

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung I

(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/ Onkologie)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Einfluss verschiedener Inhibitoren
auf die Aufnahme von Katecholaminen und mIBG
in neuronale und extraneuronale Monoamintransporter
exprimierende Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Melanie Simone Bayer

geboren am 21. Mai 1982

in Werneck

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Bares

In Dankbarkeit

meinen Eltern

Brigitte & Wolfgang

Bayer

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT

1 EINLEITUNG

	1
1.1 Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.2 Der Katecholaminstoffwechsel.....	3
1.2.1 Der Katecholaminstoffwechsel des gesunden sympathischen Nervensystems.....	3
1.2.1.1 Chemische Struktur und Vorkommen der Katecholamine.....	3
1.2.1.2 Synthese und Speicherung der Katecholamine.....	4
1.2.1.3 Abbau der Katecholamine.....	5
1.2.2 Der Katecholaminstoffwechsel der Paragangliome.....	6
1.2.3 Der Katecholaminstoffwechsel der Neuroblastome.....	7
1.3 Die Katecholamintransporter.....	8
1.3.1 Der Noradrenalintransporter.....	10
1.3.2 Der Dopamintransporter.....	10
1.3.3 Der Extraneuronale Monoamintransporter.....	11
1.3.4 Die Organischen Kationentransporter.....	12
1.3.5 Die Vesikulären Monoamintransporter.....	12
1.4 Das Phäochromozytom.....	13
1.4.1 Definition und Epidemiologie.....	13
1.4.2 Pathogenese, Ätiologie und Genetik.....	13
1.4.3 Pathologie, Klassifizierung und Stadieneinteilung.....	15
1.4.4 Lokalisation von Primärtumor und Metastasen und deren klinische Symptomatik.....	15
1.4.5 Diagnostik des Phäochromozytoms.....	16
1.4.6 Therapie des Phäochromozytoms.....	17
1.4.7 Prognosefaktoren und Prognosen.....	18
1.5 Das Neuroblastom.....	19
1.5.1 Definition und Epidemiologie.....	19
1.5.2 Pathogenese, Ätiologie und Genetik.....	19
1.5.3 Pathologie, Klassifizierung und Stadieneinteilung.....	21
1.5.4 Lokalisation von Primärtumor und Metastasen und deren klinische Symptomatik.....	23

1.5.5	Diagnostik des Neuroblastoms.....	24
1.5.6	Therapie des Neuroblastoms.....	25
1.5.7	Prognosefaktoren und Prognosen.....	27
1.6	MIBG-Szintigraphie.....	29
1.6.1	Grundlagen der Szintigraphie.....	29
1.6.2	Entwicklungsgeschichte der mIBG-Szintigraphie.....	30
1.6.3	Pharmakologie von mIBG.....	30
1.6.4	Klinische Anwendung von mIBG in Diagnostik und Therapie..	32
2	MATERIALIEN	34
2.1	Verbrauchsmaterialien.....	34
2.2	Geräte und Messapparaturen.....	34
2.3	Reagenzien.....	35
2.3.1	Zellkulturmedien.....	35
2.3.2	Radioaktive Chemikalien.....	35
2.3.3	Chemikalien.....	36
2.3.4	Chemische Struktur der wichtigsten Chemikalien.....	37
2.4	Herstellung gebrauchsfertiger Lösungen.....	38
2.4.1	Zellkulturmedien.....	38
2.4.2	Inkubationspuffer.....	38
2.4.3	Verdünnungsreihe der Inhibitoren.....	39
2.5	Zelllinien.....	41
3	METHODEN	43
3.1	Übersicht über die Versuche.....	43
3.2	Bestimmung des pH-Wertes mit dem pH-Meter.....	43
3.3	Arbeiten mit Zellkulturen.....	44
3.3.1	Einfrieren von Zellen.....	44
3.3.2	Auftauen von Zellen.....	45
3.3.3	Kultivierung von Zellen.....	45
3.3.4	Passagieren von Zellen.....	46
3.4	Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer.....	47

3.5	Untersuchungen von Zellsuspensionen im Zentrifugenröhrchen.....	48
3.5.1	Vorbereitung von Zellen für die radioaktiven Aufnahmeversuche.....	48
3.5.2	Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen in SK-N-SH-, PC 12- und CAKI-Zellen sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Parameter.....	49
3.5.2.1	Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in Abhängigkeit verschiedener Inkubationszeiten in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁵ M mIBG.....	50
3.5.2.2	Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren.....	51
3.5.2.3	Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG.....	52
3.5.2.4	Aufnahme von [¹³¹ I] mIBG in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron.....	53
3.5.2.5	Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von gelöstem Corticosteron.....	53
3.5.3	Abgabe von radioaktiv markierten Substanzen aus SK-N-SH-, PC 12- und CAKI-Zellen sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierenden HEK 293-Zellen in Zeitabhängigkeit in Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener Inhibitoren.....	54
3.5.4	Quantifizierung der in den Zellen enthaltenen Radioaktivität...	55
3.5.4.1	Quantifizierung von [³ H]-markierten Substanzen.....	56
3.5.4.2	Quantifizierung von [¹³¹ I] mIBG.....	57
3.6	Untersuchungen im Transwellsystem.....	57
3.6.1	Idee zur Verwendung des Transwellsystems.....	57
3.6.2	Kultivierung von Zellen im Transwellsystem – Vorbereitung für die radioaktiven Aufnahmeversuche.....	58
3.6.3	Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in SK-N-SH- und PC 12-Zellen sowie EMT-exprimierende CAKI- und HEK 293-Zellen..	59
3.6.3.1	Aufnahme von [³ H] DA in Abhängigkeit vom Ort der Zellaussaat.....	61
3.6.3.2	Aufnahme von [³ H] DA in Abhängigkeit vom Ort des Radioaktivitätsangebotes.....	61
3.6.3.3	Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG.....	62

3.6.3.4	Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in Abhängigkeit von der Präsenz konkurrierender Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG.....	64
3.6.4	Quantifizierung der in den Zellen enthaltenen Radioaktivität..	65
3.7	Statistische Methoden.....	65
4	ERGEBNISSE	67
4.1	Allgemeine Erläuterungen.....	67
4.1.1	Darstellung der Ergebnisse.....	67
4.1.2	Strukturierung des Ergebnisteiles.....	69
4.2	Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA.....	71
4.2.1	Zeitabhängigkeit der Aufnahme von [³ H] DA.....	72
4.2.2	Zeitabhängigkeit der Aufnahme von [³ H] NA.....	73
4.2.3	Vergleich der zeitabhängigen Aufnahme von [³ H] DA mit der von [³ H] NA.....	75
4.3	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA.....	76
4.3.1	Einfluss von mIBG.....	77
4.3.1.1	Einfluss von mIBG auf die Aufnahme von [³ H] DA....	78
4.3.1.2	Vergleich des Einflusses von 10 ⁻⁵ M mIBG auf die Aufnahme von [³ H] DA mit dem auf die Aufnahme von [³ H] NA in Zeitabhängigkeit.....	81
4.3.2	Einfluss von 6-Fluordopamin auf die Aufnahme von [³ H] DA..	84
4.3.3	Einfluss von Desipramin auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	87
4.3.4	Einfluss von Corticosteron.....	89
4.3.4.1	Einfluss des Corticosteronlösungsmittels Dimethylsulfoxid.....	91
4.3.4.2	Einfluss der Lagerung bei 4°C auf die biologische Wirksamkeit von gelöstem Corticosteron.....	93
4.3.4.3	Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	94
4.3.4.4	Vergleich des Einflusses von Corticosteron auf die Aufnahme von [³ H] DA mit dem auf die Aufnahme von [³ H] NA.....	96
4.3.5	Einfluss von GBR-12909 auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	98

4.3.6	Vergleich der Hemmeffekte von GBR-12909 und Corticosteron als Einzelinhibitoren mit denen als Kombinationsinhibitoren auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	101
4.3.7	Zusammenfassender Vergleich der Hemmeffekte unterschiedlicher Konzentrationen von verschiedenen Inhibitoren auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	102
4.4	Zeitabhängige Abgabe von Radioaktivität in Abwesenheit oder Anwesenheit von Inhibitoren.....	106
4.4.1	Zeitabhängige Abgabe von Radioaktivität in Abwesenheit von Inhibitoren.....	107
4.4.2	Abgabe von Radioaktivität in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren.....	109
4.5	Einfluss von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG auf die Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in SK-N-SH-Zellen sowie EMT-exprimierende CAKI- und HEK 293-Zellen (<i>Untersuchungen in Zellsuspensionen</i>).....	111
4.5.1	Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	112
4.5.1.1	Aufnahme von [³ H] DA in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron.....	112
4.5.1.2	Hemmeffekt von 10 ⁻⁴ M Corticosteron auf die [³ H] DA Aufnahme.....	114
4.5.2	Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme von [³ H] NA.....	115
4.5.2.1	Aufnahme von [³ H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron.....	115
4.5.2.2	Hemmeffekt von 10 ⁻⁴ M Corticosteron auf die [³ H] NA Aufnahme.....	117
4.5.3	Vergleich der Aufnahme von [³ H] DA mit der von [³ H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron.....	118
4.5.4	Einfluss von mIBG auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	118
4.5.4.1	Aufnahme von [³ H] DA in Abwesenheit oder Anwesenheit von mIBG.....	118
4.5.4.2	Hemmeffekt von 10 ⁻⁵ M mIBG auf die [³ H] DA Aufnahme.....	119
4.5.5	Einfluss von mIBG auf die Aufnahme von [³ H] NA.....	120
4.5.5.1	Aufnahme von [³ H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von mIBG.....	120
4.5.5.2	Hemmeffekt von 10 ⁻⁵ M mIBG auf die [³ H] NA Aufnahme.....	121

4.5.6	Vergleich der Aufnahme von [³ H] DA mit der von [³ H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁵ M mIBG.....	121
4.6	Aufnahme von [¹³¹ I] mIBG in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron (<i>Untersuchungen in Zellsuspensionen</i>).....	122
4.6.1	Aufnahme von [¹³¹ I] mIBG in Abwesenheit von Corticosteron.....	123
4.6.2	Einfluss von 10 ⁻⁴ M Corticosteron auf die [¹³¹ I] mIBG Aufnahme.....	125
4.7	Vergleich der radioaktiven Aufnahme in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron in Abhängigkeit vom Substrat...	126
4.7.1	Vergleich der radioaktiven Aufnahme in Abwesenheit von Corticosteron.....	126
4.7.2	Vergleich der Hemmeffekte von 10 ⁻⁴ M Corticosteron.....	128
4.8	Optimierung der Kurzzeitinkubation im Transwellsystem.....	129
4.8.1	Einfluss des Ortes der Zellaussaat auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	131
4.8.2	Einfluss des Ortes des Radioaktivitätsangebotes auf die Aufnahme von [³ H] DA.....	132
4.9	Einfluss der Präsenz konkurrierender Zellen auf die Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in Zellen des Transwellsystems in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG..	136
4.10	Einfluss von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG auf die Aufnahme von [³ H] DA oder [³ H] NA in Abhängigkeit vom Ort der Zellaussaat (<i>Untersuchungen im Transwellsystem</i>).....	139
4.10.1	Aufnahme von [³ H] DA in SK-N-SH- und EMT-Zellen.....	140
4.10.1.1	Aufnahme von [³ H] DA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG.....	140
4.10.1.2	Vergleich der Hemmeffekte von 10 ⁻⁴ M Corticosteron auf die Aufnahme von [³ H] DA in SK-N-SH- und EMT-Zellen.....	143
4.10.1.3	Vergleich der Hemmeffekte von 10 ⁻⁵ M mIBG auf die Aufnahme von [³ H] DA in SK-N-SH- und EMT-Zellen.....	144
4.10.2	Aufnahme von [³ H] NA in SK-N-SH- und CAKI-Zellen.....	145
4.10.2.1	Aufnahme von [³ H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10 ⁻⁵ M mIBG.....	145
4.10.2.2	Vergleich der Hemmeffekte von 10 ⁻⁴ M Corticosteron auf die Aufnahme von [³ H] NA in SK-N-SH- und CAKI-Zellen.....	148

4.10.2.3	Vergleich der Hemmeffekte von 10^{-5} M mIBG auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ NA in SK-N-SH- und CAKI-Zellen	149
4.11	Vergleich der Untersuchungssysteme – Zentrifugenröhrchen versus Kompartimente des Transwellsystems.....	150
5	DISKUSSION	156
5.1	Auswahl geeigneter Parameter für die Aufnahmeversuche.....	157
5.1.1	Zusammensetzung des Inkubationspuffers.....	157
5.1.2	Inkubationszeit.....	159
5.1.3	$[^3\text{H}]$ DA und $[^3\text{H}]$ NA als „Ersatz“substrate für $[^{131}\text{I}]$ mIBG.....	160
5.2	Aufnahmeversuche im Transwellsystem.....	163
5.2.1	Problematik der Methode.....	163
5.2.2	Aussagekraft der Untersuchungen im Transwellsystem.....	166
5.3	Interpretation der Abgabe von Radioaktivität nach $[^3\text{H}]$ DA Inkorporation.....	169
5.4	Effekte der getesteten Inhibitoren auf die verschiedenen Zelllinien...	173
5.4.1	Desipramin.....	173
5.4.2	6-FDA.....	174
5.4.3	mIBG.....	178
5.4.4	GBR-12909.....	181
5.4.5	Corticosteron.....	183
5.5	Vergleich der Aufnahme von $[^{131}\text{I}]$ mIBG, $[^3\text{H}]$ DA und $[^3\text{H}]$ NA in verschiedene Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron.....	186
5.5.1	Vergleich der Aufnahme verschiedener Substrate.....	186
5.5.2	Vergleich der unterschiedlichen Hemmwirkung von 10^{-4} M Corticosteron in Abhängigkeit vom Substrat.....	188
5.6	Expression eines weiteren Katecholamintransporters in der CAKI-Zellmembran?.....	189
5.7	Klinischer Nutzen von Corticosteron beim Neuroblastom bzw. Phäochromozytom?.....	190
5.7.1	Verbesserung der Spezifität und Sensitivität der diagnostischen $[^{123}\text{I}]$ mIBG-Szintigraphie?.....	190
5.7.2	Reduzierung der Nebenwirkungen der $[^{131}\text{I}]$ mIBG-Therapie?.	191
5.8	Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	194

6 LITERATURVERZEICHNIS	203
7 ZUSAMMENFASSUNG	226
8 ANHANG	228
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	228
8.2 Verzeichnis aufgeführter Firmen.....	231
8.3 Danksagung.....	232
8.4 Curriculum Vitae.....	234
8.5 Publikation.....	236

*„Nach langem Hin und Her und aller Kunst der Überredung bekam ich die kooperative multizentrische Therapie-Optimierungsstudie aus Köln zugeschickt. Ich verschlang sie regelrecht, las ganze Nächte durch, aber was sollte ich schon verstehen von Katecholaminrezeptoren oder von molekulargenetischer Risikoeinschätzung? Trotzdem hütete ich sie wie einen Schatz und lief stolz mit hundertdreißig Seiten **Optimismus** über die Flure.“*

(Aus: Schophaus, Michael; Im Himmel warten Bäume auf dich; Goldmann Verlag, 2000; S.42.)

Anhand der Aussage dieses Vaters, dessen dreijähriger Sohn an einem Neuroblastom im Stadium IV erkrankt ist, kann man erkennen, wie wichtig und wertvoll die Forschung im hämato-onkologischen Bereich ist.

Dabei sind nicht nur die klinischen Forschungen von besonderer Bedeutung, sondern auch die Grundlagenforschung, da diese den Ausgangspunkt für eine gute und sinnvolle klinische Studie darstellen.

In der Hoffnung, mit dieser Arbeit - ein kleines Stück in einem großen Ganzen - an der Optimierung der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms und Phäochromozytoms mitzuwirken, habe ich mit Begeisterung und großem Interesse dieses Thema für meine Dissertation gewählt.

1 EINLEITUNG

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Phäochromozytome und Neuroblastome können schon seit 1981 [249] bzw. 1984 [145,266] szintigraphisch mit radioaktiv markiertem meta-Iodobenzylguanidin (mIBG) dargestellt werden. Seit dieser Zeit wurde die nuklearmedizinische Diagnostik immer weiter vorangetrieben. Zu den neueren Methoden zählt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit 2-[¹⁸F] Fluordesoxyglukose (2-[¹⁸F] FDG) oder 6-[¹⁸F] Fluordopamin (6-[¹⁸F] FDA), die in Zukunft routinemäßig in der Diagnostik des Neuroblastoms und des Phäochromozytoms eingesetzt werden könnte [47,126,172,198,200,205].

Die Voraussetzung dafür, dass mIBG und Fluordopamin (FDA) in den zu detektierenden Zellen angereichert werden, ist eine spezifische Aufnahme in diese Zellen über Transportsysteme. Da mIBG und FDA katecholaminähnliche Substanzen sind, können sie über Katecholamintransporter inkorporiert werden. Dabei kann mIBG, ähnlich wie Noradrenalin (NA), hauptsächlich über Noradrenalintransporter (NAT) transportiert werden [86]. Ein Transport über Dopamintransporter (DAT) ist eher unwahrscheinlich [86], während in der Literatur unterschiedliche Meinungen bezüglich des mIBG-Transportes über Serotonintransporter (SERT) beschrieben sind [86,276]. FDA hingegen wird, ähnlich wie Dopamin (DA), sowohl über NAT als auch über DAT aufgenommen [62,216,237]. Die Affinität des NAT ist für DA höher als für NA [90,216]. Daher besteht die Möglichkeit, dass mehr FDA als mIBG in den Zellen angereichert wird. Durch radioaktive Aufnahmestudien an Zellkulturen sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Diagnostik des Neuroblastoms bzw. des Phäochromozytoms mittels 6-[¹⁸F] FDA eventuell auf Grund einer stärkeren Aufnahme einen Vorteil gegenüber [¹²³I] mIBG bringen könnte.

Unklar ist jedoch, ob eine Aufnahme von mIBG bzw. 6-FDA auch über Extraneuronale Monoamintransporter (EMT) und Organische Kationentransporter (OCT) möglich ist. Die Vermutung liegt zwar nahe, da bei der mIBG-Szintigraphie, außer in NAT- bzw. DAT-exprimierende Tumorzellen,

radioaktiv markiertes mIBG auch in anderen Zellen angereichert wird [26,79,207,267,268]. Allerdings wurde das bislang noch nicht durch Zellkulturversuche bestätigt. Diese Vermutung zu belegen ist ein Ziel dieser Arbeit.

In früheren Untersuchungen [106] konnte gezeigt werden, dass bei vermehrter Aufnahme von mIBG in Neuroblastomzellen im Verhältnis weniger mIBG in gesundes Gewebe aufgenommen wurde. Das könnte bedeuten, dass die selektive Aufnahme von mIBG in Tumorzellen im Organismus in Konkurrenz zu anderen mIBG-aufnehmenden Zellen steht. Wenn das mIBG über EMT bzw. OCT in gesunde Zellen transportiert wird, wäre eine logische Schlussfolgerung, dass eine spezifische Hemmung des EMTs bzw. der OCT eine vermehrte Aufnahme in Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomzellen zur Folge hat. Diese Annahme sollte in vorliegender Arbeit ebenfalls untersucht werden.

Um einen möglichst langen Effekt der Radioaktivität auf die Tumorzellen zu erhalten, wird in der Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomtherapie das radioaktive [¹³¹I]-Isotop zur Markierung von mIBG benutzt, da es eine relativ lange Halbwertszeit (HWZ) von 8,5 Tagen hat. Nach 4 Tagen werden 70-90% des verabreichten [¹³¹I] mIBGs unverändert wieder ausgeschieden [175]. Man kann vermuten, dass unverstoffwechseltes mIBG hauptsächlich über die Transporter aus den Zellen ausgeschieden wird, über die es aufgenommen wurde, da dies für andere Substrate bereits nachgewiesen werden konnte [37,72,130,222]. Durch radioaktive Abgabeversuche sollte im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht werden, welchen Einfluss spezifische Inhibitoren auf die Speicherung von Radioaktivität in Tumorzellen haben, wenn sie nach der radioaktiven Inkorporation angeboten werden.

In dieser Dissertation wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Wird die spezifische Hemmung des NATs durch Desipramin bestätigt?
- 2) Stärke der NAT-Expression in den verschiedenen Zelllinien?
- 3) Wird die spezifische Hemmung des DATs durch GBR-12909 bestätigt?
- 4) Stärke der DAT-Expression in den verschiedenen Zelllinien?
- 5) Wird die spezifische Hemmung des EMTs durch Corticosteron bestätigt?
- 6) Wird mIBG über EMT und OCT aufgenommen?

- 7) Wird 6-FDA über EMT und OCT aufgenommen?
- 8) Wird 6-FDA besser in Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomzellen aufgenommen als mIBG?
- 9) Findet durch eine spezifische Hemmung der EMT eine vermehrte Aufnahme von radioaktiven Substanzen über den NAT statt?
- 10) Wird durch Anwesenheit spezifischer Inhibitoren nach der radioaktiven Inkorporation die Speicherung der Radioaktivität in Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomzellen beeinflusst?

Um die bei diesen Untersuchungen gefundenen Ergebnisse verstehen und interpretieren zu können, sind theoretische Kenntnisse über den Katecholaminstoffwechsel, die Katecholamintransporter, das Phäochromozytom, das Neuroblastom und die Anwendung von mIBG notwendig. Deshalb sollen die Grundlagen im Folgenden (1.2 - 1.6) beschrieben werden.

