

**Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Andreas Buck**

**In-vitro-Untersuchung zum Einfluss von Therapeutika auf die PSMA- und
CXCR4-Rezeptorexpression in humanen Prostatakarzinomzelllinien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

**Marian Saam
aus
Budapest**

Würzburg, Dezember 2020

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Buck
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Kübler
Dekan: Prof. Dr. Matthias Forsch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Prostatakarzinom.....	1
1.2	Klinische Manifestationsformen des Prostatakarzinoms	1
1.3	Epidemiologie	1
1.4	Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.5	Prostata-spezifische hormonelle Regulation der Prostata	2
1.6	Klassifikation.....	5
1.6.1	Gleason Score	5
1.6.2	TNM-Klassifikation.....	6
1.7	Diagnostik.....	7
1.7.1	Prostata-spezifischer Antigen-PSA-Serumspiegel.....	7
1.7.2	Bildgebende Verfahren des Prostatakarzinoms	9
1.7.3	Prostata-spezifisches Membranantigen.....	11
1.7.4	CXCR4-Rezeptor	11
1.8	Therapie.....	13
1.8.1	Androgenentzugstherapie bei hormonsensitivem Prostatakarzinom	13
1.8.2	Therapie und Ätiologie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms .	14
1.8.2.1	Chemotherapie mit Docetaxel.....	14
1.8.2.2	Endokriner Therapie mit Abirateron.....	15
1.8.2.3	Antiandrogentherapie mit Flutamid	16
1.8.2.4	PSMA-Radioliganden-Therapie	16
2	Zielstellung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.2	Kulturmedium und Zusätze	20
3.3	Antikörper	20
3.4	Statistische Auswertungen	20
3.5	Auswertung, Gruppenanalyse	20
3.6	Zelllinien	21
3.6.1	PC-3.....	21

3.6.2	LNCaP	21
3.6.3	LNCaP C4-2.....	22
3.7	Zellkultivierung	22
3.7.1	Auftauen der Zelllinien	22
3.7.2	Subkultivierung der Zelllinien	22
3.7.3	Zellzahlbestimmung.....	23
4	Durchflusszytometrie	24
4.1	Fluorochrome	25
5	Untersuchungsmethoden.....	26
5.1	In-vitro-Untersuchung der dosisabhängigen Zellproliferation	26
5.2	CFSE-Färbung.....	27
5.3	Oberflächenfärbung mit PSMA-AK und CXCR4-AK.....	27
5.4	Aufnahme bzw. Bindung von Radiotracer	28
5.4.1	Tracer	28
5.4.2	Zellbindungsuntersuchung, Uptake mit ⁶⁸ Ga-PSMA in humanen LNCaP-Zelllinien nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol, Abirateron und Docetaxel.....	29
5.4.3	Auswertung der Tracer- ⁶⁸ Ga-PSMA-11-Bindung	29
6	Ergebnisse.....	31
6.1	<i>In-vitro</i> -Analyse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinien LNCaP, LNCaP C-4 und PC 3 nach Exposition mit Testosteron, Estradiol und Flutamid	31
6.1.1	LNCaP	31
6.1.2	LNCaP C4-2.....	32
6.1.3	PC 3.....	35
6.2	Dosisabhängige In-vitro-Expression von CXCR4- und PSMA-Rezeptoren nach Hormontherapie.....	38
6.2.1	Dosisabhängige PSMA-Expression unter Hormontherapie	38
6.2.1.1	LNCaP.....	38
6.2.1.2	LNCaP C4-2	39
6.2.1.3	PC-3.....	40
6.2.2	CXCR4-Expression unter Hormontherapie.....	41
6.2.2.1	LNCaP.....	41
6.2.2.2	LNCaP C4-2	42
6.2.2.3	PC 3.....	43

6.3	Konzentrationsabhängige CXCR4-Expression und PSMA-Expression nach Hormontherapie in Kombination mit Abirateron und Docetaxel.....	44
6.3.1	LNCaP.....	45
6.3.2	LNCaP C-4.....	47
6.4	<i>In-vitro</i> -Untersuchung der Bindung des ⁶⁸ Ga-PSMA-Liganden in humaner LNCaP-Prostatazelllinie nach vorangegangener Hormontherapie mit Testosteron und Estradiol sowie Chemotherapie mit Docetaxel und Abirateron und deren Kombinationen.....	49
7	Diskussion.....	52
8	Zusammenfassung.....	58
9	Literaturverzeichnis.....	59
	Abbildungsverzeichnis.....	64
	Tabellenverzeichnis.....	67
	Abkürzungsverzeichnis.....	68
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist in Europa und Nordamerika die häufigste bösartige Tumorerkrankung des Mannes.¹ Es werden in Deutschland jährlich etwa 60.000 Neuerkrankungen verzeichnet. Obwohl die indolenten Formen der Erkrankung eine gute Prognose aufweisen, zählt das Prostatakarzinom neben dem Lungen- und dem kolorektalen Karzinom zu den drei am häufigsten zum Tode führenden Krebserkrankungen des Mannes.² Die hohe Prävalenz, das langsame Fortschreiten der Erkrankung und die negativen Einflüsse von Therapiemaßnahmen auf die Lebensqualität verleihen dem Prostatakarzinom eine hohe sozioökonomische Bedeutung.¹

1.2 Klinische Manifestationsformen des Prostatakarzinoms

Nach der gültigen WHO-Klassifikation wird zwischen den benignen Tumoren und Krebsvorstufen von den malignen Veränderungen der Prostata unterschieden. Zu den gutartigen und präkanzerösen Veränderungen zählen die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH), die atypische mikroazinäre Proliferation (ASAP), die geringgradige prostatistische intraepitheliale Neoplasie (LG-PIN) und die hochgradige prostatistische intraepitheliale Neoplasie (HG-PIN).

Die Einteilung der malignen Veränderungen der Prostata erfolgt nach ihrem Ursprung. Am häufigsten finden sich Plattenepithelkarzinome, welche von der oberflächlichen Epithelschicht ausgehen und Adenokarzinome, welche ihren Ursprung im darunterliegenden Drüsengewebe haben. Dagegen sind vom Muskel- und Bindegewebe der Prostata ausgehende Sarkome eher selten.

1.3 Epidemiologie

Das mittlere Erkrankungsalter des Prostatakarzinoms liegt bei ungefähr 70 Jahren. Die Inzidenz der Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter deutlich an. So ist das Risiko eines 70-jährigen Mannes, in den folgenden zehn Jahren an einem Prostatakarzinom zu erkranken, etwa 60-mal höher als eines 40-jährigen Mannes.² Die altersstandardisierte Erkrankungshäufigkeit steigt ab dem 55 Lebensjahr steil an. In Deutschland sterben

jährlich ca. 12.000 Patienten an den Folgen eines Prostatakarzinoms. Infolge des demografischen Wandels wird bis zum Jahr 2050 der Anteil der über 60-Jährigen Männer auf ca. 28 Millionen ansteigen und infolge dessen die Inzidenz und Mortalität von Prostataerkrankungen weiter zunehmen.¹

1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt, aber es zeichnet sich ab, dass das Alter, fett- und eiweißreiche Ernährung, genetische Faktoren, die hormonelle Stimulation sowie lokal entzündliche Prozesse hierbei von Bedeutung sind.³

Als Grundlage für die Beschreibung und Beurteilung der Prostata dient das Modell nach McNeal. Demnach wird die Prostata nach ihrer Embryogenese und Histogenese in die Innenzone (zentrale Zone der Prostata), welches die Samenwege umgibt und 20 % Drüsengewebe stellt (Ursprungsort von 10 % der Prostatakarzinome), in die Transitionalzone (Ursprungsort 15 bis 20% der Prostatakarzinome) und in die periphere Zone, welche 70% der Drüsenabschnitte beinhaltet (Ursprungsort von 70 bis 75 % der manifesten Prostatakarzinome) eingeteilt.

Eine kurative Behandlung, wie zum Beispiel eine radikale Prostatektomie, perkutane Strahlentherapie oder Brachytherapie, ist meist nur im organbegrenzten Stadium des Prostatakarzinoms (PCa) möglich. Unbehandelt breitet sich das PCa zunächst langsam innerhalb der Prostata aus. Im Verlauf kann es deren Kapsel aber durchbrechen und Metastasen ausbilden.⁴

1.5 Prostataspezifische hormonelle Regulation der Prostata

Die Prostata steht zeitlebens unter hormonellen Einflüssen. Androgene mit dem Hauptvertreter Testosteron und Östrogene bilden die Sexualhormone des Mannes. Einzelne Areale der Vorsteherdrüse reagieren unterschiedlich auf diese Keimdrüsenhormone. Die Kenntnis über ihre Funktionen, Regelkreise und die Möglichkeit ihrer Beeinflussung sind bei der Behandlung des Prostatakarzinoms von erheblicher Bedeutung.³

Testosteron

Testosteron ist das wichtigste männliche Sexualhormon. Das Steroidhormon wird über Zwischenschritte aus Cholesterin in den Leydig'schen Zellen des Hodens und in der Nebennierenrinde produziert. Von dort gelangt es im Blut an Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) gebunden zu den Zielzellen. Bildung und Freisetzung in den Leydig-Zellen werden vom Hypothalamus über die Hypophyse unter Einfluss übergeordneter Hirnareale mit Beteiligung von follikel-stimulierendem Hormon (FSH), luteinisierendem Hormon (LH), LH-Releasing-Hormon (LH-RH) und Inhibin gesteuert. Gleichwohl erfolgt aufgrund einer steigenden Testosteron-Serumkonzentration eine negative Rückkopplung mit verminderter LH-Sekretion aus der Hypophyse.⁵

Bei der Biosynthese des Testosterons entsteht zunächst durch oxidative Spaltung Pregnenolon. Anschließend werden unter Mitwirkung von Cytochrom-P-450-(CYP17A1) zwei Kohlenstoffatome abgespalten. Nach erfolgter Oxidation der 3 β -Hydroxylgruppe entsteht anschließend Androstendion. Zuletzt wird die Ketogruppe am C17 von der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase reduziert, wodurch Testosteron entsteht.⁵

Die anatomische und funktionelle Differenzierung der Prostata ist von der Testosteronkonzentration abhängig. Freies Testosteron wird in die Prostata aufgenommen und fast vollständig und irreversibel durch die 5-Alpha-Reduktase in das biochemisch wirksamere Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt.⁵ DHT bindet mit einer deutlich höheren Affinität zum Androgenrezeptor als Testosteron und kann nicht zu Estradiol aromatisiert werden.⁵ Patienten mit einem 5-alpha-Reduktasedefekt und dadurch verminderter DHT-Konzentration entwickeln kaum eine benigne Prostatahyperplasie. Hierbei gilt eine Hyperplasie der Prostata als Vorstufe eines Prostatakarzinoms.⁵

Die Androgenabhängigkeit des PCa erklärt das gute Ansprechen auf eine Androgenentzugstherapie. Neben dem Testosteron ist der Androgenrezeptor selbst für die Androgenwirkung verantwortlich. Die Höhe des Testosteronspiegels wird auch durch die Aktivität des Rezeptors beeinflusst.⁵ Die Androgenrezeptor-Genregion ist polymorph. Mutationen und das Vorhandensein von Androgenrezeptor-Co-Aktivatoren können Einfluss auf die Entstehung und Progression eines Prostatakarzinoms ausüben.⁶ Dies unterstreicht, dass das Prostatawachstum vielfältigen Variablen unterliegt, die

wiederum auf den Stimulus Testosteron reagieren und so zu unterschiedlichen Wirkungen des Hormons führen.⁶ Das Vorliegen eines Prostatakarzinoms stellt eine Kontraindikation zur Testosteronsubstitution dar. Ob Testosteron eine Transformation von präklinischen Formen des Karzinoms zum klinisch manifesten Tumor bewirkt, ist nicht bekannt.⁵ Bekannt dagegen ist das androgenabhängige Wachstum des Prostatakarzinoms bei jungen Männern.⁵

Östrogen

Die Rolle des Östrogenrezeptors bei der Entstehung des Prostatakarzinoms ist noch nicht abschließend geklärt. Es wurden zwei verschiedene Östrogenrezeptoren im Prostatagewebe identifiziert - der Östrogenrezeptor α , welcher im Stroma und in der Basalzellschicht exprimiert wird und der Östrogenrezeptor β , der überwiegend in sekretorischen Prostataepithelzellen zu finden ist. Beide Rezeptoren kommen auch in zahlreichen anderen Geweben vor und binden Östradiol und andere Östrogene sowie auch Östrogenantagonisten. Eine Reihe von Befunden sprechen dafür, dass der Östrogenrezeptor α bei der Entstehung von Prostatakarzinomen eine bedeutende Rolle spielt.⁷ In der Prostata wird die Bildung von Wachstumsfaktoren durch den Östrogenrezeptor α vermittelt, wodurch die Proliferation des Prostatagewebes angeregt wird. Somit wird die Proliferation stimuliert und die Zelldifferenzierung gehemmt. Welche Rolle der Östrogenrezeptor- α bei der Entstehung des Prostatakarzinoms spielt, ist aber noch nicht eindeutig geklärt.⁷ Die Östrogene beim Mann entstehen überwiegend aus Testosteron. Die Synthese erfolgt unter Mitwirkung der P450-Aromatase in Fettgewebe, Nebenniere, Hoden und in der Prostata.⁷ Während der Testosteronspiegel im Alter abnimmt, steigt das Östrogen-Androgen-Verhältnis in der Prostata an. Beide Rezeptoren sind auf unterschiedliche Weisen an der Tumorprogression beteiligt.⁷ Sie regulieren die Fusion des androgenregulierten Gens TMPSS 2 (transmembran protease serine 2) und des Gens ERG. Bemerkenswerterweise tragen 40% bis 60% aller Prostatakarzinome die Fusionsvariante TMPSS 2-ERG.⁷

1.6 Klassifikation

1.6.1 Gleason Score

1966 veröffentlichte Donald Gleason ein einfaches Gradierungssystem, welches auf einer Analyse der Architektur des Tumormusters beruht. Er beschrieb die Übergänge der Tumorentdifferenzierung, ausgehend von hochdifferenzierten reifen und daher biologisch harmlosen Tumordrüsen (Muster 1) bis zu aggressiven, entdifferenzierten Tumoranteilen (Muster 5) in fünf Stufen (siehe Tabelle 1). Die Zytologie ist in dieser Einteilung ohne Bedeutung. Der Gleason-Score wird aus der Addition der zwei häufigsten Gleason-Grade gebildet. Nach der ISUP-Modifikation von 2005 wurde ein sogenanntes Drittmuster eingeführt. Es wurde festgelegt, dass beim Vorliegen dreier unterschiedlicher Muster das führende und das aggressivste Muster kombiniert werden sollen. Im Jahre 2014 wurde diese Einteilung von der ISUP nochmals modifiziert und spezifiziert. Es entstand ein neues prognostisches Gruppensystem für das Adenokarzinom der Prostata.

Prognosegruppe	Gleason-Score	Wertung
1	Gleason-Score 3+3	exzellente Prognose
2	Gleason-Score 3+4=7a	sehr gute Prognose, seltene Metastasierung
3	Gleason-Score 4+3=7b	mässig gute Prognose
4	Gleason-Score 8	schlechte Prognose
5	Gleason-Score 9-10	ernste Prognose

Tabelle 1: Prognoseeinteilung nach International Society of Urological Pathology (ISUP) 2014

Durch die weltweit einheitliche Anwendung des Graduierungssystems wurde die Grundvoraussetzung zur Durchführung und Auswertung von Studien und damit Evaluation von Therapieoptionen geschaffen.

1.6.2 TNM-Klassifikation

Die anatomische Ausbreitung des Tumors wird durch die TNM-/pTNM-Klassifikation beschrieben, wobei **T** die Größe des Primärtumors, **N** den Befall der regionären Lymphknoten und **M** das Vorhandensein von Fernmetastasen beschreibt (siehe Tabelle 2). Die für die Therapie maßgebliche Einstufung ist jeweils die höchste Kategorie.

T	Primärtumor	
	TX	Primärtumor nicht beurteilbar
	TO	kein Anhalt für Primärtumor
	T1	klinisch nicht erkennbar, nicht tastbar, in bildgebenden Verfahren nicht sichtbar
	T1a	histologischer Zufallsbefund in < 5% des resezierten Gewebes
	T1b	histologischer Zufallsbefund in > 5% des resezierten Gewebes
	T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
	(p)T2	Tumor Organbegrenzt
	(p)T2a	Tumor befällt die Hälfte oder weniger eines Lappens
	(p)T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
	(p)T2c	Tumor in beiden Lappen
	(p)T3	Tumor durchbricht die Kapsel
	(p)T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung, Infiltration des Blasenhalses
	(p)T3b	Primärtumor nicht beurteilbar
	(p)T4	kein Anhalt für Primärtumor
		klinisch nicht erkennbar, nicht tastbar, in bildgebenden Verfahren nicht sichtbar
N	Lymphknotenbefall	
	(p)NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	(p)N0	keine reionäre Lymphknotenmetastasen
	(p)N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen	
	(p)M0	keine Fernmetastasen
	(p)M1	Fernmetastasen
	(p)M1a	nicht regionäre Lymphknoten befallen
	(p)M1b	Knochenmetastasen
	(p)M1c	andere Lokalisation

Tabelle 2: TNM-/pTNM-Klassifikation [UICC 2017]⁴

Neben Gleason-Score und TNM-Klassifikation sind noch andere Grading-Systeme entwickelt worden. Erwähnt werden sollte das deutsche System nach Helpap, welches neben dem histologischen Muster auch den Grad der Kernatypien einschließt.

1.7 Diagnostik

Prostatakarzinome in den Anfangsstadien können kurativ ausreichend behandelt werden. Diese Tatsache und der lange zeitliche Abstand zwischen dem ersten Nachweis histologischer Veränderungen und dem Auftreten klinischer Symptome misst der Früherkennung eine bedeutende Stellung zu.⁸ Deren Ziel ist die Identifikation organbegrenzter aggressiver Tumore bei asymptomatischen Männern.¹ Da die Mehrzahl der Karzinome im peripheren Drüsenanteil entsteht, verursacht das lokal begrenzte Prostatakarzinom keine Beschwerden.⁹ Das Vorhandensein von Beschwerden - Knochenschmerzen, Miktionsbeschwerden, Hämospemie oder Impotenz - lässt auf das Vorliegen eines lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinoms schließen.⁹

1.7.1 Prostataspezifischer Antigen-PSA-Serumspiegel

Das Prostataspezifische Antigen (PSA) ist eine Glykoprotein-Serin-Protease, die ausschließlich in den Epithelzellen der Prostata gebildet wird. Ihre Hauptaufgabe ist die durch Proteolyse vermittelte Verflüssigung des seminalen Koagulum nach Ejakulation.⁹ PSA zirkuliert im Serum in freier und gebundener Form, letztere kann mittels diagnostischer Tests bestimmt werden.

