

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

**Direktor: Professor Dr. med. Andreas Buck**

**Untersuchungen zur Aufnahme und zum Metabolismus von  
Fluor-18-markierten und von radiojodierten Fettsäuren in primär  
humanen Prostatakarzinomzelllinien und in einem experimentellen  
Modell eines humanen Prostatakarzinoms**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

**zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg**

Vorgelegt von

Michaela van Oorschot

aus Hannover

**Würzburg, November 2012**



**Referent:** Univ.-Prof. Dr. Samuel Sannick  
**Koreferent:** Univ.-Prof. Dr. Matthias Guckenberger  
  
**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Matthias. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 23.Juli 2013

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Das Prostatakarzinom	1
1.1.1. Symptome	1
1.1.2. Früherkennung und Diagnostik	2
1.1.3. Therapie	4
1.1.4. Nachsorge und Rezidiv	6
1.2. In vivo Diagnostik mit nuklearmedizinischen Methoden	7
1.3. Fettsäuremetabolismus	10
1.4. Problemstellung und Zielsetzung	12
2. <u>Material und Methoden</u>	15
2.1. Verwendete Agenzien	15
2.2. Versuchsgeräte und Materialien	16
2.3. Zellkultur	17
2.3.1. Zelllinien	17
2.3.1.1. Auftauen der Zellen	18
2.3.1.2. Passagieren der Zellen	19
2.3.1.3. Kryokonservierung der Zellen	19
2.3.1.4. Bestimmung der Zellzahl	20
2.3.2. In vitro Untersuchungen zur Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat, 13-(4'-[ <sup>124/131</sup> I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure, [ <sup>18</sup> F]Fluorethylcholin und [ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglukose in die Prostatakarzinomzellen	20
2.4. Tierversuche	21
2.4.1. Versuchstiere	21
2.4.2. In vivo Untersuchungen im Tiermodell	22
2.5. Statistische Auswertung	23
3. <u>Ergebnisse</u>	24
3.1. Zellbindungsuntersuchungen in primär humanen PC-3, Du145, LNCaP und 22Rv1 Prostatakarzinomzellen	24
3.1.1. Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat in die Prostatakarzinomzelllinien	24
3.1.2. Aufnahme von 13-(4'-[ <sup>124/131</sup> I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure in die Prostatakarzinomzelllinien	28

3.1.3.	Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglukose und [ <sup>18</sup> F]Fluorethylcholin in die Prostatakarzinomzelllinien	32
3.1.4.	Bestimmung der Spezifität der Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat und 13-(4'-[ <sup>124/131</sup> I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure in die Prostatakarzinomzelllinien	34
3.1.4.1.	Spezifitätsbestimmung mit dem Inhibitor Etomoxir	34
3.1.4.2.	Spezifitätsbestimmung mit dem Inhibitor AICAR und Angiotensin	40
3.2.	Erste PET-Untersuchungen in tumortragenden Mäusen	43
4.	<u>Diskussion</u>	49
4.1.	In vitro Untersuchungen an humanen Prostatakarzinomzellen	50
4.1.1.	Aufnahmekinetik von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat und 13-(4'-[ <sup>124/131</sup> I] Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure in die Prostatakarzinomzellen	50
4.1.2.	Spezifität der Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat und 13-(4'-[ <sup>124/131</sup> I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure in die Prostatakarzinomzellen	51
4.2.	Erste in vivo Untersuchungen im Tiermodell	55
5.	<u>Zusammenfassung</u>	59
6.	<u>Literaturverzeichnis/ Abbildungsverzeichnis</u>	61

Danksagung

Lebenslauf

## Abkürzungsverzeichnis:

AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Transporter
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CT	Computertomographie
DCEMR	Dynamische Kontrasterweiterte Magnetresonanztomographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCH	[ <sup>18</sup> F]Fluorethylcholin
FDG	[ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglukose
FTP	[ <sup>18</sup> F]Fluorthioplomitat
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HMRS	Proton Magnetresonanz Spektroskopie
HRMR	High Resolution T <sub>2</sub> -gewichtete Bildgebung
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PHIPA	13-(4'-[ <sup>124/131</sup> I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
SPECT	Single Photon Emissions Computertomographie
TRUS	Transurethraler Ultraschall

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Prostatakarzinom

Mit jährlich rund 60.000 diagnostizierten Fällen ist das Prostatakarzinom (PCa) die häufigste Krebserkrankung bei Männern in Deutschland. In der Todesursachenstatistik bösartiger Tumorerkrankungen steht das PCa mit 10,1 % nach Lungen- und Dickdarmkrebserkrankungen an dritter Stelle weltweit (Kaatsch et al. 2012). Die Inzidenz des PCa ist stark altersabhängig und steigt generell mit fortschreitendem Lebensalter an. Dies lässt bei zunehmendem Altern der Bevölkerung ein Ansteigen der Prävalenz des PCa erwarten. In der neuen Übersicht der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland von 2012 wird die Inzidenz im Jahr 2008 unter den 50-59 Jährigen mit 227/ 100 000, der 60-69 Jährigen mit 921/ 100 000, in der Altersspanne von 70-79 Jahren mit 1524/ 100 000 und bei den über 80 Jährigen mit 1451/ 100 000 angegeben (Kaatsch *et al.* 2012).

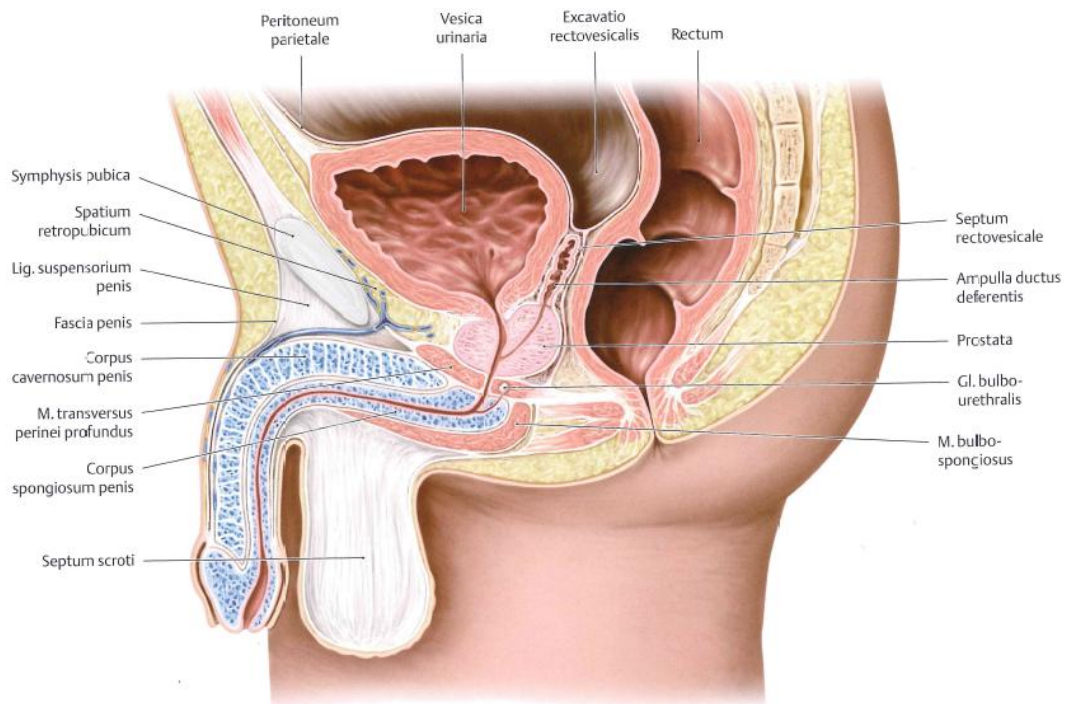
Das Prostatakarzinom zeigt einen sehr variablen Verlauf. Es gibt viele Fälle, in denen zwar ein Prostatakarzinom vorliegt, dieses aber so langsam wächst, dass es dem Patienten keine Beschwerden verursacht und nicht lebenslimitierend wirkt. Das so genannte insignifikante PCa ist nicht therapiebedürftig. In einer amerikanischen Studie ließ sich bei Untersuchungen des Prostatagewebes in Autopsien von Patienten, die zu Lebzeiten nicht wegen Prostataerkrankungen behandelt worden waren, ein Anstieg des PCa ab der 4. Lebensdekade nachweisen. Bei einem Drittel der 60-69-Jährigen und bei 46 % der 70-81-Jährigen wurde ein PCa gefunden (Yin *et al.* 2008).

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist noch nicht abschließend geklärt. Sowohl androgene Stimulation, als auch eine genetische Disposition und Ernährungsfaktoren spielen für das Wachstum eine Rolle (Nieder *et al.* 2003; van den Brandt *et al.* 2003; Zeegers *et al.* 2003).

### 1.1.1. Symptome

In den frühen Stadien ist das PCa meist asymptomatisch. Die Mehrzahl der Karzinome entsteht im Außenteil der Drüse, so dass sie keine Beschwerden verursachen. Häufig

handelt es sich um einen Zufallsbefund bei der Operation einer benignen Prostatahyperplasie oder bei einer Obduktion, die aus anderen Gründen durchgeführt wird. Zentral gelegene und weit fortgeschrittene Tumoren können auf die Harnröhre drücken und dadurch eine obstruktive Miktions symptomatik hervorrufen. Es kommt zu Blasenentleerungsstörungen und bei Invasion in das Gefäßsystem auch zu Blut im Urin oder im Sperma. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 1 die männliche Anatomie des kleinen Beckens mit der Prostata und den umliegenden Organen dargestellt.



**Abbildung 1:** Anatomie der Prostata mit den umliegenden Organen (Schünke *et al.* 2005).

### 1.1.2. Früherkennung und Diagnostik

Wird ein Prostatakarzinom im frühen Stadium erkannt, ist es heilbar. Auf Grund der meist fehlenden Symptomatik in diesem Stadium werden nach der „Interdisziplinären Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms“ jedem Mann ab dem 40. Lebensjahr Früherkennungsmaßnahmen empfohlen (Wirth *et al.* 2009). Zur Früherkennung stehen zwei sich ergänzende Verfahren zur Verfügung. Zum einen die Palpation in der digital rektalen Untersuchung und zum anderen die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blutserum.

Bei auffälligem Tastbefund, einem PSA-Wert über 4 ng/ml oder einer Steigerung des Wertes um mehr als 0,5 ng/ml pro Jahr wird zur weiterführenden Diagnostik eine Stanzbiopsie aus der Prostata entnommen. Mit speziellen Biopsiegeräten werden aus mehreren Regionen der Prostata 10-12 Gewebezylinder entnommen und histologisch untersucht. Findet sich Tumorgewebe in den Prostatastanzen, handelt es sich um ein histologisch gesichertes PCa und die lokale Tumorausbreitung kann mit Hilfe des transrektalen Ultraschalls (TRUS) festgestellt werden. Da die Tumorausbreitung, das Staging, Basis der Therapieentscheidung und damit bestimmend für die Prognose des Patienten ist, ist eine präzise Primärdiagnostik unerlässlich. Eine zur morphologischen Bildgebung zum TRUS zusätzlich durchgeführte Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) verbessert die Genauigkeit der lokalen Ausbreitungsdiagnostik nicht. Nur im Fall einer negativen Stanzbiopsie kann eine endorektal durchgeführte MRT zusätzliche Informationen über den Lokalstatus liefern und sinnvoll sein (Prando *et al.* 2005).

Das Prostatakarzinom metastasiert meist zuerst lymphogen und dann hämatogen. Die ersten befallenen Lymphknotenstationen befinden sich in der Fossa obturatoria. Diese werden beim Staging als Marker für einen positiven oder negativen Lymphknotenbefall gewertet. Fällt deren Lymphknotenstatus negativ aus, kann davon ausgegangen werden, dass noch keine lymphogenen oder hämatogenen Metastasen vorliegen. Weitere Stationen sind die präsakralen und inguinalen Lymphknoten, sowie die entlang der iliacalen Gefäße und paraaortal. Bei Verdacht auf Lymphknotenmetastasen (Gleason-Score von  $\geq 8$  / Kategorie cT3/4) erfolgt deren Diagnostik über eine MRT des Beckens (Wirth *et al.* 2009).

Der bevorzugte Ort der hämatogenen Streuung ist das Skelettsystem. Seltener finden sich Metastasen in der Leber oder der Lunge. Der Nachweis von Knochenmetastasen erfolgt über die Skelettszintigraphie. Diese wird bei beschwerdefreien Patienten bei einem PSA-Wert über 10 ng/ml durchgeführt, da in anderen Fällen nicht von einem Vorhandensein von Organmetastasen auszugehen ist (Wirth *et al.* 2009). Neben der genauen lokalen Ausbreitung ist auch die Diagnostik von eventuellen Metastasen für die Therapieentscheidung von essentieller Bedeutung. Leider ist die Sensitivität und Spezifität der MRT für das Aufspüren von Lymphknotenmetastasen nur für Foci über 1 cm ausreichend hoch, so dass kleinere betroffene Lymphknoten leicht übersehen



werden können (Nakashima *et al.* 2004). Die Genauigkeit bei der Suche nach Metastasen kann durch die Positronen-Emissions-Tomographie in Kombination mit der Computertomographie (PET/CT) mit radioaktiv markierten Cholinderivaten verbessert werden. „Diese Untersuchung ist besonders dann angezeigt, wenn man bei positivem Nachweis von lymphogenen oder hämatogenen Metastasen auf lokale kurative Maßnahmen verzichten möchte. In diesen Fällen würden sie eine diagnostische Lymphknotenausräumung überflüssig machen“ (Sökeland und Rübben 2008). Auf die Diagnostik mit der PET und die Kombinationsuntersuchung der PET/CT wird in Kapitel 1.2. genauer eingegangen.

In der Diagnostik des Prostatakarzinoms mittels MRT hat es in den letzten Jahren einige Neuerungen gegeben. Eine ist die Kombination der high-resolution T<sub>2</sub>-gewichteten Bildgebung (HRMR) mit dynamisch Kontrasterweiterter Magnetresonanz (DCEMR) und Proton MR Spektroskopie (HMRS). Diese Methoden zeigen Potential bei der Steuerung von Biopsien nach erster negativer Biopsie, zur Planung der Prostatektomie und könnten auch die frühe Detektion eines Rezidivs erleichtern (Sciarra *et al.* 2011; Sciarra *et al.* 2011). Ein weiteres Verfahren ist die ultraschall superparamagnetic iron oxyde MRT (USPIO). Dabei werden paramagnetische Eisenpartikel intravenös injiziert, die sich in den Tumorzellen ablagern und nach 24 h mit der MRT dargestellt werden können. Vor allem bei der Metastasensuche verspricht dieses Verfahren ein gewisses klinisches Potential (Mattei und Danuser 2011).

### **1.1.3. Therapie**

Das Prostatakarzinom hat in frühen Stadien eine exzellente Prognose. Bei dem lokalen oder regionalen PCa liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei nahezu 100 %. Wenn es sich bei Diagnosestellung um einen metastasierten Zustand handelt, verschlechtert sich die Prognose und die 5-Jahresüberlebensrate liegt nur noch bei 32 % (Jemal *et al.* 2008). Zusammengenommen hat das Prostatakarzinom eine 5-Jahresüberlebensrate von 70 %. Die Therapie des Prostatakarzinoms richtet sich nach der Ausbreitung des Tumors (TNM-Klassifikation), seinem Grading (Gleason-Score) und patientenabhängigen Daten, wie dessen Allgemeinzustand, Begleiterkrankungen, biologischen Alters und der daraus resultierenden Lebenserwartung. In Abhängigkeit dieser Faktoren wird zwischen

einer konservativen abwartenden Therapie, der operativen Entfernung der kanzerösen Prostata, Strahlentherapie oder antiandrogenen Hormontherapie gewählt.

Grundsätzlich gilt es ein lokal begrenztes PCa mit lokalen Methoden, sprich mit operativer Behandlung oder Strahlentherapie, und einen fortgeschrittenen Befund mit systemischer Therapie, in aller Regel einer Androgendeprivationstherapie oder antiandrogenen Hormontherapie, zu behandeln.

Handelt es sich um einen klinisch nicht erkennbaren Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar, aber histologisch in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes nachgewiesen ist (pT1a), ist die Active Surveillance die primäre Herangehensweise (Wirth *et al.* 2009). Auf Grund des langsamen Wachstums ist nach zehn Jahren bei nur 15-20 % der Patienten mit einem Tumorprogress zu rechnen und keine direkte Therapie nötig (Hautmann und Huland 2006). Im 3 monatlichen Abstand wird der PSA-Verlauf kontrolliert und erst bei einem Anstieg des Wertes die Therapie begonnen. Gelegentlich wird bei einem jungen Patienten (unter 60 Jahre) auch bei einem T1a Stadium eine operative Entfernung des Tumors gewählt.

Als lokalisiertes PCa werden die Stadien T1, T2, N0, M0 zusammengefasst. In diesen Stadien ist die Erkrankung heilbar. Therapie der Wahl sind die radikale Prostatektomie und Strahlentherapie (Radiatio) (Wirth *et al.* 2009; Grimm *et al.* 2012). Voraussetzung für die Durchführung beider Therapiestrategien ist eine Lebenserwartung des Patienten von über zehn Jahren. In der radikalen Prostatektomie wird die gesamte Prostata mit ihrer Kapsel, den Endstücken der Samenleiter und der Bläschendrüse entnommen. Zusätzlich werden die Lymphknoten in der Fossa obturatoria entfernt und im Schnellschnittverfahren auf einen Tumorbefall geprüft oder das gesamte Lymphknotenpaket entfernt. Die Operation erfolgt als offener Eingriff und wird in einigen Zentren auch laparoskopisch oder als Roboter-assistierte Operation durchgeführt (Duffey *et al.* 2011; Singh 2011; Montorsi *et al.* 2012). Als gleichwertige Therapiestrategie des lokalisierten PCa kommt eine Strahlentherapie in Frage. Diese kann entweder in Form einer perkutanen Hochvolt-Radiotherapie oder als Brachytherapie durchgeführt werden. Die perkutane Bestrahlung erfolgt mit einer Strahlendosis von 72 bzw. 78 Gy am Zielvolumen. Diese Dosis wird über mehrere Wochen fraktioniert mit Hilfe eines Linearbeschleunigers verabreicht. Bei der

Brachytherapie werden radioaktive Jod-125-Seeds oder Palladium-102-Seeds direkt in das Prostatagewebe eingesetzt und erreichen so eine hohe lokale Strahlendosis. Operation und Bestrahlung unterscheiden sich durch ihr Nebenwirkungsprofil und die Radikalität der Entfernung des Tumorgewebes und müssen individuell gewählt werden. In verschiedenen Studien ließen sich keine Unterschiede im Bezug auf das biochemisch rezidivfreie Überleben über 5 bzw. 7 Jahre finden (Nilsson *et al.* 2004; Grimm *et al.* 2012).

Wenn der Tumor bereits die Prostatakapsel durchbrochen hat, Lymphknoten befallen sind oder Fernmetastasen vorliegen, handelt es sich um ein fortgeschrittenes Prostatakarzinom (Stadium T3, T4, N1-N4, M1). Im Stadium T3 ist eine vollständige operative Entfernung des Tumors nicht indiziert. In dieser Situation wird eine primär kurative Strahlentherapie durchgeführt, entweder als perkutane Hochdosistherapie oder in Kombination mit einer Brachytherapie (Wirth *et al.* 2009). Die Behandlung ist in der Regel mit einer Hormontherapie kombiniert. Bei zusätzlichem Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen ist die Langzeithormontherapie als Androgendeprivationstherapie oder Antiandrogene Therapie Standard. Die Strahlentherapie kann individuell fakultativ hinzugezogen werden (Wirth *et al.* 2009). Die Androgendeprivationstherapie umfasst die bilaterale Orchiektomie, die Östrogenstherapie, die Behandlung mit LHRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten. Man muss davon ausgehen, dass 80 % der Tumorzellklone hormonsensitiv, jedoch 20 % hormonresistent sind. Es ist damit zu rechnen, dass 80 % der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom auf eine solche Hormontherapie mit einer Remission über 2-4 Jahre ansprechen und ca. 10 % bis zu 10 Jahre überleben. Hingegen zeigen 10-20 % so gut wie kein Ansprechen auf eine Hormontherapie. Bei den übrigen ist eine Remission über mehrere Jahre zu beobachten, der ein erneutes Wachstum der hormonresistenten Prostatazellklone folgt (Hautmann und Huland 2006).

#### **1.1.4. Nachsorge und Rezidiv**

Nach Primärtherapie sollte bei asymptomatischen Patienten innerhalb der ersten 2 Jahre vierteljährlich, im 3. und 4. Jahr halbjährlich und vom 5. Jahr an in jährlichen Intervallen Nachsorgeuntersuchungen mittels PSA-Wert Bestimmung erfolgen (Wirth *et al.* 2009). Wird dabei zweimalig ein PSA-Anstieg auf 0,2 ng/ml gemessen, spricht man von einem biochemischen Rezidiv. Dieser Anstieg kann entweder durch ein

Lokalrezidiv oder durch Metastasen bedingt sein. Trotz guter primärtherapeutischer Behandlungsmethoden tritt ein Tumorrezidiv bei 20-50 % der Patienten auf (Oehr *et al.* 2004). Die Lokalisation des Rezidivs ist von entscheidender Bedeutung, wenn eine lokale Rezidivtherapie für den Patienten in Frage kommt. Leider steht dafür derzeit noch keine standardisierte Untersuchungsmethode bereit. Wichtige Faktoren zur Differenzierung stellen die PSA-Verdopplungszeit, der Gleason-Score des bei der Operation entnommenen Präparates und die zeitliche Latenz bis zum chemischen Rezidivnachweis dar. Bei PSA-Werten über 10 ng/ml wird zusätzlich eine Knochenszintigraphie empfohlen (Bader *et al.* 2003; Gomez *et al.* 2004). Handelt es sich um ein Lokalrezidiv kann als kurativer Ansatz eine Salvageprostatektomie (nach primärer Radiatio) oder eine perkutane Salvagestrahlentherapie (nach primärer Operation) erfolgen. Beim Vorhandensein von Fernmetastasen ist die eingesetzte Therapie in der Regel nur noch palliativ. Wie in der Situation des primär metastasierten Prostatakarzinoms, kann mit antiandrogener Hormontherapie behandelt werden. Zusätzlich kommen eine Chemotherapie, Steroidtherapie oder andere symptomlindernde Maßnahmen zur Behandlung in Frage.

## **1.2. In vivo Diagnostik mit nuklearmedizinischen Methoden**

Auf Grund ihrer Bedeutung in der Therapieentscheidung und der Prognose stellt die Diagnose von Metastasen des Prostatakarzinoms eine besondere Herausforderung dar. Gleichfalls ist die Differenzierung eines chemischen Rezidivs nach vermeintlich kurativ erfolgter Therapie in Lokalrezidiv oder systemische Metastasen hinsichtlich des weiteren Vorgehens von grundlegender Wichtigkeit und stellt den behandelnden Arzt mit den aktuellen diagnostischen Möglichkeiten vor eine schwierige Aufgabe.

Vergleichende Studien ergaben, dass unter den nuklearmedizinischen Verfahren die Positronenemissionstomographie (PET) und hier insbesondere in Kombination mit der Computertomographie (CT) aktuell die sensitivsten Methode zur Darstellung des rezidierten Prostatakarzinoms darstellt (McGarry 2001; Farsad *et al.* 2008; Kwee *et al.* 2009; Rioja Zuazu *et al.* 2009). Selbst in Grenzbereichen mit einem PSA-Wert von weniger als 5 ng/ml ist die PET ein geeignetes Mittel zum Nachweis von Rezidiven (Rioja Zuazu *et al.* 2009). In Patientenstudien konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls

zur Darstellung von Knochenmetastasen geeignet ist. Während die Knochenszintigraphie momentan diagnostisches Mittel der Wahl ist, zeigt die PET eine höhere Sensitivität in der Detektion von Knochenmetastasen (Beissert *et al.* 2008). Klinisch wird die PET gegenwärtig nur noch in Kombination mit einer Computertomographie, als Hybridbildgebung PET/CT eingesetzt. Die PET/CT vereinigt die sensitive Darstellung der Stoffwechselaktivität des Tumors im PET mit den räumlich hochaufgelösten Schnittbildern der CT und erlaubt somit eine höhere Sensitivität und Spezifität als die PET allein (Even-Sapir *et al.* 2006). Eine Studie von Krause *et al.* an Patienten mit lokalen und regionalen Metastasen sowie Fernmetastasen nach biochemischem Rezidiv ergab eine lineare Abhängigkeit zwischen Detektionsrate und PSA-Wert. Bei einem PSA-Wert von 3 ng/ml liegt sie bei über 75 %. Bei 1 ng/ml ist der Tumor immer noch bei einem Drittel der Patienten darstellbar (Krause *et al.* 2011).

Für die Untersuchung des Prostatakarzinoms mit der PET sind mehrere radioaktiv markierte Pharmaka - sogenannte Radiotracer oder Radiopharmaka - getestet worden. Die am besten untersuchten Radiopharmaka sind [<sup>18</sup>F]Fluorodeoxyglukose (FDG), [<sup>11</sup>C]- und [<sup>18</sup>F]Cholin sowie [<sup>11</sup>C]Acetat, von denen gegenwärtig [<sup>11</sup>C]- und [<sup>18</sup>F]Cholin die besten Ergebnisse im klinischen Alltag liefern (Hara *et al.* 1998; DeGrado *et al.* 2001; Hara *et al.* 2002). Die Radionuklide Fluor-18 und Kohlenstoff-11 sind dabei jeweils an Cholin, chemisch ein Ethanolamin und essentieller Bestandteil der Zellmembranen, gebunden. Biologische Grundlage der Aufnahme ist die durch die Malignität induzierte Hochregulation der Cholin kinase, welche zur Bindung des Cholins in Form von Phosphatidylcholin in den Tumorzellmembranen führt. Im Gegensatz zum [<sup>11</sup>C]/[<sup>18</sup>F]Cholin ergaben zahlreiche Untersuchungen, dass die bei mehr als 90 % aller onkologischen Fragestellungen eingesetzte FDG-PET zum Nachweis eines PCa wenig geeignet ist (Price *et al.* 2002; Caroli *et al.* 2010).