1.2 Der Katecholaminstoffwechsel

1.2.1 Der Katecholaminstoffwechsel des gesunden sympathischen Nervensystems

1.2.1.1 Chemische Struktur und Vorkommen der Katecholamine

Unter der Bezeichnung Katecholamine werden die Substanzen Dopamin (DA), Noradrenalin (NA) und Adrenalin (A) zusammengefasst. Chemisch sind die Katecholamine durch eine ortho-Hydrochinon-Struktur mit einer Aminogruppe in der Seitenkette charakterisiert.

Der Nachweis dopaminerger Neurone gelang bisher ausschließlich im Zentralen Nervensystem (ZNS), die Dopaminsynthese findet allerdings auch in chromaffinen Zellen der Lunge, der Leber und des Darmes statt. Noradrenerge Neuronen hingegen finden sich sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem. Dort erfolgt die Erregungsübertragung von postganglionären Neuronen des Sympathikus auf die von ihnen innervierten Zielorgane mittels NA. Adrenerge Neuronen kommen im ZNS nur in sehr geringer Anzahl vor.

Die Adrenalinsynthese findet nahezu ausschließlich in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes (NNM) statt.

1.2.1.2 Synthese und Speicherung der Katecholamine

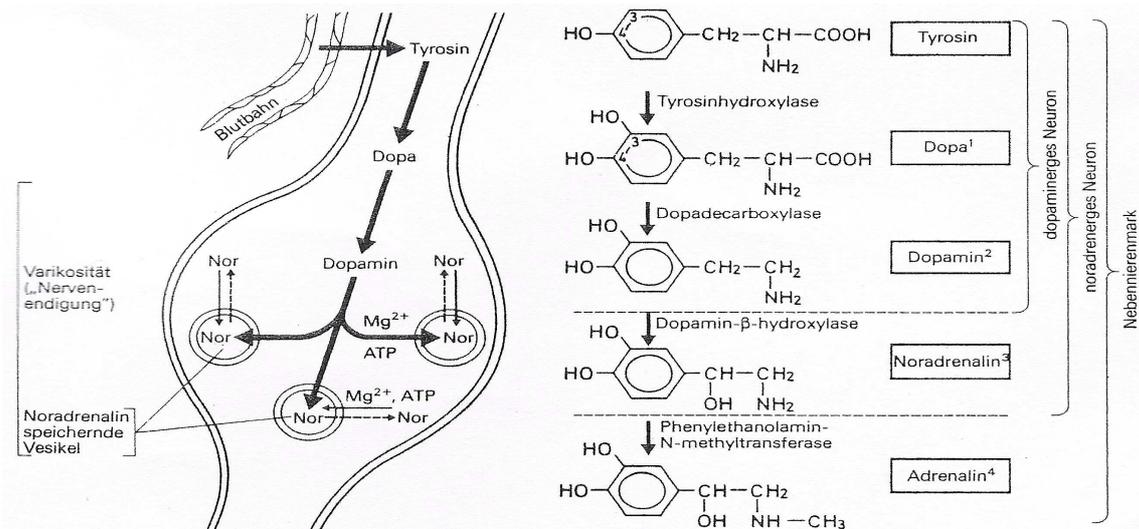


Abb. 1: Synthese und Speicherung von Noradrenalin in den Nervenendigungen. Nor = Noradrenalin (aus Forth & Henschler, 1987) [71].

Katecholamine entstehen aus der nicht-essentiellen aromatischen Aminosäure Tyrosin, die mit der Nahrung aufgenommen wird oder in der Leber durch Hydroxylierung der essentiellen Aminosäure Phenylalanin gebildet wird. Wie in Abb. 1 dargestellt, wird Tyrosin aus dem Blut in den intraneuronalen Raum aufgenommen und dort durch das Enzym Tyrosinhydroxylase in 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) umgewandelt. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katecholaminsynthese [193], der mit Hilfe von Eisen, molekularem Sauerstoff und dem Cofaktor (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin katalysiert wird [140]. Das gebildete Dopa wird im Zytosol durch die Dopadecarboxylase und den Cofaktor Pyridoxalphosphat zu 3,4-Dihydroxyphenylethylamin (DA) decarboxyliert. Im Zytosol oder in den Speichervesikeln noradrenerger Neurone und in den chromaffinen Zellen des NNMs kann DA durch die Dopamin-β-Hydroxylase (DBH), die durch Sauerstoff und dem Cofaktor Ascorbat katalysiert wird, in NA

umgewandelt werden [162,163]. Die Methylierung von NA zu Adrenalin wird durch die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT) und dem Cofaktor S-Adenosylmethionin katalysiert, und findet vor allem in den chromaffinen Zellen des NNMs statt.

Im normalen sympathischen Nervensystem werden DA und NA größtenteils in Vesikeln gespeichert. Der Transport dieser beiden Substanzen in die Vesikel erfolgt gegen einen Konzentrationsgradienten durch Aufnahme über protonen-abhängige Vesikuläre Monoamintransporter (VMAT 1/2), die magnesium- und ATP-abhängig sind [77]. Im Zytosol sind Katecholamine bei einem pH-Wert von 7,2-7,4 einer sehr schnellen Autoxidation und den abbauenden Enzymen ausgesetzt. Die Speichervesikel mit einem pH-Wert von 5,5 und einer hohen Ascorbinsäurekonzentration dienen daher u.a. zum Schutz vor einer zu schnellen Oxidation und einer enzymatischen Spaltung der Katecholamine [41]. Dieser Schutzmechanismus konnte durch Blockierung der Aufnahme von Katecholaminen in Speichervesikel durch Reserpin gezeigt werden [253].

1.2.1.3 Abbau der Katecholamine

Die Inaktivierung freigesetzter Katecholamine erfolgt zu 80-95% [10,58] durch die Wiederaufnahme über NAT bzw. DAT im synaptischen Spalt in das präsynaptische Neuron [27,206]. Dort werden sie entweder wieder über die VMAT 1/2 in Speichervesikel aufgenommen oder metabolisiert. Ein geringer Teil der Katecholamine wird nicht wieder in die ausschüttenden Zellen aufgenommen, sondern gelangt in die Blutzirkulation. Dort werden die Katecholamine über EMT und OCT extraneuronal aufgenommen [58,61] und enzymatisch abgebaut.

Am Abbau der Katecholamine sind im Wesentlichen zwei Enzyme beteiligt: Die Monoaminoxidase (MAO) und die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte MAO kommt in den meisten Zellen vor und hat zwei Unterformen (A und B), von denen nur A in den katecholaminergen Axonendigungen enthalten ist. Zusammen mit der

Aldehyddehydrogenase (AD) katalysiert die MAO die oxidative Desaminierung der Katecholamine unter Bildung von NH_3 und H_2O_2 . Die im Zytoplasma gelöste COMT ist ebenfalls in nahezu allen Zellen vorhanden, v.a. in den Leberzellen, fehlt aber in den katecholaminproduzierenden Neuronen [139]. Sie katalysiert die Methylierung der Hydroxylgruppe in meta-Stellung von Katecholaminen mit S-Adenosylmethionin.

Wie in nachfolgender Abb. 2 dargestellt, wird DA durch die Enzyme MAO, AD und COMT zu Homovanillinsäure (HVA) und NA sowie Adrenalin zu Vanillinmandelsäure (VMA) abgebaut. Dabei kann zuerst der Schritt der Desaminierung durch die MAO und dann der Schritt der Methylierung durch die COMT stattfinden oder in umgekehrter Reihenfolge.

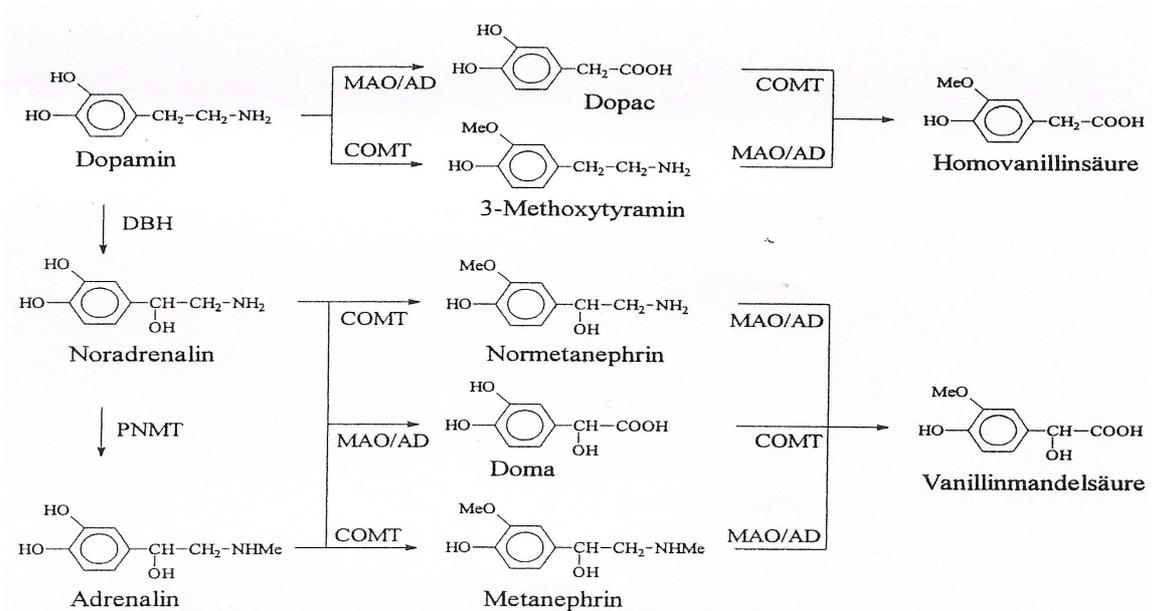


Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung vom Abbau der Katecholamine (aus Firmenschrift von Waters).

AD = Aldehyddehydrogenase, COMT = Catechol-O-Methyltransferase, MAO = Monoaminoxidase, DBH = Dopamin- β -Hydroxylase, PNMT = Phenylethanolamin-N-Methyltransferase, DOPA = 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC = 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure, HVA = Homovanillinmandelsäure, VMA = Vanillinmandelsäure .

1.2.2 Der Katecholaminstoffwechsel der Paragangliome

Die Paragangliome der sympathischen (retroperitonealen) Paraganglien können Katecholamine, meist NA und DA, sezernieren. Die Tumore der

parasympathischen (mediastinalen) Paraganglien sind meist endokrin inaktiv. Im NNM lokalisierte Paragangliome (= Phäochromozytome) produzieren v.a. Adrenalin und NA. DA wird selten als Endprodukt gebildet und kommt meist nur bei den malignen Phäochromozytomen vor.

Die Katecholaminsynthese und der -abbau der Phäochromozytome und Neuroblastome entsprechen dem des gesunden sympathischen Nervensystems und sind unter 1.2.1.2 und 1.2.1.3 (S. 4-6) dargestellt. Ein Unterschied zwischen Phäochromozytomen und Neuroblastomen besteht aber in der Speicherung der Katecholamine. Phäochromozytome haben eine viel größere Anzahl an Vesikeln, in denen sie vermehrt Katecholamine speichern und synthetisieren können [94]. Laut Smets et al. besitzen die Phäochromozytomzellen der PC 12-Zelllinie im Vergleich zu den Neuroblastomzellen der SK-N-SH-Zelllinie ca. 10x mehr Speichervesikel, in denen bis zu 40% mehr mIBG gespeichert werden kann [252]. Durch die, im Vergleich zu den normalen sympathischen Neuronen, gesteigerte Ausschüttung an Katecholaminen kommt es zu den in 1.4.4 (S. 15-16) beschriebenen klinischen Symptomen.

1.2.3 Der Katecholaminstoffwechsel der Neuroblastome

Neuroblastomzellen vom neuronalen Typ (N-Typ) synthetisieren Katecholamine wie Zellen des normalen sympathischen Nervensystems und besitzen einen NAT. Nur etwa 5-12% der Tumore produzieren keine Katecholamine [39,111] und haben auch keinen NAT. Diese Neuroblastomzellen sind vom melanocytären Typ (S-Typ) und können nur die Vorstufe der Katecholamine, das Dopa, mit Hilfe der Tyrosinase synthetisieren. Eine Interconversion von N- und S-Neuroblastomzellen ist grundsätzlich möglich [219].

Das Katecholaminmuster ist je nach Differenzierungsgrad der Tumorzellen unterschiedlich und kann deshalb als Indikator der Tumordifferenzierung hilfreich sein. In ca. 20% der Fälle finden sich erhöhte Dopamin- oder

Noradrenalinspiegel im Plasma [4]. Dabei kann eine überhöhte Dopaminkonzentration im Plasma auch mit einem normalen Spiegel an HVA und VMA einhergehen [196]. Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium ist häufiger nicht der Spiegel an Katecholaminen, sondern der Dopa-Spiegel erhöht [88,115,135]. Bei ungefähr 90% der Neuroblastompatienten ist die Ausscheidung von HVA, als Abbauprodukt von DA, und von VMA, als Abbauprodukt von NA und Adrenalin, erhöht. Deshalb haben HVA und VMA eine große Bedeutung in der Diagnostik. Wenig differenzierten Neuroblastomen fehlt häufig die DBH, was zu einem niedrigen VMA/HVA-Quotienten führt und somit ein prognostischer Marker ist [158,292,293].

In Neuroblastomzellen finden sich im Unterschied zu gesunden sympathischen Nervenzellen nur wenige Speichervesikel [252]. Die synthetisierten Katecholamine werden deshalb vermehrt von der MAO abgebaut oder es kommt zur spontanen Oxidation zu Chinonen, wobei bei beiden Reaktionen H_2O_2 entsteht [257]. Eine übermäßige Produktion von H_2O_2 , einer reaktiven Sauerstoffverbindung, führt zu physiologischen und strukturellen Zellschäden [13]. Außerdem bestehen Hinweise auf die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Tumorentstehung und -progression [44].

1.3 Die Katecholamintransporter

Katecholamintransporter sind schon lange bekannt. 1965 berichtete Iversen erstmals über das Uptake 1- und das Uptake 2-System [127]. Schon damals wurde beschrieben, dass der Transport über diese Systeme natrium- und temperaturabhängig ist.

Anhand molekulargenetischer Forschungen konnten die einzelnen Transporter im Laufe der letzten Jahre identifiziert werden. Man fand heraus, dass sie große strukturelle Ähnlichkeiten haben und alle zur Familie der „Solute Liquid Carrier“ (SLC) gehören [90]. Die verschiedenen Charakteristika der einzelnen neuronalen und extraneuronalen Katecholamintransporter sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 1: Charakteristika der verschiedenen neuronalen und extraneuronalen Katecholamintransporter. (Modifizierte Tabelle aus Goodman und Gilman, 2006) [27,31,58,85,90,95-98,100,104,113,130,141,216,232,295].

Transporter	Substratspezifität	Physiolog. Verteilung im Organismus	Zelltyp	Inhibitoren
NAT	DA > NA > A	- sympath. Gewebe - NNM - Leber - Plazenta	- Sympath. Neurone - Chromaffine Zellen - Endothelzellen d. Kapillaren - Synzytiotrophoblasten	- Kokain - Desipramin - andere trizykl. Antidepressiva - Nisoxetin
DAT	DA >> NA > A	- Niere - Magen - Pankreas	- Endothel - Parietal- u. Endothelialzellen - Ductus pancreaticus	- GBR-12783 - GBR-12909 - Kokain - Mazindol
OCT 1	DA ≈ A > NA	- Leber - Darm	- Hepatozyten - Epithelzellen	- D 22 - DP 24 - Corticost. - Famotidin - Ranitidin - Prazosin - Pb
OCT 2	DA >> NA > A	- Niere - ZNS	- prox. u. dist. Tubulus - Gliazellen, Neurone	- D 22 - DP 24 - Corticost. - Famotidin - Ranitidin - Cimetidin - SKF-550
OCT 3 = EMT	A >> NA > DA	- Leber - ZNS - Herz - Gefäße - Niere - Plazenta - Retina - Darm - Lunge	- Hepatozyten - u.a. Gliazellen - Myozyten - Endothelzellen - Rinde, prox. u. dist. Tubulus - Synzytiotrophoblasten - Photorezeptoren, Amakrine Zellen - Epithelzellen	- DP 24 - D 22 - Corticost. - O-MISP - Estrogene - Famotidin
VMAT	DA > NA	- sympath. Gewebe	- Speichervesikel - sympath. Neurone	- Reserpin

Die Reihenfolge der Inhibitoren ist nach der Stärke der Hemmwirkung gewählt. Dabei steht der Inhibitor an erster Stelle, der den jeweiligen Transporter am stärksten hemmt.

DP 24 = Disprocynium 24, D 22 = Decynium 22, Corticost. = Corticosteron, O-MISP = O-methylisoprenalin, Pb = Phenoxybenzamin, SKF-550 = (9-fluorenyl)-N-methyl-β-chlorethylamin (= Phenoxybenzaminderivat), prox. = proximal, dist. = distal.

1.3.1 Der Noradrenalintransporter

Als ein Teil des Uptake 1-Systems wurde 1991 der NAT identifiziert [206]. Die physiologische Verteilung dieses Katecholamintransporters im Organismus ist in Tab. 1 dargestellt. Hauptsächlich ist der NAT in der präsynaptischen Membran von sympathischen Neuronen lokalisiert, wo er für die Wiederaufnahme der zuvor ausgeschütteten Katecholamine zuständig ist. Ein Großteil ist jedoch nicht primär an der präsynaptischen Membran, sondern in der Membran der Speichervesikel zu finden [147]. Desweiteren ist der NAT auf Phäochromozytomen und auf ca. 90% der Neuroblastomen (N-Typ Neuroblastome) lokalisiert. Allerdings ist der prozentuale Anteil der NAT-exprimierenden Zellen im Tumor gering und sehr variabel [101].

Es gibt Hinweise, dass die Expression des NATs in vielfältiger Weise reguliert werden kann [147,173,302]. Dabei spielen die zellulären Eisenkonzentrationen [15] und extrazelluläres ATP [109] eine wichtige Rolle. In der Literatur sind auch Einflüsse durch Nerve Growth Factor (NGF) [239], durch Dexamethason [285] und Interferon α [264] auf die Regulation von NAT beschrieben. Außerdem besteht evt. eine funktionelle Verknüpfung zwischen dem Ausmaß der NAT Expression und dem Katecholaminstoffwechsel [52,166].

Die Substratspezifität des NATs ist gering und es können außer NA auch DA und katecholaminanalogue Verbindungen (z.B. 6-FDA) oder substituierte Benzylguanidine (z.B. mlBG) aufgenommen werden. Die Affinität des NAT für DA ist dabei sogar höher als diejenige für NA [216]. Der temperatur- und energieabhängige Prozess der Katecholaminaufnahme über den NAT kann sehr effektiv durch Kokain und Desipramin und gehemmt werden [206].

1.3.2 Der Dopamintransporter

Vor der Identifizierung des DAT 1991 [85,242,277] wurde er, zusammen mit dem NAT, als Uptake 1-System bezeichnet. Der DAT ist v.a. in Nieren-, Magen- und Pankreaszellen zu finden (Tab. 1, S. 9). Eine geringe Expression von DAT in Neuroblastomen und Phäochromozytomen ist auf Grund der

Heterogenität der Tumore nicht vollständig auszuschließen (siehe 2.5, S. 41). Die Expression der DAT auf der Zelloberfläche sowie die Transportaktivität ist von der N-linked Glykosylierung abhängig [164,209]. Im Unterschied zum NAT weist der DAT eine relativ strenge Substratspezifität auf. Der DAT kann die anderen Katecholamine auch in geringem Maße transportieren, in größeren Mengen nimmt er außer DA nur dopaminanaloge Verbindungen (z.B. 6-FDA) auf. Als spezifische Hemmstoffe des DAT sind GBR-12783 [25], GBR-12909 [114], Kokain und Mazindol [85] in der Literatur beschrieben.

1.3.3 Der Extraneuronale Monoamintransporter

1998 wurde der EMT (= OCT 3) als ein Teil des Uptake 2-Systems identifiziert [100,104,141,295]. Der EMT gehört zur Familie der organischen Kationentransporter und ist für die Aufnahme sowie extraneuronale Inaktivierung freier Katecholamine aus dem Blut verantwortlich, die der Wiederaufnahme über das Uptake 1-Systementsprechen sind. Über das Uptake 2 System werden etwa 5% der Katecholamine inkorporiert [58,61]. Wie in Tab. 1 (S. 9) aufgelistet, sind diese Transporter hauptsächlich in Geweben lokalisiert, die sympathisch innerviert sind [265]. Stark exprimiert ist der EMT in Herz, Lunge und Plazenta [100,104], weniger stark im ZNS, Darm, Magen, in der Niere und Skelettmuskulatur. Über eine Expression in der Leber gibt es widersprüchliche Aussagen [104].

Die Regulation des humanen EMTs erfolgt über Phosphorylierung und Dephosphorylierung, wobei er im phosphorylierten Zustand aktiv ist [180]. Über den EMT können Histamine und Serotonin [99] sowie alle Katecholamine aufgenommen werden, wobei die Affinität des EMTs für Adrenalin am größten und für DA am niedrigsten ist [100]. In der Literatur ist sogar beschrieben, dass DA über den humanen EMT gar nicht transportiert werden kann [130]. Durch die in Tab. 1 (S. 9) aufgeführten Inhibitoren ist dieser extraneuronale Katecholamintransporter hemmbar. Die typischen NAT- und VMAT-Inhibitoren zeigen jedoch keinen Hemmeffekt [100].