Die qualitative Bestimmung von PSA kann sowohl zur Verlaufskontrolle eines bereits diagnostizierten Prostatakarzinoms als auch zur Detektion einer Prostataerkrankung bei asymptomatischen Männern eingesetzt werden. Seit seiner Entdeckung im Jahr 1979 wurde die Bedeutung dieses Markers bei der Früherkennung durch Studien belegt.¹⁰ Im Rahmen der Krebsvorsorgeuntersuchung besteht in Deutschland daher eine Aufklärungspflicht über die Möglichkeit einer PSA-Bestimmung zur Früherkennung des Prostatakarzinoms. Jedoch sind Sensitivität und Spezifität von der Definition des Schwellenwertes abhängig. Bei dem zumeist verwendeten Grenzwert von 4 ng/ml ist die Sensitivität zur Detektion eines Prostatakarzinoms hoch.¹ Zwar ist PSA prostataspezifisch, aber anderweitige Veränderungen der Prostata, beispielsweise eine benigne Prostat hyperplasie oder eine akute Prostatitis, können ebenfalls eine Erhöhung hervorrufen. Laut Leitlinienempfehlung sollten zur Beurteilung des PSA-Wertes daher alle anamnestischen, laborchemischen und körperlichen

Untersuchungsbefunde berücksichtigt werden und ab einem Grenzwert von 4ng/ml eine weitere Abklärung mittels einer Prostata-Biopsie in Erwägung gezogen werden.

1.7.2 Bildgebende Verfahren des Prostatakarzinoms

Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wird nach einem negativen Biopsiebefund und gleichzeitig ansteigendem oder auffälligem PSA-Wert zur Detektion eines Prostatakarzinoms angewandt.¹¹ Die multiparametrische MRT (mpMRT) stellt die Methode der Wahl dar. Das Verfahren besteht aus hochauflösenden T2-gewichteten (T2w-)Sequenzen und den multiparametrischen Methoden der diffusionsgewichteten MRT (DWI), dynamischen kontrastmittelgestützten MRT (DCE-MRT) und Protonen-MR-Spektroskopie (¹H-MRS).¹¹ Die Genauigkeit der Tumordetektion wird unter Einbeziehung dieser funktionellen Methoden gesteigert.¹¹

Positronenemissions-Tomographie/Computertomographie

Die Positronenemissions-Tomographie-Computertomographie (PET/CT) ist eine Kombination aus zwei unterschiedlichen bildgebenden Verfahren und ermöglicht als nicht-invasive Untersuchungsmethode eine Visualisierung sowohl des Tumors als auch von Metastasen. Als Grundlage dient das von Hevesy begründete „Tracer-Prinzip“, wobei kleinste Mengen Radioaktivität, Spurenerzeuger (Tracer) genannt, in den Stoffwechselprozess eines Patienten eingebracht werden, ohne diesen zu beeinflussen. Mittels Detektoren wird die Verteilung der Radioaktivität im Körper gemessen und die biochemischen Vorgänge, an denen der Tracer teilnimmt, werden visualisiert.¹² Der Tracer besteht aus einem biologisch aktiven Molekül und einem radioaktiven Teil. Bei der Positronenemissions-Tomographie (PET) werden Radionuklide verwendet, welche bei ihrem Zerfall Positronen aussenden. Nach kurzer Distanz treten diese in Wechselwirkung mit jeweils einem Elektron. Beide Teilchen werden dabei vernichtet und es entstehen zwei Photonen (Gammastrahlung), die sich in einem Winkel von 180° voneinander entfernen.¹³ Diese Photonen treffen gleichzeitig an zwei Stellen auf den Detektorring und ermöglichen damit die schichtweise Messung der Aktivitätsverteilung.¹³ Die für die Schwächungskorrektur notwendigen Daten werden durch die mit einer CT (Computer-Tomographie) ermittelten Schwächungskoeffizienten geliefert. Eine dreidimensionale Rekonstruktion der vorliegenden Aktivitätsverteilung erfolgt durch die Anwendung weiterer Algorithmen. Messtechnisch sind alle Positronenstrahler mittels PET detektierbar. Im Rahmen der medizinischen Anwendung spielen ihre Halbwertszeit für die Geschwindigkeit der zu visualisierenden biologischen

Prozesse, ihre maximale β^+ -Energie für die Auflösung der PET-Bilder und ihre Verfügbarkeit für die Herstellung von Bedeutung. Die bei der PET-Bildgebung häufig verwendete 2-¹⁸F-Fluorodesoxyglukose (FDG), deren Verwendung auf dem erhöhten Glukoseverbrauch in Tumorzellen beruht, ist für Diagnostik und Therapie von Prostatakarzinomen aufgrund relativ langsamer Proliferationsraten und eines damit nur gering gesteigerten Glukosemetabolismus nicht geeignet.

Als eine aktuell sehr vielversprechende Anwendung der PET/CT im Hinblick auf das Prostatakarzinom gilt derzeit das prostataspezifische Membranantigen (PSMA). Gekoppelt wird dieser Ligand an das Radionuklid ⁶⁸Ga.¹⁴ ⁶⁸Ga-PSMA ist sowohl hinsichtlich Speicherintensität als auch Kontrast besonders bei niedrigen PSA-Werten und hohem Gleason-Score der Cholin-PET/CT überlegen.¹⁴ Die ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT ermöglicht die hochsensitive Detektion von Metastasen eines Prostatakarzinoms in einer Größenordnung von wenigen Millimetern.¹⁴

Im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg unter der Leitung des Wissenschaftlers Klaus Kopka wurde eine Serie PSMA-gerichteter Radioliganden für die nicht invasive PET-Bildgebung und Endotherapie des Prostatakarzinoms entwickelt. Ein neuer Therapieansatz könnte die multimodale Bildgebung oligometastasierter Prostatakarzinome sein. Diese ermöglichen die Lokalisation und gleichzeitige Resektion von Läsionen. Dabei dienen das radioaktive Signal zur präoperativen Bildgebung mittels PET/CT und das Fluoreszenzsignal zur intraoperativen Detektion und Abgrenzung der Läsionen.¹⁵

Einen besonderen Fortschritt der personalisierten Therapie in der Nuklearmedizin stellt die peptidvermittelte Radio-Liganden-Therapie mit Lu-177-PSMA (Radio-Liganden-Therapie, PRLT) für Patienten insbesondere im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung dar, die auf eine Hormon- und/oder Chemotherapie nicht mehr ansprechen.¹⁴ Wenn eine Krankheit mit einem diagnostischen Radiopeptid dargestellt und darauf folgend mit einem chemisch fast identischen therapeutischen Radiopeptid behandelt wird, dann wird dies als Theranostik bezeichnet.¹⁶

1.7.3 Prostataspezifisches Membranantigen

Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) ist ein zellmembranständiges Enzym das neben der Prostata auch in der Niere, dem proximalen Dünndarm, in den Speicheldrüsen aber auch in der Leber und Milz vorkommt. Auch findet es sich auf Zellen der Neovaskulatur anderer Tumorarten.¹⁸ Seine Expression im Prostatagewebe ist ca. 1000-mal höher als in anderen Geweben.¹⁹ Lokalisiert ist PSMA im unveränderten Gewebe auf der apikalen Seite des die Drüsengänge auskleidenden Epithels. Bei pathologischer Veränderung des Prostataepithels kommt es zu einer Expression auf der luminalen Seite der Drüsengänge.¹⁴ Mit steigendem Progressions- und Metastasierungsgrad nimmt auch die Expression von PSMA zu. PSMA wird als ein Typ-II-Membranprotein betrachtet. Bei Typ-II-Membranproteinen weist das aminoterminele Ende eine intrazelluläre Orientierung auf und verfügt über einen langen extrazellulären carboxyterminalen Anteil.¹⁸ PSMA kann extrazellulär gebundene Liganden ins Innere der Zelle aufnehmen. Seine Beteiligung in der neuroendokrinen Regulation des Prostatawachstums und der Zelldifferenzierung ist anzunehmen.¹⁸ Diese Eigenschaft wird von neu entwickelten Liganden für nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie genutzt. Um enzymatisch aktiv zu sein, muss PSMA glykosiliert und als Dimer vorliegen.²⁰

1.7.4 CXCR4-Rezeptor

CXCR4 gehört zu der Gruppe der Chemokine. Diese sind kleine basische Moleküle mit chemotaktischen Eigenschaften. Über 50 verschiedene humane Chemokine sind bislang identifiziert worden. Ihre Einteilung in Unterfamilien erfolgt anhand der relativen Position ihrer Cysteinreste (C). Derzeit wird von vier Unterfamilien ausgegangen, wobei die α -(CXC)-Chemokine und β -(CC)-Chemokine die größte Gruppe bilden.²¹ Im Jahr 1996 entdeckten Feng et al. den CXC-Motiv-Chemokinrezeptor Typ 4 (CXCR4, auch CD 184) als Kofaktor für das Andocken und Eindringen des HIV-Virus in die menschlichen T-Zellen. Chemokine binden an spezifische Rezeptoren.²¹ Diese gehören der Gruppe G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Domäne Rezeptoren an. Sie sind in der Lage, mittels Chemotaxis eine Zellmigration zu induzieren.²¹ Chemokin-Rezeptoren kommen auf unterschiedlichen Zellen wie Endothelzellen, Muskelzellen, Gliazellen und Neuronen vor, werden aber überwiegend auf hämatopoetischen Zellen exprimiert.²¹ Der Chemokingradient ist bei der direkten Zellbewegung sowohl bei normalen als auch bei

pathologischen Vorgängen von zentraler Bedeutung.²² Maligne Tumoren mit komplexen Netzwerken von Chemokinen können die Leukozyteninfiltration und Angiogenese beeinflussen und gewinnen so besondere Bedeutung in Verbindung mit Tumorwachstum und Metastasierung.²³

Der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 wurde nach seiner Entdeckung zunächst als LESTR (leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor) bezeichnet. Seine Beteiligung an der Aktivierung von inflammatorischen Zellen war bereits bekannt.²⁴ Im Jahr 2001 konnte in einer Studie zum Mamakarzinom der Zusammenhang zwischen Chemokinrezeptoren und Tumormetastasierung gezeigt werden.²⁴ Tumorgewebe zeichnet sich durch ein komplexes Chemokin-Netzwerk aus. Dieses ist für Ausdehnung und Phänotyp des Infiltrats spezifisch und beeinflusst Angiogenese, Migration und Wachstum der Tumorzellen.²²

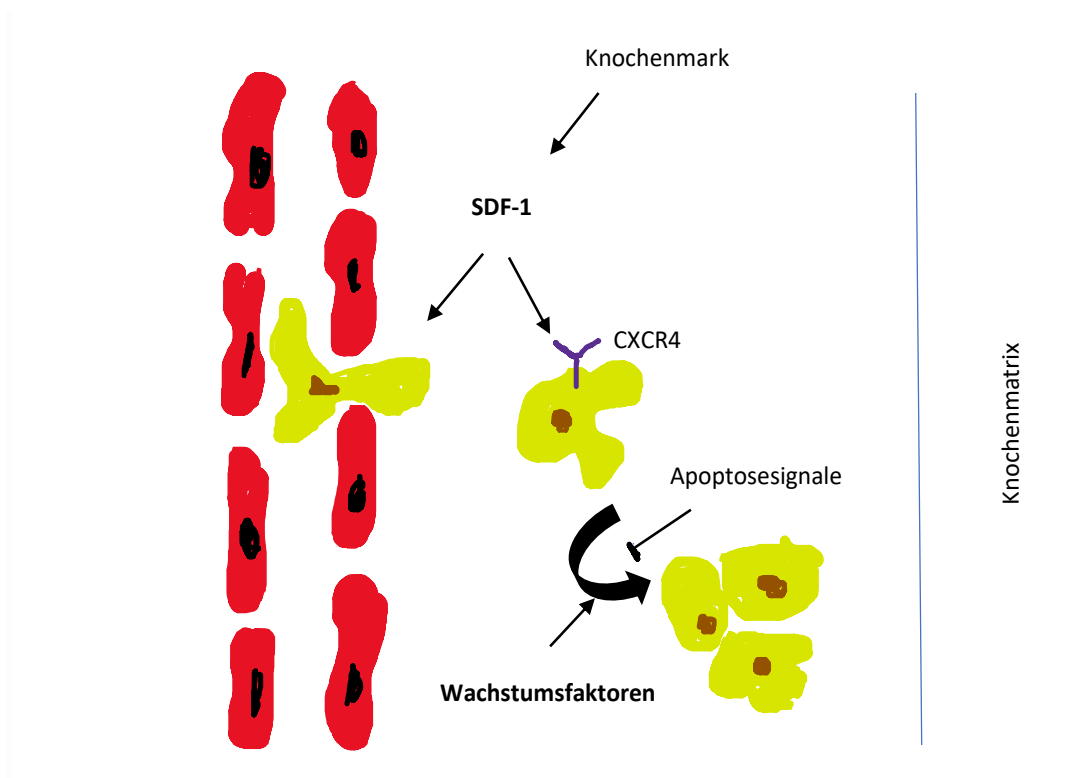


Abbildung 1: Die Rolle der CXCR4-SDF-1-Achse für die Entwicklung von Knochenmetastasen: Das Modell zeigt schematisch die Infiltration zirkulierender Prostatakarzinomzellen in das Knochenmark (modifiziert nach Crump Mp, Gong J, Loetscher P et al.)²⁵

Die selektive Infiltration der Zielorgane basiert auf der transienten Interaktion der Tumorzellen mit endotheliale E-Selektin, was eine direkte Adhärenz und Nähe zu Zielorganen wie das Knochenmark vermittelt.²⁵ Für die Knochenmetastasierung des Prostatakarzinoms ist die CXCR4-SDF-1-Achse von besonderer Bedeutung, da diese auch die Einwanderung von hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark steuert. Osteoblasten produzieren und sezernieren den Liganden SDF-1 (stromal cell derived factor-1) und rekrutieren hämatopoetische Zellen.²⁶ Aber auch die Infiltration zirkulierender, an der Oberfläche den CXCR4-Rezeptor tragender Prostatakarzinomzellen in das Knochenmark, wird vom SDF-1-Gradienten vermittelt.²⁶ Dieser Wirkmechanismus (siehe Abbildung 1) ist besonders bei der Entstehung von Metastasen von Bedeutung.²⁵ CXCR4 wird sowohl in Prostatakarzinomen als auch in deren Metastasen überexprimiert und bildet damit eine neue Zielstruktur für zukünftige neue theranostische Tracer. Dagegen wird sein Ligand SDF-1 überwiegend an den Zielorten der Metastasierung exprimiert.²⁷ Ein Ausschalten des Rezeptors führt zu einer verminderten Angiogenese und Lymphogenese sowie zur Abnahme der ossären Metastasierung.²⁸

1.8 Therapie

Die Therapie des Prostatakarzinoms erfolgt stadienabhängig. Im Rahmen von interdisziplinären Tumorkonferenzen wird unter kritischer Abwägung der therapeutischen Optionen eine ärztliche Empfehlung ausgesprochen.

Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Prostatakarzinom sprechen initial auf eine Androgenablation an. Bei der Mehrzahl der Patienten versagt diese Therapie in der Regel innerhalb von ca. 18 bis 24 Monaten, weshalb diese Patienten eine sekundäre Behandlung benötigen.

1.8.1 Androgenentzugstherapie bei hormonsensitivem Prostatakarzinom

Die Entdeckung der wachstumsfördernden Wirkung von Testosteron und die Wachstumshemmung durch dessen Entzug wurde im Jahre 1941 vom Charles Huggins entdeckt.²⁹ Als Standarderstlinientherapie gilt heute noch die radikale Prostatektomie oder die chemische Kastration mittels Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga.³⁰ Testosteron und Dihydrotestosteron, welches eine 10-fach höhere Affinität als

Testosteron hat, sind die Liganden des zytoplasmatisch gelegenen Androgenrezeptors. Die Aktivierung des Androgenrezeptors durch seinen Liganden Testosteron führt zur Gentranskription und -translation für Wachstum und Teilung der Karzinomzellen.³¹ Durch den Entzug und die Blockade von Testosteron werden Gentranskription und -translation unterbrochen. Dabei können sowohl Veränderungen des Androgenrezeptors selbst als auch die Sensibilisierung des Rezeptors für zirkulierendes Dihydrotestosteron zur Hormonresistenz des Prostatakarzinoms führen.³¹ Neben auf Hormonmanipulationen nicht mehr ansprechende Prostatakarzinomen bleibt Studien zufolge bei einigen Prostatakarzinomen eine gewisse Hormonabhängigkeit erhalten.³¹

1.8.2 Therapie und Ätiologie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms

Wie die Entstehung des Prostatakarzinoms sind auch die Faktoren, die zur Entwicklung eines CRPCa führen, weitestgehend unbekannt. Das kastrationsresistente Prostatakarzinom wird als solches bezeichnet, wenn ein 3-maliger PSA-Anstieg unter Hormontherapie (Testosteron im Kastrationsbereich) dokumentiert wird. Trotz Androgenblockade (unter 0,2-0,5 ng/ml Testosteron) kann es zu einer Tumorprogredienz kommen. Dieses ist entweder durch eine Erhöhung des PSA-Wertes oder das Auftreten von neuen Metastasen gekennzeichnet. Zwar wird durch die Androgenentzugstherapie die Testosteronproduktion in den Hoden supprimiert, allerdings bleibt die Androgenproduktion in den Nebennieren weiter bestehen. Aufgrund dieser basalen Sekretion von Testosteron ist ein vollständiger Entzug nicht möglich.³⁰ Die Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms diente in der Vergangenheit vorwiegend zur palliativen Behandlung mit dem Ziel der Symptomkontrolle oder Verlängerung des symptomfreien Überlebens.³² Erst der Einsatz von neuen Substanzen wie Docetaxel, Cabazitaxel, Abirateron und Enzalutamid führte zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens der Patienten.³¹ Eine Kombinationstherapie mit Antiandrogenen wie Flutamid, Nilutamid, Enzalutamid oder Bicalutamid kann bei einem Drittel der Patienten zu einem PSA-Ansprechen führen.¹

1.8.2.1 Chemotherapie mit Docetaxel

Docetaxel ist ein halbsynthetisches Zytostatikum aus der Gruppe der Taxane. Es stabilisiert den interzellulären Mikrotubulusapparat und leitet so den gezielten Zelltod

ein und dient zur Behandlung von schnell proliferierenden Tumorzellen. Darüber hinaus antagonisiert das Medikament durch Phosphorylierung die Wirkung des antiapoptotischen Pro-Onkogens Bcl-2, woraus eine vermehrte Apoptose resultiert.³³

1.8.2.2 Endokrine Therapie mit Abirateron

Abirateronacetat wird bei der Behandlung vom fortgeschrittenen metastasierenden Prostatakarzinom eingesetzt. Um die Bioverfügbarkeit am Zielort zu erhöhen, wird es als Prodrug verabreicht und im Körper zum aktiven Metaboliten Abirateron transformiert.

