

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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

[³H]Cholin- und [¹⁸F]FDG-Uptake in die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, PC-3 sowie in stimulierte und unstimulierte menschliche Entzündungszellen

Timo Julian Schwarz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. Univ.- Prof. Dr. M. Schwaiger

Die Dissertation wurde am 03.11.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2012 angenommen.

In Dankbarkeit
meinen Eltern
gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Das Prostatakarzinom	7
1.1.1	Diagnostik des Prostatakarzinoms	8
1.1.2	Therapie des Prostatakarzinoms.....	10
1.2	PET und PET/CT in der Diagnostik des Prostatakarzinoms	14
1.3	Entzündungszellen in Prostatapathologien	22
1.4	Zielsetzung.....	27
2	MATERIAL	28
2.1	Zellen.....	28
2.2	Kulturmedium.....	28
2.3	Versuchsmedium.....	28
2.4	Stimulantien	28
2.5	Dichtegradientenzellisolation.....	28
2.6	FACS Zellisolation.....	29
2.7	Chemikalien	29
2.8	Radioaktive Substanzen	29
2.9	Geräte	30
2.10	Gebrauchsmaterialien	30
2.11	Software.....	30
3	METHODIK	31
3.1	Eingesetzte Prostatakarzinomzelllinien	31
3.1.1	Anzucht der Zellen im Kulturmedium	31
3.1.2	Passagieren der Zellen	33
3.1.3	Einfrieren der Zellen	34
3.1.4	Auftauen der Zellen	34
3.1.5	Zellzahlbestimmung.....	35
3.2	Leukozytenisolation	36
3.2.1	Dichtegradientenisolation	36
3.2.1.1	Isolation mit einem Dichtegradienten.....	36
3.2.1.2	Isolation mit zwei Dichtegradienten.....	38
3.2.2	FACS Zellisolation	40
3.2.2.1	Antikörpermarkierung	43
3.2.2.2	Isolation der Zellen.....	44

3.3	Vorbereitung der Zellen für die Uptakeversuche	47
3.3.1	Zellstimulation	47
3.3.1.1	Makrophagen Stimulation	47
3.3.1.2	Granulozytenstimulation	47
3.3.1.3	Stimulation mononukleärer Zellen (MNCs)	48
3.3.1.4	Stimulation von CD3+ T-Lymphozten und CD19+ B-Lymphozyten	48
3.3.2	Überführung der Zellen in Versuchspuffer	48
3.3.2.1	Zellüberführung für Uptakeversuche unter Suspensionsbedingungen	48
3.3.2.2	Zellüberführung für Uptakeversuche unter adhärennten Bedingungen	49
3.4	Uptake Versuche	50
3.4.1	Kombinierte [³ H]Cholin- und [¹⁸ F]FDG-Uptake Versuche	50
3.4.2	Herstellung des radioaktiven Versuchspuffercocktails	51
3.4.2.1	[¹⁸ F]FDG Zugabe	52
3.4.2.2	[³ H]Cholin Zugabe	52
3.4.3	Uptakeversuch unter Suspensionsbedingungen	52
3.4.4	Uptakeversuch unter adhärennten Bedingungen	54
3.4.5	Messungen im Gamma- und Betacounter	55
3.5	Proteinbestimmung nach Bradford	55
3.6	Auswertung	58
3.6.1	Errechnung der [³ H]Cholin-Uptakewerte	58
3.6.2	Errechnung der [¹⁸ F]FDG-Uptakewerte	58
3.6.3	Umrechnung der Uptakewerte auf 10 ⁵ Zellen	59
3.6.4	Errechnung der Z-Scores für die Stimulationsgraphen	61
3.6.5	Zellvergleich – Tracervergleich	62
3.6.5.1	Zellvergleich	62
3.6.5.2	Tracervergleich	62
3.6.6	Statistik	64
3.6.6.1	Zelllinienvergleich	64
3.6.6.2	Tracervergleich	65
3.6.6.3	Vergleich der Z-Scores	65
4	ERGEBNISSE	66
4.1	Vorversuche	66
4.1.1	Leukozytenisolation	66
4.1.2	[¹⁸ F]FDG-Uptakevariabilität	67
4.1.3	[¹⁸ F]FDG-Uptake Charakterisierung	68
4.1.3.1	Aktivitätsverdünnungsreihe	68
4.1.3.2	Glukoseverdünnungsreihe	69
4.1.3.3	Zellzahlverdünnungsreihe	71
4.1.4	Kombinierter Uptake - Zellverdopplung	72

4.1.5	Probestimulation der mononukleären Zellen mit ConA.....	73
4.2	[¹⁸F]FDG und [³H]Cholin-Uptake der Zelllinien.....	75
4.2.1	[¹⁸ F]FDG-Uptake	75
4.2.1.1	Zelllinienvergleich.....	75
4.2.1.2	Entzündungszell/Tumorzell Index (ETI) für [¹⁸ F]FDG	77
4.2.1.2.1	LNCaP ETI _{[¹⁸F]FDG}}	77
4.2.1.2.2	PC-3 ETI _{[¹⁸F]FDG}}	78
4.2.2	[³ H]Cholin-Uptake	79
4.2.2.1	Zelllinienvergleich.....	79
4.2.2.2	Entzündungszell/Tumorzell Index (ETI) für [³ H]Cholin.....	82
4.2.2.2.1	LNCaP ETI _{[³H]Cholin}}	82
4.2.2.2.2	PC-3 ETI _{[³H]Cholin}}	83
4.2.3	Tracervergleich	84
4.2.3.1	Faktorieller Unterschied ETI _{[¹⁸F]FDG}} zu ETI _{[³H]Cholin}} bei LNCaP Tumorzellen	84
4.2.3.2	Faktorieller Unterschied ETI _{[¹⁸F]FDG}} zu ETI _{[³H]Cholin}} bei PC-3 Tumorzellen	85
4.3	Zellstimulation	88
4.3.1	Stimulation der Makrophagen.....	88
4.3.1.1	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme	88
4.3.1.2	[³ H]-Cholin-Aufnahme	90
4.3.2	Stimulation der MNCs	92
4.3.2.1	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme	92
4.3.2.2	[³ H]Cholin-Aufnahme	94
4.3.3	Stimulation der CD3+ T-Lymphozyten	96
4.3.3.1	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme	96
4.3.3.2	[³ H]Cholin-Aufnahme	97
4.3.4	Stimulation der CD19+ B-Lymphozyten	99
4.3.4.1	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme	99
4.3.4.2	[³ H]Cholin-Aufnahme	100
4.3.5	Stimulation der CD15+ Granulozyten	102
4.3.5.1	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme	103
4.3.5.2	[³ H]Cholin-Aufnahme	104
4.4	Uptakevergleich der Tumorzellen unter adhärennten und suspensiven Bedingungen	107
4.4.1	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme	107
4.4.2	[³ H]Cholin-Aufnahme.....	109
4.5	Uptakewerte pro 10⁵ Zellen.....	110
4.5.1	[¹⁸ F]FDG-Uptakewerte pro 10 ⁵ Zellen.....	110
4.5.2	[³ H]Cholin-Uptakewerte pro 10 ⁵ Zellen	111

5	DISKUSSION	113
5.1	Methodikdiskussion	114
5.1.1	Zellisolation	114
5.1.2	Der kombinierte Uptakeversuch	115
5.2	Tumorzellvergleich	117
5.3	FDG und Entzündungsgewebe	119
5.3.1	Granulozyten, Lymphozyten und die FDG Markierung	120
5.3.2	Makrophagen und die FDG Atherosklerosediagnostik	122
5.4	[¹⁸ F]- und [¹¹ C]Cholin und Entzündungsgewebe.....	124
5.5	Tracervergleich	125
5.6	Zellstimulation	126
5.6.1	Granulozytenstimulation.....	126
5.6.2	Makrophagen Stimulation.....	127
5.6.3	Stimulation von MNCs und Lymphozyten	129
6	ZUSAMMENFASSUNG:	133
7	LITERATURVERZEICHNIS:	135
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	151
9	DANKSAGUNG	152
ANHANG	153	

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom stellt mit 24,5 % aller diagnostizierten Krebserkrankungen die häufigste maligne Erkrankung des Mannes in der BRD dar [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Allerdings steht das Prostatakarzinom mit 10,3% aller tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen in Deutschland hinter Lungen- und Darmkrebs an dritter Stelle [Robert Koch Institut, 2010]. Die altersstandardisierte Inzidenz ist weltweit unterschiedlich und zeigt für Europa ein Nord-Süd-Gefälle. So liegen für Schweden Inzidenzen von 90 Erkrankte/100000 Männern vor, während für Spanien Inzidenzen von 35,9 Erkrankte/100000 Männern angegeben werden [Haas et al., 2008]. Das Lebenszeitrisko eines in der westlichen Welt geborenen Mannes an einem Prostatakarzinom zu erkranken, beträgt 42%, während nur 9,5% symptomatisch werden und ungefähr 3% daran versterben [Scardino et al., 1992]. Männer mit gut differenzierten Tumoren versterben selten an ihrem Prostatakarzinom, entscheidender ist hierbei der Einfluss der Begleiterkrankungen [Albertson et al., 2005]. Zu den unumstrittenen Risikofaktoren, ein Prostatakarzinom zu entwickeln gehören hohes Alter [Ries et al., 2007] und positive Familienanamnese [Johns et al., 2003]. Zu den Risikofaktoren, die eine Assoziation zum Prostatakarzinom aufweisen, die jedoch in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie als nicht überzeugend oder klinisch nicht relevant angesehen werden, gehören lokal entzündliche Prozesse wie Prostatitis, Vasektomie, Diabetes mellitus und Adipositas. Erhöhte Testosteronserumwerte, sowie Testosteronsubstitution gehen nicht mit einem erhöhten Risiko eines Prostatakarzinoms einher [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Allerdings zeigen 5 α -Reduktasehemmer, die die Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron hemmen, einen viel versprechenden Ansatz zur Risikoreduktion des Prostatakarzinoms. In der 2010 veröffentlichten REDUCE Studie zeigt sich nach 4-jähriger 5 α -Reduktasehemmertherapie mit Dutasterid eine Risikoreduktion von 22,8% gegenüber der Placebogruppe [Andriole et al. 2010]. In Deutschland sind 5 α -Reduktasehemmer zur Prävention des Prostatakarzinoms nicht zugelassen, jedoch finden sie vermehrt Anwendung bei Jugendlichen mit Alopecia androgenica, sowie bei der benignen Prostatahyperplasie im Alter.

1.1.1 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Bei Männern im Alter über 40 Jahren und einer mutmaßlichen Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren sollte bei dem Wunsch auf eine Prostatakarzinom-Früherkennungsuntersuchung eine Bestimmung des PSA Wertes sowie eine digital-rektale Untersuchung empfohlen werden. Diese jedoch nur nach sorgfältiger Aufklärung des Patienten über deren Aussagekraft und gegebenenfalls notwendigen Konsequenzen. Die Prostatabiopsie wird durchgeführt bei PSA Werten über 4 ng/ml, karzinomverdächtigem Ergebnis der digital-rektalen Untersuchung sowie auffälligem PSA-Anstieg im Verlauf. [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

In der prospektiv randomisierten europäischen Multizenterstudie (ERSPC), bei der die Todesraten aufgrund von Prostatakarzinom zwischen Patienten, die sich einem Screeningprogramm unterzogen, mit einer Kontrollgruppe verglichen wurden, konnte eine Todesratenreduktion aufgrund von Prostatakarzinom um 20% zu Gunsten der Screeninggruppe gezeigt werden. Bei dieser Studie mussten 1410 Männer gescreent werden, um einen Mann vor dem Tod aufgrund von Prostatakarzinom zu bewahren [Schröder et al. 2009]. Zugleich wird aber bei diesen 1410 gescreenten Männern 116 mal die histologisch gesicherte Diagnose Prostatakarzinom gestellt, während dies bei 1410 Männern in der Kontrollgruppe 68 mal der Fall ist. Dies sind 48 zusätzliche Männer pro einem vor dem Tod bewahrten Mann, die mit der Diagnose Prostatakarzinom aufgrund von Screeningmaßnahmen leben müssen und einer Therapie bedürfen. Dies verdeutlicht den umstrittenen Nutzen der Prostatakarzinomfrüherkennung.

Bei Verdacht auf Prostatakarzinom sollte zunächst eine digital-rektale Untersuchung (DRU) durchgeführt werden [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Diese Untersuchung zeigt bei sehr hoher Spezifität (94%) und negativen prädiktiven Wert (99%) jedoch eine eher geringe Sensitivität von 59% sowie einen geringen positiven prädiktiven Wert (28%) [Hoogendam et al. 1999]. Die digital-rektale Untersuchung kann durch die transanale Ultraschalldiagnostik (TRUS) ergänzt werden. Anhand von PSA Wert, DRU und TRUS wird, wie oben beschrieben, die Indikation zur Prostatastanzbiopsie gestellt. Die Stanzbiopsie erfolgt unter transrektal-sonographischer Kontrolle bei Antibiotikaschutz und lokaler Anästhesie. Es werden mindestens 10 bis 12 Gewebszylinder aus beiden Prostatalappen entnommen und anschließend histopathologisch untersucht. Wird in den Stanzen ein Karzinom diagnostiziert, sollte dies unter Angabe der Stanzenlokalisierung und Gleason-Score beschrieben werden. Der Gleason-Score ist ein Zahlenwert zwischen 2 und 10, wobei der Wert 2 ein wenig aggressives

Wachstum beschreibt und der Wert 10 für ein sehr aggressives Wachstum steht. Der Gleason-Score errechnet sich aus der Summe der zwei am häufigsten im Prostataresektat vorkommenden Wachstumsmuster in Zahlenwerten von 1 bis 5 entsprechend dem Grad der Entdifferenzierung. Bei Nadelbiopsien sollte der Gleason-Score immer den schlechtesten Grad der Entdifferenzierung beinhalten, auch wenn dieser nur in weniger als 5% des Probematerials vorherrscht [Heidenreich et al. 2007]. Sofern möglich, sollte beim Biopsiematerial auch invasives sowie Kapsel überschreitendes Wachstum erwähnt werden [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Nach histologischer Sicherung der Diagnose Prostatakarzinom wird das Stadium bestimmt, in dem sich das Prostatakarzinom befindet. Hierzu dient die UICC-Klassifikation [AJCC, 2009]. Es wird hierbei zwischen den Stadien lokal begrenzt (T1-2 N0 M0), lokal fortgeschritten (T3-4 N0 M0) und fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Prostatakarzinom (N1-3 und/oder M1) unterschieden.

Das T-Stadium wird durch die digital-rektale Untersuchung bestimmt. Die Testgüte der TRUS ist der DRU nicht überlegen, Befunde der TRUS sollten jedoch berücksichtigt werden [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Am genauesten wird die lokale Tumorausdehnung durch die MRT mit Endorektalspulen erfasst [Böni et al. 1996]. Diese Untersuchung sollte vor der Entscheidung über eine therapeutische Maßnahme bei Patienten mit unklaren Biopsiebefunden, bei Patienten mit Gleason-Score von mindestens 8 und/oder lokal fortgeschrittenen T Stadien (T3-4) durchgeführt werden [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Eine weitere Diagnostik zur Erfassung des N- und M-Stadiums wird unter Berücksichtigung der bisher erhobenen Befunde veranlasst. Bei bekanntem T-Stadium, PSA Wert und Gleason-Score ergibt sich aus Normogrammen wie der Partin Tabelle die Wahrscheinlichkeit für Fernmetastasen, Samenbläscheninfiltration und Lymphknotenmetastasen [Partin et al. 2001]. Bei einer hohen Wahrscheinlichkeit auf lokal begrenzte Tumorausdehnung wird keine weitere Diagnostik durchgeführt. Patienten mit einem histologisch gesicherten Prostatakarzinom und einem PSA-Wert von >10 ng/ml oder einem Gleason-Score größer 8 oder einem T-Stadium von 3-4 oder Knochenschmerzen sollten eine Skelettszintigraphie mit ^{99m}Tc-Phosphonaten erhalten. [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Die Sensitivität und Spezifität der Skelettszintigraphie liegen bei 70% und 57% [Even-Sapir et al. 2006]. SPECT bzw. SPECT-CT Aufnahmen können die Sensitivität und Spezifität erhöhen. Die höchste Sensitivität (100%) und Spezifität (100%) zur Detektion von Knochenmetastasen zeigen jedoch [¹⁸F]Fluorid

PET/CT Aufnahmen [Even-Sapir et al. 2006] Es gibt keine Evidenz dafür, dass MRT oder Cholin-PET/CT beim Prostatakarzinom eine höhere Treffsicherheit für Knochenmetastasen besitzen [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Allerdings sollen unklare szintigraphische Befunde durch MRT oder CT weiter abgeklärt werden. Des Weiteren findet die MRT ihren Einsatz bei der Zielvolumenberechnung bei geplanter Strahlentherapie [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

1.1.2 Therapie des Prostatakarzinoms

Für das lokal begrenzte Prostatakarzinom bestehen verschiedene Therapieansätze. Neben der radikalen Prostatektomie und Strahlentherapie bestehen Konzepte wie Active Surveillance und Watchful Waiting.

Die zunehmend bei jüngeren Patienten durchgeführte Frühdiagnostik führt bei vielen Patienten dazu, dass Tumore detektiert werden, die nicht signifikant sind. Nicht signifikante Tumore, die kleiner sind als $<0,5\text{cm}^3$ und keine Gleasongrade 4 und 5 zeigen, führen nicht zu einer verminderten Lebenserwartung oder Beeinträchtigung der Gesundheit des Betroffenen [Graefen et al. 2008]. Um dementsprechend eine Übertherapie zu vermeiden, sollten Patienten mit einem niedrigen Risikoprofil über das Konzept der Active Surveillance informiert werden [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Das Niedrigrisikoprofil wurde von D'Amico 1998 mit $\text{PSA} \leq 10\text{ng/ml}$, Gleason-Score ≤ 6 und T1c und T2a Tumoren formuliert und von der Deutschen Gesellschaft für Urologie übernommen und durch die Forderung von Tumorgewebe in weniger als 2 Stanzungen und weniger als 50% Tumorgewebe in einer Stanze erweitert [D'Amico et al. 1998] [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Active Surveillance ist das Konzept eines verzögerten Vorgehens unter fortlaufender Kontrolle von PSA-Wert, digital-rektaler Untersuchung und Prostatabiopsien. Nur bei Patienten, bei denen eine kurative Behandlung in Frage kommt, soll das Konzept der Active Surveillance umgesetzt werden. Bei Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen eine Lebenserwartung unter 10 Jahren haben oder älter als 70 Jahre sind, sollte das Konzept Watchful Waiting erörtert werden, wobei Interventionen rein palliativ bei Tumorsymptomen erfolgen [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Die primäre Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms ist die radikale Prostatektomie. Diese kann retropubisch, perineal, laparoskopisch oder Roboter-assistiert erfolgen. Die häufigsten Nebenwirkungen dieses operativen Eingriffes sind geringgradige Belastungsinkontinenz, erektile Dysfunktion, Lymphozelen, Urin-Leckagen und

Lungenembolien [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Die radikale Prostatektomie ist das einzige Therapieverfahren, bei dem die Wirksamkeit durch eine prospektiv randomisierte Studie gegenüber der Watchful Waiting-Strategie nachgewiesen wurde. In dieser Studie von Bill-Axelsson zeigte sich bei einer medianen Nachbeobachtung von 8,2 Jahren nach Prostatektomie eine Senkung der Gesamtmortalität, der krankheitsspezifischen Mortalität und des Risikos für Fernmetastasen. Allerdings wurde die Senkung der krankheitsspezifischen Mortalität nur bei Prostatektomiepatienten unter 65 Jahren nachgewiesen. Bei den Patienten über 65 Jahren war die Reduktion der krankheitsspezifischen Mortalität nicht signifikant [Bill-Axelsson et al. 2005].

Die Lymphadenektomie mit Resektion von mindestens 10 Lymphknoten sollte nur bei Patienten mit erhöhtem Risiko auf fortgeschrittene Karzinomstadien durchgeführt werden. Da bisher keine Hinweise auf einen lebenszeitverlängernden Nutzen besteht, sollte vor allem der diagnostische Nutzen gegen die Nebenwirkung wie Lymphozele, Thrombose und Lymphödeme abgewogen werden. Eine Indikation zur Hormontherapie kann sich aus dem positiven Lymphknotenbefund ergeben [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Die perkutane Strahlentherapie ist, genauso wie die radikale Prostatektomie, eine primäre Therapieoption beim lokal begrenzten Prostatakarzinom [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Es gibt keine prospektiv randomisierte Studie, die das Ergebnis zwischen radikaler Prostatektomie und perkutaner Strahlentherapie vergleicht. Zahlreiche Kohortenstudien zeigen jedoch, dass die Ergebnisse nach radikaler Prostatektomie mit denen der perkutanen Strahlentherapie und Brachytherapie vergleichbar sind [Nilsson et al. 2004]. So konnte auch in der bisher größten Kohortenstudie von Kupelian et al. kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Therapieoptionen gefunden werden. Allerdings zeigte sich in dieser Studie, dass eine perkutane Strahlentherapie mit weniger als 72 Gray mit einem erhöhten Risiko eines biochemischen Rezidivs einhergeht, das sich durch steigende PSA Werte definiert [Kupelian et al. 2004]. Dementsprechend empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Urologie eine Mindestdosis von 70-72 Gray, die durch dreidimensionale Bestrahlung verabreicht wird [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Nebenwirkung der Strahlentherapie sind schmerzhafte Proktitis mit rektaler Blutung, Diarrhoea, Haematurie, Cystitis und Inkontinenz. Durch die Einführung der dreidimensional konformalen Bestrahlung konnten insbesondere die proktologischen Nebenwirkungen reduziert werden [Dearnaley et al. 1999]

Patienten mit einem hohen Risikoprofil mit PSA Werten über 20ng/ml, Gleason-Score ≥ 8 oder klinischem Stadium $\geq T2c$ sollten zusätzlich zur Strahlentherapie eine Hormontherapie

erhalten. Die Hormontherapie erfolgt durch den Effekt einer Kastration (z.B. bilaterale Orchiectomie, LHRH-Analoga, GnRH-Blocker) oder durch antiandrogene Substanzen wie Bicalutamid oder Flutamid. In der prospektiv randomisierten TROG 96.01 Studie konnte Danham zeigen, dass nach Bestrahlung lokaler Prostatakarzinome mit einem T-Stadium größer als T2b eine über 6 Monate durchgeführte Hormontherapie mit Flutamid und dem GnRH-Blocker Goserelin nach 10 Jahren Tumorprogression, Karzinom-spezifische Mortalität und Gesamtmortalität signifikant senkt [Denham et al. 2011].

Eine weitere primäre Therapieoption bei lokal begrenztem Prostatakarzinom mit einem niedrigen Risikoprofil ist die Brachytherapie [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. In der Low-dose-rate- (LDR-) Therapie werden unter transrektaler Ultraschallkontrolle radioaktive ^{125}I - oder ^{103}Pd -Seeds als Permanentimplantate eingebracht. Bei der High-dose-rate- (HDR-) Therapie werden über einen transperinealen Zugang Hohlnadeln mit ^{192}Ir Strahlenquellen temporär für wenige Sekunden bis min an vorher berechneten Positionen eingebracht [Schenck et al., 2006]. Während die LDR-Therapie nur bei dem lokal begrenzten Prostatakarzinom mit niedrigem Risikoprofil eine Therapieoption ist, wird die HDR-Brachytherapie in Kombination mit der perkutanen Strahlentherapie auch beim lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom angewendet [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Das T3-Stadium (extrakapsuläres Wachstum und Infiltration von Samenbläschen) und T4-Stadium (Organinvasion Sphinkter, Levator, Beckenwand, Blase und Rektum) ohne Lymphknoten und Fernmetastasen beschreiben das lokal fortgeschrittene Prostatakarzinom. Primäre Therapieoptionen sind hierbei die Strahlentherapie in Kombination mit einer Hormontherapie und die radikale Prostatektomie mit einer extendierten pelvinen Lymphadenektomie. Prostatektomiepatienten die einen Tumor positiven Schnitttrand oder Samenbläscheninfiltration aufweisen sollten eine adjuvante perkutane Strahlentherapie erhalten [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Beim Lymphknoten-positiven Prostatakarzinom bestehen chirurgische Therapieoptionen wie die Lymphadenektomie sowie strahlentherapeutische Therapieoptionen wie die Bestrahlung des pelvinen und paraortalen Lymphabflusses. Aufgrund der eingeschränkten Datenlage werden bezüglich der beiden Therapieoptionen von der Deutschen Gesellschaft für Urologie keine Empfehlungen ausgesprochen [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Eine Hormontherapie über 2 Jahre sollte jedoch begleitend zur Strahlentherapie verabreicht werden. Diese kann auch nach radikaler Prostatektomie mit histologisch gesicherten

Lymphknotenmetastasen durchgeführt werden. Auch das palliative Konzept Watchful Waiting sollte von einer Hormontherapie begleitet werden.

Das nach einer primären Therapie rezidivierende Prostatakarzinom wird meist durch steigende PSA Werte in der Nachsorge auffällig. Ein biochemisches PSA-Rezidiv definiert sich bei Patienten nach radikaler Prostatektomie durch einem in mindestens zwei Messungen bestätigten PSA-Wertanstieg um mehr als 0,2 ng/ml [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Bei der in situ verbleibenden posttherapeutischen Prostata nach Strahlentherapie ist die Definition des PSA-Rezidivs durch residuale PSA-Produktion erschwert [Fichtner, 2006]. Die von der Deutschen Gesellschaft für Urologie empfohlene „Phoenix-Definition“ eines PSA-Rezidivs nach Strahlentherapie lautet: tiefster PSA-Wert der Nachsorge (PSA-Nadir) plus 2 ng/ml. Dieser Wert soll sich nach 3 Monaten noch einmal bestätigen [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Eine bioptische Sicherung sollte bei Patienten nach Strahlentherapie mit der Option einer lokalen Rezidivtherapie angestrebt werden [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Nach radikaler Prostatektomie stellt sich die Biopsie der vesico-urethralen Anastomose als zu ungenaue Methode zum Nachweis eines Lokalrezidivs dar [Fowler et al., 1995]. Um zwischen einem lokalen und systemischen Rezidiv zu differenzieren, stehen diesbezüglich nach radikaler Prostatektomie PSA-Verdopplungszeit, Gleason-Grad des Prostatektomiepräparates und das Zeitintervall zwischen Operation und Rezidivnachweis im Vordergrund. Zur weiteren Diagnostik sollte vor einer Salvageoperation oder Salvageradiotherapie eine Knochenszintigraphie durchgeführt werden. Dies insbesondere bei PSA-Werten >10 ng/ml [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. Eine [¹¹C]Cholin-PET/CT Bildgebung wird von der Deutschen Gesellschaft für Urologie vor einer Salvageoperation bei Tumorrezidiv nach Strahlentherapie aufgrund fehlender Datenlage nicht empfohlen. Biopsiebefund, T-Stadium, PSA Wert, PSA Anstieg und PSA Verdopplungszeit sollen zur Einschätzung dienen, ob das vorliegende Rezidiv lokal begrenzt ist und die Entscheidung über lokaltherapeutische Maßnahmen beeinflussen [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Das metastasierte Prostatakarzinom sollte primär hormonell therapiert werden. Die biochemische Kastrationstherapie zeigt genauso wie die operative Kastrationstherapie erheblichen Einfluss auf die Lebensqualität. So zählen zu den häufigen Nebenwirkungen Libidoverlust, erektile Dysfunktion, Hitzewallungen, Gynäkomastie und Brustschmerz, Osteoporose, Anämie und Zunahme des Körperfetts. Ein günstigeres Nebenwirkungsprofil bezogen auf Hitzewallung und Libidoverlust zeigen die antiandrogene Substanzen wie

Biclutamid. In einer randomisierten Studie zeigte sich jedoch, dass insbesondere bei Patienten mit ausgedehnter Metastasierung die Kastrationstherapie der antiandrogenen Therapie im Bezug auf progressionsfreies Überleben überlegen ist [Tyrell et al., 1998]. Eine palliative Hormontherapieentscheidung sollte demnach maßgeblich nach den Erwartungen des Patienten erfolgen [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

Das Androgen-unabhängige oder Kastrations-resistente Prostatakarzinom ist durch weiteres Wachstum und steigende PSA Werte unter Hormontherapie gekennzeichnet. Eine Änderung der antihormonellen Therapie oder eine zusätzliche Chemo- oder Steroidtherapie kann Symptome lindern. Die Überlebenszeit wird dadurch nicht oder nur gering verlängert [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011].

1.2 PET und PET/CT in der Diagnostik des Prostatakarzinoms

Anders als bei der Skelettszintigraphie mit ^{99m}Tc -Phosphonaten ist der klinische Stellenwert der PET in der Diagnostik des Prostatakarzinoms noch umstritten. So wird in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie [^{11}C]Cholin-PET/CT und [^{18}F]Fluorid-PET/CT erwähnt, eine Empfehlung zur Durchführung dieser diagnostischen Maßnahme wird aufgrund von fehlender Evidenz und Datenlage jedoch nicht ausgesprochen [Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011]. In den Guidelines der European Association of Urology (EAU) wird anerkannt, dass PET Aufnahmen mit radioaktiven Cholinderivaten zur Detektion von Lokalreziven beitragen können, jedoch wird zugleich erwähnt, dass dieses Verfahren kein klinisches Routineverfahren ist [Heidenreich et al., 2007]. In den englischen NICE Leitlinien zum Prostatakarzinom wird darauf verwiesen, dass die PET kein klinisches Routineverfahren ist. Dementsprechend wird in diesen Leitlinien die PET auch nicht weiter erwähnt [National Collaboration Centre for Cancer, 2008]. Keine Erwähnung der PET findet sich in den amerikanischen Leitlinien der American Urological Association [Thompson et al., 2007].

Die PET ist ein bildgebendes Verfahren, das gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie der CT und MRT nicht die Morphologie eines Gewebes wiedergibt, sondern die Stoffwechselaktivität. Hierzu werden Radiopharmaka wie z.B. radioaktiv markierte Glukose in Form von [^{18}F]Fluordesoxyglukose dem Patienten gespritzt und anschließend wird durch einen PET-Scan die Anreicherung dieser Radiopharmaka in den verschiedenen Geweben beurteilt. Der Hauptanwendungsbereich der PET findet sich im Bereich der nuklearmedizinischen Onkologie. Hierzu wurden Radiopharmaka entwickelt, die sich speziell in Tumorgewebe

anreichern. Zu diesen Radiopharmaka zählen Glukose, Aminosäuren und Cholin, die mit im Zyklotron hergestellten Positronenstrahlern gekoppelt werden. Die in der Nuklearmedizin am häufigsten verwendeten Positronenstrahler ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O haben sehr kurze Halbwertszeiten von jeweils 109,8 min, 20,3 min, 9,96 min und 2 min. Diese teilweise sehr kurzen Halbwertszeiten erfordern von nuklearmedizinischen Einrichtungen einen Anschluss an eine Radiochemie mit Zyklotron.

Positronenstrahler emittieren bei der Umwandlung eines Protons in ein Neutron ein positiv geladenes Elektron (Positron) und ein Neutrino. Das aus dem Atomkern emittierte Positron trifft kurz nach Abgabe seiner kinetischen Energie auf ein Elektron. Hierbei kommt es zur Paarvernichtung (Annihilation) der beiden Teilchen. Es entstehen zwei Gammaquanten, die unter einem 180° Winkel in entgegengesetzter Richtung den Ort der Paarvernichtung verlassen. Auf die zwei Gammaquanten entfällt die Ruheenergie des Positrons und Elektrons, so dass die Energie eines einzelnen Gammaquants 511 keV beträgt. Positronenemissionstomographen detektieren mit einander gegenüberliegenden Detektorpaaren alle Ereignisse, welche innerhalb eines sehr kurzen Zeitfensters (Koinzidenzfenster) auftreten (4-15 ns). Somit definieren sich Koinzidenzlinien, aus denen durch Rekonstruktionsalgorithmen die Aktivitätsverteilung im Raum rekonstruiert werden kann. Der Hauptunterschied zwischen SPECT (single photon emission computed tomography) und PET ist die Notwendigkeit von Bleikollimatoren zur Bestimmung der Flugrichtung bei der SPECT im Vergleich zur elektronischen Kollimation bei PET. Somit ist die PET im Vergleich zur SPECT viel empfindlicher für emittierte Gammaquanten. Durch genauere Detektion der Flugzeitunterschiede der Gammaquanten, sowie neuartige Detektorblöcke kann die Ortsauflösung bei der PET im Vergleich zur SPECT ohne feinere Kollimatorsysteme und konsekutiver Strahlendosiserhöhung verbessert werden [Ziegler, 2007].

Seit der Einführung erster kombinierter PET/CT Geräte 1998 ist es möglich, die biochemischen Stoffwechselinformationen der PET mit den morphologischen Informationen der CT zu verbinden. PET und CT Untersuchungen können nun durchgeführt werden, ohne den Patienten umzulagern, wodurch Fehler in der räumlichen Ausrichtung minimiert werden. Zugleich ist die Nutzung des CT-Datensatzes für die Schwächungskorrektur der PET sehr wichtig. Artefakte aufgrund von Schwächung durch Compton-Streuung können somit minimiert werden. Inzwischen hat sich PET/CT klinisch etabliert und hat in der Onkologie fast vollständig die alleinige PET-Untersuchung abgelöst. Die Entwicklung klinischer Systeme, die

Kernspintomographie mit PET verbindet (MR/PET), ist sehr aktuell und wird für bestimmte Fragestellungen in der Onkologie neue Ansätze bieten. [Ziegler, 2007]

86% aller in Deutschland durchgeführten PET Aufnahmen beziehen sich auf onkologische Indikationen [Kotzerke et al., 2010]. Der hierbei am häufigsten eingesetzte Tracer ist die [¹⁸F]Fluordesoxyglukose, die bei malignen Prozessen zur Gewebscharakterisierung, Staging und Therapiekontrolle eingesetzt wird [Reske et al., 2001]. Die in absteigender Reihenfolge am häufigsten untersuchten Tumorentitäten sind das Lungenkarzinom, maligne Lymphome und gastrointestinale Tumore [Kotzerke et al., 2010]. Neben den onkologischen Fragestellungen werden 8% aller PET-Aufnahmen im Bereich der Neurologie und 3% im Bereich der Kardiologie durchgeführt. Auch in der Kardiologie findet der Tracer [¹⁸F]Fluordesoxyglukose zur Myokardviabilitätsbestimmung bei koronarer Herzkrankheit Anwendung, um den Erfolg revaskularisierender Maßnahmen abzuschätzen [Schwaiger et al., 2010]. Im Bereich der Inflammationsdiagnostik konnte Rudd et al. 2002 mit [¹⁸F]FDG die Aktivität der makrophagozytären Entzündung durch erhöhte Uptakewerte in atherosklerotischen Plaques nachweisen. Plaques mit hoher [¹⁸F]FDG Anreicherung stellten sich durch die Symptomatik der Patienten als instabile Plaques dar [Rudd et al. 2002]. Der breite Einsatzbereich der PET mit [¹⁸F]FDG (FDG-PET), sowie die klinische Bedeutung dieses Verfahrens zeigen auf, dass dieses Verfahren insbesondere aus der modernen Onkologie nicht mehr wegzudenken ist [Reske et al., 2001]. Allerdings erweisen sich nicht alle Tumore als FDG-PET geeignet. So ist die FDG-PET-Bildgebung im Gehirn aufgrund des hohen Glukosemetabolismus und des niedrigen Signal-Hintergrund-Verhältnisses limitiert. Besonders die hohe FDG-Aufnahme in der Grauen Substanz bereitet Schwierigkeiten, zwischen der ebenfalls hohen FDG-Aufnahme bei malignen Hirntumoren zu unterscheiden. Diesbezüglich wurden Aminosäuretracer entwickelt, die im Gegensatz zum FDG kaum Anreicherung in gesundem Gehirngewebe zeigen. Dadurch ergibt sich ein sehr gutes Signal-Hintergrund Verhältnis von Tumor zu umgebendem Gewebe, was eine hochspezifische Hirntumordiagnostik erlaubt. Häufig verwendete Tracer sind hierbei [¹¹C]Methionin, [¹¹C]Tyrosin und [¹⁸F]FET, von denen am besten [¹¹C]Methionin evaluiert ist [Drzezga, 2007].

Auch bei der PET Diagnostik des Prostatakarzinom bestehen für den Tracer [¹⁸F]FDG Einschränkungen. [¹⁸F]FDG wird über die Niere ausgeschieden und reichert sich somit in Urethra und der Harnblase an. Durch die unmittelbare Nähe zur Prostata ist folglich die Beurteilung der lokalen Tumorausbreitung sowie die Detektion von Metastasen im kleinen

Becken erschwert [de Jong et al. 2002]. Zugleich ist das Prostatakarzinom ein langsam wachsender Tumor, der eine niedrige Glykolyserate aufweist. Singh et al. zeigten, dass die schnell wachsende nicht Hormon-abhängige Prostatakarzinomzelllinie DU145 für ihr schnelles Wachstum im Vergleich zur Hormon-abhängigen, langsam wachsenden LNCaP Zellelinie viel Glukose benötigt [Singh et al., 1999]. In einem in vitro Modell verglich Price den [¹⁸F]FDG-Uptake von schnell wachsenden, nicht Hormon-abhängigen PC-3 Zellen mit dem von LNCaP Zellen. Hierbei zeigten die langsam wachsenden LNCaP Zellen einen geringeren [¹⁸F]FDG-Uptake [Price et al., 2002]. In einem Xenograftmodell mit humanen Prostatakarzinomzellen konnten auch Javar et al. in vivo zeigen, dass die [¹⁸F]FDG-Aufnahme in die nicht Hormon-abhängigen PC-3 Zellen höher ist als in die Hormon-abhängigen CWR-22 Prostatakarzinomzellen [Javar et al., 2005]. Diese und weitere Studienergebnisse sind dahingehend zu interpretieren, dass vor allem aggressivere Prostatakarzinome in einem höheren Maße [¹⁸F]FDG verstoffwechseln, wenig aggressive Tumore jedoch der Diagnostik entgehen. In einem die FDG-PET Studien zum Prostatakarzinom zusammenfassenden Artikel schreibt Krause, dass bei einer organbezogenen Erkrankung die FDG-PET in der Primärdiagnose des Prostatakarzinoms eine niedrige Sensitivität mit einer hohen Anzahl von falsch-negativen Befunden aufweist [Krause et al., 2007]. Effert et al. zeigten in einer klinischen Studie, dass zwischen der benignen Prostatahyperplasie und dem primären Prostatakarzinom mittels FDG-PET nicht zuverlässig unterschieden werden kann [Effert et al., 1996] Oyama et al. konnten die oben beschriebene, experimentell erfasste höhere FDG-Aufnahme bei aggressiveren Tumoren in einer klinischen Studie nachweisen. Hierbei zeigte sich eine höhere FDG-Aufnahme bei Tumoren mit einem höheren Gleason-Score [Oyama et al., 1999]. Während Krause et al. in ihrem Übersichtartikel der FDG-PET eine bessere Eignung zur Detektion des metastasierenden Prostatakarzinoms als zum Primärstaging einräumen [Krause et al., 2007], distanzieren sich Reske et al in ihrem Übersichtsartikel bezüglich der PET in der Rezidivdiagnostik des Prostatakarzinoms ganz eindeutig von FDG-PET beim Prostatakarzinom. Es wird festgestellt, dass für nahezu alle klinisch wichtigen Fragestellungen in der Rezidivdiagnostik des Prostatakarzinoms mit PET/CT das am häufigsten für die PET bei onkologischen Fragestellungen eingesetzte FDG nutzlos und nicht indiziert ist [Reske et al., Oktober 2006].

Die genannten Limitationen von [¹⁸F]FDG in der PET Diagnostik erforderten die Entwicklung neuer, geeigneterer Radiopharmaka zur Darstellung des Prostatakarzinoms. Klinisch getestet wurden [¹⁸F]Fluordihydrotestosteron (FDHT), [¹¹C]Acetat und radioaktiv markiertes Cholin.

Der Einsatz von [^{18}F]FDHT als Androgenrezeptorligand zur Darstellung hoch differenzierter Prostatakarzinome beschränkt sich mangels klinischer Erfahrung und Verfügbarkeit nur auf wenige Spezialeinrichtungen [Reske et al., Juni 2006]. Der am häufigsten in der PET-Prostatakarzinomdiagnostik verwendeten Tracer sind die mit ^{18}F - oder ^{11}C - radioaktiv markierten Cholinderivate, gefolgt von [^{11}C]Acetat.

[^{11}C]Acetat zeigt eine hohe Aufnahme in Tumorzellen [Yoshimoto et al., 2001], die durch Überexpression der Fettsäuresynthetase in Tumorzellen an eine erhöhte Lipidsynthese gekoppelt ist [Swinnen et al., 2003]. In klinischer Erprobung zeigte sich [^{11}C]Acetat als nicht zuverlässiger Tracer, um zwischen der benignen Prostatahyperplasie und dem Prostatakarzinom zu unterscheiden [Kato et al., 2002]. Diesbezüglich scheint [^{11}C]Acetat keine geeigneter Tracer für den sicheren Nachweis des primären Prostatakarzinoms zu sein [Krause et al., 2007]. Jedoch erweist sich [^{11}C]Acetat als nützlicher Tracer zum Nachweis eines Lokalrezidivs und zeigte in einer Rezidivdiagnostikstudie von Kotzerke et al. sehr ähnliche Ergebnisse wie [^{11}C]Cholin [Kotzerke et al., 2003].

Da ein Drittel aller Phospholipide in der menschlichen Zellmembran aus Phosphatidylcholin besteht, zeigen Tumorzellen einen erhöhten Cholinstoffwechsel. Den erhöhten Cholinstoffwechsel konnten Ramirez et al. durch eine erhöhte Aktivität der Cholin kinase in Patientenpräparaten und Zelllinien von Mamma-, Lungen-, Kolorektal- und Prostatakarzinomen nachweisen [Ramirez et al., 2002]. Mittels der MR-Spektroskopie zeigten sich in der Prostata von Karzinompatienten erhöhte Cholinkonzentrationen im Vergleich mit Patienten ohne Karzinome [Heerschap et al., 1997]. Mit dem Wissen über hohe Cholinkonzentrationen in Prostatakarzinomen, sowie einer geringen [^{11}C]Cholin Ausscheidung über die Harnwege führten Hara et al., die bisher [^{11}C]Cholin zur Hirntumordiagnostik eingesetzt hatten, 1998 die erste klinische Studie zur Darstellung des Prostatakarzinoms mittels [^{11}C]Cholin-PET durch. Im Vergleich mit [^{18}F]FDG konnten lokale Metastasen in der [^{11}C]Cholin-PET aufgrund von höheren Uptakraten und fehlender Hintergrundaktivität im kleinen Becken besser detektiert werden [Hara et al., 1998]. Die kurze Halbwertszeit von ^{11}C (20min) limitiert den Einsatz dieses Tracers nur auf Kliniken mit einem Zyklotron und einer Radiochemie [Krause et al., 2007]. Um radioaktive Cholinderivate auch in Kliniken im Sinne des Satellitenkonzeptes einzusetzen, entwickelten DeGrado et al. [^{18}F]Flourmethylocholin (FCH) mit einer ^{18}F Halbwertszeit von 109,8 min [De Grado et al, 2001]. Price et al. verglichen in einer klinischen Studie die FCH-PET mit der FDG-PET an Prostatkarzinompatienten. Hierbei zeigte sich eine Überlegenheit von FCH gegenüber FDG. Zugleich erwähnen die

Autoren, dass die FCH-PET der [¹¹C]Cholin-PET entsprechende Aufnahmen liefert [Price et al., 2002].

Die PET-Diagnostik des primären Prostatakarzinoms mittels ¹¹C- und ¹⁸F- markierter Cholinderivate wurde in zahlreichen Studien mit uneinheitlichen Ergebnissen untersucht [Krause et al., 2011]. Die Cholin-PET Untersuchung zeigte bei Patienten mit diagnostiziertem Prostatakarzinom in initialen Studien eine sehr hohe Sensitivität von 100%. Yamagushi et al. konnten in 20/20, de Jong et al. in 25/25 Prostatakarzinompatienten mittels Cholin-PET den Tumor darstellen [Yamagushi et al., 2005] [de Jong et al., 2002]. Sutinen et al. diagnostizieren das Prostatakarzinom ebenfalls mit einer Sensitivität von 100%, allerdings zeigen sie zugleich, dass die benigne Prostatahyperplasie ebenfalls einen hohen [¹¹C]Cholin-Uptake aufweist [Sutinen et al., 2004]. Um weiter die Präzision der Cholin-PET Diagnostik zu klären, sind Daten über die Spezifität dieses Verfahrens nötig. Hierzu veröffentlichten Farsad et al. die erste Kolokalstationsanalyse, wobei die Tumorausbreitung im Prostataresektat mit der [¹¹C]Cholin-PET/CT verglichen wurde. Stufenschnitte von Prostatakarzinomresektaten wurden so angefertigt, dass für 6 Sextanten die Tumordinfiltration beurteilt werden konnte. Bei der Auswertung von 216 Sextanten von 36 Patienten zeigte sich für die [¹¹C]Cholin-PET/CT eine Sensitivität von 66% und eine Spezifität von 81%. Zugleich konnte gezeigt werden, dass andere Prostatapathologien wie die HG-PIN (high-grade prostate intraepithelial neoplasm) abnormal viel [¹¹C]Cholin aufnehmen. Die Autoren folgern, dass Cholin-PET/CT sich nicht für die Diagnose des primären Prostatakarzinoms eignet [Farsad et al., 2005]. Ebenfalls auf der Basis von histologischen Schnittpräparaten von 26 Patienten, zeigten Reske et al. eine Sensitivität von 81% und Spezifität von 87% der [¹¹C]Cholin-PET/CT und folgern daraus, dass die Darstellung der Karzinomausbreitung sowie die Abgrenzung von gutartigem Gewebe mittels [¹¹C]Cholin-PET/CT möglich ist [Reske et al., August 2006]. Anderer Meinung sind die Autoren zweier Studien, bei denen Giovaccini et al. bei 19 und Martorana et al. bei 43 Prostatektomiepatienten die Sextantenhistologie der Prostataresektate mit der [¹¹C]Cholin-PET/CT verglichen, um die Sensitivität und Spezifität dieses Verfahrens zur Tumordetektion zu ermitteln. Martorana et al. berichten von einer Sensitivität von 66% und einer Spezifität und 86% und stellen dabei fest, dass insbesondere kleine Tumoreläsionen unter 5 mm regelmäßig der [¹¹C]Cholin-PET/CT Diagnostik entgehen. Somit sehen die Autoren keinen Wert für dieses Verfahren zur Detektion der extraprostatatischen Tumorausdehnung [Martorana et al., 2006]. Ebenfalls distanzieren sich Giovacchini et al. von der Primärdiagnostik und vom lokalen Tumorstaging mittels [¹¹C]Cholin-PET/CT, nachdem sie in ihrer Studie eine Sensitivität von

72% und Spezifität und 43% ermittelt haben [Giovacchini et al., 2008]. Da die [¹¹C]Cholin-PET/CT Testgüte bisher nur an Prostatakarzinompatienten beschrieben wurde, veröffentlichten Scher et al. 2006 die erste klinische Studie, bei der auch Patienten eingeschlossen wurden bei denen die Diagnose Prostatakarzinom noch nicht gestellt wurde. 58 Patienten mit Verdacht auf ein Prostatakarzinom erhielten eine PET/CT oder PET Aufnahme mit [¹¹C]Cholin. Nach weiteren diagnostischen Maßnahmen (Biopsie) oder therapeutischen Maßnahmen (Prostataresektion) wurde die histologische Diagnose mit den Ergebnis der PET-Bildgebung verglichen. Bei 37 Patienten konnte die Diagnose Prostatakarzinom histologisch gesichert werden. Die PET/CT und PET zeigten dabei eine patientenbezogene Sensitivität und Spezifität von 86,5% und 61,9%. Die Autoren dieser Arbeit diskutieren als Grund für die geringe Spezifität eine hohe [¹¹C]Cholin-Aufnahme auch in benignen Läsionen. So zeigten sich in der Histologie der falsch positiven Patienten häufig benigne Läsionen wie die akute Prostatitis, chronische Prostatitis und die benigne Prostathyperplasie [Scher et al, 2006].

Verschiedene Autoren beschreiben eine erhöhte Cholin-Aufnahme in entzündliches Gewebe. Schmid et al. erwähnt in einer [¹⁸F]Cholin-PET Studie eine hohe Anreicherung von [¹⁸F]Cholin bei Patienten mit chronisch entzündlichen Pathologien wie Sarkoidose und chronisch venösen Unterschenkelulkus [Schmid et al., 2005]. In einer [¹⁸F]FDG und [¹¹C]Cholin vergleichenden PET/CT Studie zum Ovarialkarzinom wurde ein falsch positiver Befund für beide Tracer eindeutig auf eine bakterielle, inflammatorische Beckenerkrankung mit Escherichia Coli zurückgeführt [Toriuka et al., 2003]. Bei 126 Patienten verglichen Tian et al. den Einsatz von [¹⁸F]FDG und [¹¹C]Cholin an 130 benignen und malignen Tumoren verschiedenster Lokalisationen. Dabei zeigte sich eine hohe [¹¹C]Cholin-Aufnahme in Riesenzelltumore, Desmoidtumore, Fibrome, Neurofibrome, entzündliches Granulationsgewebe und pigmentierte villonoduläre Synovialitis. Die meisten dieser Läsionen zeigen Histiozyten oder Riesenzellen, die von Makrophagen/Monozyten abstammen [Tian et al., 2004]. Auch Wyss et al. stellten in der autoradiographischen Analyse experimenteller Rattenabszesse einen hohen [¹⁸F]Cholin-Uptake in Makrophagen-reichen Arealen fest [Wyss et al, 2004]. Dass die [¹¹C]Cholin-Uptake in entzündlichen Geweben erhöht ist und auch für diagnostische Zwecke eingesetzt werden kann, zeigten Roivainene et al. in einer klinischen Studie bei Patienten mit proliferativen Arthritis [Roivainene t al., 2003].

Um die Aufnahme von [¹¹C]Cholin in verschiedene Prostatapathologien wie Prostatitis, Prostatakarzinom und BPH untereinander sowie mit normalem Prostatagewebe zu vergleichen,

fürten Souvatzoglou et al. eine Studie an 43 Prostatektomiepatienten durch. Hierzu wurden 5 mm Schnittpräparate der 43 Prostataresektate in 12 Segmente unterteilt, so dass insgesamt 2526 Segmente auf die genannten Pathologien untersucht und der [¹¹C]Cholin-PET/CT Aufnahmen gegenübergestellt werden konnten. Zugleich wurde auch die Tumorkonfiguration (I, fokal; II, multifokal; III, rind-like shaped; IV size<5mm) in einem weiteren Segmentmodell analysiert. Hierbei entsprach bei 79% der Patienten (34/43) das Areal mit der höchsten [¹¹C]Cholin-Aufnahme einem tumorinfiltrierten Segment. Bei 7 der 9 Patienten, die eine maximale [¹¹C]Cholin-Aufnahme in nicht tumorinfiltrierten Segmenten zeigten, wurde die Tumorkonfiguration als Grad IV klassifiziert. Grad IV Tumore konnten somit signifikant schlechter erkannt werden als Grad I Tumore. In den 2526 analysierten Segmenten zeigte sich 454 mal normales Gewebe, 86 mal Prostatakarzinom, 1004 mal BPH und 95 mal Prostatitis. Die für diese Gewebe errechneten Uptakewerte wurden untereinander verglichen, wobei die BPH und das Prostatakarzinom signifikant höhere Uptakewerte als normales Prostatagewebe zeigten. Prostatakarzinomgewebe zeigt gegenüber BPH leicht höhere Uptakewerte, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Überraschenderweise lag der Uptake von Prostatitisgewebe im Bereich von normalem Prostatagewebe und deutlich, allerdings knapp nicht signifikant, unter dem Uptake vom Prostatakarzinom [Souvatzoglou et al, 2011]. Da das Prostatakarzinom nicht von der benignen Prostatahyperplasie mittels [¹¹C]Cholin-PET/CT unterschieden werden konnte, distanzieren sich die Autoren von dem Routineeinsatz dieses Verfahrens als first-line Screeningmethode bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Prostatakarzinom. Allerdings sehen sie eine mögliche Anwendung der [¹¹C]Cholin-PET/CT Diagnostik bei Hochrisiko-Prostatakarzinompatienten, bei denen multiple Biopsien negative Befunde zeigten [Souvatzoglou et al, 2011]. In seinem Übersichtsartikel zur Studienlage der Cholin-PET/CT Diagnostik beim primären Prostatakarzinom, sieht auch Krause (Koautor der oben erwähnten Studie von Souvatzoglou) nach der Auswertung von 17 Studien den Einsatz der Cholin-PET/CT zur Diagnostik des primären Prostatakarzinoms ebenfalls als nicht zu empfehlendes Verfahren [Krause et al, 2011].

Jedoch beschreibt Krause in gleichem Artikel die PET/CT Diagnostik mit radioaktiven Cholinderivaten als sensitives Verfahren zum Re-Staging von Patienten mit steigenden PSA Werten nach lokaler Therapie. Aus 19 Studien, die die PET/CT mit radioaktiven Cholinderivaten bei Patienten im Prostatakarzinomrezidiv evaluiert haben, beschreibt Krause bei insgesamt 1386 untersuchten Patienten eine mittlere Sensitivität und Spezifität von 70,7 und 65,3 und wertet die aktuelle Studienlage als viel versprechend. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Detektionsrate des Prostatakarzinomrezidivs mittels [¹¹C]Cholin-

PET/CT und PSA Wert [Krause et al, 2008]. Aber auch bei niedrigen PSA Werten, bei denen die Detektionsraten eher gering sind, sieht Krause die [¹¹C]Cholin-PET/CT Diagnostik als klinisch sinnvoll, da die exakte Lokalisierung des Rezidivs individuelle Therapiestrategien ermöglicht [Krause et al., 2011]. Zukünftig ist an weitere klinische wie wissenschaftliche Einsatzbereiche der Cholin-PET/CT zu denken, nachdem Giocacchini et al 2008 zeigen konnten, dass sich die [¹¹C]Cholin-PET/CT zum Therapiemonitoring der antiandrogenen Therapie mit Bicalutamide eignet [Giovacchini et al, 2008].

1.3 Entzündungszellen in Prostatapathologien

Für die teilweise sehr geringe Spezifität der Cholin-PET/CT Prostatakarzinomdiagnostik werden meist benigne Läsionen in der Prostata verantwortlich gemacht [Farsad et al., 2005] [Scher et al, 2006] [Souvatzoglou et al, 2011] Insbesondere entzündliche Prozesse zeigen eine erhöhte Cholin-Aufnahme und können dadurch falsch positive Befunde verursachen [Schmid et al., 2005] [Toriuka et al., 2003] [Tian et al., 2004]. In folgender Übersicht wird die entzündliche Komponente der verschiedenen Prostataläsionen dargestellt.

Als Gemeinsamkeit der malignen und benignen Prostatapathologien, zeigt sich häufig eine unterschiedlich stark ausgeprägte leukozytäre Komponente in den jeweiligen Pathologien. Die Prostatitis, als klassische leukozytäre Entzündung der Prostata, wird sogar als pathogenetischer Faktor für die Entstehung des Prostatakarzinoms diskutiert. Bastian et al. berichten in ihrem Übersichtsartikel zu Prostatitis und Prostatakarzinom über eine erhöhte Assoziation des Prostatakarzinoms zu sexuell übertragbaren Erkrankungen wie Syphilis und Gonorrhö und verweisen ebenfalls darauf, dass die Einnahme von antiinflammatorischen Substanzen wie Acetylsalicylsäure (ASS) negativ mit der Prostatakarzinominzidenz korreliert [Bastian et al., 2010]. Als Vorläuferläsion der High Grade –PIN (prostatistische intraepitheliale Läsion) und somit zum Prostatakarzinom, beschreiben de Marzo et al. 1999 erstmals die proliferative inflammatorische Atrophie (PIA). Hierbei handelt es sich um eine hoch proliferative Läsion, die mit einer Leukozyteninfiltration assoziiert ist und morphologische Ähnlichkeiten zur prostatistischen Atrophie aufweist. In unterschiedlich starkem Ausmaße zeigen die PIA-Läsionen ein leukozytäres Infiltrat aus 80-85% CD3+ T-Lymphozyten und vereinzelt CD20+ B-Lymphozyten sowie CD68+ Makrophagen. Die Autoren erwähnen, dass die Morphologie der PIA mit den von McNeal et al.(Postinflammatory Atrophy), Bennett et al. (chronic prostatitis) und

Blumenfeld et al. (lymphocytic prostatitis) beschriebenen Prostatapathologien übereinstimmt [De Marzo et al., 1999].

Bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) findet ebenfalls eine Leukozyteninfiltration in das hyperplastische Gewebe statt. Die verschiedenen morphologischen Ausprägungen der Leukozyteninfiltration wurden von Kohnen et al. im Jahre 1979 histologisch klassifiziert [Kohnen et al. 1979]. In 162 hyperplastischen Prostataresektaten wurde bei 98,1% eine Entzündungskomponente festgestellt. In einer weiteren histologischen Studie von Nickel et al. aus dem Jahr 1999 lag die Inzidenz einer Entzündung bei 80 BPH-Resektaten bei 100%. Kohnen et al. klassifizierten die Leukozyteninfiltration in 6 verschiedene Muster, während Nickel et al. 4 verschiedene Typen beschreiben. Tabelle 1 zeigt die 6 verschiedenen Infiltrationsmuster nach Kohnen et al.

Tabelle 1:

Entzündungsmuster in der Prostatahyperplasie nach Kohnen et al. mit der jeweiligen histologischen Morphologie, dem charakteristischen leukozytären Infiltrat, der Häufigkeit und der Infiltration. Die Häufigkeit beschreibt, in wieviel Prozent der 162 Resektate die Läsion vorliegt. Die Infiltration informiert über die Ausdehnung und beschreibt, wieviel Prozent der Resektatfläche von der Leukozyteninfiltration betroffen sind [modifiziert nach Kohnen et al., 1979].

Entzündungsmuster	Histologische Morphologie	Charakteristische Leukozyten	Häufigkeit in %	Infiltration in %
Glanduläre Entzündung	Dilatierter Gang mit Zellen im Lumen des Ganges	Im Lumen: Makrophagen, neutrophile Granulozyten Stroma: Lymphozyten, Plasmazellen	85,2	4,9
Periglanduläre Entzündung	Knotiger Fokus von Lymphozyten und Plasmazellen in der Nähe eines Ganges, keine Ganginfiltration	Lymphozyten, Plasmazellen	88,8	3,8
Diffuse Stroma Entzündung	Diffuse Infiltration mit ödematösen Stroma	Lymphozyten, Plasmazellen, selten neutrophile Granulozyten	77,2	2,5
Isolierte Stroma Lymphknoten	Noduläre Ansammlung von Lymphozyten	Lymphozyten, Plasmazellen	61,7	1,0
Akute nekrotisierende Entzündung	Abszesse mit Neutrophilen und Gewebsnekrosen	Neutrophile Granulozyten	3,7	2,9
Lokalisierte granulomatöse Entzündung	Noduläre granulomatöse Läsion	Makrophagen, Epitheloidzellen, Lymphozyten, Plasmazellen	3,7	0,8

Während Kohnen et al. mikroskopisch Felder auszählten, geschah dies bei Nickel et al. computergestützt an histologischen Schnittpräparaten, die mit Antikörpern gegen Leukozyten gefärbt wurden. Die 4 verschiedenen Infiltrationsmuster von Nickel et al. werden nach dem Schweregrad der Ausprägung weiter in drei Grade unterteilt und sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2:

Entzündungsmuster in der Prostathyperplasie nach Nickel et al. mit der histologischen Morphologie und dem charakteristischen leukozytären Infiltrat. Die Häufigkeit beschreibt, in wieviel Prozent der 80 BPH-Resektate die Läsion vorliegt. Grad 1 steht für eine milde leukozytäre Infiltration, während Grad 3 die ausgeprägte Infiltration beschreibt [modifiziert nach Nickel et al., 2000].

Muster	Morphologie	Leukozyten	Häufigkeit
Periglanduläre Entzündung	Infiltration um Drüsen	Lymphozyten	Grad1 – 100% Grad3 – 84%
Glanduläre Entzündung	Drüsen infiltrierend	Neutrophile, Makrophagen	Grad1 – 83% Grad3 – 64%
Stroma Entzündung	Stroma infiltrierend	Lymphozyten	Grad1 – 91% Grad3 – 57%
Periurethrale Entzündung	Um die Urethra, mit Ödembildung in Mukosa	Lymphozyten	Grad1 – 67% Grad3 – 34%

Im Vergleich zu den histologischen Untersuchungen von Kohnen et al. stellten Nickel et al. mit einer durchschnittlichen Leukozyteninfiltration von 1,1% eine geringere Entzündungsausbreitung bei seinen Patienten fest.