1.3.4 Die Organischen Kationentransporter

Die molekulare Identifizierung der ebenfalls zur Familie der SLC zählenden OCT erfolgte 1997 [91,95,96,181,202,301]. Davor wurden sie in der Literatur als Uptake 2-System bezeichnet. Außer dem als EMT bekannten OCT 3 existieren noch zwei weitere Hauptformen (OCT 1 und OCT 2). Durch genetische Polymorphismen und alternatives Spleißen entstehen aus den OCT 1 und OCT 2 viele weitere Unterformen [130,138].

Sie sind, wie die EMT, auch an der Inaktivierung zirkulierender Katecholamine beteiligt. Dies ist jedoch bei den OCT 1 und OCT 2 wahrscheinlich nur von untergeordneter Bedeutung, da die Transporteffizienz von Katecholaminen über die OCT 1 und OCT 2 relativ gering ist [232]. Eine wesentlich größere Bedeutung haben diese beiden Transporter bei der Elimination kationischer Umweltgifte und metabolischer Abbauprodukte [31,98]. Von den Katecholaminen nehmen die OCT 1 und OCT 2 am ehesten DA auf. Adrenalin wird über den OCT 1 nahezu genauso gut transportiert, während NA von beiden Transportern relativ gering inkorporiert wird. Die beiden OCT unterscheiden sich aber nicht nur in der Substratspezifität, sondern auch in der physiologischen Verteilung im Organismus (Tab. 1, S. 9).

Eine Inhibition der OCT 1 erfolgt durch Prazosin und Phenoxybenzamin, die allerdings auch eine irreversible Hemmung des OCT 2 und des EMT verursachen. Ein Inhibitor, der ausschließlich den OCT 2 blockiert, ist in der Literatur nicht bekannt. Durch SKF-550 wird außer der reversiblen Hemmung von OCT 2 auch der EMT irreversibel blockiert [113]. Ranitidin inhibiert den Transport über die OCT 1+2, während Famotidin alle OCT hemmt [28].

1.3.5 Die Vesikulären Monoamintransporter

Die protonenabhängigen Vesikulären Monoamintransporter (VMAT) 1 und 2, die in der Membran der Speichervesikel lokalisiert sind und sowohl DA als auch NA aufnehmen, sind durch Reserpin spezifisch hemmbar [253].

1.4 Das Phäochromozytom

1.4.1 Definition und Epidemiologie

Das Phäochromozytom ist ein meist benignes (85%), katecholaminproduzierendes Paragangliom der chromaffinen Zellen des NNMs [56,89,159]. Im Gegensatz zum Neuroblastom ist das Phäochromozytom kein typischer kindlicher Tumor, sondern tritt eher im Erwachsenenalter auf. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 42 Jahren [60]. Die Angaben über die Inzidenz des Tumors variieren, da das Phäochromozytom häufig symptomlos ist und deshalb nicht diagnostiziert wird. Laut Eisenhofer et al. [59] liegt die Inzidenz bei 3-8 Fällen pro 10^6 . Basierend auf groß angelegten Autopsiestudien erscheinen in der Literatur allerdings Inzidenzen des Phäochromozytoms von 500 Fällen pro 10^6 [188]. Bei Patienten mit einer dauerhaften Hypertonie liegt die Prävalenz des Phäochromozytoms zwischen 0,2-0,4% [159,254].

1.4.2 Pathogenese, Ätiologie und Genetik

Das Phäochromozytom ist ein embryonaler Tumor des sympathischen Nervensystems, der aus primitiven neuroektodermalen Zellen der Neuralleiste entsteht (Abb. 3).

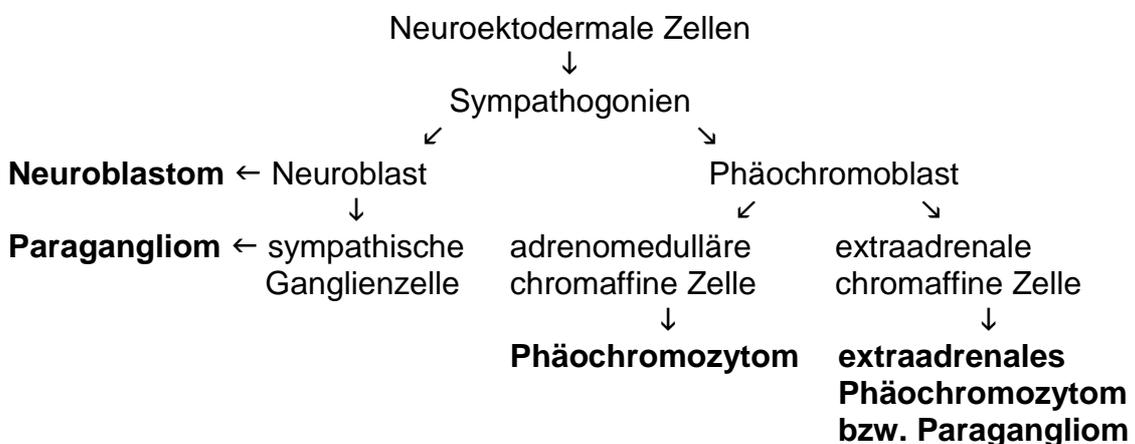


Abb. 3: Embryogenetische Entwicklung von Tumoren des sympathischen Nervensystems.

Zum Einen treten Phäochromozytome sporadisch auf, ohne genaue Erkenntnis der Ätiologie [40,174], zum anderen sind etwa 15-20% aller Phäochromozytome familiärer Natur [159]. Ein familiäres Auftreten besteht insbesondere im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN 2a/b), dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL), der Neurofibromatose Typ 1 (M. Recklinghausen) und familiärer Glomustumore. Sowohl die sporadisch als auch familiär auftretenden endokrinen Tumore sind Ausdruck einer Deregulation von Genen, die für die Kontrolle des Zellwachstums von zentraler Bedeutung sind. Genetische Mutationen bestehen dabei nicht nur in der Initiation sondern auch in der Progression des Tumors [23].

Bei Assoziation mit dem MEN 2-Syndrom, findet man eine Mutation am Genort 11.2 des langen Arms (q) von Chromosom 10. Dort ist das RET-Protoonkogen codiert, welches zum Onkogen aktiviert wird [63,192].

Ist das Phäochromozytom mit dem VHL-Syndrom in Verbindung zu bringen kann man molekularpathologisch einen Defekt im VHL-Gen feststellen, das auf dem kurzen (p) Arm des Chromosoms 3 liegt, und ein Tumorsuppressorgen darstellt [46,63,199].

Die Ursache dafür, dass bei der Neurofibromatose Typ 1 vermehrt Tumore auftreten, u.a. auch das Phäochromozytom, liegt in einer Mutation des NF 1-Gens. Dieses liegt auf dem Chromosom 17q und hat normalerweise die Funktion eines Tumorsuppressorgens [64,199,218,294].

Für Phäochromozytome, die im Zusammenhang mit familiären Glomustumoren auftreten, ist eine Mutation im Succinyldehydrogenasegen (SDH-Gen) der Untereinheit D [14,38,83] verantwortlich, das in der Region 11q23 lokalisiert ist. SDH katalysiert im Citratzyklus die Dehydrogenierung von Succinat zu Fumarat. Durch eine Mutation des Succinyldehydrogenasegens reichert sich Succinat an. Dadurch kommt es zur vermehrten Inhibition einer Prolylhydroxylase, die normalerweise proteingebundenes Prolin hydroxiliert, das für den Abbau von HIF-1 α benötigt wird. Kann HIF-1 α auf Grund der Inhibition der Prolylhydroxylase nicht mehr abgebaut werden, so findet eine vermehrte Glykolyse statt, die das Wachstum vieler Tumore begünstigt (= Warburg-Effekt) [65].

1.4.3 Pathologie, Klassifizierung und Stadieneinteilung

Das Phäochromozytom erscheint makroskopisch als solider, teilweise von einer Pseudokapsel umgebener Tumor. Mikroskopisch sieht man große Zellen mit azidophil granuliertem Plasma, die herdförmig zusammenliegen und von schmalen Bindegewebssepten mit kapillären Gefäßen umgeben sind. Histologisch sind benigne nicht sicher von malignen Phäochromozytomen zu unterscheiden. Bei sehr großen Tumoren, zentralen Nekrosen, lokal infiltrativem Wachstum und einem erhöhten Proliferationsindex (= Mitose-Karyohexis-Index = MKI > 5%), ist eine Malignität sehr wahrscheinlich. Das einzige weltweit akzeptierte Malignitätskriterium ist jedoch das Vorhandensein von Metastasen.

Eine Klassifikation kann nach dem Auftreten (sporadisch oder familiär), nach der Lokalisation (intra- oder extraadrenal), oder nach der Dignität (benigne oder maligne) vorgenommen werden.

Die Stadieneinteilung maligner Phäochromozytome erfolgt nach der allgemeinen TNM- Klassifikation.

1.4.4 Lokalisation von Primärtumor und Metastasen und deren klinische Symptomatik

Bei Erwachsenen sind 15%, bei Kindern hingegen 34% der Paragangliome im Bereich der abdominellen und thorakalen Grenzstränge (= Paraganglien) lokalisiert. Diese extraadrenalen Tumore können in den sympathischen Ganglien im Halsbereich, im Mediastinum, entlang der Aorta oder auch im Becken und in der Blase gefunden werden. Die restlichen Paragangliome liegen im NNM (= Phäochromozytome). Ungefähr 90% der Phäochromozytome sind einseitig, 10% doppelseitig lokalisiert. Das maligne Phäochromozytom metastasiert lymphogen und hämatogen v.a. in Lunge, Leber und Knochen.

Die Symptomatik ist in der Vielzahl der Fälle sehr typisch. Als Leitsymptom gilt eine therapierefraktäre Hypertonie mit Blutdruckkrisen, die intermittierend oder als Dauerhypertonie auftreten kann. Besonders während einer Blutdruckkrise klagt der Patient über anfallartige Kopfschmerzen, Schweißausbrüche und Herzklopfen. An weiteren Befunden kann eine Leukozytose, eine Hyperglykämie und Glukosurie auftreten. Unspezifischere Symptome sind Tremor, innere Unruhen, Fieber, Übelkeit, Blässe, Synkopen, Gewichtsabnahme sowie Abdominal- und Flankenschmerzen. Bei ca. 5% aller Phäochromozytome besteht jedoch keine klinische Symptomatik [89,159,174].

1.4.5 Diagnostik des Phäochromozytoms

Bei entsprechender Symptomatik, die im vorherigen Kapitel beschrieben ist, erfolgt eine gezielte Hormondiagnostik zur Abklärung der Verdachtsdiagnose. Dafür werden die Katecholamine und deren Metabolite im 24h-Sammelurin und im Serum bestimmt. Jedoch scheint nach neueren Studien die Bestimmung der freien Metanephrine im Plasma die sensitivste Laboranalytik zur Erkennung eines Phäochromozytoms zu sein [160]. Sind diese Werte grenzwertig, so wird bei klinischem Verdacht auf ein Phäochromozytom der Clonidin Hemmtest durchgeführt. Nach Gabe von Clonidin sinkt durch zentrale Hemmung des sympathischen Nervensystems bei gesunden Probanden die Plasmakatecholaminkonzentration, nicht dagegen bei autonomer Katecholaminsekretion infolge eines Phäochromozytoms.

Für die Lokalisationsdiagnostik stehen die Sonographie, Computer- (CT) und Kernspintomographie (MRT) sowie die [¹²³I] mIBG-Szintigraphie zur Verfügung. Mit Ausnahme der Sonographie haben alle bildgebenden Verfahren eine gute Sensitivität (85-100%), bei multiplen Tumoren ist jedoch das mIBG Szintigramm überlegen. Zu den neueren bildgebenden Verfahren zählen die PET mit 2-[¹⁸F] FDG oder 6-[¹⁸F] FDA [47,126,172,198,200,205] sowie [¹¹¹In]-Octreotid Single Photonen Emissions Computertomographie

(SPECT) [259,280], die zwar eine gute Sensitivität haben, jedoch momentan noch eine zu geringe Spezifität.

Bei nachgewiesenem Phäochromozytom mit familiärer Häufung sollte eine molekularbiologische Diagnostik durchgeführt werden, um in den mit dem Phäochromozytom assoziierten Genen nach Mutationen zu suchen.

1.4.6 Therapie des Phäochromozytoms

Bei der Therapie des Phäochromozytoms muss grundsätzlich zwischen dem benignen und dem malignen Tumor unterschieden werden [56,174]. Die Therapie der Wahl beim benignen Phäochromozytom ist die endoskopische, organerhaltende, chirurgische Extirpation mit präoperativer α -Blockade. Bei Inoperabilität erfolgt eine medikamentöse Dauertherapie mit α -Blockern (z.B. Phenoxybenzamin, Prazosin) oder α -Methyl-p-Tyrosin, das die Tyrosinhydroxylase und somit die Synthese von Katecholaminen hemmt. Kommt es trotz dieser Therapie zu hypertensiven Krisen, so werden diese mit Nitroglycerin, Urapidil und kurzwirksamen Calciumantagonisten behandelt.

Wenn möglich, wird das maligne Phäochromozytom, ebenfalls unter α -Blockade, chirurgisch entfernt. Allerdings wird eine offene „en bloc“-Resektion mit einem Sicherheitsabstand durchgeführt. Ist der Tumor nicht operabel, erfolgt die gleiche medikamentöse Dauertherapie, die bei der Therapie des benignen Tumors beschrieben ist. Bei mIBG-positiven Metastasen kann eine Isotopentherapie mit [131 I] mIBG durchgeführt werden [251,271]. Eine Strahlentherapie erfolgt nur bei frakturgefährdeten Skelettmetastasen. Ansonsten bestehen folgende Therapieoptionen: Interferon α , Somatostatin Analoga (z.B. Octreotid), Chemoembolisation von Lebermetastasen sowie eine palliative Chemotherapie. Dafür wird bisher am häufigsten das Protokoll von Averbuch et al. eingesetzt, das Cyclophosphamid und Vincristin mit Dacarbazin kombiniert [9].

1.4.7 Prognosefaktoren und Prognosen

In vielen verschiedenen Studien [7,8,49,88,128,129,136,146,165,261,279,281] wurde die Aussagekraft verschiedener Parameter für die Prognose getestet. Zu den getesteten Parametern zählen u.a. der Plasma- und Urinspiegel von Dihydroxyphenylalanin und DA, das Alter bei Diagnosestellung, die Assoziation mit familiärer Häufung, Zell- und Kernpolymorphismen, die Wachstumscharakteristik, die Größe, die Lage, das Vorhandensein von Gefäß- und Kapselinvasion sowie Nekrosen und der MKI. Da diese Parameter eine Abschätzung von vielen Variablen erfordern, sind sie als Prognosefaktoren nicht zu gebrauchen [60].

Eine gute Aussage über die Dignität des Phäochromozytoms und somit über die Prognose kann eine Kombination von molekulargenetischen Markern geben [84]. In nachfolgender Tabelle (Tab. 2) sind die wichtigsten molekulargenetischen Marker aufgelistet, die mit einem malignen Phäochromozytom assoziiert sind.

Tab. 2: Molekulargenetische Marker des malignen Phäochromozytoms.

<i>Molekulargenetischer Marker</i>	<i>Literatur</i>
Cyclooxygenase-2	Salmenkivi (2001) [225]
Hitzeschockprotein 90 (HSP 90)	Boltze (2003) [24]
Hypoxie induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α)	Favier (2002) [69]
N-Cadherin	Khorram-Manesh (2002) [144]
Reverse Telomerase Transkriptase	Boltze (2003) [24], Elder (2003) [56]
Secretogranin II Derivat EM66	Yon (2003) [297]
Stromyelisine (MMP-3)	Kolomecki (2001) [152]
Tenascin C	Salmenkivi (2001) [224]
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Kolomecki (2001) [152], Favier (2002) [69], Zielke (2002) [303], Salmenkivi (2003) [226]
VEGF Rezeptor 2	Favier (2002) [69]

Jedoch ist momentan die alleinige Kombination der verschiedenen molekulargenetischen Marker nicht ausreichend, um eine sichere Unterscheidung zwischen malignen und benignen Phäochromozytomen zu treffen [60]. Es ist immer noch eine zusätzliche bildgebende Diagnostik notwendig.

Bei benignen Tumoren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ungefähr 95%. Bei malignen Tumoren, bei denen bereits Metastasen vorhanden sind, ist die Prognose ungünstiger. Hier liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur ca. 44%.

1.5 Das Neuroblastom

1.5.1 Definition und Epidemiologie

Das Neuroblastom ist ein hochmaligner Tumor, der vom sympathischen Nervengewebe ausgeht.

Ungefähr 8% aller malignen Krebserkrankungen im Kindesalter sind Neuroblastome, häufiger sind nur die Gruppe der Hirntumore und die Leukämien [102,103,133]. Das Neuroblastom ist somit der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters. Die Inzidenz liegt bei 1-2 pro 100 000 Kindern unter 15 Jahren [11,54,133,189]. Das mittlere Alter bei der Diagnosestellung beträgt 15 Monate. In 90% der Fälle wird die Diagnose in den ersten 5 Lebensjahren gestellt, 75% der erkrankten Kinder sind jünger als 39 Monate und 25% jünger als 5 Monate [133]. Sehr selten erkranken auch Erwachsene.

1.5.2 Pathogenese, Ätiologie und Genetik

Das Neuroblastom gehört zur Gruppe der neuroblastischen Tumore und geht genau wie das Phäochromozytom aus primitiven neuroektodermalen Zellen der Neuralleiste hervor (Abb. 3, S. 13).

Die meisten Neuroblastomerkrankungen treten sporadisch auf. Es sind aber Familien beschrieben worden, in denen Neuroblastome gehäuft vorkommen [155]. Assoziationen mit anderen Erkrankungen auf Grund von einem Neuralleistendefekt, wie der Aganglionose (M. Hirschsprung) oder der Neurofibromatose Typ 1 (M. Recklinghausen), sind beschrieben [153,156,177]. Obwohl die genauen Pathomechanismen der Entstehung des Neuroblastoms noch nicht bekannt sind, wird vermutet, dass eine fehlerhafte Genregulation hier eine wichtige Rolle spielt. Es wurde eine Reihe von somatisch erworbenen, zytogenetischen Veränderungen beobachtet, die zur Überexpression von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Veränderungen der Genexpression führen [178].

Bei ca. 30-50% der primären Neuroblastome kommt eine Deletion am kurzen Arm von Chromosom 1 (1p36) vor [36,82]. Dort ist vermutlich ein Tumorsuppressorgen lokalisiert, das durch die Deletion inaktiviert wird [32].

Die häufigste genetische Veränderung, die bei einem Neuroblastom gefunden wird, ist eine Verlängerung am langen Arm von Chromosom 17 (17q) durch eine unbalancierte Translokation [157]. Das Partnerchromosom der Translokation ist in den meisten Fällen das Chromosom 1p [29].

Eine Amplifizierung des N-myc-Gens lässt sich ungefähr bei einem Drittel aller unbehandelten Neuroblastome nachweisen [35]. N-myc ist ein Protoonkogen, das sich distal auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 befindet [234]. Es wird normalerweise im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert und kontrolliert die Expression von Genen, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren [178]. Eine N-myc-Amplifizierung geht immer mit einer 17q-Verlängerung und einer 1p-Deletion einher, nicht jedoch umgekehrt. Vermutlich ist die N-myc-Amplifizierung ein späteres Ereignis in der Abfolge genetischer Veränderungen, die zum Neuroblastom führen [29].

In manchen Neuroblastomen kann eine geringere Expression der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (TRK) detektiert werden [33]. Es gibt drei Subtypen der TRK (A,B,C) [12], die neurotrophische Faktoren aus der Familie der Nerve Growth Factors (NGF) binden. Diese sind mitverantwortlich für die normale neuronale Entwicklung des sympathischen Nervensystems [178].

1.5.3 Pathologie, Klassifizierung und Stadieneinteilung

Das Neuroblastom ist ein sehr heterogener Tumor mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden [32,123]. Makroskopisch sieht das Neuroblastom dem Phäochromozytom sehr ähnlich. Die Schnittfläche zeigt oft gelbliche Nekroseherde, sowie ausgedehnte Hämorrhagien und kleine, goldgelbe, stippchenförmige Verkalkungsherde. Das Neuroblastom besteht überwiegend aus zwei Zelltypen: den Neuroblasten oder Ganglionzellen und den Schwannzellen, wobei die Schwannzellen das Stromagerüst des Tumors bilden. Wie in Tab. 3 aufgelistet ist, besteht das undifferenzierte Neuroblastom überwiegend aus Neuroblasten und nur wenigen Schwannzellen. Mikroskopisch sieht man kleine, runde, blaue Zellen, die dichte chromatinreiche Kerne und nur wenig Zytoplasma enthalten. Die Zellen liegen in Haufen zusammen und werden von fibrovaskulären Septen umgeben. Der Anteil an Neuroblasten, die meist zu Ganglionzellen ausgereift sind, ist im ausdifferenzierten Neuroblastom meist gering, während die Anzahl an Schwannzellen steigt [42]. Mikroskopisch zeigen sich die Bildung einer feinfibrillären Matrix sowie Homer-Wright-Pseudorosetten [3,110].

Nach ihren morphologischen Eigenschaften wurden die Neuroblastome 1997 in der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) eingeteilt [240], die in nachfolgender Tabelle dargestellt ist. Diese basiert auf der von Shimada et al. 1984 vorgeschlagenen Shimada Klassifikation.

Tab. 3: International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC).