Abirateron ist ein steroidaler Androgenbiosyntheseinhibitor, welcher als selektiver Cytochrom-P-450-(CYP17A1)-Inhibitor Schlüsselreaktionen der Androgensynthese irreversibel blockiert. Damit wird sowohl der testikuläre als auch der adrenale Syntheseweg irreversibel gehemmt.³¹ Die Serumtestosteronwerte werden auf nicht mehr messbare Werte reduziert und somit die Wirkung einer Androgendeprivationstherapie gesteigert. Da die Therapie mit Abirateronacetat den Mineralcorticoid-Spiegel erhöht, wird er, um die Nebenwirkungen zu senken, in Kombination mit Glucocorticoiden wie Prednisolon verabreicht.³⁴

Verschiedene Studien, wie zum Beispiel von de Bono et al., untersuchten die Wirkung von Abirateron bezogen auf das Gesamtüberleben, die Zeit bis zur Progression und das progressionsfreie Überleben beim chemo-naiven kastrationsrefraktären Prostatakarzinomen und als Second-Line-Indikation nach vorangegangener Therapie mit Docetaxel und konnten einen signifikanten Überlebensvorteil bestätigen.³⁵

Die neuen Androgenrezeptorantagonisten TAK-700, TOK-001 und MDV3100 befinden sich noch in laufenden Phase-III-Studien. TOK-001 ist das erste neue Medikament, welches sowohl die Inhibition der Androgensynthese als auch den Antagonismus des Androgenrezeptors in einem Medikament vereint. MDV3100 ist ein Antiandrogen, welches eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor aufweist und seine Bindung an den Rezeptor dessen Translokation in den Zellkern verhindert. TAK-700 wiederum ist ein weiterer CYP17 Inhibitor.³⁶ Die Zulassung zur Erstlinientherapie des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (mCRPC) erfolgte im Jahr 2012.

1.8.2.3 Antiandrogentherapie mit Flutamid

Flutamid ist ein nichtsteroidaler Androgenrezeptor-Antagonist und wird bei der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms eingesetzt. Er wirkt ausschließlich auf den Androgenrezeptor und hat keine direkten gonadotropen Effekte. Da er nicht nur an den Rezeptoren der Prostata, sondern auch an den hypothalamischen Rezeptoren bindet, verhindert er den negativen testosteronvermittelten Rückkopplungsmechanismus der LH-Sekretion innerhalb der Hypophyse.³⁸ Die vermehrte LH-Sekretion führt zur erhöhten peripheren Testosteron-Serumkonzentrationen.³⁸ Durch diesen Wirkmechanismus kann bei 70 bis 80 % der Patienten die Potenz erhalten bleiben.³³ In einer Nachfolgestudie (EORTC 30892) konnte dieses Ergebnis nicht verifiziert werden. Die Anwendung von Flutamid erfolgt nach einer chirurgischen Kastration oder zusätzlich bei der Gabe von GnRH-Agonisten im Rahmen einer Kombinationstherapie.

1.8.2.4 PSMA-Radioliganden-Therapie

Wie bereits beschrieben, eignet sich das Transmembranprotein PSMA als Zielstruktur für Radioliganden in der Nuklearmedizin. Es kommt bei dysplastisch veränderten Prostatazellen zu einer Expression auf der luminalen Seite der Drüsengänge. Daher ist die Expression von PSMA auf den PCa-Zellen um etwa das 100 bis 1.000-Fache erhöht.³⁹ Seit Einführung des prostataspezifischen ⁶⁸Ga-PSMA-Tracers konnte die Detektionsrate bei Prostatakarzinomrezidiven im Vergleich zu CT und MRT deutlich gesteigert werden.⁴⁰ Insbesondere kleine, morphologisch unauffällige Läsionen bei geringen PSA-Werten können besser detektiert werden.³¹ Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielversprechend, sodass sie in die aktuelle S3-Leitlinie als „Kann-Empfehlung“ aufgenommen wurden. Die meisten klinische Studien zur Wertigkeit der ⁶⁸Ga-PSMA-11-PET/CT zeigen für PCa-Patienten mit Rezidiven, dass bei ca. 82 % der Patienten mindestens eine PCa-verdächtige Läsion nachgewiesen werden konnte und dabei eine Sensitivität von 76,6 % und eine Spezifität von 100 % nachgewiesen wurden.⁴¹ Der Einfluss der PSMA-Bildgebung zeigt sich insbesondere in der Veränderung des therapeutischen Vorgehens. In einer Analyse von Sterzing et al. konnte gezeigt werden, dass es nach durchgeführten ⁶⁸Ga-PSMA-11 PET/CT zu einer Änderung des TNM-Stadiums kam, die eine Adaptation der Strahlentherapie zur Folge hatte.

Für die nichtinvasive PET-Bildgebung und Endoradiotherapie wurden in den vergangenen Jahren verschiedene PSMA-gerichtete (siehe Abbildung 2) Radioliganden entwickelt.¹⁴ Der radioaktiv markierte Ligand wird von den Prostatakarzinomzellen zielgerichtet aufgenommen, sodass in den betroffenen Läsionen hohe Strahlendosen erreicht und diese von innen heraus bestrahlt werden können. Durch die hohe Affinität des Liganden zum PSMA-Rezeptor entsteht die Möglichkeit einer verbesserten Diagnostik.³¹ In den meisten Fällen wird der an PSMA-617 gekoppelte β -Strahler ¹⁷⁷Lutetium verwendet. Für den therapeutischen Ansatz ist die Rezeptorbindung von PSMA-617 deutlich besser als von PSMA-11.³¹ Daraus resultiert eine verbesserte Tumoraufnahme.³¹ In der aktuellen multizentrischen deutschen Studie, an der 12 Zentren teilgenommen haben, zeigte sich bei 45% der Patienten ein biochemisches Ansprechen, wobei bereits 40% der Patienten nach dem ersten Zyklus ansprachen.⁴² Nachteilig ist bei der Verwendung von ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 die Tatsache, dass ein Drittel der Patienten trotz PSMA-Überexpression auf die Therapie nicht anspricht.⁴² Um diese Hindernisse zu überwinden, wurde der α -Strahler ²²⁵Ac an PSMA-617 statt ¹⁷⁷Lu gekoppelt.³¹

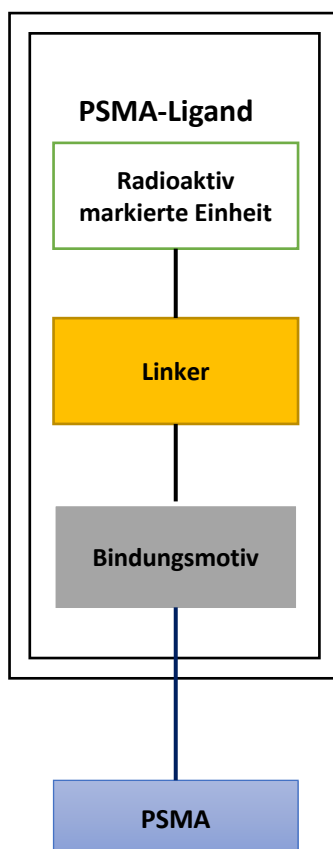


Abbildung 2: PSMA-Radioligand (vereinfachte Darstellung nach Meller B., Bremmer F., Sahlmann Co, et al.)⁴³

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die *In-vitro*-Untersuchung des Expressionsverhaltens von PSMA- und CXCR4-Rezeptoren von hormonsensitiven und hormonrefraktären Prostatakarzinomzellen nach vorangegangener Behandlung gemäß gängigen Therapieoptionen des Prostatakarzinoms. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Regulation des Prostatakarzinoms und metastatischer Absiedlungen auf molekularer Ebene besser zu verstehen, um daraus Strategien zu entwickeln, diese so zu manipulieren, dass daraus eine verbesserte Detektion und optimierte Therapie resultiert. Die durchgeführten Untersuchungen mit Testosteron, Estradiol, Flutamid, Docetaxel und Abirateron einschließlich Kombinationen sollen Aufschluss darüber geben, wie eine mögliche Stimulation der PSMA-Expression und der CXCR4-Expression mit anschließend erhöhter Aufnahme des therapeutisch relevanten Liganden bei bereits vorthera-pierten Patienten im Hinblick auf eine weitere nuklearmedizinische Therapieoptimierung erzielt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

RPMI-1640 Kulturmedium	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Fötales Kälberserum (FCS Gold)	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Natriumpyruvat	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo
HEPES	Fisher Scientific, Waltham USA Gibco [®] , Life Technologies, Thermo
[2-(4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl)ethansulfonsäure	Fisher Scientific, Waltham USA
GlutaMax-L Glutamine	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
NEAA- nicht essentielle Aminosäuren	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
0,5%Trypsin/EDTA	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
DPBS-Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco [®] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
DMSO-10% Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri USA
Ethanol 96%	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri USA
Testosteron-C₁₉H₂₈O₂	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri USA
Estradiol-C₁₈H₂₄O₂	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri USA
Flutamid-C₁₁H₁₁F₃N₂O₃	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri USA
Docetaxel	Selleck Chemicals LLC, Houston USA

Abirateron

Selleck Chemicals LLC, Houston USA

3.2 Kulturmedium und Zusätze

RPMI-1640

Gibco®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

Zusammensetzung

10% FBS

5,5 ml Penicillin-Streptomycin 5,5 ml

Natriumpyruvat

5,5 ml GlutaMax

5,5 ml HEPES

5,5 ml NEAA

PBS (Phosphat buffered saline)

Gibco®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

FBS (Fetal bovine serum)

Gibco®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

3.3 Antikörper

PSMA-AK Isotyp einer rekombinanten menschlichen IgG1
Verdünnung

Miltenyi Biotec®
Clone REA 408
1:11

CXCR4-AK Isotyp IgG2 der Maus

Miltenyi Biotec®
Clone REA 107

Verdünnung

1:50

3.4 Statistische Auswertungen

Alle statistischen Auswertungen und Berechnungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel, (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und GraphPadPrism, Version 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

3.5 Auswertung, Gruppenanalyse

Das alpha-Niveau wurde bei 0,05 festgelegt und zwei-seitige statistische Testverfahren angewendet. Die Häufigkeitsverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests bestimmt. Normal-verteilte Daten sind als Mittelwerte (\pm Standardabweichung) dargestellt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen normal-verteilten Gruppen von Messwerten wurde mittels univarianter Varianzanalyse (analysis of

variance, ANOVA) berechnet. Nicht normal-verteilte Daten sind als Median (Interquartilsabstand) dargestellt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen nicht normal-verteilten Gruppen von Messwerten wurde mittels Kruskal-Wallis H-Test verglichen. Bei den univarianten Analysen wurde für die Anhäufung des Fehlers 1. Art mittels Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche korrigiert. Die Ergebnisse und Signifikanzniveaus von Unterschieden sind im folgenden Ergebnisteil sowie den Abbildungen derart dargestellt: Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bzw. Median (\pm IQR); Signifikanzniveau: „*“: $p \leq 0.05$, „**“: $p \leq 0.01$, „***“: $p \leq 0.001$.

3.6 Zelllinien

3.6.1 PC-3

Die Zellen dieser Zelllinie entstammen einer Knochenmetastase des Adenokarzinoms eines 62-jährigen Kaukasiers. Die im Jahr 1976 isolierten Zellen sind epithelial adhärent wachsende Prostatakarzinomzellen, die eine geringe Aktivität an saurer Phosphatase und Testosteron-5-alpha-Reduktase zeigen. Sie werden, obwohl sie eine geringe Expression des Androgen-Rezeptors zeigen, als androgen-unabhängig eingestuft.¹⁹

Die in vorliegender Arbeit verwendete PC3 Zelllinie (ATCC®CRL-1435™) wurde von der Firma ATCC aus Manassas Virginia, USA kommerziell erworben.

3.6.2 LNCaP

Die Zellen wurden aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen kaukasischen Mannes mit einem diagnostizierten metastasierenden Prostata-Adenokarzinom isoliert. LNCaP ist eine in vitro leicht zu kultivierende androgenempfindliche, epithelial adhärent wachsende Zelllinie, welche die spezifischen Eigenschaften humaner Prostatakarzinome widerspiegelt. Insbesondere die Expression spezifischer Biomarker wie PSA, PSMA und prostataspezifische Phosphatase (PAP) konnten erhalten werden.⁴⁴ Androgen- und Östrogenrezeptoren sind sowohl im Zytosol als auch in den Kernfraktionen vorhanden.⁴⁴

Die in dieser Arbeit verwendete LNCaP-Zelllinie Klon FGC (ATCC®CRL-1740) ist ein Produkt der Firma ATCC aus Manassas Virginia, USA.

3.6.3 LNCaP C4-2

Um eine ähnlich gut kultivierbare, androgen-unabhängige Zelllinie nutzen zu können, wurde C4-2 als Subkultur der LNCaP repliziert. Sie zeigen eine ähnliche Genexpression für PSA wie die Ursprungslinie LNCaP, aber eine verminderte Expression des Androgen-Rezeptors.⁴⁵

Die verwendeten LNCaP C4-2 Zellen wurden von der Urologie des Universitätsklinikums Würzburg (Dr. Charis Kalogirou) zur Verfügung gestellt.

3.7 Zellkultivierung

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden bei sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank Hera safe (Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die Kultivierung und Inkubation der Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank Hera cell (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland).

3.7.1 Auftauen der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden im flüssigen Stickstoff bei -180°C gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem 37°C temperierten Wasserbad. Anschließend wurde der Inhalt des Kryogefäßes in einer mit Medium gefüllten T75 Kulturflasche (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät.

3.7.2 Subkultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden in T75 Kulturflaschen im RPMI-1640 Kulturmedium mit den Zusätzen: 10 % FBS, 5,5 ml Penicillin, 5,5ml Natriumpyruvat, 5,5 ml GlutaMax, 5,5 ml HEPES, 5,5 ml NEAA, kultiviert und je nach Zelllinie die Zellen nach 3 bis 5 Tagen bei 80 bis 90 %iger Konfluenz unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurde das alte Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 5 % PBS gespült, um die Mediumreste zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin/EDTA benetzt und für 2 Minuten inkubiert, um das Ablösen des Zellrasens zu erleichtern. Die Proteasereaktion des Trypsins wurde mit insgesamt 10 ml Medium gestoppt und die Zellen wurden in Suspension genommen. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1.300 U/min wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Medium resuspendiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit Medium verdünnt und in neue T75-Kulturflaschen ausgesät.

3.7.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült, anschließend für 2 Minuten mit Trypsin inkubiert und nachfolgend in Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation von 3 Minuten bei 1.300 rpm wurden die Zellen resuspendiert und mit Medium so verdünnt, dass eine korrekte Zellzahlbestimmung möglich war. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Cell-Scepter™ Millipore (Merck, Darmstadt, Deutschland). Das Gerät arbeitet nach dem Coulter-Prinzip (Messung der Widerstandsänderung) und erfasst Zellen zwischen 8 und 25 µm. Alle Teilchen innerhalb dieses Größenbereichs werden gezählt und ihre Verteilung wird in einem Histogramm angezeigt. Unter Zuhilfenahme der vom Gerät gelieferten Ergebnisse, wurde die korrekte Zellzahl pro µl Zellsuspension bestimmt. Die nachfolgenden Versuche wurden jeweils mit 100.000 Zellen durchgeführt.

4 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer erlauben mit hoher Flexibilität die quantitative Messung und molekulare Charakterisierung intakter Zellen.⁴⁶ Das Prinzip basiert auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz in dem Moment, zu dem die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom, einen dem Probenfluss gegenüber rechtwinklig angeordneten Laserstrahl, passieren.⁴⁶ Die Helligkeit der Signale entspricht in Abhängigkeit von der Färbung und den verwendeten Farbstoffen der Menge der gebundenen Antikörper bzw. dem markierten nukleären DNA-Gehalt.⁴⁶ So lassen sich vielfältige Aussagen über Größe, Granularität, Gestalt und Fluoreszenzintensität der Zellen treffen. Die den physikalischen und molekularen Eigenschaften entsprechenden Lichtsignale werden quantifiziert.⁴⁶

Für die optische Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzen werden Teilerspiegel und selektive Bandpassfilter eingesetzt. Diese werden über Photomultiplier detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Bei dem verwendeten Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) stehen über dem ersten Argon-Laser (488nm) drei Fluoreszenzkanäle mit den Emissionswellenlängen FL1 (530 nm), FL2 (585 nm) und FL3 (>650 nm) zur Verfügung. Über einen zweiten Diodenlaser (635 nm) kann ein vierter Fluoreszenzkanal FL4 (670 nm) verwendet werden.

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte getrennt von der Messung und erlaubte so die Untersuchung unterschiedlichster Fragestellungen. Mit Hilfe der Software CellQuest Pro Research Software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) konnten die Messwerte zweidimensional als Dot-Plots und als eindimensionale Histogramme dargestellt werden. Mit Hilfe von Analysenfenstern, auch Gates genannt, wurde die Zellpopulation festgelegt, die zur Analyse herangezogen wurde. Die Grundlage der wissenschaftlichen Berechnungen bildeten die jeweils ermittelten mittleren Fluoreszenzintensitäten. Die erhobenen Daten sind als geometrische Mittel dargestellt und widerspiegeln die logarithmische Normalverteilung und damit die zentrale Tendenz des Versuches. Das geometrische Mittel (GeoMean) ist als $\sqrt[n]{X_1 X_2 \dots X_n}$ definiert.

4.1 Fluorochrome

Die Markierung von PSMA und CXCR4 erfolgte mittels fluorochrom-gekoppelter Antikörper (siehe Abbildung 3; Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland).