McClinton et al untersuchte 1990 immunhistochemisch 20 Prostatakarzinome und 20 BPH Resektate. Dabei wurden Antikörper gegen T-Lymphozyten (CD3+), T-Helferzellen(CD4+), zytotoxische T-Zellen (CD8+), B-Lymphozyten (CD22+), Monozyten/Makrophagen (CD11c+) verwendet. Bei der mikroskopischen Auswertung zeigte sich in beiden Pathologien ein ähnliches leukozytäres Infiltrat aus T-Lymphozyten (~65%), Makrophagen (~25%) und B-Lymphozyten (~9%) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3:

Prozentwerte der häufigsten Zelltypen des inflammatorischen Infiltrates in der benignen Prostatahyperplasie und im Prostatakarzinom (Mittelwerte \pm s. e. m.) [modifiziert nach McClinton et al., 1990]

	T-Lymphozyten (CD3+)	B-Lymphozyten (CD22+)	Makrophagen (CD11a+)
BPH	69 \pm 2	9 \pm 2	23 \pm 1
Prostatakarzinom	63 \pm 2	9 \pm 2	27 \pm 1

In beiden Pathologien wurde ein ähnlicher Quotient von CD4+/CD8+ Zellen gefunden, der bei der Hyperplasie bei 0,9 und beim Karzinom bei 1,0 lag [McClinton et al. 1990].

Sehr ausführlich charakterisierten Theyer et al. die Leukozyten in BPH-Gewebe. Zunächst beschreiben Theyer et al. immunhistologisch gefärbte BPH Schnittpräparate und können dabei zeigen, dass unter den CD45 positiven Zellen (Leukozyten) die CD3+ Zelle (T-Lymphozyt) der häufigste Zelltyp ist. Eine weitere Charakterisierung der Leukozyten in der BPH erfolgte mittels Durchflusszytometer. Dazu wurde Prostatahyperplasiegewebe durch Kollagenasen aufgelöst, Partikel mit Nylonwolle abfiltriert und die übrig gebliebenen Zellen mit einem Dichtegradienten abzentrifugiert. Die Zellen wurden nach einer Antikörperfärbung flusszytometrisch charakterisiert. Von den CD45+ Leukozyten waren 70 bis 80% CD3+ (T-Lymphozyten) und 10% CD20+ (B-Lymphozyten). Von den CD3+ Zellen wurden wiederum 60% als CD4+ T-Helferzellen und 30% als CD8+ zytotoxische T-Zellen erkannt. Im Vergleich mit T-Lymphozyten, die aus dem Blut der Patienten isoliert wurden, zeigten die aus dem benignen Prostatahyperplasiegewebe gewonnenen T-Lymphozyten eine erhöhte Expression der T-Zell Aktivierungsmarker Interleukin-2-Rezeptor und des HLA-DR Moleküls [Theyer et al., 1992].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in allen Prostatapathologien T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen beschrieben wurden. Während Makrophagen mit über 20% im Prostatakarzinom und der BPH beschrieben wurden [McClinton et al., 1990], werden diese bei PIA Läsionen nur vereinzelt gefunden [De Marzo et al., 1999]. Der häufigste Zelltyp in allen Pathologien waren T-Lymphozyten. Granulozyten wurden in den genannten chronischen Prostatapathologien nicht beschrieben, sind jedoch an akut inflammatorischen Prozessen der Prostata beteiligt [Kohnen et al 1979].

1.4 Zielsetzung

Da sowohl das Prostatakarzinom als auch die benignen Prostataläsionen eine erhöhte [^{11}C]Cholin-Aufnahme zeigen, ist die Spezifität der Prostatakarzinom-Diagnostik mit [^{11}C]Cholin-PET/CT eingeschränkt. Die in allen Prostatapathologien in unterschiedlicher Ausprägung vorkommenden leukozytären Infiltrate aus T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten müssen als Ursache für die erhöhte [^{11}C]Cholin-Aufnahme in Betracht gezogen werden. Um mittels PET zwischen Tumor und Entzündung zu differenzieren, benötigt man Tracer mit einer hohen Tumorzellselektivität.

Ziel dieser Arbeit war es in einer in vitro Studie zu klären, inwiefern die in den Prostatapathologien vorkommenden Entzündungszellen im Vergleich zu den Prostatakarzinomzellen zum [^{11}C]Cholin- und [^{18}F]FDG-Uptake beitragen. In dieser Arbeit sollte auch die Tumorzellselektivität von [^{18}F]FDG und dem zu [^{11}C]Cholin strukturhomologen [^3H]Cholin untereinander verglichen werden. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob der [^3H]Cholin- und [^{18}F]FDG-Uptake in Leukozyten stimulierbar ist und inwiefern die Proliferation der Prostatakarzinomzelllinien das Tracer-Uptakeverhalten beeinflusst.

Hierzu wurden aus menschlichen Buffycoats mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen isoliert, aus deren Kultivierung Makrophagen gezüchtet wurden. Um Lymphozyten und Granulozyten in möglichst großer Reinheit zu gewinnen und um die B- und T-Lymphozyten einzeln zu isolieren, sollte das durch die Dichtegradientenzentrifugation erhaltene Zellioslat mittels FACS (fluorescent activated cell sorting) sortiert werden. Die Stimulation der Leukozyten erfolgt mit Lipopolysaccharid und Concanavalin A.

Um die Uptakeversuche mit [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin zur gleichen Zeit an denselben Zellen durchzuführen, wurde ein Tracer-Uptakemodell entwickelt, das die gleichzeitige Applikation der Tracer erlaubt. In diesem Traceruptakemodell sollte der [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin Uptake von den stimulierten und unstimulierten Leukozyten sowie den proliferierenden und nicht proliferierenden LNCaP- und PC-3- Prostatakarzinomzellen bestimmt werden.

2 Material

2.1 Zellen

Prostatakarzinomzellen

LNCaP Forschungslabor der Urologischen Klinik und Polklinik der
PC-3 Technischen Universität München

Leukozyten:

 Buffy-Coat Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Wiesentheid

2.2 Kulturmedium

LNCaP Kulturmedium: RPMI 1640
 + 10% fetales Kälberserum (FKS)
 + 1% Penicillin 10 000 U/ml / Streptomycin 10 000 µg/ml
 + 1% NEAS
 + 1% Natriumpyruvat

PC-3 Kulturmedium: RPMI 1640
 + 10% fetales Kälberserum (FKS)
 + 1% Penicillin 10 000 U/ml / Streptomycin 10 000 µg/ml
 + 1% NEAS

Leukozytenmedium: RPMI 1640
 + 10% fetales Kälberserum (FKS)
 + 1% Penicillin 10 000 U/ml / Streptomycin 10 000 µg/ml

2.3 Versuchsmedium

NaCl	140 mM
Glukose	5 mM
KCl	5,4 mM
MgSO ₄	0,8 mM
TRIS	25 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,8 mM

... gelöst in destilliertem Wasser, pH-Wert auf 7,4 eingestellt

2.4 Stimulantien

Concanavalin A (ConA) ICN, 194069, Eschwege

Lipopolysaccharide (LPS) from E. Coli Sigma, Steinheim, L-2630
Serotyp 0111:B4

2.5 Dichtegradientenzellisolation

Histopaque®-1077 (Dichte 1,077 g/ml)	Sigma, Steinheim	1077-1
Histopaque®-1119 (Dichte 1,119 g/ml)	Sigma, Steinheim	1119-1
Dulbecco's PBS, 10x	Gibco, Karlsruhe	14080-048
Trypan-Blau 0,4%	Sigma	T8154

2.6 FACS Zellisolation

Antikörper:

Antikörper: Anti-CD3-APC (IM2467)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Antikörper: Anti-CD19-PE (A07769)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Antikörper: Anti-CD15-Pacific Blue (A74775)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
FACS Puffer: BD FACS Flow Sheath Fluid	Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Belgium, (Cat. No: 342003)
Zellfilter: Filcon, Sterile, Syringe-Type	Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Belgium, (Cat. No: 340598)

2.7 Chemikalien

Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
BSA-Proteinstandard	Bio-Rad, München, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
D-Glukose	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO Freeze Medium)	Bio Veris Corporation, Gaithersburg, USA
Dulbecco's PBS, w/o Ca^{2+} , Mg^{+}	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fetales bovines Serum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 1M	Riedel de Hën, Seelze, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 3M	Apotheke des MRI, München, Deutschland
NEAS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml, 10 000 $\mu\text{g/ml}$)	Biochrom, Berlin, Deutschland
PRMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Bio-Rad, München, Deutschland
Szintillationscocktail (Lumasafe Plus)	LUMAC LSC B.B., Groningen, Niederlande
Tris, Tizma®base	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%)	Biochrom, Berlin, Deutschland

2.8 Radioaktive Substanzen

[Methyl- ^3H]Cholinchlorid	Amersham Bioscience Europe, Freiburg
[^{18}F]FDG	Nuklearmedizinische Klinik, Technische Universität München
[^{11}C]Cholin	Nuklearmedizinische Klinik, Technische Universität München

2.9 Geräte

Absaugpumpe Eppendorf 4151	Eppendorf, Hamburg
Analysewaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Beta-Counter Win spectral 1414	Wallac, Turku, Finland
Brutschrank	Heraeus, Berlin
FACS Gerät: MoFlo Legacy	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Gamma-Counter 1480 Wizard 3''	Wallac, Finland
Kamera Minolta X-300 S	Minolta, Osaka, Japan
Laminair Heraeus HB2472	Heraeus, Berlin, Deutschland
Mikroskop, Axiovert 10	Zeiss, Göttingen
Milli-Q UF Plus	Millipore S. A. Mosheim
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co, Lauda-Königshofen, Deutschland
pH-Meter, pH 522	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetus®-akku	Hischmann, Laborgeräte
Stickstoffbehälter ARPEGE 70	Air Liqueide, Düsseldorf, Deutschland
Vortex-Genie	Scientific Industries INC, Springfield MA, USA
UV/VIS Spektrometer Uvikon 931	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1,0 R	Heraeus, Berlin, Deutschland

2.10 Gebrauchsmaterialien

1 ml Spritzen Omnifix-F	Braun, Melsungen, Deutschland
24er Well Platten	Greiner, Solingen, Deutschland
Einmalkürvetten (1,5ml) Halbmikro	Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf-Pipettenspitzen (1-10, 10-100, 100-1000 µl)	Gilson, Villier Le Bel, Frankreich
Nunc Cryo Tubes (1,8 ml)	Nunc Inter Med, Roskilde, Dänemark
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland
Safe-Lock-Eppendorfcups (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterile Messpipetten (2,5; 5; 10; 25 ml)	Falcon, Becton Dickinson, USA
Szintillationsgefäß (20ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Filter (25, 75, 175 cm ²)	Greiner, Solingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Corning, Bodenheim, Deutschland

2.11 Software

Adobe® Photoshop® elements 6.0	San Jose, Kalifornien, USA
IBM® SPSS® Statistics Version 19	Ehningen, Deutschland
Microsoft® Office 2003	Unterschleißheim, Deutschland

3 Methodik

3.1 Eingesetzte Prostatakarzinomzelllinien

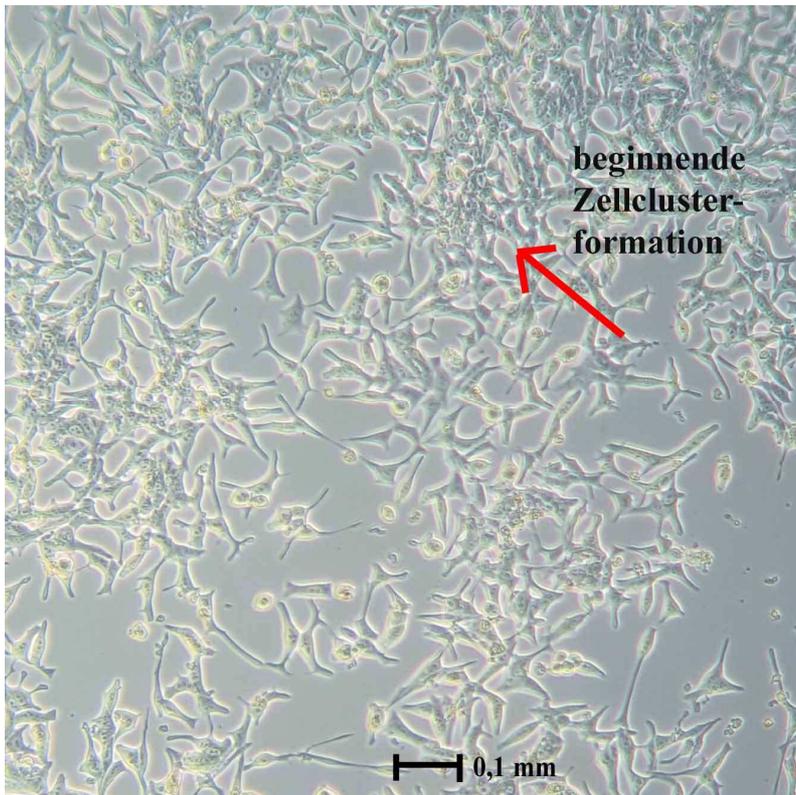
Die Zelllinien LNCaP und PC-3 an denen die Versuche durchgeführt wurden sind die am häufigsten in der Forschung verwendeten Prostatakarzinomzelllinien. Die LNCaP Zellen entstammen einer Biopsie einer Lymphknotenmetastase eines 50 Jährigen Mannes [Horoszewicz et al., 1980]. Die Zellen exprimieren Androgen- und Östrogenrezeptoren. Durch Dihydrotestosteron in physiologischen Konzentrationen ist die PSA mRNA Produktion induzierbar. Die Verdopplungszeit von LNCap Zellen beträgt ungefähr 60 Stunden [Sobel et al., 2005].

PC-3 Zellen wurden erstmal 1979 beschrieben und entstammen einer Wirbelsäulenmetastase eines 62 Jährigen Mannes [Kaighn et al., 1979]. Die Zellen entsprechen undifferenzierter Tumorzellen mit einem Androgen und Wachstumsfaktoren unabhängigen Zellwachstum. Demnach wachsen PC-3 Zellen auch in weiblichen Nacktmäusen. Da die PC-3 Zellen nicht auf die geringen Androgenmengen in FKS angewiesen sind, zeigen sie im Vergleich zu LNCaP Zellen ein von der FKS Konzentration unabhängigeres Wachstum. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 33 Stunden [Sobel et al., 2005].

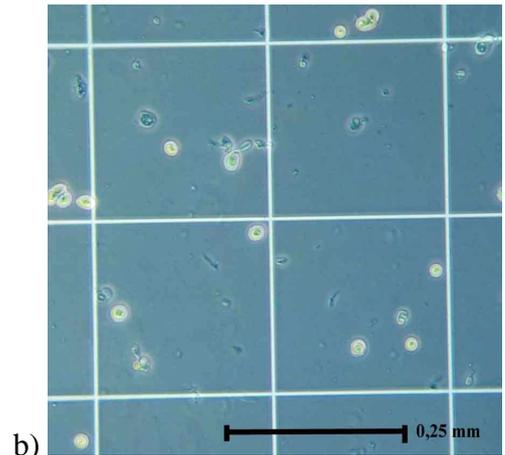
3.1.1 Anzucht der Zellen im Kulturmedium

LNCaP und PC-3 Zellen wachsen adhärent am Flaschenboden und wurden in 25 ml der jeweiligen Kulturmedien (siehe Material 2.2) in 175 cm² Flaschen angezüchtet.

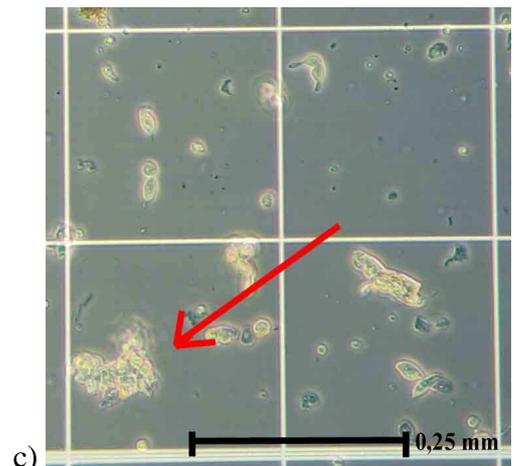
LNCaP Zellen wachsen nur locker am Flaschenboden und können sich durch einfaches Schütteln oder Klopfen aus ihrem Zellverbund lösen. In hoher Dichte wachsen die Zellen als Cluster (siehe Abb. 1a) und sind dann nur schwer resuspendierbar. Wie man unter der Neubauer Zählkammer nachvollziehen kann, machen die unresuspendierten Cluster Zellzählungen unmöglich (siehe Abb. 1 c). Deswegen ist insbesondere bei der Anzucht von LNCaP Zellen darauf achten, dass die Zellen nicht zu dicht wachsen und sich nur wenige Cluster ausbilden.



a)



b)



c)

Abbildung 1:

a) Nativaufnahme von LNCaP Zellen in der Zellkulturflasche. Die Zellen sind noch nicht zu dicht gewachsen, sodass man nur ansatzweise eine Zellclusterformation erkennt (roter Pfeil). b) Resuspendierte, nicht zu dicht gewachsene LNCaP Zellen unter der Neubauer Zählkammer. Die Zellen zeigen keine Clusterung und lassen sich deswegen gut einzeln zählen. c) Dichtgewachsene LNCaP Zellen, die nach dem Resuspendieren unter der Neubauerzählkammer eine Clusterung zeigen (roter Pfeil). Eine Zellzählung ist hierbei nicht möglich.

Die PC-3 Zellen wachsen flächendeckend und konfluierend und bildeten eine monozelluläre Schicht (siehe Abb. 2 a). Unresuspendierbare Clusterbildung wie bei den LNCaP Zellen wurde nicht beobachtet. Dementsprechend konnten die Zellen in der Neubauerzählkammer stets gut gezählt werden (siehe Abb. 2 b).

Die Zellkulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37° unter 5% CO₂- Begasung und 100% Wasserdampfsättigung aufbewahrt. Mediumwechsel erfolgte je nach Bedarf, indem das jeweilige Kulturmedium der adhären wachsenden Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und 25 ml neues Kulturmedium zugegeben wurde. Vor Zugabe des neuen Kulturmediums wurden die adhären Tumorzellen durch vorsichtige Spülung mit 10 ml PBS

von Detritus etc. befreit und PBS wieder abgesaugt. Die Zellen wurden durchschnittlich 7- 10 Tage in Kultur gehalten, ehe sie passagiert wurden.

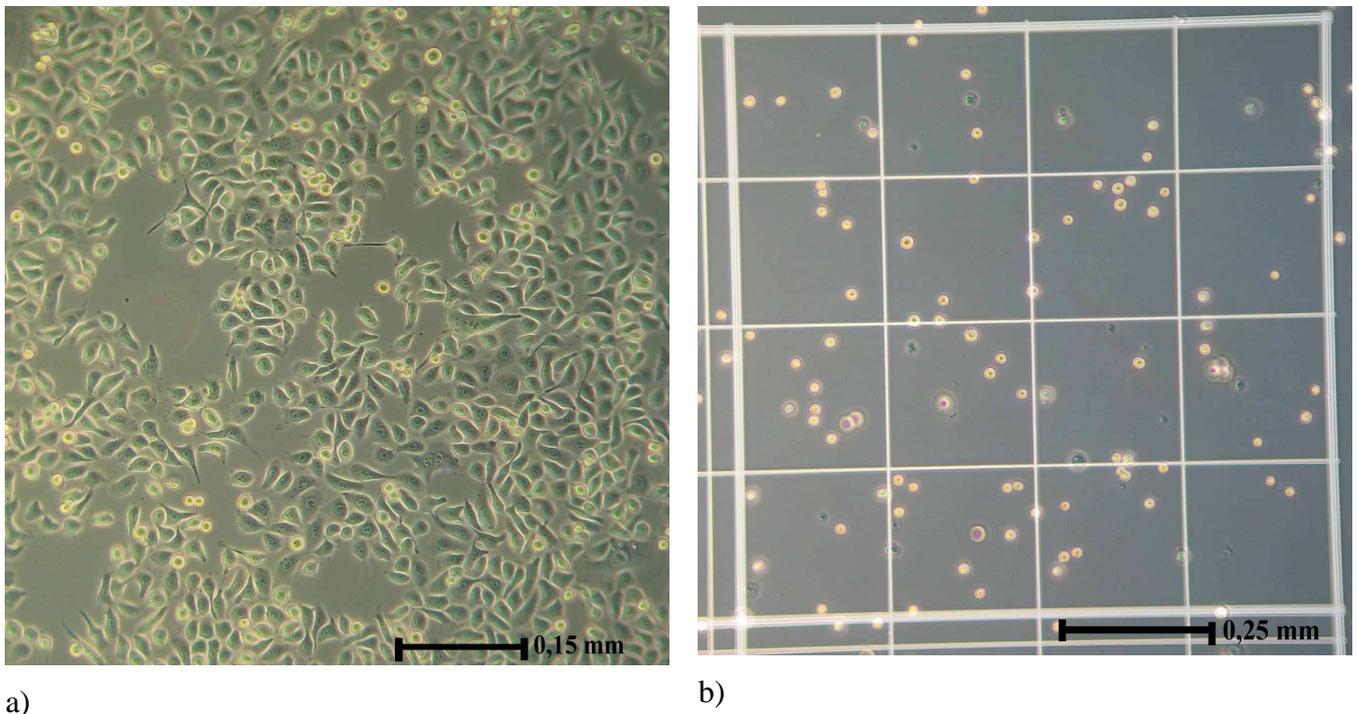


Abbildung 2

a) Nativaufnahme von PC-3 Zellen in der Zellkulturflasche b) Abgelöste PC-3 Zellen unter der Neubauerzählkammer. Da es zu keiner Zellclusterung kommt, kann man die Zellzahl gut bestimmen.

3.1.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden passagiert, sobald sie zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen waren, jedoch noch keine Zellclusterung stattgefunden hatte. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit 10 ml PBS gespült, um Zelltrümmer und Mediumreste zu entfernen. Das PBS wurde vollständig mit einer Pasterpipette entfernt, bevor 5 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Kulturflaschen in den Brutschrank gestellt, um den Ablösevorgang zu beschleunigen (LNCaP Zellen 5 min und PC3 Zellen 10 min). Zudem half insbesondere bei den PC3 Zellen Beklopfen der Kulturflasche, die Zellen vom Flaschenboden abzutrennen. Nachdem gegen das Licht sorgfältig die Ablösung der Zellen kontrolliert worden war, wurden 15 ml PBS zu den Zellen pipettiert und die Kulturflasche mehrfach damit gespült. Schließlich wurde die gesamte Zell-PBS-Suspension in die Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach diesem Schritt konnte bei Bedarf eine Zellzahlbestimmung durchgeführt werden. Nach dem Zentrifugieren

(1500 U/min, 3min) wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet in 6 ml des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert. In neuen Kulturflaschen wurde 1 ml der Zellsuspension auf 25 ml vorgelegtes Kulturmedium überführt, so dass aus einer Passage bei Bedarf 6 neue Passagen entstehen können.

Sollten LNCaP sowie PC3 Zellen auf 24 Multiwellplatten angezüchtet werden, wurden 10^6 Zellen in 1 ml des jeweiligen Kulturmediums pro Well ausgesät. Nach 3 – 4 Tagen befanden sich die PC-3 Zellen in einem adhärent wachsenden Proliferationsstadium, so dass Versuche an diesen Zellen durchgeführt werden konnten. Bei den LNCaP Zellen dauerte es 7 Tage, wobei Mediumswechsel durch Absaugen des alten Mediums und vorsichtiges Zugabe von 1 ml neuen Medium erfolgte.

3.1.3 Einfrieren der Zellen

Wie in 3.1.2 beschrieben, wurde nach dem Ablösen und Abzentrifugieren der Zellen der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in vorgewärmtem DMSO Freeze Medium ($17^\circ - 25^\circ\text{C}$) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt, wobei jedes Kryoröhrchen ca. 5×10^6 Zellen pro ml DMSO enthalten sollte. Die Zellen verweilten 5 – 10 min bei Zimmertemperatur im Freeze Medium und wurden dann für 12 – 24 h bei -70°C eingefroren, ehe sie zuletzt in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

3.1.4 Auftauen der Zellen

Die Tumorzellen lagerten zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff in 1,8 ml Kryoröhrchen. Diese Röhrchen wurden zum Auftauen in ein Wasserbad gestellt. Nachdem sich die gefrorene Zellsuspension von der Gefäßwand gelöst hatte, wurde der Inhalt in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, in denen sich 15 ml Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie befanden. Anschließend erfolgte eine Abzentrifugation der Zellen mit 1500 U/min für 3 min. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in mit 25 ml Kulturmedium gefüllte Kulturflaschen pipettiert.

3.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte ausschließlich mit der Neubauer Zählkammer. Auf die Zellisolate bezogen bietet die Neubauer Zählkammer entscheidende Vorteile gegenüber der automatischen Zellzählung mittels Durchflusszytometrie. So ist es uns mittels Neubauer Zählkammer möglich bei der LNCaP-Zellpassage unresuspendierte Zellkluster zu erkennen (siehe 3.1.1), während zugleich bei der Leukozytenisolation die Thrombozytenelimination nachvollzogen werden kann (siehe 3.2.1.1). Darüber hinaus besteht bei der Neubauerzählkammer jederzeit die Möglichkeit eine Vitalitätsprüfung mit Trypanblau durchzuführen. Hierzu werden 100 µl der zu untersuchenden Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit 100 µl Trypanblau in einem Eppendorfcup gemischt. Anschließend wird dieses Gemisch unter dem Mikroskop in der Neubauer Zählkammer betrachtet. Eine avitale Zelle färbt sich aufgrund der Membrandefekte blau.

3.2 Leukozytenisolation

3.2.1 Dichtegradientenisolation

Zur Isolierung von mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) und Granulozyten können sowohl Vollblut, als auch Buffy-Coats verwendet werden. Ein Buffy Coat enthält die Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Blutplasma, die sich nach Sedimentation oder Zentrifugation von gerinnungsgehemmten Vollblut einstellt. Der Buffy Coat entsteht somit als Nebenprodukt bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmaprodukten und besteht hauptsächlich aus Leukozyten und Blutplättchen.

Für eine bessere Darstellung der einzelnen Schichten nach der Dichtegradientenzentrifugation wird eine 1:1 Verdünnung von Vollblut mit PBS empfohlen. Da die Buffy-Coats in unterschiedlichen Zell-Konzentrationen und variabler Verunreinigung durch Erythrozyten geliefert wurden, ist es bei den Buffy-Coats nicht möglich, ein festes Verdünnungsverhältnis anzugeben. Es hat sich jedoch bewährt, dunkelrote Buffycoats im Verhältnis 1:1 oder auch 2:1 mit PBS zu verdünnen.

Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgte mit einem einzelnen Dichtegradienten, während die Isolation von Granulozyten zwei Dichtegradienten erforderte. Die zwei Isolationstechniken werden im Folgenden beschrieben.

Um die Reinheit der durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen zu überprüfen war es möglich in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum Rechts der Isar, mittels Durchflusszytometrie große Blutbilder der isolierten mononukleären Zellen und Granulozyten anzufertigen.

3.2.1.1 Isolation mit einem Dichtegradienten

Mononukleäre Zellen wurden durch Zentrifugation mit einem einzelnen Dichtegradienten (Biocoll; Dichte: 1,077 g/ml) gewonnen. Dazu wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen 12,5 ml Biocoll vorgelegt und vorsichtig mit dem Blut/PBS-Gemisch überschichtet, bis das Zentrifugenröhrchen auf 50 ml gefüllt war. Nun wurde bei 2200U/min, 20° und ausgeschalteter Zentrifugenbremse 30 min zentrifugiert.

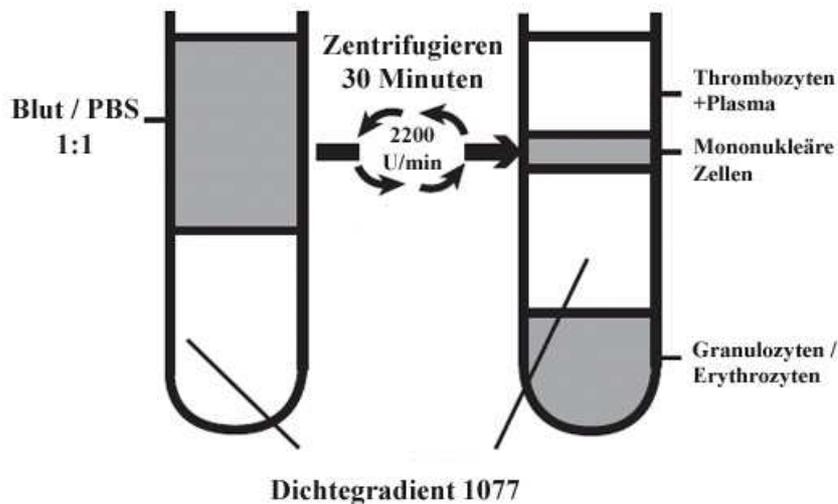


Abbildung 3:

Schichtung der Zelllayer. Links vor und rechts nach Dichtegradientenzentrifugation bei **einem** Gradienten. Nach der Zentrifugation befinden sich in der obersten Schicht die Thrombozyten, darunter die mononukleäre Zellwolke gefolgt vom Dichtegradienten. Die letzte Schicht besteht aus Granulozyten und Erythrozyten.

[Modifizierte Graphik nach Sigma-Aldrich, Histopaque®-1077 Fachinformation]

Mit einer feinen Glaspipette mit Gummisaugbalg wurde vorsichtig aus der weißen mononukleären Zellschicht (siehe Abb. 3) die Zellwolke abgesaugt und in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. In der abgesaugten mononukleären Zellschicht befinden sich noch sehr viele Thrombozyten (siehe Abb. 4 a), die durch weitere Waschschriffe entfernt werden konnten (siehe Abb. 4 b). Dazu wurde das Zentrifugenröhrchen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Der milchig graue Überstand mit den Thrombozyten wurde abgesaugt und der Waschvorgang wurde mit 5 min Zentrifugation bei 1300 U/min solange wiederholt, bis ein klarer Überstand abgesaugt werden konnte. Dies war meist nach 3-maligem Waschen möglich. Unter der Neubauer Zählkammer kann man die Thrombozytenelimination nachvollziehen (siehe Abb. 4).

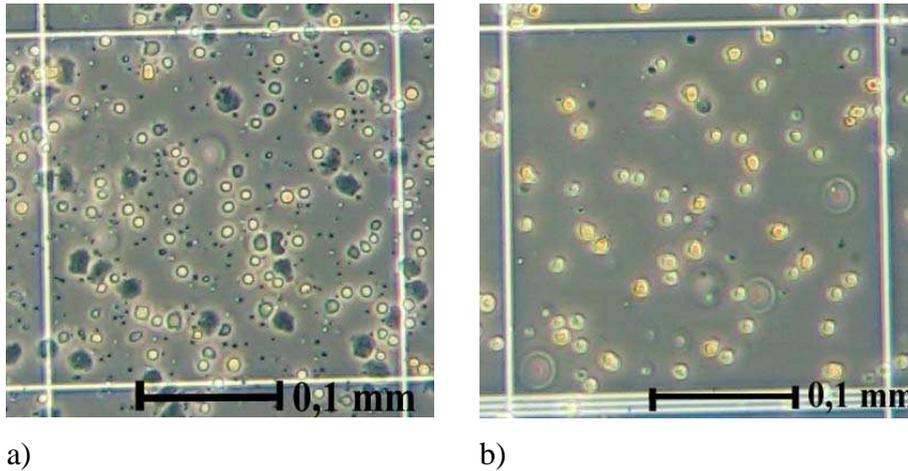


Abbildung 4:

Mononukleäres Zellisolat unter der Neubauer Zählkammer vor a) und nach b) dem Waschvorgang. Vor den Waschschritten a) sieht man im Zellisolat viele kleine dunkle Punkte zwischen den Zellen, die Thrombozyten entsprechen. Nach dreimaligem Waschen b) sind diese dunklen Punkte nicht mehr zu sehen. Die Thrombozyten wurden eliminiert.

Monozyten und Lymphozyten lassen sich durch ihr Wachstumsverhalten in Kulturflaschen auftrennen. Dazu wurde das mononukleäre Zellisolat (mind. 100 Millionen Zellen) in ca. 25 ml Kulturmedium (RPMI 1640, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und in großen Kulturflaschen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37° und 5% CO₂ setzen sich die adhären wachsenden Monozyten am Flaschenboden ab. Die im Medium schwimmenden Lymphozyten wurden durch Absaugen entfernt. Die adhären Monozyten wurden mit neuem Kulturmedium versetzt, das alle 4 Tage gewechselt wurde. Zur Umwandlung der Monozyten in Makrophagen wurden die Zellen 2 Wochen in Leukozytenmedium inkubiert.

Für die Gewinnung von Makrophagen auf 24 Well-Platten wurden pro Well $2 \cdot 10^6$ mononukleäre Zellen in 1 ml Kulturmedium ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert.

3.2.1.2 Isolation mit zwei Dichtegradienten

Die Gewinnung von Granulozyten erfolgt mit zwei Gradienten unterschiedlicher Dichte. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde 12,5 ml des Dichtegradienten 1119 vorgelegt (Hisopaque; Dichte 1,119 g/ml). Vorsichtig wurde dieser Dichtegradient mit Biocoll Gradienten 1077

überschichtet (Biocoll; Dichte 1,077). Bei erfolgreicher Überschichtung erhält man eine diskontinuierliche Grenzschicht zwischen den beiden Gradienten, die man durch optische Lichtbrechung an der Grenzschicht nachvollziehen kann. Über die zwei Gradienten wurde nun vorsichtig das Blut/PBS Gemisch aufgetragen. Nach 30 min Zentrifugation bei 2200U/min und ausgeschalteter Zentrifugenbremse stellen sich die Schichten wie in Abb. 5 dar.

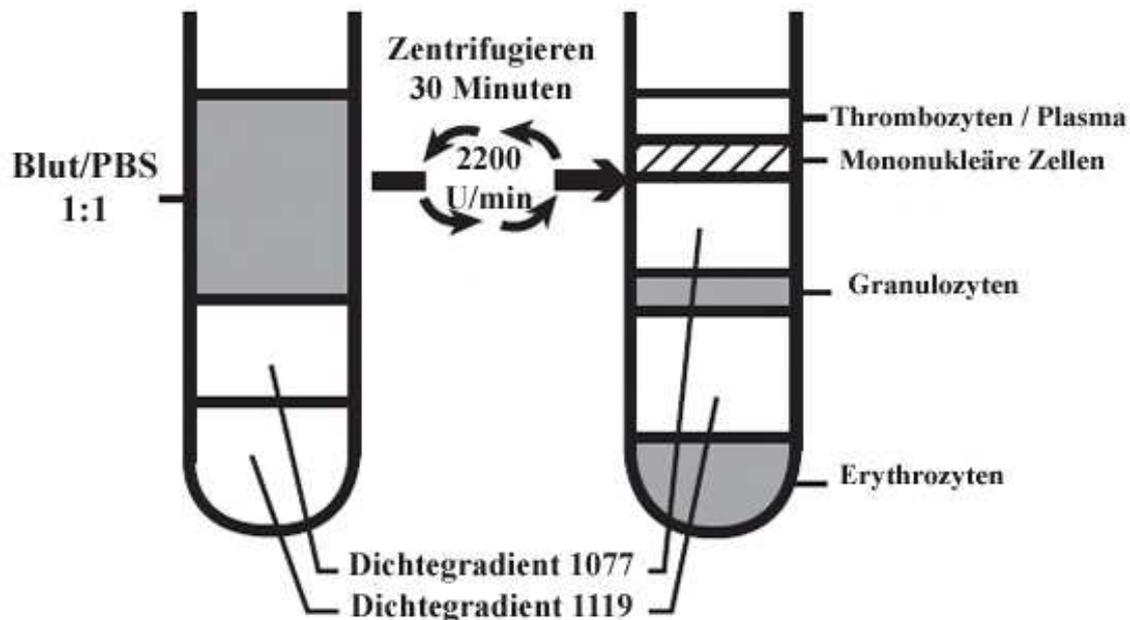


Abbildung 5:

Schichtung der Zellschichten. Links die Schichtung vor und rechts nach Dichtegradientenzentrifugation bei **zwei** Gradienten. Nach der Zentrifugation befinden sich in der obersten Schicht die Thrombozyten, darunter die mononukleäre Zellwolke. Die Granulozytenwolke liegt zwischen den klaren Schichten der Dichtegradienten 1077 und 1119. Die letzte Schicht besteht aus Erythrozyten.

Wie bei der Zellisolation mit einem Gradienten wurden zunächst die mononukleären Zellen mit einer feinen Glaspipette mit Gummisaugball abgeerntet und durch oben beschriebene Waschschriffe von Thrombozyten befreit. Die Schicht der Granulozyten wurde ebenfalls mit einer feinen Glaspipette abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Im Gegensatz zu der mononukleären Zellschicht, die mit Thrombozyten verunreinigt ist findet man in der granulozytären Zellschicht viele Erythrozyten. Diese Erythrozyten wurden durch eine hypotone Erythrolyse eliminiert. Um den mit den Zellen abpipettierten Dichtegradienten zu zerstören, wurde das Granulozytenisolat mindestens 4-fach verdünnt. Nach 10 min Zentrifugation bei 1300 U/min wurde das Zellpellet in 0,5 ml PBS resuspendiert. Die hypotone Erythrolyse erfolgte mit 20 ml destilliertem H₂O, das auf die Zellsuspension gegossen wurde.

Zwei Sekunden später wurde die Lyse durch 20 ml doppelt konzentriertes PBS abgestoppt. Um die 2 Sekunden einzuhalten, empfiehlt es sich 20 ml zweifach konzentriertes PBS und 20 ml H₂O vorzubereiten. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit einfach konzentriertem PBS auf 50 ml aufgefüllt und anschließend 5 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Falls das Pellet nach dem Zentrifugieren immer noch rot, also durch Erythrozyten verunreinigt ist, kann der Schritt der hypotonen Erythrolyse wiederholt werden, jedoch kommt es dann gehäuft zu einer unresuspendierbaren Verklumpung von Zellen. Durch einen Zellfilter kann man diese Verklumpungen jedoch problemlos abfiltrieren.

3.2.2 FACS Zellisolation

Die Dichtegradientenzellisolation ermöglichte uns leider nicht, Lymphozyten und Granulozyten in der gewünschten Reinheit zu isolieren (siehe 4.1.1). Auch erlaubt sie keine Unterscheidung zwischen B- und T-Lymphozyten. In Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, konnten wir jedoch unsere Zellisolation mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) durchführen.

Bei diesem Verfahren können Leukozyten entsprechend ihrer Größe, Morphologie und der CD (Cluster of Differentiation) Oberflächenmoleküle unterschieden und anschließend sortiert werden. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Granulozyten mit ihren charakteristischen Oberflächenmolekülen CD3, CD19 und CD15 werden hierzu vor der Zellsortierung mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen diese Oberflächenmoleküle markiert. Fluorochrome absorbieren das Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren wieder einen Teil als längerwelliges Fluoreszenzlicht. Farbe und Intensität ist von dem jeweiligen an den Antikörper gekoppelten Fluorochrom abhängig. Die verwendeten Anti-CD3, Anti-CD19 und Anti-CD15-Antikörper sind an die Fluorochrome APC, PE und Pacific Blue gekoppelt. Nach Bindung der Fluorochrom-Antikörper an die jeweiligen CD Oberflächenmolekülen ist es möglich, für jede einzelne Zelle in einem Durchflusszytometer nach Laserlichtbestrahlung die Emission der für die Fluorochrome APC, PE und Pacific Blue charakteristische Wellenlänge zu bestimmen. Somit werden die CD3, CD19 oder CD15 Oberflächenmoleküle erkannt, und jede einzelne Zelle kann nun den T-Lymphozyten, B-Lymphozyten oder Granulozyten zugeordnet werden.

Ein Durchflusszytometer mit Sortfunktion besteht im Wesentlichen aus einer Nozzleinheit (Ausgießer), einer optischen Einheit und einer Sortiereinheit (siehe Abb. 6 a). Stark vereinfacht sollen im Folgenden diese Komponenten erklärt werden.

Die Nozzle Einheit (siehe Abb. 6 und Abb. 7) hat zwei Aufgaben. Einerseits wird hier ein feiner Strahl mit Sampleprobe generiert, der in einzelne Tropfen mit jeweils einer Zelle zerbricht. Andererseits wird durch eine Spannungsquelle, die an der elektrisch leitenden Sheath Fluid (siehe Abb. 7) angelegt ist, den entstehenden Tropfen eine elektrische Ladung übertragen. In der optischen Einheit treten die Zellen durch einen oder mehrere Laserstrahlen, die je nach Fluorochromantikörper entsprechend gewählt werden, um die Fluorochrome optimal zur Lichtemission anzuregen. Die Lichtstreuung wird von Detektoren in axialer Richtung (Forward Scatter) und im 90° Winkel (Side Scatter) zum Laserstrahl erfasst. Forward Scatter (FSC) ist von der Zellgröße abhängig, während Side Scatter über die Granularität der Zelle informiert. Um bei einer Zellsortierung die von den verschiedenen Fluorochromen emittierten Lichtspektra zu erfassen, sind in der optischen Einheit verschiedene optische Filter, sowie hochsensible Photomultiplierdetektoren installiert. Der feine Zellstrahl, der sich in der optischen Einheit befindet, wird nun über die Nozzleinheit elektrisch geladen, so dass, je nachdem was die Detektoren in der optischen Einheit gemessen haben, die abscheidenden Tropfen eine positive oder negative Ladung erhalten (siehe Abb. 6). Die geladenen Tropfen, in denen sich jeweils eine Zelle befindet, treten in die Sortereinheit ein, die aus einem elektrischen Hochspannungsfeld besteht. Hier erfahren die Tropfen je nach Ladung eine elektrische Kraft, die die Tropfen von ihrer ursprünglichen Flugbahn ablenkt und somit das Sortieren ermöglicht. Der von uns verwendete High Speed Cell Sorter MoFLo™ LEGACY1 hat drei Laser, detektiert bis zu zwölf Farben und kann in vier Kanälen bis zu 45000 Zellen pro Sekunde sortieren.

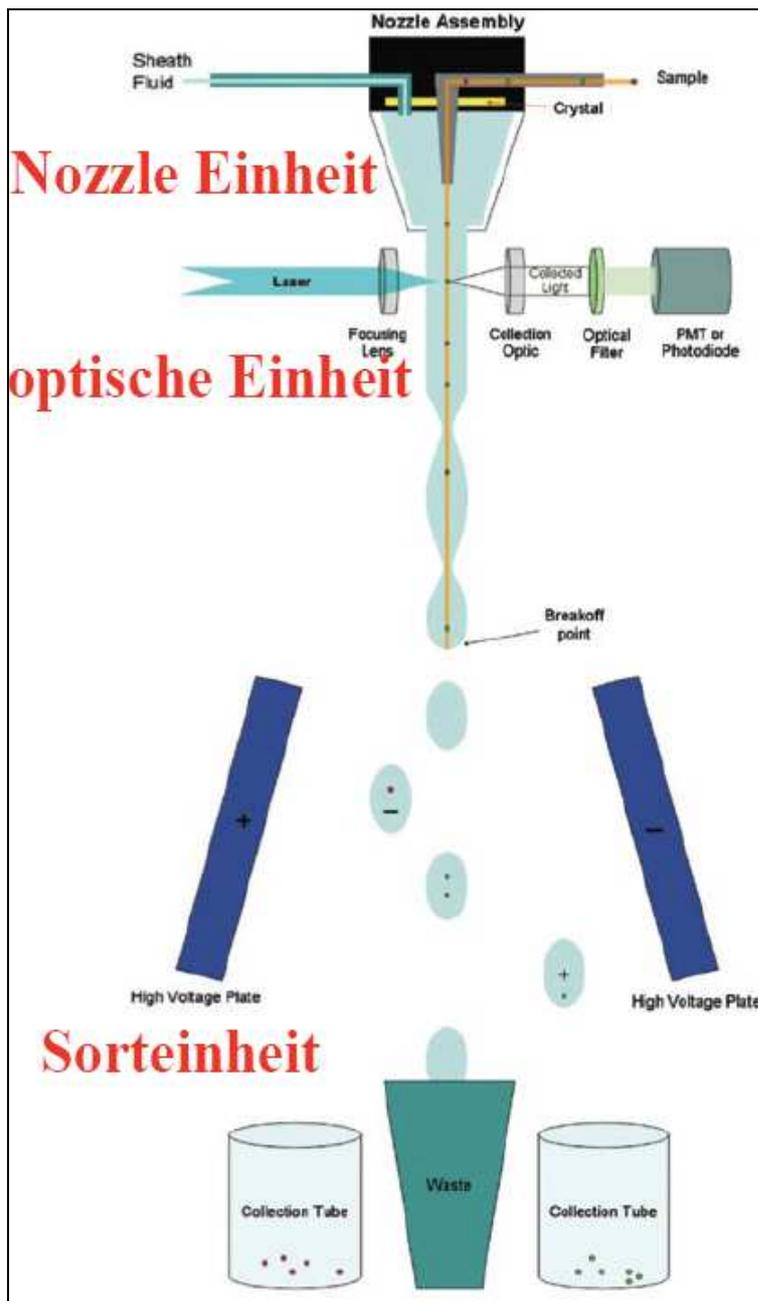


Abbildung 6

Schematische Darstellung eines Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) mit den Hauptkomponenten Nozzle, optische Einheit und Sortereinheit

[modifiziert nach DakoCytomation Fachinformation: Guide to Flow Cytometry]

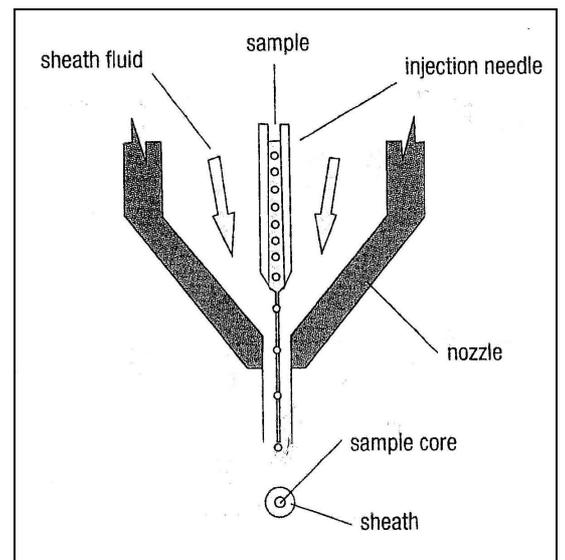


Abbildung 7

Schematische Darstellung der Nozzle Einheit. In der Nozzle befindet sich die Injektionsnadel mit der Probe. Die Injektionsnadel wird von der elektrisch leitenden Sheath Fluid umspült. Die Sheath Fluid spült die aus der Injektionsnadel austretenden Zellen Richtung Nozzle-Ausgang, wo aufgrund des geringen Durchmessers (50-200µm) ein feiner Strahl entsteht. Der Strahl zerbricht in kleine Tropfen, in denen sich jeweils eine Zelle befindet. Eine einheitliche Tropfenbildung wird durch mechanische Oszillation mittels eines piezoelektrischen Transducers unterstützt (hier nicht dargestellt)

[aus DakoCytomation Fachinformation: Guide to Flow Cytometry]

3.2.2.1 Antikörpermarkierung

Damit die Antikörper effizient eingesetzt werden können, müssen sie austitriert werden. Hierzu wurden die Antikörper auf einer 96er-Wellplatte in 50 µl mit jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen im Verhältnis 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 verdünnt. Anschließend wird mittels FACS untersucht, bei welcher maximalen Verdünnung ein Sortieren noch möglich ist.

Titrationen

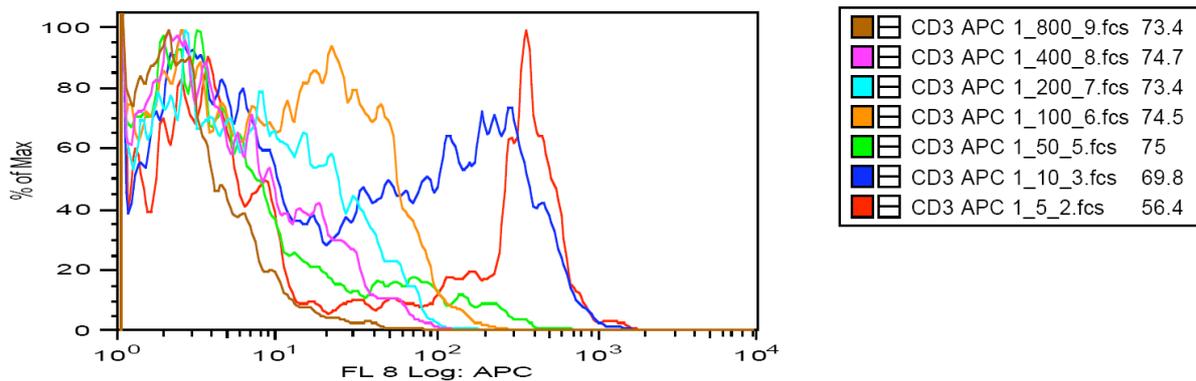


Abbildung 8 a)

AntiCD3 – APC Titrationskurve

Titrationen

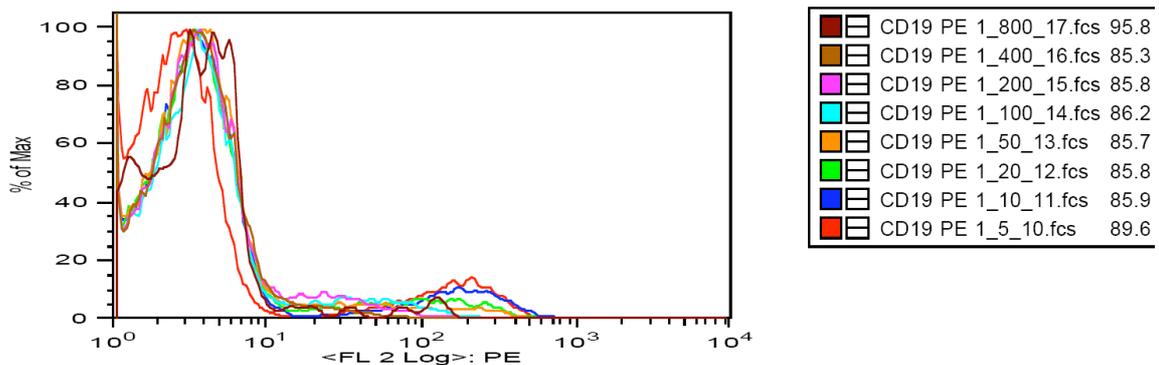


Abbildung 8 b)

AntiCD19 – PE Titrationskurven

Abb. 8 a und Abb. 8 b zeigen die Titrationskurven der Antikörper AntiCD3 – APC und AntiCD19 – PE. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen aufgetragen. Die Ordinate gibt mit % of Max an, wie viele Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität gefunden wurden. Die verschiedenen Farben der Graphen beschreiben

die Antikörperverdünnungen. Ein Graph einer optimalen Verdünnung sollte zwei Zellpopulationen zeigen und diese klar voneinander trennen. Das ist in Abb. 8 a) bei den CD3-APC Antikörpern bei der Verdünnung 1:5 der Fall, sowie in Abb. 8 b) bei CD 19-PE ebenfalls bei 1:5 oder auch noch 1:10. Die CD15-Pacific Blue Antikörpertitration (hier nicht dargestellt) ergab eine optimale Verdünnung von 1:5.

Dementsprechend wurden die CD3-APC-, CD19-PE- und die CD15-Pacific Blue – Antikörper in den jeweiligen Verdünnungen 1:5, 1:10 und 1:5 eingesetzt. Aus Erfahrung des Sortlabors des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München kann die ermittelte Verdünnung bis zu einer Zellkonzentration von 10^8 Zellen pro ml FACS-Puffer angewendet werden.

Sollten B- und T- Lymphozyten oder Granulozyten sortiert werden, wurde das Leukozytenisolat über dem 1077- oder über dem 1119 Dichtegradienten mit den Antikörpern markiert. Hierzu wurde das Zellisolat mit Filcon Zellfiltern abfiltriert und auf eine Zellkonzentration von 10^8 Zellen pro ml FACS Puffer eingestellt. In den oben beschriebenen Verhältnissen wurden den Zellproben auf Eis die Antikörper hinzugefügt. Nach dem Vortexen findet bei Dunkelheit und 4°C die Antikörperreaktion statt. Nach 20 min wird diese Reaktion durch 3-maliges Zellwaschen mit 1 ml FACS Puffer und anschließendem Abzentrifugieren (1500 U/min, 3min, 4°C) gestoppt. Kurz bevor die Zellen sortiert werden, wird den Zellen der Farbstoff PI zugefügt. Tote bzw. nicht vitale Zellen nehmen diesen Farbstoff auf und können dadurch aussortiert werden. Hierzu wird zunächst der Farbstoff 1:1000 in FACS Puffer verdünnt, bevor diese PI-Verdünnung im Verhältnis 1:1 der Zellprobe zugeführt wird.

3.2.2.2 Isolation der Zellen

Nachdem die zu sortierende Zellpopulation durch Sortinggates eingegrenzt wurde, erfolgte der Zellsort, der je nach Probengröße 1-2 Stunden dauerte.

Durchflusszytometrisch wird zunächst die Größe der Zellen mittels Forward Scatter (FSC) und die Granularität mittels Side Scatter (SSC) bestimmt. Abb. 9 a) zeigt das zytometrisch vermessene Zellisolat über dem Dichtegradienten 1077.

Tote Zellen haben den Farbstoff PI aufgenommen, der ein ähnliches Spektrum wie PE-Texas Red emittiert. Da in dem von uns verwendeten Zellsorter keine Einstellung für den Farbstoff PI vorlagen, wurde die PI Emission mit der Sortereinstellung für PE-Texas Red ermittelt. In Abb. 9 b) sind die toten Zellen dargestellt, die durch geeignete Definition der Sortinggates aussortiert werden konnten.

Die Isolation von CD3⁺ T-Lymphozyten und CD19⁺ B-Lymphozyten erfolgte aus dem Zellisolat über dem 1077 Dichtegradienten. Die Zellen wurde hierzu mit Anti-CD3-APC- und Anti-CD19-PE- Antikörpern markiert. Der Sortiervorgang erfolgte anschließend zweidimensional. In Abb. 9 c) sind die zwei isolierten Zellpopulationen dargestellt.

Für die Granulozytenisolation wurde das Zellisolat über dem 1119 Dichtegradient mit dem Anti-CD15-Pacific Blue Antikörper markiert. Da in diesem Zellisolat weniger Lymphozyten enthalten waren, wurde auf eine gleichzeitigen B- und T- Lymphozyten-Zellsortierung verzichtet. Abb. 9 d) zeigt die einzelne Zellpopulation, bestehend aus CD15⁺ Granulozyten.

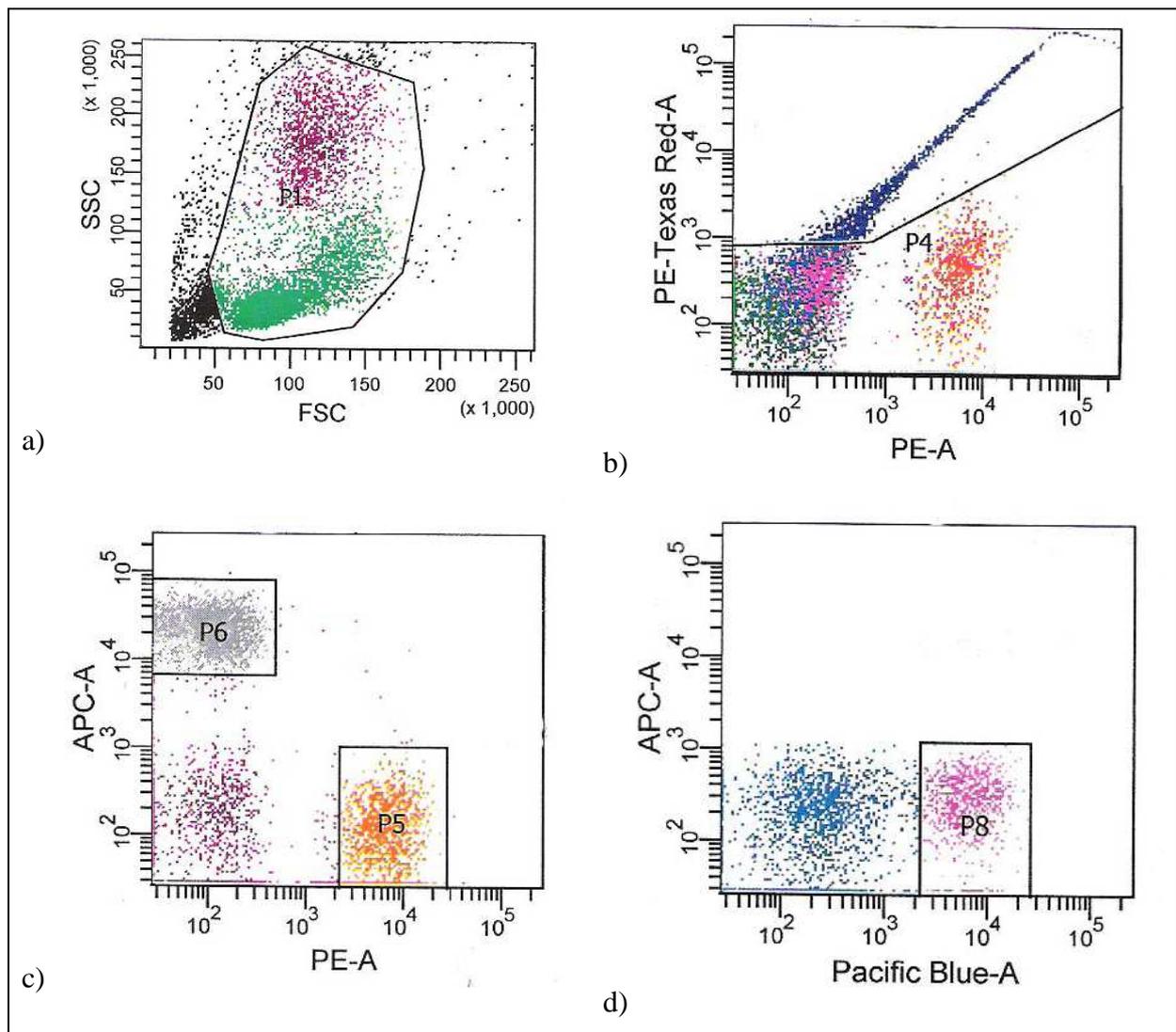


Abbildung 9:

Darstellung der Sortinggates der isolierten Leukozyten a) Mittels SSC (Sidescatter) und FSC (Forwardscatter) wurden die Granularität und Größe der isolierten Leukozyten vermessen. Granulozyten mit einer hohen Granularität und dementsprechend hohen SSC Werten befinden sich im oberen Bereich des Diagramms (violette Punktwolke) Aufgrund der geringeren Größe und geringeren Granularität befindet sich die mononukleäre Zellwolke im Diagram links unten (grüne Punktwolke). b) Auf den Achsen ist die Fluoreszenzintensität für das Fluorchrom PE-Texas Red und PE aufgetragen. Hohe PE-Texas Red Werte entsprechen einer hohen PI Aufnahme in die Zellen, was für tote Zellen charakteristisch ist. Hier im Diagramm sind das die dunkelblauen Zellen oberhalb der P4 Linie. Die Rote Wolke im rechten Bereich des Diagramms entsprechen AntiCD19-PE markierte B-Lymphozyten. c) Auf den Achsen sind die Fluoreszenzintensitäten für die Fluorochrome APC und PE aufgetragen. Die graue Wolke entspricht demnach CD3+ Lymphozyten, die mit dem Antikörper AntiCD3-APC reagieren. Die rote Wolke sind mit Anti-CD19-PE-Antikörper markierte B-Lymphozyten. d) Bei dieser Granulozytensortierung wurden die Fluoreszenzintensitäten für die Fluorochrome Pacific-Blue gegen APC aufgetragen. Granulozyten die mit Anti-CD15-Pacific Blue Antikörpern makriert wurden befinden sich in der pinken Zellwolke. Eine Antikörpermarkierung mit APC Fluorochromen fand bei diesem Sort nicht statt.

3.3 Vorbereitung der Zellen für die Uptakeversuche

3.3.1 Zellstimulation

Die im Folgenden beschriebenen Zellstimulationen fanden vor dem Uptakeversuch statt. Für jede Zelllinie wurde versucht, durch Literaturrecherche, Empfehlung von den Hämatologen am Klinikum Rechts der Isar und durch Vorversuche die passende stimulierende Substanz, in der jeweiligen Konzentration und Stimulationsdauer herauszufinden.