Neben [<sup>11</sup>C]/[<sup>18</sup>F]Cholin stellt auch [<sup>11</sup>C]Acetat einen viel versprechenden Radiotracer zum Nachweis des PCAs dar (Bouchelouche und Oehr 2008; Bouchelouche *et al.* 2011). Acetat ist ein Metabolit der zytoplasmatischen Lipidsynthese. Die Retention des radioaktiv markierten Acetats in den Prostatakarzinomzellen erfolgt primär durch dessen Umwandlung zu Phosphatidylcholin und Triglyceriden im Zytoplasma.

Neben der PET gibt es eine ältere nuklearmedizinische Methode zur Diagnostik des Prostatakarzinoms, den so genannten ProstaScint Scan. Das 1996 entwickelte Verfahren nutzt einen monoklonalen Antikörper gegen das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA), der mit Indium-111 ( $^{111}\text{In}$ ) markiert wird, um Prostatakarzinomzellen in der Single Photon Emissions Computertomographie (SPECT) darzustellen. Auf Grund der geringen Spezifität und der Untersucherabhängigkeit wurde der ProstaScint Scan in Vergangenheit nur eingeschränkt genutzt und ist nur für den Nachweis von Weichteilmetastasen zugelassen. In Kombination mit CT und MRT und den Verbesserungen dieser Bildgebung, rückt dieses Verfahren wieder neu in den Focus (Skrede *et al.* 1997; Haseman *et al.* 2000). Gleichfalls gibt es Bemühungen den Antikörper zur sogenannten „Immunotargeted“ Therapie oder beim Grading einzusetzen (Leung 2004; Denoyer *et al.* 2011; Denoyer *et al.* 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Positronenemissionstomographie in Kombination mit der Computertomographie (PET/CT) die derzeit potenteste Methode zur frühen Lokalisationsdiagnostik des rezidierten Prostatakarzinoms darstellt (De Jong *et al.* 2010; Jadvar 2011). Dennoch ergeben sich bei dem breitflächigen Einsatz dieser Techniken folgende Schwierigkeiten:

- 1) Durch die kurze Halbwertszeit von [ $^{11}\text{C}$ ]-markierten Radiopharmaka (20 Minuten) sind Untersuchungen mit diesen nur in sehr wenigen Zentren mit eigenem Zyklotron möglich. Langlebigere Radioisotope wie  $^{18}\text{F}$ Fluor oder  $^{123}\text{I}$ od wären deswegen für die Routineuntersuchung wünschenswert.
- 2) Gerade das [ $^{18}\text{F}$ ]-markierte Cholin hat durch seine schnelle renale Ausscheidung ein sehr schmales diagnostisches Fenster. [ $^{18}\text{F}$ ]Cholin, welches sich unmittelbar nach intravenöser Injektion in der Blase zu sammeln beginnt, beeinträchtigt dadurch die Aussagekraft der Aufnahme in der angrenzenden Prostata (Sutinen *et al.* 2004). Es wäre ein Radiotracer wünschenswert, der langsamer eliminiert wird.
- 3) Eine weitere Einschränkung, die sowohl für Cholin als auch für Acetat zutrifft, ergibt sich aus der Schwierigkeit der Abgrenzung des Prostatakarzinoms von der benignen Prostatahyperplasie (BPH) und der fokalen chronischen Prostatitis (Kato *et al.* 2002; Reske *et al.* 2006). Beide Erkrankungen zeigen eine hohe Anreicherung der Radiopharmaka in der PET, wodurch die Spezifität der

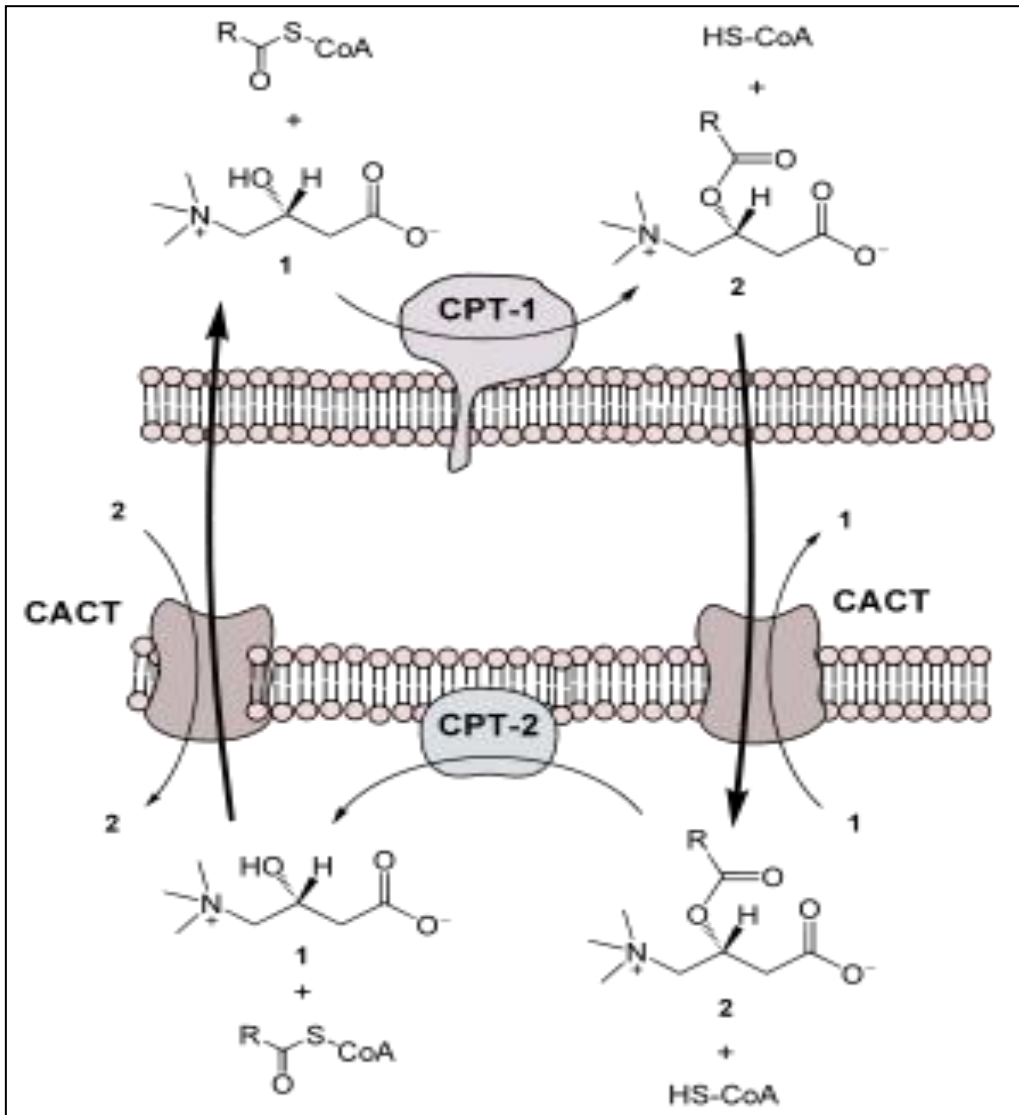
Untersuchung eingeschränkt wird. Idealerweise sollte das Radiopharmakon für die Diagnostik des Prostatakarzinoms allein für die maligne Entartung spezifisch sein.

Weltweit beschäftigen sich mehrere Forschungsgruppen mit der Entwicklung neuer Wege, um das Prostatakarzinom, sowohl im prätherapeutischen Staging als auch nach chemischem Rezidiv mit hoher Genauigkeit darzustellen und damit die Prognose, insbesondere des metastasierten Karzinoms zu verbessern. Dabei spielt die Entwicklung spezifischerer Radiotracer zur Adressierung krankheitsspezifischerer Targets mit PET, als das derzeit vielversprechendste bildgebende Verfahren zum Nachweis des rezidierten Prostatakarzinom *in vivo*, eine Hauptrolle. In Studien zum Stoffwechsel des Prostatakarzinoms ließ sich zeigen, dass der Fettsäuremetabolismus in Prostatakarzinomzellen bedeutender ist als der Glukosestoffwechsel (Leung 2004). Auch Untersuchungen in Zellkulturen ergaben, dass die Aufnahme von Fettsäuren in Prostatakarzinomzellen höher liegt als die von Glukose (Liu *et al.* 2010). Dies deutet auf das hohe Potential von radiomarkierten Fettsäuren als Radiotracer für die Untersuchung von PCa mit der PET hin und macht den Fettsäuremetabolismus zu einem interessanten Target für die molekulare Bildgebung mit der PET.

### **1.3. Fettsäuremetabolismus**

Freie Fettsäuren gelangen über verschiedene Wege in das Innere der Zelle. Einige Fettsäuren können die Zellmembran durch freie Diffusion überqueren. In manchen Geweben erfolgt die Aufnahme durch die Bindung an das Membranprotein CD 36. Ein dritter, wichtiger Weg stellt der Carrier-vermittelte Transport über die Fettsäuretransport Proteine (FATP 1-6) dar, deren Mechanismus nur eingeschränkt bekannt ist (Löffler 2007). In der Zelle werden Fettsäuren in mehreren Schritten in der  $\beta$ -Oxidation metabolisiert. Die  $\beta$ -Oxidation findet in den Mitochondrien statt. Da die innere Mitochondrienmembran für Fettsäuren undurchlässig ist, geschieht deren Transport mit Hilfe eines Carnitin-Transportsystems. An der äußeren Mitochondrienmembran werden die Fettsäuren zuerst durch das Enzym Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT in Abb. 2) aktiviert und dann über eine Translokase

(Carnitin-Acylcarnitin-Transporter, CACT in Abb. 2) in das Innere der Mitochondrien befördert. Dort wird der Aktivierungsvorgang durch eine weitere Carnitin-Palmitoyl-Transferase an der inneren Mitochondrienmembran rückgängig gemacht und die Fettsäure in der  $\beta$ -Oxidation abgebaut (Löffler 2002).



**Abbildung 2:** Carnitin-Transportsystem an der Mitochondrienmembran (McGarry 2001).

Die Synthese von Fettsäuren ist chemisch gesehen die Umkehrreaktion der  $\beta$ -Oxidation. Sie kann in den Mitochondrien und im Zytoplasma der Zellen erfolgen. Die Regelstelle von Synthese und Abbau ist die Acetyl-CoA-Carboxylasereaktion. Steht im Kreislauf genug Energie zur Verfügung wird die Acetyl-CoA-Carboxylase aktiviert und es werden vermehrt Fettsäuren zur Speicherung gebildet. Wird demgegenüber Energie benötigt,



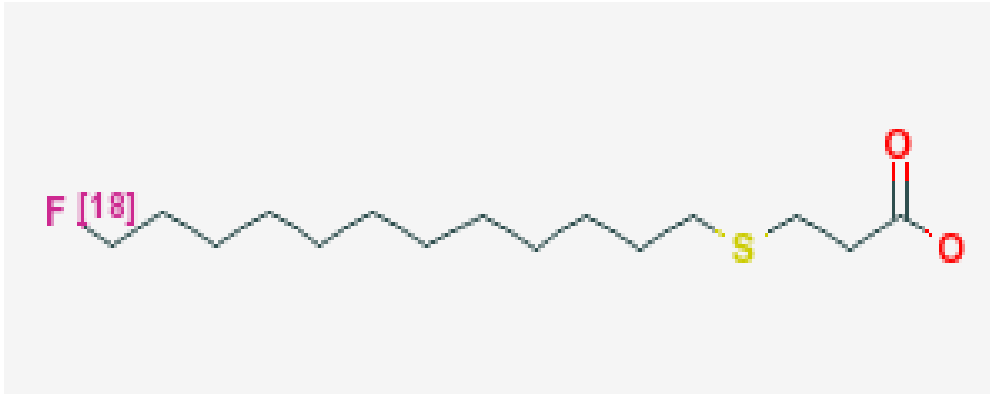
wird das Enzym gehemmt und Fettsäuren als Energielieferanten abgebaut (Löffler et al. 2002).

#### **1.4. Problemstellung und Zielsetzung**

In frühem Stadium hat das PCa bei adäquater Therapie eine gute Prognose, die sich durch das Auftreten von Metastasen dramatisch verschlechtert. Dieser Umstand erfordert eine präzise Diagnose im Staging mittels klinischer Untersuchung, Laborparameter und bildgebender Verfahren bei primärer Diagnosestellung. Gleiches gilt für das erneute Staging nach vorangegangener Therapie und Auftreten eines chemischen Rezidives. Da die Sensitivität gängiger bildgebender Verfahren, unter ihnen transurethraler Ultraschall, MRT, CT und Knochenszintigraphie, nicht ausreichend ist, um eine exakte Aussage über den Ausbreitungsstand der Erkrankung zu treffen, ist die Entwicklung weiterer bildgebender Verfahren notwendig, um die Therapieentscheidung zu erleichtern und damit eine bessere Prognose für Patienten mit einem PCa zu ermöglichen.

Es ist klinisch belegt, dass die Positronenemissionstomographie (PET), insbesondere in Kombination mit der Computertomographie (CT) das derzeit potentesten bildgebende Verfahren zum Nachweis des Prostatakarzinoms darstellt. Des Weiteren ergaben Untersuchungen in Prostatakarzinomzelllinien und erste tierexperimentelle Studien, dass der Fettsäurestoffwechsel eine bedeutendere Rolle beim Prostatakarzinom spielt als der bekannte Glukosestoffwechsel (Liu et al. 2006, 2010). Aus diesem Grunde stellt der Fettsäuremetabolismus ein vielversprechendes Target für die molekulare Bildgebung beim Prostatakarzinom dar. Gleichzeitig stellen radiomarkierte Fettsäuren eine interessante neue Klasse von Radiopharmaka für die PET- und SPECT-basierte Bildgebung beim Prostatakarzinom dar.

In der vorliegenden Arbeit sollen die radiofluorierte Fettsäure [<sup>18</sup>F]Fluorthiopalmitat (FTP) und das radiojodierte Analogon 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(4-phenyl)-tridekansäure (PHIPA) hinsichtlich ihres Potentials als Radiopharmaka für die Untersuchung des Fettsäuremetabolismus im Prostatakarzinom bewertet werden. Thiopalmitat ist eine langkettige Fettsäure, welche in der  $\beta$ -Oxidation des Fettstoffwechsels umgesetzt wird.



**Abbildung 3:** [<sup>18</sup>F]Fluorthiopalmitat (Leung 2004).

Vergleichende Untersuchungen des Metabolismus von Linoleat, Palmitat und Acetat im ventralen Teil der Prostata ergaben, dass Palmitat zum größten Teil in Glycerophosphatide aber auch in Sphingomyelin umgesetzt wird (Kaatsch *et al.* 2012). Bei der Untersuchung der Bildung von Citrat aus Fettsäuren und Aminosäuren im ventralen Teil der Prostata von Ratten zeigte sich Palmitat als der am besten geeignete Stoff das Citratlevel in den Prostatazellen zu erhöhen (Toghrol *et al.* 1980). Insofern spielt Palmitat eine wichtige Rolle im Fettsäuremetabolismus der Prostatazellen und bietet sich nach geeigneter Radiomarkierung als Fettsäure-basierter Radiotracer gut an. [<sup>18</sup>F]Fluorthiopalmitat wurde primär entwickelt, um den Fettsäuremetabolismus im Myocard *in vivo* zu untersuchen (DeGrado *et al.* 2000). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass FTP ein gut geeigneter Tracer für die Untersuchung des Fettstoffwechsels im Myocard darstellt (DeGrado *et al.* 2000; DeGrado *et al.* 2006).

Bei der zweiten Fettsäure handelt es sich um die radiojodierte 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I] Iodphenyl)-3-(4-phenylen)tridekansäure (PHIPA), eine Omegaphenyl Fettsäure. Auch sie wurde in Zell- und Tierversuchen mit Ratten zur Darstellung des Herzens verwendet und dort als geeigneter Tracer bewertet (Eisenhut und Liefhold 1988; Knapp *et al.* 1996; Eisenhut *et al.* 1997).

Im Zusammenhang mit dem Staging, Detektion eines Rezidives und Re-Staging haben die molekulare Bildgebung mit PET und insbesondere mit PET/CT mit den neueren Radiotracern das Potential in der Prognosestellung und Risikoeinschätzung für die Wahl der optimalen Behandlung und im Monitoring des therapeutischen Erfolgs unterstützend zu sein (Biersack und Freemann 2007). Motiviert durch obig genannte Faktoren sollen in dieser Arbeit die Fettsäuren FTP und PHIPA als mögliche

Radiotracer zur Untersuchung des Prostatakarzinoms mit der PET getestet werden. Dazu soll die Aufnahme beider Fettsäuren in vier verschiedene Prostatakarzinomzelllinien quantitativ und qualitativ bewertet werden. Des Weiteren soll die Spezifität der Aufnahme und der Aufnahmemechanismus durch Inhibitionsexperimente untersucht werden. Ziel ist es, das Potential beider Fettsäuren hinsichtlich der Darstellung eines Prostatakarzinoms präklinisch zu evaluieren und gleichfalls zu Grunde liegende Mechanismen zu erforschen. Zuletzt sollen die in vitro erzielten Ergebnisse in vivo mittels Kleintier-PET an tumortragenden Mäusen verifiziert werden, um einen ersten Hinweis hinsichtlich des Potentials der neuen radiomarkierten Fettsäuren als mögliche PET-Radiotracer für die in vivo Darstellung des Prostatakarzinoms zu bekommen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Agenzien

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) Kulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS Gold)	PAA, Cölbe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
Einfriermedium, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in DMEM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich Chemical, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Baker B.V., Deventer, Holland
Etomoxir	Sigma-Aldrich Chemical, Taufkirchen, Deutschland
AICAR	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
Angiotensin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
[ <sup>18</sup> F]Fluorid	PET NET, Erlangen, Deutschland
[ <sup>131</sup> I]-NaI	Amersham Healthcare, Braunschweig, Deutschland
[ <sup>124</sup> I]-NaI	Eckard und Ziegler Berlin bzw. PET-Zentrum des Universitätsklinikums GHS-Essen, Essen, Deutschland

Die untersuchten Fettsäuren [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiapalmitat, [ $^{131}\text{I}$ ]PHIPA und [ $^{124}\text{I}$ ]PHIPA wurden im radiochemischen Labor der Klinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik Würzburg am Tag des Experiments durch einen erfahrenen Radiochemiker hergestellt, in Propylenglycol gelöst und für die Untersuchungen bereitgestellt.

## 2.2. Versuchsgeräte und Materialien

Brutschrank	Hera cell, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Sterilbank	Hera safe, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Autoklav	Autoklav 23, Melag Medizintechnik, Berlin, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Stickstofftank	LS 750, Lab Systems Taylor-Wharton Germany GmbH, Mildstedt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Neubauer-improved, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipettierhilfe	Accu-jet pro, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Gamma-Counter	Automatic Gamma Counter Wizard 3 <sup>6</sup> , Wallac, Turku, Finnland
Kleintier-PET	Siemens Inveon, Siemens AG, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Pipetman, Gilson International B.V. Deutschland, Limburg-Offheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reagiergefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar Stripette, Sigma-Aldrich Chemical, Taufkirchen, Deutschland
Einfrierbox	Freezing Container 500 ml Nalgene, Sigma-Aldrich Chemical, Taufkirchen, Deutschland
Kryobehälter für Stickstofftank	Nalgene, Sigma-Aldrich Chemical, Taufkirchen, Deutschland
Kryogenic Vials	Nalgene, Sigma-Aldrich Chemical, Taufkirchen, Deutschland

## 2.3. Zellkultur

### 2.3.1. Zelllinien

Die Experimente wurden mit zwei primär humanen androgenunabhängigen Prostatakarzinomzelllinien (DU145 und PC-3), sowie mit den primär humanen androgenabhängigen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und 22Rv1 durchgeführt. DU145 ist eine epitheliale Prostatakarzinomzelllinie, die aus Hirnmetastasen eines 69 Jahre alten kaukasischen Mannes gewonnen wurde. PC-3 wurde aus Knochenmetastasen eines 62-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen. Bei beiden Zelllinien lässt sich keine Hormonsensitivität nachweisen (Stone *et al.* 1978; Kaighn *et al.* 1979).

Vergleichend wurde in den Experimenten mit den beiden hormonabhängigen Zelllinien LNCaP und 22Rv1 gearbeitet. LNCaP entstammt einer linksseitigen supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50 Jahre alten europäischen Mannes. Die Zellen weisen eine Expression von Androgen- und Estrogenrezeptoren auf und reagieren auf die Zugabe von 5-alpha-Dihydrotestosteron (Horoszewicz *et al.* 1983; Sramkoski *et al.* 1999). Bei der vierten Zelllinie, 22Rv1, handelt es sich um epitheliale

Prostatakarzinomzellen, die aus einem Xenograft einer Maus gewonnen wurden. Auch hier lässt sich eine Androgenrezeptorexpression nachweisen (Sramkoski *et al.* 1999).

Die verwendeten Zelllinien, ihre Herkunft und das verwendete Zellkulturmedium sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Alle vier Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen kultiviert.

<b>Zelllinie</b>	<b>Kulturmedium</b>	<b>Herkunft</b>
DU145	DMEM high Glucose mit L-Glutamin, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep 1 % Natriumpyruvat, 1 % HEPES,	Primär humane Prostatakarzinomzelllinie, ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
PC-3	1 % Nicht essentielle Aminosäuren	Primär humanes Adenokarzinom der Prostata, ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
LNCaP		Primär humane Prostatakarzinomzelllinie, ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
22Rv1		Primär humane Prostatakarzinomzelllinie, ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

### **2.3.1.1. Auftauen der Zellen**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zelllinien wurden bei -180° C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Nach Entnahme

aus dem Stickstofftank wurde das Kryogefäß zum Auftauen des Inhalts in ein 37° C temperiertes Wasserbad gehalten. Danach wurde die Oberfläche des Gefäßes mit 70 % Ethanol desinfiziert und der Inhalt in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in welchem 10 ml Kulturmedium vorgelegt waren. Nach 6 minütiger Zentrifugation bei 1600 U/min wurde der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde in 13 ml Medium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät. Bei 37° C unter einer 5 % igen humiden CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden die Zellen in einem Inkubator kultiviert.

### **2.3.1.2. Passagieren der Zellen**

Die Zellen wurden nach drei bis fünf Tagen bei 90 %-iger Konfluenz passagiert. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zuerst wurde das Kulturmedium entfernt und verworfen. Um alle Mediumreste zu entfernen, wurden die Zellen mit 5 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/Ethylendiamintetraacetat-Lösung (Trypsin/EDTA) versetzt, die Zellen durch Schwenken der Flasche komplett benetzt und überschüssiges Trypsin/EDTA abgesaugt. Nach ca. 3 Minuten im Brutschrank und mikroskopischer Kontrolle, wurde die Proteasereaktion des Trypsins mit 3 ml Medium inaktiviert und die Zellen in Suspension genommen. In Abhängigkeit ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen in den Verhältnissen 1:2 bis 1:6 in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

Durch die geringe Haftung an der Oberfläche bei der Zelllinie LNCaP ergab sich bei deren Passage eine Besonderheit. Nach dem Versetzen mit der Trypsin/EDTA-Lösung, wurde diese nicht abgesaugt, sondern bei der Inkubation im Brutschrank auf den Zellen belassen. Weiter wurde wie bei den anderen Zelllinien verfahren.

### **2.3.1.3. Kryokonservierung der Zellen**

Bei der Kryokonservierung der Zellen wurde erst wie beim Passagieren vorgegangen. Die abgelösten Zellen wurden bei 1600 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 0,75 ml Medium in die Kryogefäße überführt. Dann wurden jeweils 0,75 ml Einfrierlösung zugefügt. Die Kryogefäße wurden über Nacht in einer Einfrierbox, die ein schrittweises Abkühlen um 1° C/Min gewährleistet, in einem Gefrierschrank auf -80° C abgekühlt. Am Folgetag wurden die Kryogefäße in den Stickstofftank überführt, in dem sie bei -180° C konserviert wurden.



#### 2.3.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauerzählkammer. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit PBS verdünnt und mit Trypanblau versetzt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die poröse Membran toter Zellen in die Zelle eindringen kann und diese dunkelblau färbt. Bei lebenden Zellen ist die Membran undurchdringlich für Trypanblau, so dass sich auf diese Weise die Vitalität der Zellsuspension feststellen lässt. Sie betrug nie unter 95 %. In der Zählkammer wurden zwei Mal vier Großquadranten mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte dann über die Gleichung:

$$N/ml = (N:8) \times VF \times 10^4$$

N: Gesamtzahl der ausgezählten Zellen aus den Kleinquadranten

VF: Verdünnungsfaktor der Suspension

#### 2.3.2. In vitro Untersuchungen zur Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorthiopalmitat, 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure, [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin und [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglukose in die Prostatakarzinomzellen

Bei den Experimenten wurden der Uptake von 4-[<sup>18</sup>F]Fluorthiopalmitat (FTP), 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure (PHIPA), [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin (FCH) und [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglukose (FDG) nach 5, 10, 15, 30, 45 und 60 Minuten getestet. Pro Einzelversuch wurde mit 400 000 Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gearbeitet. Die Zellen wurden zunächst abgelöst und deren Zellzahl bestimmt. Danach wurde die benötigte Menge Zellsuspension in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS gelöst, so dass eine Konzentration von 800 000 Zellen/ml entstand.