Antikörper	Detektionkanal	Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
CXCR4	FL2	PE	480/565 nm	578 nm
PSMA	FL1	FITC	495 nm	519 nm

Tabelle 3: Wellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

5 Untersuchungsmethoden

5.1 In-vitro-Untersuchung der dosisabhängigen Zellproliferation

Die Analyse der Zellproliferation in Einzel- oder Kombinationsapplikation der einzelnen Wirkstoffe erfolgte unter Zuhilfenahme der CFSE-Färbung (Carboxyfluorescein-Succinimidylester). Der membrangängige und zunächst nicht fluoreszierende Farbstoff CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester) wird in der Zelle durch Esterasen in das grün fluoreszierende, weniger membrangängige CFSE umgewandelt, welches an zytoplasmatische Proteine bindet. Die auf diese Weise markierten Proteine werden bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch die Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung abnimmt. Somit kann die Zahl der Zellteilungen anhand der Fluoreszenzintensität einer Zelle im Durchflusszytometer identifiziert werden, was die Grundlage zur Einschätzung der Zellproliferation bildet.

Anhand der Proliferationskinetik sollte die dosisabhängige wachstumshemmende bzw. wachstumsfördernde Wirkung der einzelnen Substanzen untersucht werden. Um möglichst nahe an die In-vivo-Verhältnisse nach Zustand mit Chemotherapie zu kommen, sollte eine Proliferationsreduktion von 60 bis 70% erreicht werden.

Je Substanz, Konzentration und Zelllinie wurden 100.000 Zellen pro Vertiefung aus der entsprechenden Subkultur im Medium unter sterilen Bedingungen in Wellplatten überführt, mit CFSE behandelt und anschließend ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit den jeweiligen Konzentrationen der einzelnen Substanzen im Medium versetzt. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurden die Ergebnisse mit dem Durchflusszytometer ermittelt. Bei jeder Zelllinie und Substanz war die Mitführung eines unbehandelten Ansatzes obligatorisch, der als Referenz diente (100% Proliferation).

Die Versuche wurden insgesamt 4- bis 5-mal unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Zur Beurteilung der Proliferation wurde aus den ermittelten Werten ein Mittelwert gebildet.

5.2 CFSE-Färbung

Zur Markierung wurden 10^6 Zellen pro ml und Loch-Vertiefung in PBS und 5 % FBS mit 0,5 μ l CFSE-Farbstoff bei Raumtemperatur unter der Sterilbank im Dunkeln für 3 Minuten inkubiert. Um das freie CFDA-SE vollständig aus der Zellsuspension zu entfernen, folgten insgesamt drei Waschschr itte mit PBS und 5 % FBS mit anschließender Zentrifugation (4 Minuten, bei 1300 rpm) und der Abnahme des wässrigen Überstandes. Nach dem letzten Waschschr itt wurden die Zellen in Medium resuspendiert und 1 ml der Zellsuspension pro Loch-Vertiefung ausgesät. Im Anschluss daran wurden die Zellen nach Zugabe der einzelnen Wirkstoffe und Konzentrationen bei 37°C mit 5 % CO₂ Zugabe für 72 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in FACS-Puffer (PBS mit 3 % FBS) für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Die Messung erfolgte unmittelbar.

5.3 Oberflächenfärbung mit PSMA-AK und CXCR4-AK

Für die Oberflächenfärbung wurden 10^6 Zellen pro ml und Loch-Vertiefung ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte infolge eines Mediumwechsels die Zugabe der entsprechenden einzelnen Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen. Während der 72-stündigen Inkubation wurden die Zellen regelmäßig bezüglich Wachstum und Aussehen geprüft. Im Anschluss wurden die Zellen mit 400 μ l PBS gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA 2 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit insgesamt 120 ml Medium gestoppt. Nach Zugabe von 2,5 ml FACS-Puffer folgte die vierminütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 1.300 rpm. Jedem Ansatz wurden anschließend jeweils 10 μ l CXCR4-AK, 10 μ l PSMA-AK und 80 μ l FACS-Puffer hinzugefügt und bei 4°C im Dunkeln für 20 Minuten inkubiert. Für jedes Experiment wurde sowohl eine Isotypkontrolle für CXCR4-AK und PSMA-AK als auch eine Leerwertkontrolle für beide Antikörper mitgeführt. Nach einem abschließenden Waschschr itt wurden die Zellen in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen und, wie im Kapitel 3.8 beschrieben unverzüglich analysiert.

5.4 Aufnahme bzw. Bindung von Radiotracer

5.4.1 Tracer

Der Tracer ^{68}Ga -PSMA-11 (Glu-VH-CO-NH-Lys-(Ahx)- ^{68}Ga]-HBED) ist eine vom deutschen Krebszentrum (DKFZ) entwickelte organisch-chemische Verbindung und wird bei der bildgebenden Diagnostik des rezidivierenden Prostatakarzinoms eingesetzt. Der Ligand bindet mit hoher Affinität direkt an das aktive Zentrum des extrazellulären Anteils von PSMA.¹⁴ PSMA-11 wurde im Jahr 2013 von der Abteilung Radiopharmazeutische Chemie des DKFZ in die theranostische Variante PSMA-617 transformiert, welche mit ^{68}Ga , für die β -Therapie mit ^{177}Lu oder mit ^{225}Ac für die α -Therapie markiert werden kann.

Die Synthese des Radionuklids erfolgt im Radionuklid-Generator. Der Positronen-Emitter wird dabei im $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklid-Generator kontinuierlich aus dem langlebigen ^{69}Ga oder $^{\text{nat}}\text{Ga}$ generiert. Die Halbwertszeit des erhaltenen Mutternuklids ^{68}Ge beträgt ca. 270 Tage, für das Tochternuklid ^{68}Ga ca. 67,7 Minuten. Das im Generator produzierte Eluat wird anschließend von allen störenden Verunreinigungen befreit.⁴⁷ Die eigentliche Synthese erfolgt durch Umsetzung des Positronen-Emitters mit einer geeigneten chemischen Verbindung, dem Markierungsvorläufer. Durch das Nuklid werden Zerfallseigenschaften, Produktionsrouten und die chemische Kopplung an den Markierungsvorläufer definiert. Für die Radionuklidtherapie werden Radiopharmaka verwendet, welche mit einem langlebigeren Therapienuklid, wie z.B. ^{177}Lu gekoppelt sind. Bei der PET wird die Aktivität bezogen auf die Gesamtstoffmenge isotoper Moleküle in GBq/mmol angegeben. Metallische Isotope, wie ^{68}Ga werden mittels Chelatoren eingebracht wodurch die biologischen Eigenschaften des Moleküls verändert werden. Aus diesem Grund wird diese Art der Markierung häufig bei Peptiden und Antikörpern angewendet.³⁰

Die in dieser Arbeit verwendete Aktivität stammte aus dem Interdisziplinären PET/CT-Zentrum (IPZ) der Universitätsklinik Würzburg und wurde für die Patientenbehandlung bereitgestellt.

5.4.2 Zellbindungsuntersuchung, Uptake mit ⁶⁸Ga-PSMA in humanen LNCaP-Zelllinien nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol, Abirateron und Docetaxel

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte den Vorversuchen entsprechend (siehe Kapitel 5.1). Um eine ausreichende Zellzahl für diese Untersuchung nutzen zu können, wurden pro Wirkstoff jeweils zwei T25-Zellkulturflaschen mit je 500.000 Zellen initial ausgesät. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen abgelöst, gepoolt und gezählt. Für den Uptake-Versuch wurden pro Wirkstoffgruppe Triplikate mit je 200.000 Zellen/500µl DMEM mit 5% BSA angesetzt und bis zur Verwendung bei 37°C gelagert.

Pro Versuchsreihe wurden jeweils ca. 10 MBq Aktivität benötigt. Diese wurde mit DMEM/BSA-Medium so eingestellt, dass sie mittels Gamma Counter 1.0×10^6 cpm (counts per minute) detektiert werden konnte.

Je Probe wurden 50 µl Tracer zugesetzt und für 60 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden bei jedem Versuch sowohl eine zellfreie Referenz als auch unbehandelte Zellen in Dreifach-Bestimmung mitgeführt. Um die Reaktion abzustoppen, wurde der gesamte Ansatz für zwei Minuten auf Eis gestellt und im Anschluss bei 4°C drei Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde die Zellfraktion zweimal mit DMEM+5%-BSA gewaschen. Nachdem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und nach Resuspension der Zellen die Aktivität im Gamma-Counter gemessen.

Nach Abschluss der Untersuchungen wurden alle Flächen und die verwendeten Pipetten auf eine mögliche Kontamination hin untersucht und mit Kontamat Berthold-LB-124 freigemessen. Radioaktive Abfälle wurden gesondert gesammelt und gemäß StrlSchV entsorgt.

5.4.3 Auswertung der Tracer-⁶⁸Ga-PSMA-11-Bindung

Die Auswertung erfolgte mit dem Wizard² 2-Detektor Gamma Counter (PerkinElmer, Waltham, USA). Es ist ein automatischer Gamma-Zähler für alle Arten von Proben und für jede Gammazählungsanwendung. Die Radionuklid-Bibliothek des Gerätes besteht aus 45 Nukliden. Die Well-Typ-Nal-(TI)-Detektoren sammeln von allen Seiten der Probe Signale. Der Energiebereich des Gerätes beträgt 15 bis 1000 keV und die maximale Zählrate 6 million dpm (5 million cpm) für ¹²⁵I. Die vom Gerät gelieferte Datenanalyse

erfasste die gezählten radioaktiven Zerfälle pro Zeiteinheit als Impuls pro Zeit (counts per minute, cpm) und die Zahl der tatsächlichen Zerfälle als Desintegrationen pro Zeiteinheit (decays per minute, dpm). Beide Werte hängen über den Faktor der Zählrohrbeute rechnerisch zusammen: $\text{cpm}/\text{Zählrohrbeute}=\text{dpm}$. Für diese Arbeit wurden die Ergebnisse der Zerfälle (cpm) genutzt und ausgewertet.

6 Ergebnisse

6.1 *In-vitro*-Analyse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinien LNCaP, LNCaP C-4 und PC 3 nach Exposition mit Testosteron, Estradiol und Flutamid

Zur Ermittlung der bestmöglichen Expositionsdosis für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C-4 und PC 3 mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, wurde je eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Für die weiterführenden Experimente wurde jeweils die Konzentration der Substanzen Testosteron, Estradiol und Flutamid ausgewählt, die die niedrigste Zellproliferation zeigten.

6.1.1 LNCaP

Bei dieser Zelllinie durchgeführten Experimente ergaben die beste Expositionsdosis und damit die niedrigste Zellproliferation nach der Behandlung mit Testosteron 100 nM, so dass diese Konzentration für die weiterführenden Experimente mit dieser Substanz festgelegt wurde.

Nach Exposition mit Estradiol konnte gegenüber den unbehandelten Zellen kaum eine Änderung beobachtet werden, sodass das gefundene beste Ergebnis bei 300nM für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurde.

Die anschließenden Experimente mit Flutamid wurden mit der Konzentration von 10 nM durchgeführt (Tabelle 4).

Zelllinie LNCaP		
Testosteron		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
1 nM	89,19	3,72
10nM	75,70	1,28
20 nM	75,40	5,32
50 nM	75,02	10,67
100 nM	69,42	7,68
120 nM	88,62	5,99
Estradiol		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
100 nM	102,68	9,99
200 nM	97,89	8,85
300 nM	94,89	8,22
400 nM	94,97	8,97
500 nM	97,54	5,68
Flutamid		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
1 nM	114,68	5,48
10 nM	107,13	2,54
20 nM	116,47	1,84
30 nM	121,71	8,70
50 nM	126,00	6,89

Tabelle 4: Ergebnisse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinie LNCaP nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, aufgeführt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler, n=5.

6.1.2 LNCaP C4-2

Die ersten Untersuchungen mit Testosteron wurden zunächst mit den Konzentrationen 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM und 50 nM angesetzt. Dabei zeigte sich bei den Wirkstoffkonzentrationen von 1 nM eine Proliferation von 98,91 %, bei 5 nM 81,44 %, bei 10 nM 77,21 %, bei 20 nM 74,27 % und bei 50 nM 76,59 %. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass durch eine Erhöhung der Konzentration bessere Ergebnisse erzielt

werden können. So wurden im weiteren Verlauf die Versuche mit den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM und 120 nM fortgeführt. Aufgrund der Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche die Konzentration von 50 nM für Testosteron ausgewählt.

Beim Estradiol zeigten die anfänglich gewählten Konzentrationen von 1 nM mit einer Zellproliferation von 92,93 %, 10 nM mit 89,44 %, 30 nM mit 96,00 %, 50 nM mit 91,28 % und 100 nM mit 91,36 % kaum einen Effekt gegenüber den unbehandelten Zellen, sodass für die folgende Untersuchung eine Konzentrationserhöhung gewählt wurde. Der zweite Ansatz mit den Konzentrationen von 100 nM mit einer Zellproliferation von 84,28 %, 300 nM mit 92,38 %, 500 nM mit 83,40 %, 800 nM mit 88,38 % und 1000 nM mit einer Proliferation von 96,82 % verlangte von den Ergebnissen her eine geringer ausfallende Konzentrationsanpassung. So wurden die Versuche mit den Konzentrationen 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM und 500 nM weitergeführt. Die nachfolgenden Versuche wurden bei einer Konzentration von 300 nM durchgeführt.

Bei der Suche nach der niedrigste Zellproliferation bei der Behandlung der Zellen mit Flutamid wurde zunächst eine Versuchsreihe mit den Konzentrationen 1 nM mit 102,24 % Proliferation, 5 nM mit 121,99 % Proliferation, 8 nM mit 108,70 % Proliferation, 10 nM mit 116,83 % Proliferation, 20 nM mit 115,02 % und eine Reihe mit wesentlich höheren Konzentrationen 20 nM mit einer Proliferation von 97,35 %, 50 nM mit 107,92 %, 100 nM mit 107,69 %, 500 nM mit 103,96 % und 1000 nM mit 133,21 % Proliferation durchgeführt. Es zeigte sich, dass unter der Behandlung mit Flutamid ähnlich wie bei den LNCaP-Zellen eine gesteigerte Proliferation stattfindet. Aus den Ergebnissen abgeleitet wurden für die weiteren Versuche die Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM und 50 nM ausgewählt. Anschließende Untersuchungen fanden bei der Konzentration von 1 nM statt (siehe Tabelle 5).

Zelllinie LNCaP C4-2		
Testosteron		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
1 nM	95,92	2,01
10 nM	78,11	3,02
50 nM	74,97	4,59
100 nM	75,45	4,95
120 nM	77,04	4,09
Estradiol		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
100 nM	100,28	5,67
200 nM	99,70	4,76
300 nM	98,92	3,78
400 nM	103,81	4,21
500 nM	101,92	3,97
Flutamid		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
1 nM	108,29	6,19
10 nM	110,36	4,46
20 nM	110,15	4,61
30 nM	112,64	3,32
50 nM	119,01	6,13
100 nM	107,69	Einzelmessung
500 nM	103,96	Einzelmessung
1000 nM	133,21	Einzelmessung

Tabelle 5: Ergebnisse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinie LNCaP C4-2 nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, aufgeführt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler, n=5.

6.1.3 PC 3

Bei der PC-3-Zelllinie zeigte sich eine Hormonunempfindlichkeit. Es konnte bei den Substanzen Estradiol und Flutamid ein Proliferationsanstieg und beim Testosteron eine minimale Hemmung festgestellt werden (siehe Tabelle 6).

Zelllinie PC 3		
Testosteron		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
1 nM	99,16	3,19
10 nM	99,03	2,45
20 nM	100,30	3,19
50 nM	105,40	2,74
100 nM	111,00	7,43
120 nM	113,80	4,68
Estradiol		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
100 nM	107,92	3,29
200 nM	106,59	2,2
300 nM	105,54	2,86
400 nM	108,36	3,68
500 nM	111,11	3,93
Flutamid		
Konzentrationen	Mittl. Proliferation in %	SEM
1 nM	112,37	5,78
10 nM	113,04	4,97
20 nM	110,89	5,53
30 nM	111,50	5,77
50 nM	113,81	3,92

Tabelle 6: Ergebnisse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinie PC 3 nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, aufgeführt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler, n=5.

Die Wirkung von Testosteron wurde bei den Konzentrationen - wie schon bei den LNCaP C4-2 - 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 120 nM untersucht und für die weiteren Untersuchungen die Konzentration 10 nM festgelegt.

Für die Exposition mit Estradiol wurde für die nachfolgenden Versuche die Konzentration 300 nM für am geeignetsten gehalten.

Die weiteren Untersuchungen mit Flutamid wurden mit der Konzentration von 20 nM durchgeführt.

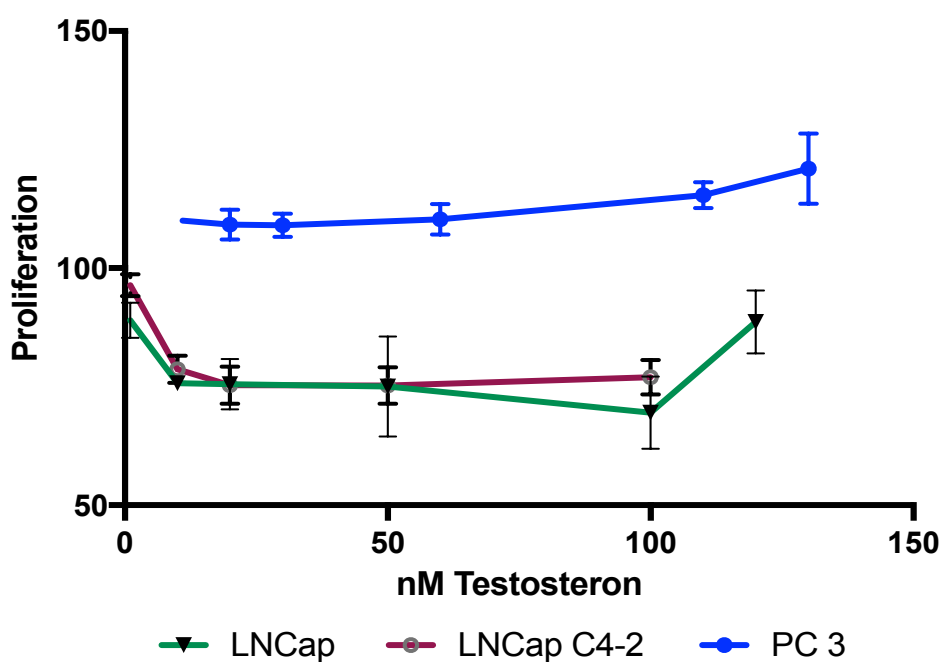


Abbildung 3: Konzentrationsabhängige Zellproliferation in % nach der Behandlung mit Testosteron für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC3 im Vergleich.