Als stimulierende Substanzen wurden Lipopolysaccharid (LPS) und Concanavalin A (ConA) eingesetzt. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Leukozyten, insbesondere Makrophagen/Monozyten werden durch die Bindung von LPS stimuliert und zur Sezernierung proinflammatorischer Zytokine angeregt. ConA ist ein Protein und gehört zur Gruppe der Lektine, die sich spezifisch an Zellmembranen anlagern und dort biochemische Reaktionen auslösen. Auf Lymphozyten wirkt ConA mitogen.

Um verschiedene Stimulationsstufen untereinander zu vergleichen, wurden die in großer Menge isolierten Makrophagen und mononukleären Zellen in verschiedenen LPS und ConA-Konzentrationen stimuliert. Da die FACS isolierten Granulozyten und Lymphozyten nur in begrenzter Menge vorlagen, wurde bei diesen Zellen nur eine Stimulationsstufe gegen die unstimulierte Kontrolle verglichen.

3.3.1.1 Makrophagen Stimulation

Die auf 24-Multiwellplatten angewachsenen Makrophagen wurden in Leukozytenmedium mit LPS in den Konzentrationen 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml über 2 Tage stimuliert. 10 mg LPS Pulver wurden in 10 ml PBS gelöst. Aus dieser Stocklösung wurden vier 10 ml LPS - Leukozytenmedium Lösungen mit den jeweiligen LPS Konzentrationen angefertigt. In jedes Well der Multiwellplatte wurden 1 ml der Stimulationslösungen gegeben, so dass für jeden Stimulationsgrad 4 Wells für die Uptakeprobe sowie 4 Wells für die Proteinprobe befüllt waren.

3.3.1.2 Granulozytenstimulation

FACS isolierte CD15+ Granulozyten wurden in Leukozytenmedium mit 0,1 µg/ml LPS zwei Stunden inkubiert. Die Zellkonzentration im LPS-Leukozytenmedium betrug 10^6 /ml, wofür

aufgrund der geringen Zahl der isolierten CD15+ Granulozyten eine kleine Zellkulturflasche ausreichte.

3.3.1.3 Stimulation mononukleärer Zellen (MNCs)

Nachdem ein [¹⁸F]FDG Uptakevorversuch mit den ConA-Konzentrationen 0 µg/ml, 1 µg/ml, 50 µg/ml und 250 µg/ml durchgeführt wurde, entschieden wir uns Dichtegradienten isolierte MNCs in den ConA-Konzentrationen zu 0 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml und 50 µg/ml für 48 Stunden zu inkubieren. Die 1mg/ml ConA-Stocklösung wurde vor jeder Stimulation in Leukozytenkulturmedium hergestellt. Aus der Stocklösung wurden 4 mal 10 ml Leukozytenmedium mit den entsprechenden ConA-Konzentrationen angefertigt, die auf jeweils $1,5 \cdot 10^7$ MNCs pipettiert wurden. Die Zellsuspensionen mit den entsprechenden ConA-Konzentrationen wurden in mittelgroßen Zellkulturflaschen inkubiert.

3.3.1.4 Stimulation von CD3+ T-Lymphozyten und CD19+ B-Lymphozyten

Die FACS isolierten Lymphozyten wurden mit 1 µg/ml ConA 48 Stunden in kleinen Zellkulturflaschen in einer Zellkonzentration von 10^6 /ml stimuliert.

3.3.2 Überführung der Zellen in Versuchspuffer

3.3.2.1 Zellüberführung für Uptakeversuche unter Suspensionsbedingungen

Alle erstellten Zellsuspensionen lagen zu Beginn des Uptakeversuches in Eppendorfcups in einem Versuchspuffervolumen von 100 µl vor. Bei FACS isolierten Lymphozyten und Granulozyten sowie MNCs wurde eine Konzentration der Versuchspuffer-Zellsuspensionen von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml angestrebt, sodass sich beim Pipettieren von 100 µl in jedes Eppendorfcup $5 \cdot 10^5$ Zellen überführen lassen. Dies war bei den in großer Menge isolierten MNCs immer gut möglich. Die FACS isolierten Leukozyten wurden jedoch meist in geringerer Anzahl isoliert. Demnach musste man sich hierbei an den Zellzahlen der zur Verfügung stehenden stimulierten und unstimulierten Zellen orientieren.

Um beim Pipettieren von 100 µl der Tumorzellsuspension 10^5 LNCaP- oder PC3-Zellen in das Eppendorfcup zu überführen, wurden diese Zellen im Versuchspuffer auf eine Zellkonzentration von 10^6 /ml eingestellt.

Oben genannte Zellkonzentrationen wurden durch folgende Schritte in Versuchspuffer überführt. Abzentrifugieren (1500 U/min, 20°, 5min) des Kulturmediums, Waschen der Zellen in Versuchspuffer und Zellzählen unter der Neubauerzählkammer, wiederholtes Abzentrifugieren des Versuchspuffers und letztlich Zugabe des Versuchspuffers entsprechend der Zellzahl und gewünschten Zellkonzentration.

LNCaP und PC3 Zellen mussten vor dem Zentrifugieren zuerst, wie im Kapitel 3.1.1.2 beschrieben, abgelöst werden.

3.3.2.2 Zellüberführung für Uptakeversuche unter adhärennten Bedingungen

Die auf 24-Multiwellplatten angewachsenen PC3 Zellen, LNCaP Zellen (siehe 3.1.1.2) sowie die adhärennten Makrophagen (siehe 3.2.1.1) wurden durch zweifaches Waschen mit 1 ml Versuchspuffer und anschließend Überschichten mit in Tabelle 6 (siehe 3.4.4) genannten Mengen an Versuchspuffer für die Uptakeversuche unter adhärennten Bedingungen vorbereitet. Für Makrophagen ist zu beachten, dass zu jeder der vier LPS Stimulationskonzentrationen vier Wells für Proteinproben sowie vier Wells für die Uptakeproben, also insgesamt 32 Wells mit Makrophagen vorbereitet wurden.

3.4 Uptake Versuche

3.4.1 Kombinierte [^3H]Cholin- und [^{18}F]FDG-Uptake Versuche

Die unterschiedliche Strahlenart sowie die verschieden lange Halbwertszeit der Radionuklide ^3H und ^{18}F ermöglichen die kombinierten Uptake Versuche. Bei den kombinierten Uptake Versuchen wurden die zu untersuchenden Zellen zur gleichen Zeit mit beiden Tracern inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate in einem Eppendorfcup im Gammacounter analysiert, wobei nur die hochenergetische Gammastrahlung von ^{18}F detektiert

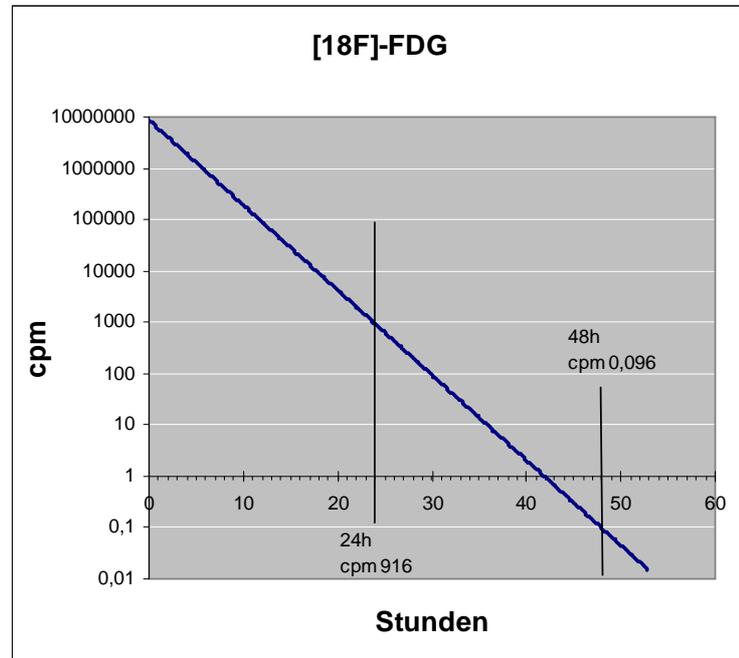


Abbildung 10:

Logarithmische Darstellung des FDG Zerfalls

wurde. Die ^3H Betastrahlung wird durch das Eppendorfcup und Distanz zum Detektor so abgeschirmt, dass sie die das Ergebnis der Gammastrahlenmessung am Gammacounter nicht verfälscht. Um die [^3H]Cholin Aktivität isoliert zu analysieren, nutzt man die unterschiedliche Halbwertszeit der verwendeten Radionuklide. Während sich die Tritiumaktivität bei einer Halbwertszeit von 12,32 Jahren innerhalb von 2 Tagen nur unwesentlich vermindert, ist die ^{18}F Aktivität nach 2 Tagen aufgrund der geringen Halbwertszeit von 109,7 min abgeklungen (siehe Abb. 10). Zu diesem Zeitpunkt kann man das Zelllysate in die Szintillationsflüssigkeit überführen und im Betacounter die [^3H]Cholin Aktivität messen, ohne dass die Messung vom ^{18}F -Zerfall beeinflusst wird.

Um den oben beschriebenen Sachverhalt zu prüfen wurden vier Proben als Dreifachansatz angefertigt. In den Proben befinden sich in jeweils 200 μl H_2O keine Aktivität in der 0-Probe, in der β^- -Probe 0,05 μCi (1,85 kBq) [^3H]Cholin, in der β^- - und γ -Probe 0,05 μCi (1,85 kBq) [^3H]Cholin und 10 μCi (370 kBq) [^{18}F]FDG und zuletzt in der γ - Probe 10 μCi (370 kBq) [^{18}F]FDG. Aus Tabelle 4 wird ersichtlich, dass die Aktivität der β^- -Probe die Counts am

Gammacounter nicht beeinflusst. Ebenfalls ist nach 2 Tagen die abgeklungene β^+ - und γ -Aktivität der [^{18}F]FDG Probe so gering, dass die Messung der γ -Probe am Betacounter im Bereich der 0-Probe ohne Aktivität ist. (siehe Tab. 4)

Tabelle 4:

Zerfallsraten der Probe ohne Aktivität sowie der Proben mit β^- -Aktivität, β^- - und γ -Aktivität und γ -Aktivität. Im Gammacounter (obere Felder) wurden am Tag der Probenherstellung die cpm gemessen. Nach 2 Tagen wurden im Betacounter (untere Felder) die ^3H -Zerfallsraten in dpm gemessen.

	0-Probe 200 μl H ₂ O	β^- - Probe 200 μl H ₂ O +1,85 kBq [^3H]Cholin	$\beta^- + \gamma$ - Probe 200 μl H ₂ O +1,85 kBq [^3H]Cholin + 370 kBq [^{18}F]FDG	γ - Probe 200 μl H ₂ O + 370 kBq [^{18}F]FDG
Cpm im Gammacounter	23 8 29	7 7 57	8762427 8635304 8653746	8694916 8675072 8649190
Dpm im Betacounter nach 2 Tagen	31 38 47	114316 117476 113657	108780 110967 118562	9 16 14

Da man beim kombinierten Uptakeversuch den Uptake zweier Tracer in dieselben Zellen untersucht, vermindert man das Risiko von Messfehlern, die durch geringe Variationen der Durchführung entstehen können. Zugleich spart man durch den kombinierten Uptakeversuch Zeit und Material. Das ist besonders bei Uptakeversuchen mittels FACS isolierten Leukozyten von Vorteil.

3.4.2 Herstellung des radioaktiven Versuchspuffercocktails

In jeder Probe liegen 100 μl nicht-radioaktiver Versuchspuffer mit Zellen vor. Gestartet wurde der Uptakeversuch durch die Zugabe von 100 μl radioaktiven Versuchspuffers mit einer [^3H]Cholin Aktivität von 0,05 μCi (1,85 kBq) und 10 μCi (370 kBq) [^{18}F]FDG. Im Folgenden wird die Herstellung des Versuchspuffers mit ^3H und ^{18}F Aktivität für 20 Proben beschrieben.

3.4.2.1 [¹⁸F]FDG Zugabe

Möglichst hoch konzentriertes [¹⁸F]FDG wird in Versuchspuffer auf eine Aktivitätskonzentration von 2 mCi/ml (74 mBq/ml) verdünnt. In ein 2 ml Eppendorfcup werden 200 µl dieser Verdünnung gegeben und anschließend wird das Cup auf 2 ml mit Versuchspuffer aufgefüllt. Diese 2 ml Versuchspuffer reichen für 20 Proben mit einer jeweiligen [¹⁸F]FDG Proben Aktivität von 10 µCi (370 kBq).

3.4.2.2 [³H]Cholin Zugabe

Das [³H]Cholin wurde uns in einer Aktivitätskonzentration von 1 mCi/ml (37 mBq/ml) im Volumen von 1 ml geliefert. Zunächst wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt. Dabei gibt man 50 µL des [³H]Cholin auf 450µl 96%-igen Ethanol. Diese Verdünnung mit der Aktivitätskonzentration von 0,1 mCi/ml (3,7 mBq/ml) wird im Folgenden als Stammlösung bezeichnet. Sie wurde bei -20° aufbewahrt und erst unmittelbar vor jedem weiteren Versuch verdünnt, da das [³H]Cholin in Ethanol relativ stabil ist.

Ein radioaktiver Versuchspufferansatz für 20 Proben bei einer gewünschten Probenaktivität von 0,05 µCi (1,85 kBq) [³H]Cholin erfordert die Aktivität von 1 µCi (37 kBq) [³H]Cholin aus der Stammlösung. Bei der Aktivitätskonzentration der Stammlösung von 0,1 mCi/ml (3,7 MBq) entsprechen 1 µCi (37 kBq) dem Volumen von 10 µl, die in dem 2 ml radioaktiven [¹⁸F]FDG Versuchspuffer (siehe 3.4.2.1) verdünnt werden.

Wird nun aus dem radioaktiven Versuchspuffercocktail 100µl entnommen und in die Eppendorfcups gegeben, befindet sich in jedem Eppendorfcup die geforderte [³H]Cholin Aktivität von 0,05µCi (1,85 kBq) und [¹⁸F]FDG Aktivität von 10µCi (370 kBq). Bis zum Versuchsbeginn wurden die 2 ml radioaktiver Versuchspuffer im Wasserbad bei 37° inkubiert.

3.4.3 Uptakeversuch unter Suspensionsbedingungen

Die gute Vorbereitung des Uptakeversuches gewährt standardisierte Versuchsdurchführung und ermöglicht dadurch eine Verminderung von Fehlern. Demnach soll zu Versuchsbeginn ein 37° warmes Wasserbad im Brutschrank stehen, die Zentrifuge auf 4° gekühlt werden und eine mit Eis gefüllte Styroporbox mit Eisenependorfständer und eiskaltem PBS vorbereitet werden. Auch Zellsuspension (siehe 3.3.2.1) sowie aktiver Versuchspuffercocktail (siehe 3.4.2) sollten bereits angefertigt und auf 37° temperiert sein. Da jede Probe vierfach bestimmt wurde,

befinden sich für eine Probe in einem Eppendorfständer 3 mal 4 Eppendorfcups für die Standards, die Uptakeprobe und die Proteinprobe (Tab. 5). Die Standards benötigt man, um später die in die Zellen der Uptakeprobe aufgenommene Aktivität in Relation zur ursprünglich eingesetzten Aktivität zu stellen. Die Proteinproben ermöglichen die Rückrechnung dieses prozentualen Uptakes auf die Proteinmasse der untersuchten Zellen (siehe 3.6).

Sollten mehrere Proben untersucht werden, wie es bei den Stimulationsreihen für Leukozyten der Fall ist, müssen für jeden Stimulationsgrad 4 Uptakeproben sowie 4 Proteinproben mitgeführt werden.

Tabelle 5:

Pipettierschema für den Uptakeversuch unter Suspensionsbedingungen

	Versuchspuffer (ohne Aktivität)	Zellsuspension	Aktiver Versuchspuffer Cocktail
Standards (4x)	100 µl	-	100 µl
Uptakeprobe (4x)	-	100 µl	100 µl
Proteinprobe (4x)	100 µl	100 µl	-

Im Folgenden werden die Proteinproben genauso behandelt wie die Uptakeproben, damit Zellverluste die bei der Versuchsdurchführung und den Waschschrinen auftreten in beiden Proben auftreten und somit zu vernachlässigen sind. Der Uptake Versuch wird gestartet durch die Zugabe des aktiven Versuchspuffercocktails. Die Proben werden 10 min im 37° Wasserbad im Brutschrank inkubiert. Abgestoppt wird der Uptake durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS. Die Proben werden nun bei 4000 U/min und 4° für 5 min zentrifugiert. Es folgt ein dreimaliges Waschen der Zellen durch jeweiliges Absaugen des Überstandes, Spülen mit je 1 ml eiskaltem PBS und Zentrifugieren bei 4000 U/min und 4° für 5 min, wobei die Proben zwischen den Zentrifugierschritten permanent auf Eis im Eiseneppendorfständer gelagert sind. Das Absaugen erfolgt mit einem Absaugstutzen für Eppendorfcups. Der abgesaugte Überstand wird in einem Abfallbehälter für flüssiges Tritium aufgefangen und nach dem Abklingen der [¹⁸F]FDG Aktivität entsprechend den Strahlenschutzbedingungen entsorgt.

Nach dem letzten Waschschrin werden die Proteinproben in 200 µl NaOH (1M) resuspendiert und somit für die Proteinbestimmung vorbereitet (siehe 3.5). Die Uptakeproben werden in 500 µl 2%igem SDS resuspendiert. Die 500 µl aktives Zelllysate werden in ein neues Eppendorfcup überführt. Das alte Eppendorfcup wird mit 500 µl SDS nachgespült. Auch diese 500 µl werden in das neue Eppendorfcup gegeben und zur Messung der [¹⁸F]FDG Aktivität in den

Gammacounter gestellt. Durch diese Maßnahme verhindert man, dass Restaktivität, die sich z.B. am Deckel des alten Eppendorfcup befindet, im Gammacounter die Ergebnisse verfälscht.

3.4.4 Uptakeversuch unter adhärennten Bedingungen

LNCaP- und PC3- Zellen sowie Makrophagen wachsen adhärennt auf dem Boden der Zellkulturflaschen. Bei einem die Zellen schonenden Uptakeversuch sollte das Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA vor dem Versuch vermieden werden. Dies erfordert, dass die Zellen auf 24-Multiwellplatten wachsen und der oben beschriebene Versuch auf genau diesen Platten unter adhärennten Bedingungen stattfindet.

Zur Elimination nicht-adhärennter Zellen werden vor Versuchsbeginn die Zellen durch Spülen mit 1 ml Versuchspuffer und anschließendem Absaugen 2 mal gewaschen. Eppendorfcups für die Standards sowie Proteinprobe und Uptakeprobe werden nach in Tab.6 stehendem Schema vierfach vorbereitet.

Tabelle 6:

Pipettierschema für den Uptakeversuch unter adhärennten Bedingungen

	Versuchspuffer (ohne Aktivität)	Aktiver Versuchspuffer Cocktail
Standards (4x) (Eppendorfcups)	100 µl	100 µl
Uptakeprobe (4x)	100 µl	100 µl
Proteinprobe (4x)	200 µl	-

Nach Zugabe des aktiven Versuchspuffers, Inkubation von 10 min im 37° Wasserbad und Abstoppen durch 1 ml eiskaltes PBS werden die Zellen 3 mal durch Absaugen und Spülen mit eiskaltem PBS gewaschen.

Wie oben beschrieben, wird auf die Proteinproben 200 µl NaOH (1M) gegeben, so dass eine Proteinbestimmung nach 24 h möglich ist. Die Uptakeproben werden mit 500 µl 2%igem SDS versetzt und durch Resuspendieren mit einer Pipette vom Plattenboden abgelöst und zugleich lysiert. Aktives SDS- Zelllysat, sowie 500 µl SDS zum Nachspülen der Wells werden in ein Eppendorfcup überführt und es erfolgt die [¹⁸F]FDG Aktivitätsmessung im Gammacounter.

3.4.5 Messungen im Gamma- und Betacounter

Bevor die Standardproben und Uptakeproben im Gammacounter untersucht werden, ist darauf zu achten, dass das Volumen der Standards dem der 1 ml aktiven Zelllysate Uptakeproben entspricht. Demnach wurden die Standards vor der Messung mit 800 µl 2% SDS versetzt. Die [¹⁸F]FDG Aktivität wird am Gammacounter als counts per minute (cpm = Zählrate pro Minute) zerfallskorrigiert gemessen.

Die Messung am Betacounter erfolgt 2 Tage nach Abklingen der [¹⁸F]FDG Aktivität. Aufgrund der relativ geringen Reichweite der Betastrahlen im Vergleich zu Gammastrahlen können Betastrahler nur in direkter Gegenwart einer Szintillationsflüssigkeit gemessen werden. Dabei erzeugen die Betastrahlen in der Szintillationsflüssigkeit Lichtblitze, welche im Betacounter quantifiziert werden. Die Aktivität wird im Betacounter als disintegrations per minute (dpm = Zerfallserscheinung pro Minute) gemessen.

Der Inhalt der Standard und Uptake Eppendorfcups wird in Szintillationsröhrchen überführt, in denen 2 ml Szintillationsflüssigkeit vorgelegt ist. Rückstände in den Eppendorfcups werden mit 0,5 ml PBS aus den Cups gespült und ebenfalls in die Szintillationsröhrchen pipettiert. Kräftiges Vortexen der Szintillationsröhrchen ist essentiell vor der Messung im Betacounter.

3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Um das Uptakeverhalten der verschiedenen Zellen zu vergleichen, muss man die unterschiedlichen Volumina der Zellen berücksichtigen. Wird der radioaktive Uptake als aufgenommene Menge an Aktivität pro mg Zellprotein angegeben, wird in der Auswertung der Einfluss der Zellgröße auf das Uptakeverhalten vermindert. So kann man kleine Lymphozyten mit geringem Proteingehalt mit großen Makrophagen mit erheblich höherem Proteingehalt vergleichen.

Zugleich kann man über den Proteingehalt einer Probe nachvollziehen, wie viele Zellen sich in einer Probe befinden. Voraussetzung dafür ist, dass man von einer definierten Anzahl Zellen einer Zelllinie die Proteinmasse bestimmt hat.

Um bei den Uptake-Versuchen die Proteinmasse der aktiven Proben zu bestimmen, wird für jede aktive Probe eine Probe ohne Aktivität mitgeführt. Die Probe ohne Aktivität wird, wie im Kapitel Uptake Versuche beschrieben (siehe 3.4), genauso behandelt wie die aktive Probe, um

Zellverluste bei den Waschvorgängen zu berücksichtigen. Nach dem letzten Waschen wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet nach Resuspension in 200 µl NaOH (1M) mindestens 1 h lysiert.

Die Proteinbestimmung wird mit 0,02% Natriumazid (NaN_3) versetzten BSA-Standards durchgeführt. Das toxische Natriumazid verhindert durch irreversible Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase das Wachstum von Mikroorganismen und macht die Standards dadurch lange haltbar. Nach dem in Tabelle 7 aufgeführten Schema werden die 40 ml Standards S I bis S VI erstellt. Zu beachten ist, dass die BSA H_2O Lösung 2 mg/ml vor dem Erstellen der Standards 1:10 in PBS verdünnt wird und anschließend bei -20°C bis zur Erstellung einer neuen Standardreihe gelagert wird.

Tabelle 7

Pipettierschema für die Standards in ml

	S I Leerwert 0 µg/ml	S II (1,25µg/ml)	S III (2,5 µg/ml)	S IV (5 µg/ml)	S V (10 µg/ml)	S VI (15 µg/ml)
PBS +0,02% NaN_3	35	35	35	35	35	35
BSA (0,2mg/ml): BPS (1 : 10)	0	0,25	0,5	1	2	3
H_2O : PBS (1 : 10)	5	4,75	4,5	4	3	2

Zur Erstellung der Standardgeraden werden aus jedem 40 ml Standard 800 µl als 3 fach Messung auf Eppendorfcups verteilt. Dadurch erhält man in den Eppendorfcups aus S I eine Proteinmasse von 0 µg, aus S II eine Proteinmasse von 1 µg, aus S III eine Proteinmasse von 2 µg, aus S IV 4 eine Proteinmasse von 4 µg, aus SV eine Proteinmasse von 8 µg und aus S VI eine Proteinmasse von 12 µg.

Zur Proteinbestimmung der unbekannt Probe werden je 20µl des NaOH Zelllysats in ein Eppendorfcup zu 700µl PBS und 80µl H_2O : PBS (1 : 10) überführt.

Auf die 800 µl Standardproben und auf die 800 µl der unbekannt Proben werden gleichzeitig jeweils 200 µl Farbstofflösung gegeben. Nach Vortexen und einer Inkubationszeit von 5 min (bis maximal 60 min) wird die Extinktion der Proben gegen den Leerwert im Photometer bei

595 nm für 1s gemessen. Es ist darauf zu achten, dass das Photometer mindestens 1 Stunde vor der ersten Messung eingeschaltet ist, damit sich die Lampe erwärmen kann und so Messungenauigkeiten vermieden werden.

Aus den Extinktionswerten der 3-fach Messung der Standards $1\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $4\mu\text{g}$, $8\mu\text{g}$ und $12\mu\text{g}$ wird der Mittelwert errechnet. Diese Mittelwerte werden in einem Diagramm über der zugehörigen Proteinmenge aufgetragen (siehe Abb. 11). Anhand dieser Mittelwerte kann man durch lineare Regression die Standardgerade aus den einzelnen Punkten errechnen. Die Schätzer-Funktion von Microsoft Excel ermöglicht es, anhand der Extinktionswerte der unbekannt Proben und der errechneten Standardgeraden die Proteinmenge zu bestimmen.

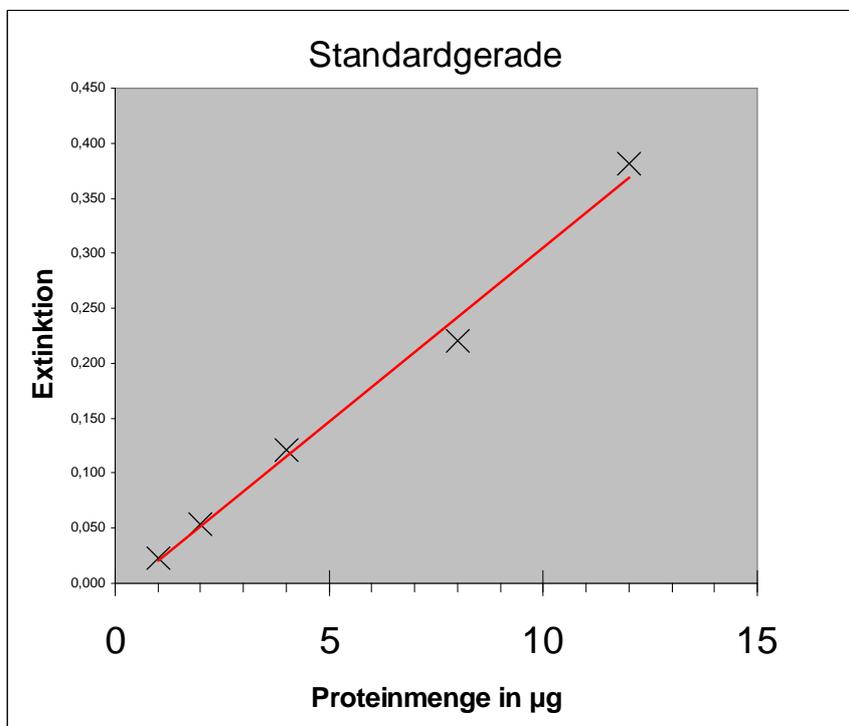


Abbildung 11

Für die Proteinstandards der Proteinmenge $1\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $4\mu\text{g}$, $8\mu\text{g}$ und $12\mu\text{g}$ sind die Extinktionsmittelwerte aus den Dreifachbestimmungen aufgetragen. Die durchgezogene rote Linie ist die von Microsoft Excel errechnete Standardgerade aus den Mittelwerten der Extinktion

3.6 Auswertung

3.6.1 Errechnung der [³H]Cholin-Uptakewerte

Bei einem Versuch wurden 4 Uptakeproben, 4 Standardproben und 4 Proteinproben mitgeführt. Für jede einzelne Uptakeprobe wurde ein Uptakewert errechnet. Dazu wurde zunächst der Mittelwert der 4 am Betacounter gemessenen Standardproben gebildet. Jeder einzelne Betacountermesswert der Uptakeprobe wurde durch den Mittelwert der Standardproben geteilt. Dadurch errechnet sich für jede einzelne Probe das Verhältnis aus aufgenommener Aktivität zu eingesetzter Aktivität in Prozent.

Von den vier Extinktionswerten der Proteinproben wurde ebenfalls der Mittelwert errechnet. Durch den Vergleich dieses Wertes mit der Proteinstandardgeraden (siehe 3.5) wurde dem Extinktionsmittelwert ein Proteinwert zugeteilt.

Wird nun das Verhältnis aus aufgenommener Aktivität zu eingesetzter Aktivität durch den Proteinmittelwert geteilt erhält man bei jeder Versuchsdurchführung 4 von der Zellzahl und Zellgröße unabhängige Uptakewerte in Prozent / Milligramm Protein (%/mg).

Aus drei voneinander unabhängigen Uptakeversuchen an drei Tagen erhält man somit 12 Uptakewerte.

3.6.2 Errechnung der [¹⁸F]FDG-Uptakewerte

Da der [¹⁸F]FDG-Uptake simultan mit dem [³H]Cholin-Uptake durchgeführt wurde, untersuchte man ebenfalls 4 Uptakeproben, 4 Standardproben und 4 Proteinproben. Auch wurde aus den am Gammacounter gemessenen Aktivitäten der Mittelwert der Standardprobe gebildet und das Verhältnis aus aufgenommener Aktivität zu eingesetzter Aktivität für jede einzelne Uptakeprobe errechnet.

Wie oben schon beschrieben, wurden die Extinktionswerte gemittelt, mit der Standardgeraden verglichen und daraus der Proteingehalt errechnet. Durch Division des Verhältnisses aus aufgenommener Aktivität zu eingesetzter Aktivität durch den Proteinmittelwert errechnet sich der [¹⁸F]FDG-Uptakewert in %/mg Protein.

Auch hierbei erhält man aus drei voneinander unabhängigen Uptakeversuchen an drei Tagen 12 Uptakewerte.

3.6.3 Umrechnung der Uptakewerte auf 10^5 Zellen

Durch Vorversuche wurde der Proteingehalt $m_{\text{prot } 1E5}$ von 10^5 Zellen der verschiedenen Zelllinien bestimmt (siehe Abb. 12). Große Zellen, wie die Tumorzelllinien und Makrophagen zeigen einen höheren Proteingehalt als kleine Leukozyten.

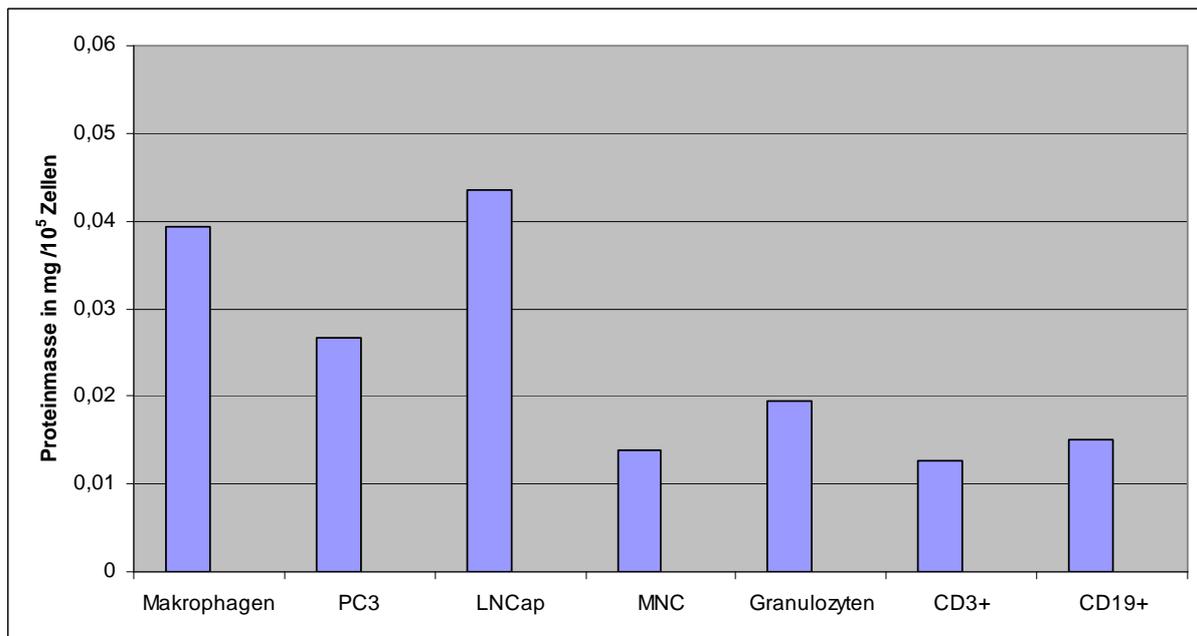


Abbildung 12

Proteingehalt pro 10^5 Zellen in mg für Makrophagen, PC-3 Zellen, LNCaP Zellen, MNCs, Granulozyten, CD3+ T-Lymphozyten und CD19+ B-Lymphozyten.

Ist die Proteinmasse einer Probe $m_{\text{prot } P}$ bekannt, kann man nach Gleichung 1 die in der Probe befindliche Zellzahl Z errechnen:

$$Z = 10^5 * m_{\text{prot } P} / m_{\text{prot } 1E5}$$

Gleichung 1

Um nun den Uptakewert von 10^5 Zellen zu errechnen, wird der Prozentwert des Verhältnisses aus eingesetzter Aktivität zu aufgenommener Aktivität (siehe 3.6.1 und 3.6.2) durch die Zellzahl Z geteilt und anschließend mit 10^5 multipliziert. Dieser Uptakewert pro 10^5 Zellen ist abhängig von der Größe der Zellen, so dass z.B. der Unterschied zwischen dem Uptakewert

pro 10^5 Zellen bei Makrophagen gegenüber Lymphozyten noch größer ausfällt als der Vergleich der gegen die Proteinmasse errechneten Uptakewerte (siehe Ergebnisteil 4.5).

Der, wie oben beschrieben, errechnete Uptakewert pro 10^5 Zellen wird durch Zellverlust bei den Waschsritten nicht beeinflusst.

Eine weitere Möglichkeit der Errechnung des Uptakewertes pro 10^5 Zellen ergibt sich aus dem exakten Einstellen von 10^5 Zellen pro Probe und Berechnung des Uptakewertes dieser Probe. Allerdings berücksichtigt man dabei den ausgeprägten Zellverlust bei der Zellwaschung (siehe Abb. 13) nicht. Da die aufgenommene Aktivität nach dreimaligem Zellwaschen nun in weniger als 10^5 Zellen vorliegt fällt der unter der Annahme einer $5 \cdot 10^5$ -Zellen-Probe erhaltene Uptakewert zu niedrig aus. Dies trifft insbesondere für kleine Zellen wie Leukozyten zu, da diese bei den Waschsritten einen höheren Zellverlust erfahren als große Zellen wie Tumorzellen.

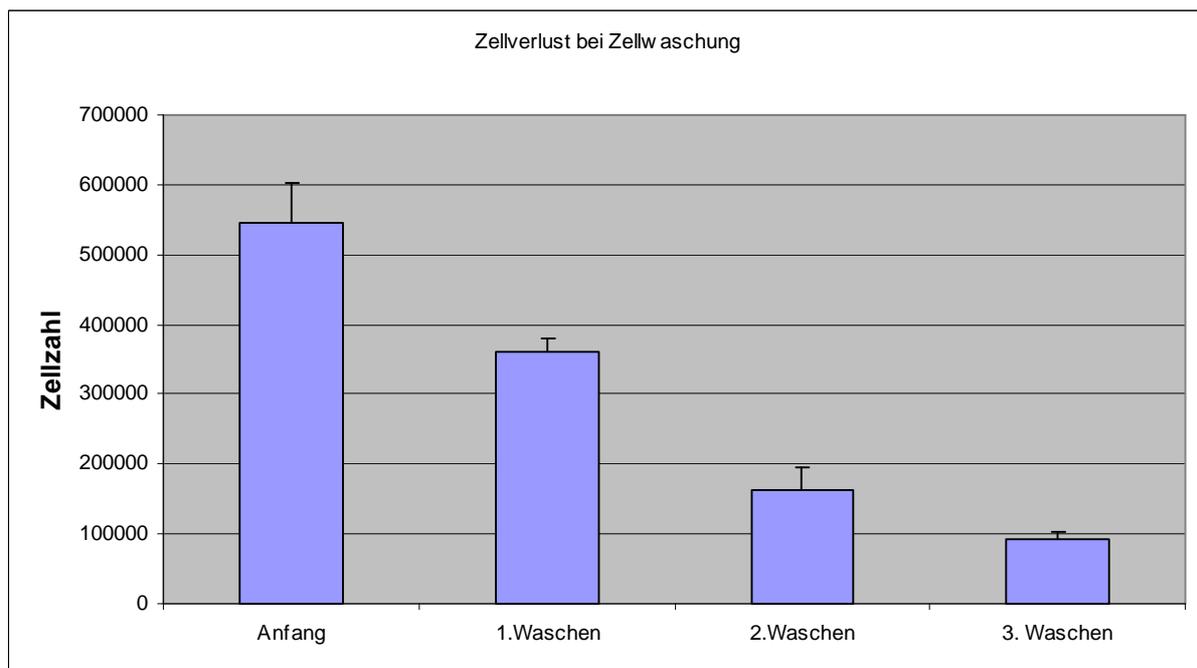


Abbildung 13

Zellverlust leukozytärer MNCs nach dreimaligem Waschen. Die Standardabweichung errechnet sich aus einer Dreifachbestimmung. Am Anfang wurde die Zellzahl auf $5 \cdot 10^5$ Zellen / Probe eingestellt

3.6.4 Errechnung der Z-Scores für die Stimulationsgraphen

Bei jedem Stimulationsuptakeversuch wurden 4 Standardproben und für jeden Stimulationsgrad 4 Uptake- und 4 Proteinproben mitgeführt. Wie in 3.6.1 und 3.6.2 beschrieben, wurde für jede Uptakeprobe ein Uptakewert in %/mg Protein errechnet.

Die weitere Auswertung erfolgte über Z-Scores. Dazu wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus allen bei einem Versuchsansatz gemessenen Uptakewerten gebildet.

Unabhängig von den Stimulationsgraden erhält man nun einen Mittelwert \bar{U} und eine Standardabweichung σ , mit der jeder einzelne Uptakewert U verglichen wird. Zunächst wird vom Uptakewert U der Mittelwert aller Uptakewerte \bar{U} abgezogen. Der Unterschied aus dieser Subtraktion wird durch die Standardabweichung aller Uptakewerte σ dividiert (siehe Gleichung 2).

$$\boxed{Z - Score = \frac{U - \bar{U}}{\sigma}}$$

Gleichung 2

Z-Score Gleichung: Diese Formel enthält den Uptakewert U der einzelnen Probe, sowie den Mittelwert \bar{U} und die Standardabweichung σ der Uptakewerte aller Stimulationsgrade

Der Z-Score gibt somit Auskunft darüber, um wie viele Standardabweichungen der einzelne Wert sich vom Mittelwert aller bei einem Versuchsansatz gemessenen Uptakewerte unterscheidet. Für jeden Versuch erhält man pro Stimulationsgrad 4 Z-Scores. Jeder Stimulationsversuch wurde dreimal an drei verschiedenen Tagen wiederholt, so dass insgesamt für jeden Stimulationsgrad 12 Werte existieren.

Der Z-Score relativiert die Einzelmessung jeweils auf einen Mittelwert des Versuchsansatzes. Dadurch lassen sich Messungen an den 3 verschiedenen Tagen, mit unterschiedlichen Tagesmittelwerten gemeinsam auswerten. Zugleich ist der Z-Score dem Uptakewertvergleich zur unstimulierten Kontrolle die man als 100% definiert insofern überlegen, dass auch die Datenvariabilität der Kontrolle eingesehen werden kann. Dies ist auch Grundlage für statistische Tests.

3.6.5 Zellvergleich – Tracervergleich

Die erhobenen Daten lassen sich entsprechend zweier Parameter bei der Datengewinnung zweidimensional auswerten. Die eine Dimension der Datengewinnung sind die verschiedenen Zelllinien die untersucht wurden, die andere Dimension sind die zwei Tracer, die eingesetzt wurden. Eine zweidimensionale Analyse beruht somit einerseits auf der Charakterisierung der verschiedenen Zelllinien und andererseits auf der Charakterisierung der Tracer [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin.

3.6.5.1 Zellvergleich

Zur Charakterisierung der verschiedenen Zelllinien werden die Traceruptakewerte verglichen. Dies geschieht zunächst durch eine Boxplotdarstellung. Eine zentrale Lage des Medianwertes im Boxplot weist auf normal verteilte Uptakewerte hin. Ergibt sich des weiteren keine statistische Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme (siehe Statistik 3.6.6.1), werden aus den 12 Einzelmessungen Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle errechnet und graphisch dargestellt. Nun kann man Aussagen darüber machen, welche Zelllinie vom jeweiligen Tracer mehr aufnimmt. Durch Paarvergleiche kann man statistisch testen, ob Unterschiede zwischen den Uptakewerten signifikant sind (siehe Statistik 3.6.6.1).

3.6.5.2 Tracervergleich

Durch den Versuchsaufbau der kombinierten Uptakeversuche, wobei von jeder Zelllinie zur gleichen Zeit der Uptake von [^3H]Cholin sowie [^{18}F]FDG bestimmt wurde, bietet es sich an, [^{18}F]FDG mit [^3H]Cholin zu vergleichen.

Bezogen auf eine Zelllinie ist ein direkter Uptakevergleich der zwei Tracer nicht möglich. Anhand der Uptakewerte kann man über eine Zelllinie keine Aussage darüber machen ob sie mehr [^{18}F]FDG oder [^3H]Cholin aufnimmt. Die aufgenommene Stoffmenge [^3H]Cholin in %/mg(Protein) kann man nicht mit der aufgenommenen Stoffmenge [^{18}F]FDG in %/mg(Protein) vergleichen um daraus Rückschlüsse zu ziehen, ob eine Zelllinie „gieriger“ nach dem einen oder dem anderen Tracer ist.

Dieses Problem kann man dadurch umgehen, dass man das Traceruptakeverhalten einer Zelllinie mit dem einer anderen vergleicht. Durch Errechnung eines Entzündungszell/Tumorzell Index (ETI) für die Tracer [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin kann man Aussagen darüber machen, wie selektiv ein Tracer von Entzündungszellen im Vergleich zu Tumorzellen aufgenommen wird.

Der ETI errechnet sich aus einer Division des Uptakemittelwertes einer Entzündungszelle (z.B. Makrophagen) durch den Uptakemittelwert einer Tumorzelle (z.B. PC-3 Zellen) des gleichen Tracers.

Der ETI ist somit von Tracer, Tumorzelle und Entzündungszelle abhängig und wird im Folgenden nur mit voranstehenden Entzündungs- und Tumorzellnamen und tiefgestellten Tracer nach folgendem Schema für z.B. Makrophagen, PC-3 Zellen und [^{18}F]FDG erwähnt:

Makrophagen zu PC-3 $\text{ETI}_{[^{18}\text{F}]\text{FDG}}$

Ein hoher ETI eines Tracers besagt, dass die untersuchte Entzündungszelle im Vergleich mit der Tumorzelle viel Aktivität aufnimmt und somit gieriger nach dem Tracer ist als eine Entzündungszelle mit einem niedrigen ETI des jeweiligen Tracers bezogen auf die gleiche Tumorzelle.

Bezogen auf die gleichen Entzündungszellen sowie Tumorzellen kann man nun den ETI für [^{18}F]FDG ($\text{ETI}_{[^{18}\text{F}]\text{FDG}}$) mit dem von [^3H]Cholin ($\text{ETI}_{[^3\text{H}]\text{Cholin}}$) vergleichen. Sofern die jeweiligen Tracer im gleichen Verhältnis in Entzündungszellen und Tumorzellen aufgenommen werden, sollten $\text{ETI}_{[^{18}\text{F}]\text{FDG}}$ und $\text{ETI}_{[^3\text{H}]\text{Cholin}}$ identisch sein. Dies gilt insbesondere auch aufgrund des Versuchsaufbaus der kombinierten Uptakeversuche, bei denen zur gleichen Zeit dieselben Zellen mit den jeweiligen Tracern inkubiert wurden. Ein Unterschied zugunsten eines Tracers A mit höheren ETI als der eines anderen Tracers B bedeutet, dass dieser Tracer A von der untersuchten Entzündungszelle im Verhältnis zur Tumorzelle vermehrt aufgenommen wird als Tracer B. Somit ist Tracer A weniger Tumorzellenselektiv als Tracer B.

Um [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin miteinander zu vergleichen, wurden sämtliche ETIs der Entzündungszellen bezogen auf die Tumorzelllinien LNCaP und PC-3 gebildet. Nach folgendem Schema wurden die faktoriellen Unterschiede der $\text{ETI}_{[^{18}\text{F}]\text{FDG}}$ und $\text{ETI}_{[^3\text{H}]\text{Cholin}}$ für hier beispielhaft Makrophagen und PC-3 Zellen berechnet.

Faktorieller Unterschied: $\frac{\text{Makrophagen zu PC - 3 Zellen ETI}_{\text{FDG}}}{\text{Makrophagen zu PC - 3 Zellen ETI}_{\text{H3 Cholin}}}$

Ein faktorieller Unterschied $\text{ETI}_{[^{18}\text{F}]\text{FDG}}$ zu $\text{ETI}_{[^3\text{H}]\text{Cholin}}$, dessen Konfidenzintervall die eins einschließt bedeutet somit, dass zwischen den zwei Tracern kein signifikanter Unterschied im Bezug auf Tumorzellselektivität besteht.

Ein faktorieller Unterschied $\text{ETI}_{[^{18}\text{F}]\text{FDG}}$ zu $\text{ETI}_{[^3\text{H}]\text{Cholin}}$, mit einem Wert signifikant größer als 1 bedeutet, dass $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ eine geringere Tumorzellselektivität aufweist als $[^3\text{H}]\text{Cholin}$. Die $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptakewerte der untersuchten Tumor- und Entzündungszellen liegen hierbei näher beisammen als die $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ -Uptakewerte der gleichen Zelle. Dies lässt vermuten, dass zwischen Erkrankungen, die für eine der untersuchten Entzündungs- und Tumorzelle charakteristisch sind, mittels FDG-PET in vivo weniger spezifisch unterschieden werden kann als mit Cholin-PET.

Umgekehrt gilt obiger Sachverhalt mit geringerer Tumorselektivität für $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ im Vergleich zu $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ bei faktoriellen Unterschieden signifikant kleiner als eins.

3.6.6 Statistik

3.6.6.1 Zelllinienvergleich

Um das Tracer-Uptakeverhalten der verschiedenen Zelllinien untereinander zu vergleichen wurde die Verteilung der 12 Einzelmessungen (siehe 3.6.1 und 3.6.2) auf Unterschiede getestet. Hierzu wurde vor der Testung zunächst die für parametrische Verfahren notwendige Annahme einer Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Ergab sich bei diesen Verteilungsprüfungen keine statistisch relevante Evidenz für die Ablehnung einer Normalverteilung (p-Wert Shapiro-Wilk-Test $>0,20$), wurde der Student T-Test gewählt um die Gruppen auf Unterschiede zu testen. Für alle statistischen Tests wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Um den Fehler 1. Art für multiples Testen zu korrigieren, wurde eine Bonferroni-Adjustierung der p-Werte vorgenommen.

3.6.6.2 Tracervergleich

Zur Quantifizierung des Verhältnisses von Traceruptake der Entzündungszellen zu Traceruptake der Tumorzellen wurden die entsprechenden Indices für die jeweiligen Tracer berechnet (siehe 3.6.5.2). Um die relativen Unterschiede dieser Indices zwischen den Tracern zu quantifizieren, wurden log-lineare Regressionsmodelle verwendet. Diese erlauben die Schätzung faktorieller Unterschiede in den Erwartungswerten der Indices für die einzelnen Tracer. Weiterhin wurden 95% Konfidenzintervalle für diese Effektgrößen berechnet, um die Unsicherheit der Schätzung bei der gegebenen Fallzahl und Datenvariabilität zum Ausdruck zu bringen.

3.6.6.3 Vergleich der Z-Scores

Wie beim Tumorzellvergleich wurde zuerst auf Normalverteilung getestet. Zeigte sich durch den Shapiro-Wilk Test keine statistische Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme, wurde der Student T-Test für Verteilungsvergleiche verwendet. Führte der Shapiro-Wilk Test zur Ablehnung der Normalverteilungsannahme, in mindestens einer der zu testenden Gruppen, wurde der Mann-Whitney U Test als äquivalentes nicht-parametrisches Testverfahren zum Vergleich der Gruppen angewandt. Die p-Werte wurden wie beim Tumorzellvergleich durch eine Bonferroni-Korrektur für multiples Testen adjustiert. Da bei CD3+ T-Lymphozyten, CD19+ B-Lymphozyten und CD15+ Granulozyten lediglich Paarvergleiche mit der Kontrollgruppe vorgenommen wurden, wurde eine Bonferroni-Korrektur in diesem Fall nicht vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Leukozytenisolation

Die mittels Dichtegradienten isolierten mononukleären Zellen und Granulozyten zeigten bei Pappenheim Kontrollfärbungen eine geringe Reinheit der zu isolierenden Zellen (hier nicht dargestellt). In Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum Rechts der Isar war es möglich, mittels Durchflusszytometrie große Blutbilder der isolierten Zellen anzufertigen.

Um die Reinheit der mononukleären Zellen über dem 1077 Dichtegradienten darzustellen wurden drei Zellisolationen vorgenommen. Mittels anschließend durchgeführter Durchflusszytometrie konnten anteilig die verschiedenen Entzündungszellfraktionen dargestellt werden (siehe Abb. 14 a). Der Anteil mononukleärer Zellen wie Lymphozyten und Monozyten beträgt hierbei jeweils 56% und 11%, während eine Verunreinigung durch Granulozyten mit über 30% festgestellt werden konnte. Ebenso wurde das Zellisolat über dem Dichtegradienten 1119 untersucht um die Reinheit der Granulozyten darzustellen (siehe Abb 14 b). Die Granulozytenisolaten ergaben eine Reinheit der Granulozyten von 85% und zeigte eine Verunreinigung durch Lymphozyten mit 10%. Die Lymphozyten und Granulozyten konnten in diesem Vorversuch nicht in der gewünschten Reinheit isoliert werden, weswegen die weitere Zellisolation mittels FACS vorgenommen wurde.

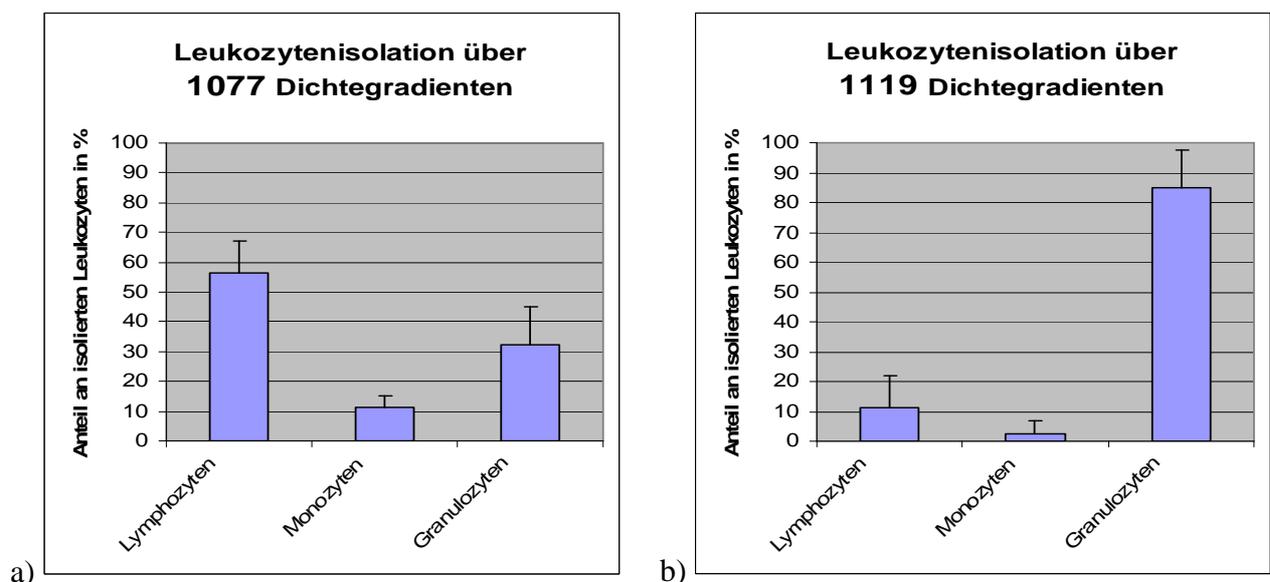


Abbildung 14:

Ergebnis der durchflusszytometrischen Bestimmung der Entzündungszellen über den Dichtegradienten. a) Isolierte Entzündungszellfraktionen über dem Dichtegradient 1077. b) isolierte Entzündungszellfraktionen über dem Dichtegradient 1119, bei Verwendung von 2 Dichtegradienten

4.1.2 [¹⁸F]FDG-Uptakevariabilität

Bevor der in dieser Arbeit bei allen Versuchen durchgeführte kombinierte [¹⁸F]FDG und [³H]Cholin-Uptakeversuch durchgeführt wurde, sind Uptakeversuche auch unkombiniert mit je einem einzelnen Tracer durchgeführt worden. Beim alleinigen [¹⁸F]FDG-Uptakeversuch wurden die Zellproben nach Inkubation mit [¹⁸F]FDG dreimal gewaschen und zuletzt ohne Überführung der Zellen in ein neues Eppendorfcup in den Gammacounter zur Aktivitätsbestimmung gestellt. Hierbei zeigten sich oft heftige Ausreißer. Es wurde vermutet, dass sich nicht in die Zellen aufgenommene Restaktivität am Eppendorfcup befindet, wo diese nicht durch Waschschrte entfernt werden kann (z.B. Deckel oder obere Bereiche des Eppendorfcups). Um dies zu überprüfen, wurden acht [¹⁸F]FDG-Uptakeproben mit LNCaP Zellen angefertigt. Vier dieser Proben wurden nach 3 maligem Waschen wie oben in den Gammacounter gestellt, während vier weitere dieser Proben nach dem dritten Waschen in 0,5 ml PBS resuspendiert und in neue Eppendorfcups überführt wurden. Anschließend wurden die leeren Eppendorfcups und die neuen Eppendorfcups zur Aktivitätsbestimmung in den Gammacounter gestellt. Tabelle 8 zeigt die für die neue Eppendorfcupproben (Probe neu), die leeren Eppendorfcups (Probe leer) und die ursprüngliche nicht überführte Probe (Probe alt) die am Gammacounter gemessenen counts per minute.

Tabelle 8:

Counts per minute der am Gammacounter gemessenen [¹⁸F]FDG Aktivität der nicht überführten Probe (Probe alt), der überführten Probe (Probe neu), der leeren Eppendorfcups (Probe leer). Die zugesetzte [¹⁸F]FDG Aktivität lässt sich durch die counts per minute der Standards bestimmen.

[¹⁸ F]FDG Aktivität in cpm			
Probe alt	Probe neu	Probe leer	Standards
2100	1548	3438	6647552
1971	1474	285	6689465
8979	1231	547	6773930
2139	1642	571	6775670

Die Messwerte der nicht überführten Proben (Probe alt) zeigen einen hohen Ausreißer. Ein extremer Ausreißer befindet sich bei den Messungen der überführten Probe (Probe neu) nicht. Zugleich zeigt jedoch eine Probe der Eppendorfcups ohne Zellen außergewöhnlich hohe counts per minute. Somit bestätigt sich der Verdacht, dass für die extremen Ausreißer beim [¹⁸F]FDG-Uptakeversuch in dem Versuchseppendorfcup zurückgebliebene Aktivität verantwortlich ist.

Dadurch, dass bei der Versuchsdurchführung des kombinierten Uptakeversuchs alle Proben in ein neues Eppendorfcup überführt werden bevor sie in den Gammacounter gestellt werden (siehe Methodik 3.4), wird Restaktivität, die am alten Eppendorfcup verbleibt, nicht mitgemessen.

4.1.3 [¹⁸F]FDG-Uptake Charakterisierung

Um Einflussgrößen auf den [¹⁸F]FDG-Uptake in die Zellen zu kennen und um diese konstant zu halten, wurden folgende drei Vorversuche durchgeführt.

4.1.3.1 Aktivitätsverdünnungsreihe

Da ¹⁸F ein relativ kurzlebige Radionuklid ist und vom Zeitpunkt der Herstellung des radioaktiven Versuchspuffercocktails bis zum Beginn des Uptakeversuchs immer unterschiedlich viel Zeit vergeht, wird man niemals die exakten 10 µCi (0,370 MBq) [¹⁸F]FDG, wie im Methodikteil unter 3.4.2 gefordert, zum Versuchsbeginn der Zellprobe zuführen können. Ob prozentual bei unterschiedlichen Ausgangsaktivitäten jedoch das Verhältnis zwischen aufgenommener und eingesetzter [¹⁸F]FDG Aktivität gleich bleibt, sollte durch folgenden Versuch geklärt werden.

Die Ausgangsaktivität wurde hierzu dreimal im Verhältnis 1:1 verdünnt, so dass in 12 Eppendorfcups dreimal die [¹⁸F]FDG Aktivität 60 µCi (2,22 MBq), dreimal 30 µCi (1,11 MBq), dreimal 15 µCi (0,56 MBq) und dreimal 7,5 µCi (0,28 MBq) vorgelegt wurden. Dies insgesamt für Zellproben und Standardproben in doppelter Ausführung. Als Zellen wurden für diesen Versuch ungefähr $3 \cdot 10^5$ mononukleäre Zellen verwendet, die nach [¹⁸F]FDG Inkubation in glukosefreien Versuchspuffer und den Waschsritten in den Gammacounter zur Aktivitätsmessung gegeben wurden. Ebenso wurde die Aktivität der Standardprobe bestimmt. Abb. 15 zeigt die Mittelwerte der counts per minute der Proben mit den vier unterschiedlichen [¹⁸F]FDG Ausgangsaktivitäten. Mit Halbierung der Ausgangsaktivität halbieren sich die am Gammacounter gemessenen counts per minute ebenfalls. Werden die counts per minute in Relation zu den ebenfalls am Gammacounter gemessenen Ausgangsaktivitäten der Standardproben gestellt, so bleibt der prozentuale [¹⁸F]FDG-Uptake konstant (siehe Abb. 16). Dies ist die Grundlage für die im Folgenden durchgeführten Uptakeversuche und bedeutet, dass eine Schwankung der Aktivität um die 10 µCi (0,370 MBq) pro Eppendorfcup, wie im

Methodikteil gefordert, keine Auswirkung auf die [¹⁸F]FDG-Uptakeraten habe, sofern sich diese als Prozentwert der Ausgangsaktivität errechnen.

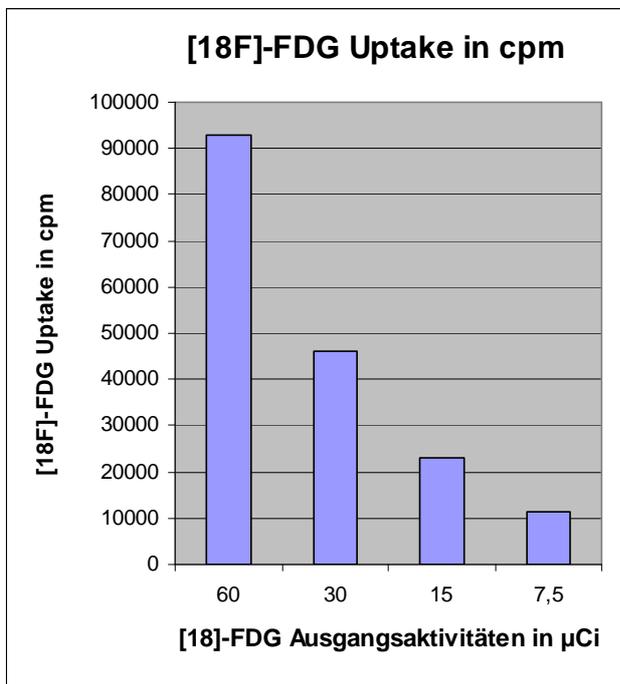


Abbildung 15:

Mittelwerte der Dreifachmessungen der [¹⁸F]FDG-Aufnahme in cpm bei $3 \cdot 10^5$ MNCs in Abhängigkeit der Ausgangsaktivitäten 60 μCi (2,22 MBq), 30 μCi (1,11 MBq), 15 μCi (5,56 MBq) und 7,5 μCi (0,28 MBq).