Pro Einzelversuch wurden 500 µl Zellsuspension in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Danach wurde abhängig von der Aktivität zwischen 2 µl und 15 µl FTP, PHIPA, FEC und FDG hinzugegeben und zwischen 15 und 60 Minuten bei 37° C in einem Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen des 5 Minuten Zeitzustandes sowie die vier Kontrollen in gleicher Weise behandelt.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gestellt, um den Uptake zu stoppen. Danach wurden sie bei 4° C und 4000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 500 µl eiskaltem PBS gewaschen. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde zwei Mal wiederholt, danach wurde abschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Radioaktivität des verbliebenen Zellpellets wurde mit Hilfe eines Gamma-Counters gemessen.

Des Weiteren wurde die Spezifität der Aufnahme von FTP und PHIPA anhand von Inhibitorexperimenten mit dem irreversibel wirkendem O-Carnitin-Palmitoyl-Transferasehemmer Etomoxir getestet.

Dazu wurden zu der Zellsuspension vor Zugabe der Fettsäure 100 µl Inhibitor in den Konzentrationen 1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM hinzugefügt und 5 min bei 37° C inkubiert. Danach wurde die entsprechende Fettsäure zugegeben und weiter wie bei den anderen Experimenten verfahren. Um eine gute Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde der Uptake bei den Inhibitorexperimenten immer nach 15 min gemessen.

Gleichfalls wurde der Einfluss von Angiotensin und AICAR auf den Uptake von FTP und PHIPA untersucht.

Auch bei diesen Experimenten wurde der Zellsuspension vor Zugabe der Fettsäure 100 µl AICAR oder Angiotensin in den Konzentrationen 5 mM, 1 mM und 0,1 mM (AICAR)/ 1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM (Angiotensin) zugefügt. Während der Inkubationszeit kamen die Gefäße 5 Minuten bei 37° C in den Wärmeschrank. Danach wurde die entsprechende Fettsäure zugefügt und weiter wie bei den anderen Experimenten verfahren. Um eine gute Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde die Aufnahme bei den Inhibitorexperimenten ebenfalls nach 15 min gemessen.

Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmungen an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die gemessenen Aktivitäten ins Verhältnis zu der gemessenen Aktivität in den Kontrollen gesetzt.

## **2.4. Tierversuche**

### **2.4.1. Versuchstiere**

Als Modell für die in vivo Experimente am Kleintier-PET wurden CD1-nu/nu-Nacktmäuse mit einem Prostatakarzinom an der rechten Flanke verwendet. Ihnen

wurden  $5 \times 10^6$  Prostatakarzinomzellen der hormonunabhängigen Zelllinie PC-3 in die Flanke injiziert. Die Versuche wurden bei einem Tumordurchmesser von ca. 1 cm durchgeführt. Die Tiere waren 8-10 Wochen alt, hatten ein Gewicht von  $18,4 \pm 2,3$  g und waren im Tierstall der Universität Würzburg untergebracht.

#### **2.4.2. In vivo Untersuchungen im Tiermodell**

In einer ersten Pilotstudie sollten die in der Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse in vivo im Tiermodell verifiziert werden. Als in vivo Modell dienten CD1-nu/nu-Nacktmäuse mit heterotop an der rechten Flanke implantiertem primär humanem Prostatakarzinom. Die Bioverteilung und Tumoraufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiapalmitat wurde nach intravenöser Injektion des Radiopharmakons in die narkotisierten Tiere mittels Kleintier-PET untersucht und mit Daten aus der Untersuchung mit [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylcholin (FEC) und [ $^{18}\text{F}$ ]Fluordeoxyglukose (FDG) an den gleichen tumortragenden Tieren verglichen. Alle durchgeführten Tierexperimente wurden nach §8.1 des Tierschutzgesetzes von den örtlichen Behörden genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-2531.01-18/08).

Während der Versuche wurden die Mäuse gewärmt und standen unter Narkose mit 2 Vol.% Isofluran in einem Gasgemisch aus Druckluft und medizinischem Sauerstoff. Für die Messungen wurde mit  $^{18}\text{F}$  markiertes FTP und FCH mit einer Aktivität von durchschnittlich  $0,62 \pm 0,24$  MBq und  $6,08 \pm 1,31$  MBq über die Schwanzvene injiziert. 10 Minuten nach Injektion wurden die Mäuse in Bauchlage fixiert und ein Ganzkörper-PET-Scan durchgeführt. Die Verabreichung von FDG erfolgte intraperitoneal und die Durchführung der Aufnahme 50 Minuten post injektionem.

Die Bildrekonstruktion der Rohdaten erfolgte mit gefilterter Rückprojektion (Filter-Backprojektion) zu Schnittbildern in transversaler, sagittaler und coronarer Ebene. Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm AMIDE erstellt. Dazu wurden sog. Regions of interest (Regionen von Interesse, ROIs) in den Tumor und in ausgewählte Organe (Leber, Knochen, Muskel) gelegt und somit die aufgenommene Aktivität bestimmt. Insgesamt wurden neun Mäuse untersucht.

## **2.5. Statistische Auswertung**

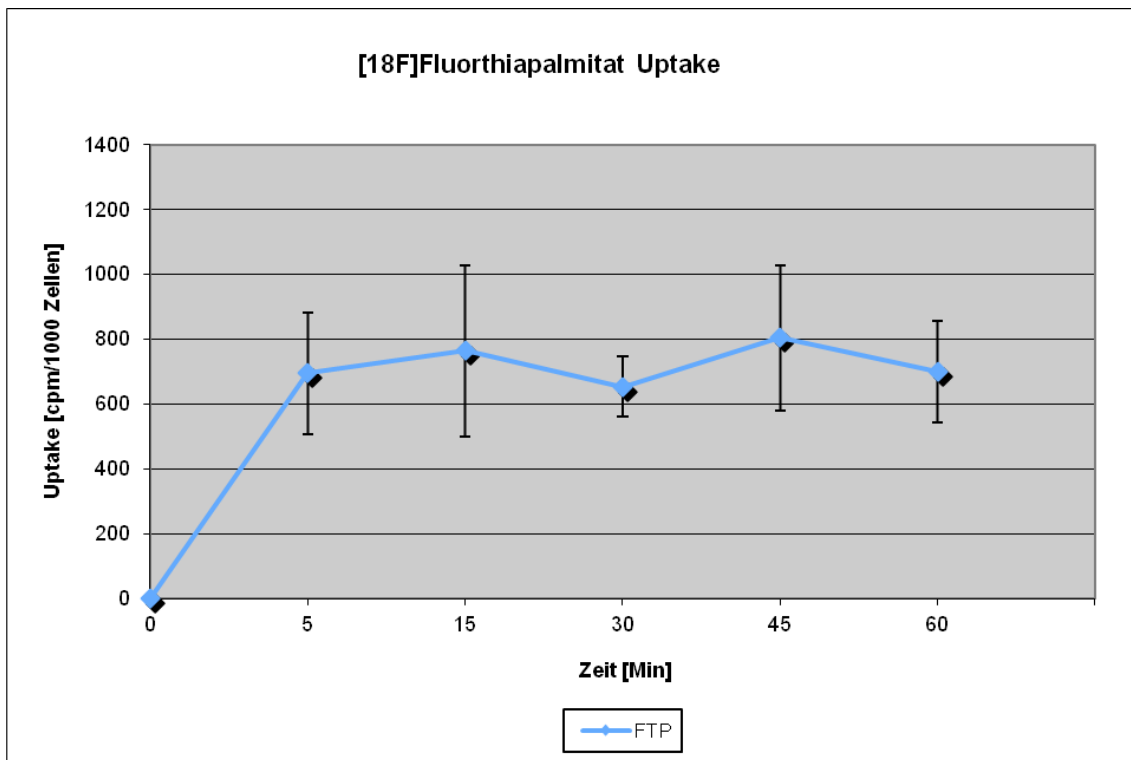
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2004/2007. Zur Festlegung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurde der Student's T-Test verwendet. Als signifikant wurde ein P-Wert von  $P = 0,05$  gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Zellbindungsuntersuchungen in primär humanen PC-3, DU145, LNCaP und 22Rv1 Prostatakarzinomzelllinien

##### 3.1.1. Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiopalmitat in die Prostatakarzinomzelllinien

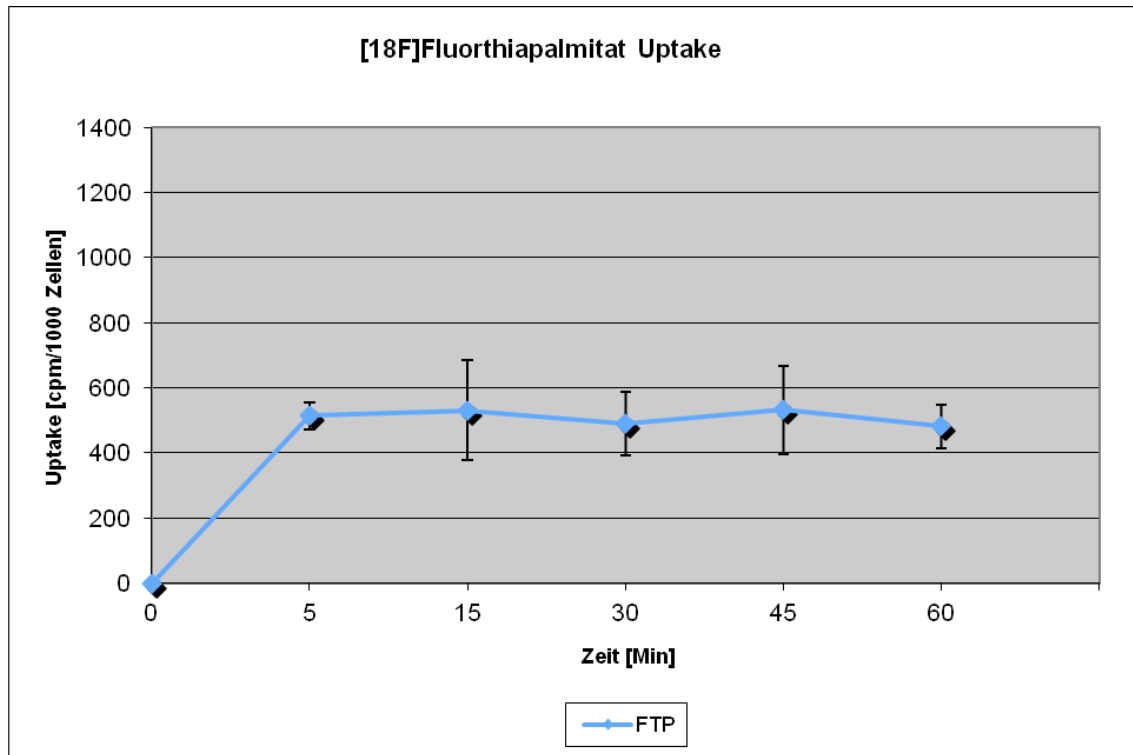
Die Abbildungen 4-7 zeigen die Aufnahmekinetik von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiopalmitat (FTP) in die hormonunabhängigen Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC-3 sowie in die hormonabhängigen Zelllinien 22Rv1 und LNCaP.



**Abbildung 4:** Aufnahmekinetik von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiopalmitat in die DU145-PCa-Zelllinie.

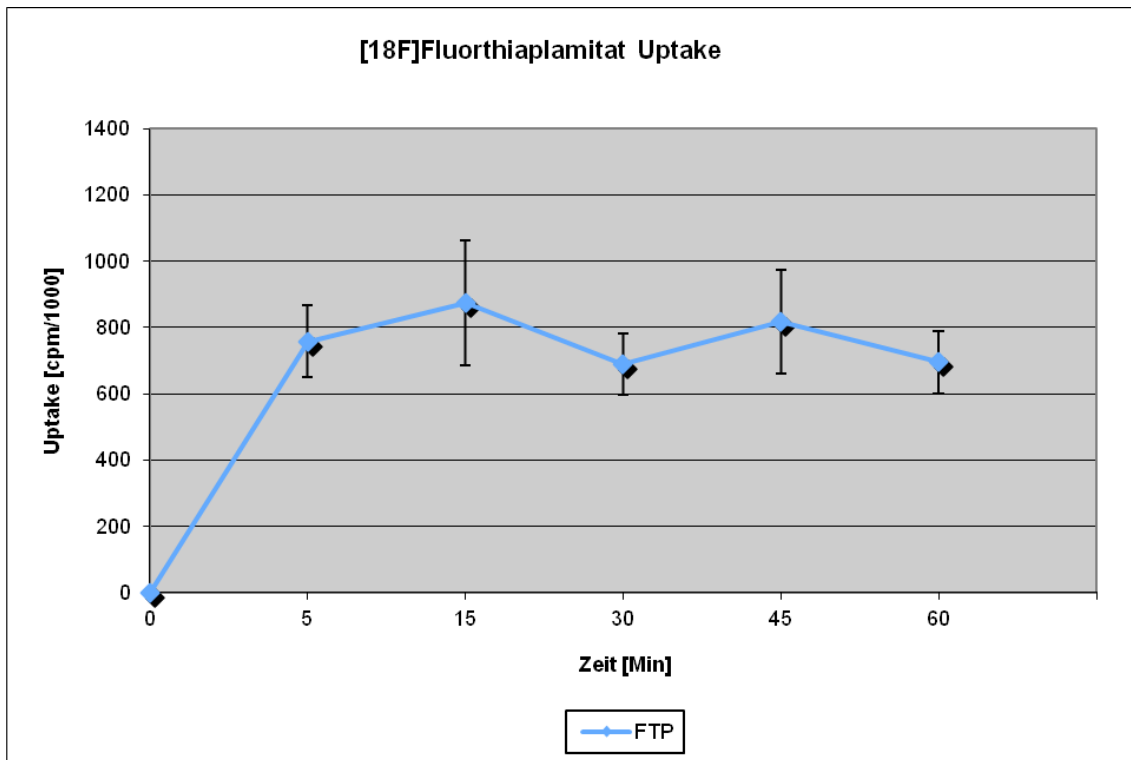
FTP zeigt eine schnelle Aufnahmekinetik in die DU145-Zellen unter standardisierten Bedingungen (37°C, PH 7.0, 5% CO<sub>2</sub>). Fast 90 % der gesamten Radioaktivitätsakkumulation in die Tumorzellen erfolgt innerhalb der ersten 5 Minuten (694 cpm/1000 Zellen). Innerhalb weiterer 10 Minuten steigt die Aufnahme nur noch geringfügig auf 764 cpm/1000 Zellen und erreicht damit eine Sättigung, welche im

Laufe der weiteren Untersuchungszeit bis 60 Minuten auf diesem Niveau konstant bleibt.



**Abbildung 5:** Aufnahmekinetik von  $[^{18}\text{F}]$ Fluorhiapalmitat in die PC-3-PCa-Zelllinie.

Auch die PC-3-Zellen zeigen unter diesen Bedingungen eine rasche Aufnahme von FPT. Nach einer Inkubation von 5 Minuten beträgt die zelluläre Aufnahme von FPT 514 cpm/1000 Zellen (Abb. 5). Dies entspricht 41 % der zugefügten Radioaktivität. Bis 15 Minuten steigt die Aktivitätsakkumulation auf 531 cpm/1000 Zellen leicht an und hält sich in der verbleibenden Untersuchungszeit konstant auf diesem Niveau.



**Abbildung 6:** Aufnahmekinetik von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthioplomitat in die LNCaP-PCa-Zelllinie.

Die Aufnahme von FTP in die LNCaP Zelllinie liegt insgesamt auf einem höheren Niveau als bei PC-3 und DU145. Nach 5 Minuten liegt die Aufnahme bereits bei 757 cpm/1000 Zellen und steigt auf 873 cpm/1000 Zellen nach 15 Minuten an, entsprechend 50-60 % der zugegebenen Radioaktivität in die Zellen. Dieser Wert bleibt bis zu einer Inkubationszeit von 60 Minuten weitestgehend konstant.

Die auf nächster Seite folgende Abbildung 7 zeigt, dass die 22Rv1-Zelllinie sich weitgehend kongruent zu LNCaP verhält. Die im Verlauf gemessene Radioaktivität liegt zwischen 940-1008 cpm/1000 Zellen. Nach 15-minütiger Inkubation ist dieses Niveau bereits erreicht und der Uptake liegt bei 1007 cpm/1000 Zellen. Der nach 5 Minuten gemessene Wert zeigt eine Aufnahme von 729 cpm/1000 Zellen, entsprechend 50 % der inkubierten Radioaktivität.

Die Abbildung 8 fasst die Aufnahme von FPT in den vier PCa-Zelllinien DU145, PC-3, LNCaP und 22Rv1 in einer Übersicht zusammen.

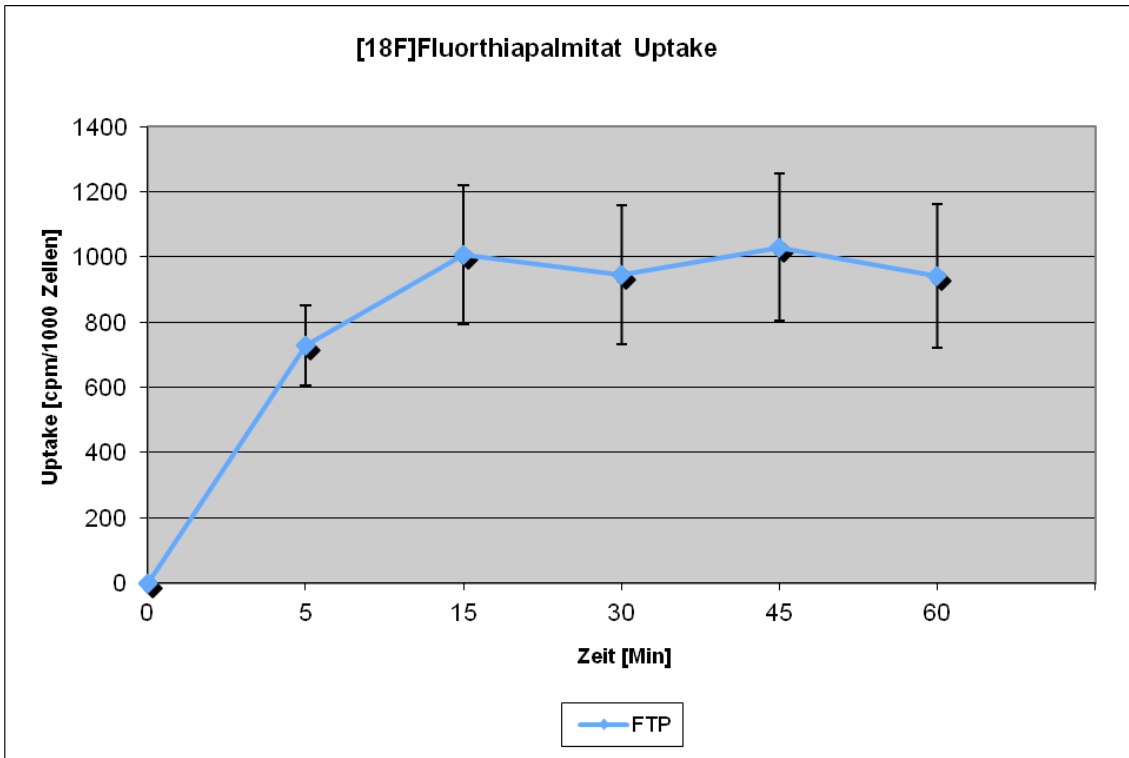


Abbildung 7: Aufnahmekinetik von [<sup>18</sup>F]Fluorothiopalmitat in die 22Rv1-PCa-Zelllinie.

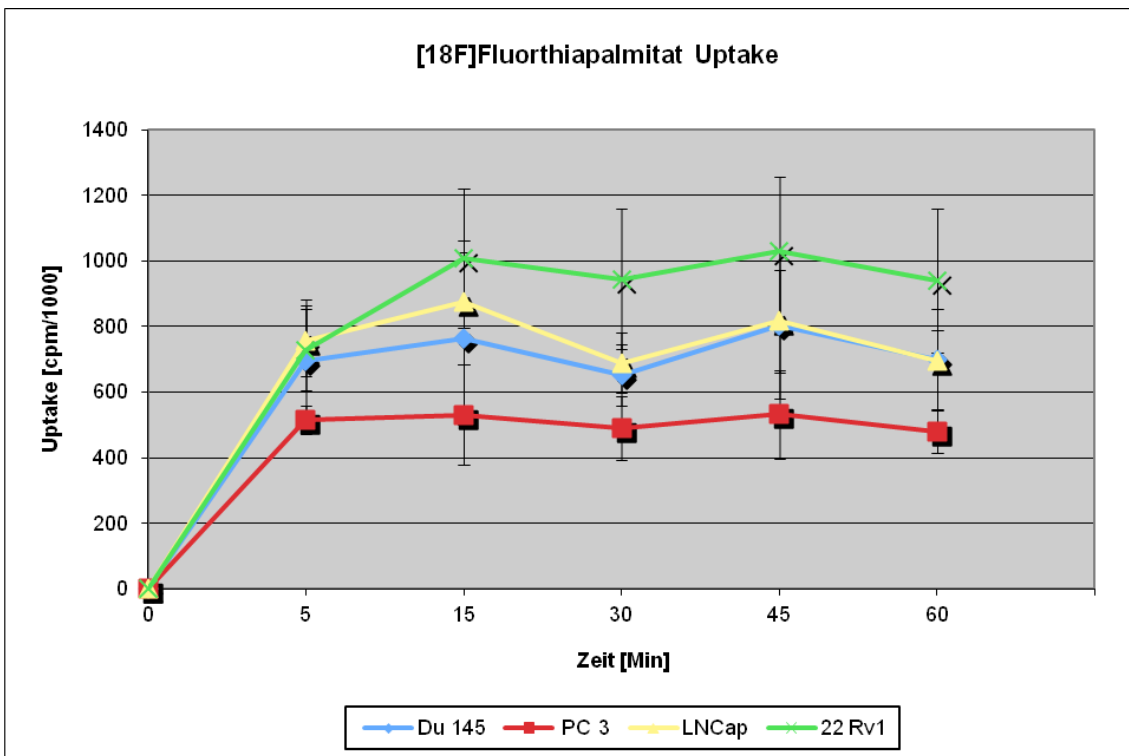


Abbildung 8: Aufnahmekinetik von [<sup>18</sup>F]Fluorothiopalmitat in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien.



In alle vier Zelllinien wird FPT relativ rasch aufgenommen mit einer langanhaltenden Retention in den Tumorzellen. Die Aufnahmekinetik von FPT zeigt einen ähnlichen Verlauf in allen vier untersuchten Zelllinien. Bereits nach 5, spätestens 15 Minuten ist die Sättigung der zellulären Aktivitätsaufnahme erreicht (Abb. 8). Nach 15 Minuten stellt sich ein Plateau ein. Im Vergleich der Zelllinien liegt der Uptake bei 22Rv1 am höchsten (Plateau um 1000 cpm/1000 Zellen). PC-3 hat den geringsten Uptake mit einer Sättigung bei um 500 cpm/1000 Zellen.

### 3.1.2. Aufnahmekinetik von 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure in die Prostatakarzinomzelllinien

Die Aufnahmekinetik von 13-(4'-[<sup>131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure (PHIPA) in den einzelnen PCa-Zelllinien ist in den Abbildungen 9-13 zusammengefasst. Die zelluläre Aufnahme von 13-(4'-[<sup>124</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure (PHIPA) war identisch.

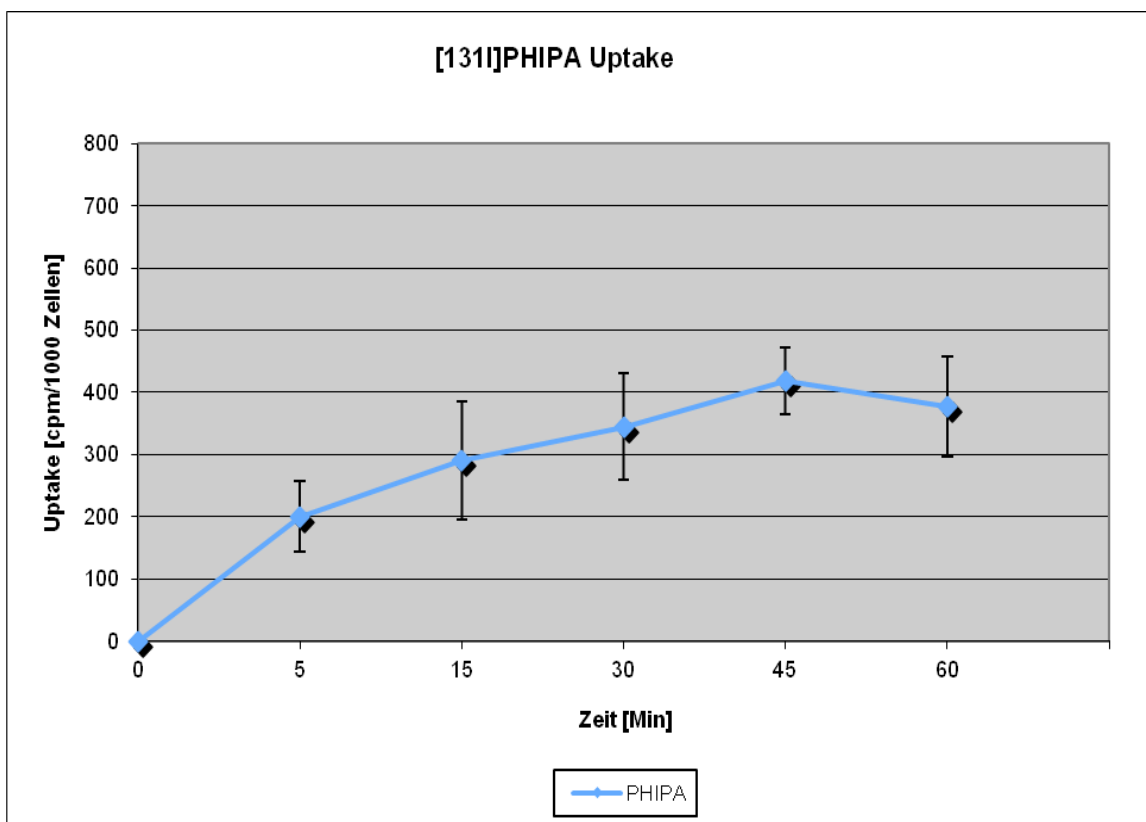


Abbildung 9: Aufnahmekinetik von PHIPA in die DU145-PCa-Zelllinie.