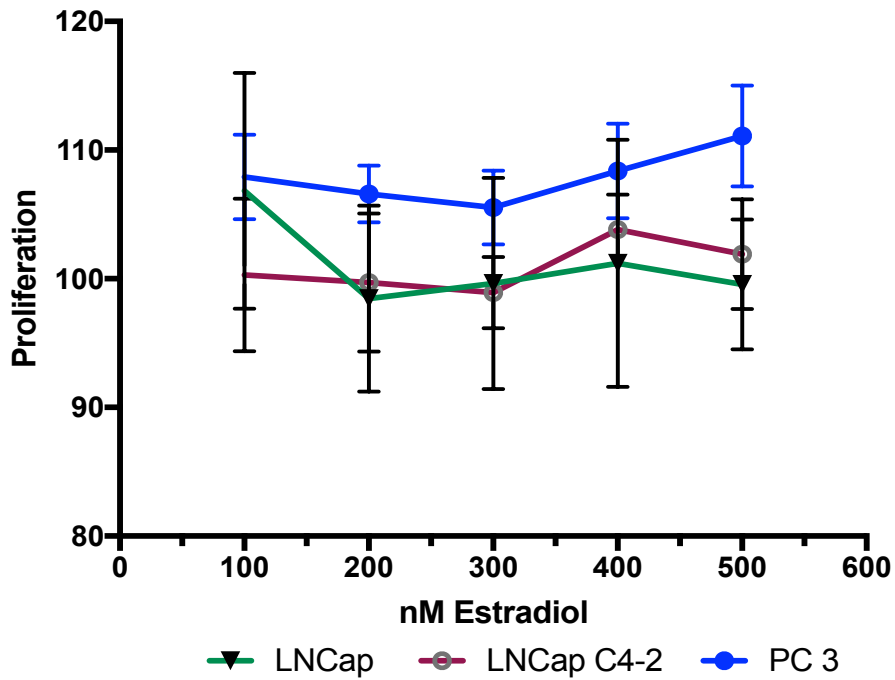


Abbildung 4: Konzentrationsabhängige Zellproliferation in % nach der Behandlung mit Estradiol für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC3 im Vergleich.

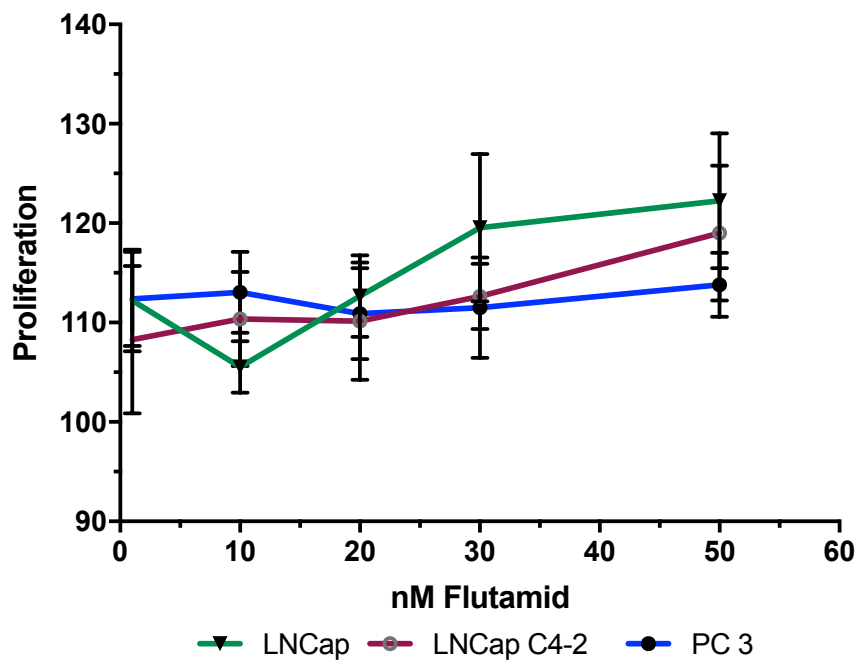


Abbildung 5: Konzentrationsabhängige Zellproliferation in % nach der Behandlung mit Flutamid für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC3 im Vergleich.

6.2 Dosisabhängige In-vitro-Expression von CXCR4- und PSMA-Rezeptoren nach Hormontherapie

Im Vorversuch (siehe Kapitel 6.1.) wurden diejenigen Konzentrationen der Substanzen ermittelt, bei deren Zugabe die für die Zielsetzung dieser Arbeit niedrigste Zellproliferation ermittelt wurde. Nunmehr wurde das Expressionsverhalten der Rezeptoren PSMA und CXCR4 unter dem Einfluss der einzelnen Substanzen in entsprechender Konzentration untersucht.

Die Zelllinien wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert, ausgesät und mit den in den Vorversuchen ermittelten Konzentrationen für die jeweilige Zelllinie und Substanz 72 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit den fluorochrom-markierten spezifischen Antikörpern für PSMA und CXCR4 versetzt. Die Analyse des Expressionsverhalten von PSMA und CXCR4 erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Alle Experimente wurden unabhängig voneinander mindestens viermal durchgeführt.

6.2.1 Dosisabhängige PSMA-Expression unter Hormontherapie

6.2.1.1 LNCaP

Bei der androgen-sensitiven Zelllinie LNCaP wurden wie bei der Proliferationsuntersuchung (siehe Kapitel 6.1.1) die Wirkstoffe in den jeweiligen Konzentrationen für die folgenden Studien verwendet: Testosteron (100 nM), Estradiol (300 nM) und Flutamid (10 nM). Weiterhin wurden auch die Kombinationen Flutamid (1nM) mit Estradiol (300 nM) und Flutamid (1nM) mit Testosteron (100 nM) untersucht. Nach Abzug der Isokontrolle und unter Mitführung unbehandelter Zellen als Kontrolle konnten bei der Einzelwirkstoffgabe Testosteron (100 nM), Estradiol (300 nM) und Flutamid (10 nM) eine vergleichbare PSMA-Expression detektiert werden. Bei den Wirkstoffkombinationen Flutamid (1 nM) mit Estradiol (300 nM) sowie Flutamid (1 nM) und Testosteron (100 nM) konnte hingegen eine signifikante Abnahme der PSMA-Expression beobachtet werden ($p_{\text{Flu-Est}}=0,008$, $p_{\text{Flu-Test}}=0,011$).

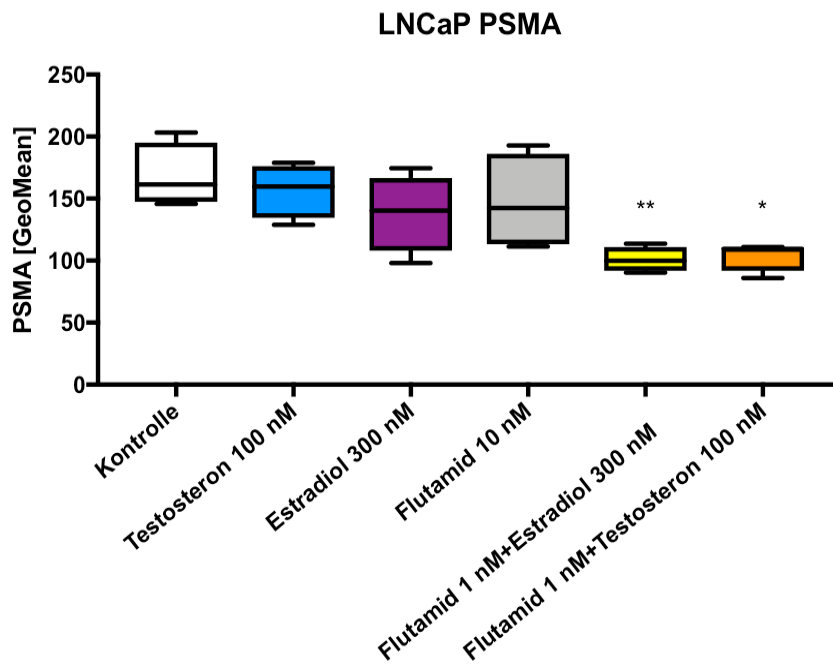


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm Interquartilsabstand (IQR); n = 5. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

6.2.1.2 LNCaP C4-2

Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen, Testosteron (50 nM), Estradiol (300 nM) und Flutamid (1 nM), wurden zuvor in den Proliferationsuntersuchungen der Zelllinie LNCaP C4-2 (siehe Kapitel 6.1.2) ermittelt. Die Kombinationen von Flutamid (1 nM) mit Estradiol (300 nM) und Flutamid (1 nM) mit Testosteron (50 nM) sind ebenfalls untersucht worden. Zunächst wurden Versuche mit den Konzentrationen Testosteron (20 nM und 10 nM) sowie Flutamid (20 nM) durchgeführt. Da sich die Werte in den Bereich zwischen 16,35 und 14,65 bewegten, wurden diese Konzentrationen nicht in die Auswertung einbezogen. Eine Veränderung gegenüber den unbehandelten Zellen konnte nicht festgestellt werden. So lagen die Ergebnisse nach Abzug der Isotyp-(IgG1)-Kontrolle für die unbehandelten Zellen selbst bei 23,99. Im Vergleich dazu lagen die medialen Werte für Testosteron (50 nM) bei 15,42 ($p=0,3839$), für Estradiol (300 nM) bei 18,07 ($p>0,9999$), beim Flutamid (1 nM) bei 20,69 ($p>0,9999$), bei den Kombinationen Flutamid (1 nM) mit Estradiol (300 nM) bei 20,63 ($p\geq 0,9999$) und

Flutamid (1 nM) mit Testosteron (50 nM) bei 17,20 ($p=0,9398$). Bei der Behandlung der androgenunabhängigen Zelllinie LNCaP C4-2 mit den Substanzen sowie ausgewählten Konzentrationen konnten keine signifikanten Veränderungen der von PSMA-Oberflächenexpression beobachtet werden. Tendenziell konnte aber sowohl nach Einzel- als auch nach Kombinationsapplikation eine geringe PSMA-Expression im Vergleich zu den unbehandelten LNCaP C4-2-Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 7).

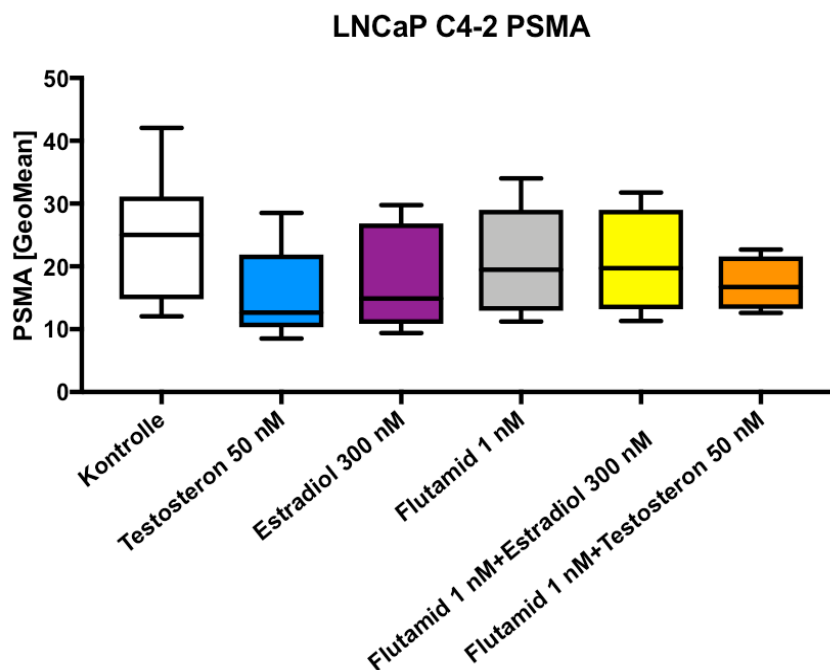


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C4-2 nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; $n = 5$. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus mit $\alpha=0,05$ festgelegt wurde. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

6.2.1.3 PC-3

Der Einfluss der Wirkstoffkonzentrationen von Testosteron (10 nM), Estradiol (300 nM) und Flutamid (20 nM) wurde untersucht. Die Ergebnisse wurden mittels der Isotyp-(IgG1)-Kontrolle auf Hintergrundaktivität bereinigt und als Kontrolle mit dem Antikörper inkubierte unbehandelte Zellen mitgeführt. Die hormonunempfindlichen PC-3 Zellen zeigten unter der Hormonbehandlung keine Veränderung der PSMA-Expression

gegenüber der Kontrollpopulation. Der Mittelwert der unbehandelten Zellen lag bei 0,35. Im Vergleich dazu wurden mediane Werte für Testosteron (10 nM) um 0,42, bei Estradiol (300 nM) um 0,49 und bei Flutamid (20 nM) um 0,35 detektiert (siehe Abbildung 8).

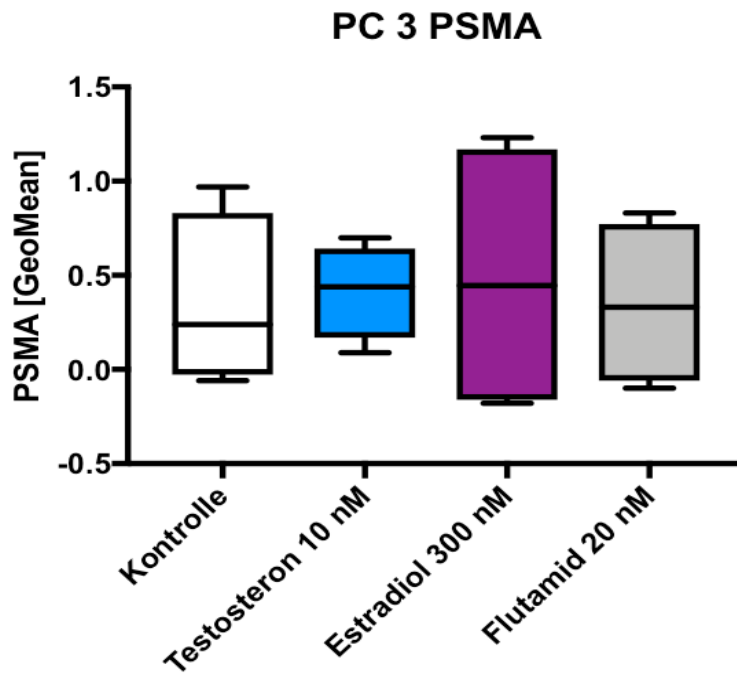


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie PC 3 nach 72- stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus mit $\alpha=0,05$ festgelegt wurde.

6.2.2 CXCR4-Expression unter Hormontherapie

6.2.2.1 LNCaP

In allen hier durchgeführten Experimenten blieb die ermittelte CXCR4-Oberflächenexpression nach chemotherapeutischer Behandlung der Zellen auf dem Expressionsniveau der unbehandelten Zellen. Im Einzelnen wurde im Mittel eine CXCR4-Expression für die unbehandelten Zellen von 35,13 (GeoMean) detektiert. Vergleichbare Werte wurden für Testosteron (100 nM) mit 34,62, für Estradiol (300 nM) mit 34,56 und für Flutamid (10 nM) mit 33,51 sowie für die Kombinationen Flutamid (1nM) mit

Estradiol (300 nM) 29,89 sowie für die Kombination Flutamid (1 nM) mit Testosteron (100 nM) 32,62 beobachtet (siehe Abbildung 9).

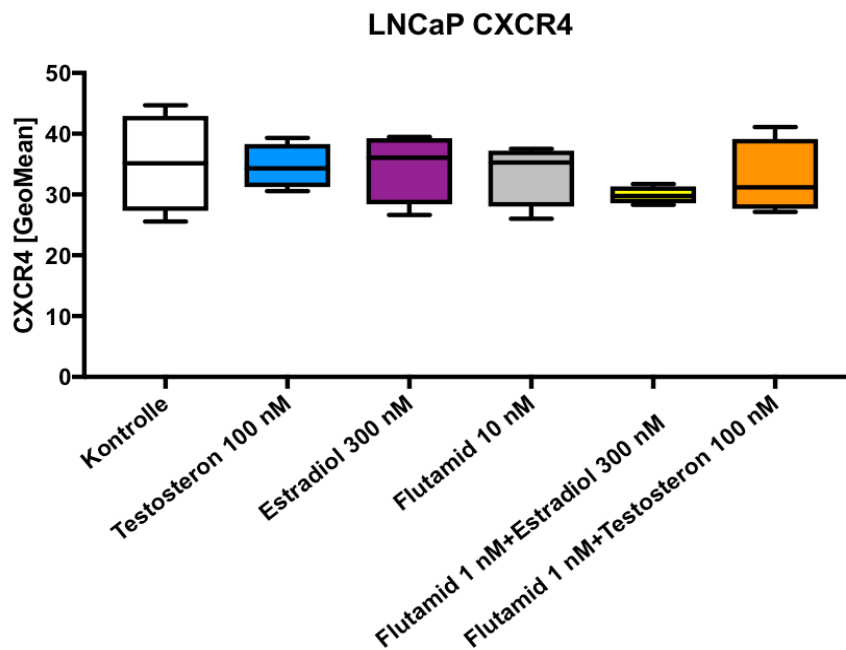


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analysen der CXCR4- Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 4. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.

6.2.2.2 LNCaP C4-2

Wie bereits in Kapitel 6.1.2 beschrieben wurden folgende Substanzkonzentrationen verwendet: Testosteron (50 nM), Estradiol (300 nM), Flutamid (1 nM) sowie die Kombinationen Flutamid (1 nM) mit Estradiol (300 nM) und Flutamid (1 nM) mit Testosteron (50 nM). Ferner wurden auch Versuche mit den Wirkstoffkonzentrationen Testosteron (20 nM und 10 nM) und Flutamid (20 nM) durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der PSMA-Expression zu erhalten, wurde für die Versuche die Konzentration Testosteron (50 nM) und Flutamid (1 nM) festgelegt. Insgesamt wurden nach Bereinigung der Hintergrundaktivität mittels Isotyp-Kontrolle und unter Mitführung von unbehandelten Zellen folgende Werte ermittelt: für Testosteron (50 nM) 6,17, für Estradiol (300 nM) 8,33, für Flutamid (1 nM) 12,21 sowie für die Kombinationen Flutamid (1 nM) mit Estradiol (300 nM) 13,91 und Flutamid (1

nm) mit Testosteron (50 nM) 6,44. Eine tendenziell erhöhte CXCR4-Expression konnte für die Kombination aus Flutamid (1 nM) mit Estradiol (300 nM) beobachtet werden, dieser Effekt war allerdings nicht signifikant ($p > 0,9999$, siehe Abbildung 10). Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser LNCaP C4-2-Zelllinie unter Hormontherapie eher um eine leichte Herunterregulation der Expression handelt.