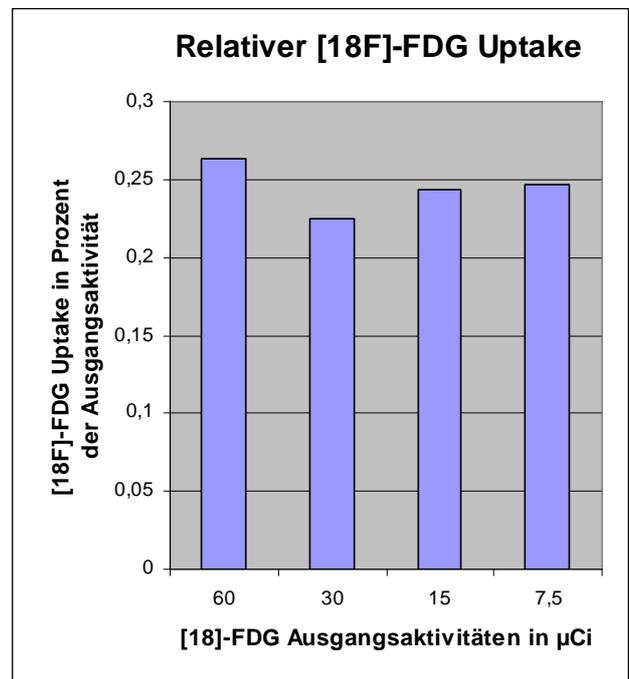


Abbildung 16:

Verhältnis der Mittelwerte der drei Zellproben zu den Mittelwerten der drei Standardproben in Prozent in Abhängigkeit der Ausgangsaktivitäten 60 μCi (2,22 MBq), 30 μCi (1,11 MBq), 15 μCi (5,56 MBq) und 7,5 μCi (0,28 MBq).

4.1.3.2 Glukoseverdünnungsreihe

Um den Einfluss der Glukosekonzentration auf den [¹⁸F]FDG-Uptake zu überprüfen, wurden ein Versuchspuffer ohne Glukose und ein Versuchspuffer mit 5 mmol/l hergestellt. Ein Teil des Versuchspuffers mit 5 mmol/l Glukose wurde dreimal im Verhältnis 1:3 in Versuchspuffer ohne Glukose verdünnt, so dass 4 Versuchspuffer mit den Glukosekonzentrationen 5 mmol/l, 1,67 mmol/l, 0,56 mmol/l und 0,19 mmol/l entstehen. Mit dem Versuchspuffer der Glukosekonzentration 0 mmol/l stehen somit 5 Versuchspuffer zur Verfügung, in die in der Vorbereitung des Uptakeversuchs ungefähr $3 \cdot 10^5$ mononukleäre Zellen als Dreifachbestimmung vorgelegt wurden. Durch Zugabe von [¹⁸F]FDG wurde der Uptakeversuch gestartet.

Abb. 17 zeigt den [¹⁸F]FDG-Uptake der jeweils 3·10⁵ MNCs, die sich zum Zeitpunkt der [¹⁸F]FDG Inkubation in den verschiedenen Versuchspuffern befanden. Zellen, die im Versuchspuffer mit hohen Glukosekonzentrationen inkubiert wurden, zeigen einen deutlich geringeren [¹⁸F]FDG-Uptake als diejenigen mit niedrigeren Glukosekonzentrationen im Versuchspuffer. Bei Zellen, die in einem Versuchspuffer inkubiert wurden, der keine Glukose enthielt, ist der [¹⁸F]FDG-Uptake maximal.

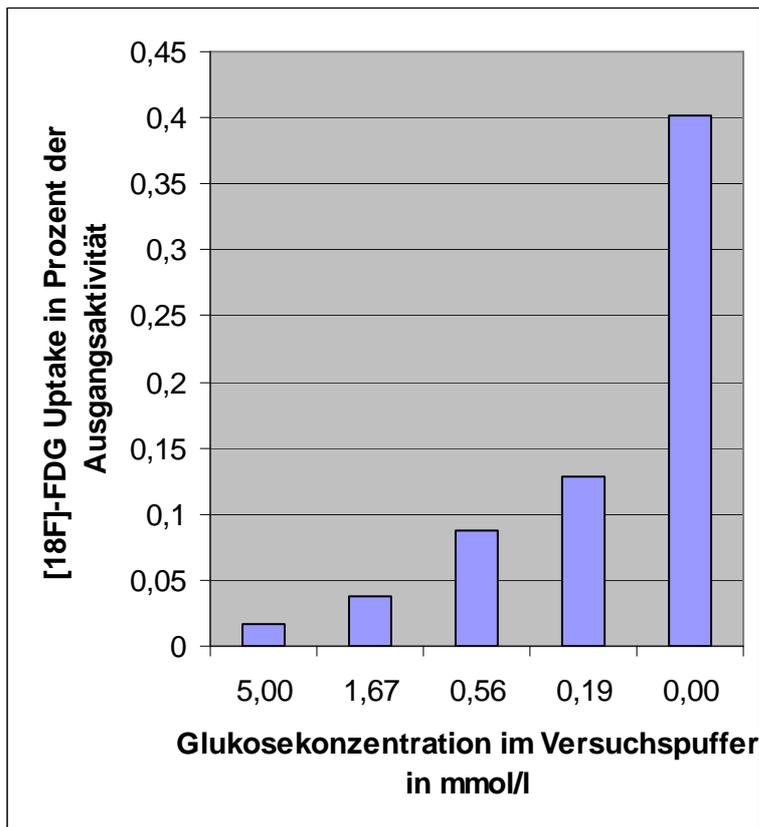


Abbildung 17:

Mittelwerte des [¹⁸F]FDG-Uptakes aus Dreifachbestimmungen in Prozent der Ausgangsaktivität in Abhängigkeit der Glukosekonzentration im Versuchspuffer

Dieser Sachverhalt zeigt noch einmal, wie wichtig es ist, die Glukosekonzentration bei den [¹⁸F]FDG-Uptakeversuchen konstant zu halten. Dies erforderte bei Neumischung eines Versuchspuffers größte Sorgfalt, um die Glukosekonzentration möglichst exakt einzustellen. Auch sollte ein glukosehaltiger Versuchspuffer nicht zu alt sein.

4.1.3.3 Zellzahlverdünnungsreihe

Ein Zusammenhang zwischen Zellzahl in den Eppendorfcups und [¹⁸F]FDG-Uptake wurde durch eine Zellzahlverdünnungsreihe und anschließenden [¹⁸F]FDG-Uptakeversuch überprüft. Zugleich sollte bei diesem Versuch durch eine sehr hohe Zellzahl in der ersten Verdünnungsstufe und die Inkubation der Zellen in glukosefreien Medium die [¹⁸F]FDG-Aufnahme maximiert werden. Hierzu wurden $5 \cdot 10^6$ mononukleäre Zellen dreimal im Verhältnis 1:3 verdünnt, sodass die vier Zellzahlen $5 \cdot 10^6$ Zellen, $1,67 \cdot 10^6$ Zellen, $0,56 \cdot 10^6$ Zellen und $0,19 \cdot 10^6$ Zellen in 12 Eppendorfcups als Dreifachbestimmung vorlagen. Die Uptakewerte der jeweiligen Zellzahlen errechnen sich aus aufgenommener Aktivität zu eingesetzter Ausgangsaktivität und sind als Prozentwerte in Abb. 18 dargestellt. Es zeigt sich, dass bei jeder Zellzahl, die 1/3 weniger Zellen als die vorausgehende Zellzahl enthält, auch die [¹⁸F]FDG Werte in cpm nur noch 1/3 betragen.

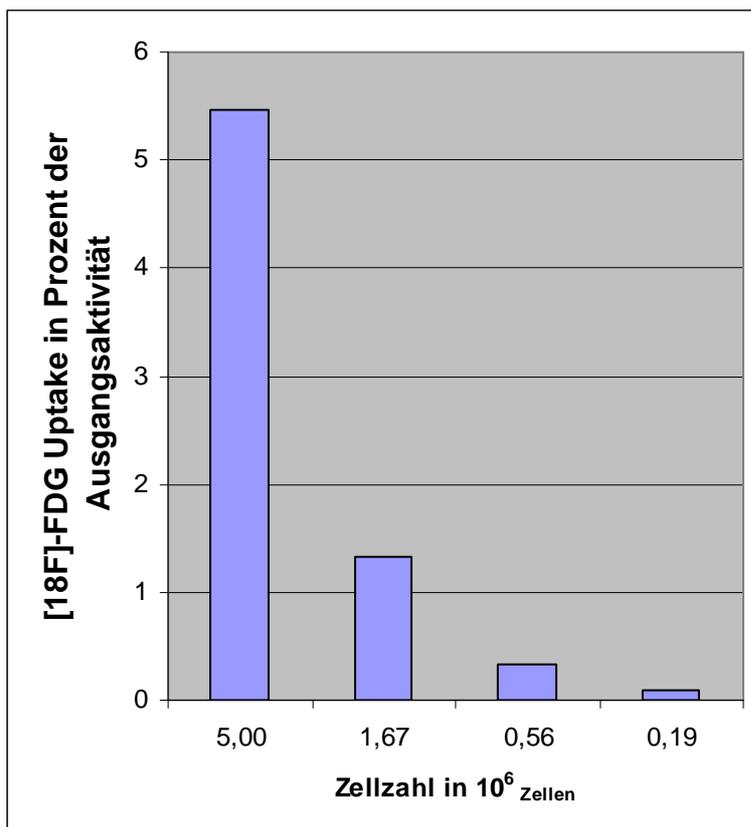


Abbildung 18:

Mittelwerte des [¹⁸F]FDG-Uptakes aus Dreifachbestimmungen in Prozent der Ausgangsaktivität in Abhängigkeit der MNCs Zellzahl zu Beginn des Versuches

4.1.4 Kombiniertes Uptake - Zellverdopplung

Bevor sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit der Methode des kombinierten Uptakeversuches durchgeführt wurden, sollte dieses Verfahren durch einen Vorversuch getestet werden. Hierbei wurde vom kombinierten Uptakeversuch erwartet, dass sich bei Zellverdopplung die Traceraufnahme von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ und $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ ebenfalls verdoppelt. Zugleich sollte durch die Errechnung der Traceruptakewerte wie im Methodikteil unter 3.6.1. und 3.6.2 beschrieben, durch Division des prozentualen Uptakes durch die Proteinmenge der Proben, kein Unterschied zwischen den Traceruptakewerten bei Verdopplung der Zellzahl bestehen. Der Versuch wurde mit $1 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^5$ LNCaP-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse des $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptakes sind in Abb. 19 dargestellt, die des $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ -Uptakes in Abb. 20. Bei beiden Tracern war es möglich, durch Zellverdopplung die Traceraufnahme zu verdoppeln. Wie Abb. 19 und Abb. 20 zeigen, konnte durch Division des prozentualen Uptakes durch die Proteinmenge der Proben der Uptakewert in %/mg Protein konstant gehalten werden. Der geringe Unterschied zwischen den Traceruptakewerten in Abb. 19 und Abb. 20 von $1 \cdot 10^5$ Zellen zu $2 \cdot 10^5$ Zellen ist im Bereich der üblichen Variabilität der Uptakeversuche.

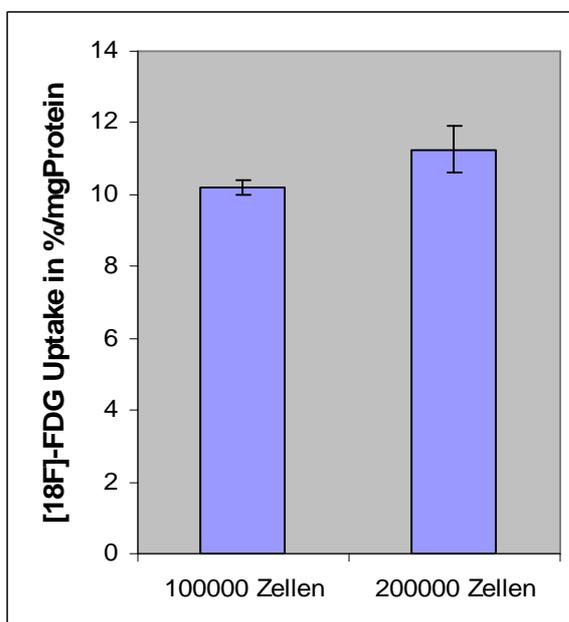


Abbildung 19:

Mittelwert und Standardabweichung des $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptakes aus einem Vierfachansatz bei $1 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^5$ Zellen.

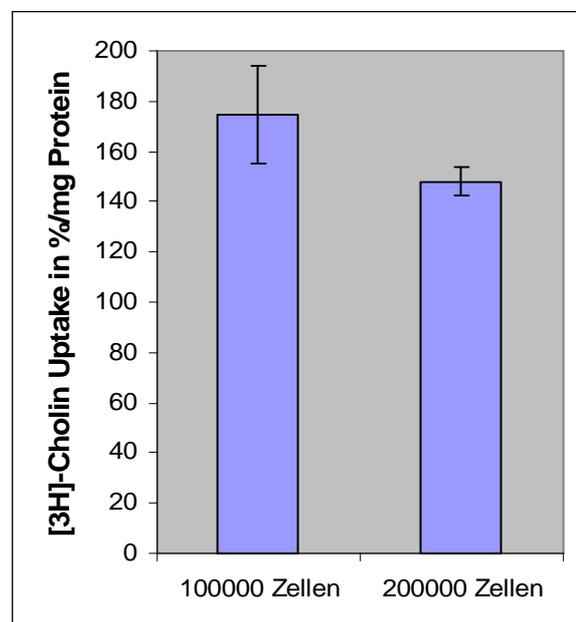


Abbildung 20:

Mittelwert und Standardabweichung des $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ -Uptake aus einem Vierfachansatz bei $1 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^5$ Zellen.

4.1.5 Probestimulation der mononukleären Zellen mit ConA

Um für die Stimulation der mononukleären Zellen und Lymphozyten die optimale ConA-Konzentration herauszufinden, wurden mononukleäre Zellen mit ConA in den Konzentrationen zu 0 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ und 250 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen unter dem Mikroskop dargestellt (siehe Abb. 21), bevor anschließend ein [^{18}F]FDG-Uptakeversuch durchgeführt wurde.

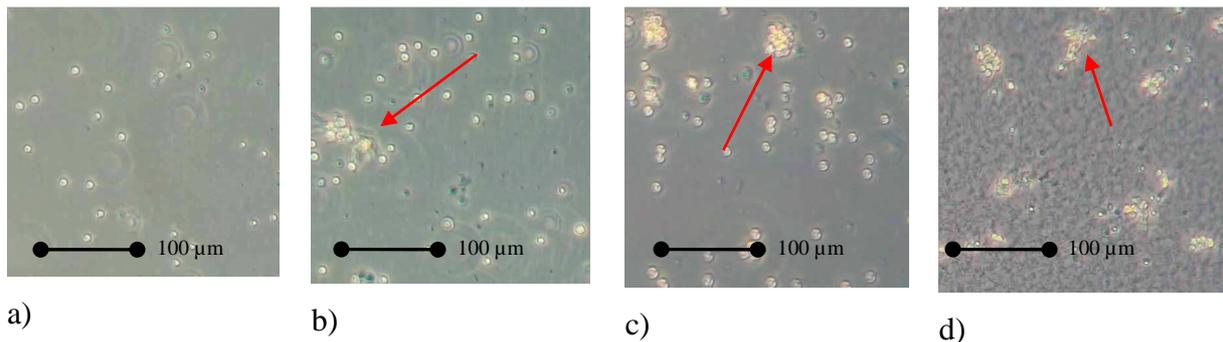


Abbildung 21:

Darstellung unstimulierter a), sowie in ConA 1 $\mu\text{g/ml}$ b), 50 $\mu\text{g/ml}$ c) und 250 $\mu\text{g/ml}$ d) stimulierter mononukleärer Zellen. Eine Zellclusterung (rote Pfeile) zeigen die mit ConA-stimulierten Zellen in b) c) und d)

Unter dem Mikroskop konnte bei den in Suspension befindlichen mononukleären Zellen die in Abb. 21 dargestellte Zellclusterung beobachtet werden. Diese Zellcluster waren bei der Stimulationskonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ so stark ausgeprägt, dass diese Cluster durch Resuspendieren nicht zu lösen waren. Eine genaue Zellzählung in der Neubauerzählkammer war dadurch nicht mehr möglich (siehe Abb. 22)

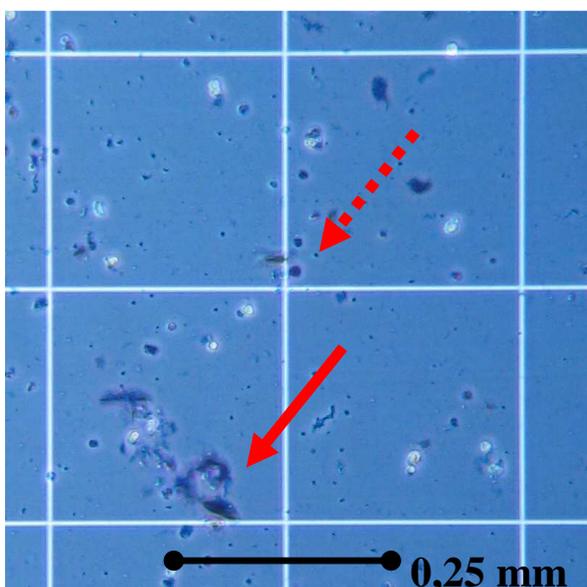


Abbildung 22:

Mononukleäre Zellen nach 24h Stimulation mit 250 $\mu\text{g/ml}$ ConA unter der Neubauerzählkammer mit Trypanblaufärbung. Neben den vereinzelt vitalen Zellen sind unresuspendierbare Zellcluster (durchgezogener roter Pfeil) und viele mit Trypanblau gefärbte tote Zellen zu erkennen (gepunkteter roter Pfeil).

Der Uptakeversuch mit [¹⁸F]FDG ergab für den Stimulationsgrad 250 µg/ml sehr geringe Uptakeraten (siehe Abb. 23). Eine Ursache hierfür sind die bei dieser Stimulationsstufe zahlreich vorkommenden toten Zellen. Aufgrund dieses Vorversuches wurde keine Zellstimulation mit ConA-Konzentrationen über 50 µg/ml durchgeführt.

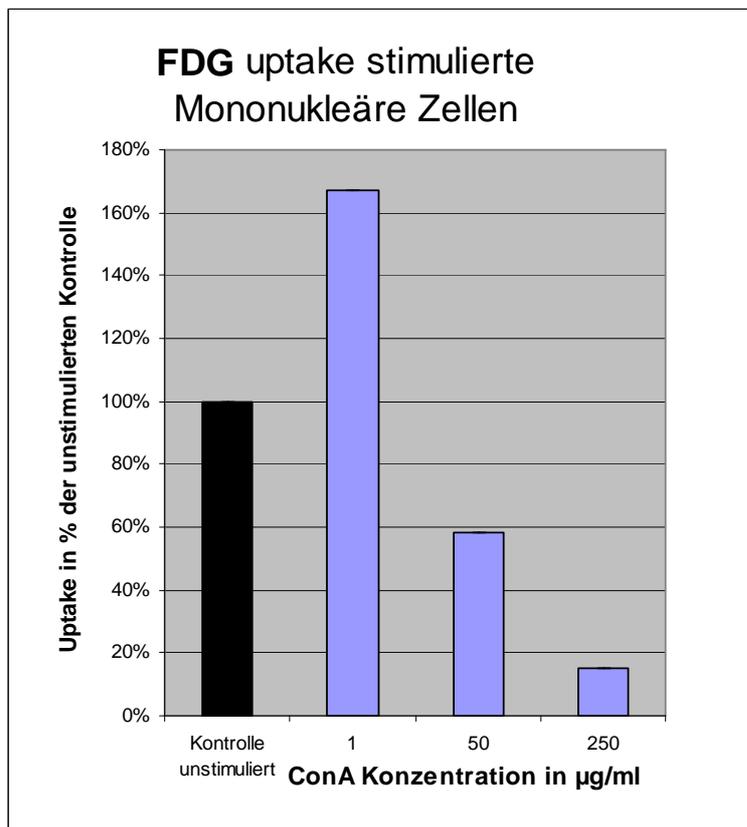


Abbildung 23:

[¹⁸F]FDG-Uptake stimulierter (ConA 1 µg/ml, 50 µg/ml und 250 µg/ml) mononukleärer Zellen in % der unstimulierten Kontrolle

4.2 [¹⁸F]FDG und [³H]Cholin-Uptake der Zelllinien

4.2.1 [¹⁸F]FDG-Uptake

4.2.1.1 Zelllinienvergleich

Zur Sichtung der [¹⁸F]FDG-Uptakewerte der einzelnen Zelllinien wird zunächst eine Boxplottdarstellung gewählt (Abb. 24). Hierbei stellt sich der Medianwert, der die Messwerte in zwei Hälften teilt, als Strich in der Box dar. Die Box definiert sich durch die obere und untere Quartile und vereinigt in ihrer Höhe 50% der Messwerte. Anhand der Antennen (Whiskers) und zusätzlich markierten Ausreißerwerten kann man in der Boxplottdarstellung die Streuung der Daten nachvollziehen.

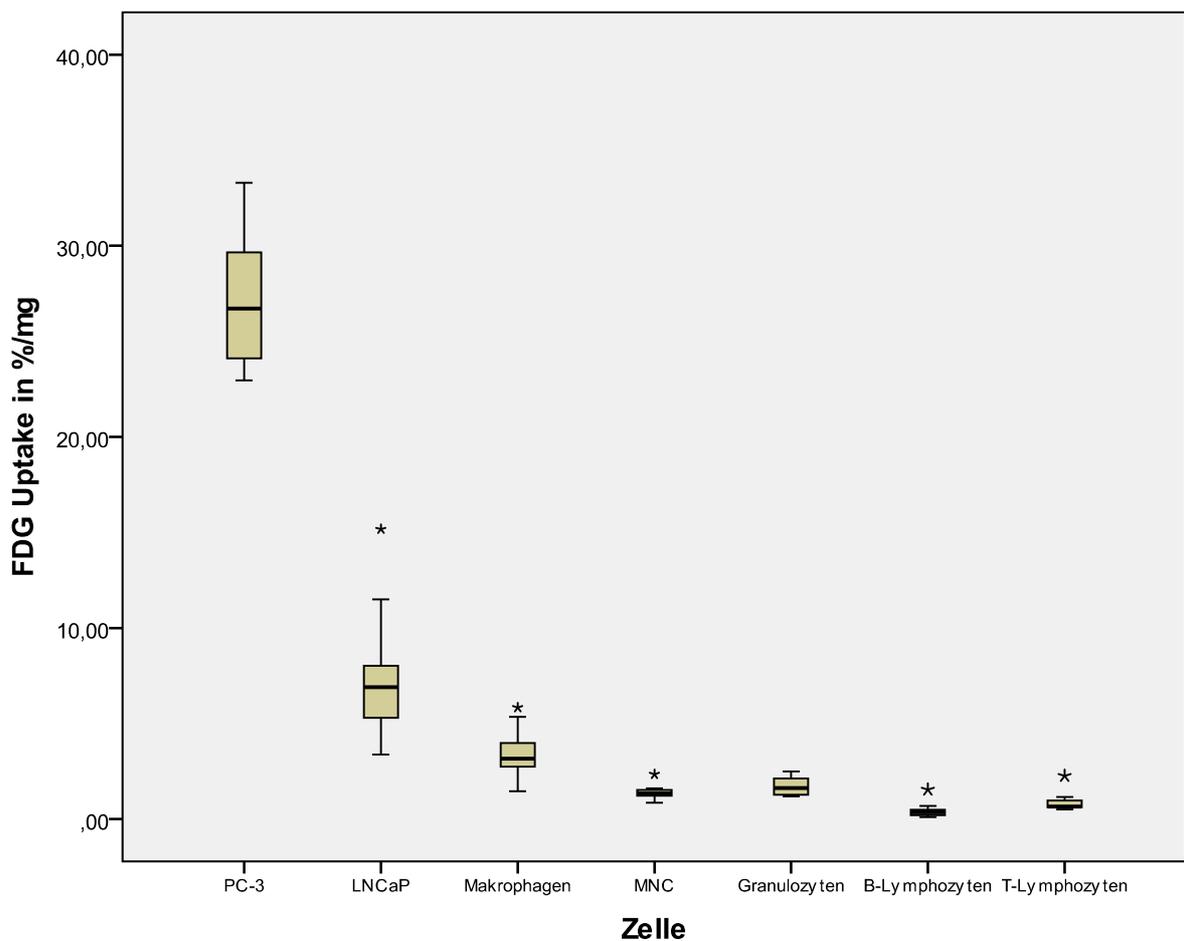


Abbildung 24:

Boxplotdarstellung der [¹⁸F]FDG-Uptakewerte in %/mg Protein von PC-3 Zellen, LNCaP Zellen, Makrophagen, MNCs, Granulozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten.

In Abb. 24 lässt die zentrale Projektion der Medianwerte in die Boxen eine Normalverteilung vermuten. Trotz breiter Streuung und einzelner Ausreißer (siehe Abb. 24), ergab die Statistische Testung keine Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme, sodass die Uptakewerte als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall dargestellt werden können (siehe Abb. 25 und Tabelle 9). In der Darstellung der Uptake-Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervall beschreiben die Fehlerbalken den Bereich, in dem zu 95% Wahrscheinlichkeit der wahre $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptakewert der jeweiligen Zelllinie liegt. Die höchsten $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptakewerte zeigen hierbei die PC-3 Zellen gefolgt von den LNCaP Zellen und Makrophagen. Die kleinen Leukozyten wie MNCs, Granulozyten und Lymphozyten zeigen einen geringeren $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptake (siehe Abb. 25).

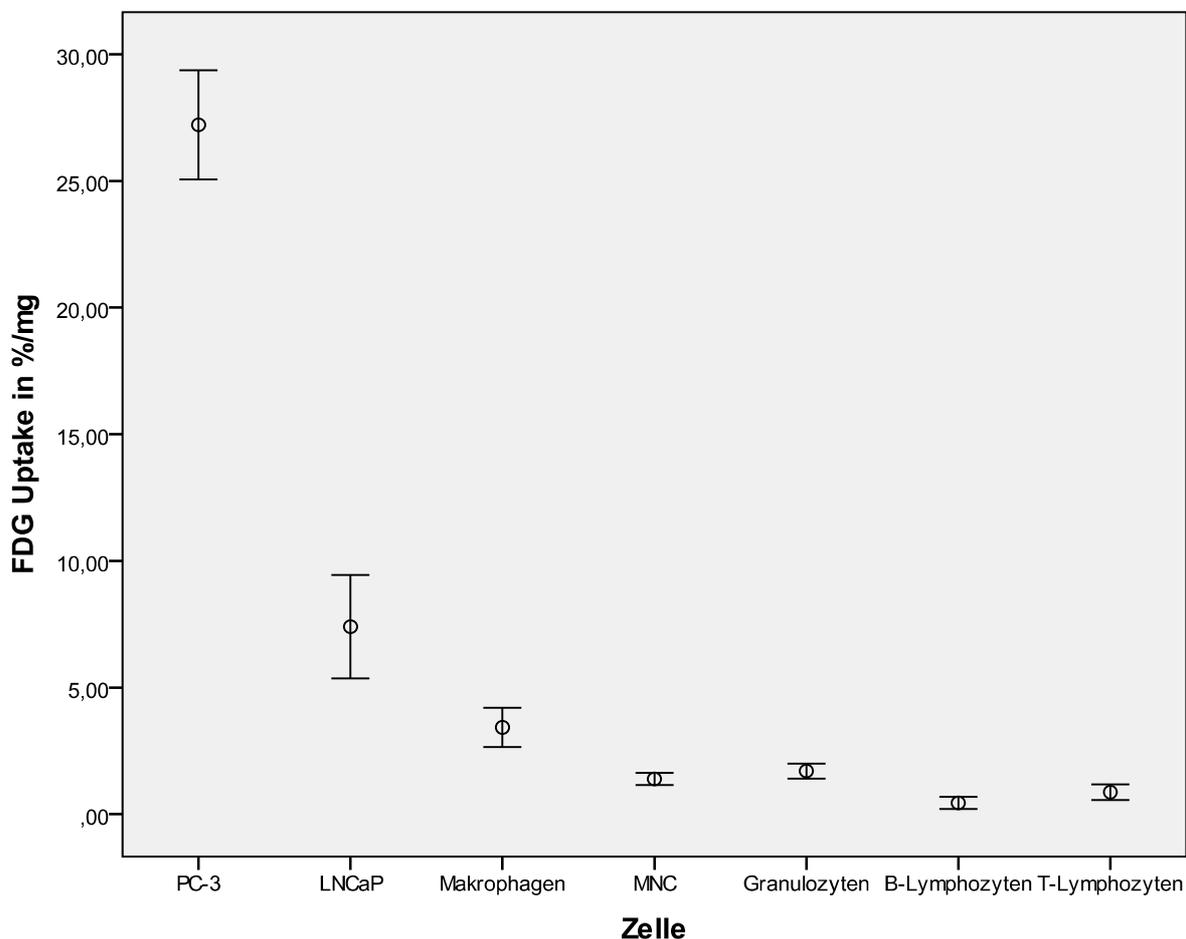


Abbildung 25:

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Uptakewerte in %/mg Protein von PC-3 Zellen, LNCaP Zellen, Makrophagen, MNCs, Granulozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten

Tabelle 9:

Mittelwerte und 95% KI der [¹⁸F]FDG- Uptakewerte der verschiedenen Zelllinien in %/mg Protein

Zelllinie	Mittelwert	95% Konfidenzintervall Untergrenze	95% Konfidenzintervall Obergrenze
PC-3	27,22	25,06	29,37
LNCaP	7,41	5,37	9,44
Makrophagen	3,43	2,65	4,20
MNC	1,39	1,16	1,63
Granulozyten	1,70	1,41	2,00
B-Lymphozyten	0,45	0,20	0,69
T-Lymphozyten	0,87	0,56	1,18

Durch statistische Testung auf Unterschiede (siehe Statistik 3.6.6.1), kann man im Paarvergleich Aussagen darüber machen, welche Zelllinie mehr [¹⁸F]FDG aufnimmt. Die Tabelle mit den zahlreichen Paarvergleichen befindet sich im Anhang A-1.

Hierbei zeigt sich, dass die PC-3 Zellen im Vergleich zu allen anderen Zelllinien signifikant am meisten [¹⁸F]FDG aufnehmen. Auch nehmen die LNCaP Zellen mehr [¹⁸F]FDG auf als jede der Entzündungszelllinien. Die aus Abb. 25 hervorgehende erhöhte [¹⁸F]FDG-Aufnahme der Makrophagen gegenüber den mononukleären Zellen und Granulozyten stellt sich als nicht signifikant dar. Gegenüber den B- und T- Lymphozyten nehmen die Makrophagen jedoch signifikant mehr [¹⁸F]FDG auf. Unter den kleinen Leukozyten wie Granulozyten, Lymphozyten und mononukleären Zellen sind die Unterschiede im Aufnahmeverhalten, wie sie aus Tab.9 und Abb. 25 hervorgehen, nicht signifikant.

4.2.1.2 Entzündungszell/Tumorzell Index (ETI) für [¹⁸F]FDG

4.2.1.2.1 LNCaP ETI_{[¹⁸F]FDG}

Wie im Methodikteil unter 3.6.5.2 beschrieben, werden die LNCaP ETIs für den Tracer [¹⁸F]FDG gebildet. Abb. 26 und Tab. 10 zeigen einmal tabellarisch und einmal graphisch den LNCaP ETI_{[¹⁸F]FDG} der verschiedenen Entzündungszellen. Makrophagen zeigen hierbei mit dem 0,46-fachen (46%) des LNCaP [¹⁸F]FDG-Uptakes den höchsten ETI. Den geringsten ETI zeigen die Lymphozyten mit dem ungefähr 0,1-fachen (~10%) des LNCaP [¹⁸F]FDG-Uptakes.

Tabelle 10:

Tabellarische Darstellung der LNCaP $ETI_{[18F]FDG}$ für die verschiedenen Entzündungszellen

Entzündungszelle	Entzündungszell LNCap Index
Makrophagen	0,46
MNC	0,19
Granulozyten	0,23
B-Lymphozyten	0,06
T-Lymphozyten	0,12

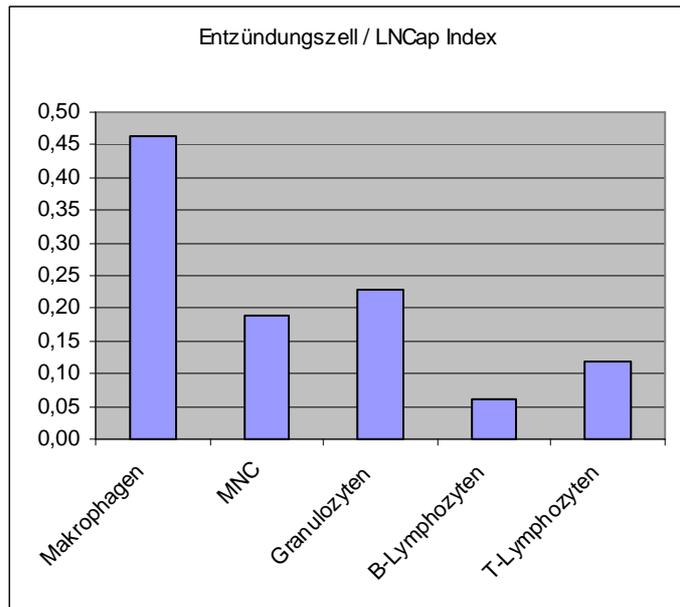


Abbildung 26:

Graphische Darstellung der LNCaP $ETI_{[18F]FDG}$ für die verschiedenen Entzündungszellen

4.2.1.2.2 PC-3 $ETI_{[18F]FDG}$

Wie für die LNCaP Zellen werden ebenfalls für die PC-3 Zellen die ETIs für die verschiedenen Entzündungszellen berechnet und als Tabelle 11 und Abbildung 27 dargestellt. Aufgrund der hohen Uptakeraten der PC-3 Zellen (siehe Abb. 25) fallen die PC-3 $ETI_{[18F]FDG}$ niedriger aus, sodass der Makrophagen/PC-3 $ETI_{[18F]FDG}$ als höchster ETI nur 0,13 beträgt. Der $[18F]FDG$ -Uptake von Makrophagen beträgt somit 13% des PC-3 Uptakes

Tabelle 11:

Tabellarische Darstellung der PC-3 ETIs_{[18F]FDG} für die verschiedenen Entzündungszellen

Entzündungszelle	Entzündungszell zu PC-3 Index
Makrophagen	0,13
MNC	0,05
Granulozyten	0,06
B-Lymphozyten	0,02
T-Lymphozyten	0,03

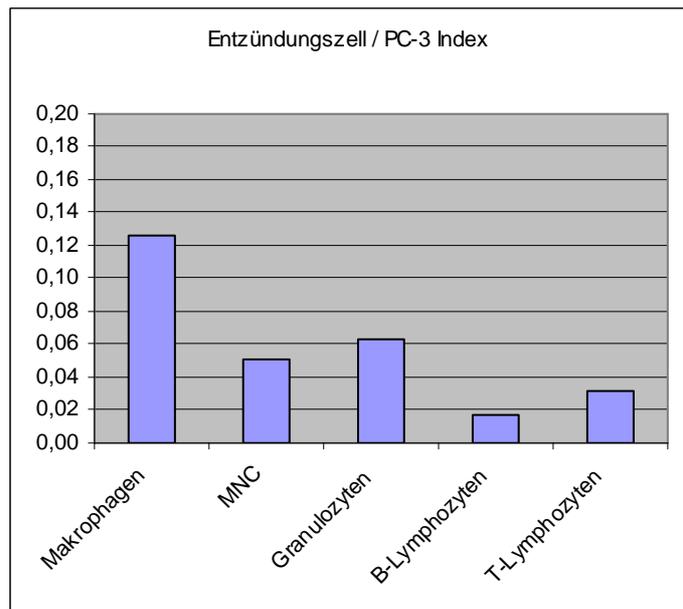


Abbildung 27:

Graphische Darstellung der PC-3 ETIs_{[18F]FDG} für die verschiedenen Entzündungszellen

4.2.2 [³H]Cholin-Uptake

4.2.2.1 Zelllinienvergleich

Wie schon beim [¹⁸F]FDG-Uptake werden auch beim [³H]Cholin-Uptake die Daten zunächst in einer Boxplotdarstellung gesichtet (siehe Abb. 28). Eine große Box wie bei den Uptakewerten der PC-3 Zellen weist auf eine hohe Streubreite hin. Zugleich zeigen sich bei den LNCaP Uptakewerten extreme Ausreißer. Die meist mittig in der Box liegenden Medianwerte weisen auf normalverteilte Uptakewerte hin. Die höchsten Uptakewerte zeigen die PC-3 Zellen. LNCaP Zellen und Makrophagen nehmen in ähnlicher Menge mehr [³H]Cholin auf als die kleinen Leukozyten.

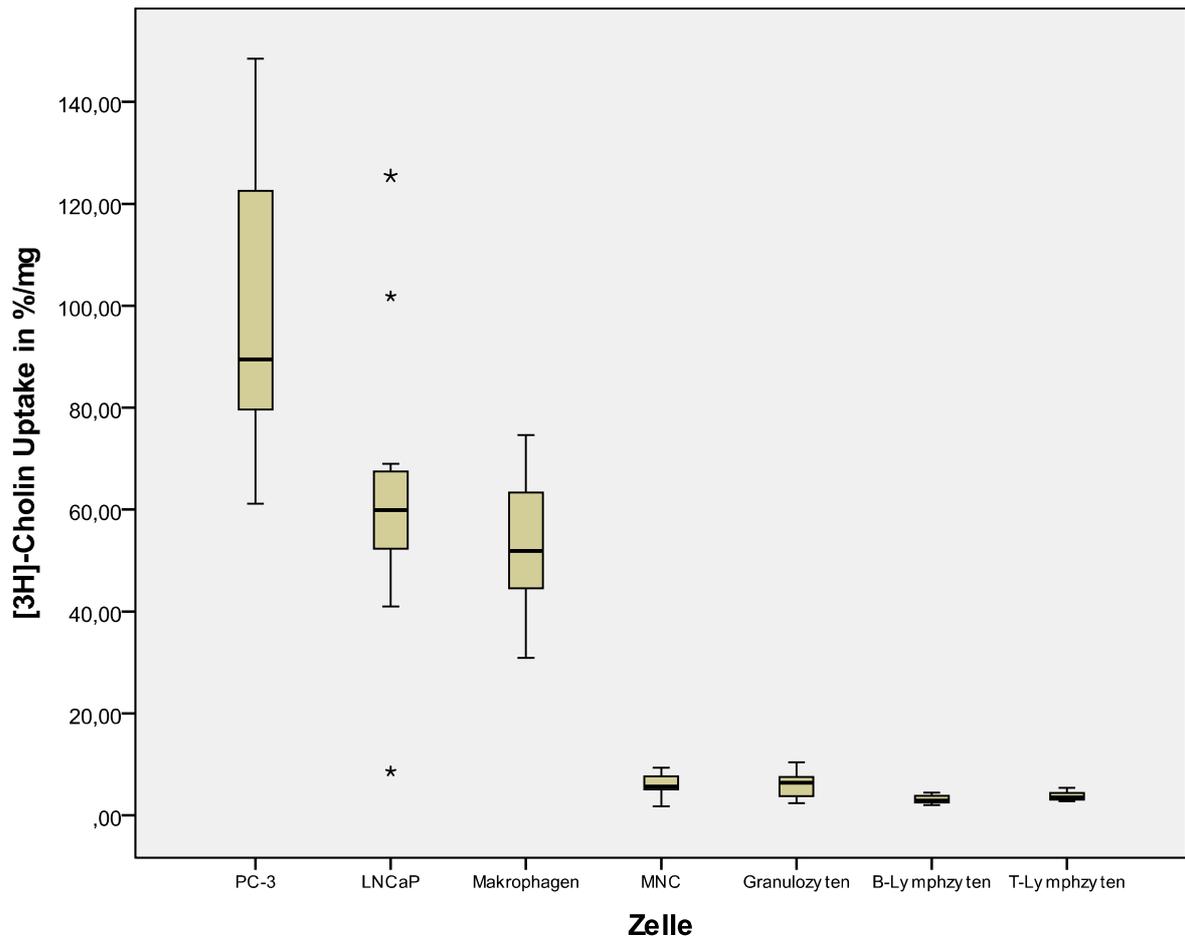


Abbildung 28:

Boxplotdarstellung der $[^3\text{H}]$ Cholin-Uptakewerte in %/mg Protein von PC-3 Zellen, LNCaP Zellen, Makrophagen, MNCs, Granulozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten.

Da nach statistischer Testung keine Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme vorliegt, können zur weiteren Auswertung die Uptake-Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervallen errechnet werden (siehe Tab. 12 und Abb. 29). Überschneidende Konfidenzintervalle wie bei LNCaP Zellen und Makrophagen zeigen hierbei schon vor weiterer statistischer Testung, dass keine signifikant unterschiedlichen Uptakemittelwerte zwischen diesen Zellen vorliegen.

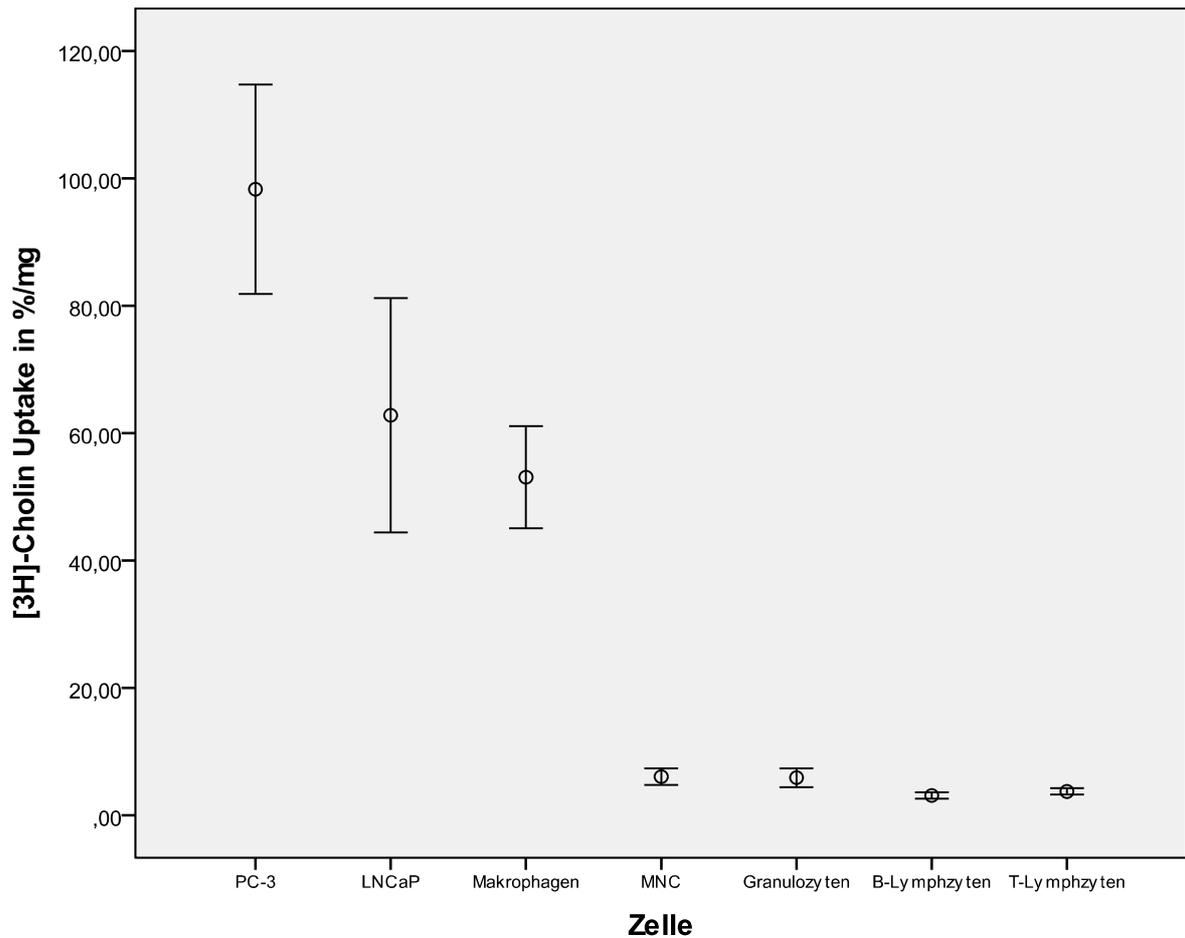


Abbildung 29:

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle der [³H]Cholin-Uptakewerte in %/mg Protein von PC-3 Zellen, LNCaP Zellen, Makrophagen, MNCs, Granulozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten

Tabelle 12

Mittelwerte und 95% KI der [³H]Cholin-Uptakewerte der verschiedenen Zelllinien in %/mg Protein

Zelllinie	Mittelwert	95% Konfidenzintervall Untergrenze	95% Konfidenzintervall Obergrenze
PC-3	98,29	81,83	114,74
LNCaP	62,79	44,41	81,17
Makrophagen	53,09	45,05	61,13
MNC	6,07	4,77	7,38
Granulozyten	5,92	4,44	7,39
B-Lymphozyten	3,12	2,60	3,64
T-Lymphozyten	3,75	3,25	4,26

Durch Paarvergleiche wurde auf Unterschiede zwischen den [³H]Cholin-Uptakewerten der Zelllinien getestet. Aus der im Anhang A-2 befindlichen Tabelle mit multiplen Paarvergleichen wird ersichtlich, dass die PC-3 Zellen signifikant mehr [³H]Cholin aufnehmen als alle anderen Zellen. LNCaP und Makrophagen nehmen signifikant mehr [³H]Cholin auf als die kleinen Entzündungszellen. Zugleich besteht aber zwischen den Makrophagen und LNCaP Zellen kein signifikanter Unterschied. Der in Tab. 12 dargestellte unterschiedliche [³H]Cholin-Uptake zwischen den mononukleären Zellen, Granulozyten und Lymphozyten ist nicht signifikant.

4.2.2.2 Entzündungszell/Tumorzell Index (ETI) für [³H]Cholin

4.2.2.2.1 LNCaP ETI_{[³H]Cholin}

Die Darstellung der LNCaP ETIs für den Tracer [³H]Cholin zeigt noch einmal sehr deutlich wie Makrophagen im Verhältnis zur LNCaP Tumorzelle ähnlich viel [³H]Cholin aufnehmen (siehe Abb. 30 und Tab. 13). Während Makrophagen einen wesentlich höheren LNCaP ETI_{[³H]Cholin} aufweist als LNCaP ETI_{[¹⁸F]FDG} (siehe Abb. 26), sind die ETI_{[³H]Cholin} der kleinen Entzündungszellen eher niedriger als bei [¹⁸F]FDG. Eine ausführlichere Abhandlung dieses Sachverhaltes findet sich im Kapitel 4.2.3 Tracervergleich.

Tabelle 13:

Tabellarische Darstellung der LNCaP ETI_{[³H]Cholin} für die verschiedenen Entzündungszellen

Entzündungszelle	Entzündungszell / LNCaP Index
Makrophagen	0,85
MNC	0,10
Granulozyten	0,09
B-Lymphozyten	0,05
T-Lymphozyten	0,06

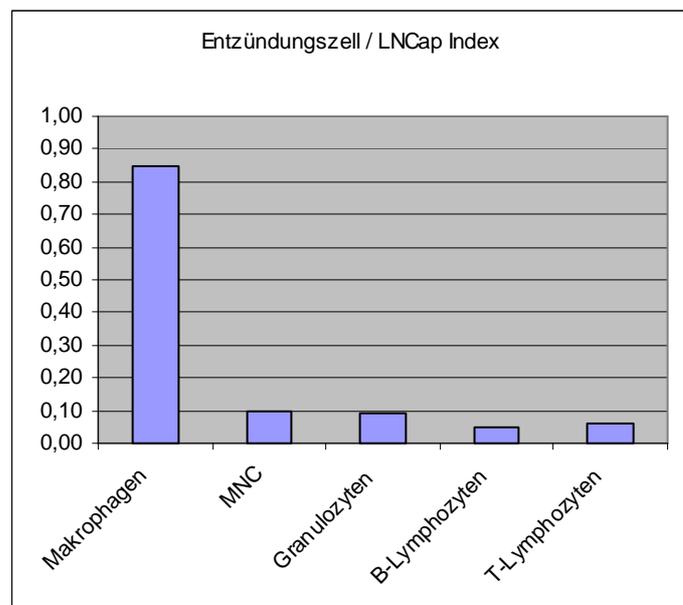


Abbildung 30:

Graphische Darstellung der LNCaP ETI_{[³H]Cholin} für die verschiedenen Entzündungszellen

4.2.2.2.2 PC-3 ETI_{[3H]Cholin}

Die geringeren ETI_{[3H]Cholin} der PC-3 Zellen im Vergleich zu den LNCaP Zellen erklären sich durch die höheren [³H]Cholin-Uptakerraten der PC-3 Zellen (siehe Abb. 29). Vergleicht man nun wie oben die hier dargestellten [³H]Cholin ETIs der PC-3 Zellen (siehe Abb. 31) mit denen von [¹⁸F]FDG (siehe Abb. 27), zeigt sich ebenfalls ein wesentlich höherer ETI_{[3H]Cholin} bei Makrophagen bei ähnlichen ETIs der kleinen Leukozyten. Auf diesen Sachverhalt wird im Folgenden genauer eingegangen.

Tabelle 14:

Tabellarische Darstellung der PC-3 ETIs_{[3H]Cholin} für die verschiedenen Entzündungszellen

Entzündungszelle	Entzündungszell/ PC-3 Index
Makrophagen	0,54
MNC	0,06
Granulozyten	0,06
B-Lymphozyten	0,03
T-Lymphozyten	0,04

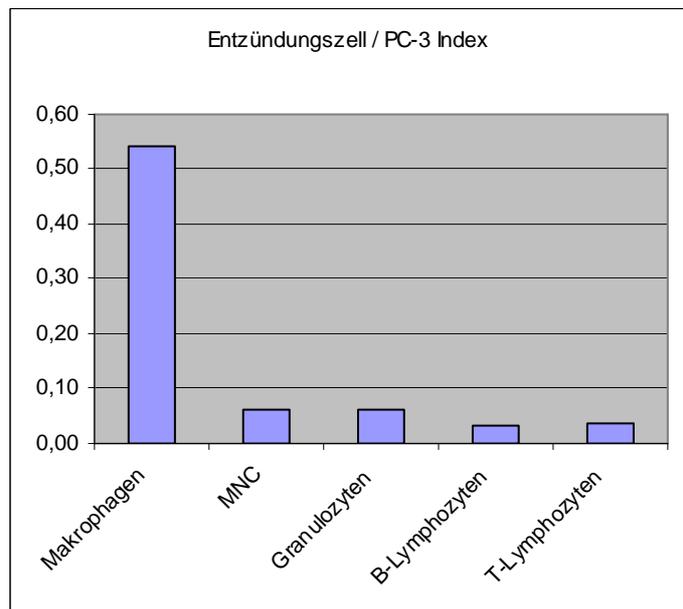


Abbildung 31:

Graphische Darstellung der der PC-3 ETIs_{[3H]Cholin} für die verschiedenen Entzündungszellen

4.2.3 Tracervergleich

4.2.3.1 Faktorieller Unterschied $ETI_{[^{18}F]FDG}$ zu $ETI_{[^3H]Cholin}$ bei LNCaP Tumorzellen

Im Methodikteil dieser Arbeit wurde im Kapitel 3.6.5.2 auf den Tracervergleich über die Entzündungszell/Tumorzell Indices (ETIs) eingegangen. Der faktorielle Unterschied der ETIs von $[^3H]Cholin$ und $[^{18}F]FDG$ bei LNCaP Zellen ist mittels des unter 3.6.6.2 beschriebenen statistischen Modells für die einzelnen Entzündungszellen mit 95% Konfidenzintervall berechnet worden und durch Abb. 32 graphisch und Tab. 15 tabellarisch dargestellt.

Für die Werte der MNCs, Granulozyten und T-Lymphozyten, die in Abb. 32 signifikant über der 1 liegen, gilt, dass $[^3H]Cholin$ im Vergleich zu $[^{18}F]FDG$ selektiver in LNCaP Tumorzellen aufgenommen wird, während $[^{18}F]FDG$ unspezifischer von den Leukozyten und LNCaP Tumorzellen aufgenommen wird. Entsprechend den zellulären Tracer-Uptakeraten ist es hierbei mittels $[^3H]Cholin$ im Vergleich zu $[^{18}F]FDG$ besser möglich zwischen LNCaP Tumorzellen und den Entzündungszellen (hier: MNCs, Granulozyten und T-Lymphozyten) zu unterscheiden.

Andererseits gilt bei Werten signifikant kleiner als 1, wie bei den Makrophagen (siehe Abb. 32), dass $[^{18}F]FDG$ eine höhere Tumorzellselektivität aufweist und $[^3H]Cholin$ unspezifischer von Makrophagen und LNCaP Zellen aufgenommen wird. Eine Unterscheidung zwischen LNCaP Tumorzellen und Makrophagen ist hierbei mittels $[^{18}F]FDG$ im Vergleich zu $[^3H]Cholin$ besser möglich.

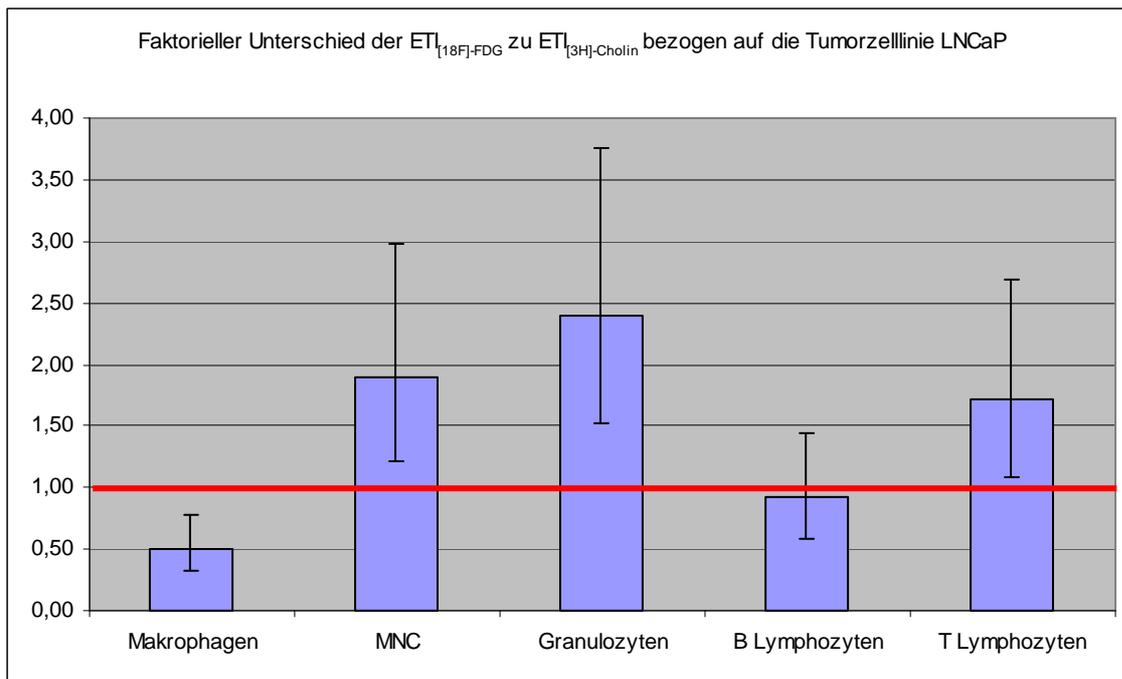


Abbildung 32

Faktorieller Unterschied $ETI_{[18F]FDG}$ zu $ETI_{[3H]Cholin}$ bei LNCaP Tumorzellen; wird die rote Linie von dem 95% Konfidenzintervall einer Entzündungszelle - wie hier bei B-Lymphozyten – geschnitten, bedeutet dies, es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Tracern im Bezug auf Tumorzellselektivität.

Tabelle 15

Tabellarische Darstellung des faktoriellen Unterschied $ETI_{[18F]FDG}$ zu $ETI_{[3H]Cholin}$ bei LNCaP Tumorzellen

	Faktorieller Unterschied $ETI_{FDG} / ETI_{[3H]Cholin}$	95% Konfidenzintervalle	
		Untergrenze	Obergrenze
Makrophagen	0,50	0,32	0,78
MNC	1,90	1,21	2,98
Granulozyten	2,39	1,52	3,76
B Lymphozyten	0,92	0,58	1,44
T Lymphozyten	1,71	1,09	2,69

4.2.3.2 Faktorieller Unterschied $ETI_{[18F]FDG}$ zu $ETI_{[3H]Cholin}$ bei PC-3 Tumorzellen

Auch für die PC-3 Zellen wurde der faktorielle Unterschied $ETI_{[18F]FDG}$ zu $ETI_{[3H]Cholin}$ berechnet (Abb. 33 und Tab. 16). Hierbei zeigt sich bei keiner Entzündungszelle ein signifikant größerer Wert als 1. Da das Konfidenzintervall von mononukleären Zellen, Granulozyten und T-Lymphozyten die 1 enthält, kann zwischen den zwei Tracern, bezogen auf diese

Entzündungszellen und PC-3 Zellen, kein Unterschied in Bezug auf Tumorselektivität nachgewiesen werden.

Auffällig ist allerdings der faktorielle Unterschied der Makrophagen, der wie in Abb. 32 bei den LNCaP Tumorzellen auch hier in Abb. 33 bei den PC-3 Tumorzellen deutlich unter der 1 liegt. Somit ist auch die Unterscheidung zwischen PC-3 Tumorzellen und Makrophagen entsprechend der zellulären Tracer-Uptakeraten mittels [^{18}F]FDG im Vergleich zu [^3H]Cholin besser möglich.

Ein faktorieller Unterschied von 0,2 bedeutet hierbei (siehe Tab.16), dass die Aufnahme von [^3H]Cholin in Makrophagen, bezogen auf die PC-3 Zellen, 5 mal höher ist, als dies bei [^{18}F]FDG der Fall ist.

Ebenfalls zeigt sich bei den B-Lymphozyten, durch einen Wert kleiner als eins, eine geringere PC-3 Tumorzell-Selektivität für den Tracer [^3H]Cholin im Vergleich zu [^{18}F]FDG.

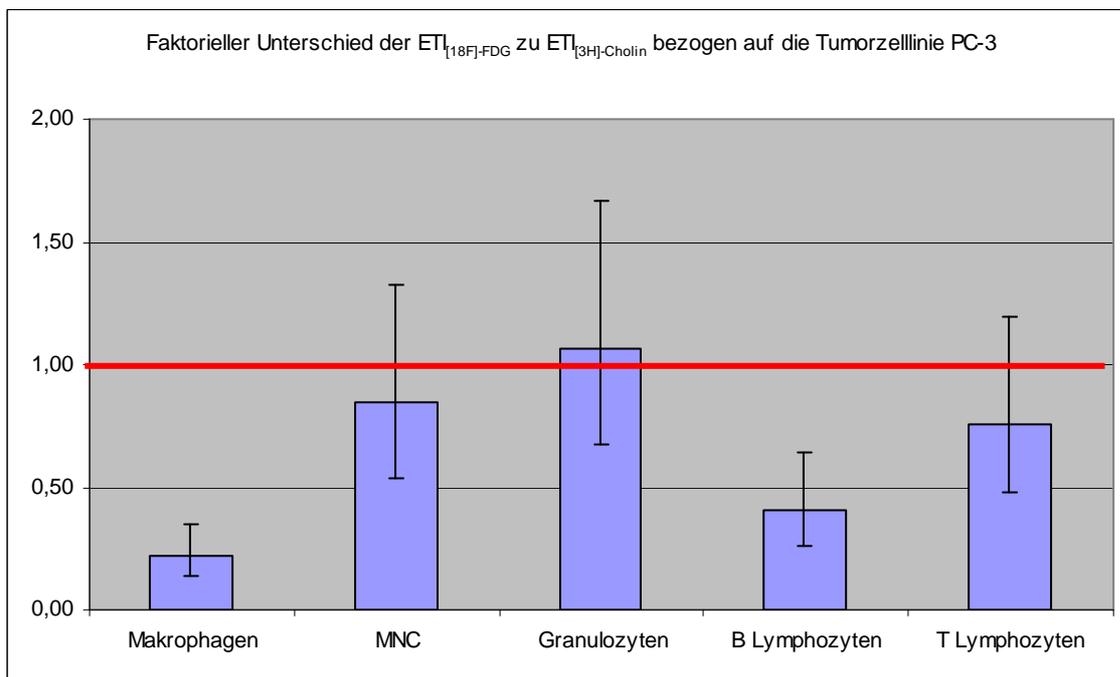


Abbildung 33

Faktorieller Unterschied $\text{ETI}_{[^{18}\text{F}]\text{FDG}}$ zu $\text{ETI}_{[^3\text{H}]\text{Cholin}}$ bei PC-3 Tumorzellen; wird die rote Linie von den Konfidenzintervallen geschnitten, so besteht kein Unterschied im Bezug auf Tumorselektivität zwischen den Tracern [^3H]Cholin und [^{18}F]FDG

Tabelle 16

Tabellarische Darstellung des faktoriellen Unterschied $ETI_{[^{18}F]FDG}$ zu $ETI_{[^3H]Cholin}$ bei PC-3 Tumorzellen

	Faktorieller Unterschied $ETI_{[^{18}F]FDG} / ETI_{[^3H]Cholin}$	95% Konfidenzintervalle	
		Untergrenze	Obergrenze
Makrophagen	0,22	0,14	0,35
MNC	0,84	0,54	1,32
Granulozyten	1,06	0,68	1,67
B Lymphozyten	0,41	0,26	0,64
T Lymphozyten	0,76	0,48	1,19

Die faktoriellen Unterschiede der ETIs für die Tracer $[^{18}F]FDG$ und $[^3H]Cholin$ bei PC-3 und LNCaP Tumorzellen weisen für beide Tumorzelllinien bei den Makrophagen durch Werte kleiner als 1 eine geringere Tumorzellselektivität von $[^3H]Cholin$ gegenüber $[^{18}F]FDG$ auf. Dies ist in dieser Konstellation durch einen sehr ausgeprägten $[^3H]Cholin$ -Uptake der Makrophagen zu erklären. Im Vergleich der Tracer sind Makrophagen somit gieriger nach $[^3H]Cholin$ als nach $[^{18}F]FDG$.