Kategorie und Subtyp	Schwannzellstroma
Neuroblastom - undifferenziert - wenig differenziert - differenziert	Keines Keines oder nur minimal Keines bis maximal 50% des Tumorgewebes
Ganglioneuroblastom - gemischt - nodulär	> 50% des Tumorgewebes Anteil schwannzellreicher & -armer Gebiete variabel
Ganglioneurom	Dominant

Die Stadieneinteilung für das Neuroblastom erfolgt nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS), das 1971 von Evans et al. [68] erstellt und zuletzt 1993 von Brodeur et al. [34] modifiziert wurde. Es richtet sich v.a. nach chirurgischen und histologischen Kriterien, sowie nach Tumorausdehnung, Lokalisation und Metastasierung.

Tab. 4: International Neuroblastoma Staging System (INSS).

Stadium	Tumorausdehnung
I (17,5%) ¹	Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung, mit oder ohne mikroskopischem Resttumor. Repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall, während am Tumor adhärenzte, chirurgisch entfernte Lymphknoten positiv sein dürfen.
Ila (5,4%)	Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung. Repräsentative ipsi- oder kontralaterale, nichtadhärenzte Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall.
Ilb (5,5%)	Unilateraler Tumor. Regionale, ipsilaterale, nichtadhärenzte Lymphknoten zeigen Tumorbefall. Kontralaterale Lymphknoten sind histologisch negativ.
III (20,6%)	Nichtresektabler, unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie ² . Mit oder ohne ipsilateralem Lymphknotenbefall; oder nichtresektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder durch bilateralen Lymphknotenbefall.
IV (40,5%)	Disseminierung des Tumors in das Knochenmark, in die Knochen, in entfernte Lymphknoten, Leber, Haut und/oder andere Organe.
IVs (10,5%)	Lokalisierter Primärtumor wie in Stadium I, Ila oder Ilb und Disseminierung nur gering in Leber, Haut und/oder Knochenmark. Dieses Stadium findet sich nur im ersten Lebensjahr.

¹ Häufigkeitsverteilung der Neuroblastomerkrankungen auf die einzelnen Stadien in Deutschland [116].

² Das Überschreiten der Mittellinie ist definiert durch infiltratives Erreichen/Überschreiten der Wirbelkante der Gegenseite.

1.5.4 Lokalisation von Primärtumor und Metastasen und deren klinische Symptomatik

Prinzipiell können primäre Neuroblastome überall dort entstehen, wo Zellen der Neuralleiste vorkommen. Etwa 50% der Tumore treten im NNM auf, 28% im restlichen Abdomen, 13% im Thorax, die Übrigen kommen im Kopf, Hals und Becken vor [103]. Der Primärtumor dehnt sich sowohl lokal infiltrierend als auch lymphogen und hämatogen aus. Metastasen entstehen v.a. im Knochenmark, im Skelettsystem und in der Leber. Ein metastatischer Befall des Orbitaknochenmarkes und der Haut ist eher selten.

Über die Lokalisation und das Ausmaß des Tumors können die Symptome eines Neuroblastoms manchmal Aufschluss geben. Neuroblastome in frühen Stadien sind klinisch häufig asymptomatisch und fallen nur zufällig auf. Unspezifische Allgemeinsymptome, wie eine Reduktion des Allgemeinzustandes, Fieber, Gewichtsabnahme und Anämie treten meist erst bei bereits fortgeschrittener Erkrankung auf [116]. Schwierigkeiten bei der Defäkation und Miktion, Aszites, Hautknötchen und auftretende Knochenschmerzen sind Anzeichen für ein zunehmendes lokales Tumorwachstum und einer Metastasierung des Neuroblastoms.

Spezifische Symptome wie Lähmungserscheinungen der unteren Extremitäten oder Paraneoplastische Syndrome treten seltener auf. Zu den Paraneoplastischen Syndromen zählen therapieresistente Diarrhöen infolge einer Produktion von Vasointestinalem Peptid (VIP) durch den Tumor, das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom [256], das Auftreten ein- oder beidseitiger periorbitaler Brillenhämatome oder das Horner-Syndrom [154].

Eine Hypertonie, wie sie beim Phäochromozytom auftritt, ist für das Neuroblastom nicht typisch. Das Neuroblastom produziert zwar vermehrt Katecholamine, die allerdings wegen der ungenügenden Anzahl an Vesikeln schon intrazellulär abgebaut und als inaktive Metaboliten in den Kreislauf abgegeben werden.

1.5.5 Diagnostik des Neuroblastoms

Da ein Großteil der Neuroblastome Katecholamine synthetisieren (88-95%) [39,111], fällt bei über 90% der Patienten eine Urinuntersuchung auf Katecholamine und deren Metabolite HVA, VMA positiv aus [103]. Sie wurde deshalb in Deutschland 1995 [228,229] und in weiteren Ländern als Screeninguntersuchung bei Neugeborenen zur Früherkennung von Neuroblastomen eingeführt [45,105,112,142,143,214,275,293]. Diese Screeninguntersuchung ist jedoch umstritten, da sie Tumore diagnostiziert, die sonst nie klinisch auffällig geworden wären und die Gesamtmortalität durch das Screening nicht gesenkt werden konnte [17,143,230,269,274].

Bei den postnatalen Blutuntersuchungen werden verschiedene Tumormarker, wie z.B. die Neuronspezifische Enolase (NSE), der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Ferritinspiegel, sowie der Katecholaminstatus im Serum untersucht. Bei den Blutuntersuchungen können ebenfalls Anämie und Thrombozytopenie auffallen, das auf Knochenmarkinfiltration hinweisen könnte [3]. Zum Nachweis oder Ausschluss des Knochenmarkbefalles ist eine Knochenmarkpunktion ein obligater Bestandteil der Diagnostik.

Zur bildgebenden Diagnostik gehören eine Sonographie des Abdomens und Röntgenaufnahmen von Thorax und Abdomen. Gelegentlich werden Neuroblastome schon bei pränatalen Ultraschalluntersuchungen entdeckt. Bei positivem Befund, sowie bei zervikalen und pelvinen Neuroblastomen, sind CT und MRT weiterführende Untersuchungsmethoden. Zur Aufdeckung von Metastasen und zur genauen Lokalisation des Primärtumors ist heute eine Szintigraphie mit [¹²³I] mIBG sowie mit Technetium 99 zur Detektion von Knochenmetastasen üblich.

Die endgültige Diagnose wird durch eine histologische Untersuchung von Tumorgewebe oder durch Nachweis von Tumorzellnestern im Knochenmark in Verbindung mit erhöhten Katecholaminmetaboliten im Serum oder Urin gestellt. Bei diagnostiziertem Neuroblastom sollten molekulargenetische Untersuchungen des Tumors durchgeführt werden, da sie wichtige Aussagen zur Prognose des Neuroblastoms liefern können (siehe Tab. 5, S. 28).

1.5.6 Therapie des Neuroblastoms

Die Therapie des Neuroblastoms richtet sich in Deutschland nach der aktuellen multizentrischen Therapiestudie der Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, derzeit die Neuroblastomstudie NB04 [81], nach der jeder Patient behandelt wird. Die Behandlung ist multimodal und risikoadaptiert und erfolgt nach Tumorstadium, Alter, N-myc-Amplifizierung, 1p-Deletion, Symptomatik und dem Volumen des in situ belassenen Tumorrestes. Die Patienten werden zu Beobachtungs-, Standardrisiko- und Hochrisikogruppen zusammengefasst.

Das Therapieprotokoll sieht für Patienten der Beobachtungsgruppe zunächst eine Operation vor, bei der die operative Entfernung des Tumors ohne Gefährdung des Patienten oder seiner Organe angestrebt wird. Es folgt eine 12-monatige Beobachtungsphase unter radiologischer Kontrolle der Tumorgröße. Ist der Tumorrest nach der Beobachtungsphase unverändert, so erfolgt eine weitere Operation mit dem Ziel der vollständigen Tumorentfernung. Dieser kann sich, je nach der Entwicklung des Tumors, eine Chemotherapie anschließen. Chemotherapie ist für Beobachtungspatienten nicht regelhaft vorgesehen und nur bei eindeutiger Tumorprogression bzw. Auftreten eines Tumorrezidivs oder bedrohlicher Symptomatik indiziert. Tritt trotz Verabreichung von maximal 4 Zyklen Chemotherapie (mit einer Dauer von je drei Wochen) eine Tumorprogression bzw. ein -rezidiv auf, so werden die Patienten in die Standard- oder Hochrisikogruppe eingegliedert.

Standardrisikopatienten erhalten nach der ersten Operation über einen Zeitraum von 12-18 Wochen Chemotherapie. Nach diesen 4-6 Zyklen erfolgt eventuell eine weitere Operation. Für Patienten mit ungenügendem Ansprechen der Therapie und aktivem Tumorrest ist eine Strahlentherapie erforderlich. Der zweiten Operation bzw. der Strahlentherapie folgen 4 Zyklen Erhaltungskemotherapie über einen Zeitraum von 12 Wochen. Nach dem Abschluss der Chemotherapie schließt sich eine Behandlung mit

13-cis-Retinsäure an, die einen Stopp der Zellproliferation verlängern soll [2,260]. Diese Therapie hat eine Laufzeit von einem Jahr, mit einer 3-monatigen Unterbrechung nach 6 Monaten.

Nach Maßgabe des NB04-Protokolls erfolgt bei der Hochrisikogruppe, zu der Patienten über einem Jahr mit einem Stadium IV Neuroblastom und alle Tumore mit einer N-myc-Amplifikation zählen, eine Randomisierung der Patienten in eine Standard- und eine experimentelle Gruppe. Nach einer Tumorteilresektion bzw. der Tumorbiopsie erfolgt die Chemotherapie.

Für Kinder mit Randomisierung in den experimentellen Arm erfolgen zunächst 2 Zyklen Chemotherapie. Diese enthalten u.a. das Zytostatikum Topotecan, einem Topoisomerase-I-Inhibitor [87,182,211], das bislang noch nicht für die Therapie von Neuroblastomen verwendet wurde. In präklinischen [283,299] und in Phase I- und II-Studien [1,137] hat es jedoch gute Effekte gezeigt. Im Anschluss an diese 2 Zyklen folgt die Therapie der Standardgruppe.

Die Standardtherapie besteht aus 6 Therapieblöcken Chemotherapie. Nach 4 oder 6 Zyklen erfolgt, je nach Resektabilität des Tumors, eine zweite Operation, bei der die subtotale Entfernung des Primärtumors angestrebt wird. Es schließt sich eine Hochdosisbehandlung mit Stammzellsupport an. Hierbei werden zu Beginn der Therapie, nach Stimulation mit G-CSF, Stammzellen aus dem peripheren Blut des Patienten gewonnen. Die CD³⁴⁺-hämatopoetischen Stammzellen werden mittels „Magnet Activated Cell Sorting“ (MACS) angereichert und mit Hilfe von Immunfluoreszenz (Nachweis des Gangliosides G_{D2} mit entsprechenden Antikörpern) und RT-PCR (Nachweis von Tyrosinhydroxylase) auf Kontamination durch Neuroblastomzellen überprüft [167]. Bei vorhandenen aktiven Knochenmetastasen wird eine Isotopentherapie mit [¹³¹I] mIBG durchgeführt. Es folgt eine myeloablative Chemotherapie, bei der die individuelle Höchstdosis an Zytostatika verabreicht wird, mit anschließender autologer Stammzelltransplantation. Eventuell schließt sich eine Radiotherapie des Primärtumors an. Nach Abschluss der Hochdosistherapie erhalten alle

Hochrisikopatienten eine Therapie mit 13-cis-Retinsäure, nach dem Schema, das bereits bei den Standardrisikopatienten beschrieben wurde.

Vielversprechend ist zur Zeit auch eine ergänzende Therapie mit chimären monoklonalen GD₂-Antikörpern (ch14.18), die im Anschluss einer Behandlung nach dem NB04-Protokoll durchgeführt werden kann. Handgretinger et. al konnten nachweisen, dass es durch eine Therapie mit GD₂-Antikörpern zu einem guten Tumoransprechen kam [108]. Vorläufige Studien bezüglich des Gesamtüberlebens zeigten noch keine signifikanten Effekte [246,247].

Das gegenwärtige Spektrum der in der Neuroblastomtherapie angewandten Zytostatika beinhaltet Adriamycin, Carboplatin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Dacarbazin, Etoposid, Ifosfamid, Melphalan, Topotecan, Vincristin und Vindesin. Die unspezifische Aufnahme in Zellen ist all diesen Zytostatika gemeinsam. Im Wesentlichen besteht die Wirkung darin, dass sich Tumorzellen in der Regel schneller teilen und deshalb durch Hemmstoffe der Mitose, RNA-, oder Proteinsynthese bzw. alkylierende Agenzien stärker geschädigt werden als normale Körperzellen.

1.5.7 Prognosefaktoren und Prognosen

Die Prognose des Neuroblastoms ist im Einzelnen sehr unterschiedlich und von verschiedenen Faktoren abhängig, die in Tab. 5 aufgeführt sind. Nachfolgend sind jedoch nicht alle bekannten Prognosefaktoren des Neuroblastoms aufgelistet, sondern nur die Wichtigsten und am häufigsten genutzten.

Außer den Prognosefaktoren der Tab. 5 (S. 28) gibt es noch zahlreiche weitere molekulargenetische Marker, z.B. Aberration der Chromosomen 3p und 11q sowie Ploidie und Expression des Adhäsionsmoleküls CD⁴⁴. Doch erst eine komplexe Microarray-Technologie wird zeigen, welche dieser Marker oder Markerkombinationen die beste Risikoabschätzung erlauben [245].

Tab. 5: Prognosefaktoren des Neuroblastoms.

Prognosefaktoren		Günstige Prognose	Ungünstige Prognose	Literatur
Klinisch	Alter bei Diagnose	< 1,5 Jahre	> 1,5 Jahre	Sano (2006) [227]
	Resektabilität	ja	nein	NB (1997, 2004) [80,81]
	Lokalisation	Außerhalb des NNMs	im NNM	NB (1997, 2004) [80,81]
	Symptome bei Diagnose	keine	vorhanden	NB (1997, 2004) [80,81]
	INSS	I, II, IVs	III, IV	Evans (1971) [68], Brodeur (1993) [34]
Histologisch	INPC	Gangli-neurom	undifferenziertes Neuroblastom	Shimada (1984, 1999) [240,241], Sano (2006) [227]
	KMI	< 5%	> 5%	Sano (2006) [227]
Laborchemisch	Ferritin	< 142 ng/ml	> 142 ng/ml	Evans (1987) [67]
	LDH	< 1500 U/l	> 1500 U/l	Evans (1987) [67], Shuster (1992) [244]
	NSE	< 100 ng/ml	> 100 ng/ml	Zeltzer (1985) [300]
	VMA/HVA-Quotient	hoch	niedrig	Laug (1978) [158], Woods (1992) [292,293]
Molekulargenetisch	N-myc-Amplifizierung	keine	vorhanden	Brodeur (1984, 1997) [32,35], Christiansen (1995) [48], Matthay (2000) [183], Cohn (2000) [50], Iehara (2006) [125]
	1p-Deletion	< 5%	> 5%	Caron (1996) [43], Rubie (1997) [220], Maris (2000) [179], Hiyama (2001) [118], Simon (2004) [248]
	17q-Verlängerung	keine	vorhanden	Bown (1999) [29]
	Telomeraseaktivität¹	niedrig	hoch	Hiyama (1995-1999) [119-121], Reynolds (1997) [217], Poremba (1999, 2000) [212,213]
	TRK A Expression	hoch	niedrig	Nakagawara (1992, 1993) [194,195]
	MRP²	niedrig	hoch	Bradshaw (1998) [30], Vasudevan (2005) [284]

¹ Die Telomeraseaktivität steht in engem Zusammenhang mit der Fähigkeit einer Zelle zur unbegrenzten Replikation, da das Enzym den Telomerverlust bei jeder Zellteilung kompensieren kann.

² Eine erhöhte Expression des MRP (= Multidrug Resistance associated Protein) kann eine Resistenz gegenüber Zytostatika hervorrufen.

Die allgemeine Heilungsrate für das Neuroblastom liegt bei etwa 55%. Bei Säuglingen mit einem Neuroblastom im Stadium I, II und IVs ist die 3-Jahres-Überlebensrate mit 95% sehr gut [32]. Die größte Patientengruppe allerdings, nämlich Kinder über einem Jahr mit einem disseminierten Tumor im Stadium III oder IV, hat eine 3-Jahres-Überlebensrate von 25-50% bei einer einzigen Kopie des N-myc-Gens und von nur 5% bei einer N-myc-Amplifizierung.

Innerhalb des ersten Lebensjahres kommt es häufig auch zu klinisch nicht manifesten Neuroblastomen, die morphologisch echten Neuroblastomen entsprechen. Diese sogenannten Neuroblastoma in situ bilden sich entweder spurlos oder unter Ausbildung von Narben spontan zurück, oder es kommt zu einer Ausreifung in benigne Tumore, wie z.B. Neurofibrome oder Ganglioneurome [16,54,103,161]. Eine spontane Rückbildung tritt auch bei klinisch manifesten Neuroblastomen auf, v.a. im Stadium IVs, zum Teil aber auch in den Stadien I-III. Diese spontanen Regressionen lassen sich als späte embryonale Residuen erklären, die sich innerhalb des ersten Lebensjahres ausdifferenzieren [215].

1.6 MIBG-Szintigraphie

1.6.1 Grundlagen der Szintigraphie

Die Szintigraphie beruht auf einer Darstellung von Körpergewebe mittels radioaktiv markierten Substanzen. Diese Substanzen bestehen aus einem Trägerstoff, der von den zu detektierenden Zellen aufgenommen wird, und einer Markierung durch ein Radionuklid, das unter Abgabe von Energie (radioaktiver Strahlung) zu einem stabileren Nuklid zerfällt. Die abgegebene Strahlung kann mit Hilfe eines geeigneten Detektorsystems aufgezeichnet und von einem Computer in Bildmaterial umgewandelt werden. Zur Zeit werden dafür einfache statische Kameras, SPECT und PET verwendet.

In der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms und Phäochromozytoms kommt derzeit als Trägerstoff vorrangig MIBG zum Einsatz. Eine Markierung erfolgt vorzugsweise mit den radioaktiven Nukliden [¹²³I] und [¹³¹I]. Für die

Routinediagnostik stehen neuerdings aber auch FDG und FDA als Trägerstoffe für PET zur Diskussion, die mit dem radioaktiven Fluorisotop [^{18}F]-markiert werden können [47,126,172,198,200,205].

1.6.2 Entwicklungsgeschichte der mIBG-Szintigraphie

Erste Ansätze zur szintigraphischen Darstellung des NNMs mit mIBG stellten Wieland et al. 1979 nach 13-jähriger Entwicklungsarbeit vor [289]. 1980 testeten Wieland et al. erstmals [^{131}I] Iodbenzylguanidin als ortho-, para- und meta-Isomer zur Darstellung des NNMs bei Hunden [290]. Hierbei erwies sich das meta-Isomer wegen seiner größeren Resistenz gegen in vivo Dejodierung als vorteilhafter [263,289]. Unter der Annahme, dass mIBG auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu NA ähnlich wie Katecholamine aufgenommen wird, wurde [^{131}I] mIBG erstmals von Sisson et al. 1981 zur Darstellung eines Phäochromozytoms beim Menschen verwendet [249]. Treuner et al. und Kimmig et al. benutzten 1984 erstmals [^{131}I] mIBG in der Diagnostik des Neuroblastoms [145,266]. Shapiro et al. wiesen 1987 die Überlegenheit des [^{123}I] gegenüber dem [^{131}I] in der diagnostischen Szintigraphie nach [66,238], da [^{123}I] einen höheren Photonenanteil, keine β -Strahlungskomponente und mit 13,5h eine sehr viel kürzere HWZ hat. In der nuklearmedizinischen Therapie von Tumoren spielt [^{131}I] mIBG jedoch weiterhin eine Rolle.

1.6.3 Pharmakologie von mIBG

Die Aufnahme von mIBG in die Zellen erfolgt über zwei natrium-, temperatur- und energieabhängige, sättigbare Transportsysteme, die voneinander unabhängig sind. Während das eine System als NAT bekannt ist, ist noch nicht vollständig geklärt, ob das andere System die OCT bzw. EMT darstellen. Ob ein Transport über SERT stattfindet, ist in der Literatur ebenfalls umstritten [86,276]. Ein Transport über die DAT hingegen ist eher unwahrscheinlich [86].

Zu einem sehr geringen Prozentsatz erfolgt die Aufnahme von mIBG über ein nicht sättigbares, natriumunabhängiges System, bei dem es sich wahrscheinlich um einen einfachen Diffusionsprozess handelt [166,270]. 24h nach Applikation von radioaktiv markiertem mIBG werden in der Regel die Aufnahmen gemacht.

Die Elimination erfolgt überwiegend renal, kann jedoch auch zu einem geringen Anteil in sonstigen Ausscheidungsprodukten, wie Schweiß, Speichel und Fäces nachgewiesen werden [187,268]. Innerhalb der ersten 24h werden bis zu 55%, nach 4 Tagen 70-90% der verabreichten Radioaktivität ausgeschieden. Etwa 75-90% der ausgeschiedenen Substanzen ist unverändertes mIBG, während der Rest als m-Iodhippursäure, m-Iodbenzoesäure oder 4-hydroxy-3-Iodbenzylguanidin im Urin erscheint [175]. Laut Mangner et al. ist der Anteil des verstoffwechsellten mIBGs umso höher, je geringer die Ausscheiderate ist. Es besteht allerdings keine Korrelation zwischen dem Auftreten der Menge der mIBG Metabolite und der Tumorlokalisation bzw. dem Plasma- oder Urinkatecholaminspiegel.