Abbildung 9 zeigt die Aufnahmekinetik von PHIPA in die hormonunabhängige Prostatakarzinomzelllinie DU145. Unter standardisierten Bedingungen steigt die Aufnahme in den ersten 5 Minuten rasch auf 200 cpm/1000 Zellen an, entsprechend 50 % der maximalen Akkumulation von PHIPA in dieser Zelllinie. Danach zeigt sich bis zu einer Inkubationszeit von 45 Minuten ein kontinuierlicher langsamerer Anstieg der Aufnahme (289 cpm/1000 Zellen bei 15 min, 344 cpm/1000 Zellen bei 30 min, 417 cpm/1000 Zellen bei 45 Minuten). Nach 60 Minuten ist der Uptake 376 cpm/1000 Zellen. Es liegt nahe, dass sich nach 45-minütiger Inkubation eine Sättigung der Aufnahme einstellt.

Als zweite hormonunabhängige Zelllinie wurde PC-3 untersucht. Auch hier zeigt sich in den ersten 5 Minuten ein steiler Anstieg auf 221 cpm/1000 Zellen (ca. 90 % des gesamten Uptakes). Nach 15-minütiger Inkubation liegt die Aufnahme von PHIPA bei 286 cpm/1000 Zellen, bleibt dort auch nach 30 Minuten (280 cpm/1000 Zellen), steigt nach 45 Minuten leicht an (372 cpm/1000 Zellen) und bleibt dann auf diesem Niveau stehen (Abb. 10).

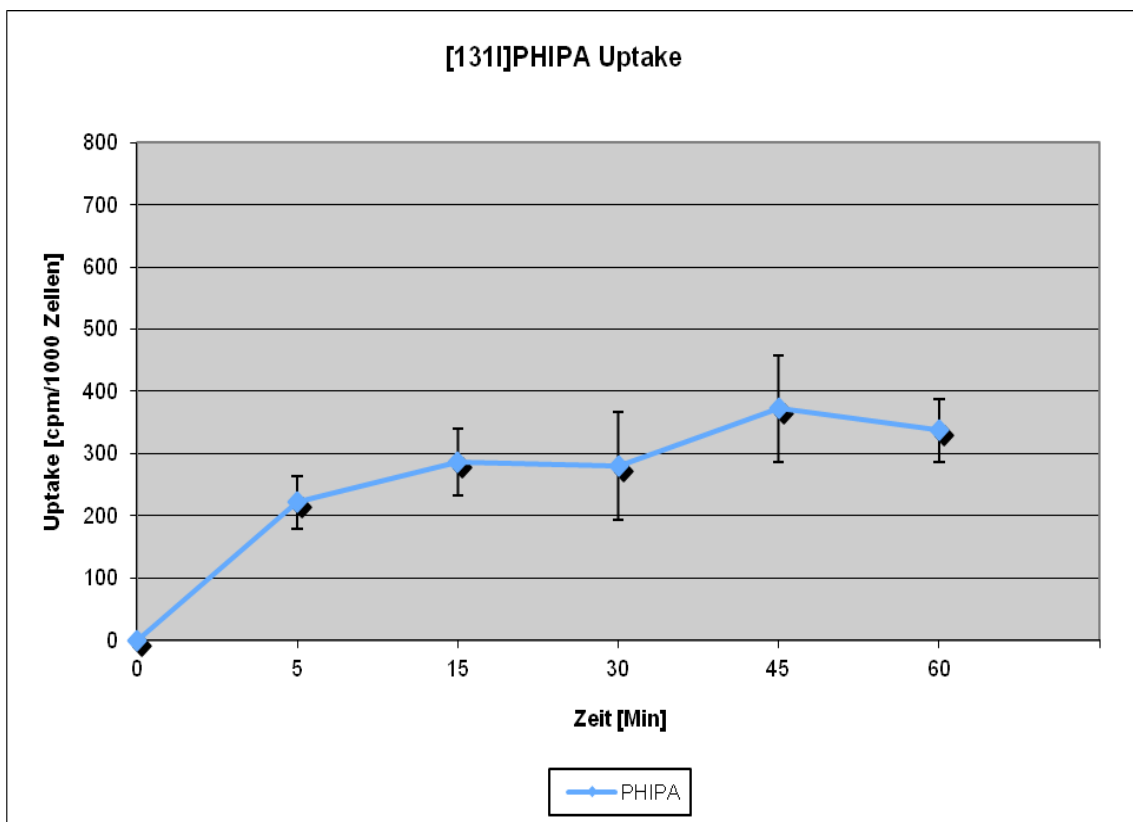
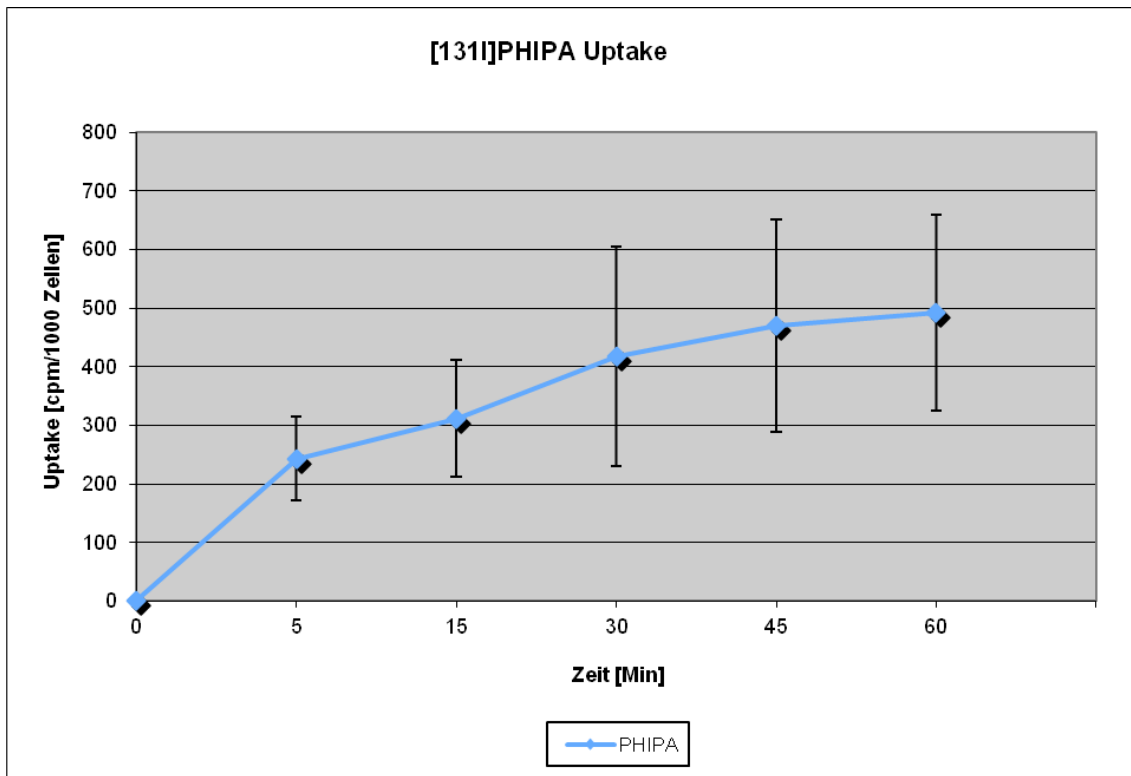
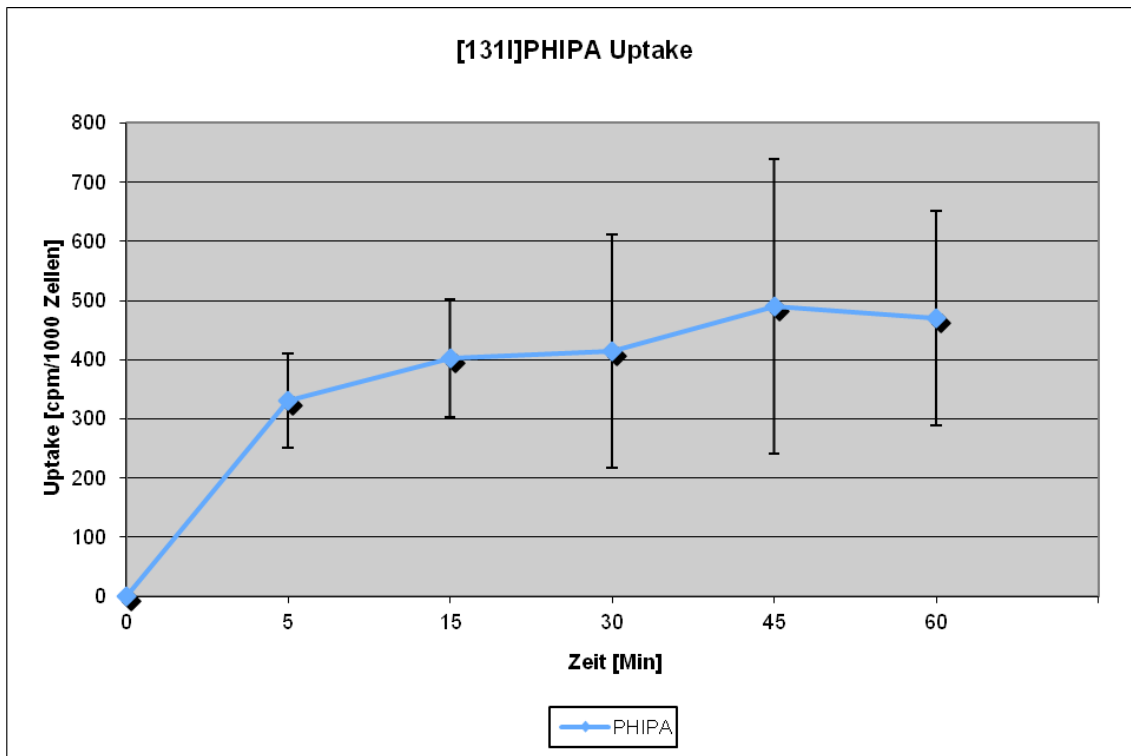


Abbildung 10: Aufnahmekinetik von PHIPA in die PC-3-PCa-Zelllinie.



**Abbildung 11:** Aufnahmekinetik von PHIPA in die LNCaP-PCa-Zelllinie.

Die Aufnahme von PHIPA in LNCaP (Abb. 11) verläuft relativ langsamer als in den DU145- und PC-3-Zelllinien und wesentlich langsamer als in vergleichbarer Untersuchung mit FTP. Nach 5 Minuten Inkubation wurde ca. 55 % der gesamten PHIPA-Aufnahme in den Zellen bestimmt (243 cpm/1000 Zellen). Danach steigt die Aufnahme langsamer im kontinuierlichen Verlauf bis zu einer Sättigung von 480 cpm/1000 Zellen erst nach ca. 50 Minuten. Nach 60-minütiger Inkubation liegt der Uptake bei 492 cpm/1000 Zellen.



**Abbildung 12:** Aufnahmekinetik von PHIPA in die 22Rv1-PCa-Zelllinie.

Die Aufnahmekinetik von PHIPA in 22Rv1 ist schematisch in der Abbildung 12 dargestellt. Wie auch bei den anderen drei untersuchten Zelllinien zeigt sich hier in den ersten 5 Minuten eine rasche Aufnahme der Fettsäure in die Zelle. Nach 5-minütiger Inkubation beträgt der Uptake 330 cpm/1000 Zellen. In den nächsten 10 Minuten steigt er auf 402 cpm/1000 Zellen (bei 15 Minuten), erreicht damit eine Sättigung und sistiert im weiteren Verlauf auf diesem Niveau.

Die folgende Abbildung zeigt die Aufnahme von PHIPA in alle vier Prostatakarzinomzelllinien in einer Übersicht.

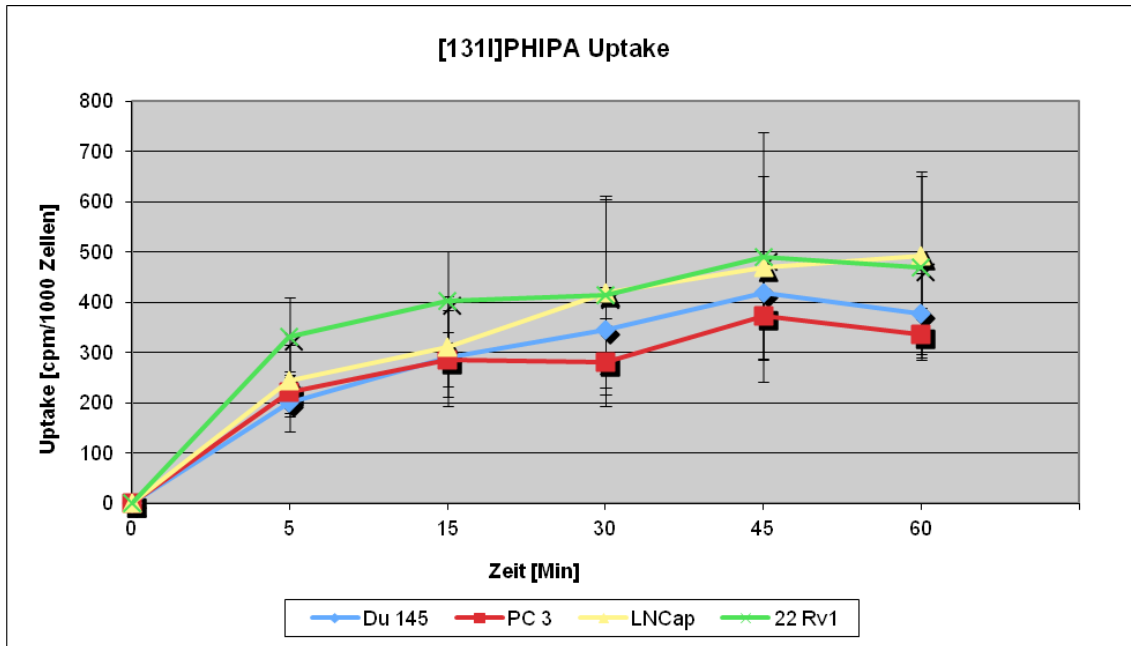


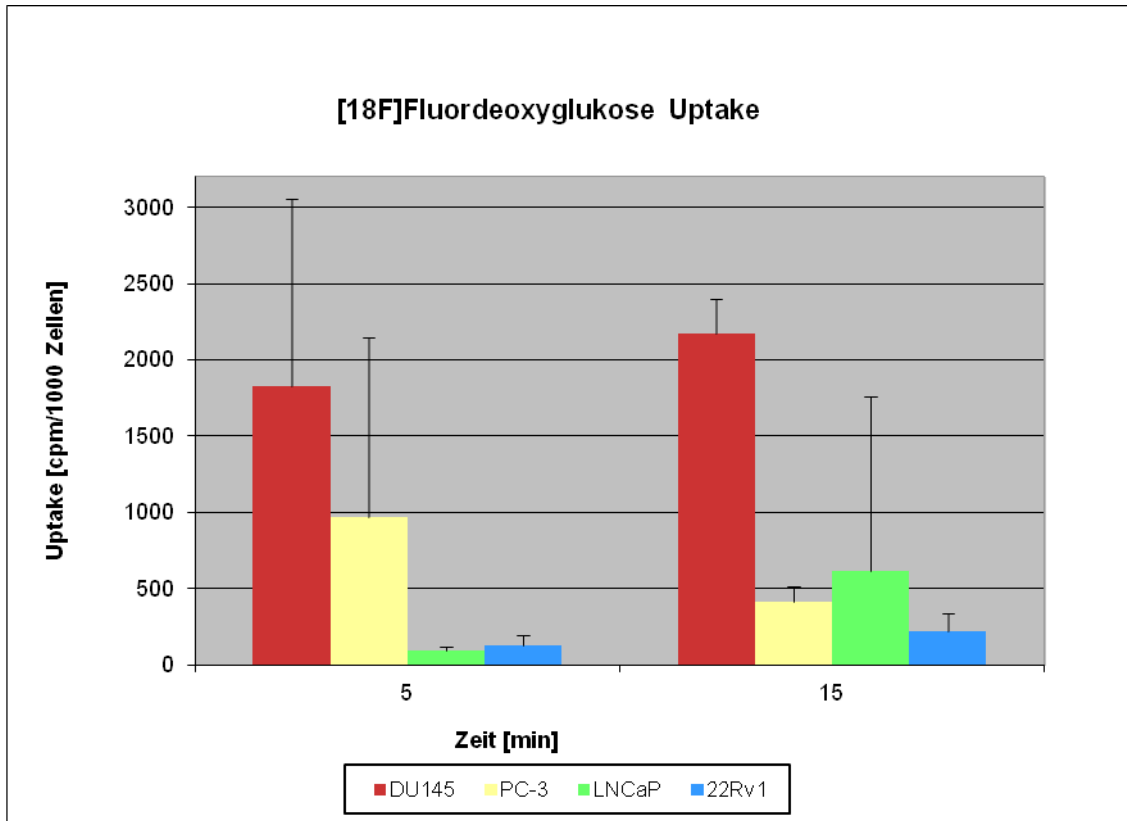
Abbildung 13: Aufnahmekinetik von PHIPA in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien.

### 3.1.3. Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglukose und [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin in die Prostatakarzinomzelllinien

Um die Aufnahme von FTP und PHIPA qualitativ beurteilen zu können, wurden vergleichbare Untersuchungen mit [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglukose (FDG) und [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin (FEC) an den gleichen Zelllinien durchgeführt.

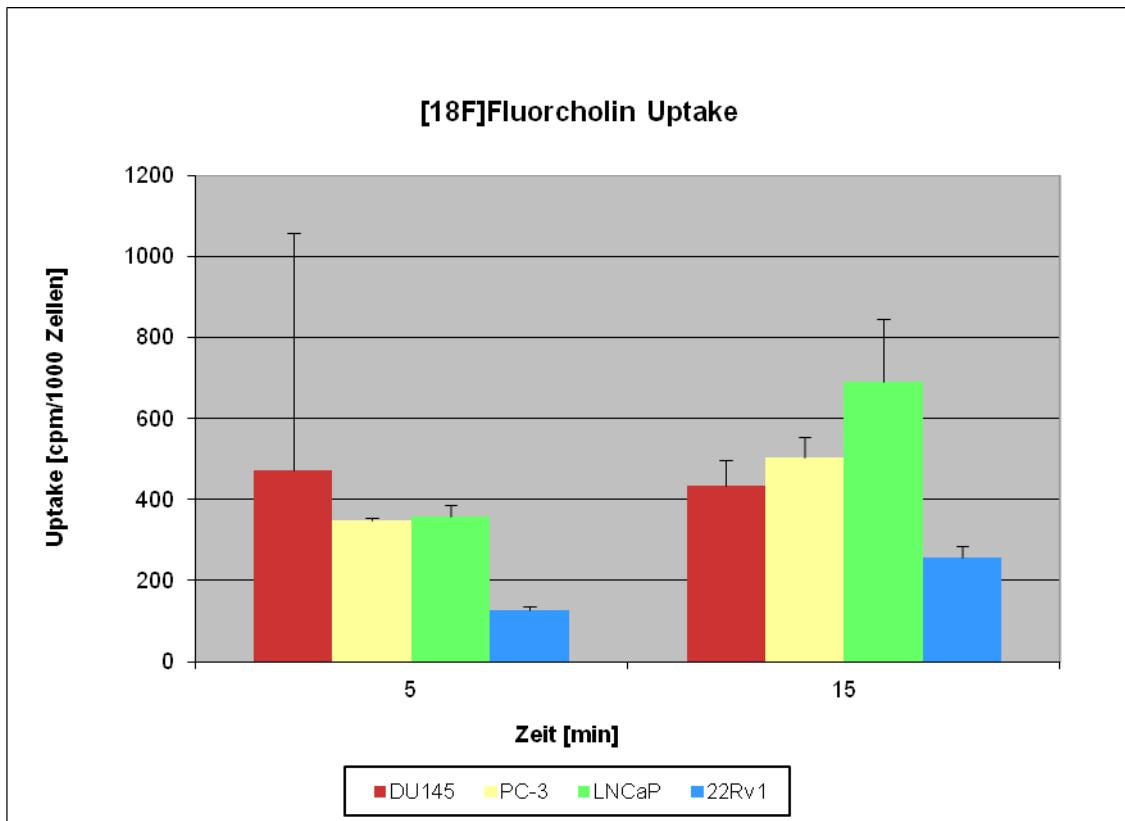
Abbildung 14 zeigt exemplarisch die Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluordeoxyglukose in die Tumorzelllinien DU145, PC-3, LNCaP und 22Rv1 nach 5 Minuten und 15 Minuten.

Die Aufnahme von FDG in die DU145-Zelllinie ist mit 1830 cpm/1000 Zellen (5 min) und 2176 cpm/1000 Zellen (15 min) am höchsten. Es lässt sich eine Steigerung der Aufnahme im Verlauf von 5 bis 15 Minuten feststellen. In PC-3 beträgt die gemessene Aktivität bei 15 Minuten 440 cpm/1000 Zellen und bei LNCaP 614 cpm/1000 Zellen. 22Rv1-Zellen zeigen die niedrigste Aufnahme von FDG. Nach 15 minütiger Inkubation beträgt die Aufnahme durchschnittlich 216 cpm/1000 Zellen.



**Abbildung 14:** Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorodeoxyglukose in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien nach einer Inkubation von 5 und 15 min (pH 7.0; 37°C).

In gleicher Weise wie [<sup>18</sup>F]Fluorodeoxyglukose ist die Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin in der Abbildung 15 dargestellt. Die beiden Zelllinien DU145 und PC-3 zeigen nur eine geringe Zunahme der Aufnahme vom Zeitpunkt 5 Minuten zu 15 Minuten. Die Aufnahme beträgt bei 5 min 471 cpm/1000 Zellen (DU145) und 347 cpm/1000 Zellen (PC-3) und bei 15 min 434 cpm/1000 Zellen (DU145) und 357 cpm/1000 Zellen. Die hormonabhängige Zelllinie LNCaP zeigt die höchsten Aufnahmewerte von [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin (691 cpm/1000 Zellen bei 15 min). In die 22Rv1-Zellen wird nach 5 min 125 cpm/1000 Zellen und nach 15 min 257 cpm/1000 Zellen Aktivität nachgewiesen.



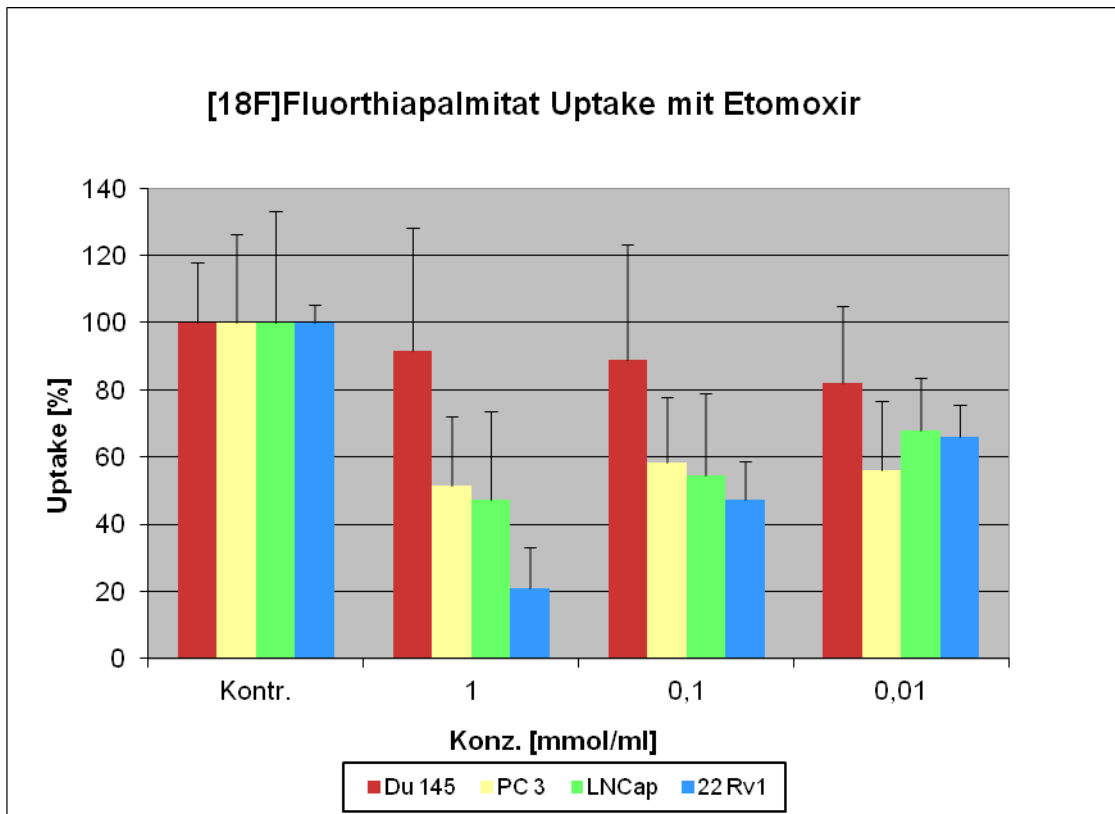
**Abbildung 15:** Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin (FEC) in die DU145-, PC-3-, LNCaP und 22Rv1-PCa-Zelllinien nach einer Inkubation von 5 und 15 min (pH 7.0; 37°C).