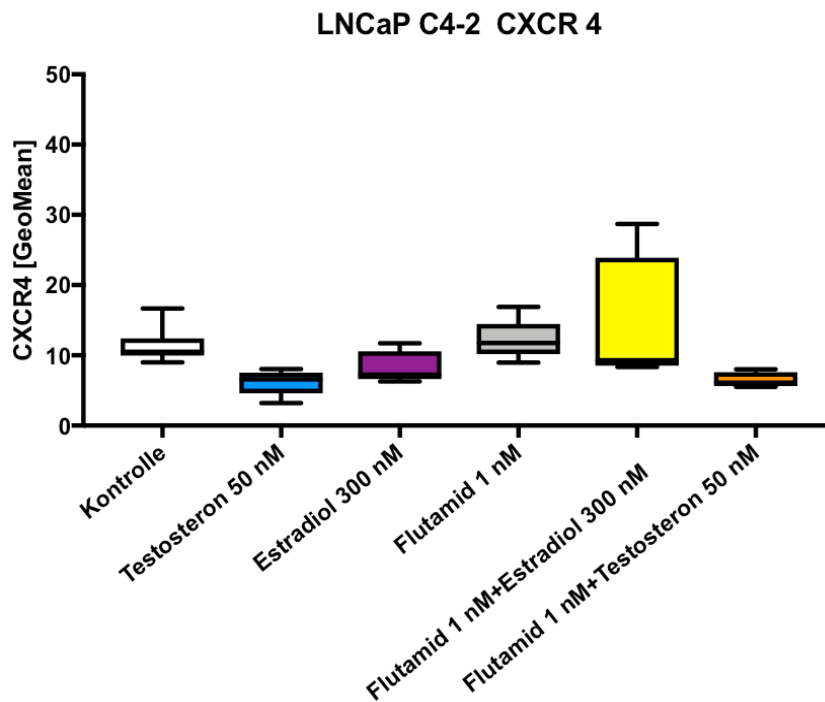


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analysen der CXCR4-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C4-2 nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; $n = 4$. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

6.2.2.3 PC 3

Nach Bereinigung der Hintergrundaktivität mittels Isotyp-Kontrolle wurden die medianen CXCR4-Expressionsniveaus für Testosteron (10 nM) bei 5,52, mit Estradiol (300 nM) bei 5,91 und für Flutamid (20 nM) bei 5,43 ermittelt. Für die mitgeführten unbehandelten Zellen wurde ein Wert von 4,73 gemessen (siehe Abbildung 11).

Die CXCR4-Expression liegt leicht höher als die PSMA-Expression. Die jeweiligen Konzentrationen bleiben auf dem gleichen Niveau.

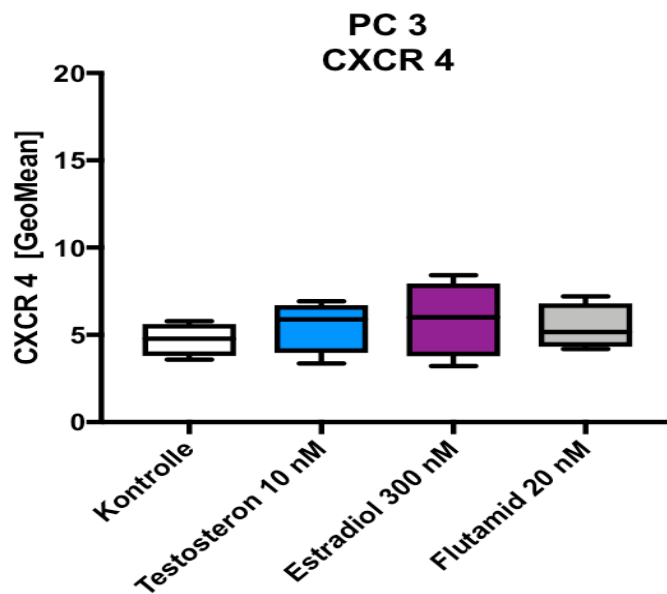


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analysen der CXCR4-Oberflächenexpression der PC 3-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 4. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.

6.3 Konzentrationsabhängige CXCR4-Expression und PSMA-Expression nach Hormontherapie in Kombination mit Abirateron und Docetaxel

Da die PC 3 Zelllinie generell eine sehr geringe Expression von CXCR4 und PSMA aufwies und keine Effekte nach Chemotherapie-Induktion beobachtet wurden, wurde bei den nachfolgenden Studien auf die PC-3 Zelllinie verzichtet und die Experimente mit den LNCaP- und LNCaP C4-2-Zellen durchgeführt.

Im Fokus dieser Arbeit liegt die mögliche Verbesserung der diagnostischen, bildgebenden Verfahren nach bereits erfolgten therapeutischen Maßnahmen. In den nachfolgenden Experimenten wurde die Expression von PSMA und des CXCR4 nach Behandlung mit Abirateron bzw. Docetaxel sowie deren Kombinationen mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, untersucht. Die Mitführung von unbehandelten Zellen sowie der Isotyp-Kontrollen war obligatorisch.

6.3.1 LNCaP

Die Konzentrationen für Testosteron, Estradiol und Flutamid wurden aufgrund der in den Vorversuchen (siehe Kapitel 6.2.1.1) ermittelten Ergebnisse festgelegt.

Untersucht wurde die Expression von CXCR4 und PSMA sowohl unter antihormonelle Therapie mit Abirateron (40 μ M), Docetaxel (8 nM) sowie deren Kombination jeweils mit Testosteron (100 nM), Estradiol (300 nM) und Flutamid (1 nM). Die Ergebnisse der PSMA-Oberflächenexpression lagen nach Bereinigung der Hintergrundaktivität mittels Isotyp-Kontrolle (siehe Abbildung 12), für die unbehandelten Zellen bei 101,46, für Testosteron (100 nM) bei 108,40, für Estradiol (300 nM) bei 93,37, für Flutamid (1 nM) bei 86,89, für Abirateron (40 μ M) bei 47,43 und für Docetaxel (8 nM) bei 66,89. Die Varianzanalyse der Wirkstoffe versus die mitgeführte Kontrolle ergab eine signifikante Herunterregulierung der PSMA-Expression unter Abirateron-Behandlung (40 μ M; $p=0,006$). Dagegen ergaben die Versuche mit den Kombinationen aus Abirateron mit Testosteron, Estradiol oder Flutamid für PSMA keine signifikanten Veränderungen gegenüber der unbehandelten Zellpopulation. Die Experimente mit Docetaxel in Kombination mit Testosteron, Estradiol oder Flutamid konnten ebenfalls keine signifikante Veränderung der PSMA-Expression nachweisen.

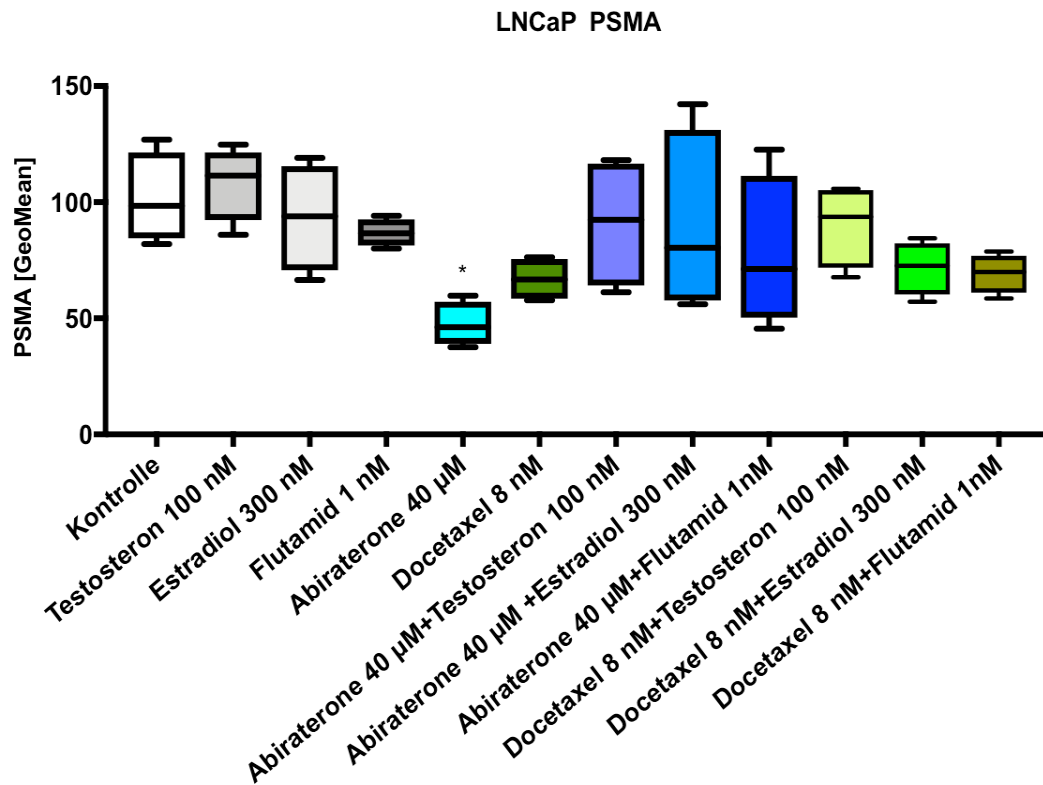


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n=5. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. * $p \leq 0,05$

Die Experimente der CXCR4-Oberflächenexpression wurden nach vorheriger Behandlung mit den Wirkstoffen analog der Experimente der PSMA-Oberflächenexpression durchgeführt. Die Ergebnisse lagen (siehe Abbildung 13), nach Bereinigung der Hintergrundaktivität mittels Isotyp-Kontrolle für Flutamid (1 nM) bei 55,39 und für Docetaxel (8 nM) bei 55,52 tendenziell am höchsten. Bei den anderen Wirkstoffen und Kombinationen wurden Werte nahe der unbehandelten Zellen beobachtet.

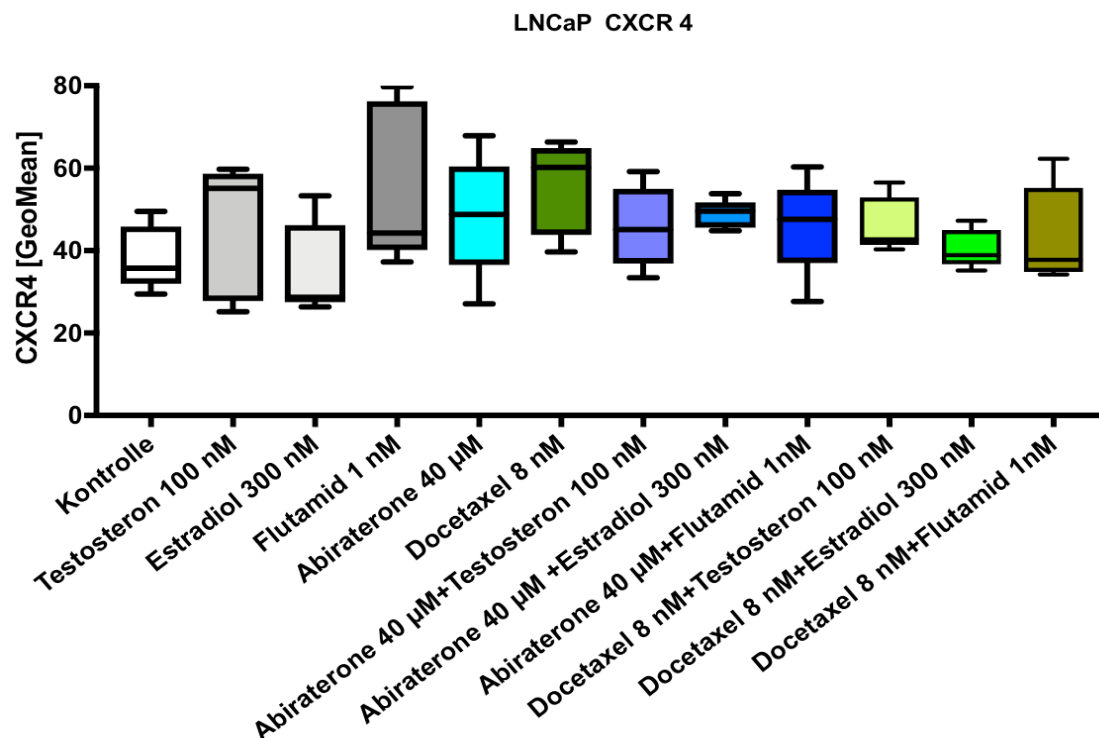


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

6.3.2 LNCaP C-4

Bei der androgen-unabhängigen Zelllinie LNCaP C4-2 scheint die Behandlung mit Abirateron sowie Kombinationen einen signifikanten Einfluss auf die Hochregulation des PSMA-Expressionsniveaus zu haben. So wurden nach Abzug der Hintergrundaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (PSMA-Expressionsniveau von 29,20), signifikant höhere PSMA-Expressionsraten nach einer Behandlung mit Abirateron (40 μ M) alleine sowie mit den Kombinationen Abirateron mit Testosteron (50 nM), mit Estradiol (300 nM) und mit Flutamid (1 nM) detektiert. Im Einzelnen wurden folgende mediane Werte gefunden: Abirateron (40 μ M) ein Wert von 46,37 ($p=0,0086$), Kombination Abirateron mit Testosteron (50 nM) 51,32 ($p=0,0062$), Kombination Abirateron mit Estradiol (300 nM) 55,83 ($p=0,0003$) sowie für die Kombination Abirateron mit Flutamid (1 nM) 47,65 ($p=0,0103$). Die alleinige Behandlung mit Testosteron, Estradiol und Flutamid scheint keinen Einfluss auf die PSMA-Expression zu haben. Interessanterweise lagen nach

Kombination von Abirateron mit einer Hormontherapie die PSMA-Expressionsraten zum Teil über den Effekten von Abirateron allein (siehe Abbildung 14). Dagegen hatte eine Behandlung mit Docetaxel keinen Einfluss auf die PSMA-Expression.

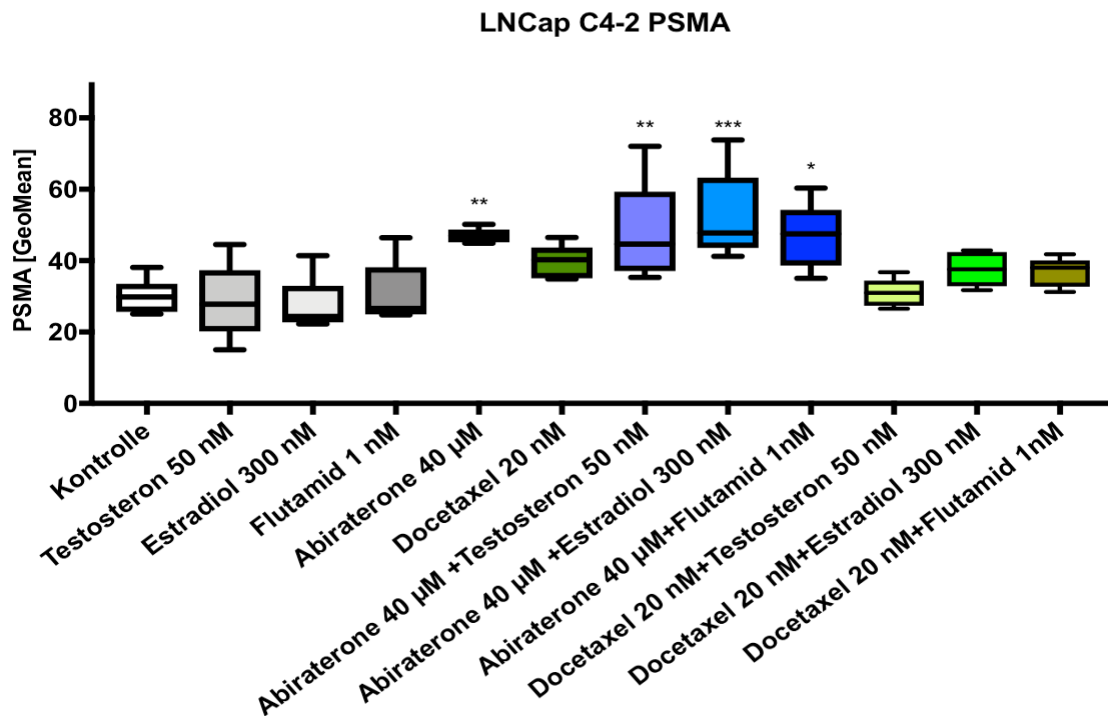


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C4-2 nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Die CXCR4-Expression wurde unter dem Einfluss von Docetaxel (20 nM) signifikant hochreguliert (unbehandelte Zellen 29,45 vs. Docetaxel 71,42; $p=0,0003$). Dieser Effekt wurde auch bei den Kombinationen Docetaxel mit Estradiol ($p=0,0028$) und Docetaxel mit Flutamid ($p \leq 0,0001$) beobachtet. Unter dem alleinigen Einfluss von Testosteron, Estradiol und Flutamid kam eher zu einer Abnahme der CXCR4-Expression. Erst die Mitbehandlung mit Docetaxel (20 nM) führt im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zur Erhöhung der CXCR4-Expression, wobei bei einer Kombination von Docetaxel (20 nM) mit Flutamid (1 nM) eine deutlich erhöhte Expression (siehe Abbildung 15), im Vergleich zu unbehandelten LNCaP-C4-2-Zellen dokumentiert werden konnte.