Trotzdem ist mIBG ein relativ stabiles Agens, das im Organismus praktisch nicht metabolisiert wird. Denn durch das Fehlen der bei den Katecholaminen vorhandenen 3,4 Hydroxylgruppen (OH) bietet sich der COMT kein Angriffspunkt. Auch die MAO kann das mIBG wegen einer Mesomerie der Guaningruppe nicht abbauen [57,86,175].

Die Dosierung von radioaktiv markiertem mIBG ist gewichtsadaptiert und an die aktuellen Dosierungsrichtlinien der Pediatric Task Group der European Association of Nuclear Medicine (EANM) angelehnt [81,203,210].

An Nebenwirkungen von mIBG werden Tachykardien mit Palpitationen, vorübergehender Blutdruckanstieg [117,197], Übelkeit und Erbrechen [124], Mundtrockenheit [184], orale Mukositis und Sialadenitis [53,75], Diarrhöen, Bauchkrämpfe sowie vereinzelt allergische Reaktionen beobachtet [203]. Zu beachten ist darüber hinaus eine Aufnahme radioaktiven Iods in die Schilddrüse, der durch ausreichende Schilddrüsenblockade begegnet werden muss [282]. Bei der therapeutischen Anwendung von [¹³¹I] mIBG, mit einer HWZ von ca. 8 Tagen, besteht im Vergleich zur diagnostischen Anwendung

von [¹²³I] mIBG (HWZ = 13,5h) ein längerer Zellkontakt. Deshalb können zusätzlich zu den oben genannten Nebenwirkungen, insbesondere Blutbildveränderungen und Knochenmarktoxizität [18,51,73,250], Nephrotoxizität [149], Lebertoxizität [11,117] sowie Schilddrüsenschädigungen [92,282], v.a. Hypothyreosen, auftreten. Außerdem ist auf Grund der Strahlenexposition im Verlauf eine Entwicklung von Sekundärtumoren möglich [74,92,255].

MIBG geht zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ein [154,203,249], die in der Regel die Aufnahme von mIBG in Tumorzellen vermindern. Die meisten dieser Medikamente kommen in der Pädiatrie jedoch selten zur Anwendung (z.B. ACE-Hemmer, Calciumkanalblocker, Reserpin oder trizyklische Antidepressiva wie Desipramin). Von Bedeutung in der Pädiatrie sind vor allem Sympathomimetika, wie z.B. Fenoterol, Salbutamol und Xylometazolin-haltige Nasentropfen, die mindestens 2 Wochen vor der mIBG-Applikation abgesetzt werden müssen.

1.6.4 Klinische Anwendung von mIBG in Diagnostik und Therapie

Die [¹²³I] mIBG-Szintigraphie ist heute eine tragende Säule in der Diagnostik des Neuroblastoms und anderer endokriner Tumoren wie dem Phäochromozytom, der MEN 2a/b, dem medullären Schilddrüsenkarzinom und dem Karzinoidtumor [207,270]. Bei klinischem Tumorverdacht kann sie einen wesentlichen Beitrag zur Diagnosesicherung und zum Ausmaß der Tumorausdehnung bzw. der Metastasierung leisten. Die [¹²³I] mIBG Szintigraphie erlaubt im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren eine Aussage über die Vitalität einzelner Läsionen und ermöglicht dadurch auch eine Beurteilung des Therapieerfolges.

Bei Kenntnis des Aufnahmemusters in nicht-tumorale Zellen beträgt die Spezifität von mIBG im Nachweis primärer und sekundärer Neuroblastomherde nahezu 100%, während die Sensitivität bezogen auf einzelne Herde bei

80-90% und hinsichtlich eines korrekten Stagings bei 90-95% liegt [79,169,170,273].

Therapeutisch wird das [¹³¹I] markierte mIBG verwendet. Es wird v.a. in der Therapie des Neuroblastoms bei nicht operablen Tumoren sowie bei einer großen metastatischen Ausbreitung verwendet. Die initiale Ansprechrate liegt bei 35%, während eine Verbesserung der kumulativen Überlebenszeit von 20% möglich ist [20].

Während die [¹³¹I] mIBG-Therapie beim Neuroblastom prinzipiell der Versuch eines kurativen Ansatzes ist, wird die Behandlung bei anderen Tumoren nicht kurativ ausgelegt. Mit der palliativen [¹³¹I] mIBG-Therapie kann man beim Phäochromozytom bzw. Paragangliom eine bis zu 76%-ige Verbesserung der Lebensqualität und Symptomatik erreichen [271,273], auch wenn die initiale Ansprechrate nur 30% beträgt. Beim medullären Schilddrüsenkarzinom ist sogar eine partielle Remission von bis zu 80% möglich [272]. Beim Karzinoid liegt die initiale Ansprechrate zwar bei 60%, ein palliativer Effekt kann allerdings maximal für 8 Monate erzielt werden [258], da die Aufnahme in den Tumor relativ gering ist.

Als Nachteil der mIBG-Diagnostik und -Therapie gilt insbesondere die physiologische Aufnahme der radioaktiv markierten Substanz in Leber, Herz, Speicheldrüsen, Lunge, Niere, Harnblase, Darm, NNM, Milz und Skelettmuskulatur [26,79,207,267,268,270]. Daraus ergeben sich auch die Nebenwirkungen der mIBG-Diagnostik und -Therapie, die unter 1.6.3 (S. 30-32) beschrieben sind, und eine verminderte diagnostische Spezifität.

Weitere Nachteile der diagnostischen Anwendung von mIBG sind v.a. eine relativ lange Untersuchungsdauer und eine schlechte Ortsauflösung, die jedoch durch SPECT-Aufnahmen steigerungsfähig ist. Bei der SPECT-Szintigraphie wird im Vergleich zur planaren eine größere Anzahl an Läsionen entdeckt und hat eine um fast 10% gesteigerte Sensitivität. Mit dem SPECT-Verfahren sind somit bei Patienten mit „minimal residual disease“ Rezidive eher erkennbar [221].

2 MATERIALIEN

2.1 Verbrauchsmaterialien

Ein Verzeichnis der aufgelisteten Firmen ist unter 8.2 (S. 231) aufgeführt.

Material	Firma
Combitips 0,5ml und 12,5ml und 50ml	Eppendorf
Eppendorfcups 1,5ml und 2,0ml	Eppendorf
Einmalspritzen 20ml und 60ml	Braun
Gewebezellkulturflaschen 750ml	Costar, Greiner
Glaspipetten 2ml, 5ml, 10ml und 25ml	Costar
Kryoröhrchen 2ml	Greiner
Pasteurpipetten 230mm	WU
Pipettenspitzen 200µl und 1000µl	Eppendorf, Sarsted
Sterilfilter NML 0,2µm Porengröße	Sartorius
Szintillationsfläschchen 20ml	PerkinElmer
Transwell Clear Membraneinsätze 0,4µm und 3,0µm Porengröße	Corning
6-Wellplatten	Falcon
Zentrifugenröhrchen 15ml und 50ml	Greiner, Falcon

Nicht einzeln gelistet wurden:

Spatel, Pinzette, Zeituhr, Zentrifugenständer, Handschuhe.

2.2 Geräte und Messapparaturen

Gerät	Firma
Brutschrank - Hera cell - CO ₂ Auto Zero	Heraeus
Dispenser 5ml	Brand
Mikroskop (Cx 40)	Olympus
Milli-Q	Millipore

Neubauer Zählkammer	Assistant
pH-Meter (pH-535 multi Cal)	WTW
Phasenkontrastmikroskop (Wilcovert)	Will
Pipettierhilfe	Eppendorf, Gilson
Repipettierhilfe	Eppendorf
Sterile Werkbank (Hera safe)	Heraeus
β-Counter (Tri Carb 2900 TR)	Canberra-Packard
γ-Counter (LB 2111)	Berthold
Vortex	Heidolph
Waage (AC 210 S)	Sartorius
Wasserbad	Köttermann, Memmert
Zentrifugen	
- Rotixa 50 Rs	- Hettich
- Varifuge 3.2 Rs	- Hereaus

2.3 Reagenzien

2.3.1 Zellkulturmedien

Kulturmedien	Firma
D-MEM Medium 500ml (+ 1000 mg/l Glucose, L-Glutamin, Pyruvat)	GIBCO
VLE RPMI 1640 Medium 500ml (w 2.0 g/l NaHCO ₃ , w/o L-Glutamin)	Biochrom

2.3.2 Radioaktive Chemikalien

Substanz	Firma
7,8-[³ H] Dopamin in 250μl: 250μCi; 6,1x10 ⁻⁹ Mole [³ H] DA spez. Aktivität: 41 Ci/mmol (= 1520 GBq/mmol)	Amersham
7,8-[³ H] Noradrenalin in 250μl: 250μCi; 2,1x10 ⁻⁸ Mole [³ H] NA spez. Aktivität: 12 Ci/mmol (= 444 GBq/mmol)	Amersham

[¹³¹I] m-Iodbenzylguanidin
(*Aliquot aus klinischer Therapie*)

Amersham

2.3.3 Chemikalien

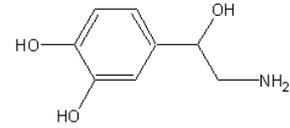
Substanz	Firma
L-Ascorbinsäure	Sigma
Corticosteron	Sigma
Desipramin	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dopamin (DA)	Sigma
Ecolume	ICN
6-Fluordopamin (6-FDA)	Institut für Org. Chemie der Universität Tübingen [237]
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
GBR-12909	Sigma
D(+)-Glucose	Sigma
L-Glutamin (200mM)	Biochrom
meta-Iodbenzylguanidin (mIBG)	Sigma
Natriumascorbat	Sigma
Noradrenalin (NA)	Sigma
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10000U/10000µg/ml)	Biochrom
Pferdeserum (HS)	Invitrogen
Phosphatgepufferte Saline - mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS ⁺⁺) - ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS)	GIBCO
Salzsäure (HCl)	Merck
Triton-X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA (0.05%/0.02% v/v)	Biochrom

2.3.4 Chemische Struktur der wichtigsten Chemikalien

Noradrenalin:

IUPAC-Nomenklatur: 4-(2-Amino-1-hydroxyethyl)-benzene-1,2-diol

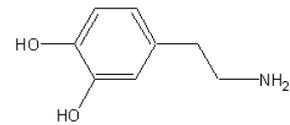
Summenformel: $C_8H_{11}NO_3$
Molekulargewicht: 169,2 g/mol



Dopamin:

IUPAC-Nomenklatur: 4-(2-Aminoethyl)-benzene-1,2-diol

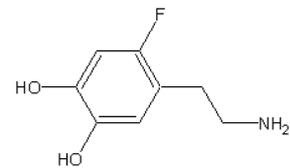
Summenformel: $C_8H_{10}NO_2$
Molekulargewicht: 189,64 g/mol



6-Fluordopamin:

IUPAC-Nomenklatur: 4-(2-Aminoethyl)-5-fluorobenzene-1,2-diol

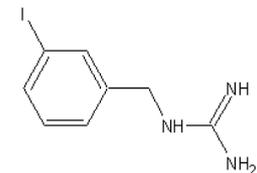
Summenformel: $C_8H_{10}NO_2F$
Molekulargewicht: 252 g/mol



meta-Iodbenzylguanidin:

IUPAC-Nomenklatur: 2-[(3-iodphenyl)-methyl]-guanidine

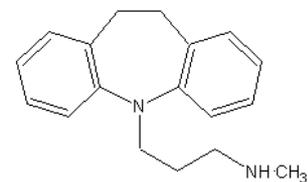
Summenformel: $C_8H_{10}N_3I$
Molekulargewicht: 324,1 g/mol



Desipramin:

IUPAC-Nomenklatur: 5-(3-Methylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepin

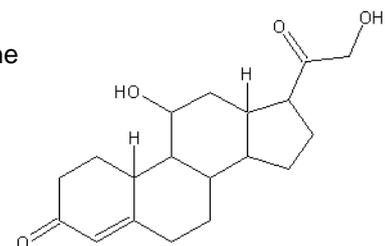
Summenformel: $C_{18}H_{22}N_2$
Molekulargewicht: 302,8 g/mol



Corticosteron:

IUPAC-Nomenklatur: 11 β ,21-Dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione

Summenformel: $C_{21}H_{30}O_4$
Molekulargewicht: 346 g/mol



2.4 Herstellung gebrauchsfertiger Lösungen

2.4.1 Zellkulturmedien

Tab. 6: Herstellung der Zellkulturmedien.

Zelllinie	SK-N-SH	CAKI	PC 12	EMT	OCT 1	OCT 2
Wachstums- medium	500ml VLE RPMI 1640 + 50ml inakt. ¹ FCS (= 10% (v/v)) + 5ml P/S (= 1% (v/v)) (= 500U/500µg) + 5ml Glutamin (= 1% (v/v)) (= 20mM)		500ml VLE RPMI 1640 + 25ml inakt. ¹ FCS (= 5% (v/v)) + 50ml inakt. ¹ HS (= 10% (v/v)) + 5ml P/S (= 1% (v/v)) (= 500U/500µg) + 5ml Glutamin (= 1% (v/v)) (= 20mM)			500ml D-MEM + 50ml inakt. ¹ FCS (= 10% (v/v)) + 5ml P/S (= 1% (v/v)) (= 500U/500µg)
Einfrier- medium	80% (v/v) des jeweiligen Wachstumsmediums 10% (v/v) inakt. ¹ FCS 10% (v/v) DMSO					

¹ Das fötale Kälberserum (FCS) und das Pferdeserum (HS) wurden zuvor 30 min im Wasserbad bei 56°C inaktiviert.

2.4.2 Inkubationspuffer

Der Inkubationspuffer ist eine Mischung aus 98% (v/v) PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucoselösung und 1% (v/v) Ascorbinsäurelösung. Die Zusammensetzung von PBS nach Dulbecco ist in nachfolgender Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Zusammensetzung von PBS nach Dulbecco.

Substanz	CaCl ₂ ·2H ₂ O	KCl	KH ₂ PO ₄	MgCl ₂ ·2H ₂ O	NaCl	Na ₂ HPO ₄
Konzentration (mmol/l)	0,90	2,68	1,67	0,76	136,89	8,10

Für die Glucoselösung mit einer Endkonzentration (f.c.) von 1 g/l wurde zunächst 1g Glucose in 10ml PBS⁺⁺ aufgelöst und durch einen Sterilfilter mit der Porengröße 0,2µm unter der Sterilbank filtriert. Von dieser Lösung wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen 5ml in eine 500ml Flasche PBS⁺⁺ pipettiert. Dieses Gemisch kann nun für mehrere Tage bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Für die Ascorbinsäurelösung wurden 29,2mg von der freien Ascorbinsäure bzw. 32,8mg vom Natriumascorbat in jeweils 36ml Aqua bidest (ddH₂O) gelöst und in Aliquote von ca. 2ml in Eppendorfcups bei -20°C eingefroren. Am Versuchstag wurde dann entweder 1% (v/v) der freien Ascorbinsäure oder des Natriumascorbats (siehe 5.1.1, S. 157-159) zu der PBS⁺⁺-Glucose-Mischung dazugegeben. In diesem Gemisch lag die f.c. der Ascorbinsäurelösung daher bei $4,6 \times 10^{-5}$ mol/l.

2.4.3 Verdünnungsreihe der Inhibitoren

Die Herstellung der Konzentrationsreihe erfolgte ausgehend vom Lyophilisat der jeweiligen Substanz, wobei zunächst aus der eingewogenen Substanz eine Stammlösung erstellt wurde. Die eingewogenen Massen der Hemmstoffe sowie das Lösungsmedium sind in nachfolgender Tab. 8 dargestellt.

Die Lösung und Verdünnung der Substanzen erfolgte außer bei 6-FDA und Corticosteron in Aqua bidest (ddH₂O). Da 6-FDA im saueren Milieu stabiler ist und nicht so schnell oxidiert [237], wurde es in 0,01 M HCl gelöst und verdünnt. Aus Vorversuchen war bekannt, dass bei Zugabe dieser HCl-Konzentration zum Inkubationspuffer, auf Grund seiner Pufferwirkung, kein inhibitorischer Effekt auf die Zellen zu erwarten war. Deshalb wurde eine Kontrolle mit HCl in den entsprechenden Versuchen nicht durchgeführt.

Das Lyophilisat von Corticosteron wurde ebenfalls nicht in ddH₂O, sondern in DMSO gelöst, da es sich in diesem Lösungsmittel besser löste. Allerdings erfolgte die Verdünnung mit ddH₂O, um die Konzentration des zelltoxischen DMSO möglichst gering zu halten. In den jeweiligen Versuchen wurde

dementsprechend als Kontrolle die höchste verwendete DMSO-Konzentrationen (1,2%) mitgeführt, um einen Einfluss auf die Aufnahme von Katecholaminen bzw. mIBG festzustellen bzw. auszuschließen.

Tab. 8: Herstellung der Stammlösungen.

Substanz	Masse¹	gelöst in	Konzentration der Stammlösung (mol/l)
Corticosteron	17,4mg	0,6ml DMSO + 0,4ml ddH ₂ O	50×10^{-3} mol/l
Desipramin	3,0mg	1ml ddH ₂ O	100×10^{-4} mol/l
mIBG	1,6mg	1ml ddH ₂ O	50×10^{-4} mol/l
6-FDA	3,2mg	5ml 0,01 M HCl	50×10^{-4} mol/l
GBR-12909	2,6mg	10ml ddH ₂ O	50×10^{-5} mol/l

¹ Die Einwaage der benötigten Massen erfolgte jeweils mit der Sartorius Waage AC 210 S.

Zur Herstellung der entsprechenden gebrauchsfertigen Lösungen wurden die Stammlösungen mit ddH₂O bzw. HCl seriell in 5er oder 10er Schritten in einer Konzentrationsfolge vorverdünnt. Diese Vorverdünnungen wurden anschließend während der Versuche jeweils 1:50 durch den Inkubationspuffer weiter verdünnt. Dadurch ergaben sich die in folgender Tabelle aufgelisteten Endkonzentrationen der unterschiedlichen Inhibitoren im Reaktionsansatz.

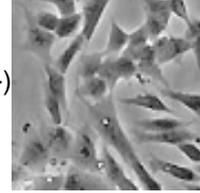
Tab. 9: Endkonzentrationen der unterschiedlichen Inhibitoren in 500µl Inkubationspuffer.

Corticosteron	Desipramin	mIBG	6-FDA	GBR-12909
1×10^{-3} mol/l	2×10^{-4} mol/l	5×10^{-5} mol/l	$2,5 \times 10^{-5}$ mol/l	1×10^{-5} mol/l
1×10^{-4} mol/l	1×10^{-4} mol/l	1×10^{-5} mol/l	5×10^{-6} mol/l	1×10^{-6} mol/l
1×10^{-5} mol/l	2×10^{-5} mol/l	5×10^{-6} mol/l	$2,5 \times 10^{-6}$ mol/l	1×10^{-7} mol/l
5×10^{-6} mol/l	1×10^{-5} mol/l	1×10^{-6} mol/l	5×10^{-7} mol/l	1×10^{-8} mol/l
1×10^{-6} mol/l	2×10^{-6} mol/l	5×10^{-7} mol/l	$2,5 \times 10^{-7}$ mol/l	1×10^{-9} mol/l
5×10^{-7} mol/l	1×10^{-6} mol/l			
1×10^{-7} mol/l	2×10^{-7} mol/l			
5×10^{-8} mol/l	1×10^{-7} mol/l			
1×10^{-8} mol/l	2×10^{-8} mol/l			

2.5 Zelllinien

SK-N-SH:

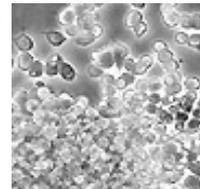
Charakteristik:	monoklonale Zellen eines differenzierten, heterogenen Neuroblastoms (human)
Eigenschaften:	Noradrenalintransporter (+++), Dopamintransporter (+)
Herkunft:	ATCC
Literatur:	u.a.: Biedler et al. (1973) [19], Seeger et al. (1977) [236], Lode et al. (1995) [166]



Die SK-N-SH-Zelllinie wurde für die Versuche ausgewählt, da sie ein differenziertes Neuroblastom darstellt, das auf seiner Zelloberfläche viele NAT exprimiert. Lode et al. konnten eine Genexpression von DAT oder SERT nicht nachweisen [166]. Eine Expression von DAT in sehr geringer Anzahl ist jedoch auf Grund der Heterogenität des Tumors nicht vollständig auszuschließen. In unserem Labor konnte, nach Suppressionsversuchen mit Zytostatika auf SK-N-SH-Zellen, fluoreszenzmikroskopisch ein schwaches Signal des DAT beobachtet werden (unveröffentlichte Ergebnisse von D. Ballweg).

PC 12 :

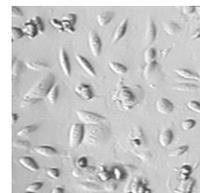
Charakteristik:	monoklonale Zellen eines Phäochromozytoms (Ratte)
Eigenschaften:	Noradrenalintransporter (+++), Dopamintransporter (++) , viele Speichervesikel
Herkunft:	ATCC
Literatur:	u.a.: Greene & Tischler (1976,1978) [94,262], Biocca et al. (1983) [21], Kadota (1996) [134]



Die PC 12-Zelllinie wurde für die Versuche ausgewählt, da sie, ähnlich wie normale Zellen des sympathischen Nervensystems, viele Speichervesikel besitzt und neuronale NAT exprimiert. In einem Subklon der PC 12-Zelllinie (PC 12h) konnte mittels RT-PCR auch eine nicht unerhebliche Expression an DAT nachgewiesen werden [134].