4.3 Zellstimulation

Die Entzündungszellen wurden nach dem im Methodikteil 3.3.1 beschriebenen Schema mit den verschiedenen Substanzen stimuliert. Anschließend wurde an den Zellen der kombinierte Uptakeversuch mit [^3H]Cholin und [^{18}F]FDG durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die Z-Scores (siehe 3.6.4).

4.3.1 Stimulation der Makrophagen

Makrophagen wurden mit LPS in drei verschiedenen Konzentrationen stimuliert (siehe 3.3.1.1). Mit der unstimulierten Kontrollprobe werden somit 4 verschiedene Stimulationsgrade verglichen.

4.3.1.1 [^{18}F]FDG-Aufnahme

Zunächst wird zur Datensichtung die Boxplot Darstellung gewählt (siehe Abb. 34). Wenige Ausreißer und ein mittig gelegener Medianwerte lassen eine Normalverteilung der Z-Scores vermuten. Die statistische Testung ergab keine Evidenz auf nicht normalverteilte Werte.

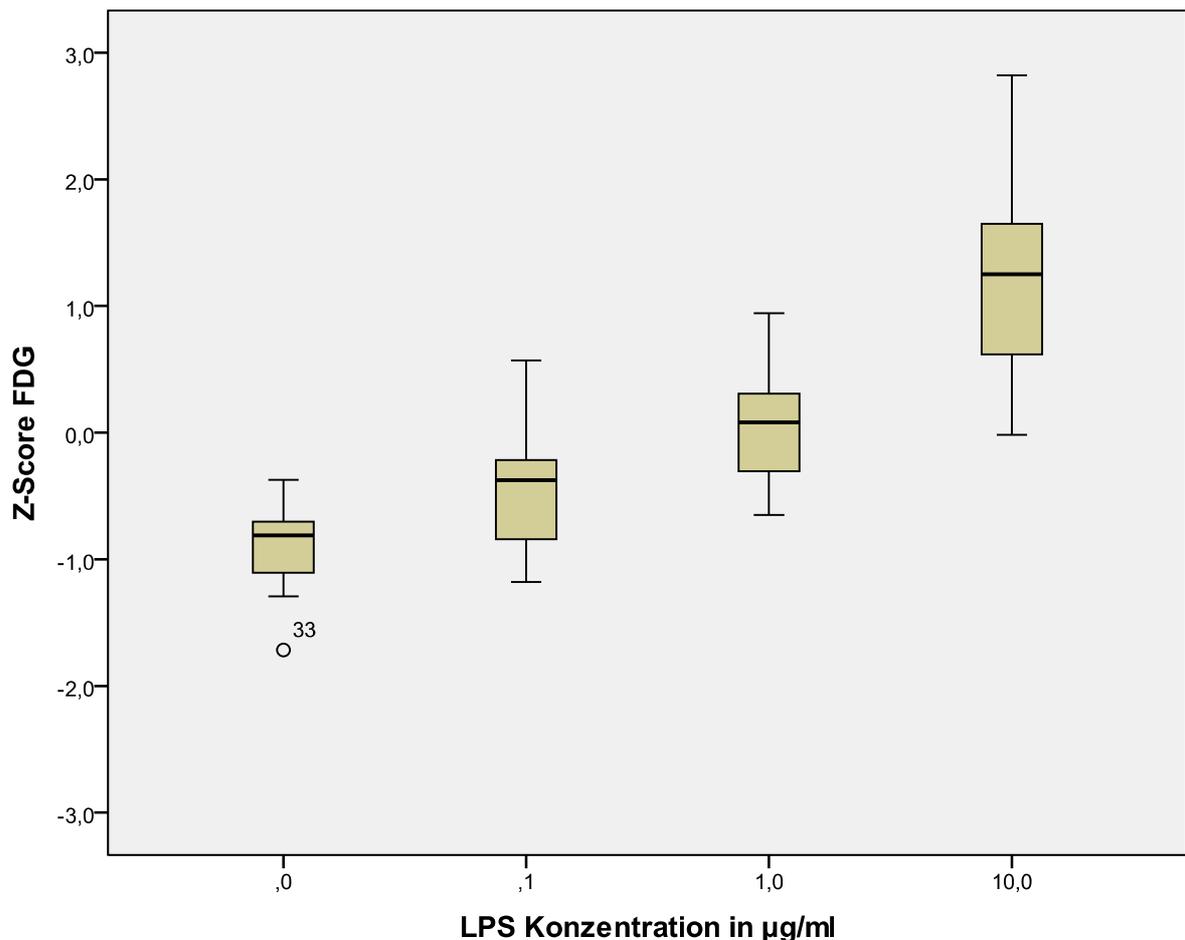


Abbildung 34

Z-Scores des [¹⁸F]FDG-Uptakes der Makrophagenstimulation in der Boxplotdarstellung in Abhängigkeit der zur Stimulierung eingesetzten LPS Konzentrationen

Die weitere Auswertung erfolgt durch die in Abb. 35 errechneten Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervallen und die statistische Testung (siehe Anhang A-3) auf Unterschied zwischen den Z-Scores der einzelnen Stimulationsstufen. Mit zunehmender LPS Konzentration fallen die erhöhten Z-Scores auf (siehe Abb. 35). Die größer werdenden Z-Scores entsprechen steigenden [¹⁸F]FDG-Uptakeraten. Die höchsten Z-Scores konnten für die Stimulationsstufe mit LPS 10 µg/ml bestimmt werden. Die Statistische Testung zeigt, dass die Unterschiede der Z-Scores, die aus Abb. 34 hervorgehen signifikant sind. Lediglich besteht zwischen den Stimulationsstufen 0 und 0,1µg/ml und 0,1 und 1 µg/ml kein signifikanter Unterschied auf einem 5% Signifikanzniveau (siehe Anhang A-3).

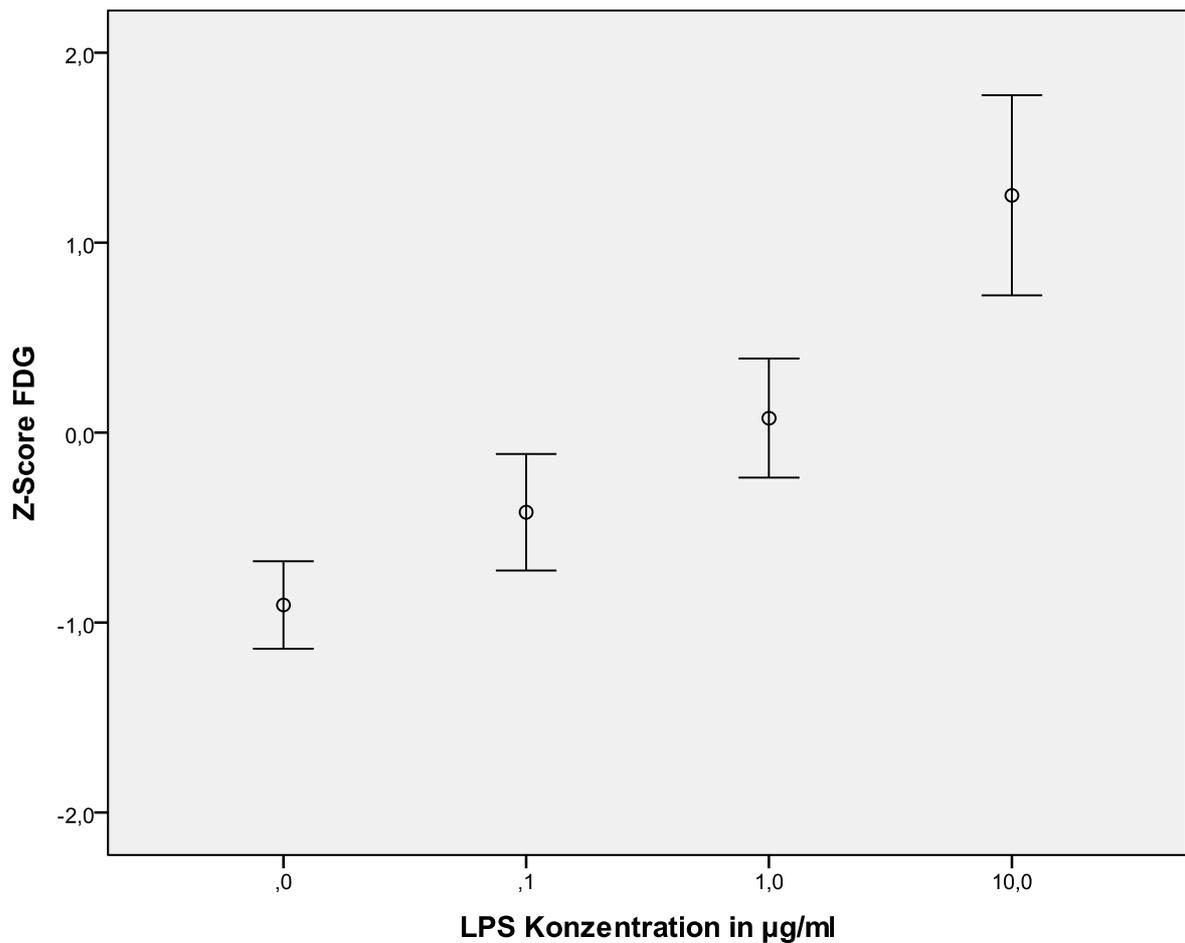


Abbildung 35

Z-Scores des [^{18}F]FDG-Uptakes der Makrophagenstimulation in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung in Abhängigkeit der zur Stimulierung eingesetzten LPS Konzentrationen

Die in Abb. 35 zu vermutende stetig lineare Korrelation zwischen der LPS Konzentrationsstufe und den [^{18}F]FDG-Uptakewerten in Form der Z-Scores wurde statistisch durch einen Test auf nichtparametrische Korrelation nach Spearman getestet (siehe Anhang A-3). Hierbei zeigt sich ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen den LPS Konzentrationsstufen und dem [^{18}F]FDG-Uptake.

4.3.1.2 [^3H]-Cholin-Aufnahme

Die Boxplotdarstellung der Z-Scores der stimulierten Makrophagen zeigt durch breite Boxen und einzelne extreme Ausreißer wie bei der Stimulationsstufe 1,0 µg/ml eine hohe Streubreite der Z-Scores. Zugleich verweist ein asymmetrisch in der Box gelegener Medianwert wie bei der Stimulationsstufe 10,0 µg/ml auf nicht normalverteilte Werte. Statistische Testung führt zur

Ablehnung der Normalverteilungsannahme. Zur weiteren Auswertung sollte dementsprechend auch keine Darstellung der Mittelwerte mit Konfidenzintervall gewählt werden. Um zwischen den Stimulationsstufen auf Unterschied zu testen, wurde der Mann-Whitney-Test für nichtparametrische Werte verwendet (siehe Statistik 3.6.6.3).

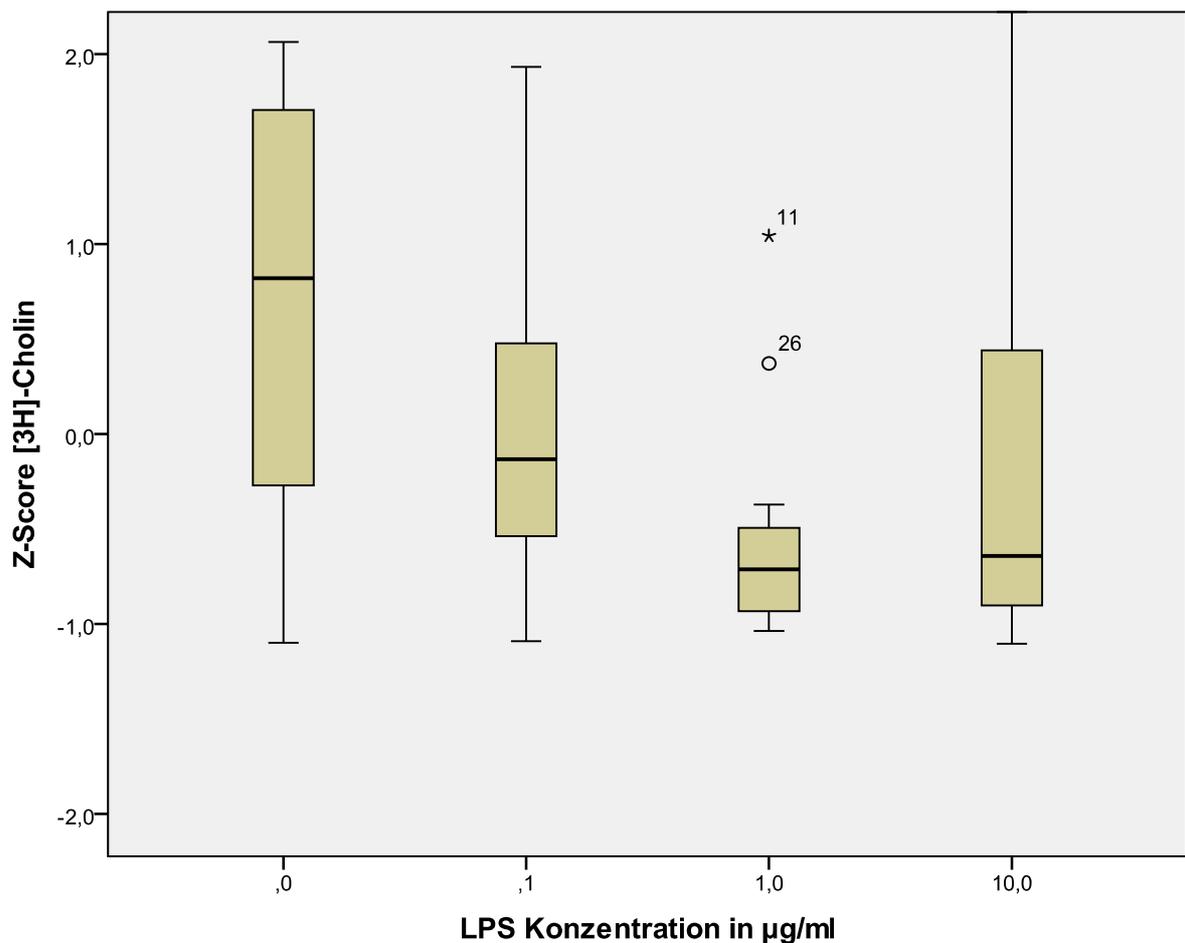


Abbildung 36

Z-Scores des [³H]-Cholin-Uptakes der Makrophagenstimulation in der Boxplotdarstellung in Abhängigkeit der zur Stimulierung eingesetzten LPS Konzentrationen

Beim Betrachten von Abb. 36 fällt auf, dass der [³H]-Cholin-Uptake durch LPS nicht stimulierbar ist wie der [¹⁸F]FDG-Uptake. Zwischen den Stimulationsgraden zeigen sich keine signifikant unterschiedlichen Z-Scores (siehe Anhang A-4). Lediglich ist der Z-Score von 1,0 µg LPS/ml signifikant geringer als der Z-Score der unstimulierten Kontrolle. Dies legt den Verdacht nahe, dass eine LPS Makrophagenstimulation sich auf den [³H]-Cholin-Uptake eher hemmend auswirkt.

4.3.2 Stimulation der MNCs

Mononukleäre Zellen wurden mit ConA in drei verschiedenen Konzentrationen stimuliert (siehe 3.3.1.3). Mit der unstimulierten Kontrollprobe werden somit 4 verschiedene Stimulationsgrade verglichen.

4.3.2.1 [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Symmetrische Boxen mit mittig liegenden Medianwerten (siehe Abb. 37) lassen normalverteilte Z-Scores vermuten. Trotz einigen Ausreißern in der Stimulationsgruppe 50 µg/ml besteht keine Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme. Die Normalverteilung der Z-Scores ist Grundlage für die Mittelwert- und 95% Konfidenzintervalldarstellung (siehe Abb. 38).

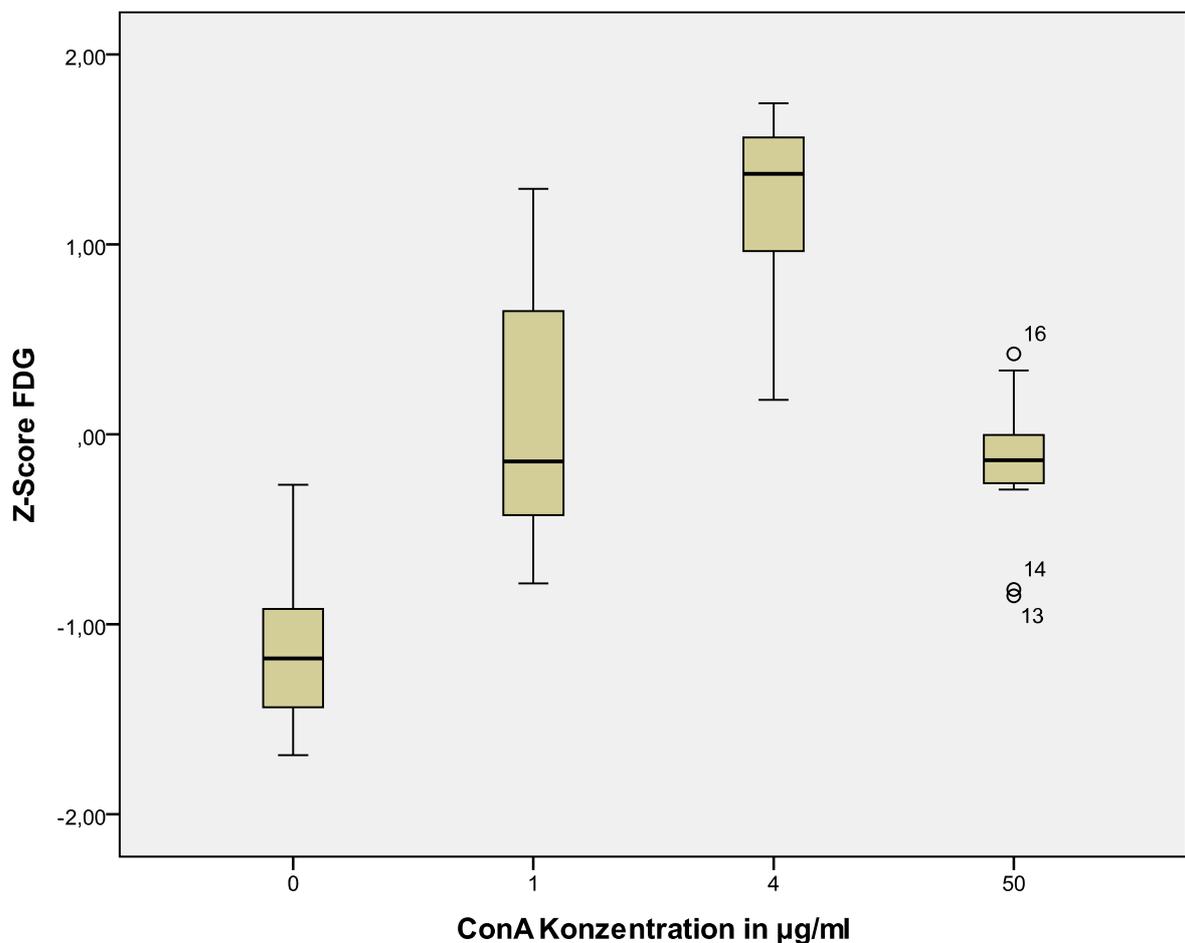


Abbildung 37

Z-Scores des [¹⁸F]FDG-Uptakes der stimulierten mononukleären Zellen in der Boxplotdarstellung in Abhängigkeit der zur Stimulierung eingesetzten LPS Konzentrationen

Aus Abb. 38 geht hervor, dass sich der [^{18}F]FDG-Uptake bei MNCs bis ConA-Konzentrationen von 4 $\mu\text{g/ml}$ gut stimulieren lässt. Die Stimulationsstufe mit der sehr hohen ConA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zeigt wieder geringere [^{18}F]FDG-Uptakewerte, die in Höhe der ConA-Stimulationskonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ liegen. Die sich nicht überschneidenden 95% Konfidenzintervalle lassen vermuten, dass die Unterschiede zwischen den Stimulationsgruppen signifikant sind. Dies bestätigt sich durch statistisches Testen (siehe Anhang A-5), wobei im Paarvergleich alle Z-Scores signifikant unterschiedlich sind. Lediglich zwischen der Stimulationsstufe 1 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ besteht kein signifikanter Unterschied.

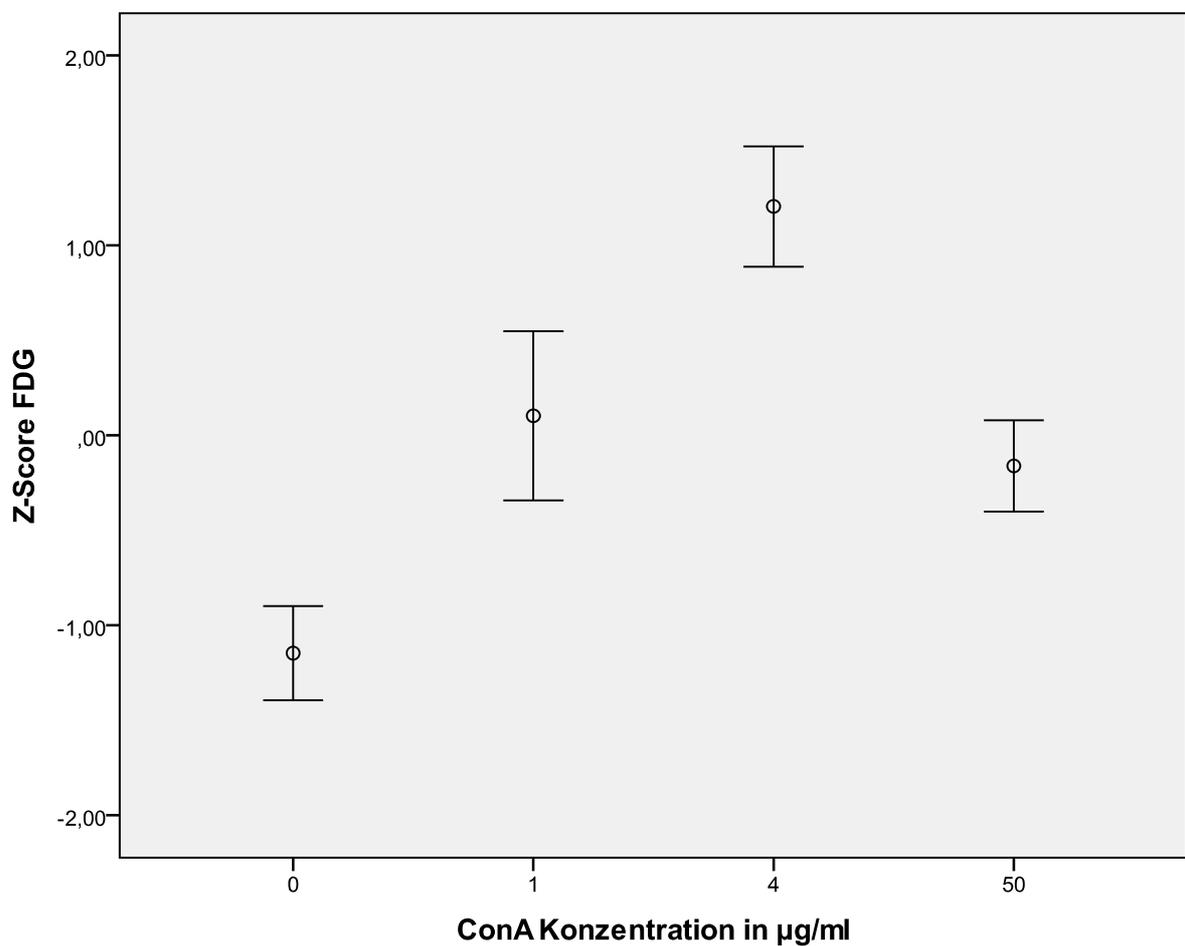


Abbildung 38

Z-Scores des [^{18}F]FDG-Uptakes der stimulierten mononukleären Zellen in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung in Abhängigkeit der zur Stimulierung eingesetzten ConA-Konzentrationen.

4.3.2.2 [³H]Cholin-Aufnahme

Ähnlich wie der [¹⁸F]FDG-Uptake der mononukleären Zellen zeigt sich die [³H]Cholin-Aufnahme ebenfalls mit einem maximalen Uptake bei 4 µg ConA/ml stimulierbar (siehe Abb. 39). Trotz einzelner Ausreißerwerte bei der unstimulierten Kontrolle und der ConA-Stimulationskonzentration von 4 µg/ml und einem nicht ganz zentral gelegenen Medianwert bei der ConA-Stimulationskonzentration von 1 µg/ml, besteht keine statistisch signifikante Evidenz für nicht normalverteilte Z-Scorewerte in den vier Stimulationsstufen. Demnach werden zur weiteren Auswertung für die Z-Scores die Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle berechnet und graphisch dargestellt (siehe Abb. 40).

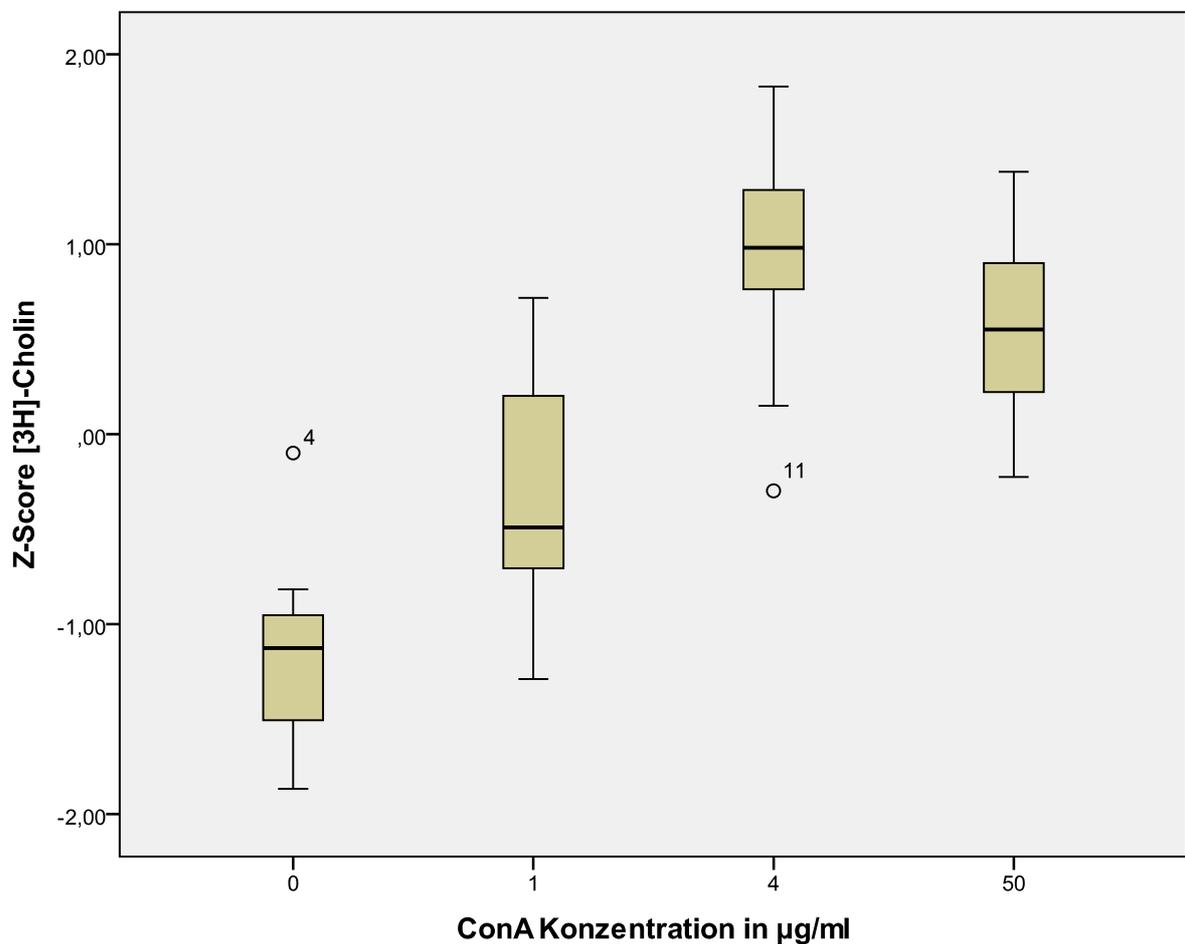


Abbildung 39

Z-Scores des [³H]Cholin-Uptakes der stimulierten mononukleären Zellen in der Boxplotdarstellung in Abhängigkeit der zur Stimulierung eingesetzten ConA-Konzentrationen

Die in Abb. 40 dargestellten Z-Score Mittelwerte mit den sich nicht überschneidenden 95% Konfidenzintervalle der unstimulierten Kontrolle und der ersten beiden Stimulationsstufen

zeigen sich durch statistische Testung als signifikant unterschiedlich. Nur zwischen den ConA-Stimulationsstufen 4 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$, bei denen sich die Konfidenzintervalle auch überschneiden (siehe Abb. 40), kann kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (siehe Anhang A-6).

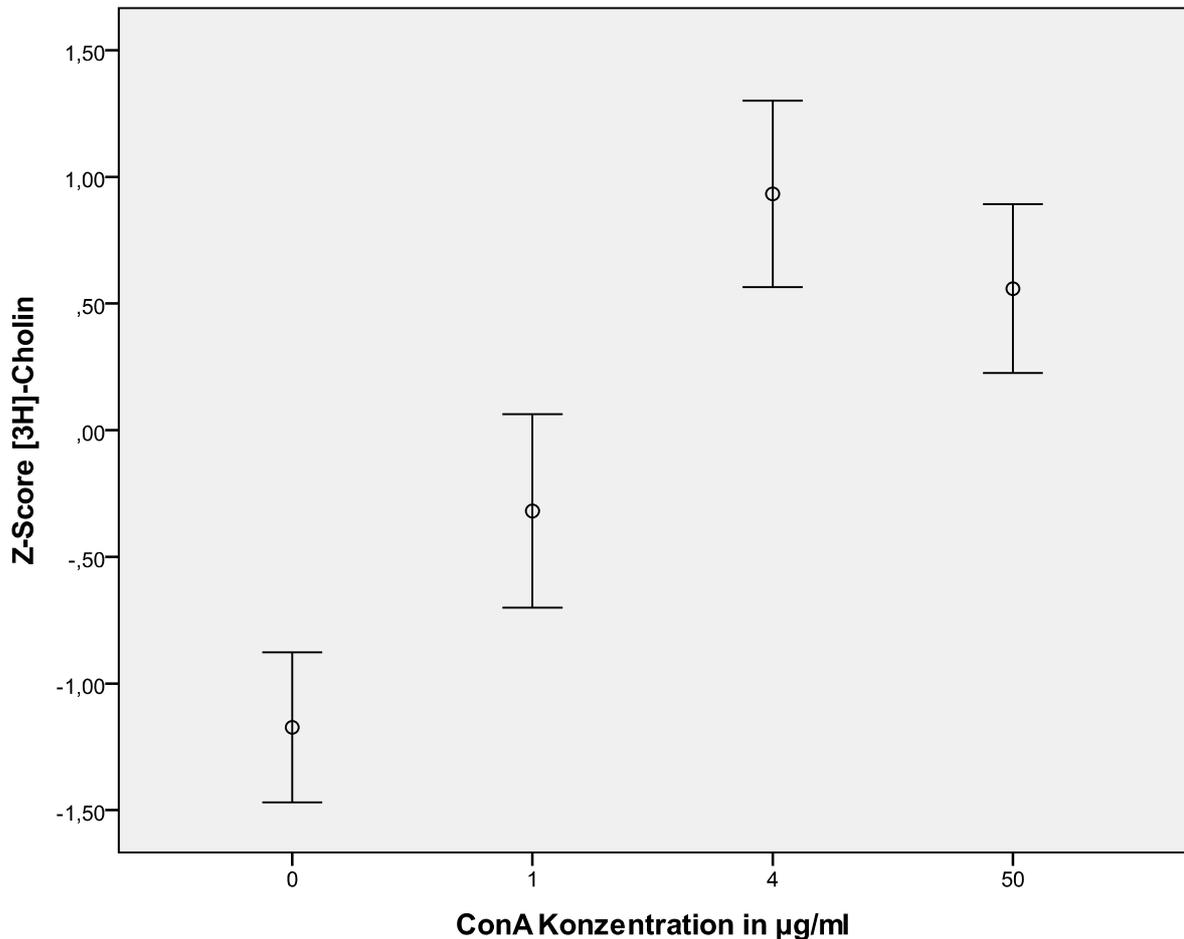


Abbildung 40

Z-Scores des [^3H]Cholin-Uptakes der stimulierten mononukleären Zellen in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung in Abhängigkeit der zur Stimulierung eingesetzten ConA-Konzentrationen.

Die [^3H]–Cholin-Aufnahme der mononukleären Zellen lässt sich ebenso wie die [^{18}F]FDG-Aufnahme durch Concanavalin graduiert stimulieren. Allerdings zeigt die Stimulierbarkeit der MNCs mit ConA ein Maximum, das unter ConA-Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/ml}$ liegt.

4.3.3 Stimulation der CD3+ T-Lymphozyten

CD3+ T-Lymphozyten wurden mit ConA in nur einer Stimulationsstufe von 1 µg/ml stimuliert. Die ConA-stimulierte Probe wird im Folgenden mit der unstimulierten Kontrolle verglichen. Da hierbei nur ein einzelner Paarvergleich nötig ist, muss nicht wie oben bei der multiplen statistischen Testung die Kumulation des Alphafehlers durch eine Bonferronikorrektur berücksichtigt werden.

4.3.3.1 [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Die zentral in der Box liegenden Medianwerte legen normalverteilte Z-Scores nahe. Es besteht keine statistische Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme, trotz einzelner Ausreißerwerte in der unstimulierten Kontrolle (siehe Abb. 41). Zur weiteren Auswertung wird die Mittelwert- und 95% Konfidenzintervalldarstellung gewählt (siehe Abb. 42).

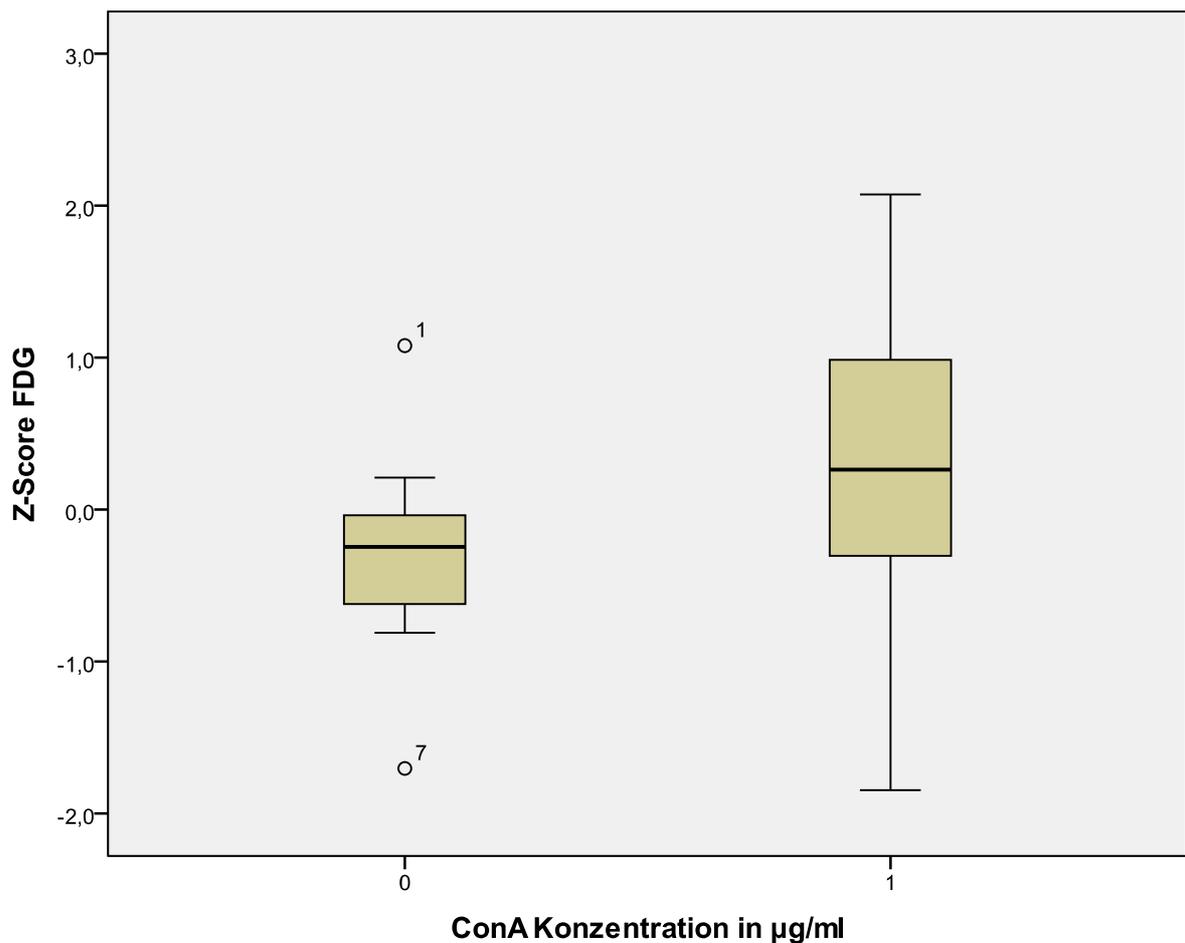


Abbildung 41

Z-Scores des [¹⁸F]FDG-Uptakes der unstimulierten und ConA-stimulierten T-Lymphozyten in der Boxplotdarstellung.

In der Mittelwert- und 95% Konfidenzintervalldarstellung zeigen sich ähnliche Mittelwerte bei überschneidenden Konfidenzintervallen. Zugleich wird durch statistische Testung kein signifikanter Unterschied zwischen der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle festgestellt (siehe Anhang A-7). Eine Stimulation der [^{18}F]FDG-Aufnahme mit ConA hat somit nicht stattgefunden.

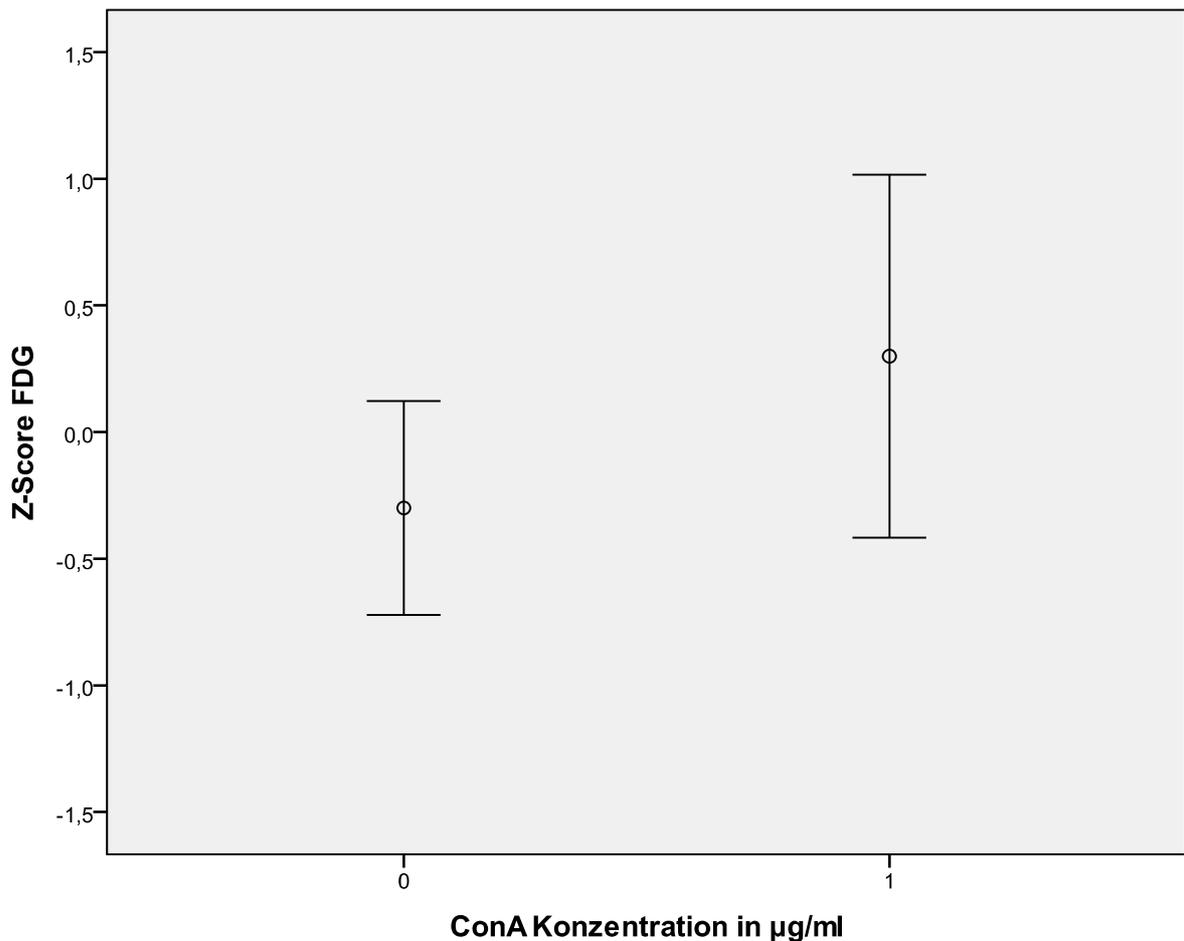


Abbildung 42

Z-Scores des [^{18}F]FDG-Uptakes der unstimulierten und ConA-stimulierten T-Lymphozyten in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung.

4.3.3.2 [^3H]Cholin-Aufnahme

Die zentral in der Box liegenden Medianwerte legen normalverteilte Z-Scores nahe (siehe Abb. 43). Trotz eines einzelnen Ausreißers in der Stimulationsgruppe besteht keine statistische Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme.

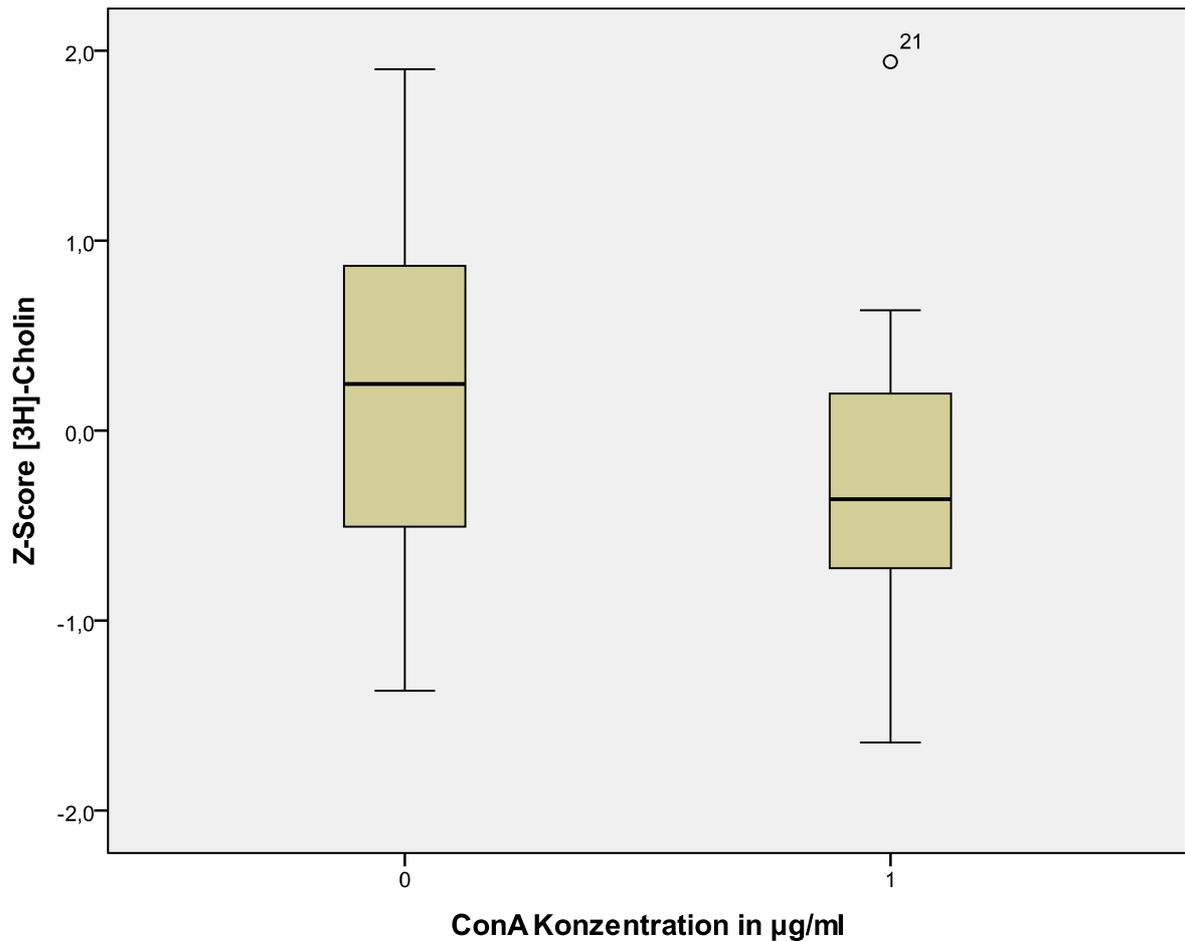


Abbildung 43

Z-Scores des [³H]Cholin-Uptakes der unstimulierten und ConA-stimulierten T-Lymphozyten in der Boxplotdarstellung

Zur weiteren Auswertung wird die Mittelwert- und 95% Konfidenzintervall-Darstellung gewählt (siehe Abb. 44). Hierbei zeigen sich überschneidende Konfidenzintervalle. Zugleich wird durch statistische Testung kein signifikanter Unterschied zwischen der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle festgestellt (siehe Anhang A-8). Eine Stimulation der [³H]Cholin-Aufnahme mit ConA hat somit nicht stattgefunden.

Weder die [¹⁸F]FDG-Aufnahme noch die [³H]Cholin-Aufnahme konnten bei CD3+ T-Lymphozyten mit ConA stimuliert werden.

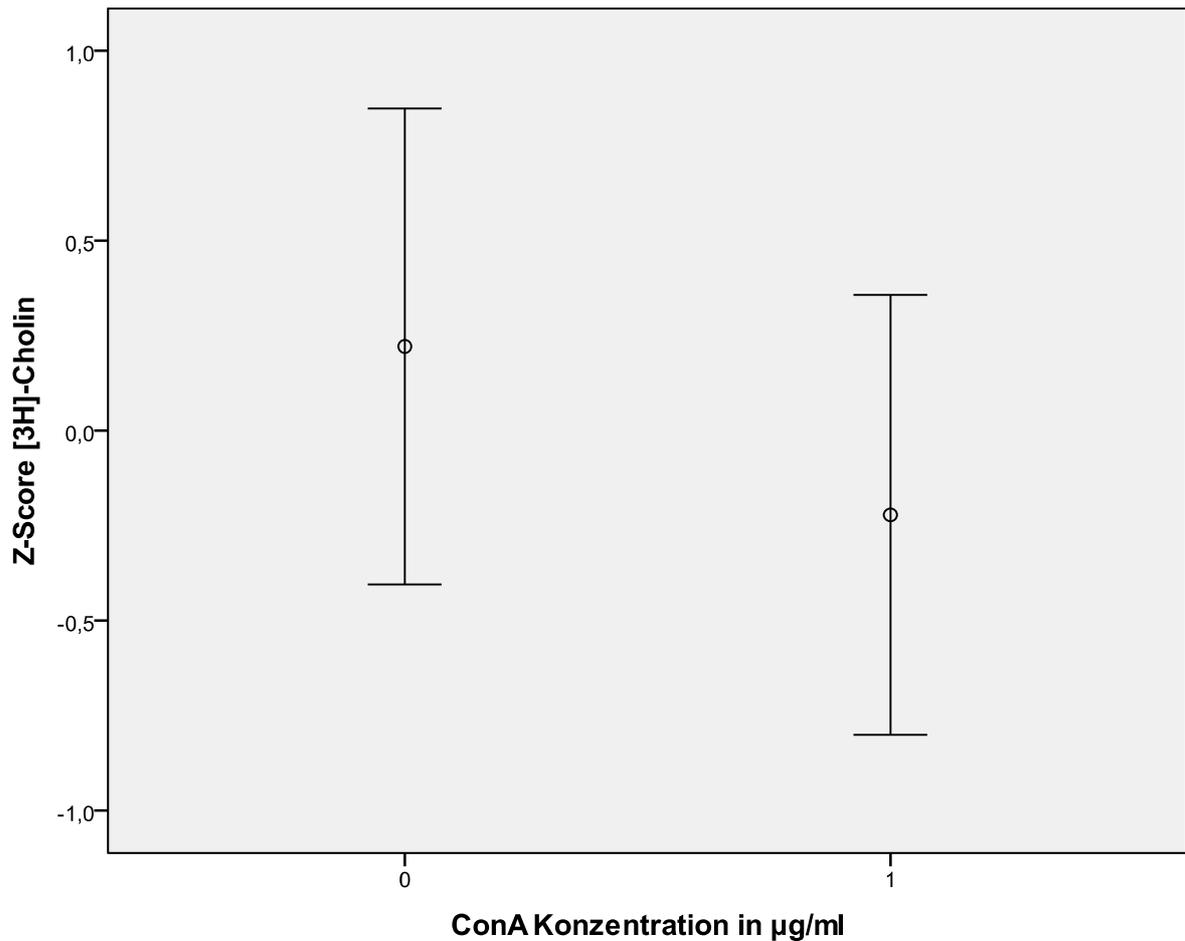


Abbildung 44

Z-Scores des [³H]Cholin-Uptakes der unstimulierten und ConA-stimulierten T-Lymphozyten in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung.

4.3.4 Stimulation der CD19+ B-Lymphozyten

CD19+ B-Lymphozyten wurden mit ConA in einer Stimulationsstufe von 1 µg/ml stimuliert. Die ConA-stimulierte Probe wird im Folgenden mit der unstimulierten Kontrolle verglichen.

4.3.4.1 [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Die in der Boxplotdarstellung zentral in der Mitte liegenden Medianwerte lassen eine Normalverteilung der Z-Scores vermuten (siehe Abb. 45). Allerdings verweisen ein Ausreißer und die stark asymmetrischen Antennen (Whiskers) der unstimulierten Kontrolle auf nicht parametrisch verteilte Z-Score-Werte. Die statistische Testung mittels Shapiro-Wilk Test führt ebenfalls zur Ablehnung der Normalverteilungsannahme. Zur weiteren Auswertung bei den

hier nicht normalverteilten Werten sollte demnach keine Mittelwert- und 95% Konfidenzintervalldarstellung gewählt werden.

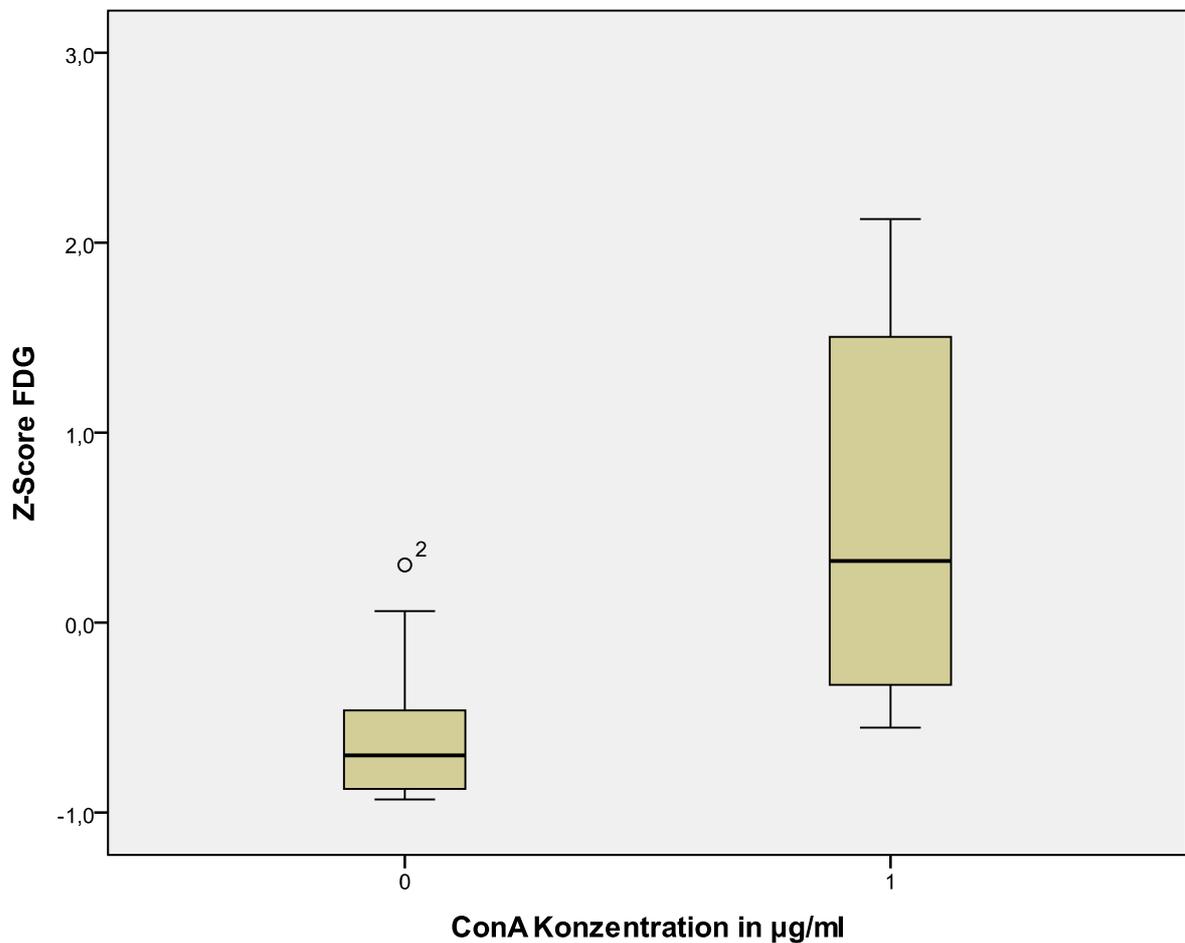


Abbildung 45

Z-Scores des [¹⁸F]FDG-Uptakes der unstimulierten und ConA-stimulierten B-Lymphozyten in der Boxplotdarstellung.

Durch statistische, nichtparametrische Testung (Mann-Whitney-Test) zeigt sich der aus Abb. 45 hervorgehende Z-Score Unterschied mit erhöhten Z-Scores der stimulierten B-Lymphozyten als signifikant (siehe Anhang A-9). Somit hat ein vermehrter [¹⁸F]FDG-Uptake in die stimulierten B-Lymphozyten statt gefunden.

4.3.4.2 [³H]Cholin-Aufnahme

Die Boxplotdarstellung zeigt normalverteilte Z-Scores in beiden Gruppen (siehe Abb. 46). Zugleich besteht keine statistische Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme.

Zur weiteren Auswertung kann demnach die Mittelwertdarstellung mit 95% Konfidenzintervallen gewählt werden (siehe Abb. 47).

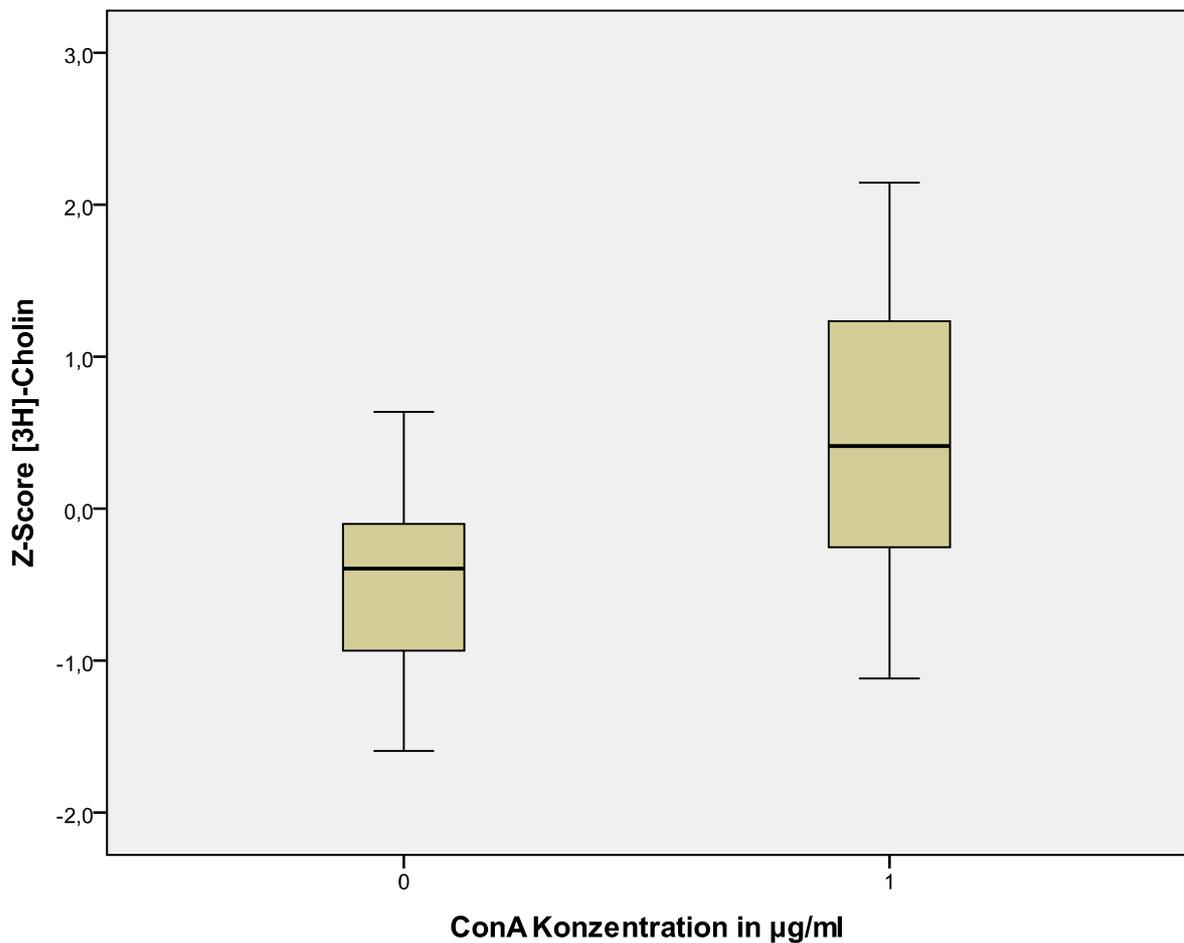


Abbildung 46

Z-Scores des [³H]Cholin-Uptakes der unstimulierten und ConA-stimulierten B-Lymphozyten in der Boxplotdarstellung. Die höheren Z-Scores der stimulierten B-Lymphozyten lassen eine erfolgreiche Stimulation vermuten.