### 3.1.4. Bestimmung der Spezifität der Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorthiapalmitat und 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure in die Prostatakarzinomzelllinien

Zum Eruiere der Aufnahmemechanismen von FTP und PHIPA in die Tumorzellen wurden Inhibitorexperimente durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der Stoffe Etomoxir, AICAR und Angiotensin auf den Uptake von FTP und PHIPA untersucht. Nach 5-minütiger Inkubation mit dem Inhibitor wurde der Uptake zum Zeitpunkt 15 Minuten gemessen und in das Verhältnis zum Uptake ohne Inhibitor gesetzt.

#### 3.1.4.1. Spezifitätsbestimmung mit dem Inhibitor Etomoxir

In der folgenden Übersicht werden die vier untersuchten Prostatakarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer Beeinflussbarkeit des Uptakes von FTP durch Etomoxir dargestellt.



**Abbildung 16:** Gegenüberstellung des Einflusses von Etomoxir auf die Aufnahme von [18F]Fluorthiapalmitat in die DU145-, PC-3, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien.

Eine Ko-Inkubation von [18F]Fluorthiapalmitat (FTP) in DU145-Zellen mit dem Palmitoyltransferaseinhibitor Etomoxir in einer Konzentration von 0,01 bis 1 mmol/ml ergibt keine signifikante Änderung im Uptake ( $T = 0,76$ ;  $P = 0,46$ ) in DU145-Zellen. Die Aufnahme liegt bei 92 % im Vergleich zur Kontrolle. Auch in einer Konzentration von 0,1 mmol/ml bleibt der Uptake bei 89 % des Vergleichswertes und zeigt damit keine signifikante Änderung ( $T = 1,21$ ,  $P = 0,25$ ). Werden die Prostatakarzinomzellen mit Etomoxir in einer Konzentration von 0,01 mmol inkubiert, liegt der Uptake bei 82 %. Auch dies stellt keine signifikante Änderung im Vergleich zur Referenz dar ( $T = 1,71$ ;  $P = 0,12$ ).

Wird die Zelllinie PC-3 mit Etomoxir inkubiert, reduziert sich die zelluläre Aufnahme auf 52 - 58 % hoch signifikant. (1 mmol/ml:  $T = 5,11$ ;  $P = 0,0003$ ; 0,1 mmol/ml:  $T = 5,17$ ;  $P = 0,0003$ ; 0,01 mmol/ml:  $T = 4,99$ ;  $P = 0,0004$ ). Dabei ist die Reduktion in der Konzentration von 1 mmol/ml um 48 % geringfügig stärker als in den anderen beiden Konzentrationen.

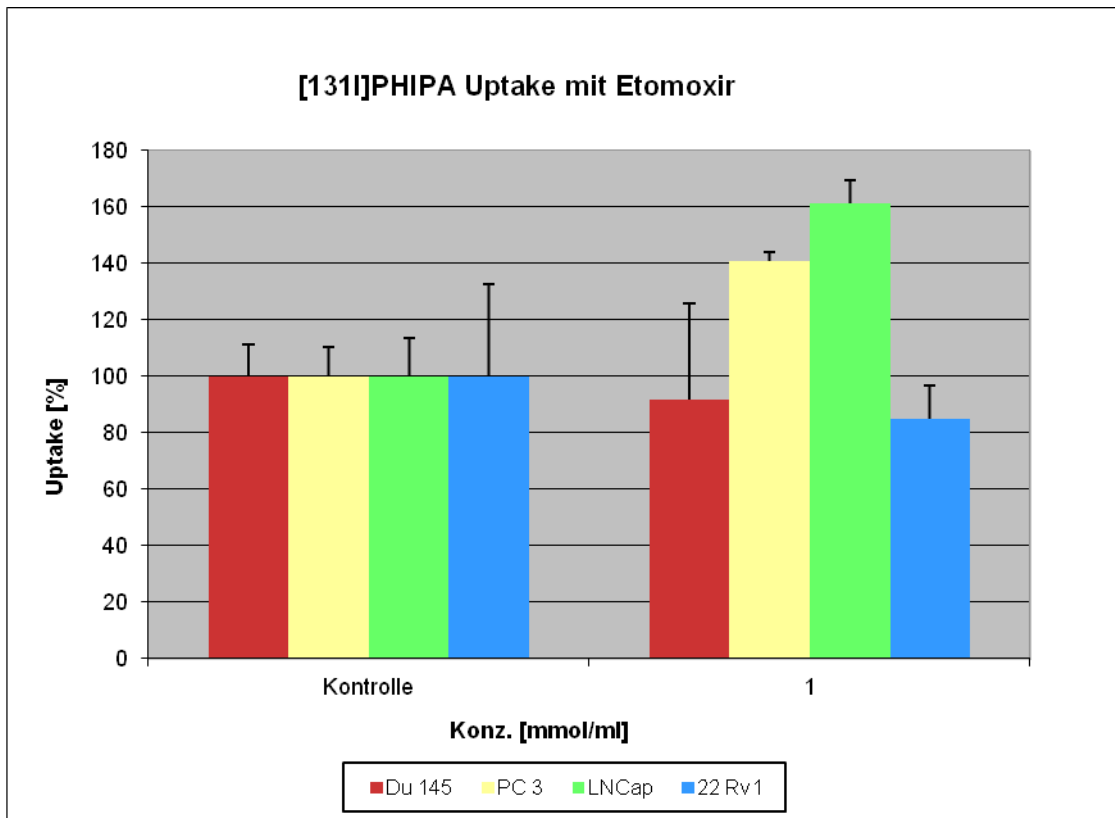
Der Uptake von FTP in LNCaP liegt unter dem Einfluss von Etomoxir in einer Konzentration von 1 mmol/ml nach 15-minütiger Inkubation bei 47 % des



Vergleichswertes. Dies entspricht einer hoch signifikanten Reduktion um 53 % ( $T = 6,46$ ;  $P = 0,0002$ ). Auch in einer Konzentration von 0,1 mmol/ml wird die Aufnahme um 45 % signifikant reduziert ( $T = 4,74$ ;  $P = 0,0015$ ). Die Zugabe von Etomoxir in der Konzentration 0,01 mmol/ml bewirkt eine Verminderung um 32 % des Vergleichswertes ( $T=3,76$ ,  $P=0,005$ ).

Auch die Aufnahme von FTP in die 22Rv1-Zellen wird konzentrationsabhängig von Etomoxir gehemmt. Bei 1 mmol/ml wird die Aufnahme um 80 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert ( $T = 15,23$ ,  $P<0,005$ ). Bei 0,1 mmol/ml wird die Aufnahme von FTP um 50 % ( $P< 0.005$ ) und bei 0,01 mmol/ml immer noch auf 65 % ( $T = 9,93$ ;  $P< 0.005$ ) im Vergleich zur Kontrolluntersuchung reduziert.

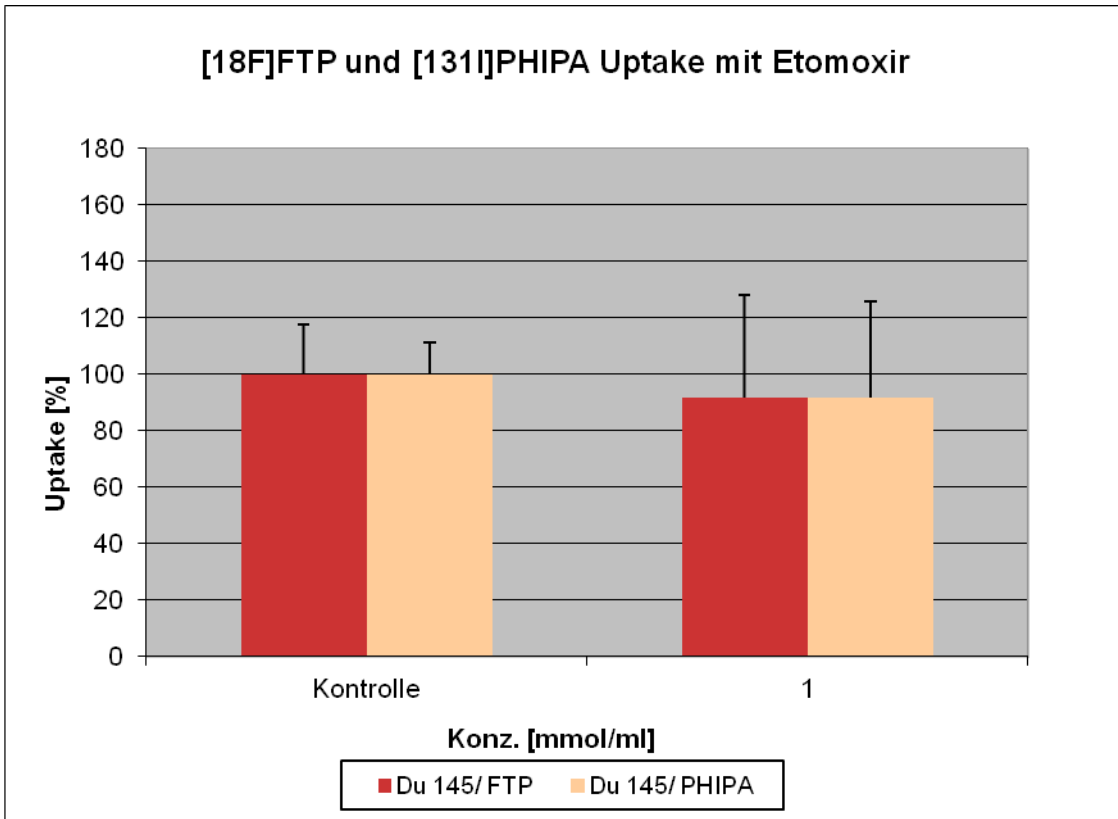
Kongruent zu der Untersuchung der Aufnahmekinetik von FTP wurde der Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von PHIPA in die PCa-Zelllinien getestet. Der Uptake nach vorheriger Inkubation mit dem Inhibitor wurde zum Zeitpunkt 15 Minuten für die Konzentration des jeweiligen Inhibitors von 1 mmol/ml bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildungen 17 dargestellt. Hierbei zeigt sich bei der Zelllinie DU145 keine wesentliche Veränderung der Aktivitätsaufnahme im Vergleich zur Kontrolle (Uptake von 92 %). In den Zelllinien PC-3 und LNCaP lässt sich die Aktivitätsaufnahme von PHIPA durch Etomoxir nicht verringern. Der Uptake steigt auf Werte von 141 % (PC-3) und 161 % (LNCaP) der Kontrolle. Bei der Zelllinie 22Rv1 liegt die Aktivitätsaufnahme von PHIPA bei 85 % und zeigt damit keine signifikante Reduktion.



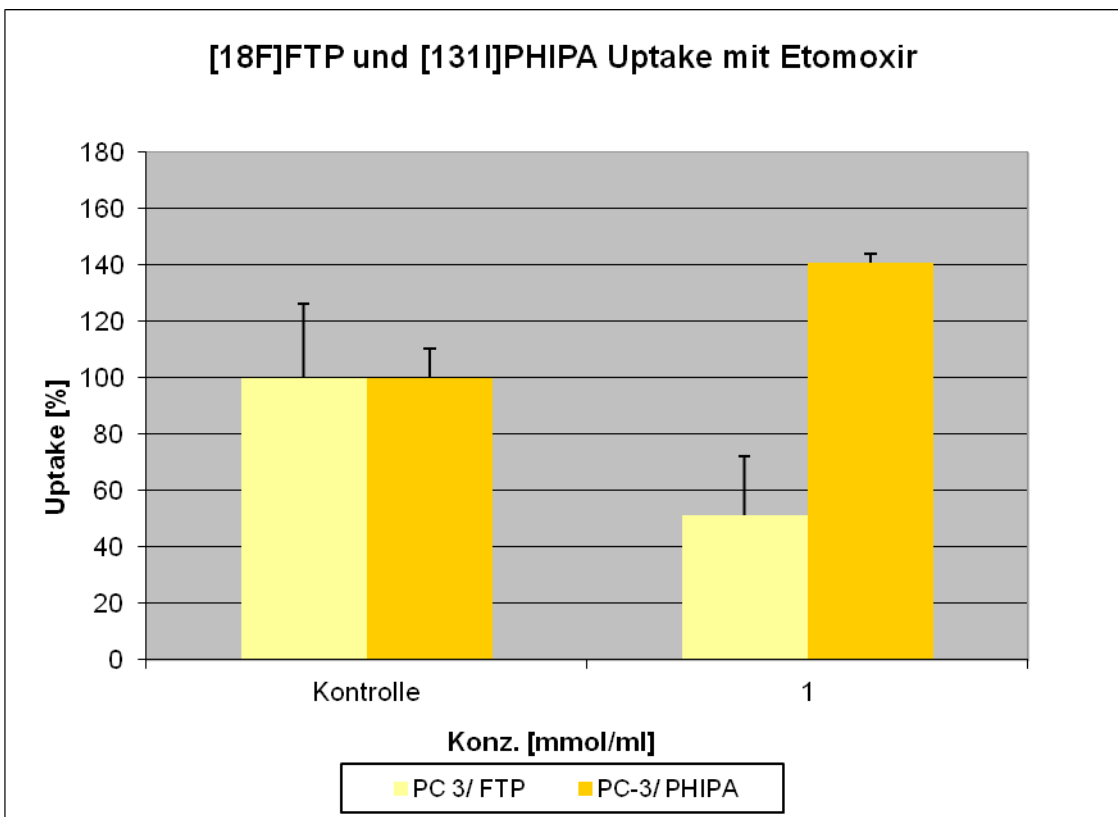
**Abbildung 17:** Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von PHIPA in die DU145-, PC-3-, 22Rv1- und LNCaP-PCa-Zelllinien.

In den folgenden Abbildungen wird der Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA für jede der vier Zelllinien in einzelnen Abbildungen dargestellt. Zur Gegenüberstellung der beiden Zelllinien wird der Einfluss von Etomoxir in einer Konzentration von 1 mmol/ml gewählt.

Unter der Ko-Inkubation von Etomoxir in einer Konzentration von 1 mmol/ml zeigt sich bei der Prostatakarzinomzelllinie DU145 für beide untersuchten Fettsäuren keine signifikante Reduktion der Aufnahme. Dies ist in Abbildung 18 auf der folgenden Seite dargestellt. Die Aufnahme von FTP und PHIPA ist im Vergleich zu der Kontrolle gleich hoch (FTP 92 % und PHIPA 92 %).

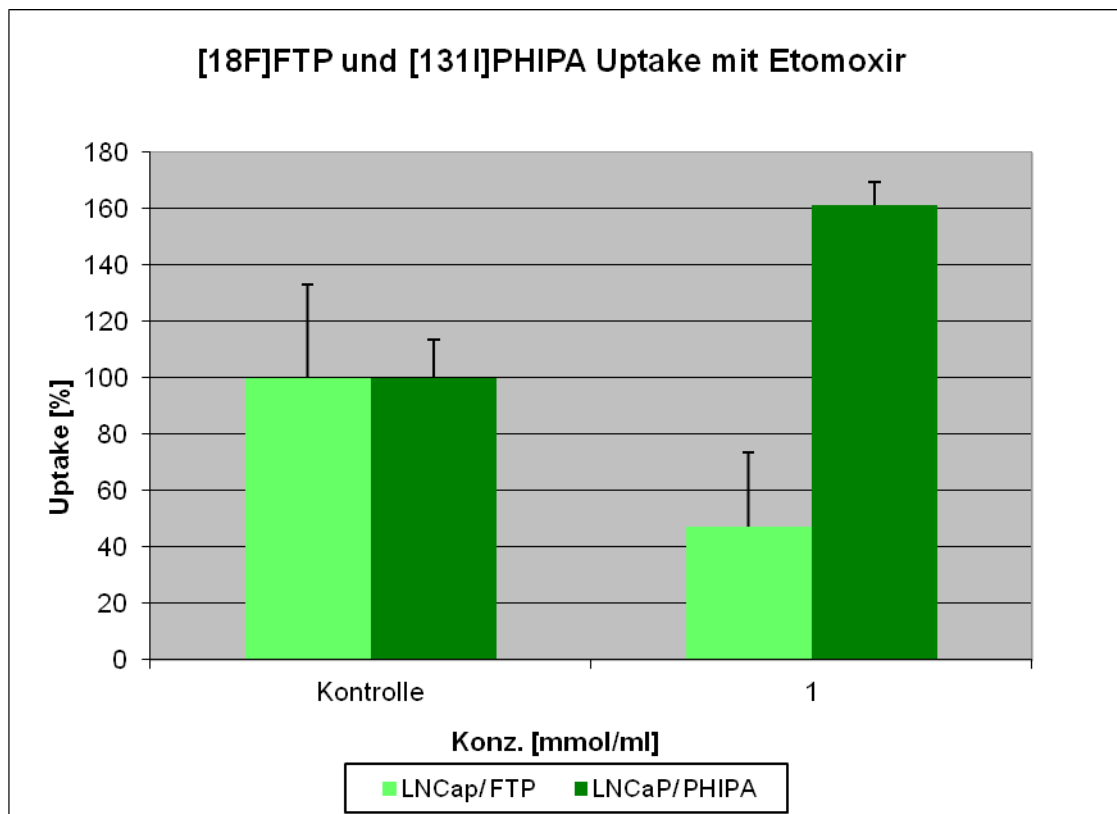


**Abbildung 18:** Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die DU145-PCa-Zellen.



**Abbildung 19:** Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die PC-3-PCa-Zelllinie.

Auf die zweite hormonunabhängige Zelllinie, PC-3, zeigt der Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA deutliche Unterschiede (Abb. 19). Die Aktivitätsaufnahme von FTP wird unter Ko-Inkubation mit Etomoxir auf 52 % der Kontrolle reduziert. Wohingegen die Aktivitätsaufnahme von PHIPA durch Zugabe von Etomoxir nicht gesenkt wird (141 %).

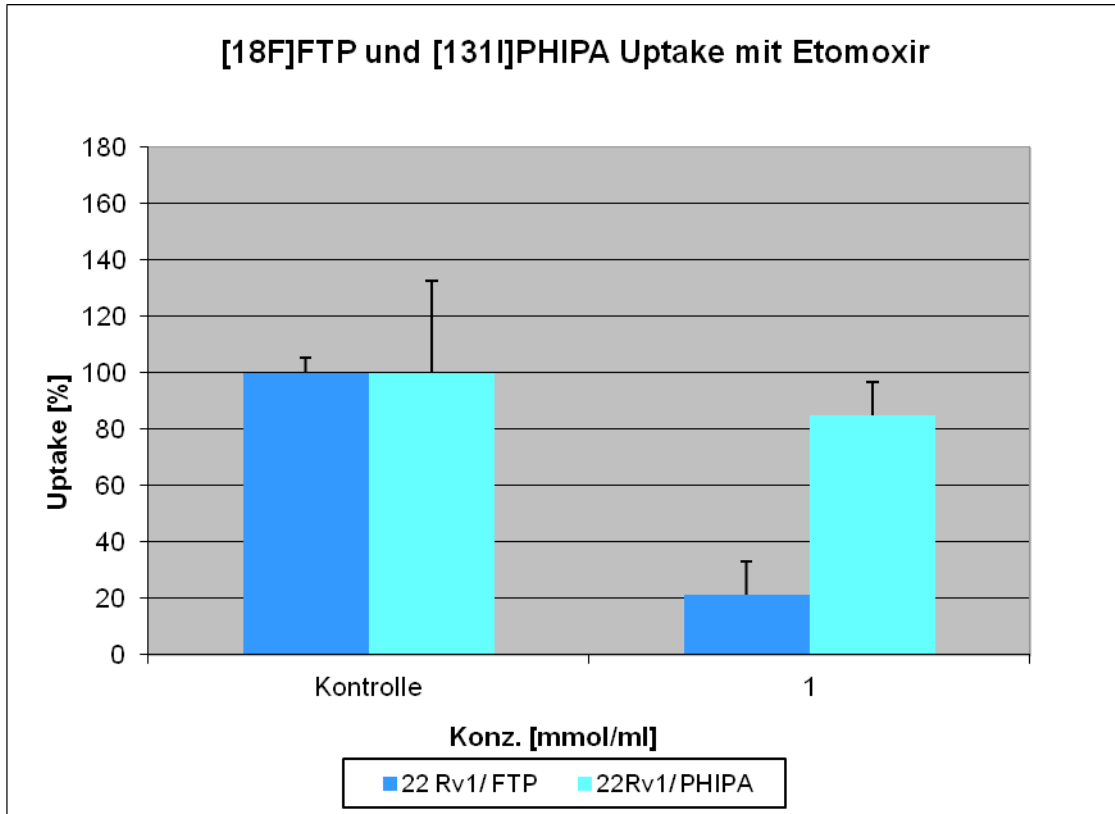


**Abbildung 20:** Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die LNCaP-PCa-Zelllinie.

In Abbildung 20 ist der Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP dargestellt. Es wird deutlich, dass durch die Ko-Inkubation mit Etomoxir die Aktivitätsaufnahme von FTP signifikant verringert wird (47 %). Die Aufnahme von PHIPA beträgt 161 % der Kontrolle und zeigt damit keine signifikante Reduktion.

Die vierte untersuchte Prostatakarzinomzelllinie ist 22Rv1. Der Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in diese Zelllinie ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 21). Auch hier zeigt sich eine signifikante Reduktion der Aufnahme

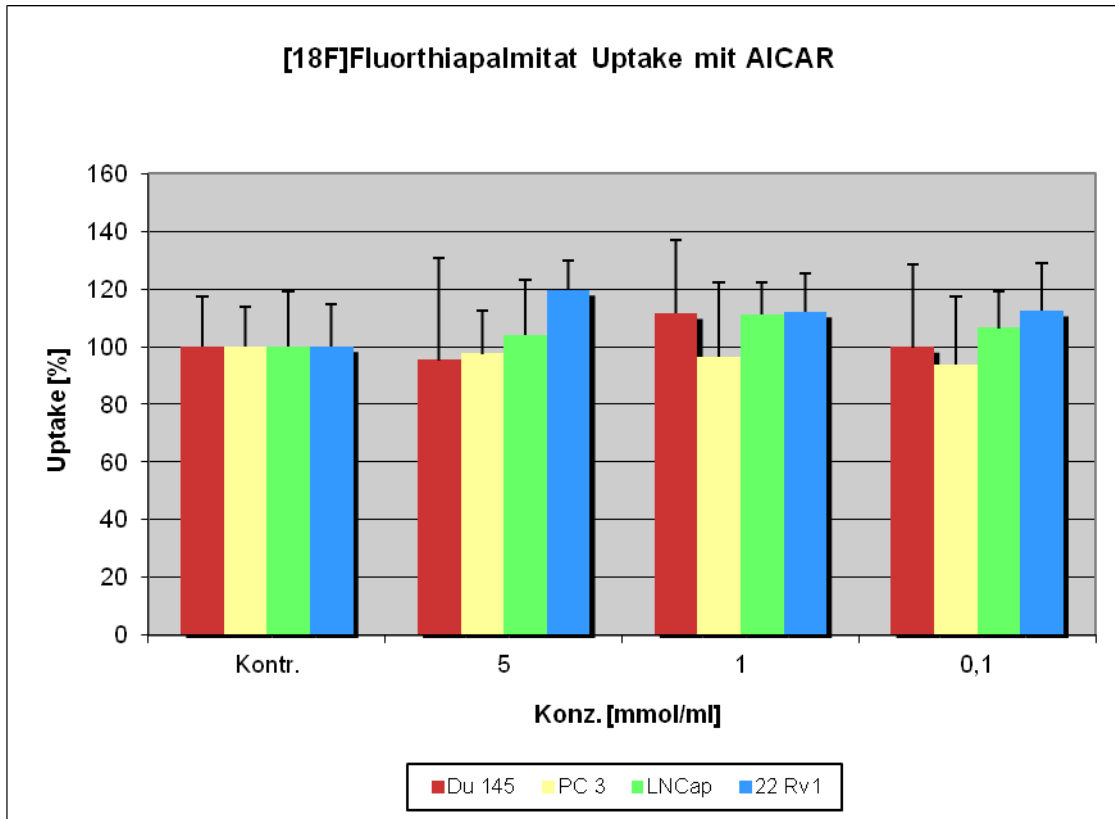
von FTP in die Zellen auf 21 % der Kontrolle und eine gleichbleibend hohe Aufnahme von PHIPA (85 %).



