AS	Aminosäuren
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	CC-Chemokinligand 2
cDNA	Komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: deoxyribonucleic acid
DRU	Digital-rektale Untersuchung
FACS	„fluorescence-activated cell scanning“, generischer Begriff für die Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
Geo-Mean	Geometrischer Mittelwert

h	Stunde/n
HSP	Hitzeschockprotein
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
KD	knockdown
LD50	Mittlere letale Dosis
MDRP	Multidrug-Resistenz-Protein
MFI	„mean fluorescenceintensity“, mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MIC-1	macrophage inhibitory cytokine 1
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOCK	Transfektion ohne siRNA
mRNA	Boten-RNA, engl.: messenger RNA,
MRT	Magnetresonanztomographie
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase-chain-reaction
PET	Positronenemissionstomographie/-tomogramm
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid,
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF-β1	transforming growth factor beta 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRUS	Transrektaler Unterschall
xg	Relative Zentrifugalkraft

Anhang

Tabelle 8: Medianwerte mit höchstem und niedrigstem Wert (Bereich) der Tracer-Aufnahme-/Bindeversuche mit [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]Cholin und [⁶⁸Ga]PSMA; Anzahl der Versuchswiederholungen ist mit n angegeben.

Medianwerte in %	[¹⁸F]FDG (Bereich)	n	[¹⁸F]Cholin (Bereich)	n	[⁶⁸Ga]PSMA (Bereich)	n
LNCaP	4,45 (2,55 - 6,23)	11	9,76 (5,21 - 12,9)	9	0,9 (0,65 - 1,5)	9
LNCaP + Doc	2,65 (1,65 - 4,5)	8	5,44 (3,59 - 8,57)	7	1,12 (0,78 - 1,51)	6
LNCaP C4-2	7,29 (5,33 - 11,7)	10	7,64 (5,04 - 13,08)	9	0,74 (0,35 - 1,15)	9
LNCaP C4-2 + Doc	3,48 (1,5 - 6,42)	8	2,88 (0,15 - 6,88)	8	0,82 (0,57 - 1,05)	7

Danksagung

Ich möchte hiermit allen danken, durch deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit zustande kommen konnte.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Buck für die tatkräftige Unterstützung sowie für sein persönliches Engagement bei der Fertigstellung meiner Dissertation bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Lückerath bedanken für die Bereitstellung des Themas, für ihre kritische Kontrolle und ihr fachliches Wissen sowie ihre umfassende Unterstützung beim Anfertigen der Dissertationsschrift.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Frau Albert bedanken, ohne deren Anleitung und Unterstützung die Durchführung der Experimente im Labor nicht möglich gewesen wäre.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors der urologischen Klinik der Universität Würzburg bedanken, die mir die Zelllinien zur Verfügung stellten sowie mir in speziellen Fragestellungen weiterhalfen. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. A. Beer, Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Ulm, für die Bereitstellung von Zelllinien.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, für die anregenden Kommentare, Diskussionen und die Unterstützung, insbesondere während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Philipp Emanuel Hartrampf

Schulbildung

09/1997 - 07/2001 Grundschule Krumbach
09/2001 - 06/2010 Simpert-Kraemer-Gymnasium Krumbach
06/2010 Abitur

Zivildienst

07/2010 – 12/2010 KKH Günzburg-Krumbach, chirurgische Abteilung

Hochschulstudium

05/2011 – 2017 Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
03/2013 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2016 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2016 – 10/2017 Praktisches Jahr:
1. Terial: Caritas-Krankenhaus Bad
Mergentheim, Innere Medizin
2. Terial: HNO-Klinik Uniklinik Würzburg
3. Terial: Missioklinik des Klinikums Würzburg
Mitte, Chirurgie
11/2017 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Würzburg, den 30.01.2018