Die in Abb. 47 dargestellten Z-Score Mittelwerte der stimulierten Probe liegen deutlich über der unstimulierten Kontrolle, während sich die Konfidenzintervalle minimal überschneiden. Durch statistische Testung zeigt sich der aus Abb. 47 hervorgehende Z-Score Unterschied mit erhöhten Z-Score Mittelwerten der stimulierten B-Lymphozyten als signifikant (siehe Anhang A-10). Somit hat ein vermehrter [³H]Cholin-Uptake in die stimulierten B-Lymphozyten statt gefunden.

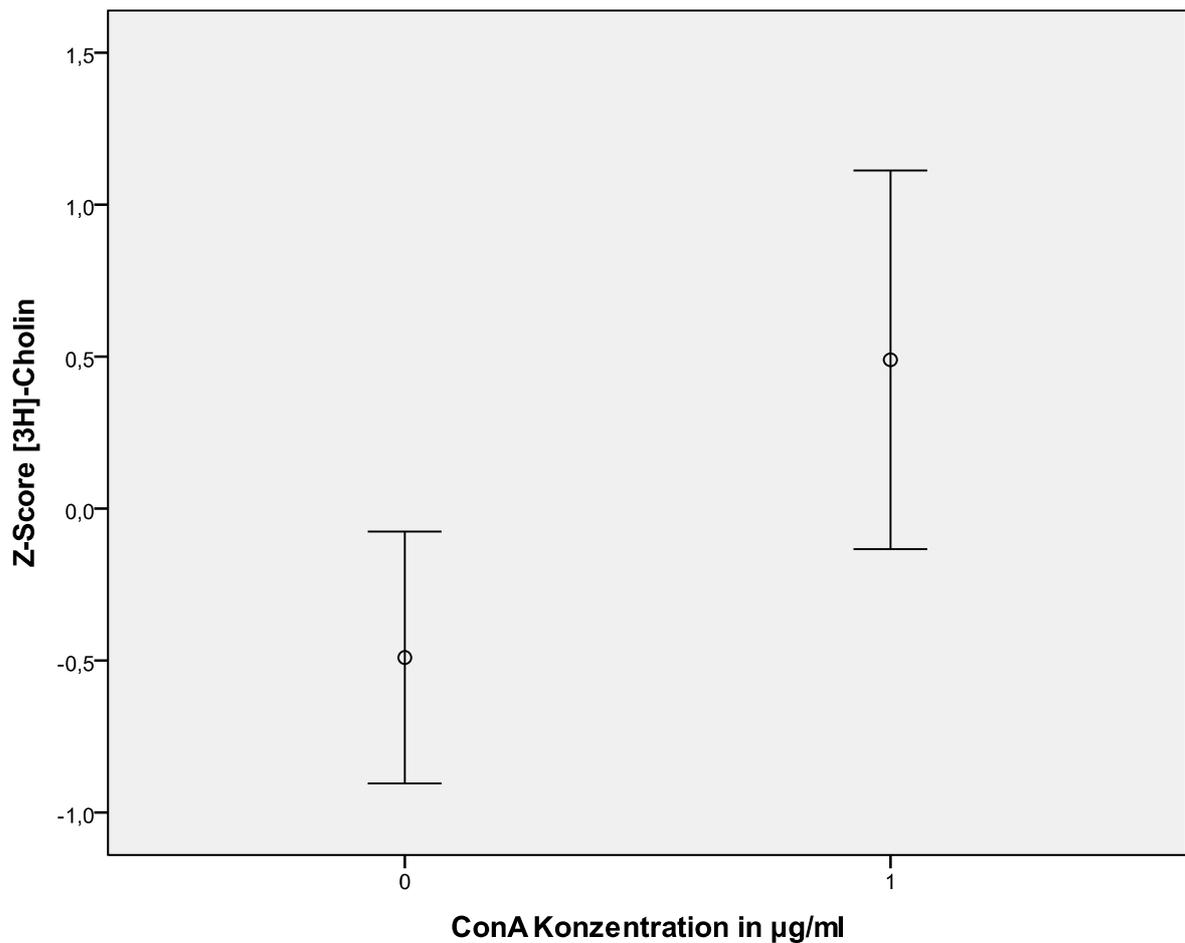


Abbildung 47

Z-Scores des [³H]Cholin-Uptakes der stimulierten und unstimulierten B-Lymphozyten in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung

Entsprechend der Ergebnisse zeigt sich die [³H]Cholin- und [¹⁸F]FDG-Aufnahme in B-Lymphozyten mit ConA stimulierbar.

4.3.5 Stimulation der CD15+ Granulozyten

CD15+ Granulozyten wurden mit Lipopolysaccharid in einer Stimulationsstufe von 1 µg/ml stimuliert. Die LPS stimulierte Probe wird im Folgenden mit der unstimulierten Kontrolle verglichen.

4.3.5.1 [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Die Boxplotdarstellung zeigt normalverteilte Werte (siehe Abb. 48). Zugleich besteht keine statistische Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme. Zur weiteren Auswertung kann demnach die Mittelwertdarstellung mit 95% Konfidenzintervallen gewählt werden (siehe Abb. 49).

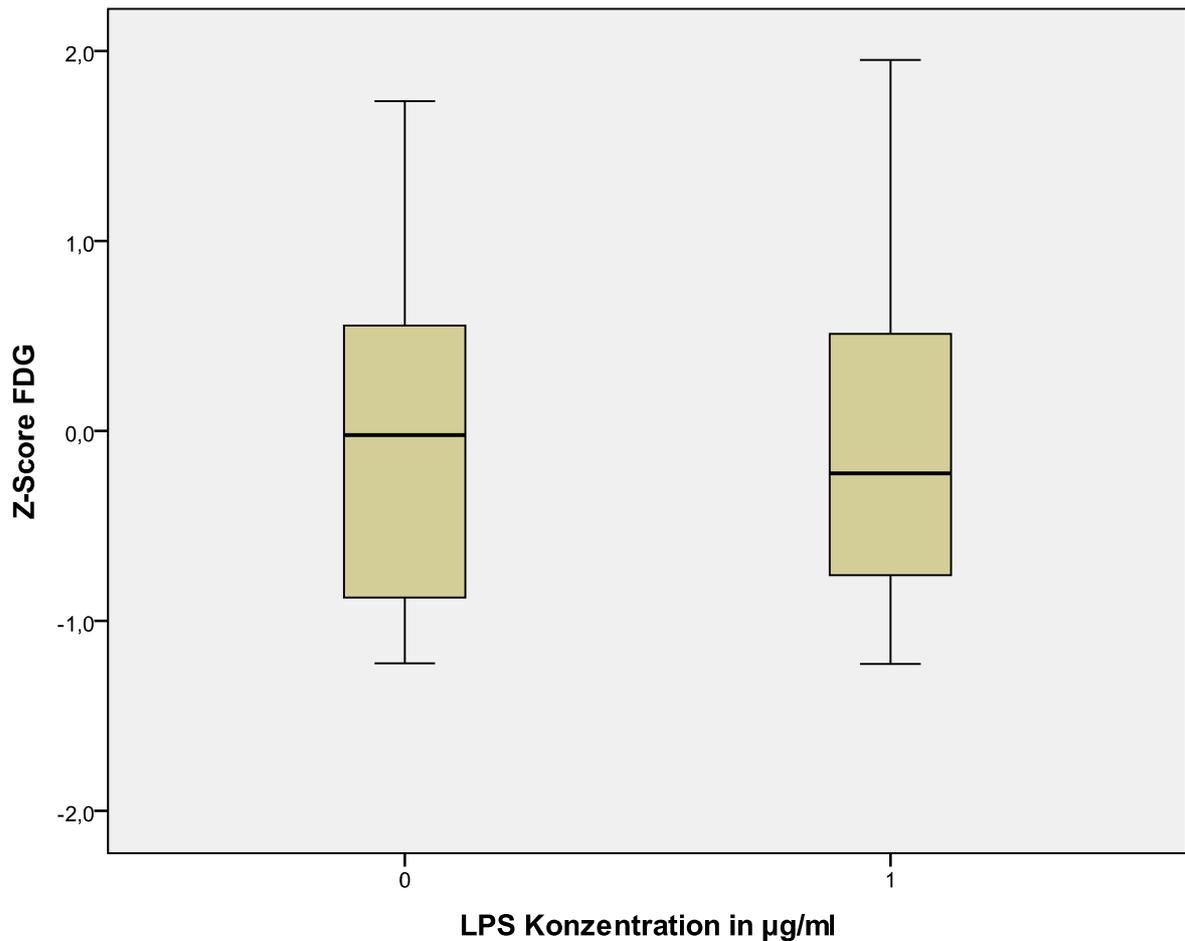


Abbildung 48

Z-Scores des [¹⁸F]FDG-Uptakes der unstimulierten und LPS-stimulierten CD15+ Granulozyten in der Boxplotdarstellung.

Die Mittelwerte der Z-Scores der stimulierten Proben und unstimulierten Kontrolle liegen beide im Nullbereich. Bei fast deckungsgleichen 95% Konfidenzintervallen (siehe Abb. 49) und statistischer Testung auf Unterschied (siehe Anhang A-11), wobei kein signifikanter Unterschied im Paarvergleich nachgewiesen wurde, ist die [¹⁸F]FDG-Aufnahme in Granulozyten durch Zugabe von LPS nicht stimulierbar

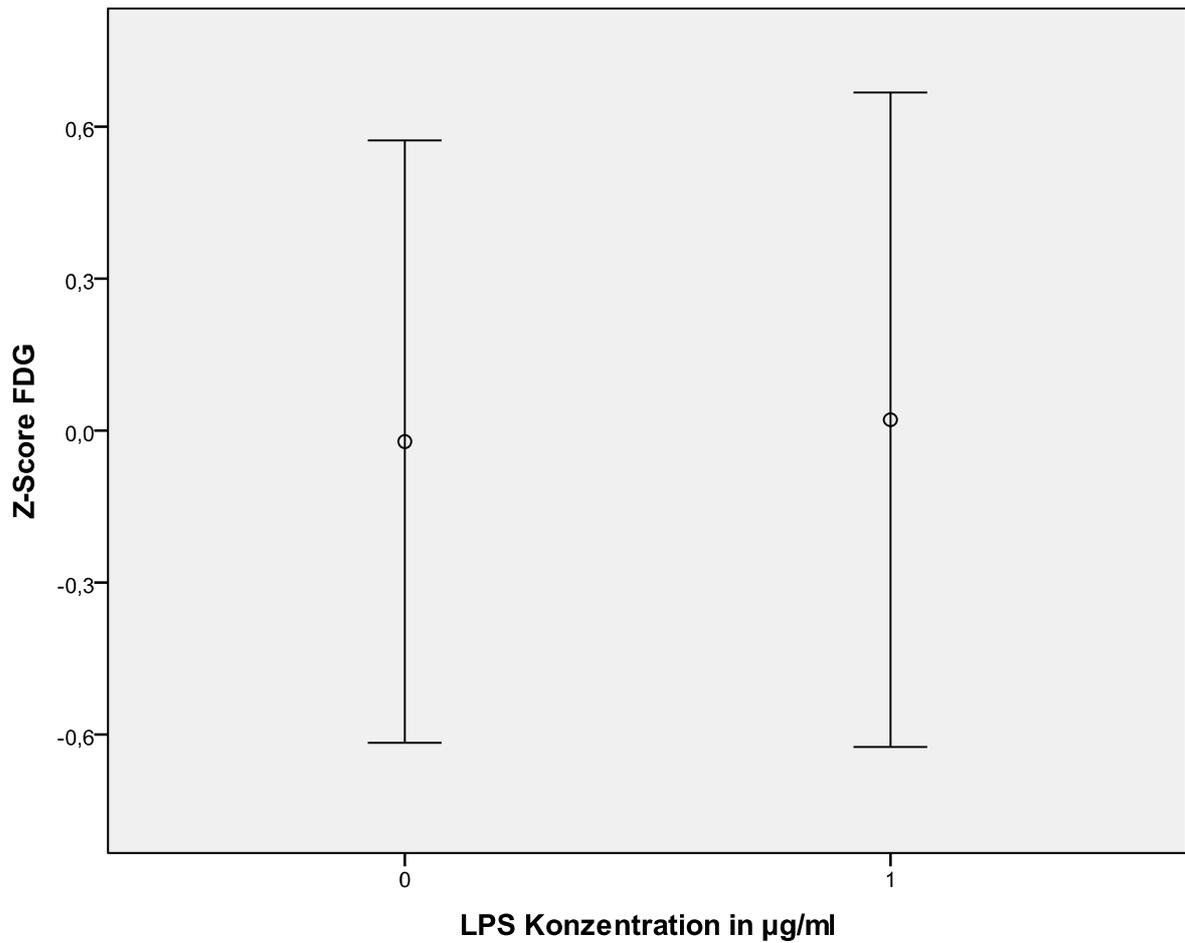


Abbildung 49

Z-Scores des [^{18}F]FDG-Uptakes der unstimulierten und LPS-stimulierten CD15+ Granulozyten in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung

4.3.5.2 [^3H]Cholin-Aufnahme

Die Boxplotdarstellung zeigt normalverteilte Werte (Abb. 50). Zugleich besteht keine statistische Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme. Zur weiteren Auswertung kann demnach die Mittelwertdarstellung mit 95% Konfidenzintervallen gewählt werden (siehe Abb. 51).

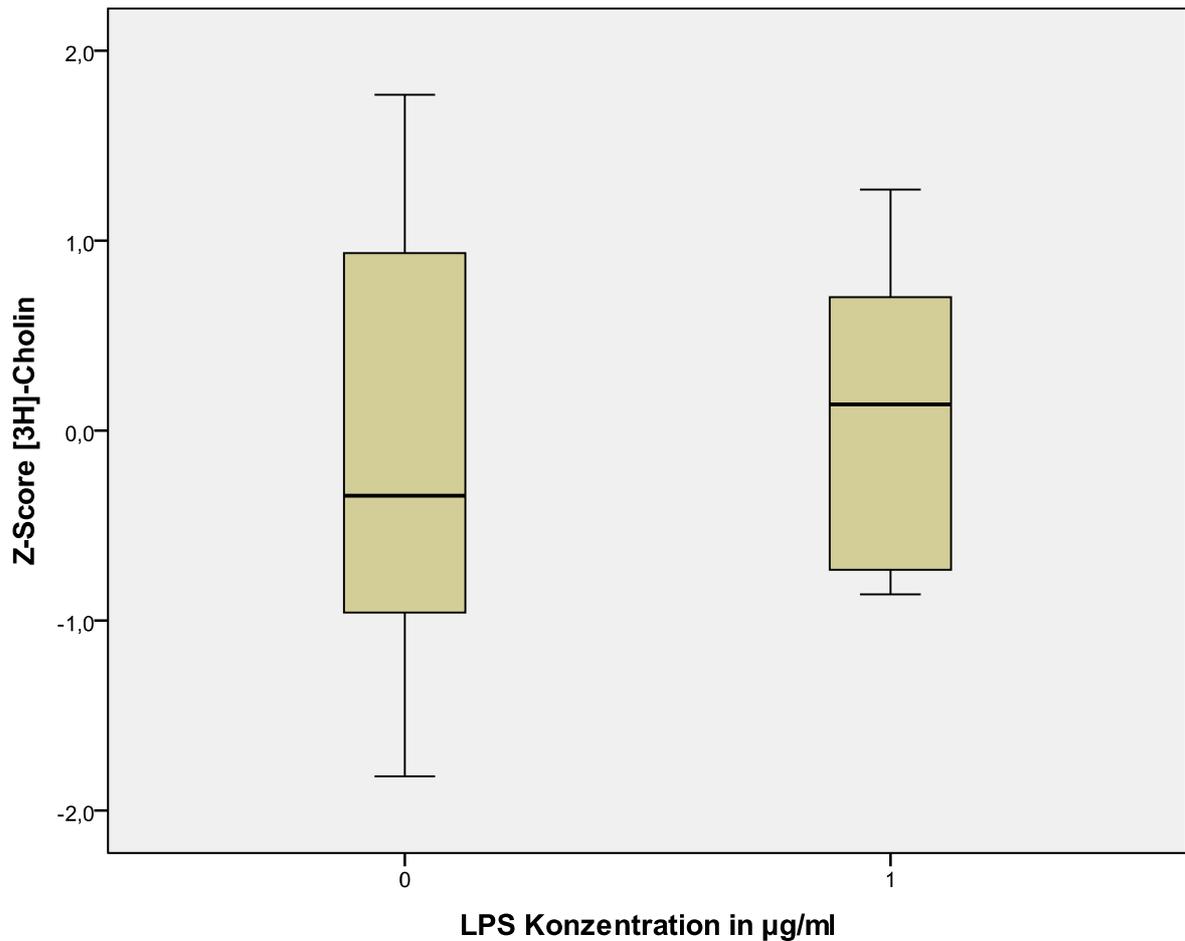


Abbildung 50

Z-Scores des [³H]Cholin-Uptakes der unstimulierten und LPS-stimulierten CD15+ Granulozyten in der Boxplotdarstellung.

Die Mittelwerte der Z-Scores der stimulierten Proben und unstimulierten Kontrolle liegen beide im Nullbereich. Bei sich überlappenden 95% Konfidenzintervallen (siehe Abb. 51) und statistischer Testung auf Unterschied (siehe Anhang A-12), wobei kein signifikanter Unterschied im Paarvergleich nachgewiesen wurde, ist die [³H]Cholin-Aufnahme in Granulozyten durch Zugabe von LPS nicht stimulierbar

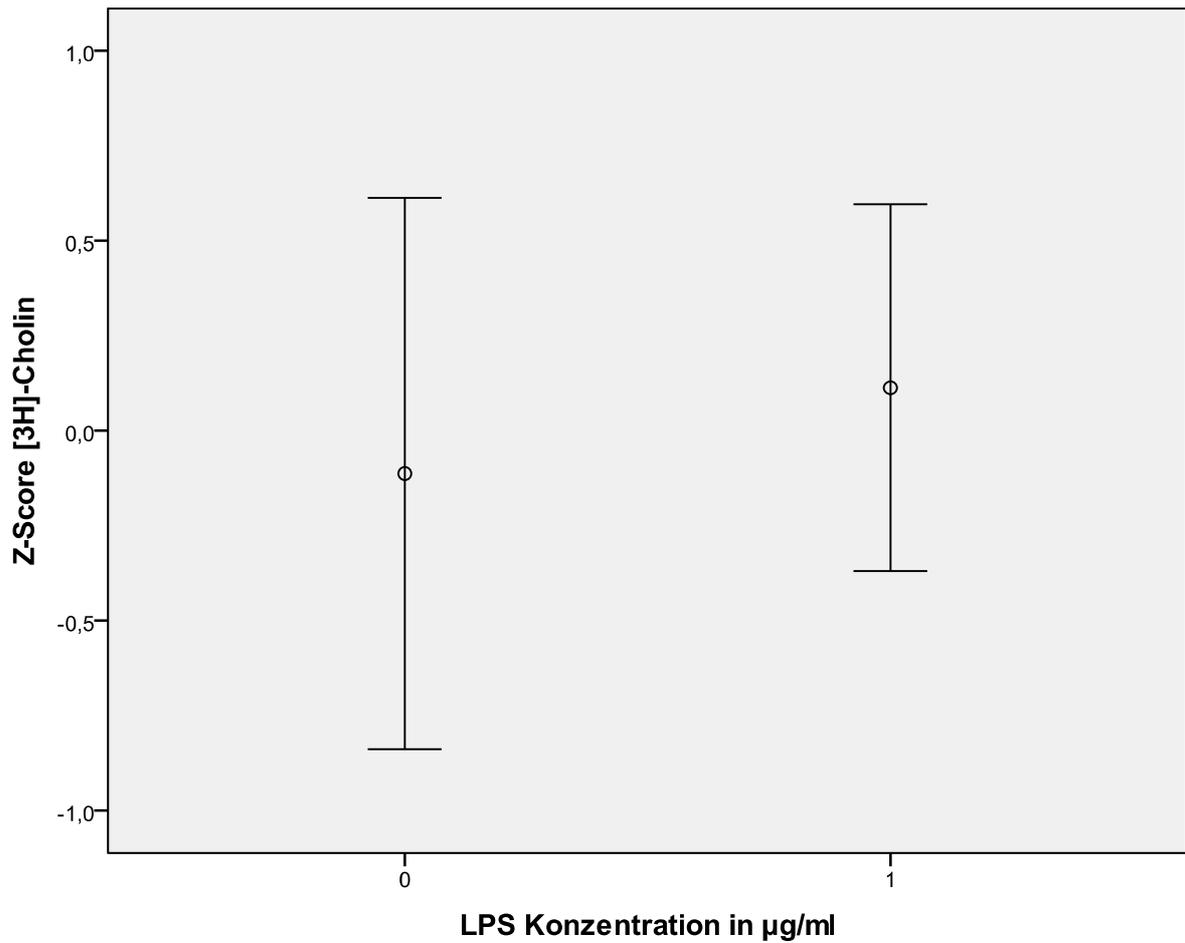


Abbildung 51

Z-Scores des [³H]Cholin-Uptakes der unstimulierten und LPS-stimulierten CD15+ Granulozyten in der Mittelwert- und 95% KI-Darstellung

Weder die [¹⁸F]FDG-Aufnahme noch die [³H]Cholin-Aufnahme konnten bei CD15+ Granulozyten durch 1 µg/ml LPS stimuliert werden.

4.4 Uptakevergleich der Tumorzellen unter adhärennten und suspensiven Bedingungen

Die bei den bisherigen Auswertungen verwendeten Uptakewerte der LNCaP- und PC-3-Zellen beziehen sich auf Uptakeversuche unter adhärennten, proliferativen Bedingungen (siehe Methodik 3.4.4). Allerdings wurde in dieser Arbeit auch der Uptake der Tracer [³H]Cholin und [¹⁸F]FDG in die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP- und PC-3- unter Suspensionsbedingungen untersucht, nachdem die Zellen aus Ihrem Wachstumsverbund gelöst wurden (siehe Methodik 3.4.3). Im Folgenden sollen die Uptakewerte der zwei Tumorzelllinien unter adhärennten Bedingungen mit den Uptakewerten unter Suspensionsbedingungen jeweils für die Tracer [³H]Cholin und [¹⁸F]FDG verglichen werden.

4.4.1 [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Die [¹⁸F]FDG-Uptakewerte der LNCaP und PC-3 Zellen unter adhärennten und suspensiven Bedingungen zeigen in der Boxplotdarstellung (hier nicht gezeigt) und bei der statistischen Testung keine Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme. Dies ist die Grundlage für die Mittelwert- und 95% Konfidenzintervalldarstellung der [¹⁸F]FDG-Uptakewerte wie in Abb. 52.

Die statistische Auswertung mit den multiplen Paarvergleichen erfolgte wie unter 3.6.6.1 beschrieben durch eine p-Wert Korrektur nach Bonferroni und befindet sich im Anhang A-13.

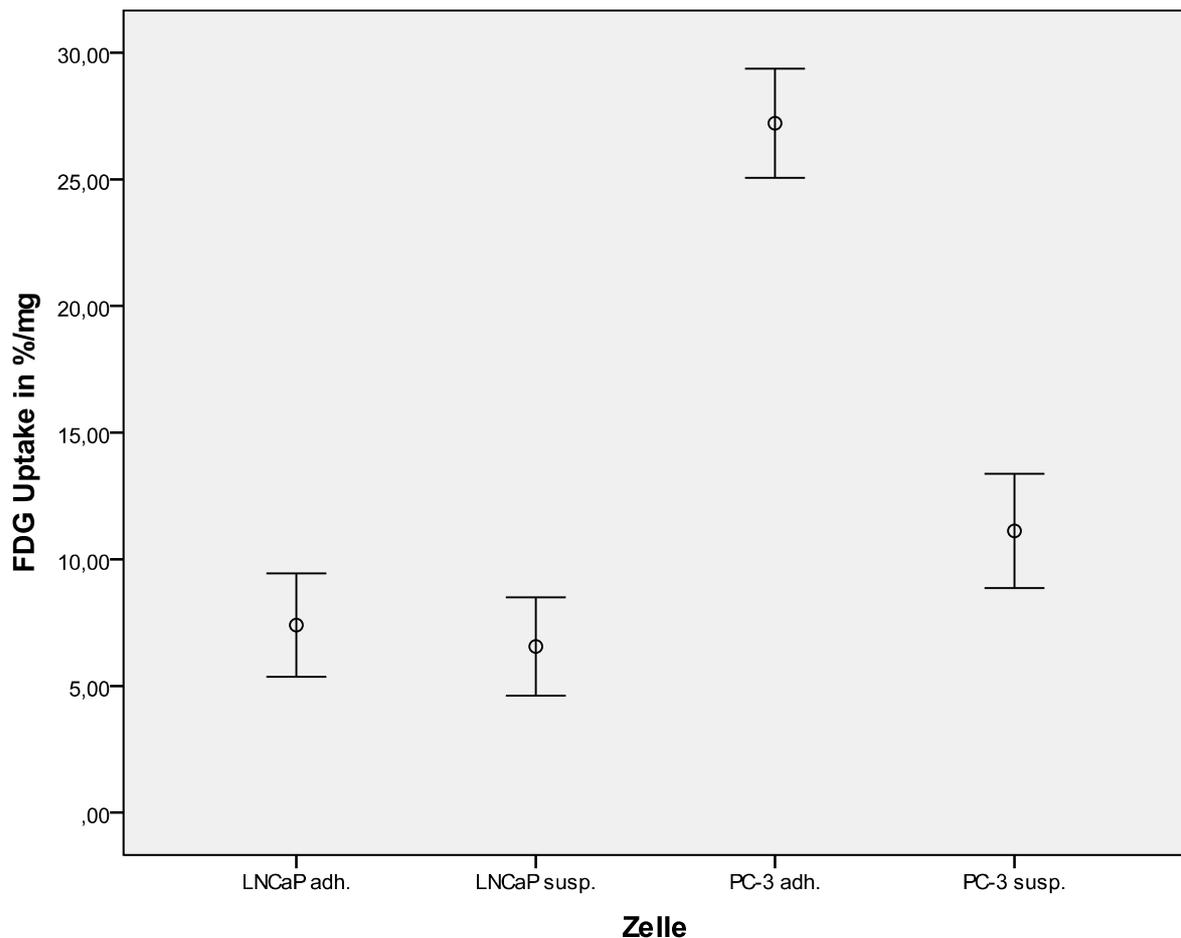


Abbildung 52

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle des [^{18}F]FDG-Uptakes in %/mg der Tumorzelllinien LNCaP und PC-3 in Suspension und unter adhärennten Bedingungen.

Die PC-3 Zellen nehmen unter adhärennten Bedingungen mehr [^{18}F]FDG auf als die LNCaP Zellen unter adhärennten Bedingungen (siehe Abb. 52). Dieser erhöhte [^{18}F]FDG-Uptake der PC-3 Zellen gegenüber den LNCaP Zellen gilt auch für Uptakeversuche unter Suspensionsbedingungen, jedoch ist hierbei der Unterschied nicht mehr so stark ausgeprägt. Vergleicht man nun den [^{18}F]FDG-Uptake zwischen Adhärenz- und Suspensionsbedingungen bezogen auf die jeweiligen Ziellinien, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei den LNCaP Zellen. Ein sehr großer und signifikanter Unterschied besteht jedoch zwischen Adhärenz- und Suspensionsbedingungen bei den PC-3 Zellen, wobei adhärennte PC-3 Zellen wesentlich mehr [^{18}F]FDG aufnehmen. Dies lässt vermuten, dass das aufwändigere Ablösen der PC-3 Zellen mit Beklopfen des Flaschenbodens (siehe Methodik 3.1.1.2) den Zellen schadet und somit den Traceruptake beeinflusst.

4.4.2 [³H]Cholin-Aufnahme

Die [³H]–Cholin-Uptakewerte der LNCaP und PC-3 Zellen unter adhärennten und suspensiven Bedingungen zeigen in der Boxplotdarstellung (hier nicht gezeigt) und bei der statistischen Testung keine Evidenz für die Ablehnung der Normalverteilungsannahme. Dies ist die Grundlage für die Mittelwert- und 95% Konfidenzintervallldarstellung der [³H]Cholin-Uptakewerte wie in Abb. 53.

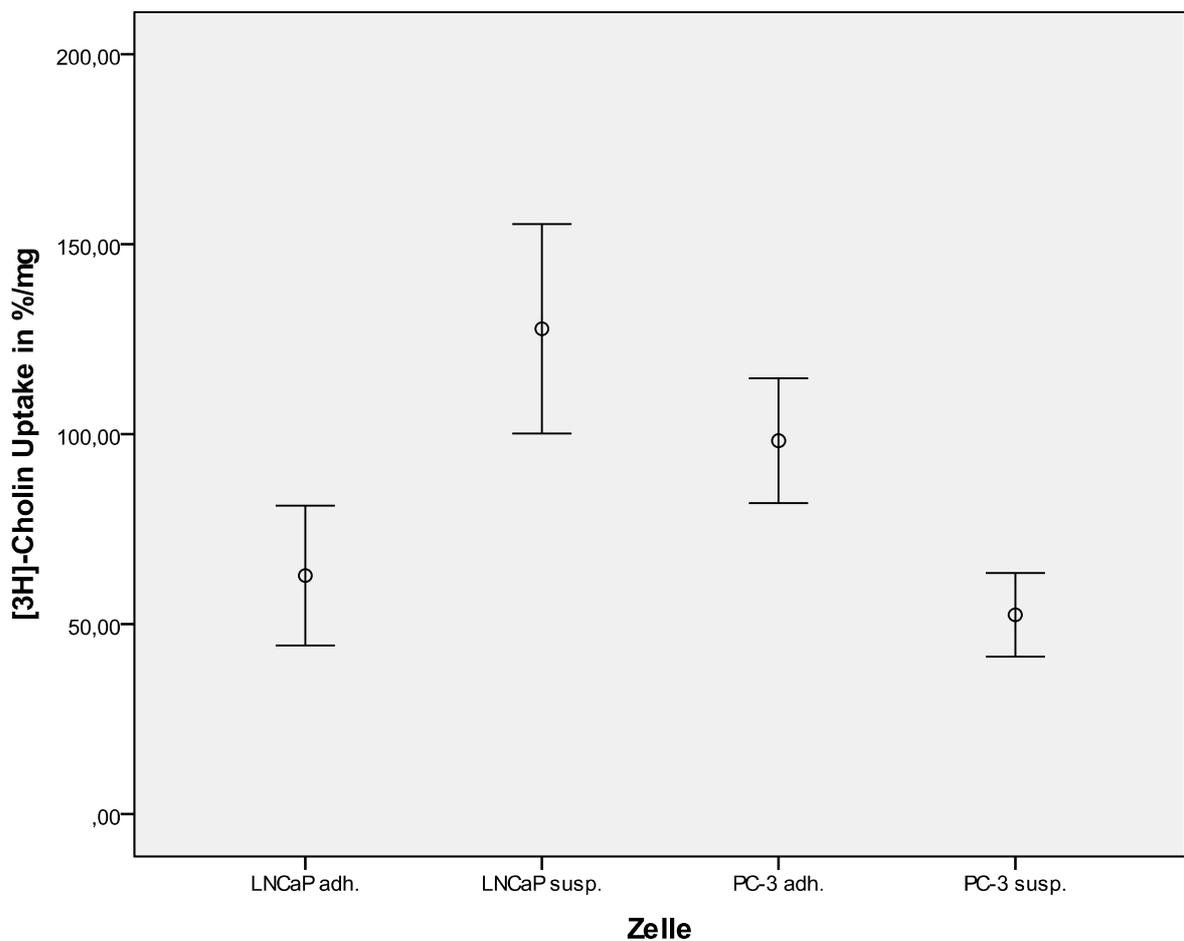


Abbildung 53

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle des [³H]–Cholin-Uptakes in %/mg der Tumorzelllinien LNCaP und PC-3 in Suspension und unter adhärennten Bedingungen.

Die multiple statistische Testung auf Unterschied zwischen den Gruppen erfolgte wie im Methodikteil dieser Arbeit beschrieben (siehe Methodik 3.6.6.1) durch eine Bonferronikorrektur der p-Werte. Die multiplen Paarvergleiche befinden sich im Anhang A-14. Die PC-3 Zellen nehmen unter adhärennten Bedingungen signifikant mehr [³H]Cholin auf als die LNCaP Zellen unter adhärennten Bedingungen (siehe Abb. 53). Dieser erhöhte [³H]Cholin-

Uptake der PC-3 Zellen gilt jedoch nicht mehr für Uptakeversuche unter Suspensionsbedingungen, bei denen die LNCaP Zellen signifikant mehr [³H]Cholin aufnehmen. Vergleicht man nun den [³H]Cholin-Uptake zwischen Adhärenz- und Suspensionsbedingungen bezogen auf die jeweiligen Ziellinien, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei den LNCaP Zellen zugunsten eines höheren [³H]Cholin-Uptakes unter Suspensionsbedingungen. Einen wie beim [¹⁸F]FDG-Uptake signifikant niedrigeren [³H]Cholin-Uptake zeigen die PC-3 Zellen in Suspension im Vergleich zu den PC-3 Zellen unter adhärennten Bedingungen. Auch für diesen verminderten Traceruptake spricht eine Zellschädigung beim aufwändigen Ablösevorgang der PC-3 Zellen (siehe Methodik 3.1.1.2).

4.5 Uptakewerte pro 10⁵ Zellen

Im Methodikteil wurde unter Punkt 3.6.3 beschrieben wie der Traceruptakewert von 1·10⁵ Zellen der jeweiligen Zelllinien berechnet wird. Im Folgenden werden die Traceruptakewerte in %/10⁵ Zellen den aus dem Ergebnisteil (siehe 4.2) dieser Arbeit schon bekannten Traceruptakewerten in %/mg (Protein) gegenübergestellt.

4.5.1 [¹⁸F]FDG-Uptakewerte pro 10⁵ Zellen

Abb. 54 zeigt den [¹⁸F]FDG-Uptake der verschiedenen Zelllinien in %/1·10⁵ Zellen. Vergleicht man diese Darstellung mit den Werten der [¹⁸F]FDG-Uptakedarstellung in %/mg wie sie aus Abb. 55 hervorgehen, so sind zunächst keine großen Unterschiede zu erkennen. Allerdings zeigen die großen Zellen mit viel Proteingehalt wie Makrophagen und LNCaP Zellen (siehe Methodikteil 3.6.3) in der Darstellung Abb. 54 im Verhältnis zu kleineren Zellen höhere [¹⁸F]FDG-Uptakewerte als in der Darstellung in Abb. 55. So ist in Abb. 54 der Abstand der Mittelwerte zwischen den PC-3 Zellen und den größeren LNCaP Zellen kleiner als in Abb. 55. Zugleich wird der Abstand der Makrophagen zu den kleinen Leukozyten größer als in Abb. 55.

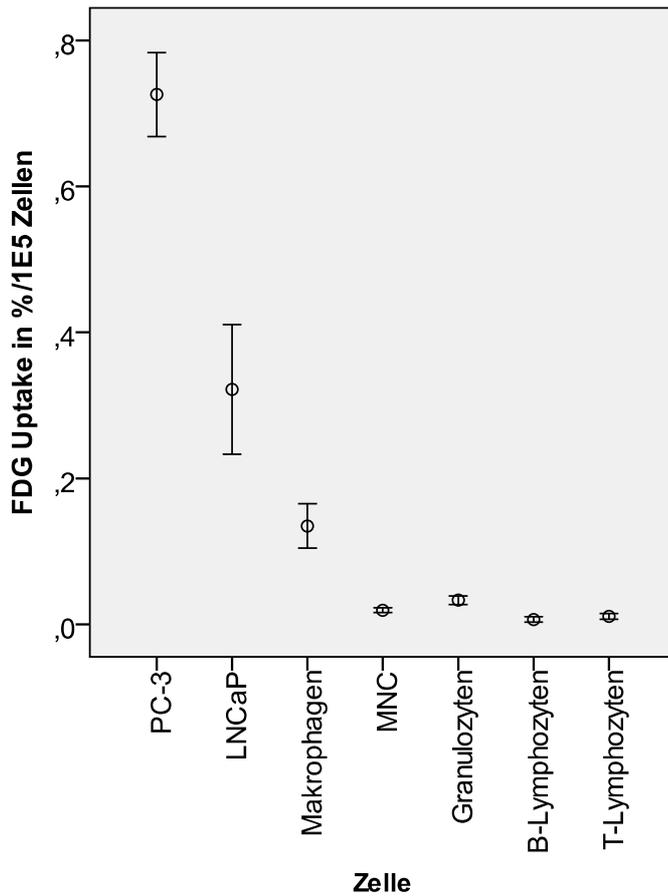


Abbildung 54

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle des [¹⁸F]FDG-Uptakes in % / 10⁵ Zellen für die verschiedenen Zelllinien

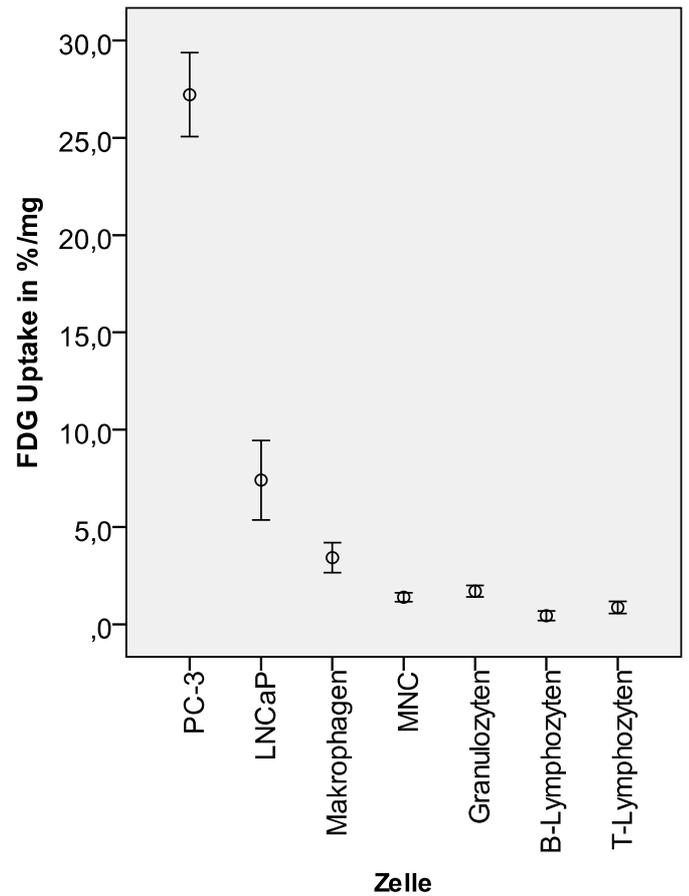


Abbildung 55

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle des [¹⁸F]FDG-Uptakes in % / mg (Protein) für die verschiedenen Zelllinien

4.5.2 [³H]Cholin-Uptakewerte pro 10⁵ Zellen

Abb. 56 zeigt den [³H]Cholin-Uptake der verschiedenen Zelllinien in %/10⁵ Zellen. Vergleicht man diese Darstellung mit den Werten der [³H]Cholin-Uptakedarstellung in %/mg wie sie aus Abb. 57 hervorgehen, so fällt auf, dass die großen Zellen wie LNCaP Zellen und Makrophagen nun [³H]Cholin-Uptakewerte im Bereich der PC-3 Zellen zeigen. Zugleich ist der Abstand der Mittelwerte der großen Zellen gegenüber den kleinen Leukozyten in Abb. 56 stärker ausgeprägt als in Abb. 57.

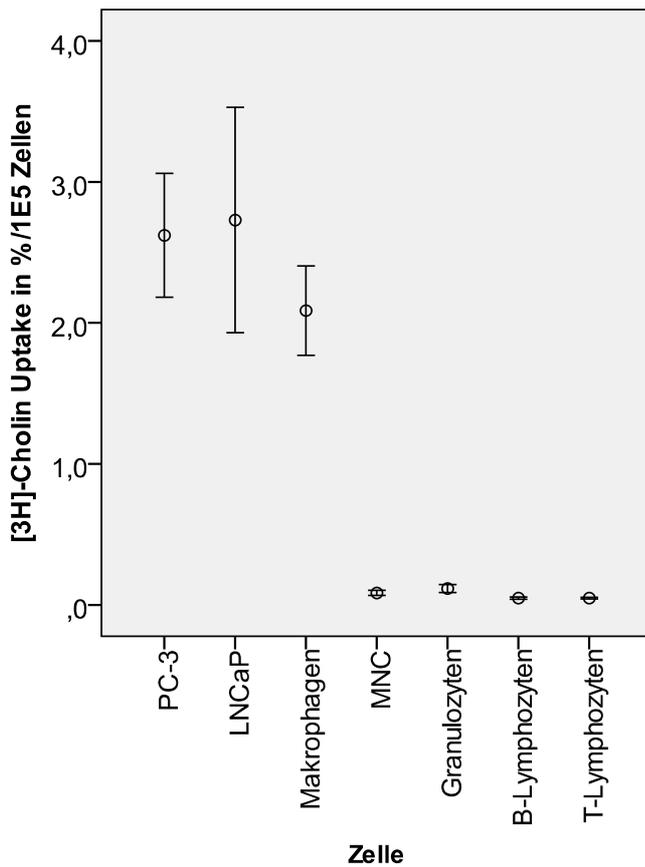


Abbildung 56

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle des $[^3\text{H}]$ Cholin-Uptakes in % / 10^5 Zellen für die verschiedenen Zelllinien

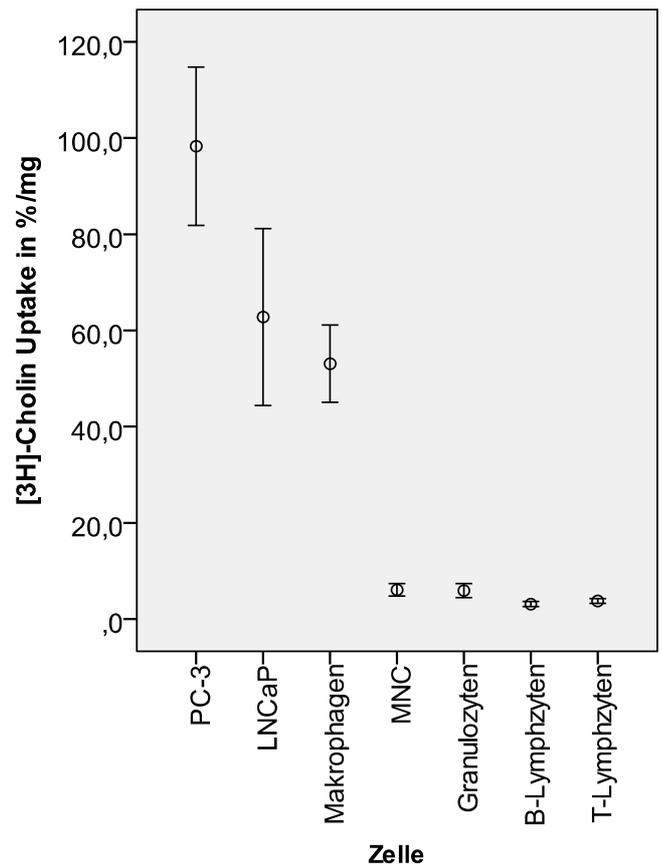


Abbildung 57

Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle des $[^3\text{H}]$ Cholin-Uptakes in % / mg (Protein) für die verschiedenen Zelllinien

Da große Zellen in der Uptakedarstellung in %/ 10^5 Zellen höhere Uptakewerte als in der Darstellung in %/mg zeigen ist die Tracer Uptakedarstellung in %/ 10^5 Zellen stark von Zellgröße abhängig. Der Einfluss der Größe der Zellen geht bei der Tracer Uptakedarstellung in %/mg somit verloren und wird in dieser Arbeit vorzugsweise angewendet.

5 Diskussion

Die Unterscheidung zwischen Tumor und Entzündung mittels FDG-PET ist ein grundlegendes Problem beim Staging maligner Tumore [Larson, 1994]. Eine erhöhte [^{18}F]FDG-Aufnahme in entzündliches Gewebe kann bei der Tumordiagnostik zu falsch positiven Befunden führen. Unter anderen wurde eine erhöhte [^{18}F]FDG Anreicherung in Abdominalabszessen [Tahara et al., 1989], Cerebralabszessen [Sasaki et al., 1990], Sarkoidosen, Tuberkulosen, Pneumonien, Entzündungen im Hals und Kopfbereich sowie chirurgischen Wunden [Bakheet et al., 1998] beschrieben. Als diagnostisch wertvolles Verfahren zur Darstellung entzündlicher Prozesse zeigt sich die FDG-PET bei chronischer Osteomyelitis, Weichteilinfektionen, orthopädischen Protheseninfektion und der Fokussuche bei Fieber unklaren Ursprungs [Kumar et al., 2008]. Ebenso gewinnt die Darstellung der inflammatorischen Komponente in instabilen atherosklerotischen Plaques mittels FDG-PET zunehmend an Bedeutung [Rudd et al., 2010].

Auch bei der PET mit ^{18}F und ^{11}C markierten Cholinderivaten (Cholin-PET) kann bei der Tumordiagnostik eine Entzündung zu falsch positiven Befunden führen. Erhöhte Traceranreicherungen in entzündliches Gewebe wurden bei der Sarkoidose und dem chronisch venösem Unterschenkelulkus [Schmid et al., 2005], bei inflammatorischen Beckenerkrankungen [Torikura et al., 2003], sowie bei entzündlichem Granulationsgewebe und der pigmentierten villonodulären Synovialitis [Tian et al., 2004] beobachtet. Roivainen et al. konnten zeigen, dass die Cholin-PET ein geeignetes Verfahren ist, um entzündliche Prozesse wie die proliferative Arthritis darzustellen.

Die PET/CT mit Cholinderivaten (Cholin-PET/CT) findet am häufigsten Anwendung in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Da das Prostatakarzinom, sowie die benignen Prostataläsionen Prostatitis und Prostatahyperplasie von einer entzündlichen Komponente begleitet werden, muss davon ausgegangen werden, dass bei diesen Läsionen Leukozyten an der erhöhten Cholinaufnahme beteiligt sind. In den verschiedenen Prostatapathologien befinden sich in unterschiedlichen Häufigkeiten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten [McClinton et al., 1990], [Kohnen et al. 1979], [De Marzo et al., 1999]. Diesbezüglich sollte in dieser Arbeit durch die in vitro Uptakeversuche an diesen Zellen herausgefunden werden inwiefern diese Zellen im Vergleich zu Prostatakarzinomzellen zum Cholinuptake beitragen und ob hierbei ein Unterschied zum [^{18}F]FDG-Uptake besteht.

5.1 Methodikdiskussion

5.1.1 Zellisolation

Um das [^{18}F]FDG- und [^3H]Cholin-Uptakeverhalten von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten in vitro mit Prostatakarzinomzellen zu vergleichen, mussten wir diese aus Buffy Coats isolieren. Mittels Dichtegradientenzentrifugation versuchten wir mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) und Granulozyten in einer möglichst hohen Reinheit zu gewinnen. Durchflusszytometrisch stellten wir in unserem mononukleären Zellisolat eine Verunreinigung mit 30% Granulozyten fest (Ergebnisse 4.1.1). Bei English et al. zeigte sich im mononukleären Zellisolat bei Verwendung eines Dichtegradienten 91% Lymphozyten und 5% Monozyten bei einer granulozytären Verunreinigung von 5%. Zugleich isolierten English et al. Granulozyten mit zwei Dichtegradienten in einer Reinheit von 98% bei einer lymphozytären Verunreinigung von nur 1% [English et al., 1974]. Wir isolierten Granulozyten in einer Reinheit von 85%.

Da es uns nicht gelang, Lymphozyten und Granulozyten in der von English et al. publizierten Reinheit zu isolieren und ebenfalls eine getrennte Isolation von T- und B-Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation nicht möglich war, führten wir eine weitere Zellsortierung mittels FACS durch. Entsprechend den Oberflächenmolekülen CD3, CD19 und CD15 erhielten wir dabei T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Granulozyten in einer Reinheit über 99%. Die erzielte hohe Reinheit durch FACS Zellsortierung geht insbesondere bei den Granulozyten-Uptakeversuchen mit einem erheblichen Mehraufwand einher. Hierbei mussten an einem Tag die Dichtegradientenisolation, Antikörpermarkierung, FACS Sortierung, Zellstimulation und der kombinierte Uptakeversuch durchgeführt werden. Zugleich wurden B-Lymphozyten oft nicht in der nötigen Menge isoliert, was das Verwerfen eines kompletten Versuchsansatzes erforderte. Da auch Granulozyten und T-Lymphozyten nur in begrenzter Anzahl isoliert wurde, konnten alle FACS isolierten Leukozyten nur in **einer** Stimulationsstufe stimuliert werden. Eine höhere Anzahl isolierter Zellen wäre unter der Verwendung des MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) Verfahren zu erwarten gewesen. Hierbei wird die zu isolierende Zelle mit Antikörpern markiert, der an magnetische Nanopartikel gekoppelt ist. Beim Durchfließen eines starken Magnetfeldes kann die markierte Zelle sortiert werden.

5.1.2 Der kombinierte Uptakeversuch

Da wir in unserer Studie für jede Zelllinie das [^{18}F]FDG- und [^3H]Cholin-Uptakeverhalten untersuchten und das Uptakeverhalten der beiden Tracer gegenüberstellen wollten, entschieden wir uns für einen kombinierten Uptakeversuch, bei dem die beiden Tracer zur gleichen Zeit denselben Zellen zugeführt werden.

Um die Anreicherung von Glukose und Cholin in Entzündungs- und Tumorgewebe zu untersuchen, führten Kubota et al. eine in vivo Doubletracerstudie mit [^{18}F]Fluormethylcholin und [^3H]Deoxyglukose an Ratten durch. Beide Tracer wurden den Ratten zur gleichen Zeit injiziert. Die [^{18}F]Fluormethylcholin Biodistributionsanalyse am Gammacounter konnte direkt nach der Gewebspräparation vorgenommen werden. Die Aktivität der [^3H]Deoxyglukose wurde nach dem Abklingen der ^{18}F -Aktivität am Betacounter gemessen [Kubota et al., 2006]. Auch Hara führte 2006 Studie durch, bei der die verschiedenen Tracer in einem in vitro Modell zur gleichen Zeit appliziert wurden. In einem kombinierten Uptakeversuch wurde hierbei die Aufnahme von [^{18}F]FDG, [^3H]Cholin und [^{14}C]Azetat in PC-3 und LNCaP Zellen unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht. Direkt nach dem Uptakeversuch wurden die Zellen in den Proben durch 1% SDS lysiert und in neuen Probegefäßen in den Gammacounter zu Messung der [^{18}F]FDG Aktivität überführt. Nach mehr als 8 Halbwertszeiten von ^{18}F wurden die Zerfallsraten von [^3H]Cholin und [^{14}C]Azetat entsprechend der emittierten Betaenergie von ^3H (Energie 0,0186 MeV) und ^{14}C (Energie 0,156 MeV) am Betacounter gemessen.

Bevor wir den kombinierten Uptakeversuch in unserer Arbeitsgruppe einführten, stellten wir fest, dass die Betastrahlung von ^3H - die ^{18}F -Messung am Gammacounter nicht beeinflusst. Zugleich zeigten wir, dass nach zwei Tagen die ^{18}F -Aktivität soweit abgeklungen ist, dass die ^3H -Messung am Betacounter nicht beeinflusst wird. Wir testeten den kombinierten Uptakeversuch durch einen Vorversuch, bei dem wir zeigen konnten, dass bei Verdoppelung die Zellzahl auch doppelt so viel [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin aufgenommen wird. Durch den Bezug der Uptakeraten auf die Proteinmasse der Proben zeigten sich die Uptakeraten bei der Zellverdopplung konstant (siehe Ergebnisse 4.1.4). Bei diesem Versuch wurde gleichzeitig mit dem kombinierten Uptakeversuch die Proteinbestimmung getestet. Im Anschluss daran wurden alle in dieser Arbeit durchgeführten Uptakeversuche als kombinierte Uptakeversuche gestaltet. Im Vergleich zu den [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin Einzeluptakeversuchen spart man sich durch den kombinierten Uptakeversuch Zeit und Material. Dies ist insbesondere bei den aufwändigen

Uptakeversuchen an FACS isolierten Leukozyten von großem Vorteil. Ebenfalls gewährt der kombinierte Uptakeversuch eine bessere Vergleichbarkeit der [^{18}F]FDG- und [^3H]Cholin-Uptakewerte, da der Uptake der jeweiligen Tracer simultan unter denselben Versuchsbedingungen bestimmt wird.

Für vergleichende Studien zum Traceruptake führten wir erfolgreich den kombinierten Uptakeversuch ein, der es uns ermöglichte, zwei in einer Probe befindliche Tracer entsprechend der unterschiedlicher Strahlenqualität und Halbwertszeit ihrer Isotope zu untersuchen. Um jedoch Tracer zu untersuchen, die an Isotope gleicher Strahlenart und Strahlenenergie gekoppelt sind, führten wir ein neues Doubletracermodell ein (siehe Anhang B). Mit diesem Modell war es möglich, unter Kenntnis der unterschiedlichen Halbwertszeiten und durch Zerfallsratenbestimmung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, die Aktivitäten zweier Isotope in einer Probe separat darzustellen. Dieses Doubletracermodell eignet sich insbesondere gut für vergleichende PET Tracer Studien, da die in der PET verwendeten Tracer mit Isotopen gekoppelt sind, die alle nach Positron/Elektron Annihilation Gammaquanten mit die gleiche Energie von 511 MeV emittieren. Wir testeten das Modell mit den Isotopen ^{11}C und ^{18}F und konnten durch Anwendung des Rechenmodells zeigen, dass die Einzelzerfallsraten von ^{11}C und ^{18}F in einer Doubletracerprobe genauso bestimmt werden können wie in ^{11}C - und ^{18}F -Einzelpuben.

Ein möglicher Einsatzbereich dieses Doubletracermodells ergibt sich durch Uptakeversuche, wie wir sie durchgeführt haben, oder durch Biodistributionsstudien, bei denen die Verteilung zweier PET Tracer verglichen werden soll. Durch einen minimalen Mehraufwand können durch dieses Modell zwei Tracer bei einem Versuchsansatz untersucht werden. Lediglich müssen statt eines Tracers zwei Tracer appliziert werden und im Gammacounter sollte die die Bestimmung der Zerfallsraten der Proben nach der ersten Messung nicht gestoppt werden, so dass eine zweite Messung zu einem späteren Zeitpunkt vorliegt. Berücksichtigt man die sehr langen Halbwertszeiten von ^{14}C und ^3H , so sehen wir in unserem Modell eine Möglichkeit, Doubletracerstudien durchzuführen, bei denen keine langlebigen radioaktiven Nuklide aufwändig entsorgt werden müssen.

Kombiniert man das in dieser Arbeit für alle Versuche durchgeführte Uptakemodell mit dem hier erarbeiteten Doubletracermodell, ist auch an Tracerstudien zu denken, bei denen mehr als 2 Tracer in einem Versuchsansatz verglichen werden.

Eine umfangreiche Literaturrecherche ergab keine Ergebnisse für in vitro Tracerstudien, die ein ähnliches Modell verwendeten, um zwei Positronenstrahler aufgrund ihrer unterschiedlichen Halbwertszeiten und zweier Messungen zu unterscheiden. Lediglich beschreiben Huang et al.

1982 wie durch ein ähnliches Rechenmodell zwei Tracer bei PET Aufnahmen unterschieden werden können. Aufgrund von Störsignalen in der PET berechnen Huang et al. die Ausgangszerfallsrate der jeweiligen Tracer nicht wie wir auf algebraischen Weg, sondern nähern sich den Zerfallsraten, durch die statistische Methode des kleinsten Quadrates. In ihrer Studie konnten sie bei einem PET Dummy, in dem sich in Wasserkammern die Isotope ^{13}N und ^{18}F befanden, die Zerfallsraten der jeweiligen Isotope einzeln darstellen. Converse et al. beschreiben jedoch, dass Doubletracer PET Aufnahmen mit der von Huang publizierten Technik aufgrund nicht konstanter räumlicher Tracerverteilung in vivo nicht möglich sind. Um PET Tracer in Doubletracerstudien zu unterscheiden, verwenden Converse et al. ein Kompartimentmodell [Converse et al., 2006].

Da Störsignale in einem nach außen abgeschlossenen System wie dem Gammacounter kaum vorkommen und die räumliche Tracerverteilung in vitro konstant ist, sehen wir für mögliche Tracerstudien unter Anwendung unseres Modells keine Einschränkungen.

5.2 Tumorzellvergleich

Der kombinierte Uptakeversuch mit [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin wurde an Androgen-abhängigen LNCaP- und Androgen-unabhängigen PC-3 Prostatakarzinomzellen durchgeführt. Wir untersuchten das Tracer-Uptakeverhalten dieser Prostatakarzinomzellen einmal an proliferierenden Zellen unter adhärennten Bedingungen, sowie ein zweites mal nach Ablösen der Zellen unter Suspensionsbedingungen.

Unter adhärennten und suspensiven Versuchsbedingungen zeigten die PC-3 Zellen einen höheren [^{18}F]FDG-Uptake als die LNCaP Zellen. Die höchsten [^{18}F]FDG-Uptakewerte wurden bei PC-3 Zellen unter adhärennten Bedingungen gemessen (siehe Ergebnisse 4.4.1). Müller et al. verglichen den [^{18}F]FDG-Uptake unter Suspensionsbedingungen von PC-3 Zellen mit dem von LNCaP Zellen und konnten ebenfalls bei all ihren Messungen höhere [^{18}F]FDG-Uptakewerte bei PC-3 Zellen zeigen [Müller et al., 2007]. Die gleiche Beobachtung beschreiben Price et al. in ihrer in vitro Studie an ebenfalls LNCaP- und PC-3 Zellen unter adhärennten Versuchsbedingungen [Price et al., 2002]. Auch Singh et al. erarbeiteten in ihrer Studie, dass das schnelle Wachstum Androgen-unabhängiger Zellen stark von Glukose abhängig ist [Singh et al., 1999]. Einen höheren [^{18}F]FDG-Uptake in Tumore mit Androgen-unabhängigen PC-3 Zellen im Vergleich zu Tumore mit Androgen-abhängigen Zellen konnten Javar et al. auch in vivo in einem Xenograftmodell zeigen [Javar et al., 2005]. Diese Beobachtungen konnten von Oyama et al. auch in einer klinischen PET Studie nachvollzogen werden, bei der höhergradig

entartet Tumore mit einem aggressiveren Wachstum und höheren Gleason-Scores höhere [^{18}F]FDG-Aufnahmen zeigten [Oyama et al., 1999].

Anders als beim [^{18}F]FDG-Uptake beschreiben Price et al. einen höheren [^{18}F]Fluorocholin- und Müller et al. einen höheren [^3H]Cholin-Uptake in Androgen-abhängigen LNCaP Zellen im Vergleich zu PC-3 Zellen. Müller et al. führten ihre Versuche unter Suspensionbedingungen durch, während Price et al. proliferierende Zellen unter adhärennten Bedingungen untersuchten [Müller et al., 2009] [Price et al., 2002]. In unseren Versuchen zeigte sich ein gleicher Sachverhalt bei Uptakeversuchen unter suspensiven Versuchsbedingungen. Allerdings konnten wir an proliferierenden Zellen unter adhärennten Bedingungen einen höheren [^3H]Cholin-Uptake der PC-3 Zellen messen (siehe Ergebnisse 4.4.2). Diese Beobachtung wäre mit dem aggressiveren Wachstumsverhalten der Androgen-unabhängigen PC-3 Zellen und dem erhöhten [^{18}F]FDG-Uptake dieser Zellen gut vereinbar. Wir vermuten, dass PC-3 Zellen, die im Vergleich zu LNCaP Zellen sehr fest am Kulturflaschenboden anwachsen durch das aufwändigere Ablösen der Zellen eher geschädigt werden. Dadurch wäre der in unserer Studie beobachtete geringere Uptake von [^3H]Cholin und [^{18}F]FDG bei PC-3 Zellen unter Suspensionsbedingungen im Vergleich zu Versuchen an PC-3 Zellen unter adhärennten Bedingungen erklärbar. Die Uptakeversuche von Price et al, die unter adhärennten Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten jedoch höhere Uptakewerte der LNCaP Zellen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass Price et al. bei ihren Uptakeversuchen an LNCaP und PC-3 keine Proteinbestimmung durchführten. Vergleichbare Zellmengen in der LNCaP und PC-3 Probe erwarteten sich die Autoren durch das Aussäen gleicher Zellzahlen zwei Tage vor dem Uptakeversuch, sowie einer Kontrolle auf 90% konfluierendes Wachstum am Tag der Versuchsdurchführung. Zugleich wurden die Zellen nach dem Uptakeversuch mit Trypsin/EDTA abgelöst, um sie in neuen Probengefäßen in den Gammacounter zu überführen. Da sich PC-3 Zellen wesentlich schwerer ablösen lassen als LNCaP Zellen, sollten als Ursache für die in der Studie nach Price et al. beobachteten geringeren [^{18}F]Fluorocholin-Uptakewerte der PC-3 Zellen eine geringere Anzahl von PC-3 Zellen in der Probe in Betracht gezogen werden. In unserer Studie lysierten wir die Zellen mit 5% SDS, um anschließend die Zerfallsraten des Zelllysates in einem neuen Probengefäß am Gammacounter zu bestimmen. Somit ist in unserer Studie das unterschiedliche Trypsin/EDTA Ablöseverhalten der PC-3 Zellen und LNCaP Zellen irrelevant. Zugleich wurden all unsere Uptakewerte mit der Proteinmasse der Proben verglichen, so dass unterschiedliche Zellzahlen keinen Einfluss auf unsere Uptakewerte in %/mg Protein haben.