**Abbildung 21:** Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die 22Rv1-PCa-Zelllinie.

### 3.1.4.2. Spezifitätsbestimmung mit den Inhibitoren AICAR und Angiotensin

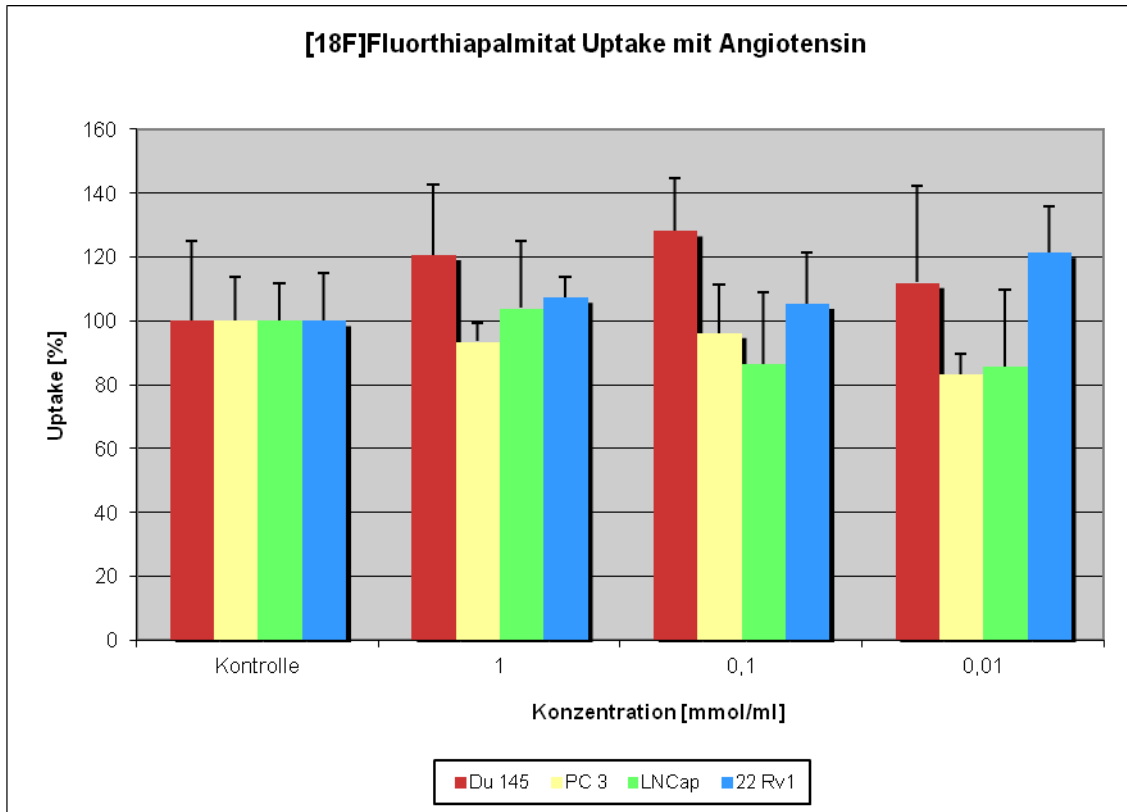
Als zweiter Inhibitor der Fettsäureaufnahme in die Prostatakarzinomzellen wurde das Nukleotid AICAR getestet. Zur Bestimmung der Spezifität der Aufnahme von FTP wurde AICAR in den Konzentrationen 5 mmol/ml, 1 mmol/ml und 0,1 mmol/ml hinzugefügt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 zusammengefasst.



**Abbildung 22:** Übersicht über den Einfluss von AICAR auf die Aufnahme von FTP in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinie.

Es zeigt sich, dass die Akkumulation von FTP in die humanen Prostatakarzinomzelllinien unabhängig der Zelllinie nicht signifikant durch AICAR gehemmt wird. Die Aufnahme von FTP liegt bei allen drei Konzentrationen von AICAR (0,1 – 5 mmol/ml) zwischen 89 – 112 % der Kontrolle.

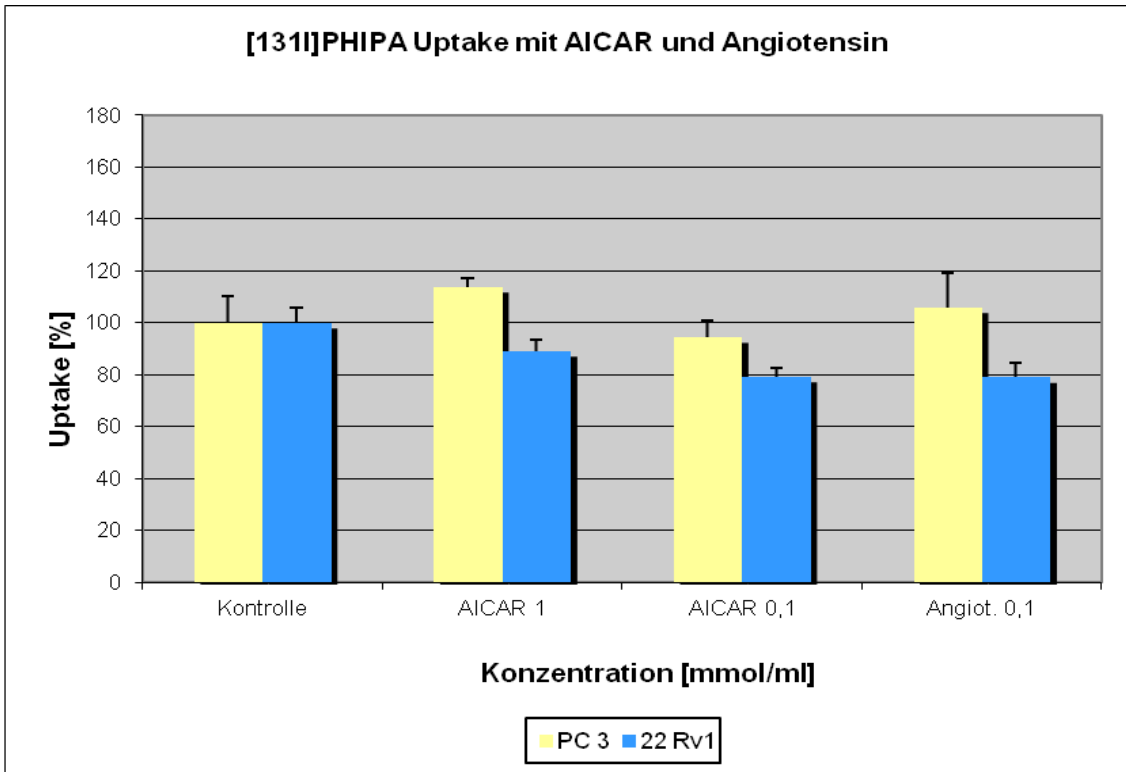
Des Weiteren wurde der Einfluss des Peptidhormons Angiotensin auf die Fettsäureaufnahme in die Prostatakarzinomzellen untersucht. FTP wurde mit Angiotensin in den Konzentrationen 0,01 mmol/ml, 0,1 mmol/ml und 1 mmol/ml in den Zellkulturen ko-inkubiert eingesetzt. Die Ergebnisse sind als Übersicht in Abbildung 23 zusammengefasst.



**Abbildung 23:** Übersicht über den Einfluss von Angiotensin auf die Aufnahme von FTP in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinie.

Unter Angiotensin in den drei untersuchten Konzentrationen steigt in der Zelllinie DU145 die Aufnahme von Fluorthiopalmitat auf 112 – 128 % im Vergleich zu der Kontrolle. Dies entspricht keiner signifikanten Veränderung. In den untersuchten Angiotensinkonzentrationen zeigt sich in den Zelllinien PC-3 und 22Rv1 keine signifikante Reduktion der Aufnahme von FTP. Die Aufnahmewerte liegen in PC-3 bei 94 % (1 mmol/ml), 96 % (0,1 mmol/ml) und 83 % (0,01 mmol/ml) und in 22Rv1 bei 107 % (1 mmol/ml), 105 % (0,1 mmol/ml) und 121 % (0,01 mmol/ml). Auch bei der hormonabhängigen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP wird der Uptake im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant von Angiotensin beeinflusst. Die FTP-Aufnahmen liegen zwischen 85 % (0,01 mmol/ml) und 103 % (1 mmol/ml).

Der Einfluss von AICAR und Angiotensin auf den Uptake von PHIPA wurde an den Zelllinien PC-3 und 22Rv1 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Dabei wurde AICAR in den Konzentrationen von 1 mmol/ml und 0,1 mmol/ml und Angiotensin in der Konzentration von 0,1 mmol/ml untersucht.



**Abbildung 24:** Einfluss von AICAR und Angiotensin auf die Aufnahme von PHIPA in die PC-3- und 22Rv1-PCa-Zelllinie.

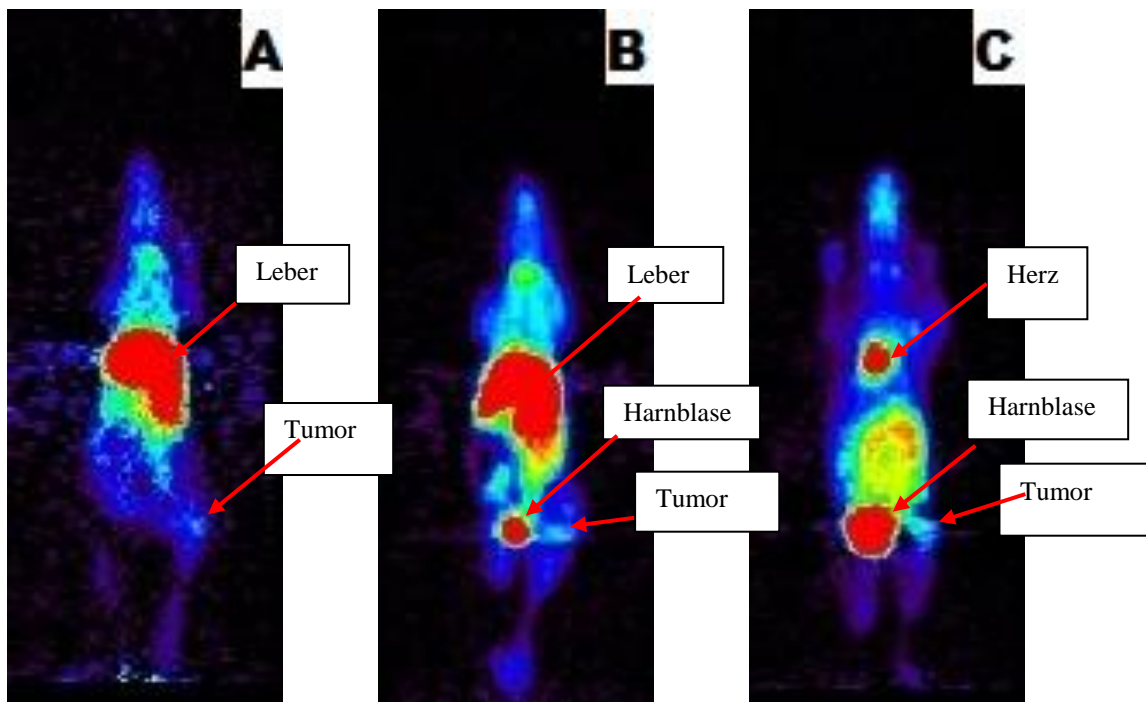
Abbildung 24 zeigt, dass sowohl AICAR als auch Angiotensin in den Konzentrationen von 0,1 mmol/ml und 1 mmol/ml keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von PHIPA in PC-3 und 22Rv1-Zellen haben. Das Inhibitionsexperiment mit AICAR und Angiotensin in der Konzentration von 0,1mmol/ml und 1,0 mmol/ml ergab eine geringfügige Veränderung in der Aufnahme von PHIPA in die Tumorzellen von ca. 10 % gegenüber der Kontrolluntersuchung. Dieser Wert liegt noch im Normbereich bei repetitiven Untersuchungen in der Zellkultur.

### 3.2. Erste PET-Untersuchungen in tumortragenden Mäusen

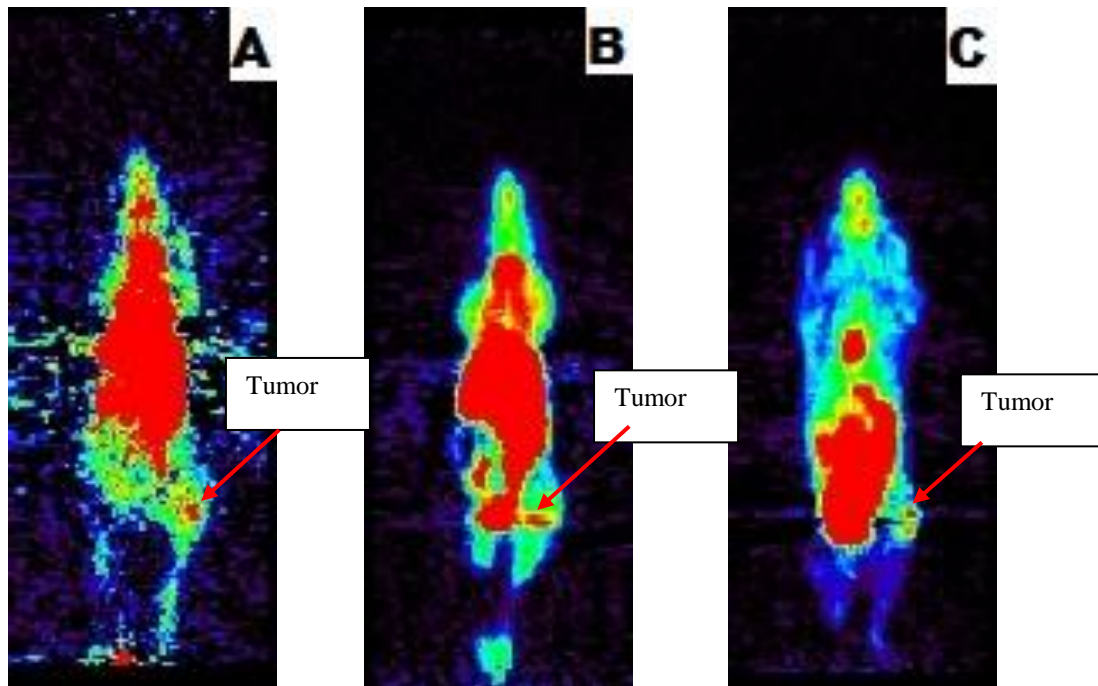
Im Rahmen dieser ersten in vivo Untersuchung wurde die Darstellbarkeit des heterotop in der Leiste implantierten Prostatakarzinoms nach intravenöser Injektion von FTP in tumortragenden CD1-nu/nu-Mäuse mittels Positronen-Emissions-Tomographie bewertet. Das Ergebnis aus der Untersuchung mit FTP-PET wurde mit FCH-PET- und FDG-PET-Messungen an den gleichen Tieren verglichen. 50 min nach i.v. Injektion von  $3,76 \pm 0,35$  MBq frisch hergestelltem FTP bzw. 10 min und 50 min nach Injektion



von FEC ( $6,41 \pm 1,36$  MBq) und FDG ( $6,04 \pm 0,08$  MBq) wurde eine Serie von Ganzkörper-Aufnahmen der Maus am Kleintier-PET durchgeführt. Abbildung 25 und 26 stellt die Ganzkörperverteilung von FTP (A), FCH (B) und FDG (C) in ein und derselben tumortragenden Maus dar. Zur besseren Veranschaulichung wurden verschiedene Skalierungen und Ebenen der Abbildungen gewählt zum einen, um die Organe mit der höchsten Akkumulation besser zu dokumentieren (Abb. 25) und zum anderen um das heterotop in die Leiste implantierte Prostatakarzinom gut darzustellen (Abb. 26).



**Abbildung 25:** Ganzkörper-PET-Aufnahme einer tumortragenden Maus nach Applikation von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiopalmitat (A), [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylcholin (B) und [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorodeoxyglukose (C) über die Schwanzvene, bzw. intraperitoneale Gabe (FDG).

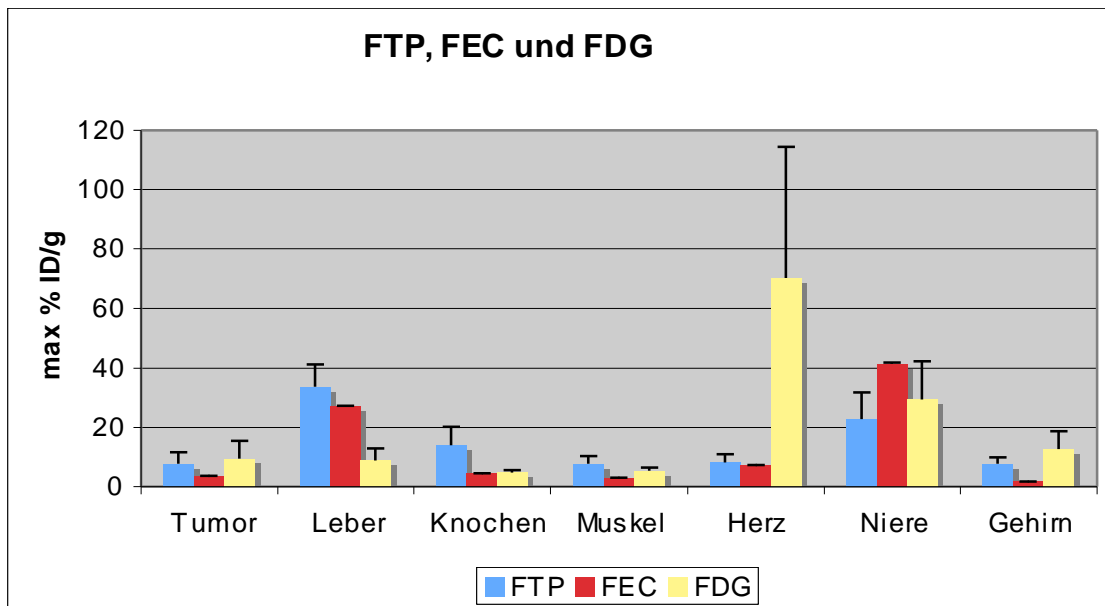


**Abbildung 26:** Ganzkörper-PET-Aufnahme einer tumortragenden Maus nach Applikation von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiopalmitat (A), [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylcholin (B) und [ $^{18}\text{F}$ ]Fluordeoxyglukose (C) über die Schwanzvene, bzw. intraperitoneale Gabe (FDG). Aufnahme 50 Min (FDG) und 10 Min (FCH, FTP) post injectionem in derselben Maus.

Der Tumor (siehe Markierung) war sowohl mit FTP als auch FCH und FDG darstell- und abgrenzbar.

Die Abbildung 27 fasst die quantitative Radioaktivitätskonzentration als max. Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% I.D./g) nach Injektion des jeweiligen Radiopharmakons zusammen.

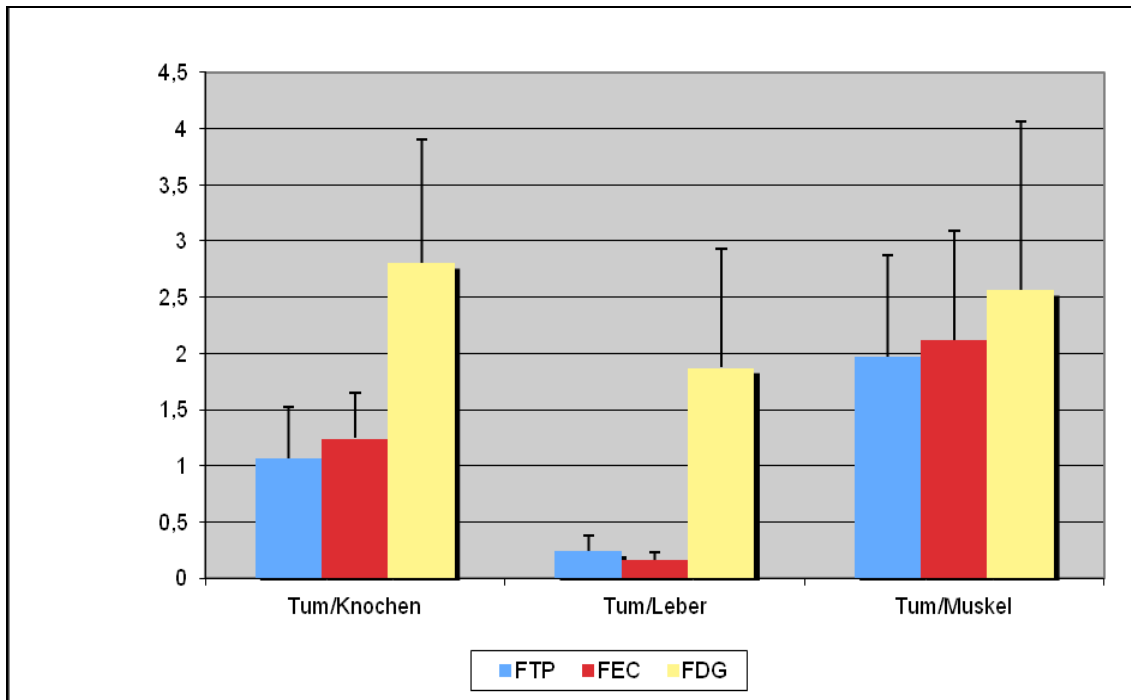
Die maximale Akkumulation von FTP in den Tumor betrug 7,7 % ID/g. Im Knochen werden 13,7 % ID/g aufgenommen. Die Aufnahme in Herz, Muskel und Gehirn sind mit 8,1 % ID/g (Herz), 7,7 % ID/g (Muskel) und 7,6 % ID/g (Gehirn) vergleichbar hoch. Die Leber erreicht die höchste Akkumulation von 33,7 % ID/g.



**Abbildung 27:** Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorhiapalmitat, [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylcholin und [ $^{18}\text{F}$ ]Fluordeoxyglukose in die Zielorgane der tumortragenden Mäuse gemessen in ROIs.

Die höchste Akkumulation von FEC findet sich in der Niere (41,5 % ID/g). Im Tumor lassen sich 3,6 % ID/g nachweisen. Der Uptake im Knochen liegt gering höher mit einem Maximum von 4,5 % ID/g und im Muskel gering niedriger mit einem Maximum von 2,8 % ID/g. Im Gehirn ist die geringste Menge FCH nachzuweisen (1,6 % ID/g) und im Herzen liegt der Uptake bei 7,2 % ID/g.

Untersucht man die gleichen Tiere mit FDG zeigen sich folgende Ergebnisse. Im Vergleich zu den beiden anderen Radiotracer ist der Tumoruptake hier der höchste. Er beträgt im Maximum 9,5 % ID/g. Am meisten FDG lässt sich im Herzen (70,1 % ID/g), gefolgt von den Nieren (29,3 ID/g) und dem Gehirn (12,6 % ID/g) messen. In der Leber zeigt sich im Vergleich zu FTP und FCH der geringste Uptake mit einem Maximum von 8,8 % ID/g. Knochen und Muskel nehmen eine relativ geringe Menge FDG auf. Das Maximum beträgt 4,8 % ID/g (Knochen) und 5,3 % ID/g (Muskel).



**Abbildung 28:** Verhältnis von Tumor zu Hintergrund mit der Darstellung durch [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorthiapalmitat, [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethylcholin und [ $^{18}\text{F}$ ]Fluordesoxyglukose im Kleintier-PET.

Um die Abgrenzung des Tumors gegenüber dem Hintergrund zu dokumentieren, wird in Abbildung 28 das Verhältnis von Tumor zu Hintergrund dargestellt. Nach Injektion von FTP ist das Verhältnis Tumor zu Knochen 1,1. Das Verhältnis Tumor zu Leber ist deutlich geringer und liegt bei 0,2. Dagegen ist das Verhältnis Tumor zu Muskel höher und beträgt 2,0.

Betrachtet man den Uptake von FCH in das Gewebe, ist dort das Verhältnis Tumor zu Knochen 1,2, Tumor zu Leber 0,2 und Tumor zu Muskel 2,1.

Im Vergleich mit den beiden anderen untersuchten Radiotraceren lässt sich mit FDG das beste Verhältnis Tumor zu Hintergrund erzielen. Das Verhältnis Tumor zu Knochen ist mit 2,8 das höchste. Gleichfalls sind die Verhältnisse Tumor zu Leber (1,9) und Tumor zu Muskel (2,5) höher als bei FTP und FCH.

Wegen der geringen Spezifität der Aufnahme von PHIPA in die Prostatakarzinomzellen und des ungeklärten Aufnahmemechanismus wurde die geplante PET-Untersuchung mit dem I-124-markierten Analogon 13-(4'-[ $^{124}\text{I}$ ]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure am Tiermodell im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die in vivo Bewertung der erstmalig in unserer Gruppe entwickelten [ $^{124}\text{I}$ ]jodierten Fettsäure 13-(4'-[ $^{124}\text{I}$ ]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure ist

Gegenstand eines weiteren Forschungsprojekts in der hiesigen Klinik für Nuklearmedizin.

## 4. Diskussion

Die in den letzten Jahren erzielten Fortschritte in der Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms brachten deutliche Verbesserungen mit sich. Besonders die verbesserten und großflächig eingesetzten Früherkennungsmaßnahmen führen zum Aufspüren von Tumoren in früheren Stadien und damit zu besseren Heilungschancen. Dennoch stellt besonders das metastasierte Prostatakarzinom weiterhin eine Herausforderung dar. Die für die morphologische Bildgebung genutzten Verfahren TRUS, CT und MRT sind begrenzt in der Darstellung der extraprostatatischen Ausbreitung und von Lymphknotenmetastasen. Auch die vielfach eingesetzte Knochenszintigraphie zeigt Mängel in der Spezifität der Darstellung. Insofern sind der Diagnostik von Metastasen im primären Staging Grenzen gesetzt, die wiederum eine adäquate Therapieentscheidung erschweren. Diese Misslage lässt sich auch am hohen Auftreten von Rezidiven nach primär kurativ intendierter Therapie ablesen. Ähnliche Schwierigkeiten zeigen sich in der Diagnostik nach chemischen Rezidiv (PSA-Relaps). Momentan stehen keine geeigneten standardisierten Verfahren zur sicheren Differenzierung eines lokalen Rezidivs von einer systemischen Metastase bereit. Dies stellt den behandelnden Arzt vor eine schwierige Entscheidung der weiteren Therapie. Es ist klinisch belegt, dass die Positronen-Emissionstomographie (PET) eine vielversprechende Untersuchungsmethode zur nicht-invasiven Darstellung des Prostatakarzinoms ist. Der für andere Tumorentitäten vielfach genutzte Radiotracer [<sup>18</sup>F]Fluorodeoxyglukose (FDG) zur Untersuchung des Glukosestoffwechsels ist für das Prostatakarzinom nur eingeschränkt nutzbar. Dies macht die Entwicklung geeigneterer Radiotracer unumgänglich. Diesbezüglich wurde eine Reihe von [<sup>11</sup>C]- und [<sup>18</sup>F]-markierten Tracer entwickelt. Einige dieser Radiotracer zeigen vielversprechende Ergebnisse. Dennoch gibt es gegenwärtig noch kein geeignetes Radiopharmakon für die klinische Routineuntersuchung und Charakterisierung vom Prostatakarzinom mit der PET.