CAKI:

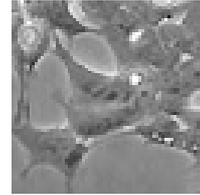
Charakteristik:	monoklonale Zellen eines Nierenkarzinoms (human)
Eigenschaften:	u.a. Extraneuronale Monoamintransporter
Herkunft:	ATCC
Literatur:	u.a.: Fogh et al. (1978) [70], Schömig et al (1990) [231,233]



Die CAKI-Zelllinie wurde für die Versuche ausgewählt, da sie v.a. EMT auf ihrer Oberfläche präsentiert [231,233]. CAKI-Zellen korrelieren in ihrem Aufnahmeverhalten sehr gut mit dem Verhalten der ausschließlich EMT-exprimierenden HEK 293-Zellen [100]. Im Gegensatz zu diesen Zellen wurden CAKI-Zellen jedoch nicht durch Transformation verändert.

EMT-exprimierende HEK 293 (EMT):

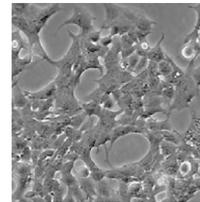
Charakteristik:	monoklonale, embryonale Nierenzellen (human) transformiert mit humanen EMT
Eigenschaften:	ausschließlich Extraneuronale Monoamintransporter
Herkunft:	Prof. Schömig, Inst. für Pharmakologie der Universität Heidelberg
Literatur:	u.a.: Gründemann et al. (1998) [100], Graham et al. (1977) [93], Bodary et al. (1990) [22]



Die EMT-exprimierende HEK 293-Zelllinie wurde für die Versuche ausgewählt, da sie nur EMT auf ihrer Oberfläche besitzt und dessen Eigenschaften somit am besten untersucht werden können. Vereinfacht wurden die Zellen im Folgenden als EMT-Zellen bezeichnet.

OCT 1-exprimierende HEK 293 (OCT 1):

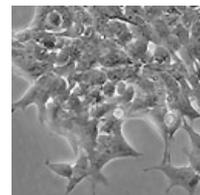
Charakteristik:	monoklonale, embryonale Nierenzellen (human) transformiert mit humanen OCT 1
Eigenschaften:	ausschließlich Organische Kationentransporter 1
Herkunft:	Prof. Schömig, Inst. für Pharmakologie der Universität Heidelberg
Literatur:	u.a.: Gründemann et al. (1994) [96], Martel et al. (1996) [181], Graham et al. (1977) [93], Bodary et al. (1990) [22]



Die OCT 1-exprimierende HEK 293-Zelllinie wurde für die Versuche ausgewählt, da sie nur den OCT 1 auf ihrer Oberfläche besitzt und dessen Eigenschaften somit am besten untersucht werden können. Vereinfacht wurden die Zellen im Folgenden als OCT 1-Zellen bezeichnet.

OCT 2-exprimierende HEK 293 (OCT 2):

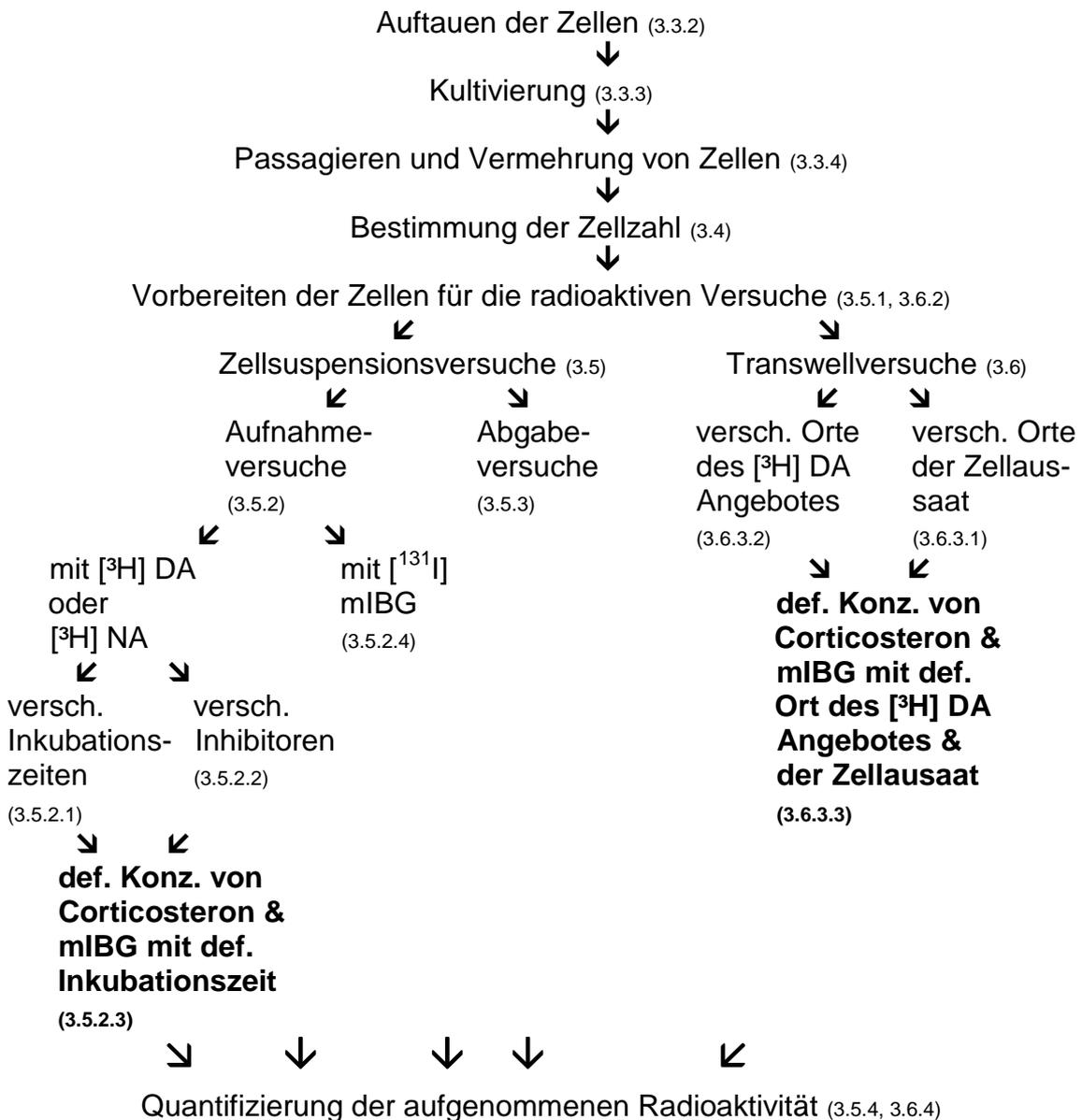
Charakteristik:	monoklonale, embryonale Nierenzellen (human) transformiert mit humanen OCT 2
Eigenschaften:	ausschließlich Organische Kationentransporter 2
Herkunft:	Prof. Schömig, Inst. für Pharmakologie der Universität Heidelberg
Literatur:	u.a.: Gründemann et al. (1998,1997) [95,98], Graham et al. (1977) [93], Bodary et al. (1990) [22]



Die OCT 2-exprimierende HEK 293-Zelllinie wurde für die Versuche ausgewählt, da sie nur den OCT 2 auf ihrer Oberfläche besitzt und dessen Eigenschaften somit am besten untersucht werden können. Vereinfacht wurden die Zellen im Folgenden als OCT 2-Zellen bezeichnet.

3 METHODEN

3.1 Übersicht über die Versuche



3.2 Bestimmung des pH-Wertes mit dem pH-Meter

Die Stabilität eines physiologischen pH-Wertes während der Versuche ist für die Funktionalität und Vitalität der Zellen essentiell. Der in dieser Arbeit verwendete

Inkubationspuffer besitzt keinen Farbindikator zur Erfassung eines pH-Abfalles. Deshalb sollte bei diesem Versuch dessen pH-Abfall im offenen System überprüft werden.

Der Inkubationspuffer wurde zunächst in einem 15ml-Röhrchen im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Dann wurde der pH-Wert des erwärmten Inkubationspuffers mit einem pH-Meter ohne Ascorbat gemessen. Die Messung des pH-Wertes erfolgte nach Zugabe von Natriumascorbat bzw. freier Ascorbinsäure erneut und stellte den Ausgangswert bei $t=0$ dar. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen ohne Verschluss in den Brutschrank gestellt und es wurde über einen Zeitraum von 240 min in regelmäßigen Abständen der pH-Wert gemessen. Vor Beginn der Messungen musste das pH-Meter anhand von Eichpuffern mit bekannten pH-Werten (pH 5, 7, 9) geeicht werden. Die Eichung war nur einmal vor der ersten Messung erforderlich, die Messelektrode sollte allerdings vor jeder pH-Messung mit destilliertem Wasser abgespült werden.

3.3 Arbeiten mit Zellkulturen

Allgemein muss beim Arbeiten mit Zellkulturen auf die Sterilität geachtet werden, um Bakterien-, Mykoplasmen- und Pilzkontaminationen zu verhindern. Deshalb wurden bei allen Arbeitsschritten, die unter der Sterilbank durchgeführt wurden, Einmalhandschuhe getragen. In regelmäßigen Abständen wurden mit 70%-iger Ethanollösung sowohl die Arbeitsfläche als auch die Handschuhe desinfiziert. Natürlich wurde nur mit steril verpackten Materialien gearbeitet. Ein weiterer Grundsatz beim Arbeiten mit Zellkulturen ist, dass alle zu den Zellen zugefügten Substanzen vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden müssen.

3.3.1 Einfrieren von Zellen

Zellen können durch Lagerung in flüssigem Stickstoff über Jahre hinweg konserviert werden. Dazu wurden die Zellen, wie in 3.3.3 (S. 45-46)

beschrieben, aus voll bewachsenen Kulturflaschen gelöst und bei 18°C mit 380G 5 min lang zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach Zelldichte in 1-3ml Einfriermedium suspendiert und je 1ml in ein Kryoröhrchen pipettiert. Das Einfrieren erforderte schnelles Arbeiten, um den Kontakt der Zellen mit dem zelltoxischen Detergens DMSO vor dem Einfrieren möglichst kurz zu halten. Um eine langsame Verringerung der Temperatur zu ermöglichen und somit die Bildung von Kristallen zu vermeiden, wurden die Röhrchen zunächst bei -80°C gelagert, wo sie bis zu 3 Monate verbleiben konnten. Allerdings war es möglich, die Kryoröhrchen schon nach etwa 12-16h in den flüssigen Stickstoff zu überführen.

3.3.2 Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad nahezu vollständig aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die 1ml Zellsuspension des Kryoröhrchens wurde sofort in 10ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und vermischt, um die Konzentration des zum Einfrieren verwendeten DMSO zu verdünnen. Dieses Gemisch wurde bei 18°C mit 380G 5 min lang zentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde in ca. 10ml Kulturmedium resuspendiert und schließlich in einer Zellkulturflasche ausgesät.

3.3.3 Kultivierung von Zellen

Die Zellsuspension wurde nach dem Auftauen oder nach dem Passagieren in eine 750ml-Gewebekulturflasche pipettiert und mit 35ml des entsprechenden Wachstumsmediums aufgefüllt. In diesem Wachstumsmedium waren, wie unter 2.4.1 beschrieben (S. 38), 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin enthalten, um ein Bakterienwachstum zu verhindern. Auch 1% (v/v) Glutamin und 10% (v/v) oder 15% (v/v) tierisches Serum waren dem Kulturmedium zugefügt, um eine

optimale Proliferation der Zellen in-vitro zu gewährleisten. Die Oberflächen der Kulturflaschen waren aus Polystyrol und deshalb gut geeignet, um adhären Zellen zur Anheftung zu dienen.

Nach dem Einsäen der Zellen wurden die Flaschen sofort in einen Brutschrank mit 37°C und 5%-igem CO₂ gelegt, wobei die Schraubverschlüsse der Flaschen leicht geöffnet wurden, um einen ungehinderten Gasaustausch zu gewährleisten. Um den initialen Anheftungsprozess nicht zu stören, sollten die Kulturen die ersten 24h nicht aus dem Brutschrank genommen werden. Der pH-Wert des Mediums konnte am Farbumschlag des Phenolrotindikators abgelesen werden. Eine Farbveränderung von rot zu gelb kommt durch die Metabolisierung von Glucose zu Laktat zustande und zeigt ein gutes Wachstum an. Nach 2-3 Tagen wurde das Wachstum der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft. In Tab. 10 sind die Wachstumsarten der verwendeten Zelllinien beschrieben (siehe auch S. 41-42).

Tab. 10: Wachstumsarten der Zelllinien.

Zelllinie	Wachstum
SK-N-SH	adhärent wachsende, kleine Zellen mit Ausläufern sowie größere, epitheloide Zellen.
PC 12	in Suspension wachsende, in Gruppen zusammen gelagerte, kugelige Zellen.
CAKI	adhärent wachsende, große, dicht aneinander liegende, epitheloide Zellen.
EMT-, OCT 1-, OCT 2-HEK 293	adhärent wachsende, in kleineren Grüppchen zusammen liegende, kleine Zellen mit kurzen Ausläufern.

3.3.4 Passagieren von Zellen

Sobald der Boden der Flasche dicht zugewachsen war, ohne dass sich die Zellen ablösten, erfolgte die Aufteilung (= Passage) der Zellen in neue Kulturflaschen. Die nicht adhären wachsenden PC 12-Zellen wurden nach dem Farbumschlag des Mediums passagiert. Vor dem Passagieren wurden die

Kulturflaschen nochmals unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt, um eine mikrobielle Kontamination auszuschließen. Da das Passagieren der verwendeten Zelllinien unterschiedlich erfolgte, werden die einzelnen Schritte bei den verschiedenen Zellen in Tab. 11 übersichtlich dargestellt.

Tab. 11: Arbeitsschritte beim Passagieren der verschiedenen Zelllinien.

Schritt	SK-N-SH	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2	PC 12
1	Vollständiges Absaugen des verbrauchten Mediums mit einer Vakuumpumpe ¹					—
2	Zugabe von 1,3ml Trypsin-EDTA-Lösung		Einfüllen von 10ml neuem Medium in die Kulturflasche			—
3	Einwirkzeit = 2-5 min		—			—
4	Beklopfen der Flasche					
5	Neutralisierung des Trypsins mit 8ml neuem Medium		—			—
6	Mehrmalige Resuspension mit einer 25ml Pipette					
7	Verteilen von jeweils 2ml in die neuen Kulturflaschen (= Passage von 1/5)		Verteilen von jeweils 0,5-1ml in die neuen Kulturflaschen (= Passage von 1/15-1/20)		Verteilen von jeweils 3,5ml in die neuen Kulturflaschen (= Passage von 1/10)	
8	Zugabe von 35ml neuem Medium in jede Flasche					
9²	ca. 5-7 d	ca. 2-3 d	ca. 2-3 d			ca. 5-7 d
10³	10x10 ⁶	6-7x10 ⁶	20x10 ⁶			35x10 ⁶

¹ je Zelllinie wurde ein extra Pasteurpipettenaufsatz verwendet, um eine Durchmischung der Zelllinien zu verhindern.

² Anzahl der Tage, bis eine neue Passage notwendig ist.

³ Anzahl an Zellen, die ungefähr in einer dicht bewachsenen 750ml-Kulturflasche enthalten sind.

3.4 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Um stets eine definierte Anzahl vitaler Zellen für die jeweiligen Versuche einsetzen zu können, wurde die Zellzahl vor jedem Versuch mit der Neubauer

Zählkammer bestimmt. War in der Zellsuspension eine Zellzahl über 1×10^6 zu erwarten, musste sie vorher mit Medium, mit einem Verdünnungsfaktor zwischen 3 und 6, vorverdünnt werden. Anschließend wurden 50 μ l Zellsuspension mit 50 μ l Trypanblau vermischt (Verdünnungsfaktor 2) und in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer pipettiert. Unter dem Mikroskop konnte bei einer 100-fachen Vergrößerung jeweils die Zellzahl in allen 4 Quadranten meanderförmig ausgezählt werden. Die Multiplikation des berechneten Mittelwertes der Zellzahlen der 4 Quadranten mit 10^4 und den jeweiligen Verdünnungsfaktoren ergab die Anzahl der vitalen Zellen pro 1ml Zellsuspension.

Durch Verlust der Membranintegrität ließen sich tote Zellen durch Trypanblau anfärben. Es sollten nicht mehr als 1-2% avitale Zellen pro Versuch vorhanden sein.

3.5 Untersuchungen von Zellsuspensionen im Zentrifugenröhrchen

3.5.1 Vorbereitung von Zellen für die radioaktiven Aufnahmeversuche

War eine für einen Versuch geeignete Anzahl an Kulturflaschen dicht bewachsen, so konnten die Zellen in 50ml-Röhrchen gesammelt werden. Um die Zellen aus den Kulturflaschen zu lösen, mussten die Arbeitsschritte 1-6 aus Tab. 11 (S. 47) durchgeführt werden. Pro 50ml-Röhrchen wurden die Zellsuspensionen von 2-4 Kulturflaschen einer Zelllinie gesammelt. Die Röhrchen wurden anschließend bei 18°C mit 380G 5 m in lang zentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt.

Das verbliebene Zellpellet wurde mit vorgewärmtem Inkubationspuffer (= 98% (v/v) PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucose, 1% (v/v) Ascorbinsäure) gut resuspendiert. Die Menge an Inkubationspuffer, die dazugegeben werden musste, ergab sich aus der Anzahl der für den jeweiligen Versuch benötigten

Zentrifugenröhrchen. Pro 15ml-Röhrchen, die für die Aufnahmeversuche verwendet wurden, war eine Menge von 0,5ml des Puffers notwendig. Bei einer Anzahl von z.B. 16 Versuchsröhrchen mussten deshalb mindestens 8ml Inkubationspuffer zum Zellpellet hinzugefügt werden.

Wie unter 3.4 (S. 47-48) beschrieben, erfolgte mit einer kleinen Menge Zellsuspension die Bestimmung der Zellzahl. Anschließend wurde durch Zugabe von Inkubationspuffer die Zellzahl auf 4×10^6 Zellen pro 1ml Inkubationspuffer eingestellt. Mit einer Repipettierhilfe wurden genau 0,5ml des Zellinkubationspuffer-Gemisches in jedes 15ml-Versuchsröhrchen pipettiert, so dass in jedem Reaktionsansatz 2×10^6 Zellen zur Verfügung standen.

3.5.2 Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen in SK-N-SH-, PC 12- und CAKI-Zellen sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Parameter

In den folgenden Versuchen, die unter 3.5.2.1 - 3.5.2.5 (S. 50-53) genauer beschrieben sind, wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Aufnahme von [^{131}I] mIBG, [^3H] DA oder [^3H] NA in SK-N-SH-, CAKI-, PC 12-Zellen sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen untersucht.

Bei diesen Untersuchungen sollte pro Reaktionsansatz eine f.c. von 1×10^{-7} mol/l der radioaktiv markierten Katecholamine bzw. des mIBGs eingesetzt werden. Dafür wurde eine unmarkierte Lösung der Substanzen mit einer f.c. von 1×10^{-7} mol/l erstellt. Durch Zugabe einer geringen Menge an Radioaktivität änderte sich die f.c. nur unwesentlich, da die Molzahl der radioaktiv markierten Substanz bis zu 20x kleiner war als die Molzahl der unmarkierten Substanz. Dies war abhängig, in welchem Verhältnis radioaktiv markierte zu unmarkierter Substanz eingesetzt wurde, und welche Substanz verwendet wurde.

Die Arbeitsschritte aller radioaktiven Aufnahmeversuche mit Zellsuspensionen im Zentrifugenröhrchen sind tabellarisch (Tab. 12, S. 50) zusammengefasst.

Tab. 12: Versuchsprotokoll für die Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen (f.c. $\approx 1 \times 10^7$ mol/l) in Zellsuspensionen im Zentrifugenröhrchen.

Schritt	Vorgehen			
	Versuch 3.5.2.5	Versuch 3.5.2.2 & 3.5.2.3	Versuch 3.5.2.1	Versuch 3.5.2.4
1	Vorbereiten der Zellen für die radioaktiven Versuche (3.5.1, S. 48)			
2	Versuchsröhrchen mit geöffnetem Deckel mit je 2×10^6 Zellen pro 500 μ l Puffer in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad stellen (CO ₂ = 0,03%)			
3	Zugabe von 10 μ l Corticosteron	Zugabe von jeweils 10 μ l unterschiedlicher Konzentrationen eines Inhibitors	Zugabe von 10 μ l 10^{-5} M mIBG in die Hälfte aller Röhrchen	Zugabe von 10 μ l 10^{-4} M Corticosteron in die Hälfte aller Röhrchen
4	Zugabe von 10 μ l [³ H] DA	Zugabe von 10 μ l [³ H] DA/[³ H] NA	Nach 0, 15, 20, 25 min Zugabe von 10 μ l [³ H] DA/[³ H] NA	Zugabe von 10 μ l [¹³¹ I] mIBG
5	Kurzes und sehr vorsichtiges Vortexen der Versuchsröhrchen zur besseren Durchmischung der Zellsuspension			
6	Nach 15 min Zugabe von 10ml eisgekühltem PBS in alle Röhrchen		Nach 30 min Abstoppen der Inkorporation durch Zugabe von 10ml eisgekühltem PBS in alle Röhrchen	
7	5 min Zentrifugation (4°C, 488G)			
8	Abkippen des radioaktiven Überstandes			
9	Erneute Zugabe von 10ml eiskaltem PBS in alle Röhrchen			
10	Schritte 7-8 wiederholen			
11	Vorsichtiges Abpipettieren des verbliebenen radioaktiven Überstandes			
12	Quantifizierung von [³ H]-markierten Substanzen (3.5.4.1, Tab. 14, S. 56)			Quantifizierung von [¹³¹ I] mIBG (S. 57)
13	Entsorgung der radioaktiven Abfälle			

3.5.2.1 Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA in Abhängigkeit verschiedener Inkubationszeiten in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG

In Abwesenheit des Inhibitors mIBG sollte bei diesem Versuch die Abhängigkeit der radioaktiven Aufnahme von der Inkubationszeit untersucht werden, um eine

geeignete Inkubationszeit für die nachfolgenden Versuche zu finden. Im gleichen Versuch wurde mIBG im 100-fachen Überschuss (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Durch Inkubation der Zellen mit [^3H] Katecholaminen in Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors mIBG erwartete man im Vergleich zur Abwesenheit des Hemmstoffes eine Reduktion der aufgenommenen Menge an Radioaktivität pro Zeiteinheit. Die Hemmung der [^3H] Katecholaminaufnahme sollte somit ein indirekter Nachweis sein, in welchem Ausmaß der kompetitive Hemmstoff über die spezifischen Transporter aufgenommen wurde. Je stärker die radioaktive Aufnahme gehemmt wurde, desto besser war die Aufnahme von mIBG.