5.3 FDG und Entzündungsgewebe

Die FDG Anreicherung in entzündlichem Gewebe sowie in Entzündungszellen wurde umfangreich untersucht. Nachdem klinisch hohe FDG Anreicherungen in Abszessen beobachtet wurden [Tahara et al., 1989] und Kubota et al. zeigen konnten, dass eine sehr hohe Traceraufnahme in Tumorgewebe von Makrophagen und Granulationsgewebe ausgeht [Kubota et al., 1992], führten Yamada et al. 1995 eine tierexperimentelle Studie an Ratten durch, um die FDG Verteilung in experimentell induzierten Entzündungsgewebe zu untersuchen. Autoradiographisch wurden hierzu sterile Entzündungen untersucht, die durch subkutane Injektion von Terpentin-Öl vier Tage zuvor hervorgerufen wurden. In der Makroautoradiographie zeigte sich eine Ringstruktur, die der Abszesswand entsprach. Eine mikroautoradiographische Analyse ergab eine hohe FDG Anreicherung in Schichten der Abszesswand, die eine hohe Fibroblaten-, Makrophagen- und Granulozytenkonzentration zeigten. Die Biodistributionsanalyse im chronisch entzündlichen Stadium, das sich am 4. Tag nach Terpentin-Injektion durch Makrophagen und Lymphozyteninfiltration darstellte, zeigte im Vergleich zum akut entzündlichen Stadium, das sich am ersten Tag nach der Terpentin-Injektion durch Granulozyteninfiltration darstellte, eine höhere [^{18}F]FDG Anreicherung [Yamada et al., 1995]. Auch Sugawara et al. beobachteten eine erhöhte [^{18}F]FDG-Aufnahme in Unterschenkelabszessen von Ratten, die durch intramuskuläre Injektion von E. Coli induziert wurden. Die [^3H]FDG Autoradiographie zeigte hierbei eine hohe Traceranreicherung in der an Makrophagen und Granulozyten reichen Abszesswand. Maximale Uptakewerte wurden in Regionen gemessen, die durch eine hohe Anzahl von Makrophagen ein hohes Makrophagen-zu Granulozyten-Verhältnis zeigten [Sugawara et al., 1999]. Kaim et al. beschreiben in ihrer Tracer vergleichenden Studie eine hohe [^{18}F]FDG-Aufnahme in experimentelle Staphylokokkus Aureus induzierte Abszesse bei Ratten. Im Vergleich zu [^{18}F]FDG zeigte [^{18}F]Fluoroethyltyrosin ([^{18}F]FET) keine Anreicherung im entzündlichen Gewebe [Kaim et al., 2002]. Auch Rau et al. beobachteten in ihrer Studie an Mäusen hohe [^{18}F]FDG-Uptakeraten in die mittels Streptozotocin und Concanavalin A induzierte chronische und akute Lymphadenitis, während [^{18}F]FET in dieser Studie jedoch keine Anreicherung in diesen Läsionen zeigte. Die Autoren schließen daraus, dass mittels FDG nicht zwischen Entzündung und Tumor unterschieden werden kann, während dies mit FET möglich sein sollte [Rau et al., 2002]. In der Studie von Kaim et al. werden Makrophagen und Granulozyten in der Abszesswand als

Ursache für den erhöhten [¹⁸F]FDG-Uptake gesehen [Kaim et al., 2002]. In unserer Studie zeigten unter den Leukozyten die Makrophagen die höchsten [¹⁸F]FDG-Uptakewerte. Ebenfalls wurden bei Granulozyten höhere [¹⁸F]FDG-Uptakewerte gemessen als bei den Lymphozyten und mononukleären Zellen (siehe Ergebnisse 4.2.1.1 – Tabelle 9). Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied lediglich zwischen dem [¹⁸F]FDG-Uptake der Makrophagen zu den Lymphozyten und MNCs aufgezeigt werden. Durch weitere Versuche könnten auch kleinere [¹⁸F]FDG-Uptake Unterschiede zwischen den Leukozyten signifikant dargestellt werden.

5.3.1 Granulozyten, Lymphozyten und die FDG Markierung

In einer in vitro Studie konnten Osman et al. darlegen, dass Granulozyten in der Lage sind, sehr hohe Mengen [¹⁸F]FDG aufzunehmen. Um infektiöse Prozesse in Patienten mit [¹⁸F]FDG markierten Leukozyten in der PET (FDG-Leukozyten PET) darzustellen, wurde in dieser Studie versucht, den [¹⁸F]FDG-Uptake in Granulozyten zu maximieren. Hierzu wurden 10⁸ über Dichtegradienten isolierte Granulozyten in vitro in 1 ml glukosefreien Puffer mit [¹⁸F]FDG inkubiert. Nach 30 min befand sich 80% der [¹⁸F]FDG Aktivität in den Granulozyten. Zugleich wurde in dieser Studie die Abhängigkeit des FDG-Uptakes von Inkubationszeit, Puffertemperatur, Glukosekonzentration im Puffer und Zellzahl der Granulozyten untersucht. So wie auch wir in unseren Vorversuchen zeigen konnten, war in der Studie von Osman et al. der [¹⁸F]FDG-Uptake in glukosefreien Puffer und bei hohen Zellzahlen maximal [Osman et al., 1992]. Bei unserem Vorversuch wurden nach 10 min Inkubation von 5·10⁶ mononukleären Zellen in glukosefreien Puffer mehr als 5% der [¹⁸F]FDG in die Zellen aufgenommen. Durch Erhöhung der Zellzahl sowie Inkubationsdauer wären wie bei Osman et al. höhere Uptakeraten zu erwarten. In unserem Vorversuch zur Aktivitätsverdünnungsreihe konnten wir zeigen, dass die Aufnahme von [¹⁸F]FDG in mononukleäre Zellen direkt mit der Menge an [¹⁸F]FDG im Puffer während der Inkubation korreliert. Eine unzureichende [¹⁸F]FDG-Markierung von Leukozyten in der FDG-Leukozyten PET kann somit durch Erhöhung der [¹⁸F]FDG Konzentration im Puffer überwunden werden.

Die nach dem Modell von Osman et al. mit [¹⁸F]FDG markierten Patientenleukozyten wurden in zwei klinischen Studien Patienten retransfundiert, um entzündliche Prozesse in der PET darzustellen. In einer Übersichtsarbeit zu diesen zwei Studien beschreibt Dumarey die [¹⁸F]FDG-Leukozyten PET/CT als ein Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität zur

Entzündungsdiagnostik. Zuverlässig wurden u. a. Kolondivertikulitis, Osteomyelitis und infizierte Gelenke diagnostiziert [Dumarey, 2009].

Auch Lymphozyten können hohe Mengen [^{18}F]FDG aufnehmen. Botti et al. inkubierten $2,5 \cdot 10^8$ Lymphozyten in [^{18}F]FDG versetzten glukosefreien Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und konnten nach 30 min zeigen, dass 64% von [^{18}F]FDG in die Zellen aufgenommen wurde [Botti et al., 1997]. Ein mögliches wissenschaftliches Anwendungsgebiet der PET/CT mit [^{18}F]FDG markierten Lymphozyten beschreiben Tumeh et al. bei der adoptiven Immuntherapie bei Karzinompatienten. Hierbei werden tumorinfiltrierende Lymphozyten aus Tumorgewebe isoliert, ex vivo vermehrt und aktiviert und anschließend in den Tumorpatienten retransfundiert. Die [^{18}F]FDG Markierung der retransfundierten Zellen ermöglicht mittels PET die Verteilung der Zellen in vivo zu verfolgen [Tumeh et al., 2008]. Maier et al. transfundierten natürliche Killerzellen (NKs) mit spezifischer Bindung an das Antigen HER2/neu in für dieses Antigen positive Tumormäuse. Durch [^{18}F]FDG Markierung der NKs konnte gezeigt werden, dass sich NKs mit spezifischer Bindung gegenüber HER2/neu im Vergleich zu NKs ohne spezifische Bindung gegenüber HER2/neu vermehrt im Tumorgewebe anreichern [Meier et al., 2008]. Eriksson et al. isolierten aus chirurgisch resezierten Milzen T-Lymphoblasten, die ex vivo mit Phytohemagglutinin aktiviert und somit zur Proliferation angeregt wurden. Nach [^{18}F]FDG Markierung wurden die Zellen in Schweine retransfundiert und mittels PET konnte die Verteilung im Körper nachverfolgt werden. Die Autoren entwickelten ein Modell, das klinisch zur Darstellung der adoptiven Immuntherapie am Menschen anwendbar ist, und konnten zugleich eine hohe Anreicherung intravenös retransfundierter T-Lymphoblasten in der Lunge zeigen [Eriksson et al., 2011]. Dass auch die Verteilung von Knochenmark-isolierten Stammzellen mittels [^{18}F]FDG Markierung dargestellt werden kann, zeigten Hofmann et al. in einer klinischen Studie an Myokardinfarktpatienten. Hierbei wurden aus dem Knochenmark mittels MACS-Technik CD34+ Stammzellen in hoher Reinheit isoliert und den Patienten nach [^{18}F]FDG Markierung intrakoronar retransfundiert. Im Vergleich zu Knochenmarkzellen, die unselektiv mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Knochenmark gewonnen wurden (Stammzellen, Progenitorzellen und hämatopoetische Zellen in verschiedenen Entwicklungsstufen), konnte durch PET/CT Aufnahmen dargestellt werden, dass sich CD34+ Stammzellen hoch selektiv im Grenzzonenbereich des Myokardinfarktes anreichern [Hofmann et al., 2005].

Dadurch dass Leukozyten hohe Mengen an [^{18}F]FDG aufnehmen können und mittels hoch empfindlicher PET/CT eine sehr genaue Darstellung der Zellverteilung in vivo möglich ist,

kann man von zukünftigen Studien erwarten, dass bisherige Zellmarkierungsmethoden mit [^{99m}Tc]Hexamethylproylene-Amine-Oxime (HMPAO) und [^{111}I]Oxine verlassen werden.

5.3.2 Makrophagen und die FDG Atherosklerosediagnostik

Makrophagen zeigten einen hohen [^{18}F]FDG-Uptake in autoradiographischen Analysen von Entzündungs- und Tumorgewebe [Kubota et al., 1992] [Yamada et al., 1995] [Kaim et al., 2002]. Auch wir konnten unter in vitro Bedingungen bei Makrophagen im Vergleich zu Granulozyten und Lymphozyten hohe [^{18}F]FDG-Uptakeraten feststellen. Da in atherosklerotischen Arterien die entzündliche Komponente durch Makrophagen vermittelt wird [Ross et al., 1999], zeigen auch atherosklerotische Plaques einen hohen [^{18}F]FDG-Uptake. Rudd et al. beschreiben 2002 die erste prospektive Studie an Patienten, in der die Entzündung in atherosklerotischen Plaques mittels FDG-PET dargestellt wurde. An 8 Patienten mit transitorischen ischämischen Attacken aufgrund von atherosklerotischen Läsionen der Karotisarterie konnten die Autoren durch FDG-PET die instabilen Plaques darstellen. Im Vergleich der rechten und der linken Karotisarterie der Patienten zeigten sich höhere FDG-Aufnahmen in der Arterienwand der durch Hemiparese oder unilaterale Amaurosis symptomatischen Karotisarterie. Zugleich wurden in dieser Studie atherosklerotische Plaques von Patienten, die durch Thrombendarteriektomie reseziert wurden, in [^3H]Deoxyglukose inkubiert und anschließend mittel Autoradiographie analysiert. Der [^3H]Deoxyglukoseuptake beschränkte sich hierbei auf an Makrophagen reiche Areale [Rudd et al., 2002]. In weiteren Studien konnte atherosklerotische Veränderungen auch an den Iliac-, Femoral-, Popliteal- und Vertebralarterien, sowie Aorta und an den Koronargefäßen mit der FDG-PET dargestellt werden [Hiari et al., 2011].

In einer in vitro Studie konnten Deichen et al. zeigen, dass menschliche Makrophagen ähnlich viel [^{18}F]FDG aufnehmen wie Glioblastomtumorzellen und pankreatische Adenokarzinomzellen. Die Autoren isolierten hierzu mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus menschlichem Vollblut und ließen anschließend Monozyten in der Zellkultur zu Makrophagen reifen. Durch Stimulation der Makrophagen mit LPS (Lipopolysaccharid) konnten die Zellen aktiviert und der [^{18}F]FDG-Uptake verdoppelt werden [Deichen et al., 2003]. Auch wir isolierten menschliche Makrophagen und konnten durch verschiedene Stimmulationsstufen mit unterschiedlichen LPS Konzentrationen zeigen, dass der [^{18}F]FDG-Uptake in Makrophagen graduiert stimulierbar ist und mit der LPS Konzentration

signifikant korreliert. In dem Übersichtsartikel von Hiari und Rudd zur FDG-PET Atherosklerosediagnostik diskutieren die Autoren, entsprechend der Studienlage, die Abhängigkeit des arteriellen [^{18}F]FDG Signals von der Anzahl der Makrophagen in den Plaques [Hiari et al., 2011]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass der Aktivierungsgrad der Makrophagen als Ursache für den erhöhten [^{18}F]FDG-Uptake in die Plaques berücksichtigt werden muss.

Tahara et al. verwendeten die FDG-PET zur Therapiekontrolle bei Atherosklerosepatienten. In ihre Studie wurden 43 Patienten eingeschlossen, die aufgrund von Tumorscreening eine PET-CT erhielten und hohe [^{18}F]FDG-Aufnahmen in der Thorakal- und Karotisarterie zeigten. Die eingeschlossenen Patienten wurden randomisiert auf eine Simvastatin-Therapiegruppe und Diät-Therapiegruppen verteilt. Simvastatin gehört zu der Medikamentengruppe der Statine, die durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase auch als Cholesterinsynthesehemmer (CSE) bezeichnet werden. Auch sind Statine als Plaquestabilisatoren bekannt und zeigen durch Senkung des C-reaktiven Proteins (CRP) antiinflammatorische Eigenschaften [Ridker et al., 2001]. In der Studie zeigte sich in einer Kontroll-FDG-PET nach 3 Monaten lediglich in der Simvastatin-Therapiegruppe im Vergleich zur Voraufnahme eine reduzierte [^{18}F]FDG-Aufnahme in die Plaques. Die Autoren sehen somit die FDG-PET als geeignetes Verfahren zur Kontrolle der Statintherapie [Tahara et al., 2006]. Ob Statine eine direkte antiinflammatorische Wirkung auf Makrophagen haben, würde sich gut in unserem in vitro Makrophagen-Stimulationsmodell untersuchen lassen. Durch die in vitro Inkubation stimulierter Makrophagen mit Statinen sowie weiterer potentieller Plaquestabilisatoren und anschließender [^{18}F]FDG-Uptakebestimmung könnte herausgefunden werden, ob Plaquestabilisatoren einen direkten Einfluss auf die Makrophagenaktivierung haben.

In der Charakterisierung inflammatorischer Prozesse in den Arterien mit FDG-PET, sehen Schwaiger et al. in ihrem Übersichtsartikel zur PET/CT Diagnostik bei koronarer Herzerkrankung die Möglichkeit, Patienten mit einem erhöhten Risiko für das akute Koronarsyndrom zu identifizieren. Auch erwähnen die Autoren den Wert dieses Verfahrens für Wissenschaft und Forschung, um neue pharmakologische Therapiestrategien zu überwachen [Schwaiger et al., 2010]

5.4 [^{18}F]- und [^{11}C]Cholin und Entzündungsgewebe

In der Cholin-PET zeigte entzündliches Gewebe in zahlreichen klinischen Beobachtungen hohe Cholinaufnahmen. Insbesondere in benignen Läsionen mit einer hohen Anzahl von Makrophagen konnten erhöhte [^{11}C]Cholin-Anreicherungen festgestellt werden [Tian et al., 2004]. Experimentell konnten Wyss et al. an Ratten ein hohe [^{18}F]Cholin-Aufnahme in der Staphylokokken-Abszesswand nachweisen. In der autoradiographischen Analyse beschränkte sich der Uptake auf makrophagenreiches Granulationsgewebe. Die Autoren schließen daraus, dass Makrophagen hauptsächlich für den [^{18}F]Cholin-Uptake verantwortlich sind [Wyss et al., 2004]. Auch Laitinen et al. sehen in Makrophagen die Ursache für die hohe [^{11}C]Cholin-Aufnahme in atherosklerotische Plaques. In ihrer experimentellen Mausstudie konnte Laitinen et al. nach einer [^{11}C]Cholin-Biodistributionsanalyse zeigen, dass die Aorten von Atherosklerosemäusen signifikant mehr [^{11}C]Cholin aufnehmen als die Aorten von Kontrollmäusen. In der autoradiographischen Analyse der Aorten stellte sich heraus, dass das aufgenommene [^{11}C]Cholin sich auf die Plaques konzentriert. Entzündete Plaques mit einem hohen Anteil an Makrophagen zeigten eine höhere [^{11}C]Cholin-Aufnahme [Laitinen et al., 2010].

Auch in unserer Studie zeigten Makrophagen einen hohen, mit LNCaP Tumorzellen vergleichbaren in vitro Uptake von [^3H]Cholin. Auch nahmen die Makrophagen signifikant mehr [^3H]Cholin auf als mononukleäre Zellen, Granulozyten und B- und T- Lymphozyten (siehe Ergebnisse 4.2.2.1). Dies sind besondere Erkenntnisse, da Makrophagen in der benignen Prostatahyperplasie und im Prostatakarzinom mehr als 20% des Leukozyteninfiltrates darstellen [McClinton et al. 1990]. Die Makrophageninfiltration muss somit als ursächliche Teilkomponente des Cholinuptakes bei diesen Läsionen in Betracht gezogen werden. In der chronisch prostatatischen Läsionen wie der proliferativen inflammatorischen Atrophie sind nur vereinzelt Makrophagen und zu 85% T-Lymphozyten zu finden [De Marzo et al., 1999]. Da T-Lymphozyten in unserer Studie nur sehr geringe [^3H]Cholin-Uptakeraten zeigten, sollte sich die chronische Prostatitis in der Cholin-PET weniger deutlich darstellen als das Prostatakarzinom und die benigne Prostatahyperplasie (BPH). Diese Vermutung unterstützt die Patientenstudie von Souvatzoglou et al., in der die Histologie von Prostataresektaten mit der Cholin-PET verglichen wurde. Gegenüber normalem Prostatagewebe zeigten in dieser Studie die BPH und das Prostatakarzinom signifikant höhere Cholin-Uptakewerte, während für die

Prostatitis Uptakewerte in der Höhe von normalem Prostatagewebe und unterhalb der BPH und des Prostatakarzinoms gemessen wurden.

5.5 Tracervergleich

In einem weiteren tierexperimentellen Ansatz untersuchten Kubota et al. an Ratten die [^{18}F]Cholin- sowie die [^{14}C]Deoxyglukose- und [^3H]Deoxyglukose-Aufnahme in Entzündungs- und Tumorgewebe. Hierzu wurden undifferenzierte Hepatomzellen in Ratten injiziert, während in den gleichen Ratten zugleich eine aseptische Entzündung durch Injektion von Terpentin-Öl hervorgerufen wurde. Die Biodistributionsanalyse zeigte eine höhere Anreicherung der Deoxyglukose gegenüber Cholin in Tumor- und Entzündungsgewebe. Allerdings ist die Deoxyglukoseaufnahme in Tumorgewebe gegenüber Entzündungsgewebe dreimal höher während die Tracer-Tumorselektivität für Cholin in Form der Tumor-Inflammationratio in dieser Studie jedoch nur ungefähr 1,5 beträgt. Nach weiterer autoradiographischen Analyse der Entzündung, wobei die von Wyss et al. beschriebene [^{18}F]Cholin Anreicherung in der Abszesswand nicht nachvollzogen werden kann, dies jedoch für die Deoxyglukose möglich ist, schreiben die Autoren, dass mittels [^{18}F]Cholin-PET eine Unterscheidung zwischen Entzündung und Tumor möglich sein sollte [Kubota et al., 2006].

Von Waarde konnte 2006 jedoch in einem ähnlichen tierexperimentellen Modell zeigen, dass [^{11}C]Cholin eine schlechtere Tumorselektivität als [^{18}F]FDG aufweist. Hierfür wurde mittels Biodistribution die Traceraufnahmen von Terpentinöl-induzierter Entzündung und induzierten Gliom-Tumoren in Ratten erfasst. Die Tumorselektivität errechnete sich aus den Tumor-Inflammationratios der jeweiligen Tracer durch Division der SUVs (Standardized Uptake Values) des Tumors durch die SUVs der Entzündung. Für [^{18}F]FDG wurde ein Wert von 3,5 ermittelt, wohingegen [^{11}C]Cholin mit einem Wert von 1,0 keine Tumorselektivität zeigte. Die Autoren folgern daraus, dass aufgrund dieser Tatsache falsch-positive Ergebnisse in der Cholin-PET Diagnostik bei Karzinompatienten entstehen können [Waarde et al., 2006].

Auch in unserer Studie wurden die Uptakeraten der Entzündungszellen mit den Uptakeraten der Tumorzelllinien LNCaP und PC-3 verglichen und als Entzündungszell/Tumorzell Indices (ETIs) für die Tracer FDG und [^3H]Cholin dargestellt. Um die ETIs der jeweiligen Tracer zu vergleichen, errechneten wir den faktoriellen Unterschied und waren somit in der Lage, Aussagen über die Tumorselektivität der Tracer zu formulieren. Bezogen auf LNCaP Tumorzellen und Makrophagen wurde [^3H]Cholin unselektiver als [^{18}F]FDG in

Entzündungszellen und Tumorzellen aufgenommen (siehe 4.2.3.1). Dies beobachteten wir auch bei PC-3 Zellen und Makrophagen (siehe 4.2.3.2) und führen das auf die hohen [³H]Cholin-Uptakeraten der Makrophagen zurück. Makrophagenreiche benigne Läsionen produzieren somit eher in der Cholin-PET als in der FDG-PET bei der Karzinomdiagnostik falsch positive Befunde. Unsere Beobachtung unterstützt somit die in der Studie von Waarde beschriebene geringere Tumorselektivität von [¹¹C]Cholin gegenüber [¹⁸F]FDG.

In weiteren Vergleichen von mononukleäre Zellen und Granulozyten mit LNCaP Zellen zeigte [³H]Cholin gegenüber [¹⁸F]FDG eine höhere Tumorselektivität (siehe 4.2.3.1). Allerdings konnte dies bei PC-3 Zellen nicht beobachtet werden. Im Vergleich von B-Lymphozyten mit PC-3 Zellen wurde wie bei den Makrophagen eine geringere Tumorselektivität von [³H]Cholin gegenüber [¹⁸F]FDG festgestellt (siehe 4.2.3.2). Dies konnte wiederum bei LNCaP Zellen nicht beobachtet werden.

Die Tracer [³H]Cholin und [¹⁸F]FDG zeigten keinen Unterschied im Bezug auf Tumorselektivität bei den T-Lymphozyten im Vergleich zu den Prostatakarzinomzellen PC-3 und LNCaP.

5.6 Zellstimulation

5.6.1 Granulozytenstimulation

An der Pathogenese zahlreicher Lungenerkrankungen sind entscheidend neutrophile Granulozyten beteiligt, deren metabolische Aktivität durch die FDG-PET nicht invasiv dargestellt werden kann. Die Abhängigkeit der [¹⁸F]FDG-Aufnahme vom Aktivierungszustand stimulierter und unstimulierter Granulozyten wurde in zwei in vitro Studien untersucht. Jones et al. isolierten neutrophile Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation aus menschlichem Vollblut. Bei einer Reinheit von über 95% Granulozyten wurden [³H]Deoxyglukose Uptakeversuche an unstimulierten Zellen, an in TNF α vorinkubierten Zellen und an formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) stimulierten Zellen durchgeführt. fMLP ist ein formyliertes Tripeptid mit positiv chemotaktischer Eigenschaft auf neutrophile Granulozyten und wurde den Zellen zu Beginn des Uptakeversuches verabreicht. Zu verschiedenen Messzeitpunkten konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von [³H]Deoxyglukose in TNF α aktivierte sowie fMLP stimulierte Zellen höher ist als bei den unstimulierten Kontrollen [Jones et al., 2002]. Auch Schuster et al. konnten durch verschiedene

LPS Konzentrationen Granulozyten aktivieren und somit die Aufnahme von [³H]Deoxyglukose in die Zellen stimulieren. Die Autoren isolierten hierzu mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Knochenmark von Mäusen neutrophile Granulozyten in einer Reinheit von über 90% und inkubierten diese eine Stunde in LPS (1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01µg/ml), bevor die Aufnahme von [³H]Deoxyglukose in einem Uptakeversuch bestimmt wurde [Schuster et al., 2006]. Auch Stöber et al. konnten isolierte menschliche Granulozyten durch 8-stündige LPS Inkubation (0,1 µg/ml) aktivieren und in den anschließenden Uptakeversuchen erhöhte [¹⁸F]Fluoroethylthiysin- und [³H]Methionin Aufnahmen gegenüber der unstimulierten Kontrolle feststellen.

Bei einem von uns durchgeführten Vorversuch an mittels Dichtegradienten isolierten Granulozyten konnte nach 2h Inkubation der Zellen in den LPS Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml kein erhöhter [¹⁸F]FDG und [³H]Cholin-Uptake gegenüber der unstimulierten Kontrolle festgestellt werden (in dieser Arbeit nicht dargestellt). Demnach gestalteten wir unser Protokoll für die Granulozytenstimulation nach den Studien von Schuster et al. und Stöber et al. und inkubierten die FACS isolierten CD15+ Granulozyten zwei Stunden in LPS 0,1 µg/ml, bevor der kombinierte Uptakeversuch durchgeführt wurde. In unseren Versuchen ließ sich weder die [³H]Cholin- noch die [¹⁸F]FDG-Aufnahme der FACS isolierten CD15+ Granulozyten mit LPS stimulieren (siehe Ergebnisse 4.3.5). Die in unserer Studie erzielte hohe Reinheit FACS isolierter Granulozyten sollte hierbei in Betracht gezogen werden. Durch die Abwesenheit anderer Leukozyten erfolgt eine Zellstimulation unter äußerst unphysiologischen Bedingungen, da hierbei eine interzelluläre Chemotaxis zwischen verschiedenen Leukozyten nicht möglich ist. Somit wäre hierbei die nicht stimulierbare FDG-Aufnahme auf eine mangelnde Zellaktivierung zurückzuführen. Da in den oben erwähnten Studien durch alleinige Dichtegradientenzentrifugation nicht die von uns mittels FACS erzielte Granulozytenreinheit erzielt werden kann, könnten in diesen Studien auch andere Leukozyten zur erhöhten FDG-Aufnahme unter LPS Stimulation beigetragen haben. Weitere Studien an hoch aufgereinigten MACS oder FACS isolierten Granulozyten könnten diesbezüglich Klarheit verschaffen.

5.6.2 Makrophagen Stimulation

Die aus mononukleären Zellen gezüchteten Makrophagen konnten wir entsprechend der hohen Menge von Dichtegradienten isolierten mononukleären Zellen auf beliebig vielen 24-Well

Platten kultivieren. Aufgrund der hohen Anzahl der Makrophagenproben war es möglich die Zellen in verschiedenen LPS Konzentrationsstufen zu stimulieren. Bei der Ausarbeitung unseres Stimulationsprotokolls orientierten wir uns an zwei Studien, in denen Traceruptakeversuche an LPS stimulierten Makrophagen durchgeführt wurden. Menschliche Makrophagen wurden hierbei, wie in unserer Studie, aus mononukleären Zellen gezüchtet und nach Deichen et al. 24 h in 8 µg/ml LPS und nach Stöber et al. 48 h in 0,1 µg/ml LPS inkubiert. Bei den anschließenden Uptakeversuchen konnten Deichen et al. zeigen, dass die [¹⁸F]FDG-Aufnahme in den LPS stimulierten Proben höher war als in der unstimulierten Kontrolle [Deichen et al., 2002]. Stöber et al. führten Uptakeversuche mit [¹⁸F]Fluoroethylthirosin durch und beobachteten ebenfalls höhere Traceruptakeraten bei den nach ihrem Protokoll stimulierten Makrophagen [Stöber et al., 2006]. Um die in den erwähnten Studien beschriebene LPS Stimulationskonzentrationen zu berücksichtigen, inkubierten wir unsere Makrophagen in den LPS Konzentrationen 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml für 48 h. Hierbei zeigte sich der [¹⁸F]FDG-Uptake in signifikanter Korrelation zur LPS Konzentration graduiert stimulierbar. Eine Stimulierbarkeit des [³H]Cholinuptakes konnten wir in unseren Versuchen nicht demonstrieren. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass sich in einem unserer Versuchsansätze eine geringe Stimulation des [³H]Cholinuptakes zeigte während sich in einem weiteren Versuchsansatz eher eine von der LPS Konzentration abhängige Suppression des [³H]Cholinuptakes nachvollziehen ließ. Bei der Wiederholung des Stimulationsversuches streuten die Werte derart, dass wir die im Ergebnisteil unter 4.3.1.2 nicht normalverteilten Werte erhielten. Als Konsequenz müssten weitere kombinierte Uptakeversuche an stimulierten Makrophagen durchgeführt werden, um den Einfluss des Aktivierungszustandes auf die [³H]Cholinaufnahme darzustellen. In weiteren Uptakeversuchen an Makrophagen mit [¹⁸F]FDG und [¹¹C]Cholin sehen wir auch die Möglichkeit, unser Doubletracermodeill mit zwei Isotopen gleicher Strahlenqualität erstmals an Zellen zu testen.

Nachdem Laitinen et al. in makrophagenreichen, entzündeten atherosklerotischen Plaques in Mäusen erhöhte [¹¹C]Cholin-Uptakewerte feststellen konnten [Laitinen et al., 2010] und in weiteren klinischen Studien arterielle atherosklerotische Wandveränderungen sich mittels Cholin-PET darstellen ließen [Kato et al., 2009], sehen wir eine Abhängigkeit des [¹¹C]Cholinuptake in Makrophagen von deren Aktivierungsgrad als sehr wahrscheinlich und erhoffen dies durch weitere Versuche zu bestätigen.

5.6.3 Stimulation von MNCs und Lymphozyten

Dass die Lymphozytenaktivierung entscheidenden Einfluss auf die [¹⁸F]FDG-Aufnahme hat, konnte in zahlreichen in vitro Studien belegt werden. Shozushima et al. isolierten menschliche Lymphozyten aus Vollblut. Die durch Dichtegradientenzentrifugation isolierten mononukleären Zellen wurden vier Stunden in Zellkulturflaschen inkubiert, um die an Plastik adhärent wachsenden Monozyten von in Suspension befindlichen Lymphozyten zu trennen (Adhärenzseparation). Nach zwei Tagen Inkubation der Lymphozyten in Kulturmedium mit dem mitogenen Lektin Phytohemagglutinin (PHA 5 µg/ml) konnte ein 8-fach erhöhte [¹⁸F]FDG-Aufnahme gegenüber einer unstimulierten Kontrolle gemessen werden. In der gleichen Studie zeigten Splenozyten, die aus den Milzen von Mäusen isoliert wurden (hauptsächlich Lymphozyten), nach zellvermittelter physiologischer Stimulation 40-fach erhöhte [³H]Deoxyglukose Uptakeraten. Die Maussplenozyten wurden hierbei in vivo gegen Schafserythrozyten (Sheep Red Blood Cells –sRBC) immunisiert und durch den in vitro Kontakt zu sRBC-Antigen präsentierenden Makrophagen aktiviert [Shozushima et al., 2003]. Auch Ishimori et al. konnten erhöhte [¹⁸F]FDG-Uptakeraten bei aktivierten Maussplenozyten feststellen. In vivo wurden die Mäuse mit dem mitogenen Lektin Concanavalin A (ConA) (10 mg/kg) vorbehandelt, bevor nach 24 h die Splenozyten isoliert wurden und anschließend in vitro der [¹⁸F]FDG-Uptake dieser Zellen mit unvorbehandelten Splenozyten verglichen wurde. Zugleich konnte durch Biodistributionsanalysen gezeigt werden, dass nach 24h ConA-Behandlung der Mäuse die Leber und die Milz signifikant mehr [¹⁸F]FDG aufnehmen [Ishimori et al., 2002].

Nachdem Stöber et al. in vitro erfolgreich die [¹⁸F]Fluorethyltyrosinaufnahme in Lymphozyten durch ConA stimulieren konnten und Mukherjee et al. in ihrer Studie, die aktivierende Wirkung von ConA auf Lymphozyten durch proliferative Assays belegten, entschieden wir uns für die ConA-Stimulation unserer Lymphozyten und mononukleären Zellen. Stöber et al. inkubierten ihre durch Dichtegradientenzentrifugation und Adhärenzseparation aus menschlichen Buffy Coats isolierten Lymphozyten 24 h in 250 µg/ml ConA Medium [Stöber et al., 2006]. Mukherjee et al. führten ihre Versuche an CD4+ T-Lymphozyten durch, die aus mononukleären Zellen durch Komplementsystem-vermittelter Lyse der Nicht-CD4+ Zellen in einer Reinheit von 95% gewonnen wurden und bestimmten die Proliferationsraten der Zellen durch deren [³H]Thymidine Aufnahme. Die Autoren konnten für ConA in der Konzentration von 1 µg/ml die stimulatorische Wirkung auf die Proliferationsraten belegen, während sie für die Konzentration von 4 µg/ml eine suppressive Wirkung beschreiben [Mukherjee et al., 2005].

Um für unsere FACS isolierten Lymphozyten die optimalen ConA-Stimulationskonzentrationen herauszufinden, inkubierten wir mononukleäre Zellen in den ConA-Konzentrationen 0 µg/ml, 1 µg/ml, 50 µg/ml und 250 µg/ml und führten anschließend einen [¹⁸F]FDG-Uptakevorversuch durch (siehe Ergebnisse 4.1.5). In diesem Vorversuch zeigten sich viele tote Zellen und eine geringe [¹⁸F]FDG-Aufnahme bei der ConA-Konzentration von 250 µg/ml. Dementsprechend wählten wir für unsere kombinierten Uptakeversuche an mononukleären Zellen die ConA-Stimulationskonzentrationen 0 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml und 50 µg/ml. Die FACS isolierten B- und T-Lymphozyten inkubierten wir in 0 µg/ml und 1 µg/ml ConA, nachdem auch Kruisbeek et al. in ihrem Artikel über T-Zellaktivierung niedrigere ConA-Konzentrationen von 1- 10 µg/ml bei 48 h Inkubation erwähnen [Kruisbeek et al., 2004].

Unter Anwendung unseres ConA-Stimulationsmodells konnten wir die [¹⁸F]FDG-Aufnahme in mononukleäre Zellen stimulieren. Eine maximale [¹⁸F]FDG-Aufnahme beobachteten wir bei der ConA-Konzentration 4 µg/ml (siehe Ergebnisse 4.3.2.1). Auch die [³H]Cholin-Aufnahme ließ sich durch die ConA-Aktivierung der mononukleären Zellen stimulieren (siehe Ergebnisteil 4.3.2.2). Somit konnten wir erstmalig in unserer Studie zeigen, dass die leukozytäre Cholin-Aufnahme stimulierbar ist. Auch beobachteten wir eine erhöhte [³H]Cholin und [¹⁸F]FDG-Aufnahme in aktivierte B-Lymphozyten (siehe Ergebnisse 4.3.4). Bei den T-Lymphozyten konnten wir weder erhöhte [³H]Cholin- noch erhöhte [¹⁸F]FDG-Uptakeraten nach Inkubation der Zellen für 48 h in 1 µg/ml ConA messen (siehe Ergebnisse 4.3.3.).

Um die ausbleibende T-Zellaktivierung in unsere Stimulations-Uptakeversuchen zu verstehen, recherchierten wir anhand einer Übersichtsarbeit von Kilpatrick den ConA-Stimulationsmechanismus bei T-Lymphozyten. ConA sowie Phytohemagglutinin (PHA) gehören zur Stoffgruppe der Lektine. Lektine sind Glykoproteine, die sich unspezifisch an zelluläre Oberflächenmoleküle binden und somit die Agglutination von Leukozyten und Erythrozyten verursachen können. Dies konnten wir nach ConA-Inkubation der mononukleären Zellen in unserem Vorversuch als Zellklustering beobachten (siehe Ergebnisse 4.1.5). Entsprechend der Vielfalt der Lektine werden zelluläre Oberflächenmoleküle mit unterschiedlicher Affinität gebunden. Die dabei ausgelösten biochemische Reaktionen können sich auf T-Lymphozyten mitogen oder antimitogen auswirken. Insbesondere Lektinen mit einer hohen Affinität zum T-Zellrezeptor wie ConA und Phytohemagglutinin zeigen mitogene Eigenschaften. Jedoch reicht eine alleinige Bindung der Lektine an den T-Zellrezeptor nicht

aus, um T-Lymphozyten zu aktivieren. Akzessorische Zellen wie B-Lymphozyten und Monozyten sind bei Lektin-Stimulation notwendig, um costimulatorische Moleküle zu binden und somit die T-Zell Aktivierung zu verstärken. Hierbei wird insbesondere das auf den T-Lymphozyten vorkommende Oberflächenmolekül CD28 erwähnt, das durch Bindung der auf B-Lymphozyten und Monozyten vorkommenden Moleküle CD80 und CD86 entscheidend costimulatorisch wirkt [Kilpatrick, 1999]. Die Notwendigkeit der akzessorischen Zellen bei der ConA-Aktivierung von T-Lymphozyten wurde bei unserem Stimulationsmodell nicht berücksichtigt. Die mittels FACS isolierten CD3+ T-Lymphozyten wurden in einer sehr hohen Reinheit mit ConA inkubiert, sodass costimulatorische Moleküle von anderen Zellen als T-Lymphozyten nicht gebunden werden konnten. Zugleich muss darauf verwiesen werden, dass der T-Zellrezeptor dem Oberflächenmolekül CD3 entspricht. Da aufgrund der FACS Isolation der T-Lymphozyten mittels Anti-CD3-Antikörpermarkierung der T-Zell Rezeptor schon durch den Anti-CD3-Antikörper gebunden wurde, ist eine weitere Zellaktivierung durch die Bindung von Lektinen fraglich. Unser Stimulationsmodell für T-Lymphozyten muss somit als ungenügend betrachtet werden und erklärt somit das Ausbleiben der erhöhten [¹⁸F]FDG- und [³H]Cholin-Aufnahme in die Zellen.

Umfangreich untersuchten Frauwirth et al. die Glukoseaufnahme in Abhängigkeit der CD28 Costimulation bei T-Lymphozyten, die in hoher Reinheit mittels MACS isolierten wurden. Die Autoren konnten zeigen, dass die [³H]Deoxyglukose Aufnahme in T-Lymphozyten durch alleinige Anti-CD3- oder alleinige Anti-CD28-Antikörper Inkubation nicht zu stimulieren ist. Allerdings nahmen die T-Lymphozyten in dieser Studie nach simultaner Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper Inkubation vielfach mehr [³H]Deoxyglukose auf als Zellen, die mit einem Kontrollantikörper inkubiert wurden. Ebenfalls konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass durch simultane T-Zellrezeptor- und CD28- Bindung intrazellulär die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) aktiviert wird [Frauwirth et al., 2002]. Die PI3K vermittelt als Schlüsselenzym nach Insulinrezeptorstimulation die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt), die wiederum durch Aktivierung glykolytischer Enzyme die zelluläre Glukoseaufnahme steigert und durch GLUT Transporter-Translokation den gesteigerten transmembranösen Glukosetransport ermöglicht [Frauwirth et al., 2004].

Da bei den von uns isolierten T-Lymphozyten der T-Zellrezeptor nach der FACS Zellisolation schon durch die Anti-CD3- Antikörper gebunden wurde, wäre durch zusätzliche Applikation von Anti-CD28-Antikörpern eine erfolgreiche Zellaktivierung nach Frauwirth et al. möglich

gewesen. Ebenfalls beschreiben Kruisbeek et al. eine Methode, T-Lymphozyten zu stimulieren, die in hoher Reinheit isoliert wurden. Demnach ist eine Zellaktivierung mit Phorbol 12-Mystrat 13-Azetat (PMA) kombiniert mit Ionomycin möglich, da die T-Lymphozytenaktivierung nach diesem Protokoll keine zusätzlichen Zellen zur Corezeptorstimulation erfordert [Kruisbeek et al., 2004]. Mond et al. beschreiben durch die Inkubation von B-Lymphozyten in PMA und Ionomycin auch für diese Zellen ein geeignetes Stimulationsmodell [Mond et al., 1999].

Um die [^{18}F]FDG- und [^3H]Cholin-Aufnahme in Lymphozyten umfangreicher zu charakterisieren und den Einfluss der Zellaktivierung auf die Traceraufnahme abzuschätzen, sehen wir es als erforderlich, dass weitere kombinierte Uptakeversuche an in hoher Reinheit isolierten Lymphozyten durchgeführt werden. Insbesondere durch eine differenziertere Zellstimulation sollte es möglich sein, hieraus neue Erkenntnisse für die Cholin-PET und FDG-PET abzuleiten.

6 Zusammenfassung:

Um bei der PET-Tumordiagnostik zwischen Entzündung und Tumor zu differenzieren, ist es erforderlich, dass PET-Tracer selektiv von Tumorgewebe aufgenommen werden. Diesbezüglich wurde in der vorliegenden *in vitro* Studie die Tumorzellselektivität von [^{18}F]FDG und [^3H]Cholin durch kombinierte Uptakeversuche untersucht, bei denen der Uptake der zwei Tracer simultan an denselben Zellen bestimmt werden konnte.

Die kombinierten Uptakeversuche wurden an den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 durchgeführt. Hierbei wurden die [^{18}F]FDG- und [^3H]Cholin-Uptakeraten der proliferierenden Zellen unter adhärennten Versuchsbedingungen mit den Uptakeraten der nicht-proliferierenden Zellen unter suspensiven Versuchsbedingungen verglichen. Es stellte sich dabei heraus, dass insbesondere der Traceruptake der PC-3 Zellen von den Umständen, unter denen die Versuche durchgeführt wurden, abhängig ist.

Nach Isolation von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Granulozyten mittels FACS in exzellenter Reinheit, wurde an diesen Zellen, sowie an isolierten Makrophagen und mononukleären Zellen, der kombinierte Uptakeversuch durchgeführt. Die in vielen autoradiographischen Studien beschriebenen hohen [^{18}F]FDG- und [^3H]Cholin-Uptakeraten von Makrophagen konnten in dieser Studie erstmalig auch *in vitro* dargestellt und mit den Uptakeraten anderer Leukozyten verglichen werden. Insbesondere [^3H]Cholin zeigte hierbei hohe Uptakeraten in Makrophagen, die mit der [^3H]Cholin-Aufnahme von Tumorzellen vergleichbar war.

Bezogen auf ihre Tumorzellselektivität erwies sich im Vergleich der Tracer [^3H]Cholin weniger geeignet als [^{18}F]FDG, um zwischen Makrophagen und den Prostatakarzinomzellen zu unterscheiden. Andererseits konnte mit [^{18}F]FDG anhand der in unserer Studie gemessenen Uptakeraten weniger selektiv zwischen Granulozyten und LNCaP Tumorzellen unterschieden werden.

In den Versuchen zur Zellstimulation konnte erstmalig gezeigt werden, dass die [^{18}F]FDG-Aufnahme in Makrophagen graduiert stimuliert werden kann. Die Aufnahme von [^3H]Cholin ließ sich jedoch nicht stimulieren. Stimulierte mononukleären Zellen sowie B-Lymphozyten zeigten erhöhte [^{18}F]FDG-Uptakewerte. Auch der [^3H]Cholin-Uptake in diese Zellen war

stimulierbar. Somit wird in dieser Studie erstmalig die Stimulierbarkeit der [³H]Cholin-Aufnahme in Leukozyten beschrieben. Aufgrund eines unzureichenden Stimulationsmodells für T-Lymphozyten, konnten hier keine erhöhten Traceruptakewerte nachvollzogen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass neben Tumorzellen auch Entzündungszellen [³H]Cholin in hohem Maße aufnehmen. Eine Unterscheidung zwischen Tumor und Entzündung ist somit mittels Cholin-PET schlecht möglich. Da unter den Entzündungszellen besonders die Makrophagen viel [³H]Cholin aufnehmen und diese Zellen zugleich in hoher Zahl im Prostatakarzinom sowie der Prostatahyperplasie vorkommen, muss davon ausgegangen werden, dass besonders die Makrophagen an der erhöhten [¹¹C]Cholin-Aufnahme in die genannten Prostataläsionen beteiligt sind.

Neben dem kombinierten Uptakeversuch mit [¹⁸F]FDG- und [³H]Cholin, wurde im Rahmen dieser Studie ein weiteres DoubletracermodeLL entwickelt, bei dem zwei PET-Tracer, die Gammaquanten mit der gleichen Energie von 511 MeV emittieren, gleichzeitig appliziert werden können. Durch ein Rechenmodell ist es hierbei möglich, die Zerfallsraten der jeweiligen Isotope einzeln darzustellen. Im Vergleich zu Uptakeversuchen mit einem einzelnen Tracer erfordert dieses DoubletracermodeLL in der praktischen Durchführung keinen Mehraufwand und eignet sich diesbezüglich besonders für Studien bei denen zwei PET-Tracer an demselben Modell verglichen werden sollen.

7 Literaturverzeichnis:

American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer staging manual. In: 7th ed. 2009
<http://www.cancerstaging.org/staging/posters/prostate8.5x11.pdf>

Albertsen PC, Hanley JA, Fine J.

20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer.
JAMA. 2005 May 4;293(17):2095-101

Andriole GL, Bostwick DG, Brawley OW, Gomella LG, Marberger M, Montorsi F, Pettaway CA, Tammela TL, Teloken C, Tindall DJ, Somerville MC, Wilson TH, Fowler IL, Rittmaster RS; REDUCE Study Group. Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer.
N Engl J Med. 2010 Apr 1;362(13):1192-202.

Bakheet SM, Powe J.

Benign causes of 18-FDG uptake on whole body imaging.
Semin Nucl Med. 1998 Oct;28(4):352-8. Review.

Bastian PJ, Nuhn P, Stadler TC, Roosen A, Stief CG.

[Prostatic inflammation and prostate cancer].

Urologe A. 2010 May;49(5):636-8. Review. German.

Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Häggman M, Andersson SO, Bratell S, Spångberg A, Busch C, Nordling S, Garmo H, Palmgren J, Adami HO, Norlén BJ, Johansson JE; Scandinavian Prostate Cancer Group Study No. 4.

Radical Prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer.
N Engl J Med. 2005 May 12;352(19):1977-84

Böni RA, Hutter BE, Trinkler F, Jochum W, Pestalozzi D, Krestin GP.

[Preoperative T-staging of prostatic carcinoma: endorectal magnetic resonance tomography compared with other imaging and clinical methods].

Rofo. 1996 Aug;165(2):152-8.

Botti C, Negri DR, Seregini E, Ramakrishna V, Arienti F, Maffioli L, Lombardo C, Bogni A, Pascali C, Crippa F, Massaron S, Remonti F, Nerini-Molteni S, Canevari S, Bombardieri E.

Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes.
Eur J Nucl Med. 1997 May;24(5):497-504.

McClinton S, Miller ID, Eremin O.

An immunohistochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate in benign and malignant prostatic disease.

Br J Cancer. 1990 Mar;61(3):400-3

Converse, Michele Barone (Editor), Emilio Borchi (Editor), Andrea Gaddi (Editor), Claude Leroy (Editor), Larry Price (Editor), Pier-Giorgio Rancoita (Editor), Randal Ruchti (Editor)

Astroparticle, Particle And Space Physics, Detectors And Medical Physics Applications (Proceedings of the 9th Italian Conference)

Publisher: World Scientific Pub Co Inc (April 25, 2006)

ISBN-10: 9812567984

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A.

Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer.

JAMA. 1998 Sep 16;280(11):969-74.

De Jong IJ, Pruim J, Elsinga PH, Vaalburg W, Mensink HJ.

Visualization of prostate cancer with ¹¹C-choline positron emission tomography.

Eur Urol. 2002 Jul;42(1):18-23.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG.

Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. Am J Pathol. 1999 Dec;155(6):1985-92.

Dearnaley DP, Khoo VS, Norman AR, Meyer L, Nahum A, Tait D, Yarnold J, Horwich A.

Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial.

Lancet. 1999 Jan 23;353(9149):267-72.

DeGrado TR, Coleman RE, Wang S, Baldwin SW, Orr MD, Robertson CN, Polascik TJ, Price DT.

Synthesis and evaluation of ¹⁸F-labeled choline as an oncologic tracer for positron emission tomography: initial findings in prostate cancer.

Cancer Res. 2001 Jan 1;61(1):110-7.

Deichen JT, Prante O, Gack M, Schmiedehausen K, Kuwert T.

Uptake of [18F]fluorodeoxyglucose in human monocyte-macrophages in vitro.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003 Feb;30(2):267-73. Epub 2002 Nov 5.

Denham JW, Steigler A, Lamb DS, Joseph D, Turner S, Matthews J, Atkinson C, North J, Christie D, Spry NA, Tai KH, Wynne C, D'Este C.

Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial.

Lancet Oncol. 2011 May;12(5):451-9.

Detusche Gesellschaft für Urologie

Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Version 1.03 - März 2011

AWMF-Leitlinien-Register Nr. 043-022OL

Drzezga, Alexander (2007): Hirntumoren (Buchkapitelbeitrag). In: Krause, Buck, Schwaiger (Hrsg.):

Nuklearmedizinische Onkologie, 1. Auflage (S.373 - S.383)

Verlag: ecomed Medizin, Landsberg, 2007

ISBN 978-3-609-76308-8

Dumarey N.

Imaging with FDG labeled leukocytes: is it clinically useful?

Q J Nucl Med Mol Imaging. 2009 Feb;53(1):89-94. Review.

Effert PJ, Bares R, Handt S, Wolff JM, Büll U, Jakse G.

Metabolic imaging of untreated prostate cancer by positron emission tomography with 18fluorine-labeled deoxyglucose.

J Urol. 1996 Mar;155(3):994-8.

English D, Andersen BR.

Single-step separation of red blood cells, Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque.

J Immunol Methods. 1974 Aug;5(3):249-52.

Eriksson O, Sadeghi A, Carlsson B, Eich T, Lundgren T, Nilsson B, Tötterman T, Korsgren O, Sundin A. Distribution of adoptively transferred porcine T-lymphoblasts tracked by (18)F-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose and position emission tomography.

Nucl Med Biol. 2011 Aug;38(6):827-33. Epub 2011 Apr 21.

Farsad M, Schiavina R, Castellucci P, Nanni C, Corti B, Martorana G, Canini R, Grigioni W, Boschi S, Marengo M, Pettinato C, Salizzoni E, Monetti N, Franchi R, Fanti S.

Detection and localization of prostate cancer: correlation of (11)C-choline PET/CT with histopathologic step-section analysis.

J Nucl Med. 2005 Oct;46(10):1642-9.

Fichtner J.

[PSA recurrence following radical prostatectomy and radiotherapy].

Urologe A. 2006 Oct;45(10):1255-6, 1258-9. Review. German.

Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB.

The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism.

Immunity. 2002 Jun;16(6):769-77.

Frauwirth KA, Thompson CB.

Regulation of T lymphocyte metabolism.

J Immunol. 2004 Apr 15;172(8):4661-5. Review.

Giovacchini G, Picchio M, Coradeschi E, Scattoni V, Bettinardi V, Cozzarini C, Freschi M, Fazio F, Messa C.

[(11)C]choline uptake with PET/CT for the initial diagnosis of prostate cancer: relation to PSA levels, tumour stage and anti-androgenic therapy.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008 Jun;35(6):1065-73. Epub 2008 Jan 16.

Graefen M, Ahyai S, Heuer R, Salomon G, Schlomm T, Isbarn H, Budäus L, Heinzer H, Huland H. [Active surveillance for prostate cancer].

Urologe A. 2008 Mar;47(3):261-9. Review. German.

Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G.

The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies.

Can J Urol. 2008 Feb;15(1):3866-71.

Hara T, Kosaka N, Kishi H.

PET imaging of prostate cancer using carbon-11-choline.

J Nucl Med. 1998 Jun;39(6):990-5.

Hara T, Bansal A, DeGrado TR.

Effect of hypoxia on the uptake of [methyl-3H]choline, [1-14C] acetate and [18F]FDG in cultured prostate cancer cells.

Nucl Med Biol. 2006 Nov;33(8):977-84. Epub 2006 Oct 4.

Heerschap A, Jager GJ, van der Graaf M, Barentsz JO, de la Rosette JJ, Oosterhof GO, Ruijter ET, Ruijs SH.

In vivo proton MR spectroscopy reveals altered metabolite content in malignant prostate tissue.

Anticancer Res. 1997 May-Jun;17(3A):1455-60.

Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F; European Association of Urology.

EAU guidelines on prostate cancer.

Eur Urol.2008 Jan;53(1):68-80. Epub 2007 Sep 19. Review.

.

Hiari N, Rudd JH.

FDG PET imaging and cardiovascular inflammation.

Curr Cardiol Rep. 2011 Feb;13(1):43-8. Review.

Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H.

Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium.

Circulation. 2005 May 3;111(17):2198-202.

Hoogendam A, Buntinx F, de Vet HC.

The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis.

Fam Pract. 1999 Dec;16(6):621-6.

Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA.

The LNCaP cell line-a new model for studies on human prostatic carcinoma.

Prog Clin Biol Res. 1980;37:115-32.

Huang SC, Carson RE, Hoffman EJ, Kuhl DE, Phelps ME.

An investigation of a double-tracer technique for positron computerized tomography.

J Nucl Med. 1982 Sep;23(9):816-22.

Ishimori T, Saga T, Mamede M, Kobayashi H, Higashi T, Nakamoto Y, Sato N, Konishi J.

Increased (18)F-FDG uptake in a model of inflammation: concanavalin A-mediated lymphocyte activation.

J Nucl Med. 2002 May;43(5):658-63.

Jadvar H, Xiankui L, Shahinian A, Park R, Tohme M, Pinski J, Conti PS.

Glucose metabolism of human prostate cancer mouse xenografts.

Mol Imaging. 2005 Apr-Jun;4(2):91-7.

Johns LE, Houlston RS.

A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk.

BJU Int. 2003 Jun;91(9):789-94. Review.

Jones HA, Cadwallader KA, White JF, Uddin M, Peters AM, Chilvers ER.

Dissociation between respiratory burst activity and deoxyglucose uptake in human neutrophil granulocytes: implications for interpretation of (18)F-FDG PET images.

J Nucl Med. 2002 May;43(5):652-7.

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW.

Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).

Invest Urol. 1979 Jul;17(1):16-23.

Kaim AH, Weber B, Kurrer MO, Westera G, Schweitzer A, Gottschalk J, von Schulthess GK, Buck A.

(18)F-FDG and (18)F-FET uptake in experimental soft tissue infection.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2002 May;29(5):648-54. Epub 2002 Mar 6.

Kato T, Tsukamoto E, Kuge Y, Takei T, Shiga T, Shinohara N, Katoh C, Nakada K, Tamaki N.
Accumulation of [11C]acetate in normal prostate and benign prostatic hyperplasia: comparison with prostate cancer.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2002 Nov;29(11):1492-5. Epub 2002 Aug 21.

Kato K, Schober O, Ikeda M, Schäfers M, Ishigaki T, Kies P, Naganawa S, Stegger L.
Evaluation and comparison of 11C-choline uptake and calcification in aortic and common carotid arterial walls with combined PET/CT.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009 Oct;36(10):1622-8.

Kilpatrick DC.

Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis.

Mol Biotechnol. 1999 Feb;11(1):55-65. Review.

Kohnen PW, Drach GW.

Patterns of inflammation in prostatic hyperplasia: a histologic and bacteriologic study.

J Urol. 1979 Jun;121(6):755-60.

Kotzerke J, Volkmer BG, Glatting G, van den Hoff J, Gschwend JE, Messer P,
Reske SN, Neumaier B.

Intraindividual comparison of [11C]acetate and [11C]choline PET for detection of metastases of prostate cancer.

Nuklearmedizin. 2003Feb;42(1):25-30.

Kotzerke J, Oehme L, Lindner O, Hellwig D; Arbeitsausschuss PET der DGN.

[Positron emission tomography 2008 in Germany - results of the query and current status].

Nuklearmedizin. 2010;49(2):58-64. Epub 2010 Mar 1. German.

Bernd J. Krause, Murat Tuncel, Michael Souvatzoglou, Andreas K. Buck, Uwe Treiber, Markus Schwaiger (2007): Prostatakarzinom (Buchkapitelbeitrag). In: Krause, Buck, Schwaiger (Hrsg.): Nuklearmedizinische Onkologie, 1. Auflage (S.189 - S.206)

Verlag: ecomed Medizin, Landsberg, 2007

ISBN 978-3-609-76308-8

Krause BJ, Souvatzoglou M, Tuncel M, Herrmann K, Buck AK, Praus C, Schuster T, Geinitz H, Treiber U, Schwaiger M.

The detection rate of [11C]choline-PET/CT depends on the serum PSA-value in patients with biochemical recurrence of prostate cancer.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008 Jan;35(1):18-23.

Krause BJ, Souvatzoglou M, Treiber U.

Imaging of prostate cancer with PET/CT and radioactively labeled choline derivatives.

Urol Oncol. 2011 Mar 7. [Epub ahead of print]

Kruisbeek AM, Shevach E, Thornton AM.

Proliferative assays for T cell function.

Curr Protoc Immunol. 2004 May;Chapter 3:Unit 3.12. Review.

Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T.

Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography.

J Nucl Med. 1992 Nov;33(11):1972-80.

Kubota K, Furumoto S, Iwata R, Fukuda H, Kawamura K, Ishiwata K.

Comparison of 18F-fluoromethylcholine and 2-deoxy-D-glucose in the distribution of tumor and inflammation.

Ann Nucl Med. 2006 Oct;20(8):527-33.

Kumar R, Basu S, Torigian D, Anand V, Zhuang H, Alavi A.

Role of modern imaging techniques for diagnosis of infection in the era of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography.

Clin Microbiol Rev. 2008 Jan;21(1):209-24. Review.

Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, Carlson TP, Klein EA.

Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004 Jan 1;58(1):25-33.

Laitinen IE, Luoto P, Någren K, Marjamäki PM, Silvola JM, Hellberg S, Laine VJ, Ylä-Herttuala S, Knuuti J, Roivainen A.

Uptake of ¹¹C-choline in mouse atherosclerotic plaques.

J Nucl Med. 2010 May;51(5):798-802.

Larson SM.

Cancer or inflammation? A Holy Grail for nuclear medicine.

J Nucl Med. 1994 Oct;35(10):1653-5.

Martorana G, Schiavina R, Corti B, Farsad M, Salizzoni E, Brunocilla E, Bertaccini A, Manferrari F, Castellucci P, Fanti S, Canini R, Grigioni WF, D'Errico Grigioni A.

¹¹C-choline positron emission tomography/computerized tomography for tumor localization of primary prostate cancer in comparison with 12-core biopsy.

J Urol. 2006 Sep;176(3):954-60; discussion 960.

Meier R, Piert M, Piontek G, Rudelius M, Oostendorp RA, Senekowitsch-Schmidtke R, Henning TD, Wels WS, Uherek C, Rummeny EJ, Daldrup-Link HE.

Tracking of [¹⁸F]FDG-labeled natural killer cells to HER2/neu-positive tumors.

Nucl Med Biol. 2008 Jul;35(5):579-88.

Mond JJ, Brunswick M.

Proliferative assays for B cell function.

Curr Protoc Immunol. 2003 Nov;Chapter 3:Unit 3.10. Review.

Mukherjee S, Ahmed A, Nandi D.