Es konnte neuerlich gezeigt werden, dass der Fettsäurestoffwechsel in Prostatakarzinomzellen eine stärkere Rolle als der Glukosestoffwechsel spielt, so dass sich Fettsäuren als geeignete Marker vom Prostatakarzinom anbieten. Zweck dieser Arbeit war es, die Fettsäuren [<sup>18</sup>F]Fluorthiopalmitat (FTP) und 13-(4-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenyl)tridekansäure (PHIPA) hinsichtlich ihrer Eignung als

potentielle Radiopharmaka für die Darstellung des Prostatakarzinoms in vitro und FTP auch in vivo im Tiermodell zu bewerten. Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse bewertet, interpretiert und in den Zusammenhang des aktuellen Forschungsstandes gestellt. Da es bisher keine Erfahrungen mit FTP und PHIPA als Radiotracer für die Onkologie gibt, ist ein Vergleich der Ergebnisse mit denen aus anderen Studien nur eingeschränkt möglich.

#### **4.1. In vitro Untersuchung in humanen Prostatakarzinomzelllinien**

##### **4.1.1. Aufnahmekinetik von [<sup>18</sup>F]Fluorthiapalmitat und 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekensäure in die Prostatakarzinomzellen**

Betrachtet man die Aufnahmekinetik von FTP und PHIPA in den hormonunabhängigen humanen Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC-3 und die hormonabhängigen LNCaP und 22Rv1 Prostatakarzinomzelllinien, lassen sich folgende Punkte festhalten.

Zum einen zeigt sich für die fluorierte Fettsäure FTP und die jodierte Fettsäure PHIPA jeweils eine zeitabhängige Aufnahme mit Erreichen eines Plateaus. Der größte Anteil der Fettsäure wird dabei in den ersten 5 Minuten aufgenommen (Abb. 8/13).

Die Aufnahme von FTP und PHIPA in die Prostatakarzinomzellen erfolgt mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. FTP wird in alle vier Zelllinien sehr rasch aufgenommen. Die Radioaktivitätskonzentration beträgt nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bereits 90 % der Gesamtaufnahme. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten ist bei allen vier Zelllinien die Sättigung der zellulären Aktivitätsaufnahme erreicht und bleibt bis zum Ende der Untersuchungszeit von 60 Minuten konstant. Die schnelle Aufnahme spricht für eine hohe Affinität von FTP zu den Prostatakarzinomzellen.

Eine Gegenüberstellung der zellulären Aufnahme von FTP und PHIPA zeigt, dass PHIPA langsamer von den untersuchten primär humanen Prostatakarzinomzelllinien aufgenommen wird. Nach 5-minütiger Inkubation ist erst 50 % der Aktivitätsaufnahme erreicht. Nach 15-30 Minuten stellt sich bei 22Rv1 und PC-3 ein Plateau ein. Dieses ist bei DU145 und LNCaP erst nach 45 – 60 Minuten erreicht. Dies scheint für eine geringere Affinität zu den Prostatakarzinomzellen zu sprechen.

Drittens liegt die maximale Aktivitätsaufnahme von FTP und PHIPA auf unterschiedlichem Niveau. Der Uptake von FTP ist mit einem Maximum von 1000 cpm/1000 Zellen ungefähr doppelt so hoch wie der von PHIPA (500 cpm/1000 Zellen). Gründe dafür können in der unterschiedlichen chemischen Struktur der fluorierten und der jodierten Fettsäure liegen.

Als viertes lassen sich Unterschiede in der Höhe der Aktivitätsaufnahme, bei der die Sättigung erreicht wird, finden. So liegt das Plateau der Aufnahme von FTP in 22Rv1 fast doppelt so hoch wie das von FTP in PC-3. DU145 liegt in der unteren Mitte und LNCaP in der oberen Mitte (Abb. 4-7). Auch die Aufnahme von PHIPA ist bei LNCaP und 22Rv1, den beiden hormonabhängigen Zelllinien, mit einem Plateau knapp unter 500 cpm/1000 Zellen höher als bei den beiden anderen Zelllinien (Plateau um 350 cpm/1000 Zellen). Ursache dieser Unterschiede können in einem generell höheren Umsatz von hormonabhängigen Prostatakarzinomzellen gesehen werden.

Gleiches findet man auch in der Arbeit von Prince et al. 2002, der die Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorethylcholin (FCH) mit [<sup>18</sup>F]Fluorodeoxyglukose (FDG) in den Zelllinien LNCaP und PC-3 vergleicht. So liegt der Uptake von FCH in den hormonabhängigen Zelllinie LNCaP um 50 % höher als in der hormonunabhängigen Zelllinie PC 3 (Price *et al.* 2002). Ein derartig großer Unterschied lässt sich in den durchgeführten Experimenten zwischen PC 3 und LNCaP nicht finden, dennoch zeigt sich die Tendenz der höheren Aufnahme in die hormonabhängigen Zelllinien.

Ob die Aufnahme über freie Diffusion, die Bindung an das Membranprotein CD36 oder Carrier-vermittelt über FATP 1-6 erfolgt, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Durch die Einstellung eines Plateaus auf Höhe der Sättigung der zellulären Aktivitätsaufnahme, ist es möglich, dass FTP nicht nur in die Zellen aufgenommen, sondern durch Einbindung in einen Stoffwechselfvorgang intrazellulär gebunden wird (metabolic trapping).

#### **4.1. 2. Spezifität der Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorthiapalmitat und 13-(4'-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenyl)tridekansäure in die Prostatakarzinomzellen**

In einer weiteren Untersuchung wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt mit dem Ziel, die Spezifität der Aufnahme und die zugrunde liegenden Mechanismen der Aufnahme von FTP und PHIPA in die Tumorzellen zu bestimmen. Es wurden



kompetitive Inhibitionsexperimente mit dem Carnitin-Palmitoyltransferase-Inhibitor Etomoxir, dem Gewebshormon Angiotensin und AICAR durchgeführt.

Es gibt verschiedene Stoffe, die die Aufnahme und den Metabolismus von Fettsäuren in Zellen beeinflussen. Der Transport der in die Zelle aufgenommenen Fettsäuren erfolgt in die Mitochondrien über die Carnitin-Palmitoyltransferase. Dieser Schritt lässt sich durch den irreversibel wirkendem O-Carnitin-Palmitoyl-Transferasehemmer Etomoxir hemmen. Außerdem konnte in Glioblastomzellen gezeigt werden, dass durch Inhibition der Fettsäureoxydation durch Etomoxir Mechanismen ausgelöst werden, die in ATP Depletion und Zelltod münden (Pike *et al.* 2010).

Im Fettsäurestoffwechsel spielt die Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) als Schrittmacherezym für die Cholesterinsynthese eine wichtige Rolle. Dieses Enzym wird durch die AMP-aktivierte Proteinkinase inaktiviert, welche wiederum durch AMP aktiviert wird. Das 5-Aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid (AICAR) stellt eine Vorstufe in der Bildung von AMP und GMP dar. In Zellexperimenten mit Prostatakarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass AICAR einen Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus der Karzinomzellen hat und so das Wachstum der Zellen inhibiert (Xiang *et al.* 2004).

Der dritte getestete Inhibitor war Angiotensin. Angiotensin ist ein Peptidhormon und zählt zu den Gewebshormonen. Im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt es eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und die Regulation des Wasserhaushaltes. Seine Wirkung an der Zelle wird über den AT1- und AT2-Rezeptoren vermittelt. In verschiedenen Zellexperimenten konnte gezeigt werden, dass Angiotensin über den AT1-Rezeptor an Prostatakarzinomzellen einen Einfluss auf deren Wachstum hat (Bose *et al.* 2009; Dominska *et al.* 2009; Sidorkiewicz *et al.* 2009).

In den Zelllinien PC-3, LNCaP und 22Rv1 zeigt sich unter Zugabe von Etomoxir eine teils konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der zellulären Aufnahme von [<sup>18</sup>F]Fluorhiapalmitat. Dabei wird in der höchst gewählten Konzentration von Etomoxir in der Zelllinie 22Rv1 die höchste Reduktion auf 21 % des Ursprungswertes erreicht. In den Zelllinien PC-3 und LNCaP und bei 22Rv1 bewegt sich die Reduktion bei niedriger Konzentration auf einem Level von 50-60 % (Abb. 16). Es lässt sich also nachweisen, dass die Carnitin-Palmitoyltransferase eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme von FTP in die Zellen spielt. Die Carnitin-Palmitoyltransferase ist unerlässlich zum

Transport der Fettsäuren in die Mitochondrien, Ort der  $\beta$ -Oxidation. Die biologische Grundlage der Retention in den Prostatakarzinomzellen scheint die Umsetzung von FTP in der  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien zu sein. Zu gleichem Schluss kamen Untersuchungen von FTP als PET-Tracer am Myocard von DeGrado et al. Auch wenn sich seine Untersuchungen auf Rattenmodelle und nicht auf in vitro-Untersuchungen der Zelllinien bezogen, konnte sich eine ähnliche Beeinflussung finden. Im Experiment wurde den Tieren FTP über die Femoralvene injiziert und nach einer gewissen Latenzzeit die Organe entnommen. Diese wurden gewogen, die Aktivität im Gamma-Counter bestimmt und als Uptake in % dose kg/g wiedergegeben. Die höchsten Werte ließen sich dabei in Herz, Leber und Niere finden. Bei vorheriger intraperitonealer Injektion von Etomoxir ließ sich im Herzen eine um 80 % verringerte Aufnahme und in den Nieren um 37 % verringerte Aufnahme nachweisen. Die Aktivität im Blut war dagegen erhöht (DeGrado *et al.* 2000).

Einzig in der Zelllinie DU145 lässt sich die Aufnahme des Radiotracers nicht mittels Etomoxir beeinflussen. Ob dort andere Mechanismen eine tragendere Rolle spielen und von welchen Bedingungen die Aufnahme abhängig ist, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Bei der Aufnahme von PHIPA in die Zelllinien DU145, PC-3 und LNCaP zeigt sich unter vorheriger Inkubation von Etomoxir keine Änderung der Aufnahme oder ein höherer Uptake. In LNCaP steigt die Aktivitätsaufnahme von PHIPA unabhängig der zugefügten Etomoxir Konzentration auf Werte zwischen 139 – 161 % des Vergleichswertes. Bei 22Rv1 kommt es ohne Zusammenhang zu der zugefügten Konzentration zu einer nur geringen Reduktion der Aufnahme. Unabhängig der gefundenen Zunahmen der Aktivität, lässt sich festhalten, dass anders als bei FTP Etomoxir keine Reduktion der Aufnahme bewirken kann (Abb. 17). Eine Schlussfolgerung wäre, dass die Retention von PHIPA in den Prostatakarzinomzellen nicht über deren Umsetzung in der  $\beta$ -Oxidation erfolgt. Dem widerspricht eine Studie von Eisenhut et al., der die Aufnahme von PHIPA in Myocardzellen von Ratten untersucht hat. Nach Injektion von mit [<sup>131</sup>I] markierter PHIPA in die Schwanzvene, wurde die Ratte nach einer bestimmten Zeit getötet und die Aktivität in dem entnommenen Herzen mit einem Gamma-Counter gemessen. Weiterhin wurde das Myokardgewebe aufgereinigt und die Metaboliten von PHIPA mittels

Massenspektroskopie gemessen. In den Myokardzellen ließ sich ein Stoffwechselprodukt eines  $\beta$ -Oxidationszyklus von PHIPA, der Metabolit 1-10 [11-(4'-Iodphenyl)-1-(p-phenylen)undekansäure, nachweisen und somit zeigen, dass PHIPA in den Mitochondrien umgesetzt wird. Dies unterstützt auch die Tatsache, dass sich in seinen Experimenten unter Zugabe des Carnitin-Palmitoyl-Transferasehemmers Etomoxir eine Reduktion der Aufnahme von 9,6 % auf 6,8 % der verabreichten Dosis in die Myokardzellen erreichen ließ (Eisenhut *et al.* 1997). Hinsichtlich der Vergleichbarkeit muss natürlich beachtet werden, dass sich Eisenhuts Ergebnisse auf in vivo Experimente im Tierversuch beziehen. Die differierenden Ergebnisse können auch als Hinweis darauf gewertet werden, dass der Fettsäurestoffwechsel des Herzens ein anderer als der der Prostatakarzinomzellen ist.

Eine zweite Ursache für die fehlende Beeinflussung der Aufnahme von PHIPA in die Prostatakarzinomzellen durch Etomoxir kann in der veränderten chemischen Struktur der Fettsäure durch die Jodierung liegen. Die Markierung mit Jod verändert die Größe von PHIPA insoweit, dass ein normales Verhalten wie eine unjodierte Fettsäure verhindert werden könnte.

Werden die Prostatakarzinomzellen mit AICAR inkubiert zeigt sich bei allen vier Zelllinien keine Reduktion der Aufnahme von FTP. Da sich die Aufnahme von FTP durch die Anwesenheit von AICAR nicht beeinflussen lässt, kann davon ausgegangen werden, dass die Cholesterinsynthese keine Rolle beim Metabolic Trapping und der Retention von FTP in den Prostatakarzinomzellen spielt. Betrachtet man die eingangs erwähnte Studie von del Hoyo *et al.* zum Metabolismus von Palmitat in Prostatazellen, decken sich die Ergebnisse in so fern, als Palmitat vor allem zu Glycerophosphatiden und Sphingomyelin verstoffwechselt werden (Kaatsch *et al.* 2012). Die Synthese dieser Lipide erfolgt ohne die Cholesterinsynthese über die HMG-CoA-Reduktase. Es liegt nahe, dass Fluorhiapalmitat in der Zelle auf gleichem Weg metabolisiert wird wie Palmitat. Wie die Aufnahme von FTP lässt sich auch die Aufnahme von PHIPA in die Prostatakarzinomzellen PC-3 und 22Rv1 nicht durch AICAR beeinflussen. Auch hier scheint die Cholesterinsynthese keine Rolle bei der Aufnahme und Retention der Fettsäure in den Zellen zu spielen.

Der Einfluss von Angiotensin auf die Aufnahme von FTP in die Tumorzellen ist etwas schwieriger zu beurteilen. In der Zelllinie DU145 zeigt sich in der höchsten eingesetzten Angiotensinkonzentration von 1 mmol/ml nur eine schwache Veränderung. Angiotensin in den weiteren untersuchten Konzentrationen zeigt keinen Einfluss auf DU145, PC-3 und 22Rv1. Die FTP Aufnahme in LNCaP wird durch Angiotensin nicht beeinflusst. Die Experimente mit Angiotensin zeigen auf die Aufnahme von PHIPA in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und 22Rv1 keinen Einfluss. Im Gegensatz zum Herzen wird deutlich, dass der AT1- und AT2-Rezeptor keine Bedeutung für die Aufnahme von FTP und PHIPA in die Prostatakarzinomzellen besitzt. Unklar bleibt inwieweit dabei auch die veränderte chemische Struktur einen Einfluss hat.

## **4.2. Erste in vivo Untersuchungen im Tiermodell**

In dem letzten Teil dieser Arbeit wurden tierexperimentelle Untersuchungen in Prostatakarzinom-tragenden CD1-nu/nu-Nacktmäusen durchgeführt, um die in vitro gewonnenen Ergebnisse in vivo mittels Kleintier-PET zu verifizieren. Dabei wurden die Ergebnisse aus der FTP-PET-Untersuchung mit Daten aus der parallel durchgeführten Untersuchung mit den etablierten Radiopharmaka FCH und FDG verglichen. Die Tierversuche zeigten nach intravenöser Injektion von FTP den höchsten Uptake in der Leber und den Nieren (33,7 % ID/g und 22,7 % ID/g). Auch im Knochen reichert sich mit 13,7 % ID/g viel FTP an (Abb. 25/26 auf S. 44/45). Die hohe Akkumulation von FTP von 33,7 % in der Leber lässt sich durch die physiologisch hohe hepatobiliäre Ausscheidung einer Fettsäure erklären, welche durch die hohe Lipophilie (Fettlöslichkeit) der Fettsäure bedingt ist. Die Aufnahme im Knochen deutet auf eine frühe Defluorierung des Radiopharmakons hin. Nach Abspaltung bindet freies [<sup>18</sup>F]Fluorid in den Knochen und sorgt dort für einen hohen Aktivitätsnachweis. Der Tumor ließ sich in der FTP-PET in vivo relativ gut darstellen. Die Aufnahme von FTP im Tumor betrug  $7,7 \pm 2,3$  % ID/g. In der schon zitierten Studie von DeGrado et al. in gesunden Ratten fanden sich die höchsten gemessenen Uptakewerte in Herz, Leber und Nieren (DeGrado *et al.* 2000). Dieses Ergebnis deckt sich ungefähr mit unseren Daten. Auch nach Injektion von FCH reichert sich die größte Menge des Radiotracers in der Leber und den Nieren an. Der Tumouruptake liegt niedriger als bei FTP bei 2,8 % ID/g.

Im Vergleich dazu ist der Tumoruptake von FDG der höchste. Er beträgt im Maximum 9,5 % ID/g. Der höchste Uptake von FDG lässt sich mit großem Abstand im Herzen, in den Nieren und im Gehirn nachweisen. Die Verteilung von FCH und FDG entspricht der in anderen Studien gemessenen Organaufnahme (DeGrado, Wang *et al.* 2000; Pillarsetty, Punzalan *et al.* 2009). In einer Studie von Price *et al.* wurde die Aufnahme von Fluorethylcholin mit der von Fluorodeoxyglukose an Mäusen mit Prostata Tumoren im Kleintier-PET verglichen. Am meisten FCH konnte in der Leber und in den Nieren nachgewiesen werden, während der Uptake im Gehirn sehr gering ausfiel. FDG hingegen fand sich vor allem im Herzen und in zweiter Stelle im Gehirn (Price, Coleman *et al.* 2002). Auch hier zeigt der hohe Leberuptake von FCH die hohe Fettstoffwechselaktivität in diesem Organ. Die Stoffwechselaktivität des Glukosestoffwechsels ist im Herzen und im Gehirn besonders hoch, dort lässt sich auch der höchste FDG Uptake finden.

Um eine Aussage über die Darstellbarkeit des Tumors und damit den Nutzen als Radiotracer für PET treffen zu können, muss das Verhältnis von Tumor zu Hintergrund betrachtet werden. Ein Verhältnis von über zwei kennzeichnet dabei einen guten Marker. In den PET-Scans mit dem Radiotracer FTP ließ sich kein Tumor zu Hintergrund Verhältnis von über zwei finden. Die Werte liegen bei 1,1 (Tumor/Knochen), 0,2 (Tumor/Leber) und 2 (Tumor/Muskel). Auf Grund der anatomischen Lage ist das Verhältnis von Tumor/Muskel am aussagekräftigsten. Mit einem Wert von zwei liegt dieses Verhältnis für den Radiotracer FTP nur knapp unter den aktuell zur Darstellung des Prostatakarzinoms verwendeten Radiotracers FEC (Tumor/Muskel 2,1). Damit lässt sich die hohe Affinität von FTP zu Prostatakarzinomzellen in den *in vitro*-Experimenten in der vorgelegten Untersuchung nur eingeschränkt nachvollziehen. Verschiedene Gründe können zu diesem Ergebnis geführt haben. Die wahrscheinlichste Ursache ist in der frühen Defluorierung von FTP nach Injektion zu sehen. Bereits 10 min nach Injektion ließ sich ein relativ hoher Anteil des radioaktiven Fluors im Knochen nachweisen. Dies zeigt eine Instabilität des Stoffes im Mausmodell an. Auch in der schon zitierten Arbeit von DeGrado *et al.* zeigte sich im Tierversuch an Ratten nach Injektion von FTP ein relevanter Knochen-Uptake. Bei seinen Untersuchungen am Schwein hingegen ließ sich innerhalb der ersten drei

Stunden kein Knochen-Uptake nachweisen. Diese Ergebnisse ließen ihn eine Spezies abhängige Defluorination von omega-markierten Fettsäuren vermuten (DeGrado *et al.* 2000).

Als weiterer Grund ist der Versuchsaufbau selbst kritisch zu hinterfragen. Zur intravenösen Injektion von FTP konnten in der Regel aufgrund der geringen Löslichkeit von FTP in wässrigen Injektionslösungen nur niedrige FTP-Dosen verabreicht werden: für FTP wurden  $< 2.0$  MBq in 150  $\mu$ L Injektionslösung gegenüber  $6,41 \pm 1.5$  MBq für FEC und  $9.0 \pm 2.1$  MBq für FDG verwendet. Dies könnte die Diskrepanz zwischen guter errechneter Aufnahmemenge und dennoch eingeschränkter Bildaussage erklären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass [ $^{18}$ F]Fluorthiapalmitat (FTP) *in vitro* eine hohe Affinität sowohl zu den hormonabhängigen als auch den hormonunabhängigen Zelllinien zeigt. FTP zeigt eine hohe Aufnahme und eine langanhaltende Retention in den untersuchten Zelllinien. Die Aufnahme von FTP wird konzentrationsabhängig durch den Fettsäuretransportinhibitor Etomoxir blockiert. Die hohe Aufnahme von FTP in Prostatakarzinomzelllinien erfolgt somit über den Fettsäuretransport und nicht über den AT1- bzw AT2-Rezeptor. Diese positiven *in vitro* Ergebnisse ließen sich im Tierversuch nicht eindeutig bestätigen. Die FTP-Aufnahme in die heterotop implantierten Tumoren war relativ gut, die Abgrenzung gegen umliegendes Gewebe allerdings schwierig, so dass eine klare Darstellung und Abgrenzung des Karzinoms in Kleintier-PET mäßig war. Der erste direkte Vergleich von FTP mit FDG und FEC in tumortragenden Mäusen *in vivo* ergab eine vergleichbar niedrige Akkumulation von FTP mit FEC in den Tumor, welche jedoch niedriger ist als in der FDG-PET. Die Diskrepanz zwischen den Daten aus den *in vitro* Zellexperimenten und den Ergebnissen aus den ersten *in vivo* Tierexperimenten am Kleintier-PET kann noch nicht erklärt werden. Weitere *in vivo* Untersuchungen am geeigneteren Prostatakarzinommodell sollten noch durchgeführt werden, um das Potential von FTP als PET-Radiopharmakon abschließend klären zu können, da die positiven *in vitro* Ergebnisse für ein hohes Potential von FTP als PET-Tracer zur Untersuchung des Prostatakarzinoms sprechen.

Auch PHIPA zeigt eine gute Affinität sowohl für die hormonabhängigen als auch für die hormonunabhängigen Prostatakarzinomzelllinien mit einer hohen zellulären

Retention über den gesamten Untersuchungszeitraum. Dies macht auch PHIPA zu einem potentiellen Kandidaten als Radiotracer zur Untersuchung des Prostatakarzinoms. Im Gegensatz zu FTP wird die zelluläre Aufnahme von PHIPA durch Etomoxir nicht inhibiert. Weitere Experimente zum Verständnis des Retentionsmechanismus in den Zellen sind von Nöten. Gleichfalls bilden die gewonnenen Daten die Grundlage für eine Fortführung der Untersuchung von PHIPA auch im Tiermodell.

## 5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor des Mannes in den westlichen Industrieländern und die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache nach dem Bronchialkarzinom bei Männern weltweit. Für seine Diagnostik, vor allem bei Rezidiv nach primär kurativ intendierter Therapie, ist die Positronenemissionstomographie (PET) klinisch ein zunehmend wichtiges nicht-invasives bildgebendes Verfahren. Dennoch gibt es gegenwärtig noch kein geeignetes Radiopharmakon für die klinische Routineuntersuchung und die Charakterisierung des Prostatakarzinoms mit der PET. Studien haben gezeigt, dass, abweichend von anderen Tumorentitäten, in Prostatakarzinomzellen der Fettsäurestoffwechsel eine höhere Bedeutung als der Glukosestoffwechsel aufweist. Darauf aufbauend wurden in dieser Arbeit die Fettsäuren [<sup>18</sup>F]Fluorhiapalmitat (FTP) und 13-(4-[<sup>124/131</sup>I]Iodphenyl)-3-(p-phenylen)tridekansäure (PHIPA) hinsichtlich ihrer Eignung als Radiotracer für die PET zum Nachweis des Prostatakarzinoms *in vitro* und [<sup>18</sup>F]Fluorhiapalmitat auch *in vivo* untersucht. Für die Zellversuche wurden zwei hormonabhängige Zelllinien, LNCap und 22Rv1, und zwei hormonunabhängige Zelllinien DU145 und PC-3 verwendet. Nach Inkubation mit dem radioaktiven Tracer wurde die Höhe der Aufnahme im zeitlichen Verlauf mit Hilfe einer gamma-Kamera gemessen. Es zeigt sich sowohl für FTP als auch für PHIPA eine zeitabhängige Aufnahme in die Prostatakarzinomzellen mit Erreichen eines Plateaus. Dieses wird von der fluorierten Fettsäure FTP schneller erreicht als von der jodierten Fettsäure PHIPA und spricht für deren höhere Affinität zu den Zellen. Des Weiteren unterscheidet sich die Höhe des erreichten Plateaus. Dieses liegt, abhängig von der Zelllinie, für FTP bis zu doppelt so hoch wie für PHIPA. Es zeigt sich außerdem, dass die maximal erreichte Aufnahme in die Zellen für die beiden hormonabhängigen Zelllinien LNCaP und 22Rv1 höher liegt, als für die hormonunabhängigen Zelllinien DU125 und PC-3. Letzteres bestätigt Untersuchungen von Price et al. 2002, die den hormonabhängigen Zelllinien einen höheren Umsatz zuschreiben.