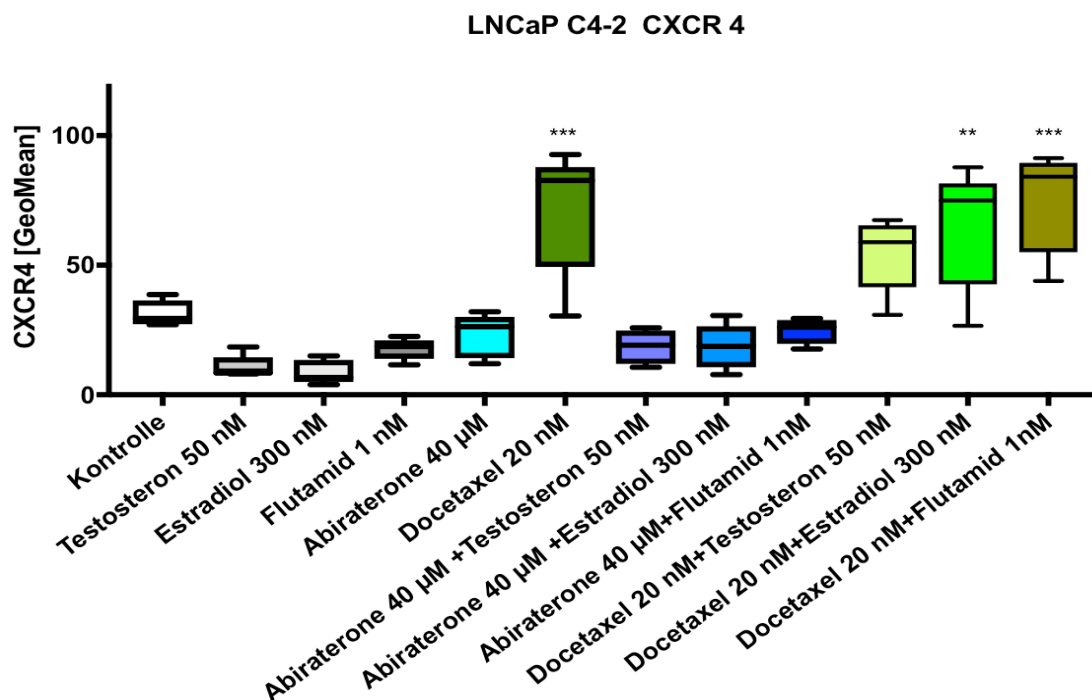


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C-4 nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Signifikanzniveaus: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

6.4 *In-vitro*-Untersuchung der Bindung des ^{68}Ga -PSMA-Liganden in humaner LNCaP-Prostatazelllinie nach vorangegangener Hormontherapie mit Testosteron und Estradiol sowie Chemotherapie mit Docetaxel und Abirateron und deren Kombinationen

Zum Zweck der Überprüfung der Rezeptorexpression bzw. der tatsächlichen Bindung von ^{68}Ga -PSMA-Liganden nach vorangegangener Hormonstimulation mit Testosteron und Estradiol sowie mit den Substanzen Docetaxel und Abirateron und deren Kombinationen, wurde die LNCaP-Zelllinie untersucht. Diese Zelllinie zeichnete sich während des gesamten Untersuchungszeitraums durch besonders hohe Zellausbeute und gute Kultivierbarkeit aus. Den Ergebnissen aus den Vorversuchen folgend (siehe Kapitel 6.3.1), wurden die Ansätze mit Testosteron (100 nM), Estradiol (300 nM),

Abirateron (40 μ M), Docetaxel (8nM) sowie deren Kombinationen als geeignet für weiterführende Untersuchungen festgelegt.

Die in der Uptake-Untersuchung ermittelten Werte (siehe Abbildung 16) bestätigen die Ergebnisse der Voruntersuchungen. So konnte gezeigt werden, dass bei 200.000 Zellen/500 μ l DMEM/+ 5% BSA die alleinige Behandlung mit Testosteron (11.274,245 cpm) oder Estradiol (12.407,213 cpm) keinerlei Auswirkung im Vergleich mit unbehandelten Zellen (12.342,633 cpm) auf die PSMA-Expression und damit auf das Uptake von ^{68}Ga -PSMA-Liganden hat. Dagegen bewirkt eine Therapie mit Abirateron (40 μ M; 4.152,988 cpm, $p \leq 0,0001$) und die Kombinationen Abirateron mit Testosteron (5.287,35583 cpm, $p \leq 0,0001$) und Abirateron mit Estradiol (5.006,77917 cpm, $p \leq 0,0001$) eine, wie bereits in den Vorversuchen gezeigt, deutliche Herunterregulierung des Rezeptors und somit eine verminderte Bindung von ^{68}Ga -PSMA an den LNCaP-Zellen. Dieser Effekt zeigt sich - wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß - auch bei der alleinigen Behandlung mit Docetaxel (8 nM; 8.554,118 cpm; $p = 0,0236$). Die Kombination Docetaxel mit Testosteron (9.710,1458 cpm) ergibt im Vergleich unbehandelten Zellen, Testosteron oder Docetaxel, einen signifikanten Nachteil bei der Bindung des Radionuklids.

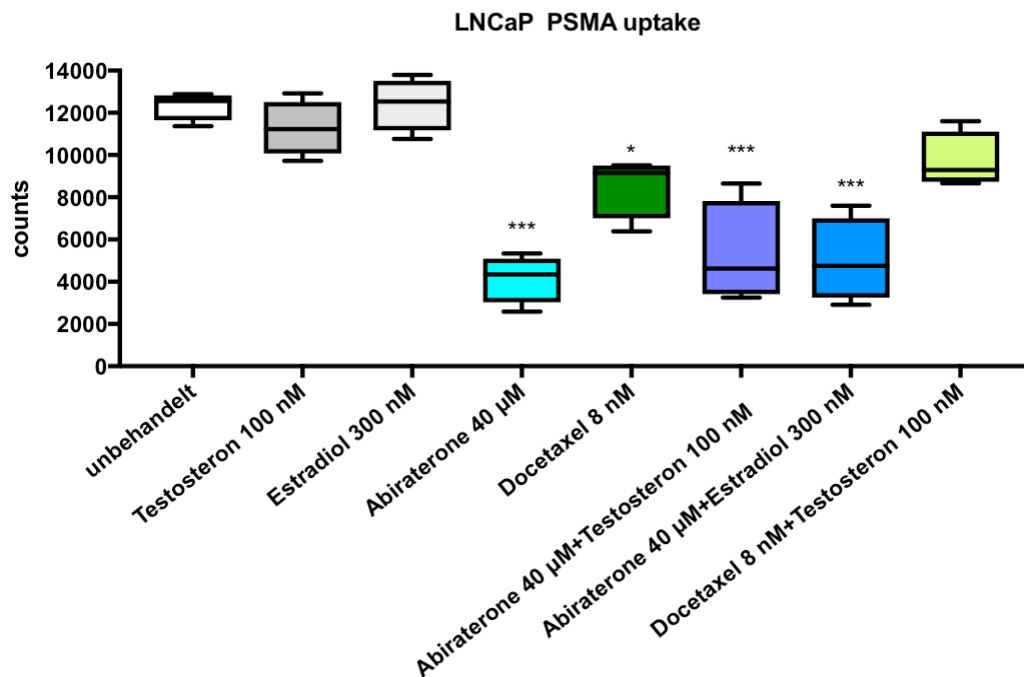


Abbildung 16: Uptake Analyse der Bindung des ^{68}Ga -PSMA-Liganden nach 72-stündiger Inkubation der LNCaP-Zellen mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Ligandenbindung in Form von Median \pm IQR; $n = 4$. Signifikanzniveaus wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

7 Diskussion

Die therapeutischen Möglichkeiten des metastasierten Prostatakarzinoms haben sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Mit den Substanzen Docetaxel und Abirateron und den Androgenrezeptor-Antagonisten Enzalutamid hat sich das Therapiespektrum erweitert und die Überlebenszeit der Patienten deutlich verlängert.⁴ Dennoch bleibt die Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms meist palliativ und richtet sich nach dem Allgemeinzustand und Metastasierungsmuster des Patienten. Neue Studien zeigen, dass die Kombination aus Androgendeprivation (ADT) mit einer Chemotherapie mit Docetaxel einen signifikanten Vorteil für ein progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben hat.⁴⁸ Als Erstlinientherapie mit dem Ziel der Symptomlinderung und Verlängerung des Überlebens wird beim hormonrefraktären Prostatakarzinom standardmäßig die dreiwöchentliche Gabe von Docetaxel in Kombination mit Prednisolon empfohlen.⁵⁰ Bei Docetaxel-Refraktärität und bei einem Rezidiv kann eine Zweitlinientherapie mit Abirateron angeschlossen werden.⁵¹ Eine aktuelle (2017) erschienene Publikation der STAMPEDE-Investigator-Gruppe (The systematic Therapy in advancing or Metastatic Prostate Cancer: Evaluation of Drug Efficacy) bestätigte bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinom als zusätzliche Therapiemaßnahme bei einer Kombinationstherapie mit ADT plus Abirateron plus Prednisolon eine signifikant längeres und besseres Überleben.⁴⁹

Eine ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT liefert genaue Kenntnisse bezüglich Ausbreitung der Erkrankung, Fortschreiten des Tumorgeschehens und nicht zuletzt Erfolg der Therapie. Außerdem ist eine ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT zur Evaluation des PSMA-Expressionsstatus vor jeder ¹⁷⁷Lu-PSMA-Therapie notwendig, auch um eine anschließende ¹⁷⁷Lu-PSMA-Radioligandentherapie genauer zu definieren.⁵² Entsprechend der aktuellen S3-Richtlinie wird nur solchen Patientengruppe eine Therapie mit ¹⁷⁷Lu-PSMA-RLT⁴ empfohlen, welche eine mCRPC mit PSMA-positiver Läsion in der Bildgebung, eine Progression nach Chemotherapie mit Docetaxel oder Cabazitaxel, Progression nach ADT der neueren Generation wie Abirateron und/oder Enzalutamid oder die Empfehlung zur von einem interdisziplinären Tumorboard zur PSMA-Therapie haben.¹

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Expression von PSMA und CXCR4 in Verbindung mit etablierten Therapeutika. Neue

Wege zu finden, welche durch die Erhöhung der PSMA-Expression zur verbesserten Sensitivität des PSMA-PET führen könnten, wodurch der personalisierte Therapieansatz weiter optimiert werden kann.

Die Ergebnisse wurden in *In-vitro*-Zellkulturverfahren und mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Durchflusszytometrie ist eine standardisierte und anerkannte Methode, die direkte Strukturnachweise mit sehr hoher Genauigkeit liefert. Durch die Bindung mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörpern (Anti-PSMA, Anti-CXCR4) war es möglich, Expression und Ausmaß eindeutig nachzuweisen. Durch Markierung im Vorfeld mit dem Farbstoff konnten alle Proliferationsuntersuchungen für sowohl den PSMA- als auch für den CXCR4-Rezeptor mit der gleichen Methode durchgeführt werden. Die Durchflusszytometrie ist eine wissenschaftlich anerkannte und adäquate Untersuchungsmethode. Die Verifizierung der Ergebnisse könnte nach Abschätzen und Bestätigen der Proteingröße, ebenfalls mittels Western Blot erfolgen. Hierzu müssen die Zellen im Vorfeld lysiert und die Proteine extrahiert werden, damit diese mit SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt und angefärbt werden können.

Auf die PSMA- und CXR4-Expression wurden die androgen-empfindliche LNCaP-, die reduziert androgenempfindliche LNCaP-C4-2- und die androgenunabhängige, aus einer Knochenmetastase stammende PC-3-Zelllinie untersucht. Die androgenrezeptor-sensitiven LNCaP-Zellen zeigen insgesamt gegenüber den PC3- und LNCaP-C4-2-Zellen zwar eine höhere Expression von PSMA, wobei unter Abirateron (40µM) eine Herunterregulierung der Expression stattfindet, bleibt es bei den restlichen Wirkstoffen, wie auch bei den Kombinationen jedoch ein wirkstoffbezogener Effekt aus. Dennoch ist die LNCaP- Prostatakarzinomzelllinie für die Untersuchung der PSMA-Expression in besonderem Maße geeignet, da sie die spezifischen Eigenschaften humaner Prostatakarzinome widerspiegelt und in hohem Maß PSMA exprimiert.⁵³ Alle drei Zelllinien besitzen die Fähigkeit, *in-vitro* Knochenmetastasen zu bilden.⁵⁴ Auf diese Weise bilden die ausgewählten Zelllinien die umfangreichen Eigenschaften des metastasierten Prostatakarzinoms ab.

In den durchgeführten Uptake-Versuchen konnte nach erfolgter Exposition mit Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel die sichere Bindung des ⁶⁸Ga-PSMA-Liganden an den exprimierten PSMA nachgewiesen werden.

Bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom werden als Alternative zur operativen Kastration GnRH-Analoga (Gonadotropin-Releasing-Hormon) bei Therapiebeginn gemeinsam mit Flutamid verabreicht, um dem Serumtestosteronanstieg zu Beginn der Behandlung vorzubeugen. Ebenso verringert Flutamid die Umwandlung von Estradiol zu 2-Hydroxyöstron und 2-Methoxyöstron.⁵⁵ Östrogene dienen unter einer Androgendeprivation zur Schmerzlinderung und zur Verbesserung der Lebensqualität.⁵⁶

In einer Arbeit von Meller et al. (2015) wurde in Laborexperimenten eine kurzfristige Erhöhung der PSMA-Expression mit Antiandrogenen untersucht. Die verwendete Zelllinie VCaP wurde unter anderem mit Testosteron behandelt, um eine androgen-sensitive Version der VCaP-Zellen zu erhalten. Um einen toleranten Subtyp zur Verfügung zu stellen, wurden in einem anderen Ansatz VCaP-Zellen mit Abirateron behandelt. Im Anschluss daran wurden diese drei Zelllinien jeweils auf die Zugabe bzw. Entzug von Testosteron respektive Abirateron hin untersucht. In dieser Studie von Meller et al. hat sich die PSMA-Expression der androgen-sensitiven Zellen unter Zugabe von Abirateron verachtfacht und bei zusätzlichem Testosteronentzug verzehnfacht. In dieser Studie wurden die Zellen mit Abirateron (5 µM) und mit Testosteron (1 nM) behandelt.⁴³ Der Studie von Meller et al. entsprechende Ergebnisse konnten mit den in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffkonzentrationen Abirateron (40 µM) und Testosteron (100 nM) bei den androgen-sensitiven LNCaP Zellen nicht erzielt werden. Vielmehr ging die PSMA-Expression unter Abirateron (40 µM) gegenüber den unbehandelten Zellen um 70% zurück. Als mögliche Ursache hierfür ist die Differenz der verwendeten Konzentrationen zwischen der Studie mit Abirateron (5 µM) und unserer Untersuchung mit Abirateron (40 µM) anzusehen. Eine Zugabe von Testosteron ergab keine wesentliche Steigerung. Allerdings sind die Ergebnisse soweit nicht vergleichbar da in der erwähnten Studie die Experimente mit Testosteron (1 nM) und unsere Untersuchungen mit Testosteron (100 nM) durchgeführt wurden. Zwar geht die Expression von PSMA unter Docetaxel (8 nM) ebenfalls zurück, sie fällt aber deutlich geringer aus. Auch Flutamid bewirkt eine Herunterregulierung der PSMA-Expression bei den androgen-empfindlichen LNCaP-Zellen. Dagegen zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit bei den reduziert androgen-empfindliche LNCaP-C4-2-Zellen eine erhöhte PSMA-Expression unter der Therapie mit Abirateron. Aktuelle Untersuchungen in der nuklearmedizinischen Klinik der Universität Würzburg zeigen, dass bei einer Behandlung

mit Abirateron über mehrere Monate bei der Zelllinie LNCaP C4-2 die PSMA-Expression hochreguliert wird. Eine Kombinationstherapie mit zusätzlich Testosteron, Estradiol oder Flutamid beeinflusste die Ergebnisse kaum, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine Steigerung der PSMA-Expression auf die Zugabe von Abirateron basiert. In einer Studie von Vallabhajosula et al. (2016) wurde die PSMA-Expression vor und nach Beginn einer Therapie mit Abirateron und Enzalutamid ermittelt. Zwei Wochen nach Beginn der Therapie zeigte sich eine erhöhte PSMA-Expression, wohingegen diese nach drei Monaten jedoch deutlich gefallen ist.⁵⁷ Die in den beschriebenen Experimenten ermittelten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass zwar bei den androgen-sensitiven Prostatakarzinomzellen nach erfolgter Therapie mit Abirateron und/oder Docetaxel die PSMA-Expression rückläufig ist und dadurch die Empfindlichkeit bzw. die Effektivität einer PSMA-Radioligandentherapie reduziert sein könnte, dennoch findet eine basale Expression statt, welche eine Zielstruktur für Therapie und Diagnostik darstellen kann.

Die von der Verfasserin durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass nach einer Prämedikation mit Docetaxel die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 in den reduziert androgen-empfindlichen LNCaP C4-2 signifikant gestiegen ist (siehe Kapitel 6.3.2.). Die androgensensitiven LNCaP-Zellen verzeichneten gegenüber unbehandelten Zellen zwar ebenfalls eine erhöhte Expression, diese ist aber deutlich geringer (siehe Kapitel 6.3.1.) ausgefallen als bei der reduziert androgen-empfindlichen LNCaP C4-2 Zellen.

In den beschriebenen Uptake-Experimenten wurde aufgrund von höheren Expressionsraten PSMA als Zielstruktur genutzt. PSMA stellt für die Diagnose und Therapie des Prostatakarzinoms einen vielversprechenden Angriffspunkt dar. Da der CXCR4-Rezeptor an unterschiedlichen Zelltypen und Organen exprimiert wird und seine Überexpression mit einer Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert ist, können die hier ermittelten Daten für weiterführende Experimente anderer Tumorarten von Nutzen sein. So könnten die Ergebnisse mit Docetaxel in dieser Arbeit bei der weiteren Erforschung der Therapieoptionen von Brustkrebs, Bronchialkarzinom, Adenokarzinom des Magens und bei Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich von Bedeutung sein.

PSMA-RLT ist eine neue Diagnostik- und Therapieoption. Hierbei wird das bereits erprobte ^{177}Lu -Radionuklid mit dem spezifischen Liganden von PSMA kombiniert.⁵⁸ Bislang liegen nur wenige und teils widersprüchliche Daten insbesondere zu den Einflussfaktoren vor. Die bisher veröffentlichten, vorwiegend retrospektiven Untersuchungen belegen ein gutes Ansprechen bei fortgeschrittener Metastasierung und vorangegangener multimodaler Behandlung.⁵⁹ In einer multizentrischen, retrospektiven Studie von Rahbar et al. mit 145 Patienten konnte nach erfolgter ^{177}Lu -PSMA-RLT-Therapie bei 60 % ein allgemeiner PSA-Abfall und bei 45 % der Patienten sogar ein Abfall von mindestens 50% nachgewiesen werden. In der ersten prospektiven Phase-II-Studie von Hoffmann et al. wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet.

Es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um die PSMA PET/CT so weit zu verbessern, dass alle Wirkmechanismen der vorangehenden Therapien des Prostatakarzinoms berücksichtigt werden können und so die bestmögliche diagnostische Aussage bezogen auf eine Detektion von Metastasen bzw. eine für den Patienten personalisierte Therapie mit dem ^{177}Lu -PSMA-RLT oder neuentwickelten zukünftigen Liganden stattfinden kann. Insbesondere die Datenlage zur Nutzenbewertung von ^{177}Lu -PSMA-RLT bei der Behandlung des frühen mCRPC ist noch nicht ausreichend.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden *in-vitro*-Zellkulturverfahren ermittelt und sind nicht auf die Situation im Menschen übertragbar. Zelllinien für Zellkulturverfahren bestehen aus einem einzelnen Zelltyp und ahmen die Eigenschaften einer menschlichen Krebserkrankung nach. Menschliche Organe sind komplex und bestehen aus verschiedenen Zellarten. Die Wechselwirkungen der unterschiedlichen Zellarten und deren Interaktion mit dem Immunsystem können in einem Zellkultur-Modell nicht dargestellt werden. Anschließende präklinische Untersuchungen könnten mit einer Organchip-Technologie, bei der Mini-Organen aus induzierten pluripotenten Stammzellen oder aus einer Organresektion auf einem Kunststoff-Chip aufgebracht werden erfolgen. Diese Organchips-Systeme sind viel effektiver, die Ergebnisse sind auf den Menschen übertragbar und legen den Grundstein für eine personalisierte Medizin.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Erforschung der Zusammenhänge der Auswirkungen vorangegangener Therapien des Prostatakarzinoms, bezogen auf die

PSMA-Expression, besser zu verstehen um zukünftige Behandlungsstrategien zu optimieren.