CTLA4-CD80/CD86 interactions on primary mouse CD4⁺ T cells integrate signal-strength information to modulate activation with Concanavalin A.

J Leukoc Biol. 2005 Jul;78(1):144-57.

Müller, Sebastian Andreas.

Charakterisierung des Cholintransports in humane Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu Kolonkarzinomzellen und der FDG-Aufnahme

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation, München 2007

Müller SA, Holzapfel K, Seidl C, Treiber U, Krause BJ, Senekowitsch-Schmidtke R.
Characterization of choline uptake in prostate cancer cells following bicalutamide and docetaxel treatment.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009 Sep;36(9):1434-42.

National Collaborating Centre for Cancer (UK).

Prostate Cancer: Diagnosis and Treatment. Cardiff (UK): National Collaborating Centre for Cancer (UK); 2008 Feb. PubMed PMID: 21542543.

Nickel JC, Downey J, Young I, Boag S.

Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia.

BJU Int. 1999 Dec;84(9):976-81.

Nilsson S, Norlén BJ, Widmark A.

A systematic overview of radiation therapy effects in prostate cancer.

Acta Oncol. 2004;43(4):316-81. Review.

Osman S, Danpure HJ.

The use of 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose as a potential in vitro agent for labelling human granulocytes for clinical studies by positron emission tomography.

Int J Rad Appl Instrum B. 1992 Feb;19(2):183-90.

Oyama N, Akino H, Suzuki Y, Kanamaru H, Sadato N, Yonekura Y, Okada K.

The increased accumulation of [18F]fluorodeoxyglucose in untreated prostate cancer.

Jpn J Clin Oncol. 1999 Dec;29(12):623-9.

Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD.

Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium.

Urology. 2001 Dec;58(6):843-8.

Price DT, Coleman RE, Liao RP, Robertson CN, Polascik TJ, DeGrado TR.

Comparison of [18 F]fluorocholine and [18 F]fluorodeoxyglucose for positron emission tomography of androgen dependent and androgen independent prostate cancer.

J Urol. 2002 Jul;168(1):273-80.

Ramírez de Molina A, Rodríguez-González A, Gutiérrez R, Martínez-Piñeiro L, Sánchez J, Bonilla F, Rosell R, Lacal J.

Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers.

Biochem Biophys Res Commun. 2002 Aug 23;296(3):580-3.

Rau FC, Weber WA, Wester HJ, Herz M, Becker I, Krüger A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R.

O-(2-[(18)F]Fluoroethyl)- L-tyrosine (FET): a tracer for differentiation of tumour from inflammation in murine lymph nodes.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2002 Aug;29(8):1039-46.

Reske SN, Kotzerke J.

FDG-PET for clinical use. Results of the 3rd German Interdisciplinary Consensus Conference, "Onko-PET III", 21 July and 19 September 2000.

Eur J Nucl Med. 2001 Nov;28(11):1707-23. Review.

Reske SN, Blumstein NM, Glatting G.

[Advancement of PET and PET/CT in prostate carcinoma].

Urologe A. 2006 Jun;45(6):707-10, 712-4. German.

Reske SN, Blumstein NM, Neumaier B, Gottfried HW, Finsterbusch F, Kocot D, Möller P, Glatting G, Perner S.

Imaging prostate cancer with 11C-choline PET/CT.

J Nucl Med. 2006 Aug;47(8):1249-54.

Reske SN, Blumstein NM, Glatting G.

[PET and PET/CT in relapsing prostate carcinoma].

Urologe A. 2006 Oct;45(10):1240, 1242-4, 1246-8, 1250. Review. German.

Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM Jr; Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators.

Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events.

N Engl J Med. 2001 Jun 28;344(26):1959-65.

Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends 7.
Ausgabe 2010

Roivainen A, Parkkola R, Yli-Kerttula T, Lehtikainen P, Viljanen T, Möttönen T, Nuutila P, Minn H.
Use of positron emission tomography with methyl-11C-choline and 2-18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose in
comparison with magnetic resonance imaging for the assessment of inflammatory proliferation of
synovium.
Arthritis Rheum. 2003 Nov;48(11):3077-84.

Ross R.
Atherosclerosis-an inflammatory disease.
N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26. Review.

Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, Johnström P, Davenport AP,
Kirkpatrick PJ, Arch BN, Pickard JD, Weissberg PL.
Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission
tomography.
Circulation. 2002 Jun 11;105(23):2708-11.

Rudd JH, Narula J, Strauss HW, Virmani R, Machac J, Klimas M, Tahara N, Fuster V, Warburton EA,
Fayad ZA, Tawakol AA.
Imaging atherosclerotic plaque inflammation by fluorodeoxyglucose with positron emission
tomography: ready for prime time?
J Am Coll Cardiol. 2010 Jun 8;55(23):2527-35. Review.

Even-Sapir E, Metser U, Mishani E, Lievshitz G, Lerman H, Leibovitch I.
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. 2006 Feb;47(2):287-97.

Sasaki M, Ichiya Y, Kuwabara Y, Otsuka M, Tahara T, Fukumura T, Gunasekera R, Masuda K.
Ringlike uptake of [18F]FDG in brain abscess: a PET study.
J Comput Assist Tomogr. 1990 May-Jun;14(3):486-7.

Scardino PT, Weaver R, Hudson MA.

Early detection of prostate cancer.

Hum Pathol. 1992 Mar;23(3):211-22.

Schenck M, Krause K, Schwandtner R, Haase I, Fluehs D, Friedrich J, Jaeger T, Boergermann C, Ruebben H, Stuschke M.

[High-dose rate brachytherapy for high-risk prostate cancer].

Urologe A. 2006 Jun;45(6):715-6, 718-22.

Scher B, Seitz M, Albinger W, Tiling R, Scherr M, Becker HC, Souvatzoglou M, Gildehaus FJ, Wester HJ, Dresel S.

Value of 11C-choline PET and PET/CT in patients with suspected prostate cancer.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007 Jan;34(1):45-53.

Schmid DT, John H, Zweifel R, Cservenyak T, Westera G, Goerres GW, von Schulthess GK, Hany TF.

Fluorocholine PET/CT in patients with prostate cancer: initial experience.

Radiology. 2005 May;235(2)

Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Määtänen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A;

ERSPC Investigators. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study.

N Engl J Med. 2009 Mar 26;360(13):1320-8.

Schuster DP, Brody SL, Zhou Z, Bernstein M, Arch R, Link D, Mueckler M.

Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Apr;292(4):L845-51.

Schwaiger M, Ziegler SI, Nekolla SG.

PET/CT challenge for the non-invasive diagnosis of coronary artery disease.

Eur J Radiol. 2010 Mar;73(3):494-503. Review.

Shozushima M, Tsutsumi R, Terasaki K, Sato S, Nakamura R, Sakamaki K.

Augmentation effects of lymphocyte activation by antigen-presenting macrophages on FDG uptake.

Ann Nucl Med. 2003 Oct;17(7):555-60.

Singh G, Lakkis CL, Laucirica R, Epner DE.

Regulation of prostate cancer cell division by glucose.

J Cell Physiol. 1999 Sep;180(3):431-8.

Sobel RE, Sadar MD.

Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1.

J Urol. 2005 Feb;173(2):342-59. Review.

Souvatzoglou M, Weirich G, Schwarzenboeck S, Maurer T, Schuster T, Bundschuh RA, Eiber M,

Herrmann K, Kuebler H, Wester HJ, Hoefler H, Gschwend J, Schwaiger M, Treiber U, Krause BJ.

The sensitivity of [11C]choline PET/CT to localize prostate cancer depends on the tumor configuration.

Clin Cancer Res. 2011 Jun 1;17(11):3751-9.

Stöber B, Tanase U, Herz M, Seidl C, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R.

Differentiation of tumour and inflammation: characterisation of [methyl-3H]methionine (MET) and O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET) uptake in human tumour and inflammatory cells.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006 Aug;33(8):932-9.

Sugawara Y, Gutowski TD, Fisher SJ, Brown RS, Wahl RL.

Uptake of positron emission tomography tracers in experimental bacterial infections: a comparative biodistribution study of radiolabeled FDG, thymidine, L-methionine, ⁶⁷Ga-citrate, and ¹²⁵I-HSA.

Eur J Nucl Med. 1999 Apr;26(4):333-41.

Sutinen E, Nurmi M, Roivainen A, Varpula M, Tolvanen T, Lehikoinen P, Minn H.

Kinetics of [(11)C]choline uptake in prostate cancer: a PET study.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 Mar;31(3):317-24.

Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F,

Van de Sande T, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G.

Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains.

Biochem Biophys Res Commun. 2003 Mar21;302(4):898-903.

Tahara T, Ichiya Y, Kuwabara Y, Otsuka M, Miyake Y, Gunasekera R, Masuda K

High [18F]-fluorodeoxyglucose uptake in abdominal abscesses: a PET study.

J Comput Assist Tomogr. 1989 Sep-Oct;13(5):829-31.

Tahara N, Kai H, Ishibashi M, Nakaura H, Kaida H, Baba K, Hayabuchi N, Imaizumi T.
Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography.

J Am Coll Cardiol. 2006 Nov 7;48(9):1825-31.

Theyer G, Kramer G, Assmann I, Sherwood E, Preinfalk W, Marberger M, Zechner O, Steiner GE.
Phenotypic characterization of infiltrating leukocytes in benign prostatic hyperplasia.

Lab Invest. 1992 Jan;66(1):96-107.

Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, D'Amico AV, Dmochowski RR, Eton DT, Forman JD, Goldenberg SL, Hernandez J, Higano CS, Kraus SR, Moul JW, Tangen CM; AUA Prostate Cancer Clinical Guideline Update Panel.

Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update.

J Urol. 2007 Jun;177(6):2106-31.

Tian M, Zhang H, Oriuchi N, Higuchi T, Endo K.

Comparison of ¹¹C-choline PET and FDG PET for the differential diagnosis of malignant tumors.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 Aug;31(8):1064-72.

Torizuka T, Kanno T, Futatsubashi M, Okada H, Yoshikawa E, Nakamura F, Takekuma M, Maeda M, Ouchi Y.

Imaging of gynecologic tumors: comparison of ¹¹C-choline PET with ¹⁸F-FDG PET.

J Nucl Med. 2003 Jul;44(7):1051-6.

Tumeh PC, Radu CG, Ribas A.

PET imaging of cancer immunotherapy.

J Nucl Med. 2008 Jun;49(6):865-8. Review.

Tyrrell CJ, Kaisary AV, Iversen P, Anderson JB, Baert L, Tammela T, Chamberlain M, Webster A, Blackledge G.

A randomised comparison of 'Casodex' (bicalutamide) 150 mg monotherapy versus castration in the treatment of metastatic and locally advanced prostate cancer.

Eur Urol. 1998;33(5):447-56.

van Waarde A, Jager PL, Ishiwata K, Dierckx RA, Elsinga PH.

Comparison of sigma-ligands and metabolic PET tracers for differentiating tumor from inflammation.

J Nucl Med. 2006 Jan;47(1):150-4.

Wyss MT, Weber B, Honer M, Späth N, Ametamey SM, Westera G, Bode B, Kaim AH, Buck A.
18F-choline in experimental soft tissue infection assessed with autoradiography and high-resolution PET.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 Mar;31(3):312-6.

Yamada S, Kubota K, Kubota R, Ido T, Tamahashi N.

High accumulation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in turpentine-induced inflammatory tissue.

J Nucl Med. 1995 Jul;36(7):1301-6.

Yamaguchi T, Lee J, Uemura H, Sasaki T, Takahashi N, Oka T, Shizukuishi K, Endou H, Kubota Y, Inoue T.

Prostate cancer: a comparative study of 11C-choline PET and MR imaging combined with proton MR spectroscopy.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005 Jul;32(7):742-8.

Yoshimoto M, Waki A, Yonekura Y, Sadato N, Murata T, Omata N, Takahashi N, Welch MJ, Fujibayashi Y.

Characterization of acetate metabolism in tumor cells in relation to cell proliferation: acetate metabolism in tumor cells.

Nucl Med Biol. 2001 Feb;28(2):117-22.

Ziegler, Sibylle I. (2007): Instrumentierung: SPECT, PET, PET/CT (Buchkapitelbeitrag). In: Krause, Buck, Schwaiger (Hrsg.): Nuklearmedizinische Onkologie, 1. Auflage (S.17 - S.24)

Verlag: ecomed Medizin, Landsberg, 2007

ISBN 978-3-609-76308-8

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
Bq	Becquerel
BSA	bovine serum albumin
CD	Cluster of Differentiation
Cholin-PET	Positronenemissionstomographie mit den ^{11}C - oder ^{18}F -markierten Cholinderivaten
Ci	Curie
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute
dpm	desintegrations per minute
CT	Computertomographie
eV	Elektronenvolt
ETI	Entzündungszell/Tumorzell Index
FACS	fluorescent activated cell sorting
FCH	[^{18}F]Fluormethylcholin
FCH-PET	Positronenemissionstomographie mit dem Tracer [^{18}F]Fluormethylcholin
FET	[^{18}F]Fluorethyltyrosine
FDG	[^{18}F]Fluordesoxyglukose
FDG-PET	Positronenemissionstomographie mit dem Tracer [^{18}F]Fluordesoxyglukose
FKS	fetales Kälberserum
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
KI	Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
NEAS	nicht-essentielle Aminosäuren
PET	Positronenemissionstomographie
PET/CT	Positronenemissionstomographie mit Computertomographie
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PSA	prostataspezifisches Antigen
SPECT	Single photon emission computed tomography
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TRUS	transrektaler Ultraschall

9 Danksagung

Aufgrund der hervorragenden Betreuung dieser Arbeit durch meine Doktormutter gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke. Der unmittelbare und fachkundige Rat, die Vermittlung zahlreicher wichtiger Kontakte sowie die Unterstützung eigene Ideen umzusetzen haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Matthias Schiemann danke ich für die Möglichkeit, meine Leukozytenisolation an den FACS Geräten des Institutes für Medizinische Mikrobiologie Immunologie und Hygiene vorzunehmen. Der Dank geht hierbei für die Unterstützung in Rat und Tat auch an Frau Götsch und Frau Henkel.

Herrn Dr. Schulz danke ich für die großen Blutbilder der Zellisolate, die mittels Durchflusszytometer im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie erstellt wurden.

Herrn Dr. Tibor Schuster aus dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie danke ich für die Hilfe, die gesammelten Daten statistisch korrekt auszuwerten.

Für zahlreiche Sachinformationen und die geduldige Einarbeitung an den Geräten des Forschungslabors der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar bedanke ich mich bei Herrn Dr. Christoph Seidl, Herrn Dr. Valon, Frau Frank und Frau Pirsig.

Auch will ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. Krause, Herrn Prof. Dr. Weihrich und Herrn Dr. Nawroth bekunden, da die sehr interessanten Fachgespräche in der Planungsphase dieser Arbeit maßgeblich den Versuchsaufbau beeinflusst haben.

Dank auch an alle weiteren Mitglieder des Laborteams für die stets freundliche und hilfsbereite Atmosphäre.

Insbesondere möchte ich auf diesem Weg meinen Eltern danken. Sie haben mir diese Universitätsausbildung ermöglicht und standen mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite.

ANHANG

A – Statistik

A-1 Zelllinienvergleich - [¹⁸F]FDG-Uptake

Multiple Comparisons

FDG Uptake in %/mg
Bonferroni

(I)Zelle	(J)Zelle	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
B-Lymphzyten	Granulozyten	-1,2580*	,75673	1,000	-3,6357	1,1197
	LNCaP	-6,9594*	,75673	<0,05	-9,3371	-4,5817
	Makrophagen	-2,9830*	,75673	<0,05	-5,3608	-,6053
	MNC	-,9480	,75673	1,000	-3,3257	1,4298
	PC-3	-26,7707*	,75673	<0,05	-29,1485	-24,3930
	T-Lymphzyten	-,4251	,75673	1,000	-2,8029	1,9526
Granulozyten	B-Lymphzyten	1,2580	,75673	1,000	-1,1197	3,6357
	LNCaP	-5,7014*	,75673	<0,05	-8,0791	-3,3237
	Makrophagen	-1,7250	,75673	,533	-4,1027	,6527
	MNC	,3101	,75673	1,000	-2,0677	2,6878
	PC-3	-25,5127*	,75673	<0,05	-27,8905	-23,1350
	T-Lymphzyten	,8329	,75673	1,000	-1,5449	3,2106
LNCaP	B-Lymphzyten	6,9594*	,75673	<0,05	4,5817	9,3371
	Granulozyten	5,7014*	,75673	<0,05	3,3237	8,0791
	Makrophagen	3,9764*	,75673	<0,05	1,5987	6,3541
	MNC	6,0115*	,75673	<0,05	3,6337	8,3892
	PC-3	-19,8113*	,75673	<0,05	-22,1891	-17,4336
	T-Lymphzyten	6,5343*	,75673	<0,05	4,1565	8,9120
Makrophagen	B-Lymphzyten	2,9830	,75673	<0,05	,6053	5,3608
	Granulozyten	1,7250	,75673	,533	-,6527	4,1027
	LNCaP	-3,9764*	,75673	<0,05	-6,3541	-1,5987
	MNC	2,0351	,75673	,184	-,3427	4,4128
	PC-3	-23,7877*	,75673	<0,05	-26,1655	-21,4100
	T-Lymphzyten	2,5579*	,75673	<0,05	,1801	4,9356
MNC	B-Lymphzyten	,9480	,75673	1,000	-1,4298	3,3257
	Granulozyten	-,3101	,75673	1,000	-2,6878	2,0677
	LNCaP	-6,0115*	,75673	<0,05	-8,3892	-3,6337
	Makrophagen	-2,0351	,75673	,184	-4,4128	,3427
	PC-3	-25,8228*	,75673	<0,05	-28,2005	-23,4451
	T-Lymphzyten	,5228	,75673	1,000	-1,8549	2,9005
PC-3	B-Lymphzyten	26,7707*	,75673	<0,05	24,3930	29,1485
	Granulozyten	25,5127*	,75673	<0,05	23,1350	27,8905
	LNCaP	19,8113*	,75673	<0,05	17,4336	22,1891
	Makrophagen	23,7877*	,75673	<0,05	21,4100	26,1655
	MNC	25,8228*	,75673	<0,05	23,4451	28,2005
	T-Lymphzyten	26,3456*	,75673	<0,05	23,9679	28,7233
T-Lymphzyten	B-Lymphzyten	,4251	,75673	1,000	-1,9526	2,8029
	Granulozyten	-,8329	,75673	1,000	-3,2106	1,5449
	LNCaP	-6,5343*	,75673	<0,05	-8,9120	-4,1565
	Makrophagen	-2,5579*	,75673	<0,05	-4,9356	-,1801
	MNC	-,5228	,75673	1,000	-2,9005	1,8549
	PC-3	-26,3456*	,75673	<0,05	-28,7233	-23,9679

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.
Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 3,436

*. Die mittlere Differenz ist auf dem 0,05-Niveau signifikant.

A-2 Zelllinienvergleich - [³H]Cholin-Uptake

Multiple Comparisons

H3Cholin Uptake in %/mg
Bonferroni

(I)Zelle	(J)Zelle	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler r	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
B-Lymphzyten	Granulozyten	-2,7980*	6,32211	1,000	-22,6629	17,0669
	LNCaP	-59,6726*	6,32211	<0,05	-79,5375	-39,8077
	Makrophagen	-49,9681*	6,32211	<0,05	-69,8330	-30,1032
	MNC	-2,9565	6,32211	1,000	-22,8214	16,9083
	PC-3	-95,1669*	6,32211	<0,05	-115,0318	-75,3020
	T-Lymphzyten	-,6341	6,32211	1,000	-20,4990	19,2308
Granulozyten	B-Lymphzyten	2,7980	6,32211	1,000	-17,0669	22,6629
	LNCaP	-56,8746*	6,32211	<0,05	-76,7395	-37,0098
	Makrophagen	-47,1701*	6,32211	<0,05	-67,0350	-27,3052
	MNC	-,1586	6,32211	1,000	-20,0235	19,7063
	PC-3	-92,3689*	6,32211	<0,05	-112,2338	-72,5040
	T-Lymphzyten	2,1639	6,32211	1,000	-17,7010	22,0287
LNCaP	B-Lymphzyten	59,6726*	6,32211	<0,05	39,8077	79,5375
	Granulozyten	56,8746*	6,32211	<0,05	37,0098	76,7395
	Makrophagen	9,7045	6,32211	1,000	-10,1604	29,5694
	MNC	56,7161*	6,32211	<0,05	36,8512	76,5810
	PC-3	-35,4943*	6,32211	<0,05	-55,3592	-15,6294
	T-Lymphzyten	59,0385*	6,32211	<0,05	39,1736	78,9034
Makrophagen	B-Lymphzyten	49,9681*	6,32211	<0,05	30,1032	69,8330
	Granulozyten	47,1701*	6,32211	<0,05	27,3052	67,0350
	LNCaP	-9,7045	6,32211	1,000	-29,5694	10,1604
	MNC	47,0116*	6,32211	<0,05	27,1467	66,8764
	PC-3	-45,1988*	6,32211	<0,05	-65,0637	-25,3339
	T-Lymphzyten	49,3340*	6,32211	<0,05	29,4691	69,1989
MNC	B-Lymphzyten	2,9565	6,32211	1,000	-16,9083	22,8214
	Granulozyten	-,1586	6,32211	1,000	-19,7063	20,0235
	LNCaP	-56,7161*	6,32211	<0,05	-76,5810	-36,8512
	Makrophagen	-47,0116*	6,32211	<0,05	-66,8764	-27,1467
	PC-3	-92,2104*	6,32211	<0,05	-112,0753	-72,3455
	T-Lymphzyten	2,3224	6,32211	1,000	-17,5425	22,1873
PC-3	B-Lymphzyten	95,1669*	6,32211	<0,05	75,3020	115,0318
	Granulozyten	92,3689*	6,32211	<0,05	72,5040	112,2338
	LNCaP	35,4943*	6,32211	<0,05	15,6294	55,3592
	Makrophagen	45,1988*	6,32211	<0,05	25,3339	65,0637
	MNC	92,2104*	6,32211	<0,05	72,3455	112,0753
	T-Lymphzyten	94,5328*	6,32211	<0,05	74,6679	114,3977
T-Lymphzyten	B-Lymphzyten	-,6341	6,32211	1,000	-19,2308	20,4990
	Granulozyten	-2,1639	6,32211	1,000	-22,0287	17,7010
	LNCaP	-59,0385*	6,32211	<0,05	-78,9034	-39,1736
	Makrophagen	-49,3340*	6,32211	<0,05	-69,1989	-29,4691
	MNC	-2,3224	6,32211	1,000	-22,1873	17,5425
	PC-3	-94,5328*	6,32211	<0,05	-114,3977	-74,6679

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.
Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 239,814

*. Die mittlere Differenz ist auf dem 0,05-Niveau signifikant.

A-3 Stimulation der Makrophagen - [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Multiple Comparisons

Abhängige Variable: zFDG

	(I)LPS Konzentration in µg/ml	(J)LPS Konzentration in µg/ml	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
LSD	,0	,1	-,488*	,2322	,041	-,956	-,020
		1,0	-,983*	,2322	,000	-1,451	-,515
		10,0	-2,156*	,2322	,000	-2,624	-1,688
	,1	,0	,488*	,2322	,041	,020	,956
		1,0	-,495*	,2322	,039	-,963	-,027
		10,0	-1,668*	,2322	,000	-2,136	-1,200
	1,0	,0	,983*	,2322	,000	,515	1,451
		,1	,495*	,2322	,039	,027	,963
		10,0	-1,173*	,2322	,000	-1,641	-,705
	10,0	,0	2,156*	,2322	,000	1,688	2,624
		,1	1,668*	,2322	,000	1,200	2,136
		1,0	1,173*	,2322	,000	,705	1,641
Bonferroni	,0	,1	-,488*	,2322	,248	-1,129	,154
		1,0	-,983*	,2322	,001	-1,625	-,342
		10,0	-2,156*	,2322	,000	-2,797	-1,514
	,1	,0	,488	,2322	,248	-,154	1,129
		1,0	-,495*	,2322	,231	-1,137	,146
		10,0	-1,668*	,2322	,000	-2,309	-1,026
	1,0	,0	,983*	,2322	,001	,342	1,625
		,1	,495*	,2322	,231	-,146	1,137
		10,0	-1,173*	,2322	,000	-1,814	-,531
	10,0	,0	2,156*	,2322	,000	1,514	2,797
		,1	1,668*	,2322	,000	1,026	2,309
		1,0	1,173*	,2322	,000	,531	1,814

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = ,324

*. Die mittlere Differenz ist auf dem 0,05-Niveau signifikant.

Korrelationen

			Stimulationsgrad	zFDG
Spearman-Rho	Stimulationsgrad	Korrelationskoeffizient	1,000	,841**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	48	48
zFDG	zFDG	Korrelationskoeffizient	,841**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	48	48

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

A-4 Stimulation der Makrophagen - [³H]Cholin-Aufnahme

Paarvergleich	P Wert	Signifikanzniveau (korrigiert nach Bonferroni)	
0,0 zu 0,1		0,1	0,008
0,0 zu 1,0	0,004*		0,008
0,0 zu 10,0		0,043	0,008
0,1 zu 1,0		0,043	0,008
0,1 zu 10,0		0,326	0,008
1,0 zu 10,0		0,773	0,008

* Die Mittlere Differenz ist auf einem 0,05-Niveau Signifikant

A-5 Stimulation der MNCs - [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Multiple Comparisons

zFDG
Bonferroni

(I)ConA Konzentration in µg/ml	(J)ConA Konzentration in µg/ml	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler r	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0	1	-1,2491*	,20758	,000	-1,8226	-,6756
	4	-2,3511*	,20758	,000	-2,9246	-1,7776
	50	-,9854*	,20758	,000	-1,5589	-,4119
1	0	1,2491*	,20758	,000	,6756	1,8226
	4	-1,1020*	,20758	,000	-1,6755	-,5285
	50	,2637	,20758	1,000	-,3098	,8372
4	0	2,3511*	,20758	,000	1,7776	2,9246
	1	1,1020*	,20758	,000	,5285	1,6755
	50	1,3657*	,20758	,000	,7922	1,9392
50	0	,9854	,20758	,000	,4119	1,5589
	1	-,2637	,20758	1,000	-,8372	,3098
	4	-1,3657*	,20758	,000	-1,9392	-,7922

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.
Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = ,259

*. Die mittlere Differenz ist auf dem 0,05-Niveau signifikant.

A-6 Stimulation der MNCs - [³H]Cholin-Aufnahme

Multiple Comparisons

zH3Cholin
Bonferroni

(I)ConA Konzentration in µg/ml	(J)ConA Konzentration in µg/ml	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler r	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0	1	-,8539	,22256	,002	-1,4688	-,2391
	4	-2,1059*	,22256	,000	-2,7208	-1,4910
	50	-1,7319*	,22256	,000	-2,3467	-1,1170
1	0	,8539	,22256	,002	,2391	1,4688
	4	-1,2519*	,22256	,000	-1,8668	-,6370
	50	-,8779*	,22256	,002	-1,4928	-,2630
4	0	2,1059*	,22256	,000	1,4910	2,7208
	1	1,2519*	,22256	,000	,6370	1,8668
	50	,3740	,22256	,600	-,2409	,9889
50	0	1,7319*	,22256	,000	1,1170	2,3467
	1	,8779*	,22256	,002	,2630	1,4928
	4	-,3740	,22256	,600	-,9889	,2409

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.
Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = ,297

*. Die mittlere Differenz ist auf dem 0,05-Niveau signifikant.

A-7 Stimulation der CD3+ T-Lymphozyten - [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit				
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz
zFDG	Varianzen sind gleich	3,551	,073	-1,585	22	,127	-,5988	,3779
	Varianzen sind nicht gleich			-1,585	17,822	,131	-,5988	,3779

Test bei unabhängigen Stichproben

		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Untere	Obere
zFDG	Varianzen sind gleich	-1,3824	,1849
	Varianzen sind nicht gleich	-1,3932	,1957

A-8 Stimulation der CD3+ T-Lymphozyten - [³H]Cholin-Aufnahme

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit				
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz
zH3Cholin	Varianzen sind gleich	,427	,520	1,144	22	,265	,4432	,3875
	Varianzen sind nicht gleich			1,144	21,862	,265	,4432	,3875

Test bei unabhängigen Stichproben

		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Untere	Obere
zH3Cholin	Varianzen sind gleich	-,3605	1,2468
	Varianzen sind nicht gleich	-,3608	1,2471

A-9 Stimulation der CD19+ B-Lymphozyten - [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Mann-Whitney-Test

Ränge

ConA Konzentration...	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
zFDG 0	12	7,67	92,00
1	12	17,33	208,00
Gesamt	24		

Statistik für Test^b

	zFDG
Mann-Whitney-U	14,000
Wilcoxon-W	92,000
Z	-3,349
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<0,05
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	<0,05 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: ConA Konzentration in µg/ml

A-10 Stimulation der CD19+ B-Lymphozyten - [³H]Cholin-Aufnahme

T-Test

Gruppenstatistiken

ConA Konzentration in µg/ml	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
zH3Cholin 0	12	-,490	,6521	,1883
1	12	,490	,9800	,2829

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit	T-Test für die Mittelwertgleichheit								
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
zH3Cholin	Varianzen sind gleich	2,142	,157	-2,883	22	<0,05	-,9796	,3398	-1,6843	-,2749
	Varianzen sind nicht gleich			-2,883	19,145	<0,05	-,9796	,3398	-1,6905	-,2687

A-11 Stimulation der CD15+ Granulozyten - [¹⁸F]FDG-Aufnahme

T-Test

Gruppenstatistiken

LPS Konzentration in µg/ml	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
zFDG 0	12	-,022	,9355	,2700
1	12	,022	1,0164	,2934

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit	T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz
zFDG	Varianzen sind gleich	,014	,907	-,108	22	,915	-,0431	,3988
	Varianzen sind nicht gleich			-,108	21,850	,915	-,0431	,3988

Test bei unabhängigen Stichproben

	T-Test für die Mittelwertgleichheit	
	95% Konfidenzintervall der Differenz	
	Untere	Obere
zFDG	Varianzen sind gleich	-,8701 ,7838
	Varianzen sind nicht gleich	-,8704 ,7842

A-12 Stimulation der CD15+ Granulozyten - [³H]Cholin-Aufnahme

T-Test

Gruppenstatistiken

LPS Konzentration in µg/ml	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
zH3Cholin 0	12	-,113	1,1420	,3297
1	12	,113	,7597	,2193

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit				
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz
zH3Cholin	Varianzen sind gleich	1,986	,173	-,570	22	,574	-,2258	,3959
	Varianzen sind nicht gleich			-,570	19,142	,575	-,2258	,3959

Test bei unabhängigen Stichproben

		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Untere	Obere
zH3Cholin	Varianzen sind gleich	-1,0470	,5953
	Varianzen sind nicht gleich	-1,0541	,6025

A-13 Tumorzellen Uptakevergleich - [¹⁸F]FDG-Aufnahme

Multiple Comparisons

FDG Uptake in %/mg
Bonferroni

(I)Zelle	(J)Zelle	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler t	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
LNCaP adh.	LNCaP susp.	,8448	1,34946	1,000	-2,8835	4,5731
	PC-3 adh.	-19,8113 *	1,34946	<0,05	-23,5396	-16,0830
	PC-3 susp.	-3,7120	1,34946	,052	-7,4403	,0163
LNCaP susp.	LNCaP adh.	-,8448	1,34946	1,000	-4,5731	2,8835
	PC-3 adh.	-20,6562 *	1,34946	<0,05	-24,3845	-16,9279
	PC-3 susp.	-4,5568 *	1,34946	<0,05	-8,2851	-,8285
PC-3 adh.	LNCaP adh.	19,8113 *	1,34946	<0,05	16,0830	23,5396
	LNCaP susp.	20,6562 *	1,34946	<0,05	16,9279	24,3845
	PC-3 susp.	16,0994 *	1,34946	<0,05	12,3711	19,8277
PC-3 susp.	LNCaP adh.	3,7120	1,34946	,052	-,0163	7,4403
	LNCaP susp.	4,5568 *	1,34946	<0,05	,8285	8,2851
	PC-3 adh.	-16,0994 *	1,34946	<0,05	-19,8277	-12,3711

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 10,926

*. Die mittlere Differenz ist auf dem 0,05-Niveau signifikant.

A-14 Tumorzellen Uptakevergleich - [³H]Cholin-Aufnahme

Multiple Comparisons

H3Cholin Uptake in %/mg
Bonferroni

(I)Zelle	(J)Zelle	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler r	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
LNCaP adh.	LNCaP susp.	-64,9683	12,39462	<0,05	-99,2124	-30,7243
	PC-3 adh.	-35,4943*	12,39462	<0,05	-69,7383	-1,2503
	PC-3 susp.	10,3457	12,39462	1,000	-23,8983	44,5898
LNCaP susp.	LNCaP adh.	64,9683	12,39462	<0,05	30,7243	99,2124
	PC-3 adh.	29,4740	12,39462	,131	-4,7700	63,7181
	PC-3 susp.	75,3141*	12,39462	<0,05	41,0701	109,5581
PC-3 adh.	LNCaP adh.	35,4943	12,39462	<0,05	1,2503	69,7383
	LNCaP susp.	-29,4740	12,39462	,131	-63,7181	4,7700
	PC-3 susp.	45,8400*	12,39462	<0,05	11,5960	80,0841
PC-3 susp.	LNCaP adh.	-10,3457	12,39462	1,000	-44,5898	23,8983
	LNCaP susp.	-75,3141*	12,39462	<0,05	-109,5581	-41,0701
	PC-3 adh.	-45,8400*	12,39462	<0,05	-80,0841	-11,5960

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 921,759

*. Die mittlere Differenz ist auf dem 0,05-Niveau signifikant.

B – Der kombinierte Uptakeversuch mit zwei Isotopen gleicher Strahlenqualität

Bisher wurden erfolgreich kombinierte Doubletracer-Uptakeversuche mit Tracern durchgeführt, die an Nuklide unterschiedlicher Strahlenqualität gekoppelt waren. Hierzu wurden [^3H]Cholin und [^{18}F]FDG verwendet. Durch die unterschiedliche Halbwertszeit und Strahlenqualität der Isotope konnte die Aktivitäten der zwei Tracer, die sich einer Probe befanden separat voneinander untersucht werden.

Im Folgenden wird beschrieben, wie man die Zerfallsrate von zwei Isotopen gleicher Strahlenart und Energie, die sich in einer Probe befinden, separat voneinander untersuchen kann. Beispielhaft soll das hier für die zwei β^+ -Strahler ^{11}C und ^{18}F erläutert werden, die, nach Abgabe der kinetischen Energie des Positrons, Gammaquanten mit der identischen Energie von 511 MeV emittieren. Liegen beide Isotope in einer am Gammacounter zu untersuchenden Probe vor, so kann man nicht unterscheiden, ob ein Zerfallsereignis von den Isotopen ^{11}C oder ^{18}F ausgeht. Die gemessenen Counts sind immer eine Summation aus der Aktivität beider Isotope (siehe Abb. 1).

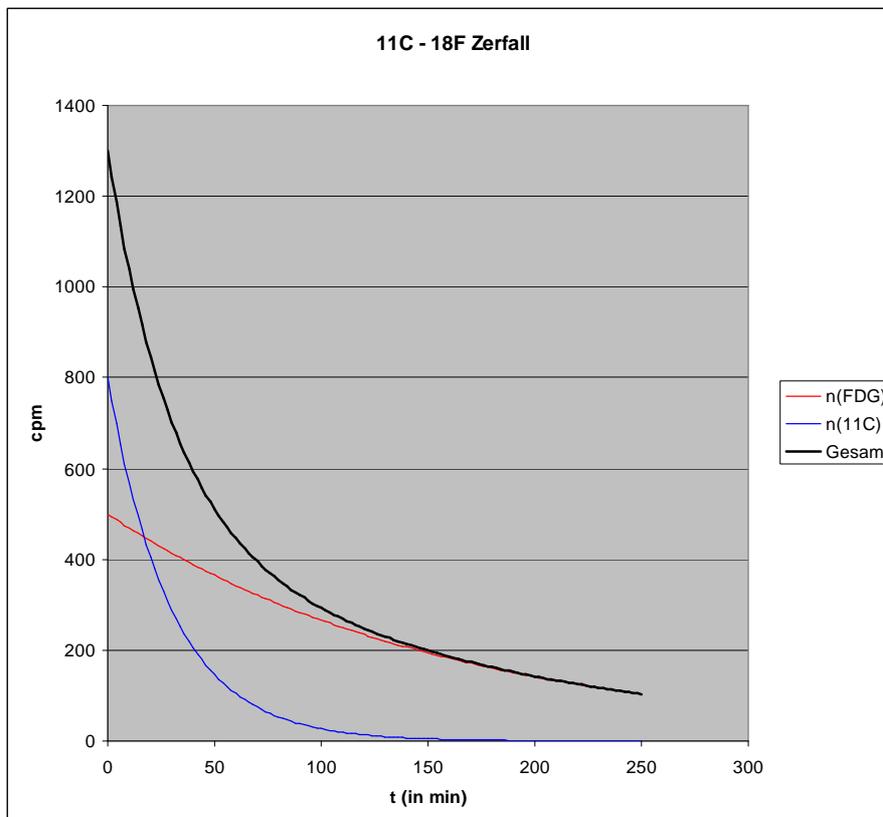


Abbildung 1) Zerfall von ^{18}F (rote Linie - 500 Cpm) und ^{11}C (blaue Linie - 800 Cpm). Die am Gammacounter messbare Aktivität in Cpm entspricht der schwarzen Linie, die sich aus der Summe den cpm von ^{18}F und ^{11}C ergibt.

Im Folgenden wird gezeigt, wie man unter Kenntnis der Halbwertszeiten (Zerfallskonstanten λ) von ^{11}C und ^{18}F , durch zwei Messungen am Gammacounter zu zwei verschiedenen Zeitpunkten t_1 und t_2 unter Angabe der Aktivität N_1 und N_2 in cpm die anfänglich eingesetzte Aktivität in cpm von ^{18}F und ^{11}C errechnen kann.

Gegeben:

N_1 cpm zum Zeitpunkt t_1

N_2 cpm zum Zeitpunkt t_2

$$\lambda_{18\text{F}} = \ln 2 / t_{1/2\ 18\text{F}}$$

$$\lambda_{11\text{C}} = \ln 2 / t_{1/2\ 11\text{C}}$$

Die am Gammacounter messbare Gesamtaktivität N setzt sich aus der Aktivität von ^{18}F $n_{(18\text{F})}$ und ^{11}C $n_{(11\text{C})}$ zusammen:

$$N = n_{(18\text{F})} + n_{(11\text{C})}$$

Die Zerfallsraten N_1 und N_2 lassen sich demnach in Abhängigkeit der Messzeitpunkte t_1 und t_2 sowie der Ausgangszerfallsraten zu Beginn der Messung $n_{0(18\text{F})}$ und $n_{0(11\text{C})}$ nach Gleichung I und II darstellen. Die Ausgangszerfallsraten $n_{0(18\text{F})}$ und $n_{0(11\text{C})}$ zu Beginn der Messung sind die Zerfallsraten, die wir durch dieses Rechenmodell bestimmen wollen.

$$\text{I} \quad N_1 = n_{0(18\text{F})} \cdot e^{-\lambda_{18\text{F}} \cdot t_1} + n_{0(11\text{C})} \cdot e^{-\lambda_{11\text{C}} \cdot t_1}$$

$$\text{II} \quad N_2 = n_{0(18\text{F})} \cdot e^{-\lambda_{18\text{F}} \cdot t_2} + n_{0(11\text{C})} \cdot e^{-\lambda_{11\text{C}} \cdot t_2}$$

$$\text{Aus II} \rightarrow n_{0(18\text{F})} = \frac{N_2 - n_{0(11\text{C})} \cdot e^{-\lambda_{11\text{C}} \cdot t_2}}{e^{-\lambda_{18\text{F}} \cdot t_2}}$$

II in I

$$N_1 = \frac{N_2 - n_{0(11C)} \cdot e^{-\lambda_{11C} \cdot t_2}}{e^{-\lambda_{18F} \cdot t_2}} \cdot e^{-\lambda_{18F} \cdot t_1} + n_{0(11C)} \cdot e^{-\lambda_{11C} \cdot t_1}$$

Die Gleichung wird nach $n_{0(11C)}$ aufgelöst. Um die weitere Rechnung überschaubar zu halten, werden nun folgende Terme durch Buchstaben ersetzt.

$$a = e^{-\lambda_{11C} \cdot t_2} \quad b = e^{-\lambda_{18F} \cdot t_2} \quad ; \quad c = e^{-\lambda_{18F} \cdot t_1} \quad ; \quad d = e^{-\lambda_{11C} \cdot t_1} \quad ; \quad x = n_{0(11C)}$$

Die Gleichung lässt sich demnach wie folgt darstellen:

$$N_1 = \frac{N_2 - x \cdot a}{b} \cdot c + x \cdot d$$

Nun wird nach x bzw. $n_{0(11C)}$ aufgelöst:

$$N_1 = \frac{N_2 \cdot c}{b} - \frac{x \cdot a \cdot c}{b} + x \cdot d$$

$$N_1 - \frac{N_2 \cdot c}{b} = -\frac{x \cdot a \cdot c}{b} + \frac{x \cdot d \cdot b}{b}$$

$$N_1 - \frac{N_2 \cdot c}{b} = x \frac{(d \cdot b - a \cdot c)}{b}$$

$$x = \frac{N_1 - \frac{N_2 \cdot c}{b}}{\frac{(d \cdot b - a \cdot c)}{b}} = \frac{N_1 \cdot b - N_2 \cdot c}{d \cdot b - a \cdot c} = n_{0(11C)}$$

Schreibt man nun statt den Buchstaben wieder die Terme in die Formel, ergibt sich für $n_{0(11C)}$ folgende Formel:

$$n_{0(11C)} = \frac{N_1 \cdot e^{-\lambda_{18F} \cdot t_2} - N_2 \cdot e^{-\lambda_{18F} \cdot t_1}}{e^{-\lambda_{11C} \cdot t_1} \cdot e^{-\lambda_{18F} \cdot t_2} - e^{-\lambda_{11C} \cdot t_2} \cdot e^{-\lambda_{18F} \cdot t_1}}$$

Die ^{11}C Ausgangszerfallsrate $n_{0(11C)}$ in Abhängigkeit von N_1 , N_2 , t_1 , t_2 , λ_{18F} und λ_{11C}

Bei bekannten $n_{0(11C)}$ kann durch Umformung von Gleichung I $n_{0(18F)}$ errechnet werden:

$$\text{I} \quad N_1 = n_{0(18F)} \cdot e^{-\lambda_{18F} \cdot t_1} + n_{0(11C)} \cdot e^{-\lambda_{11C} \cdot t_1}$$

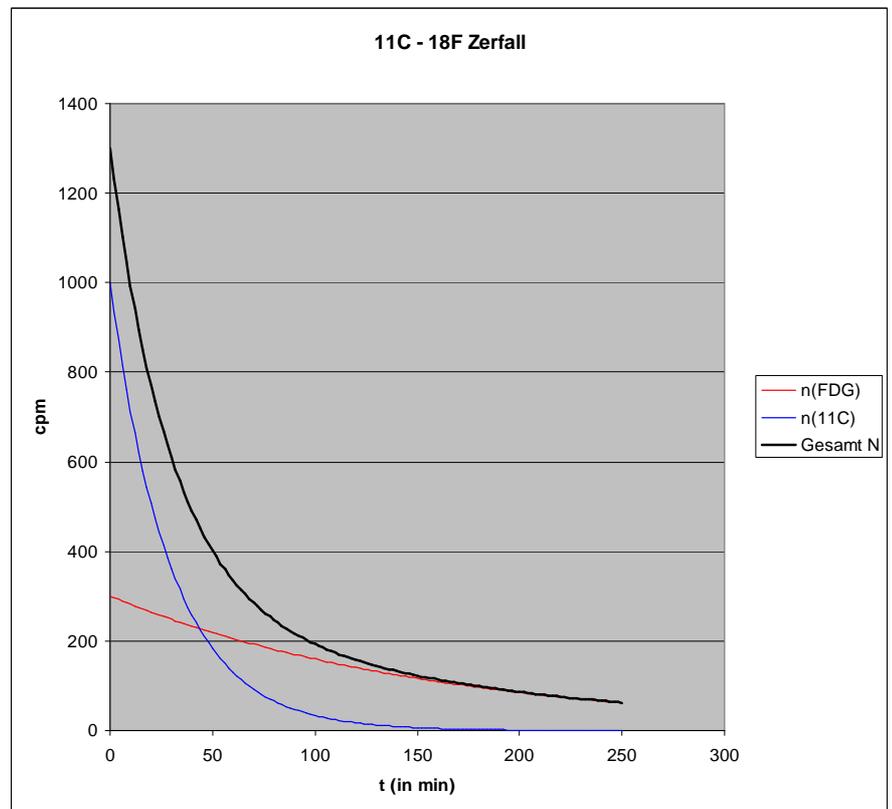
$$n_{0(18F)} = \frac{N_1 - n_{0(11C)} \cdot e^{-\lambda_{11C} \cdot t_1}}{e^{-\lambda_{18F} \cdot t_1}}$$

Die ^{18}F Ausgangszerfallsrate $n_{0(18F)}$ in Abhängigkeit von N_1 , t_1 , λ_{18F} , λ_{11C} und $n_{0(11C)}$

Ein simulierter Zerfall von ^{11}C (1000 cpm) und ^{18}F (300 cpm) ergibt die in Tab. 1 dargestellten Werte. Durch Messung am Gammacounter erfahren wir nur die schwarz unterlegten Werte.

t(min)	n(FDG)	n(^{11}C)	Gesamt N
0	300	1000	1300
2	296,235099	934,270812	1230,50591
4	292,5174462	872,861951	1165,3794
6	288,8464488	815,489444	1104,33589
8	285,2215212	761,887985	1047,10951
10	281,6420852	711,809707	993,451792
12	278,1075699	665,023033	943,130603
14	274,6174117	621,311609	895,929021
16	271,1710538	580,473302	851,644355
18	267,7679465	542,319263	810,08721
20	264,4075471	506,673058	771,080606
22	261,0893196	473,36985	734,45917
24	257,8127348	442,255634	700,068369
26	254,5772701	413,186531	667,763801
28	251,3824093	386,028116	637,410525
30	248,227643	360,654801	608,882444
32	245,112468	336,949254	582,061722
34	242,0363874	314,801853	556,838241
36	238,9989106	294,110183	533,109094
38	235,9995531	274,77856	510,778113
40	233,0378366	256,717588	489,755425
42	230,1132886	239,84375	469,957038
44	227,2254428	224,079015	451,304458
46	224,3738384	209,350483	433,724322
48	221,5580208	195,590046	417,148067
50	218,7775407	182,734071	401,511612
52	216,0319548	170,723109	386,755064
54	213,320825	159,501618	372,822443
56	210,6437191	149,017706	359,661425
58	208,0002099	139,222893	347,223103
60	205,3898759	130,071886	335,461761
62	202,8123007	121,522366	324,334667
64	200,2670732	113,5348	313,801873
66	197,7537875	106,07225	303,826037
68	195,2720428	99,1002068	294,37225
70	192,821443	92,5864307	285,407874
72	190,4015976	86,5007998	276,902397
74	188,0121203	80,8151725	268,827293

Tabelle 1) Simulierter Zerfall



Durch das Tabellenprogramm Microsoft Excel konnten wir eine Tabelle erstellen, die es ermöglicht, mit obigen Formeln durch die Eingabe der Halbwertszeiten der verwendeten Isotope, den gemessenen Counts N_1 und N_2 und der Zeiten t_1 und t_2 die Ausgangsaktivitäten für ^{11}C und ^{18}F zu berechnen (siehe Tab. 2).

Eine Proberechnung mit Werten aus dem simulierten Zerfall (siehe Tab. 1) für die Messzeiten t_1 bei 4min und t_2 bei 10min mit N_1 bei 1165 cpm und N_2 bei 993 cpm ergibt für die

Ausgangswerte $n_{0(11C)}$ und $n_{0(18F)}$ ziemlich genau die anfänglich eingesetzte Aktivitäten für ^{11}C 1000 cpm und ^{18}F 300 cpm (siehe Tab. 2).

t1/2 11C	20,39
t1/2 18F	109,77
Lambda C11=	0,03399447
Lambda F18=	0,00631454
t ₁	4
t ₂	10
N ₁	1165
N ₂	993
a	0,71180971
b	0,93880695
c	0,97505815
d	0,87286195
n0 11C	1000,67263
n0 18F	299,008769

Tabelle 2) In den grünen Feldern steht die Halbwertszeit, woraus sich der jeweilige Lambdawert der Isotope errechnet. In die gelb unterlegten Felder werden die am Gammacounter messbaren Werte eingetragen. Die Ausgangszerfallsraten $n_{0(18F)}$ und $n_{0(11C)}$ werden nun durch oben genannte Formeln automatisch berechnet.

Nachdem man durch diese Simulation sehr genaue Ausgangsaktivitäten errechnen konnte, stellte sich die Frage, ob das theoretische Modell auch für direkt am Gammacounter gemessene Werte anzuwenden ist. Dazu wurden 3 Proben untersucht. Die erste Probe enthält ^{18}F , die zweite enthält ^{11}C und die Dritte enthält ^{18}F und ^{11}C , entsprechend Probe 1 und 2. Durch Anwendung der Exceltabelle mit den errechneten Formeln sollte gezeigt werden, dass man aus Probe 3 die Aktivitäten errechnen kann, die sich in Probe 1 und 2 befinden.

Praktische Durchführung:

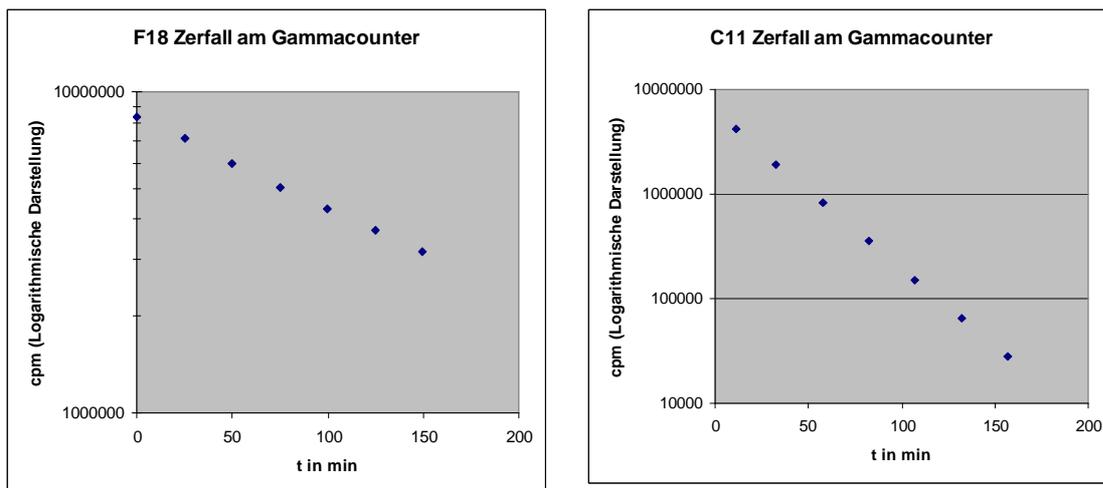
In einem ersten Ansatz wurden die ^{18}F -Probe, ^{11}C -Probe sowie die $^{18}F+^{11}C$ Doubletracer-Probe mit den Aktivitäten für ^{18}F und ^{11}C von jeweils 10 μ Ci (0,37 Mbq) angefertigt.

In einem zweiten Ansatz wurden die gleichen drei Proben mit einer Aktivität von 0,1 μ Ci (3,7 kBq) für jeweils ^{18}F und ^{11}C vorbereitet.

Jede Probe wurde als 3 Fachmessung bestimmt, um Pipettier-Ungenauigkeiten aufzudecken. Alle Proben liefen sieben mal durch den Gammacounter, so dass für jede einzelne Eppendorfcup-Probe 7 Werte mit ihren jeweiligen Zeitwerten existieren.

Ein technisches Problem war jedoch, dass am Gammacounter kein Messprogramm existiert, bei dem Nuklidzerfall-unkorrigierte Messwert in cpm ausgegeben werden. Deshalb wurde zur Aktivitätsbestimmung aller Proben das Programm für ^{18}F verwendet. Durch Anwenden des Zerfallsgesetzes für ^{18}F konnte die automatische ^{18}F -Zerfallskorrektur des Gammacounters rückgängig gemacht.

In Abbildung 2a) und 2b) sind die am Gammacounter gemessenen Werte der ^{11}C -Probe und der ^{18}F -Probe des ersten Ansatzes dargestellt.



a)

b)

Abbildung 2) Zerfallsraten in Counts per Minute (cpm) in Abhängigkeit der Zeit t der ^{18}F -Probe a) und der ^{11}C -Probe b). Es zeigt sich ein exponentielles Zerfallsmuster. Das ist eine wichtige Voraussetzung zur Anwendung der Aktivitätsrückrechnungsformel für zwei Tracer.

Zunächst wird auf die Werte $^{18}\text{F} + ^{11}\text{C}$ Doubletracer-Probe des zweiten Ansatzes eingegangen. Die am Gammacounter gemessenen Werte für die Doubletracer-Probe stehen in Tab. 3 und sind im Graph der Abb. 3 gegen die Zeit logarithmisch aufgetragen.

Messung	t in min	N cpm
1	15,95	118217
2	41,03	84149
3	66,07	64492
4	91,02	51709
5	115,93	42956
6	140,83	36104
7	165,75	30455

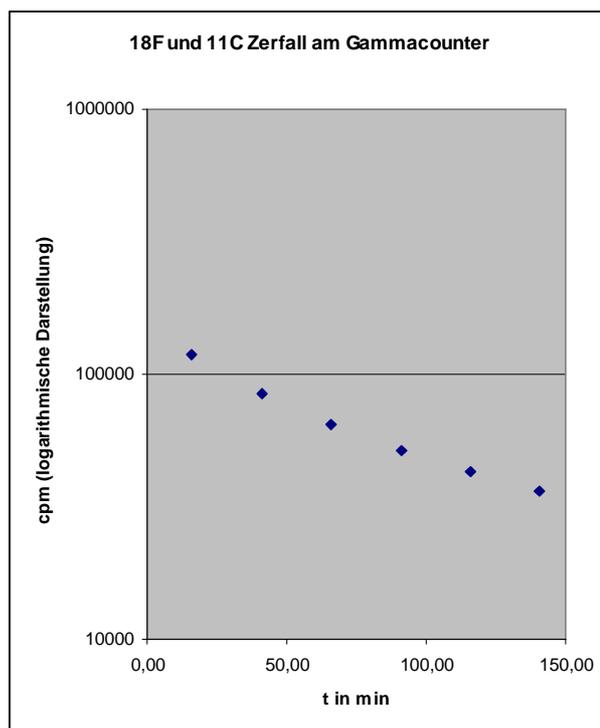


Tabelle 3) Messung der Zerfallsrate N in cpm der $^{18}\text{F}+^{11}\text{C}$ Doubletracer-Probe des zweiten Ansatzes zu den Verschiedenen Messzeitpunkten t.

Abbildung 3) Counts per Minute der Doubletracer-Probe in Abhängigkeit der Zeit t. Wie zu erwarten, beschreiben die Messwerte in der logarithmischen Darstellung keine Gerade.

Unter Anwendung der Exceltabelle mit den oben berechneten Formeln errechnen sich für die Messungspaarvergleiche die in Tab. 4) dargestellten ^{18}F - und ^{11}C -Ausgangsaktivitäten in cpm zum Zeitpunkt $t_0(0\text{min})$.

Messungspaarvergleich	$n_{0(11\text{C})}$ in cpm	$n_{0(18\text{F})}$ in cpm
1 zu 3	68122	86936
3 zu 6	71397	86410
2 zu 5	70221	86485
1 zu 2	68729	86545

Tabelle 4) Ausgangsaktivitäten von ^{11}C und ^{18}F in cpm in Abhängigkeit der Messpaarvergleiche. Die Messpaarvergleiche beschreiben, aus welchen Messungen von Tab3) die zur Errechnung der Ausgangsaktivitäten nötigen Zeiten t_1 und t_2 und Zerfallsraten N_1 und N_2 entnommen wurden. Die verschiedenen Messpaarvergleiche ergeben ähnliche Werte für die Ausgangsaktivitäten $n_{0(11\text{C})}$ und $n_{0(18\text{F})}$.

Um die errechneten Zerfallsraten $n_{0(11\text{C})}$ und $n_{0(18\text{F})}$ der Doubletracer-Proben mit den Zerfallsraten der ^{18}F und ^{11}C Singletracer-Proben zu vergleichen, wurde die gemessene

Zerfallsraten der Singletracer-Proben auf den Zeitpunkt t_0 (0 min) zurückgerechnet. In Tab. 5a) und b) sind die Zerfallsraten von jeweils drei ^{18}F -Proben und drei ^{11}C -Proben zum Zeitpunkt t_0 (0 min) dargestellt. Aufgrund von Pipettierungenauigkeiten variieren die Zerfallsraten der Singletracer-Proben. Vergleicht man nun die errechneten Werte der Doubletracer-Probe in Tab. 4) mit den Werten der Singletracer-Proben in Tab 5) wird ersichtlich, dass ähnliche Werte – im Rahmen der Pipettierungenauigkeit wie sie aus Tab 5 hervorgehen- für die Isotope ^{11}C und ^{18}F gemessen wurden.

^{18}F -Probennummer	Cpm zu t_0
1	90580
2	85830
3	105762

a) ^{18}F -Proben

^{11}C -Probennummer	Cpm zu t_0
1	58611
2	75541
3	56805

b) ^{11}C -Proben

Tabelle 5 a) Die drei Werte der 0,1 μCi (3,7 kBq) ^{18}F -Proben variieren ein wenig aufgrund von Pipettierungenauigkeiten b) Auch die ^{11}C -Proben zeigen leicht unterschiedliche Werte

Auch für die Doubletracer-Proben des ersten Ansatzes war es möglich, die Anfangsaktivität von ^{11}C und ^{18}F zu errechnen. Es war jedoch darauf zu achten, dass die erste Messung aufgrund der sehr hohen Probenaktivität nicht zu verwerten war. Die erste der sieben Messungen wurde vom Gammacounter mit der Warnung „First isotope peak shifted; normalization recommended“ ausgegeben. Alle weiteren Messungen zu späteren Zeitpunkten wurden vom Gammcounter ohne Warnhinweis ausgegeben. In Tab 6) stehen die am Gammcounter gemessenen Werte, aus denen sich durch Anwenden der Excelltabelle mit den Rückrechnungsformeln die in Tab. 7) ersichtliche Ausgangsaktivität für ^{11}C und ^{18}F errechnet.

Messung	t in min	cpm
1	3,5	8220057,68 First isotope peak shifted; normalization recommended
2	28,5	8554074,79
3	53,5	6837788,33
4	78,5	5393406,28
5	103,4	4404990,87
6	128,3	3727649,85
7	153,2	3169374,26

Tabelle 6) Messung der Zerfallsrate N in cpm der $^{18}\text{F}+^{11}\text{C}$ Doubletracer-Probe des ersten Ansatzes zu den verschiedenen Messzeitpunkten t.

Paarvergleich	$n_{0(11\text{C})}$	$n_{0(18\text{F})}$
1 zu 3	1736697	9980882
3 zu 4	6398764	8130565
3 zu 5	6571086	8091373
3 zu 6	6039496	8212277
6 zu 7	5832205	8259423

Tabelle 7) Ausgangsaktivitäten von ^{11}C und ^{18}F in cpm in Abhängigkeit der Messpaarvergleiche. Die Messpaarvergleiche, bei denen Messung 1 nicht enthalten ist ergeben ähnliche Werte für die jeweiligen Isotope.

Zusammenfassung der Experimente:

Die Aktivitätsrückrechnung mit oben hergeleiteten Formeln ist sehr gut möglich. Das sieht man insbesondere daran, dass die zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Paarvergleiche ziemlich ähnliche Ausgangsaktivitäten ergeben. Im Rahmen der Pipetiergenauigkeit wurden für die Doubletracer-Proben ähnliche Werte wie für die Singletracer-Proben errechnet. Zugleich konnte gezeigt werden, dass das Modell für hohe Aktivitäten 10 μCi (0,37 Mbq), sowie niedrigere Aktivitäten wie 0,1 μCi (3,7 kBq) erfolgreich angewendet werden kann. 10 μCi (0,37 Mbq) entsprechen bei Zellaufnahmeversuchen der Standardaktivität, während 0,1 μCi (3,7 kBq) ungefähr der Aktivität entsprechen, die von Zellen aufgenommen wird.

Das Doubletracermodell stellt somit für Zellaufnahmeversuche eine hervorragende Möglichkeit dar, zwei Tracer an denselben Zellen zu untersuchen.