Zur Berechnung der Hemmwirkung von mIBG dienten die gemessenen Radioaktivitäten der einzelnen Zeitwerte in Abwesenheit des Inhibitors als 100%-Werte. Durch die Messung bei verschiedenen Zeiten konnte in diesem Versuch ebenfalls die Zeitabhängigkeit des Hemmeffektes von 10^{-5} M mIBG bzw. die indirekt ermittelte mIBG Aufnahme dargestellt werden.

Die praktische Durchführung der Versuche erfolgte wie in Tab. 12 (S. 50) beschrieben. Die radioaktive Aufnahme wurde jeweils nach 5, 10, 15 und 30 min gemessen.

3.5.2.2 Aufnahme von [^3H] DA oder [^3H] NA in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren

In diesen Untersuchungen ging es darum, den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von verschiedenen Inhibitoren auf die Aufnahme von [^3H] Katecholaminen in die Zellen der 6 verschiedenen Zelllinien zu erkennen. Die Versuche mit den „funktionellen“ Inhibitoren Corticosteron, Desipramin und GBR-12909 sollten zeigen, ob und welche Transporter der Katecholaminaufnahme diese Substanzen hemmen. Mit den kompetitiven Hemmstoffen mIBG und 6-FDA sollte deren Aufnahme indirekt über die verschiedenen Transporter in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen über den kompetitiven Hemmeffekt gezeigt werden. Es wurden unterschiedliche

Konzentrationen der Inhibitoren getestet (Tab. 9, S. 40), um eine Konzentration mit dem optimalen Hemmeffekt zu finden. Zur Berechnung des Hemmeffektes diente die radioaktive Aufnahme ohne Zugabe eines Inhibitors als 100%-Wert. Die Hemmstoffe wurden unmittelbar vor Zugabe der Radioaktivität zu den Zellsuspensionen gegeben. Die kompetitiven Inhibitoren mIBG und 6-FDA sowie Corticosteron, Desipramin und GBR-12909 sind sofort wirksam und benötigen keine Präinkubation. Versuche von Gründemann et al. zeigten, dass bei einer 30-minütigen Vorinkubation mit Corticosteron im Vergleich zur 1-minütigen Vorinkubation kein Unterschied im Inhibitoreffekt zu sehen war [95]. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Tab. 12 (S. 50) dargestellt.

3.5.2.3 Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10⁻⁵ M mIBG

Da neben mIBG auch Corticosteron eine wichtige Bedeutung in der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms bzw. Phäochromozytoms haben könnte, sollten die in den Screeningversuchen (3.5.2.2) gewonnenen Ergebnisse in weiteren Untersuchungen mit diesen beiden Inhibitoren in einer größeren Versuchsanzahl bestätigt werden. MIBG wurde verwendet, um über eine potentielle kompetitive Hemmung der [³H] DA bzw. [³H] NA Aufnahme indirekt zu demonstrieren, wie gut es selbst als radioaktiv markiertes mIBG von den Zellen aufgenommen wird. Corticosteron wurde verwendet, um zu untersuchen, ob diese Substanz die verschiedenen Katecholaminaufnahmesysteme selektiv hemmt, um damit eine bevorzugte [³H] DA, [³H] NA bzw. [¹³¹I] mIBG Aufnahme in Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomzellen zu erreichen. Dieser Versuch wurde nur mit SK-N-SH-, CAKI- und EMT-Zellen an drei verschiedenen Tagen mit jeweils unterschiedlichen Passagezahlen der jeweiligen Zelllinie wiederholt. Jeder Wert wurde dabei in einer Dreifachmessung bestimmt.

Für diesen Versuch sollten die Inhibitorkonzentrationen verwendet werden, die in den Vorversuchen einen optimalen Hemmeffekt zeigten. Als Inkubationszeit diente die Zeit, die bei den Screeningversuchen ermittelt wurde. Die praktische Durchführung dieser Untersuchungen erfolgte nach Tab. 12 (S. 50).

3.5.2.4 Aufnahme von [¹³¹I] mIBG in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10⁻⁴ M Corticosteron

Ziel dieser Versuche war es, das Ausmaß der [¹³¹I] mIBG Aufnahme in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l) direkt nachzuweisen, nachdem der indirekte Nachweis der mIBG Aufnahme über den kompetitiven Hemmeffekt von 10⁻⁵ M mIBG (100-facher molarer Überschuss) schon in den unter 3.5.2.2 und 3.5.2.3 (S. 51-52) beschriebenen Versuchen mit [³H] DA bzw. [³H] NA erfolgte. Für diese Untersuchungsreihe wurde [¹³¹I] mIBG benutzt, das aus Resten einer klinischen Neuroblastomtherapie stammte. Da [¹³¹I] markiertes mIBG nur einmal zur Verfügung stand, wurden bei den anderen Versuchen [³H]-markierte Katecholamine als Ersatzsubstrat verwendet.

Die einzelnen Arbeitsschritte der radioaktiven Aufnahmeversuche mit [¹³¹I] mIBG sind in Tab. 12 (S. 50) aufgelistet. Die praktische Durchführung der Versuche mit [¹³¹I] mIBG erfolgte dabei genauso wie die mit [³H] Katecholaminen, allerdings wurde im Gegensatz zu den [³H] Katecholaminaufnahmeversuchen eine Inkubationszeit von 30 min gewählt.

3.5.2.5 Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von gelöstem Corticosteron

Untersucht wurde die Lagerfähigkeit von gelöstem Corticosteron bei 4°C. Dabei sollte überprüft werden, ob die Lagerzeit bzw. die Konzentration des gelösten Corticosterons einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit des Inhibitors hat. Diese Untersuchungen erfolgten exemplarisch nur an EMT- und OCT 2-Zellen. Das praktische Vorgehen entspricht dem Versuchprotokoll der radioaktiven Aufnahmeversuche in Zellsuspensionen (Tab. 12, S. 50). Dabei wurden der einen Hälfte der Versuchsröhrchen Corticosteronlösungen in verschiedenen Konzentrationen angeboten, die am Versuchstag hergestellt wurden. Zur anderen Hälfte der Versuchsröhrchen wurden Corticosteronlösungen gegeben, die bei 4°C im Kühlschrank lichtgeschützt gelagert waren. Der Vergleich wurde mit 7 und 76 Tage gelagertem Corticosteron durchgeführt.

3.5.3 Abgabe von radioaktiv markierten Substanzen aus SK-N-SH-, PC 12- und CAKI-Zellen sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierenden HEK 293-Zellen in Zeitabhängigkeit in Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

Bei diesen Versuchen wurde untersucht, wie lange die Radioaktivität nach der Aufnahme von [³H] DA (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in den Zellen verbleibt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Anwesenheit der Inhibitoren mIBG (f.c. = 5x10⁻⁵ mol/l), 6-FDA (f.c. = 2,5x10⁻⁵ mol/l), Corticosteron (f.c. = 1x10⁻⁵ mol/l) und Desipramin (f.c. = 2x10⁻⁴ mol/l) die Abgabe oder eine Wiederaufnahme von freigesetztem und noch nicht metabolisiertem [³H] DA beeinflussen.

Die praktische Durchführung der Versuche ist im Versuchsprotokoll in Tab. 13 (S. 55) aufgeführt. Es erfolgte zunächst eine 15-minütige Inkubation bei 37°C mit 1x10⁻⁷ mol/l [³H] DA, bevor die Abgabe der Radioaktivität gemessen wurde. Die Messungen fanden 0, 30, 60 und 240 min nach Beendigung der Inkubation statt, wobei beim 60-min-Wert die radioaktive Abgabe sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren bestimmt wurde. Dabei wurden die Hemmstoffe sofort nach dem Inkubationsende in die entsprechenden Versuchsröhrchen pipettiert (Schritt 11, Tab. 13).

Die Radioaktivität, die gleich nach der 15-minütigen Inkubation in den Zellen nachgewiesen werden konnte, stellte den Ausgangswert t=0 dar, bei der noch keine Abgabe stattgefunden hat. Für die Berechnung der Abgabe nach den verschiedenen Zeiten wurde dieser Ausgangswert als 100%-Wert herangezogen und dazu die in den Zellen nach 30, 60 und 240 min gemessene Radioaktivität in Relation gesetzt. Subtrahierte man diesen Wert von 100%, so erhielt man den Wert, wie viel Prozent weniger radioaktiv markierter Substanzen im Vergleich zum Ausgangswert vorlagen, bzw. wie viel der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität bereits abgegeben wurde. Auch bei diesen Versuchen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tab. 13: Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Abgabe von Radioaktivität aus den Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit [^3H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l).

Schritt	Vorgehen
1	Vorbereiten der Zellen für die radioaktiven Versuche (3.5.1, S. 48)
2	Versuchsröhrchen mit geöffnetem Deckel mit je 2×10^6 Zellen pro 500 μl Puffer in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad stellen
3	Zugabe von 10 μl [^3H] DA in alle Versuchsröhrchen
4	Kurzes und sehr vorsichtiges Vortexen der Versuchsröhrchen zur besseren Durchmischung der Zellsuspension
5	Nach 15 min Inkubation Abstoppen der Inkorporation durch Zugabe von 10ml eisgekühltem PBS in alle Versuchsröhrchen
6	5 min Zentrifugation (4°C, 488G)
7	Abkippen des radioaktiven Überstandes
8	Erneute Zugabe von 10ml eiskaltem PBS in alle Röhrchen
9	Schritte 6-7 wiederholen
10	Vorsichtiges Abpipettieren des restlichen radioaktiven Überstandes
11	Zugabe von 10 μl der verschiedenen Inhibitoren in die entsprechenden Versuchsröhrchen
12	Zugabe von 500 μl erwärmten Inkubationspuffer in alle Röhrchen
13	5 min Zentrifugation (4°C, 488G) der entsprechenden Röhrchen nach 0, 30, 60 und 240 min
14	Abkippen des radioaktiven Überstandes
15	Vorsichtiges Abpipettieren des verbliebenen radioaktiven Überstandes
16	Quantifizierung der in den Zellen verbliebenen Radioaktivität (3.5.4.1)
17	Entsorgung der radioaktiven Abfälle

3.5.4 Quantifizierung der in den Zellen enthaltenen Radioaktivität

Bei jedem Versuch wurden 10 μl der jeweils verwendeten radioaktiven Substanz als Dreifachansatz gemessen. Diese Radioaktivität wurde entsprechend den Zellpelletansätzen in 500 μl 0,1%-iger Triton-X-100-Lösung gelöst (Schritt 1, Tab. 14, S. 56). Der Mittelwert dieser 3 cpm-Messungen wurde als 100%-Wert

verwendet, dessen Molzahl bekannt war. Die Molzahlen der anderen gemessenen cpm-Werte konnten über den Dreisatz errechnet werden.

3.5.4.1 Quantifizierung von [³H]-markierten Substanzen

Um die Menge der nach den entsprechenden Inkubationen in den Zellen vorhandenen [³H]-markierten Substanzen zu quantifizieren, wurde der β -Zerfall des Tritiums pro Minute (Δ cpm) im β -Counter indirekt über Photonen detektiert. Die Photonen entstanden durch eine Reaktion von β -Teilchen der radioaktiven Substanzen mit Partikeln der Szintillationsflüssigkeit.

Damit die intrazelluläre Radioaktivität mit der Szintillationsflüssigkeit in Kontakt treten konnte, mussten die Zellmembrane zerstört werden. Dies wurde durch Zugabe einer Triton-X-100-Lösung und das Vortexen erreicht. Vor der Messung sollten die Szintillationsfläschchen eine Nacht stehen gelassen werden, um Lumineszenz-Effekte abklingen zu lassen. Die einzelnen Schritte zur Vorbereitung der Zellen für die Messungen im β -Counter sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 14: Arbeitsschritte zur Quantifizierung der Radioaktivität.

Schritt	Vorgehen
1	Zugabe von 500 μ l 0,1%-iger Triton-X-100-Lösung zum Zellpellet (Fortführung des Schrittes 12 der Tab. 12 (S. 50) und 16 der Tab. 13 (S. 55))
2	Für ca. 10s kräftig vortexen
3	Ca. 1-2h stehen lassen
4	Nochmals für ca. 5s kräftig vortexen
5	450 μ l Zellsuspension pro Versuchsröhrchen in ein Szintillationsfläschchen pipettieren
6	Zugabe von 6ml Ecolume Szintillationsflüssigkeit
7	Szintillationsfläschchen gut schütteln
8	Über Nacht stehen lassen
9	Messen der in den Zellen vorhandenen Radioaktivität mittels β -Counter

3.5.4.2 Quantifizierung von [^{131}I] mIBG

[^{131}I] mIBG zerfällt unter Abgabe von γ -Strahlung, die direkt mit einem γ -Counter gemessen werden konnte. Dem Zellpellet musste deshalb keine Szintillationsflüssigkeit zugegeben werden. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Proben direkt in den γ -Counter gestellt und die aufgenommene Radioaktivität in cpm quantifiziert.

3.6 Untersuchungen im Transwellsystem

3.6.1 Idee zur Verwendung des Transwellsystems

Um die im Organismus bestehende direkte Konkurrenz zwischen den NAT- und evt. DAT-exprimierenden Neuroblastomzellen und den EMT-exprimierenden Zellen bezüglich der Aufnahme der [^3H] Katecholamine darzustellen, wurden einige Untersuchungen in einem Co-Kultursystem durchgeführt.



Abb. 4: Transwellsystem: (A) schematische Darstellung, (B) Fotografie der verschiedenen Transwellplatten, (C) einzelner Membraneinsatz (von www.corning.com).

Wie in Abb. 4A schematisch dargestellt ist, besteht das Transwellsystem aus einem oberen und einem unteren Kompartiment, die im gleichen Medium liegen. Über eine permeable, mikroporöse Membran stehen die beiden Kompartimente in Verbindung. Kultiviert man zwei verschiedene Zelllinien im Transwellsystem im gleichen Medium, so sollten sie exakt die gleichen Versuchsbedingungen haben, mit gleichen Einflüssen und einem ungehinderten Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten. Dieses experimentelle

Modell sollte realistischer die Konkurrenzbedingungen im menschlichen Körper darstellen als die getrennte Inkubation von 2 verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichen Reaktionsansätzen.

3.6.2 Kultivierung von Zellen im Transwellsystem – Vorbereitung für die radioaktiven Aufnahmeversuche

Für die Untersuchungen im Transwellsystem wurden neben den SK-N-SH-Zellen CAKI- und EMT-Zellen verwendet. Die PC 12-Zelllinie wurde auf Grund von Schwierigkeiten bei der praktischen Durchführung (siehe 5.2.1, S. 163-166) nur für die Versuche zur Optimierung der Kurzzeitinkubation im Transwellsystem verwendet, nicht jedoch für die Hauptversuche.

Nach dem Auftauen erfolgte die Kultivierung und das Passagieren der Zellen zunächst wie unter 3.3.3 und 3.3.4 (S. 45-47) beschrieben. Waren die für die jeweiligen Versuche benötigte Anzahl an Kulturflaschen dicht bewachsen, so konnten die Zellen, wie in den Schritten 1-6 der Tab. 11 (S. 47) aufgeführt, in 50ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt werden. Anschließend wurde die Zahl der vitalen Zellen mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und durch Zugabe der jeweiligen Zellkulturmedien (Tab. 6, S. 38) die Zellzahl auf 2×10^6 Zellen pro 1ml Medium eingestellt.

Für die Versuche wurden 6-Well-Transwellplatten der Firma Corning verwendet. Da die verschiedenen Zelllinien teilweise unterschiedliche Wachstumsmedien benötigten, erfolgte die Anzucht der Zellen im oberen und im unteren Kompartiment zunächst in getrennten Systemen. Dafür wurden die Membraneinsätze herausgenommen und in normale 6-Well-Platten eingesetzt. Mit einer Repipettierhilfe wurden 500 μ l der Zellsuspension auf jeden Boden der Transwellplatte bzw. auf jeden Membraneinsatz pipettiert, so dass in jedem Kompartiment 1×10^6 Zellen enthalten waren. Eine Ausnahme stellte allerdings die CAKI-Zelllinie dar. Da die CAKI-Zellen im Vergleich zu den anderen Zellen sehr groß sind, konnten pro Well bzw. Membran nur $0,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät werden, d.h. in diese Vertiefungen wurde nur 250 μ l Zellsuspension

pipettiert. Die Verteilung der verschiedenen Zelllinien in die Kompartimente ist bei den unterschiedlichen Untersuchungen verschieden und deshalb bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen in Abbildungen dargestellt. Jede Vertiefung wurde mit dem entsprechenden Kulturmedium aufgefüllt, so dass am Ende in jedem Well insgesamt 3ml Medium enthalten war.

Nach dem Befüllen der Vertiefungen wurden die Transwellplatten für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, damit die Zellen gut an der Boden- bzw. Membranoberfläche haften. Am Versuchstag, 3 Tage nach der Einsaat der Zellen in die Wellplatten, wurden die Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. War keine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen vorhanden, konnte das verbrauchte Medium vorsichtig mit einer Vakuumpumpe vollständig abgesaugt werden.

3.6.3 Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA in SK-N-SH- und PC 12-Zellen sowie EMT-exprimierende CAKI- und HEK 293-Zellen

Transwellplatten werden v.a. bei Langzeitinkubationen über mehrere Tage verwendet, weil dann ein guter Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten stattfinden kann. Da die Katecholamine bei 37°C relativ instabil sind, sollte für diese Versuche die Inkubationszeit jedoch nicht zu lang sein. Um eine geeignete Versuchsanordnung für die Kurzzeitinkubation im Transwellsystem zu finden, bei der ein ausreichender Stoffaustausch erfolgen konnte, wurden zunächst einige Vorversuche gemacht, deren Aufbau unter 3.6.3.1 - 3.6.3.2 (S. 61-62) beschrieben ist. Als Inkubationszeit wurde, statt der bei den Zellsuspensionsversuchen in den Zentrifugenröhrchen verwendeten 15-minütigen Inkubation, 30 min ausgewählt. Denn innerhalb dieser Zeit sollte ein ausreichender Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten stattgefunden haben und die noch nicht von den Zellen aufgenommenen [³H] Katecholamine sollten bis dahin stabil sein. Die praktische Durchführung aller Versuche im Transwellsystem ist annähernd gleich. Deshalb wurden die

Arbeitsschritte in Tab. 15 zusammengefasst und nur die Abweichungen der einzelnen Versuche näher beschrieben. Bei der Inkubation wurden den Zellen pro Well [^3H]-markierte Substanzen mit einer f.c. von ca. 1×10^{-7} mol/l angeboten.

Tab. 15: Versuchsprotokoll für die Aufnahme [^3H]-markierter Katecholamine (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in Zellen des Transwellsystems.

Schritt	Vorgehen		
	Versuch 3.6.3.1	Versuch 3.6.3.2	Versuche 3.6.3.3 & 3.6.3.4
1	Kultivierung der Zellen im Transwellsystem - Vorbereitung für die radioaktiven Aufnahmeversuche (3.6.2, S. 58-59)		
2	Zugabe von jeweils 2ml Inkubationspuffer ¹ in jedes Kompartiment einer Vertiefung (insg. 4ml pro Well)	Zugabe von jeweils 2ml bzw. 3ml Inkubationspuffer ¹ in jedes Kompartiment einer Vertiefung (insg. 4ml bzw. 6ml pro Well)	Zugabe von jeweils 3ml des entsprechenden Inkubationsgemisches ² in jedes Kompartiment einer Vertiefung (insg. 6ml pro Well)
3	Zugabe von jeweils 40 μl [^3H] DA in jedes Kompartiment einer Vertiefung (insg. 80 μl pro Well)	Zugabe von insg. 80 μl bzw. 120 μl [^3H] DA pro Well	—
4	Transwellplatten vorsichtig hin- und herbewegen		
5	Transwellplatten im Brutschrank (37°C, 0,5% CO ₂) inkubieren		
6	Nach 10 und 20 min Transwellplatten vorsichtig hin- und herbewegen		
7	Nach 30 min Membraneinsätze aus den Transwellplatten herausnehmen und in normale 6-Wellplatten stellen		
8	Vorsichtige Zugabe von 3ml eiskaltem PBS in jede Vertiefung		
9	Überstand aus Wells abkippen		
10	Schritte 8-9 zweimal wiederholen		
11	Abpipettieren des restlichen Überstandes		
12	Quantifizierung der aufgenommenen Radioaktivität (Tab. 18, S. 65)		

¹ Der Inkubationspuffer ist eine Mischung aus 98% (v/v) PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucoselösung und 1% (v/v) Ascorbinsäurelösung. Die Herstellung ist unter 2.4.2 (S. 38-39) beschrieben.