8 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Therapieformen des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms auf die Expression von PSMA und von CXCR4 als Zielstruktur für ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren und ^{177}Lu -PSMA-RLT als Therapieoption.

In den Expressionsversuchen zeigte sich, dass bei der androgen sensitiven LNCaP Zelllinie unter Einfluss von Flutamid in Kombination mit Testosteron oder Estradiol und von Abirateron die Expression von PSMA herunterreguliert wird. In den Uptake-Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass trotz des negativen Einflusses von Abirateron auf die PSMA-Expression eine basale Bindung und Aufnahme des ^{68}Ga -PSMA-Liganden stattfindet, was durch die Zugabe von Testosteron oder Estradiol nicht vermindert werden konnte. Eine Behandlung mit Docetaxel erniedrigt bei der LNCaP-Zelllinie ebenfalls die PSMA-Expression, wenn auch nicht in dem Maße wie Abirateron. Des Weiteren zeigte sich, dass bei der reduziert androgenabhängigen LNCaP-C4-2-Zelllinie die Zugabe von Abirateron die PSMA-Expression hochreguliert, wohingegen Docetaxel positiv auf die CXCR4-Expression auswirkt. Die gewonnenen Daten lassen insgesamt noch kein abschließendes Urteil zu, durch welchen Mechanismus Abirateron und Docetaxel ihren Einfluss auf die Expression von PSMA und CXCR4 ausüben, in welcher Abhängigkeit sie zu den Rezeptoren stehen sowie welcher Mechanismus der PSMA-Expression nach erfolgter Therapie mit Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron, Docetaxel und deren Kombination zugrunde liegt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Chemotherapeutika einen Einfluss auf die Rezeptorexpression aufweisen. Die erzielten Ergebnisse sind vielversprechend und bilden einen Grundstein für weiteren *In-vivo*-Untersuchungen mit dem Ziel, das Potential der ^{68}Ga -PSMA PET/CT in der Diagnostik des Prostatakarzinoms weiter zu steigern sowie die Therapie mit ^{177}Lu -PSMA zu optimieren.

9 Literaturverzeichnis

1. Wirth MP, Fröhner M. S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms. *Der Onkol.* 2012;18(4):355–364. doi:10.1007/s00761-012-2216-z
2. Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, et al. Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends. 2010.
3. Carsten Bokemeyer, Markus Borner, Christian Kollmannsberger, Michael Krainer, Oliver Rick, Reinhold M. Schaefer, Thomas Wiegel, Manfred Wirth BW. Prostatakarzinom. Prostatakarzinom onkopedia Leitlinien.
4. *Interdisziplinäre leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms Version 4.0.*
5. Sperling H, Rossi R, Lümnen G, Rübben H. Testosteron und Prostata. *Der Urol Ausgabe A.* 2004;43(9):1092–1096. doi:10.1007/s00120-004-0654-y
6. Yeh S, Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(11):5517 LP-5521. <http://www.pnas.org/content/93/11/5517.abstract>.
7. Jockenhövel F. Welche Rolle spielen Östrogenrezeptoren in der Prostata? *Der Urol Ausgabe A.* 2003;42(1):97. doi:10.1007/s00120-002-0285-0
8. S1- Leitlinie zur Prostatakarzinoms Vorwort. 2016.
9. Müller-Lisse UL, Hofstetter A. Urologische Diagnostik des Prostatakarzinoms. *Radiologe.* 2003;43(6):432–440. doi:10.1007/s00117-003-0913-8
10. Ilic D ODGS, Wilt TJ. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;(3). doi:10.1002/14651858.CD004720.pub2
11. Röthke AM, Blondin D, Schlemmer H, Franiel T, Matthias Röthke K. PI-RADS-Klassifikation: Strukturiertes Befundungs- schema für die MRT der Prostata PI-RADS Classification: Structured Reporting for MRI of the Prostate. *Fortschr Röntgenstr Strukt Befundungsschema ... Fortschr Röntgenstr.* 2013;185(185):253–261. doi:10.1055/s-0032-1330270
12. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(16):9226–9233.
13. Seitz M, Scher B, Scherr M et al. Bildgebende Verfahren bei der Diagnose des Prostatakarzinoms. *Urologe.* 2007;46(10):1435–1448. doi:10.1007/s00120-007-1455-x
14. Afshar-Oromieh A, Kratochwil C, Eder M, Eisenhut M, Kopka K, Haberkorn U. Rezidivdiagnostik des Prostatakarzinoms mit PSMA-Liganden PET/CT und die initialen klinischen Erfahrungen mit der PSMA-basierten Radioligandentherapi. *Der Nukl.*
15. Kopka K, Benešová M, Bařinka C, Haberkorn U, Babich J. Glu-Ureido-Based Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Lessons Learned During the Development of a Novel Class of Low-Molecular-Weight Theranostic

- Radiotracers. *J Nucl Med.* 2017;58(Suppl 2):17S–26S. doi:10.2967/jnu med.116.186775
16. Schaefer NPD med. Von Diagnostik zur Therapie zur Theranostik am Beispiel der Lutetium-177-PSMA-Therapie. *Swiss Med Forum.* 2019.
 17. Heck MM, Retz M, Tauber R, Knorr K, Kratochwil C, Eiber M. Radionuklidtherapie des Prostatakarzinoms mittels PSMA-Lutetium. *Urologe.* 2017;56(1):32–39. doi:10.1007/s00120-016-0274-3
 18. Heston WDW. Bedeutung des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) Eine Neurocarboxypeptidase und Membran-Folat-Hydrolase*. *Der Urol A.* 1996;35(5):400–407. doi:10.1007/s001200050041
 19. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979;17(1):16–23.
 20. Ghosh A, Heston WDW. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004;91(3):528–539. doi:10.1002/jcb.10661
 21. Trebst C, Ransohoff RM, Windhagen A, Stangel M. Chemokine. *Nervenarzt.* 2003;74(10):850–857. doi:10.1007/s00115-003-1571-9
 22. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):171–179. doi:10.1016/j.sem cancer.2003.10.003
 23. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 2006;7(12):243. doi:10.1186/gb-2006-7-12-243
 24. Crump MP, Gong J, Loetscher P et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 1997;16(23):6996 LP-7007. <http://emboj.embopress.org/content/16/23/6996.abstract>.
 25. Rose M, Knüchel R. Wie entwickeln sich Metastasen urologischer Tumoren? *Urologe.* 2014;53(6):802–816. doi:10.1007/s00120-014-3465-9
 26. Clarke NW, Hart CA, Brown MD. Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2009;11(1):57–67. doi:10.1038/aja.2008.29
 27. Sun Y-X, Wang J, Shelburne CE et al.. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem.* 2003;89(3):462–473. doi:10.1002/jcb.10522
 28. Xing Y, Liu M, Du Y et al. Tumor cell-specific blockade of CXCR4/SDF-1 interactions in prostate cancer cells by hTERT promoter induced CXCR4 knockdown: A possible metastasis preventing and minimizing approach. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(11):1839–1848.
 29. Charles Huggins, M.D., Clarence V. Hodges MD. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate.

30. Rösch F, Piel M. Radiochemie/Tracer. In: Mohnike W, Hör G, Hertel A, Schelbert H, Hrsg. *PET/CT-Atlas: Interdisziplinäre PET/CT- und PET/MR-Diagnostik und Therapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016:35–73. doi:10.1007/978-3-662-48842-3_3
31. Gasch C, Körber S, Kremer C et al. Bedeutung und Nutzen von PSMA-Liganden beim Prostatakarzinom. *Aktuelle Urol*.
32. N.Mottet (Chair), R.C.N. van den Bergh, E.Briers (Patient Representative), L.Bourke, P. Cornford (Vice-chair), M. De Santis, S. Gillessen, A. Govorov, J. Grummet, A.M. Henry, T.B. Lam, M.D. Mason, H.G. van der Poel, T.H. van der Kwast, O. Rouvière TW, Guidelines Associates: T. Van den Broeck, M. Cumberbatch, N. Fossati, T.Gross, M. Lardas, M. Liew, L.Moris, I.G. Schoots PMW. *EAU Guidelines. End. presented at the EAU Annual Congress Copenhagen 2018.*; 2018.
33. Johannsen M, Wilke K, Schnorr D, Loening SA. Taxane in der Chemotherapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms. *Der Urol Ausgabe A*. 2004;43(2):160–167. doi:10.1007/s00120-004-0528-3
34. Ärzteschaft A der deutschen. *Zytiga® (Abirateron)*.
35. Miller K. Kastrationsresistentes Prostatakarzinom 2011 TT - Castration Resistant Prostate Cancer 2011. *Aktuel Urol*. 2011;42(02):95–102. doi:10.1055/s-0031-1271399
36. Ohlmann C-H, Kamradt J, Stöckle M. Antihormonelle Therapie des Prostatakarzinoms der 3. Generation. *Urologe*. 2012;51(4):522–526. doi:10.1007/s00120-011-2760-y
37. Omlin A, Gillessen S. Androgen- und Östrogenbiosynthesehemmer beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom. *Urologe*. 2012;51(1):8–14. doi:10.1007/s00120-011-2737-x
38. Heidenreich A, Pfister D, Ohlmann CH, Engelmann UH. Androgendeprivation in der Therapie des Prostatakarzinoms. *Urologe*. 2008;47(3):270–283. doi:10.1007/s00120-008-1636-2
39. Murphy GP, Elgamal AA, Su SL, Bostwick DG, Holmes EH. Current evaluation of the tissue localization and diagnostic utility of prostate specific membrane antigen. *Cancer*. 1998;83(11):2259–2269.
40. Morigi JJ, Stricker PD, van Leeuwen PJ et al. 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*. 2015;56(8):1185–1190.
41. Afshar-Oromieh A, Avtzi E, Giesel FL et al. The diagnostic value of PET/CT imaging with the (68)Ga-labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42(2):197–209. doi:10.1007/s00259-014-2949-6
42. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C et al. German Multicenter Study Investigating 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med* . 2017;58(1):85–90. doi:10.2967/jnumed.116.183194

43. Meller B, Bremmer F, Sahlmann CO et al. Alterations in androgen deprivation enhanced prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer cells as a target for diagnostics and therapy. *EJNMMI Res.* 2015;5(1):66. doi:10.1186/s13550-015-0145-8
44. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 1983;43(4):1809–1818.
45. Thalmann GN, Sikes RA, Wu TT et al. LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis. *Prostate.* 2000;44(2):91–103 Jul 1;44(2).
46. Rothe G. *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie.*
47. Roesch F, J Riss P. The renaissance of the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radionuclide generator initiates new developments in ⁶⁸Ga radiopharmaceutical chemistry. *Curr Top Med Chem.* 2010;10(16):1633–1668.
48. Ohlmann C-H, Gschwend J, Miller K, Mitglieder von AKO und die Vorstandsmitglieder der AUO. Kombinierte Chemohormontherapie beim metastasierten hormonsensitiven Prostatakarzinom. *Urologe.* 2015;54(11):1606–1608. doi:10.1007/s00120-015-3970-5
49. James ND, de Bono JS, Spears MR et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N Engl J Med.* 2017;377(4):338–351. doi:10.1056/NEJMoa1702900
50. Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol.* 2008;26(2):242–245. doi:10.1200/JCO.2007.12.4008
51. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(21):1995–2005. doi:10.1056/NEJMoa1014618
52. Baum RP, Kulkarni HR, Volkmer B et al. Theranostik des metastasierten Prostatakarzinoms mittels Lu-177 PSMA-Liganden in Kombination mit Ga-68 PSMA PET/CT. *Der Nukl.* 2015;38(02):145–152.
53. Pettaway CA, Pathak S, Greene G et al. Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1996;2(9):1627 LP-1636. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/2/9/1627.abstract>.
54. Yonou H, Yokose T, Kamijo T et al. Establishment of a novel species-and tissue-specific metastasis model of human prostate cancer in humanized non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice engrafted with human adult lung and bone. *Cancer Res.* 2001;61(5):2177–2182.
55. ZUMOFF B, FISHMAN J, Freed S et al. Effect of flutamide on estradiol metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;49(3):467–468.

56. Altwein JE, Wirth M, Ebert T. Primäre Hormontherapie beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom. *Dtsch Arztebl Int*. 2001;98(5):A-255. <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=25882>.
57. Vallabhajosula S, Jhanwar Y, Tagawa S et al. 99mTc-MIP-1404 Planar and SPECT scan: Imaging biomarker of androgen receptor (AR) signaling and prostate specific membrane antigen (PSMA) expression. *J Nucl Med*. 2016;57(supplement 2):1541. http://jnm.snmjournals.org/content/57/supplement_2/1541.abstract.
58. Ahmadzadehfar H, Albers P, Bockisch A et al. Lutetium-177-PSMA-Radioligandentherapie. *Urologe*. 2018;57(6):709–713. doi:10.1007/s00120-018-0642-2
59. Boegemann M, Schrader AJ, Rahbar K. 177Lu-PSMA-Therapie. *Urologe*. 2017;56(11):1440–1444. doi:10.1007/s00120-017-0510-5

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Die Rolle der CXCR4-SDF-1-Achse für die Entwicklung von Knochenmetastasen: Das Modell zeigt schematisch die Infiltration zirkulierender Prostatakarzinomzellen in das Knochenmark (modifiziert nach Crump Mp, Gong J, Loetscher P et al.)²⁵ ..12
- Abbildung 2:** PSMA-Radioligand (vereinfachte Darstellung nach Meller B., Bremmer F., Sahlmann Co, et al.)⁴³17
- Abbildung 3:** Konzentrationsabhängige Zellproliferation in % nach der Behandlung mit Testosteron für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC3 im Vergleich.....36
- Abbildung 4:** Konzentrationsabhängige Zellproliferation in % nach der Behandlung mit Estradiol für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC3 im Vergleich.....37
- Abbildung 5:** Konzentrationsabhängige Zellproliferation in % nach der Behandlung mit Flutamid für die Zelllinien LNCaP, LNCaP C4-2 und PC3 im Vergleich.....37
- Abbildung 6:** Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm Interquartilsabstand (IQR); n = 5. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus: * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01.39
- Abbildung 7:** Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C4-2 nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus mit $\alpha=0,05$ festgelegt wurde. * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01.40
- Abbildung 8:** Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie PC 3 nach 72- stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus mit $\alpha=0,05$ festgelegt wurde.41
- Abbildung 9:** Durchflusszytometrische Analysen der CXCR4-Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid,

	sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 4. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.	42
Abbildung 10:	Durchflusszytometrische Analysen der CXCR4-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C4-2 nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 4. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.	43
Abbildung 11:	Durchflusszytometrische Analysen der CXCR4-Oberflächenexpression der PC 3-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 4. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt.	44
Abbildung 12:	Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n=5. Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur Signifikanzniveaus wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. * $p \leq 0,05$	46
Abbildung 13:	Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der LNCaP-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.	47
Abbildung 14:	Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C4-2 nach 72-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$	48
Abbildung 15:	Durchflusszytometrische Analysen der PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinie LNCaP C-4 nach 72-stündiger Inkubation mit den	

Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Flutamid, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität (GeoMean) in Form von Median \pm IQR; n = 5. Signifikanzniveaus: ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001.....49

Abbildung 16: Uptake Analyse der Bindung des ^{68}Ga -PSMA-Liganden nach 72-stündiger Inkubation der LNCaP-Zellen mit den Wirkstoffen Testosteron, Estradiol, Abirateron und Docetaxel sowie ausgewählten Kombinationen. Dargestellt sind nach Abzug der Isotyp-Hintergrundaktivität die geometrischen Mittel der Ligandenbindung in Form von Median \pm IQR; n = 4. Signifikanzniveaus wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. *p \leq 0,05, *** p \leq 0,001.....51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Prognoseeinteilung nach International Society of Urological Pathology (ISUP) 2014	5
Tabelle 2:	TNM-/pTNM-Klassifikation [UICC 2017] ⁴	6
Tabelle 3:	Wellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	25
Tabelle 4:	Ergebnisse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinie LNCaP nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, aufgeführt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler, n=5.....	32
Tabelle 5:	Ergebnisse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinie LNCaP C4-2 nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, aufgeführt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler, n=5.....	34
Tabelle 6:	Ergebnisse der dosisabhängigen Zellproliferation der Zelllinie PC 3 nach Behandlung mit Testosteron, Estradiol und Flutamid, aufgeführt sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler, n=5.....	35

Abkürzungsverzeichnis

AAH	Atypische adenomatöse Hyperplasie
ASAP	Atypische mikroazinäre Proliferation
CFDA-SE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimdylester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CRPCa	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CT	Computertomographie
DHT	Dihydrotestosteron
FITC	Fluoreszenzeinisothiocyanat
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
HG-PIN	Hochgradige prostatistische intraepitheliale Neoplasie
ISUP	International Society of Urological Pathology
IQR	Interquartilsabstand
LG-PIN	Geringgradige prostatistische intraepitheliale Neoplasie
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-RH	Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
mCRCP	Metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
MRT	Magnetresonanztomographie
PCa	Prostatakarzinom
PE	Phycoerythrin
PET	Positronenemissionstomographie
PI-RADS	Prostate Imaging Reporting and Data System
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membran Antigen
PSMA-RLT	PSMA-Radio-Liganden-Therapie
SDF-1	Stromal cell derived factor-1
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
TMPSS 2	Transmembran Protease Serine 2

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank dem Direktor der Nuklearmedizinischen Klinik des Universitätsklinikums Herrn Professor Dr. A. Buck für die Bereitstellung aller erforderlichen Materialien, Gerätschaften und Räumlichkeiten ohne die die Anfertigung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Antje Stolzenburg für die Themenstellung und für die stets unermüdliche Betreuung und Hilfestellung bei allen meiner Fragen.

Ich möchte mich bei Frau Gabriele Riehl für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in die verschiedenen Techniken bedanken.

Ich danke meiner Familie für ihren unaufhörlichen Beistand.