Im Rahmen von kompetitiven Inhibitorexperimenten mit Etomoxir – ein Carnitin-Palmitoyltransferase-Inhibitor- sowie mit dem Gewebshormon Angiotensin und mit AICAR konnte gezeigt werden, dass sich die Aufnahme von FTP durch Etomoxir konzentrationsabhängig hemmen lässt. Somit stellt die Carnitin-Palmitoyltransferase einen wichtigen Aufnahmemechanismus für den Transport von FTP in die Zellen dar.



Zu gleicher Aussage kam De Grado et al 2000 bei Untersuchungen am Myocard am Rattenmodell. Die Aufnahme von PHIPA in die Prostatakarzinomzellen wird durch Etomoxir nicht beeinflusst. Desgleichen lässt sich die Aufnahme sowohl von FTP als auch von PHIPA weder durch Koinkubation mit Angiotensin noch mit AICAR hemmen. Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen somit, dass die hohe Aufnahme von FTP in Prostatakarzinomzelllinien über den Fettsäuretransport und nicht über den AT1- bzw AT2-Rezeptor erfolgt. Unser Ergebnis bestätigt damit gleichzeitig den erhöhten Fettsäuretransport in Prostatakarzinomzellen. In einem zweiten Schritt wurde die Aufnahme von FTP in ein heterotop implantiertes Prostatakarzinom in CD1-nu/nu-Nacktmäusen in vivo am Kleintier-PET bestimmt. Dabei zeigte sich eine relativ geringe Aufnahme von FTP in die Tumoren in vivo im Vergleich zur Akkumulation in Tumorzellen in vitro in der Zellkultur. Ein erster Vergleich der Aufnahme von FTP mit denen von FEC und FDG in die Tumoren in vivo ergab eine ähnlich niedrige Tumorakkumulation von FEC und FTP, welche allerdings unter derer von FDG liegt. Die Abgrenzung des Tumors mittels FTP-PET war zwar möglich, jedoch insgesamt noch nicht zufriedenstellend. Die Diskrepanz zwischen Daten aus Zellexperimenten in vitro und Ergebnissen aus tierexperimentellen Untersuchungen in vivo am Kleintier-PET kann noch nicht erklärt werden. Zur näheren Erforschung des Potentials von FTP als Radiopharmakon für die PET-Untersuchung sollten weitere in vivo Untersuchungen an Tiermodellen durchgeführt werden. Der zugrundliegende Mechanismus der hohen Aufnahme von PHIPA in die Prostatakarzinomzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Jedoch legen diese positiven Ergebnisse der in vitro Experimente mit PHIPA einen Grundstein für fortführende in vivo Bewertungen dieses Radiopharmakons nach Markierung mit I-124 mit dem Ziel, das Potential von [<sup>124</sup>I]PHIPA als mögliches Radiopharmakon zur Darstellung des Prostatakarzinoms abschließend klären zu können.

## 6. Literaturverzeichnis/ Abbildungsverzeichnis

Bader, P., F. C. Burkhard, R. Markwalder, U. E. Studer (2003). "Disease progression and survival of patients with positive lymph nodes after radical prostatectomy. Is there a chance of cure?" J Urol **169**(3): 849-854.

Beissert, M., R. Lorenz, E. W. Gerharz (2008). "[Rational imaging in locally advanced prostate cancer]." Urologe A **47**(11): 1405-1416.

Biersack, H.-J., L. M. Freemann (2007). Clinical Nuclear Medicine. Berlin Heidelberg, Springer Verlag: 53-54; 201-204.

Bose, S. K., W. Gibson, S. Giri, N. Nath, C. D. Donald (2009). "Angiotensin II up-regulates PAX2 oncogene expression and activity in prostate cancer via the angiotensin II type I receptor." Prostate **69**(12): 1334-1342.

Bouchelouche, K., P. Oehr (2008). "Recent developments in urologic oncology: positron emission tomography molecular imaging." Curr Opin Oncol **20**(3): 321-326.

Bouchelouche, K., S. T. Tagawa, S. J. Goldsmith, B. Turkbey, J. Capala, P. Choyke (2011). "PET/CT Imaging and Radioimmunotherapy of Prostate Cancer." Semin Nucl Med **41**(1): 29-44.

Caroli, P., C. Nanni, D. Rubello, A. Alavi, S. Fanti (2010). "Non-FDG PET in the practice of oncology." Indian J Cancer **47**(2): 120-125.

De Jong, I. J., T. D. De Haan, E. M. Wiegman, A. C. Van Den Bergh, J. Pruim, A. J. Breeuwsma (2010). "PET/CT and radiotherapy in prostate cancer." Q J Nucl Med Mol Imaging **54**(5): 543-552.

DeGrado, T. R., R. E. Coleman, S. Wang, S. W. Baldwin, M. D. Orr, C. N. Robertson, T. J. Polascik, D. T. Price (2001). "Synthesis and evaluation of 18F-labeled choline as an oncologic tracer for positron emission tomography: initial findings in prostate cancer." Cancer Res **61**(1): 110-117.

DeGrado, T. R., M. T. Kitapci, S. Wang, J. Ying, G. D. Lopaschuk (2006). "Validation of 18F-fluoro-4-thia-palmitate as a PET probe for myocardial fatty acid oxidation: effects of hypoxia and composition of exogenous fatty acids." J Nucl Med **47**(1): 173-181.

DeGrado, T. R., S. Wang, J. E. Holden, R. J. Nickles, M. Taylor, C. K. Stone (2000). "Synthesis and preliminary evaluation of (18)F-labeled 4-thia palmitate as a PET tracer of myocardial fatty acid oxidation." Nucl Med Biol **27**(3): 221-231.

DeGrado, T. R., S. Wang, J. E. Holden, R. J. Nickles, M. Taylor, C. K. Stone (2000). "Synthesis and preliminary evaluation of (18)F-labeled 4-thia palmitate as a PET tracer of myocardial fatty acid oxidation." Nucl Med Biol **27**(3): 221-231.

Denoyer, D., L. Kirby, K. Waldeck, P. Roselt, O. C. Neels, T. Bourdier, R. Shepherd, A. Katsifis, R. J. Hicks (2012). "Preclinical characterization of 18F-D-FPHCys, a new amino acid-based PET tracer." Eur J Nucl Med Mol Imaging. **39**(4): 703-712.

Dominska, K., A. W. Piastowska, E. Rebas, A. Lachowicz-Ochedalska (2009). "The influence of peptides from the angiotensin family on tyrosine kinase activity and cell viability in a human hormone-dependent prostate cancer line." Endokrynol Pol **60**(5): 363-369.

Duffey, B., B. Varda, B. Konety (2011). "Quality of evidence to compare outcomes of open and robot-assisted laparoscopic prostatectomy." Curr Urol Rep **12**(3): 229-236.

Eisenhut, M., W. D. Lehmann, W. E. Hull, W. W. Just, J. Hoffend, J. Zehelein, R. Zimmermann (1997). "Trapping and metabolism of radioiodinated PHIPA 3-10 in the rat myocardium." J Nucl Med **38**(12): 1864-1869.

Eisenhut, M., J. Liefhold (1988). "Radioiodinated p-phenylene bridged fatty acids as new myocardial imaging agents: syntheses and biodistribution in rats." Int J Rad Appl Instrum A **39**(7): 639-649.

Even-Sapir, E., U. Metser, E. Mishani, G. Lievshitz, H. Lerman, I. Leibovitch (2006). "The detection of bone metastases in patients with high-risk prostate cancer: 99mTc-MDP Planar bone scintigraphy, single- and multi-field-of-view SPECT, 18F-fluoride PET, and 18F-fluoride PET/CT." J Nucl Med **47**(2): 287-297.

Farsad, M., R. Schiavina, A. Franceschelli, F. Sanguedolce, P. Castellucci, A. Bertaccini, E. Brunocilla, F. Manferrari, S. Concetti, M. Garofalo, C. Rocca, M. Borghesi, R. Franchi, S. Fanti, C. Nanni, G. Martorana (2008). "Positron-emission tomography in imaging and staging prostate cancer." Cancer Biomark **4**(4-5): 277-284.

Gomez, P., M. Manoharan, S. S. Kim, M. S. Soloway (2004). "Radionuclide bone scintigraphy in patients with biochemical recurrence after radical prostatectomy: when is it indicated?" BJU Int **94**(3): 299-302.

Grimm, P., I. Billiet, D. Bostwick, A. P. Dicker, S. Frank, J. Immerzeel, M. Keyes, P. Kupelian, W. R. Lee, S. Machtens, J. Mayadev, B. J. Moran, G. Merrick, J. Millar, M. Roach, R. Stock, K. Shinohara, M. Scholz, E. Weber, A. Zietman, M. Zelefsky, J. Wong, S. Wentworth, R. Vera, S. Langley (2012). "Comparative analysis of prostate-specific antigen free survival outcomes for patients with low, intermediate and high risk prostate cancer treatment by radical therapy. Results from the Prostate Cancer Results Study Group." BJU international **109 Suppl 1**: 22-29.

Hara, T., N. Kosaka, H. Kishi (1998). "PET imaging of prostate cancer using carbon-11-choline." J Nucl Med **39**(6): 990-995.

Hara, T., N. Kosaka, H. Kishi (2002). "Development of (18)F-fluoroethylcholine for cancer imaging with PET: synthesis, biochemistry, and prostate cancer imaging." J Nucl Med **43**(2): 187-199.

Haseman, M. K., S. A. Rosenthal, T. J. Polascik (2000). "Capromab Pendetide imaging of prostate cancer." Cancer Biother Radiopharm **15**(2): 131-140.

Hautmann, R., H. Huland (2006). Urologie. Heidelberg, Springer Verlag: 229-241.

Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, E. Kawinski, J. P. Karr, H. Rosenthal, T. M. Chu, E. A. Mirand, G. P. Murphy (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma." Cancer res **43**(4): 1809-1818.

Jadvar, H. (2011). "Prostate cancer: PET with 18F-FDG, 18F- or 11C-acetate, and 18F- or 11C-choline." J Nucl Med **52**(1): 81-89.

Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, M. J. Thun (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.

Kaatsch, P., C. Spix, A. Katalinic, A. Hentschel, N. Baras, B. Barnes, J. Bertz, S. Dahm, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Laudi, U. Wolf (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. R. K.-I. H. u. d. Gesellschaft und d. e. K. i. D. e. V. (Hrsg). Berlin. **8**: 80-83.

Kaighn, M. E., K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, L. W. Jones (1979). "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)." Invest Urol **17**(1): 16-23.

Kato, T., E. Tsukamoto, Y. Kuge, T. Takei, T. Shiga, N. Shinohara, C. Katoh, K. Nakada, N. Tamaki (2002). "Accumulation of [11C]acetate in normal prostate and benign prostatic hyperplasia: comparison with prostate cancer." Eur J Nucl Med Mol Imaging **29**(11): 1492-1495.

Knapp, F. F., Jr., J. Kropp, P. R. Franken, F. C. Visser, G. W. Sloof, M. Eisenhut, Y. Yamamichi, Y. Shirakami, H. Kusuoka, T. Nishimura (1996). "Pharmacokinetics of radioiodinated fatty acid myocardial imaging agents in animal models and human studies." Q J Nucl Med **40**(3): 252-269.

Krause, B. J., M. Souvatzoglou, U. Treiber (2011). "Imaging of prostate cancer with PET/CT and radioactively labeled choline derivatives." Urol Oncol Epub: 11/03/2011.

Kwee, S. A., M. N. Coel, B. H. Ly, J. Lim (2009). "(18)F-choline PET/CT imaging of RECIST measurable lesions in hormone refractory prostate cancer." Ann Nucl Med **23**(6): 541-548.

Leung, K. (2004). 18-[18F]Fluoro-4-thia-palmitate. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). Bethesda (MD): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210569>.

Leung, K. (2004). [18F]Fluoro-[1,2-2H4]choline. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). Bethesda (MD): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21735582>.

Liu, Y., L. S. Zuckier, N. V. Ghesani (2010). "Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach." Anticancer Res **30**(2): 369-374.

Löffler, G. P., P.E. (2002). Stoffwechsel der Triacylglycerine. Berlin, Heidelberg, Spinger: 436-445.

Löffler, G. P., P.E.; Heinrich, P.C. (2007). Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg, Springer Verlag: 401-418.

Mattei, A., H. Danuser (2011). "Contemporary imaging analyses of pelvic lymph nodes in the prostate cancer patient." Curr Opin Urol **21**(3): 211-218.

McGarry, J. D. (2001). "Travels with carnitine palmitoyltransferase I: from liver to germ cell with stops in between." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 241-245.

Montorsi, F., T. G. Wilson, R. C. Rosen, T. E. Ahlering, W. Artibani, P. R. Carroll, A. Costello, J. A. Eastham, V. Ficarra, G. Guazzoni, M. Menon, G. Novara, V. R. Patel, J. U. Stolzenburg, H. Van der Poel, H. Van Poppel, A. Mottrie (2012). "Best Practices in Robot-assisted Radical Prostatectomy: Recommendations of the Pasadena Consensus Panel." Eur Urol: Epub 06/07/2012.

Nakashima, J., A. Tanimoto, Y. Imai, M. Mukai, Y. Horiguchi, K. Nakagawa, M. Oya, T. Ohigashi, K. Marumo, M. Murai (2004). "Endorectal MRI for prediction of tumor site, tumor size, and local extension of prostate cancer." Urology **64**(1): 101-105.

Nieder, A. M., S. S. Taneja, M. P. Zeegers, H. Ostrer (2003). "Genetic counseling for prostate cancer risk." Clin Genet **63**(3): 169-176.

Nilsson, S., B. J. Norlen, A. Widmark (2004). "A systematic overview of radiation therapy effects in prostate cancer." Acta Oncol **43**(4): 316-381.

Oehr, P., H.-J. Biersack, R. E. Coleman (2004). PET and PET-CT in Oncology. Berlin Heidelberg, Springer Verlag: 245-249.

Pike, L. S., A. L. Smift, N. J. Croteau, D. A. Ferrick, M. Wu (2010). "Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells." Biochim Biophys Acta: Epub 16/11/2010.

Prando, A., J. Kurhanewicz, A. P. Borges, E. M. Oliveira, Jr., E. Figueiredo (2005). "Prostatic biopsy directed with endorectal MR spectroscopic imaging findings in patients with elevated prostate specific antigen levels and prior negative biopsy findings: early experience." Radiology **236**(3): 903-910.

Price, D. T., R. E. Coleman, R. P. Liao, C. N. Robertson, T. J. Polascik, T. R. DeGrado (2002). "Comparison of [18 F]fluorocholine and [18 F]fluorodeoxyglucose for positron emission tomography of androgen dependent and androgen independent prostate cancer." J Urol **168**(1): 273-280.

Price, D. T., R. E. Coleman, R. P. Liao, C. N. Robertson, T. J. Polascik, T. R. DeGrado (2002). "Comparison of [18 F]fluorocholine and [18 F]fluorodeoxyglucose for positron emission tomography of androgen dependent and androgen independent prostate cancer." J Urol **168**(1): 273-280.

Reske, S. N., N. M. Blumstein, G. Glatting (2006). "[Advancement of PET and PET/CT in prostate carcinoma]." Urologe A **45**(6): 707-710, 712-704.

Rioja Zuazu, J., M. Rodriguez, A. Rincon Mayans, A. Saiz Sansi, J. J. Zudaire Bergera, R. Martinez-Monge, J. A. Richter, J. M. Berian Polo (2009). "Usefulness of PET scans in diagnosing recurrent prostate cancer. Prostate with PSA level < 5 ng/ml." Actas Urol Esp **33**(8): 844-852.

Schünke, M., E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, K. Wesker (2005). Prometheus LernAtlas der Anatomie: Hals und Innere Organe. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag: 170.

Sciarra, A., J. Barentsz, A. Bjartell, J. Eastham, H. Hricak, V. Panebianco, J. A. Witjes (2011). "Advances in Magnetic Resonance Imaging: How They Are Changing the Management of Prostate Cancer." Eur Urol **59**(6): 962-977.

Sciarra, A., V. Panebianco, S. Salciccia, S. Cattarino, D. Lisi, A. Gentilucci, A. Alfaroni, G. Mariotti, R. Passariello, V. Gentile (2011). "Modern role of magnetic resonance and spectroscopy in the imaging of prostate cancer." Urol Oncol **29**(1): 12-20.

Sidorkiewicz, M., E. Rebas, M. Szymajda, H. Lawnicka, M. Pawlikowski, A. Lachowicz (2009). "Angiotensin receptors in hormone-independent prostate cancer cell line DU145: presence of two variants of angiotensin type 1 receptor." Med Sci Monit **15**(4): BR106-110.

Singh, I. (2011). "Robotics in urological surgery: review of current status and maneuverability, and comparison of robot-assisted and traditional laparoscopy." Comput Aided Surg **16**(1): 38-45.

Skrede, S., H. N. Sorensen, L. N. Larsen, H. H. Steineger, K. Hovik, O. S. Spydevold, R. Horn, J. Bremer (1997). "Thia fatty acids, metabolism and metabolic effects." Biochim Biophys acta **1344**(2): 115-131.

Sökeland, J., R. Rübgen (2008). Taschenlehrbuch Urologie. Stuttgart, Thieme Verlag: 329-342.

Sramkoski, R. M., T. G. Pretlow, 2nd, J. M. Giaconia, T. P. Pretlow, S. Schwartz, M. S. Sy, S. R. Marengo, J. S. Rhim, D. Zhang, J. W. Jacobberger (1999). "A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(7): 403-409.

Stone, K. R., D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey, D. F. Paulson (1978). "Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)." Int J Cancer **21**(3): 274-281.

Sutinen, E., M. Nurmi, A. Roivainen, M. Varpula, T. Tolvanen, P. Lehtikoinen, H. Minn (2004). "Kinetics of [(11)C]choline uptake in prostate cancer: a PET study." Eur J Nucl Med Mol Imaging **31**(3): 317-324.

Toghol, F., R. B. Franklin, L. C. Costello (1980). "Citrate synthesis from fatty acids and amino acids in rat ventral prostate." Enzyme **25**(6): 371-376.

van den Brandt, P. A., M. P. Zeegers, P. Bode, R. A. Goldbohm (2003). "Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer: a prospective cohort study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(9): 866-871.

Wirth, M., L. Weißbach, R. Ackermann, W. Alberti, C. Albrecht, B. Göckel-Beining, M. Fröhner, W. Hinkelbein, K. Müller, H. Rübgen, T. Wiegand, J. Wolff, B. Wörmann (2009). "Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms." Berlin, Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., Deutsche Gesellschaft für Krebshilfe e.V.: 1-658.

Xiang, X., A. K. Saha, R. Wen, N. B. Ruderman, Z. Luo (2004). "AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms." Biochem Biophys Res Commun **321**(1): 161-167.

Yin, M., S. Bastacky, U. Chandran, M. J. Becich, R. Dhir (2008). "Prevalence of incidental prostate cancer in the general population: a study of healthy organ donors." J Urol **179**(3): 892-895; discussion 895.

Zeegers, M. P., A. Jellema, H. Ostrer (2003). "Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis." Cancer **97**(8): 1894-1903.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anatomie der Prostata mit den umliegenden Organen (Schünke et al. 2005).....	2
<b>Abbildung 2:</b> Carnitin-Transportsystem an der Mitochondrienmembran (McGarry 2001).....	11
<b>Abbildung 3:</b> [ <sup>18</sup> F]Fluorthiopalmitat (Leung 2004).....	13
<b>Abbildung 4:</b> Aufnahmekinetik von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiopalmitat in die DU145-PCa-Zelllinie.....	24
<b>Abbildung 5:</b> Aufnahmekinetik von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiopalmitat in die PC-3-PCa-Zelllinie.....	25
<b>Abbildung 6:</b> Aufnahmekinetik von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiopalmitat in die LNCaP-PCa-Zelllinie.....	26
<b>Abbildung 7:</b> Aufnahmekinetik von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiopalmitat in die 22Rv1-PCa-Zelllinie.....	27
<b>Abbildung 8:</b> Aufnahmekinetik von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiopalmitat in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien.....	27
<b>Abbildung 9:</b> Aufnahmekinetik von PHIPA in die DU145-PCa-Zelllinie.....	28
<b>Abbildung 10:</b> Aufnahmekinetik von PHIPA in die PC-3-PCa-Zelllinie.....	29
<b>Abbildung 11:</b> Aufnahmekinetik von PHIPA in LNCaP-PCa-Zelllinie.....	30
<b>Abbildung 12:</b> Aufnahmekinetik von PHIPA in die 22Rv1-PCa-Zelllinie.....	31
<b>Abbildung 13:</b> Aufnahmekinetik von PHIPA in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien.....	32
<b>Abbildung 14:</b> Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorodeoxyglukose in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien nach einer Inkubation von 5 und 15 min (pH 7.0; 37°C).....	33
<b>Abbildung 15:</b> Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorethylocholin (FEC) in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien nach einer Inkubation von 5 und 15 min (pH 7.0; 37°C).....	34



<b>Abbildung 16:</b> Gegenüberstellung des Einflusses von Etomoxir auf die Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat in die DU145-, PC-3, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinien.....	35
<b>Abbildung 17:</b> Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von PHIPA in die DU145-, PC-3-, 22Rv1- und LNCaP-PCa-Zelllinien.....	37
<b>Abbildung 18:</b> Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die DU145-PCa-Zellen.....	38
<b>Abbildung 19:</b> Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die PC-3-PCa-Zelllinie.....	39
<b>Abbildung 20:</b> Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die LNCaP-PCa-Zelllinie.....	39
<b>Abbildung 21:</b> Einfluss von Etomoxir auf die Aufnahme von FTP und PHIPA in die 22Rv1-PCa-Zelllinie.....	40
<b>Abbildung 22:</b> Übersicht über den Einfluss von AICAR auf die Aufnahme von FTP in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinie.....	41
<b>Abbildung 23:</b> Übersicht über den Einfluss von Angiotensin auf die Aufnahme von FTP in die DU145-, PC-3-, LNCaP- und 22Rv1-PCa-Zelllinie.....	42
<b>Abbildung 24:</b> Einfluss von AICAR und Angiotensin auf die Aufnahme von PHIPA in die PC-3- und 22Rv1-PCa-Zelllinie.....	43
<b>Abbildung 25:</b> Ganzkörper-PET-Aufnahme einer tumortragenden Maus nach Applikation von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat (A), [ <sup>18</sup> F]Fluorethylcholin (B) und [ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglukose (C) über die Schwanzvene, bzw. intraperitoneale Gabe (FDG).....	44
<b>Abbildung 26:</b> Ganzkörper-PET-Aufnahme einer tumortragenden Maus nach Applikation von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat (A), [ <sup>18</sup> F]Fluorethylcholin (B) und [ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglukose (C) über die Schwanzvene, bzw. intraperitoneale Gabe (FDG). Aufnahme 60 Min (FDG) und 10 Min (FCH, FTP) post injectionem in derselben Maus.....	45
<b>Abbildung 27:</b> Aufnahme von [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat, [ <sup>18</sup> F]Fluorethylcholin und [ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglukose in die Zielorgane der tumortragenden Mäusen gemessen in ROIs.....	46
<b>Abbildung 28:</b> Verhältnis von Tumor zu Hintergrund mit der Darstellung durch [ <sup>18</sup> F]Fluorthiapalmitat, [ <sup>18</sup> F]Fluorethylcholin und [ <sup>18</sup> F]Fluordeoxyglukose im Kleintier-PET.....	47

## **Danksagung**

Für die Bereitstellung aller zur Durchführung meiner Promotion erforderlichen materiellen Voraussetzungen und des Laborarbeitsplatzes danke ich dem Direktor der Nuklearmedizinischen Klinik des Universitätsklinikums Professor Dr. A. Buck und ehemals Professor Dr. Ch. Reiners.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. S. Samnick, der mich bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift betreute und mir in allen fachlichen Fragen zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. I. Israel für Ihre unermüdliche Beratung in fachlichen und praktischen Dingen, sowie bei Frau Hirsch und den Kollegen aus der Physik und Chemie für die praktische Unterstützung in der Bereitstellung der Radiopharmaka und bei allen weiteren Mitgliedern der Nuklearmedizinischen Klinik bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank meiner Familie.

# Lebenslauf

Name: Michaela van Oorschot

Staatsangehörigkeit: deutsch

24.2.1986 geboren in Marburg /Lahn

1992-1995

Besuch der Emil-von-Behring Grundschule in Marburg

1995-1996

Besuch der Grundschule in Thalbürgel (Thüringen)

1996-2004

Besuch des Christlichen Gymnasiums in Jena

Abitur: Juni 2004

September - Dezember 2004

Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der ResQuality -Schule für präklinische Notfallmedizin, Essen

Staatliches Examen: Dezember 2004

2005-2011

Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

Staatliches Examen: November 2011

Ab April 2012

Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I im Diakoniekrankenhaus Henriettenstiftung, Hannover.