² Das Inkubationsgemisch ist eine Zusammensetzung aus Inkubationspuffer, [^3H] Katecholaminen, sowie den Inhibitoren Corticosteron oder mIBG. Die genaue Zusammensetzung der 3 verschiedenen Inkubationsgemische ist unter 3.6.3.3 in Tab. 17 (S. 64) aufgeführt.

3.6.3.1 Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA in Abhängigkeit vom Ort der Zellaussaat

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob der Ort der Zellaussaat (oberes oder unteres Kompartiment) einen Einfluss auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA hat. Dafür wurden $0,5 \times 10^6$ CAKI-Zellen und $1,0 \times 10^6$ PC 12-Zellen in die Kompartimente des Transwellsystems, wie in Abb. 5 dargestellt, ausgesät.

Die praktische Durchführung erfolgte nach dem Versuchsprotokoll der radioaktiven Aufnahme in Zellen des Transwellsystems (Tab. 15, S. 60). Dabei wurde $[^3\text{H}]$ DA zu gleichen Teilen in beiden Kompartimenten angeboten und Membraneinsätze mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ verwendet.



Abb. 5: Schema der Zellaussaat. PC = PC 12-Zellen.

3.6.3.2 Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA in Abhängigkeit vom Ort des Radioaktivitätsangebotes

In diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob der Ort des Radioaktivitätsangebotes einen Einfluss auf die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme hat. Dafür wurden sowohl im oberen als auch im unteren Kompartiment $0,5 \times 10^6$ bzw. $1,0 \times 10^6$ Zellen der gleichen Zelllinie ausgesät. Die Verteilung der Radioaktivität erfolgte nach dem Schema, das in Abb. 6 dargestellt ist.



Abb. 6: Verteilungsschema der Radioaktivität. $\text{DA}^* = [^3\text{H}]$ DA.

Dieser Versuch wurde 3 Mal mit verschiedenen Zelllinien nach dem Versuchsprotokoll in Tab. 15 (S. 60) durchgeführt. Bei jedem dieser 3 Versuche wurden Optimierungen vorgenommen, die in Tab. 16 aufgeführt sind. Die Veränderungen im Vergleich zum vorherigen Experiment sind gelb markiert.

Tab. 16: Optimierungsversuche.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Zelllinie	PC 12	CAKI	SK-N-SH
Membranporengröße	0,4µm	0,4µm	3,0µm
Löcher in der Seitenwand des Membraneinsatzes¹	Keine	10 pro Membraneinsatz	10 pro Membraneinsatz
Inkubationspuffer insgesamt pro Vertiefung	4ml	4ml	6ml
Radioaktivität insgesamt pro Vertiefung	80µl [³ H] DA	80µl [³ H] DA	120µl [³ H] DA

¹ In die Seitenwand des Membraneinsatzes (Abb. 4C, S. 57) wurden jeweils 10 Löcher mit einem Durchmesser von ca. 4mm unter sterilen Bedingungen gelötet. Dies soll einen schnelleren Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten ermöglichen. Gelbe Markierung = Veränderung im Vergleich zum Vorversuch.

3.6.3.3 Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10⁻⁵ M mlBG

Diese Versuche entsprechen vom Grundgedanken dem Hauptversuch der Zellsuspensionsversuche in den Zentrifugenröhrchen (3.5.2.3, S. 52). Mit der Durchführung im Transwellssystem sollten die Effekte, die bei den Untersuchungen in den Zentrifugenröhrchen gefunden wurden, unter im Organismus ähnlicheren Bedingungen verifiziert werden.

Die Durchführung der Versuche in Abwesenheit von Inhibitoren sollte zeigen, wieviel [³H] DA bzw. [³H] NA unter der Konkurrenzsituation in die verschiedenen Zellen aufgenommen wird. Um die Frage zu beantworten, ob durch eine selektive Hemmung der EMT eine vermehrte Anreicherung der [³H] Katecholamine in die Neuroblastomzellen erreicht werden kann, wurden zusätzliche Versuche in Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron durchgeführt.

Der kompetitive Inhibitor mIBG sollte indirekt über den Hemmeffekt die Aufnahme von mIBG in konkurrierende Zellen im Transwellssystem darstellen. Dafür wurde die Konzentration der Inhibitoren Corticosteron und mIBG benutzt, die in den Vorversuchen einen optimalen Hemmeffekt zeigten.

Die praktische Durchführung dieses Transwellversuches ist in Tab. 15 (S. 60) beschrieben und erfolgte unter Einbeziehung aller zuvor getesteten Optimierungen. Auch in den Hauptversuchen im Transwellssystem wurden nur SK-N-SH-, CAKI- und EMT-Zellen verwendet, die 3 Tage zuvor in die Kompartimente ausgesät wurden. Die Verteilung der Zelllinien in die Transwellplatten und das Pipettierschema für die verschiedenen Inkubationsgemische in die entsprechenden Wells sind in Abb. 7 schematisch dargestellt.

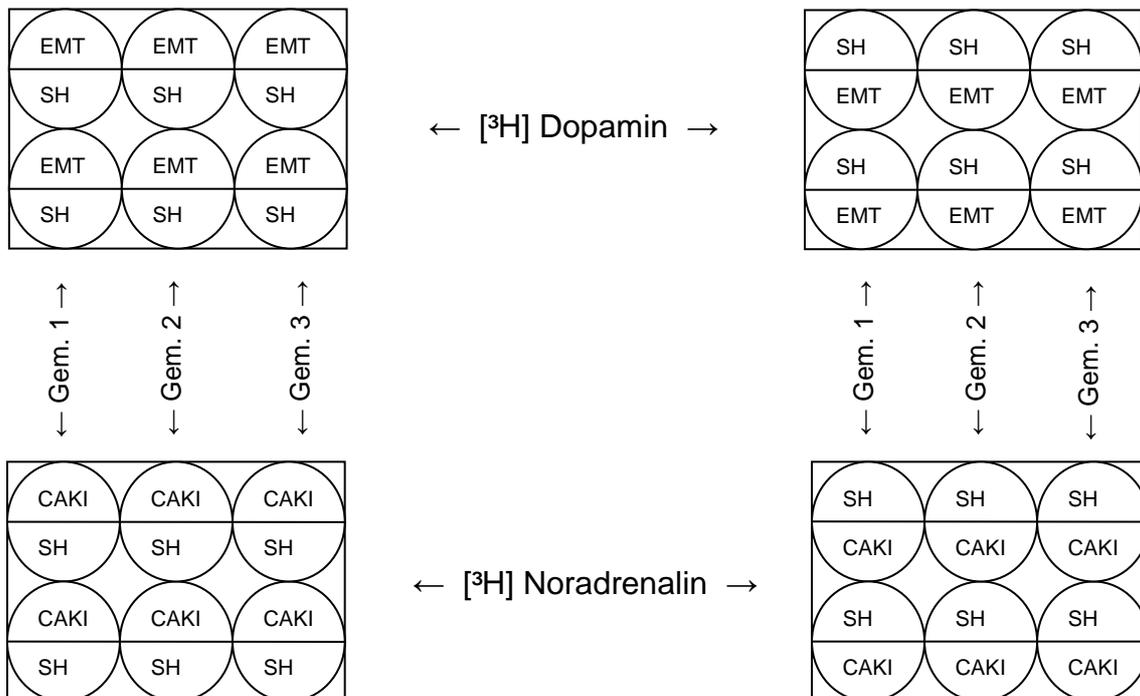


Abb. 7: Verteilung der Zelllinien in die Kompartimente und Pipettierschema der Inkubationsgemische in die Transwellplatten. Gem. = Gemisch = Inkubationsgemisch (siehe Tab. 17, S. 64). SH = SK-N-SH-Zellen.

Die Zusammensetzung der Inkubationsgemische ist in nachfolgender Tabelle beschrieben. Dabei beziehen sich die Volumenangaben der Tab. 17 auf ein Well, somit enthielt ein Kompartiment jeweils die Hälfte des Volumens. Das bedeutet, dass 3ml Inkubationspuffer, 60µl [³H] Katecholamine sowie bei den Gemischen

2 und 3 zusätzlich 60µl Corticosteron bzw. mIBG in das obere Kompartiment und die gleiche Menge in das untere Kompartiment pipettiert wurden.

Tab. 17: Zusammensetzung der Inkubationsgemische.

	Gemisch 1	Gemisch 2	Gemisch 3
Inkubationspuffer¹	6ml	6ml	6ml
Radioaktivität [³H] DA od. [³H] NA	120µl	120µl	120µl
Inhibitor	—	120µl Corticosteron	120µl mIBG

¹ Der Inkubationspuffer ist eine Mischung aus 98% (v/v) PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucoselösung und 1% (v/v) Ascorbinsäurelösung.

3.6.3.4 Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA in Abhängigkeit von der Präsenz konkurrierender Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10⁻⁵ M mIBG

Bei diesen Untersuchungen sollte festgestellt werden, in welchem Ausmaß zwei verschiedene Zelllinien in einem Co-Kultursystem um die Aufnahme von [³H] DA bzw. [³H] NA konkurrieren.

Für die Versuche wurde die Zelllinie, deren Aufnahmeverhalten getestet werden sollte, auf dem Boden zweier Transwellplatten ausgesät. Wie in Abb. 8 zu sehen ist, wurde in eine Transwellplatte zusätzlich auf der Membran eine andere Zelllinie ausgesät, so dass eine Konkurrenzsituation entstand. In die andere Transwellplatte wurde auf der Membran keine weitere Zelllinie ausgesät. Die einzelnen Schritte der praktischen Durchführung sind im Versuchsprotokoll (Tab. 15, S. 60) aufgeführt.

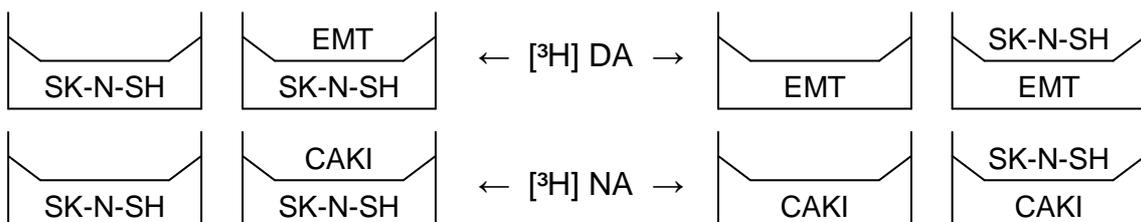


Abb. 8: Schematische Darstellung der Aussaat der verschiedenen Zelllinien in die unterschiedlichen Kompartimente des Transwellsystems.

Da bei dieser Untersuchungsreihe, wie in den unter 3.6.3.3 beschriebenen Versuchen, die [³H] Katecholaminaufnahme in die verschiedenen Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron und mIBG getestet wurde, konnte das Pipettierschema aus Abb. 7 (S. 63) verwendet werden.

3.6.4 Quantifizierung der in den Zellen enthaltenen Radioaktivität

Das Prinzip der Quantifizierung der Radioaktivität wurde bereits unter 3.5.4 (S. 55-57) beschrieben. Die Arbeitsschritte bei Transwellversuchen (Tab. 18) unterscheiden sich nur in den ersten vier Schritten von denen der Zellsuspensionsversuche (Tab. 14, S. 56). Dabei stellt die nachfolgende Tabelle die Fortführung des Arbeitsschrittes 11 der Tab. 15 (S. 60) dar.

Tab. 18: Arbeitsschritte zur Quantifizierung der Radioaktivität bei Transwellversuchen.

Schritt	Vorgehen
1	Zugabe von 500µl 0,1%-iger Triton-X-100-Lösung in jede Vertiefung
2	Abkratzen der Zellen mit der Pipettenspitze vom Boden
3	Mehrmalige kräftige Resuspension
4	350µl Zellsuspension pro Well in ein Szintillationsfläschchen pipettieren
5	Zugabe von 6ml Ecolume Szintillationsflüssigkeit
6	Szintillationsfläschchen gut schütteln
7	Über Nacht stehen lassen
8	Messen der in den Zellen vorhandenen Radioaktivität mittels β-Counter

3.7 Statistische Methoden

Wie bereits erwähnt, wurde bei den Screeningversuchen nur eine einmalige Doppelbestimmung eines Wertes durchgeführt. Diese gewonnenen Daten

können statistisch nicht auf Signifikanz getestet werden, da die Versuchszahl von $n=1$ zu gering ist. Zur statistischen Analyse der Daten der Hauptversuche (4.5, S. 111-122 und 4.10, S. 139-150) wurde Sigma Stat 3.0 [Sigma Stat for Windows Version 3.0: copyright© 1992-2003 SPSS Inc. (Chicago, USA)] verwendet. Dreifachbestimmungen eines Wertes wurden jeweils gemittelt. Aus einer Anzahl von $n=3$ unabhängigen Versuchen wurden die statistischen Vergleiche gewonnen. Die angegebenen Werte für p wurden mit dem gepaarten t-Test berechnet. Dabei wurde $p>0,05$ als nicht signifikant, $p<0,05$ (*) als signifikant und $p<0,01$ (**) als hochsignifikant betrachtet. Der gepaarte t-Test ist eine parametrische, statistische Methode, die grundsätzlich dann verwendet wird, wenn der Effekt einer Monotherapie ermittelt werden soll. Der beobachtete Behandlungseffekt, hier der Inhibitoreffekt, muss dabei in der untersuchten Population, hier die Zellkultur, normal verteilt sein.

Statistisch verglichen wurden:

- 1) die Aufnahme radioaktiv markierter Substanzen in Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron bzw. mIBG mit der ungehemmten Aufnahme für eine bestimmte Zelllinie. Beim statistischen Vergleich im t-Test erfolgte für jedes Wertepaar einer Zellkultur die Bildung einer Differenz aus den Werten, die ohne Inhibitor gemessen wurden, und den Werten, die mit Inhibitor gemessen wurden. Der gepaarte t-Test untersucht also die Veränderungen vor und nach einer singulären experimentellen Intervention an der gleichen Zellkultur. Da die Veränderung und nicht die Absolutwerte im Mittelpunkt stehen, entsteht ein aussagekräftiger Test für den Effekt einer Monotherapie.
- 2) die Hemmeffekte des Inhibitors Corticosteron bzw. mIBG zwischen CAKI- und SK-N-SH-Zellen sowie zwischen EMT- und SK-N-SH-Zellen. Dabei wurde beim statistischen Vergleich eine Differenz der Hemmwirkungen auf zwei verschiedene Zelllinien gebildet. Hierbei untersucht der gepaarte t-Test den Unterschied der Hemmeffekte auf zwei verschiedene Zelllinien für einen bestimmten Inhibitor. Da hier der Unterschied und nicht die Absolutwerte im Mittelpunkt stehen, stellt dies einen guten Test dar für den Vergleich der unterschiedlichen Wirksamkeiten eines Inhibitors auf verschiedene Zellen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Allgemeine Erläuterungen

4.1.1 Darstellung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein Screening bezüglich der Aufnahme der Katecholamine DA und NA bzw. von mIBG in neuronale Zellen (SK-N-SH- und PC 12-Zellen) im Vergleich zu extraneuronalen Zellen (CAKI- sowie EMT-, OCT 1- und OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen) in Abhängigkeit unterschiedlicher Faktoren vorzunehmen. Auf Grund der großen Variationen der Inkubationszeit, der Hemmstoffe und der Inhibitorkonzentrationen war die für die unterschiedlichen Untersuchungen benötigte Zellzahl sehr groß.

Um die Zellzahl an den einzelnen Versuchstagen in Grenzen zu halten, wurden die meisten Ergebnisse als Doppelbestimmungen aus Einzelversuchen gewonnen. Darüber hinaus wurden einzelne ausgewählte Hauptversuche in drei voneinander unabhängigen Versuchsblöcken durchgeführt.

An den verschiedenen Versuchstagen standen durch die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Zelllinien nicht immer 2×10^6 Zellen pro 500 μ l Inkubationspuffer für alle getesteten Zelllinien zur Verfügung. Um die Ergebnisse der verschiedenen Zelllinien an unterschiedlichen Versuchstagen miteinander vergleichen zu können, wurden die Messwerte auf einen Ansatz von jeweils 1×10^6 Zellen umgerechnet.

Da die Untersuchungen auf Grund der großen Zellzahl an mehreren Versuchstagen stattfinden mussten, waren die Passagen einer Zelllinie unterschiedlich. Da die meisten der untersuchten Zelllinien heterogene Tumorzellen sind, ist eine unterschiedliche Expression der Transporter auf der Zelloberfläche möglich und darf beim Vergleich verschiedener Versuche sowie bei der Interpretation der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden.

In den Abbildungen des 4. Kapitels sind alle Ergebnisse als Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung (MW \pm SD) dargestellt. Für die Berechnung des MW und der SD, sowie für die graphische Darstellung der

Ergebnisse wurde das Programm Sigma Plot 8.0 [Sigma Plot 2002 for Windows Version 8.0: copyright© 1992-2003 SPSS Inc. (Chicago, USA)] verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurde der Mittelwert aus der Doppelmessung eines einzelnen Versuches gebildet. Die hierbei angegebene Standardabweichung soll anzeigen, wie weit die beiden Messwerte auseinander liegen.

Für alle Untersuchungen wurde pro Reaktionsansatz eine f.c. der Radioaktivität von ca. 1×10^{-7} mol/l verwendet. Da bei der Herstellung der radioaktiven Lösung nicht immer das gleiche Verhältnis von [^3H]-markierten zu unmarkierten Katecholaminen verwendet wurde, war bei den unterschiedlichen Untersuchungen die pro Ansatz angebotene Molzahl nicht immer vollständig gleich. Damit die Ergebnisse an den verschiedenen Versuchstagen vergleichbar sind, ist in den Abbildungen die Aufnahme bzw. Abgabe der Radioaktivität auf der Ordinate in Prozent angegeben. Die Prozentangabe bedeutet hierbei, wieviel Prozent von der in einem Ansatz angebotenen Menge an Radioaktivität in die jeweiligen Zellen aufgenommen wurde. Bei einem Angebot von beispielsweise jeweils 7×10^{-11} Mole einer radioaktiven Substanz pro Ansatz und einer Aufnahme von 0,1%, wurden insgesamt 7×10^{-14} Mole der Substanz in die Zellen transportiert.

Bei Abbildungen, die den Hemmeffekt eines Inhibitors zeigen, ist die Hemmung auf der Ordinate in Prozent angegeben. Zur Berechnung der Hemmwirkung diente die aufgenommene Menge an radioaktiver Substanz in Abwesenheit des Inhibitors als 100%-Wert. Die Menge, die in die Zellen in Anwesenheit eines Inhibitors aufgenommen wurde, wurde mit Hilfe des Dreisatzes in Relation zu diesem 100%-Wert gesetzt. Ausgehend vom 100%-Wert erhält man somit eine Angabe, wie viel Prozent an radioaktiv markierten Substanzen noch in die Zellen in Anwesenheit eines Hemmstoffes aufgenommen wurden. Nach Subtraktion von 100% erhält man den Hemmeffekt des Inhibitors.

In den folgenden Kapiteln sind Reihenfolgen von Zelllinien oder von Inhibitoren dargestellt. Eine Zelllinienreihe präsentiert absteigend, wie stark die Zelllinien radioaktiv markierte Substanzen aufnahmen, oder wie stark sie von einem bestimmten Inhibitor gehemmt wurden. Eine Inhibitorreihe zeigt in absteigender Reihenfolge an, welche Inhibitoren die Aufnahme von Radioaktivität in eine

bestimmte Zelllinie am besten hemmten. Dabei bedeutet „ >> “, dass die Zelllinie vor diesem Zeichen wesentlich mehr Radioaktivität inkorporierte oder die radioaktive Aufnahme in diese Zelllinie von einem bestimmten Inhibitor wesentlich stärker gehemmt wurde, als die Zelllinie, die nach dem Zeichen steht. Das gleiche gilt für die in einer Reihenfolge aufgelisteten Inhibitoren. Der Inhibitor vor „ >> “ hemmte die radioaktive Aufnahme in eine bestimmte Zelllinie stärker, als der Inhibitor der danach aufgeführt ist. „ > “ zeigt entsprechend an, dass die Effekte stark, jedoch nicht ganz so stark wie bei „ >> “, ausgeprägt waren. Eine in etwa gleiche radioaktive Aufnahme bzw. Hemmung ist durch „ ≈ “ gekennzeichnet, wobei der Effekt vor dem Zeichen minimal mehr ausgeprägt war.

4.1.2 Strukturierung des Ergebnisteiles

Der Ergebnisteil kann grob in 2 große Teile gegliedert werden, wobei der erste Teil die Ergebnisse der Suspensions-kulturversuche in den Zentrifugenröhrchen darstellt und im zweiten Teil die Ergebnisse der Co-Kulturversuche im Transwellssystem beschrieben sind.

Im ersten Teil werden vor der Präsentation der Hauptversuche der Zellsuspensionsuntersuchungen (Kapitel 4.5 - 4.6) zunächst die Ergebnisse der Vorversuche unter 4.2 - 4.4 dargestellt.

Zu Beginn (4.2) wurde die zeitabhängige Aufnahme der [³H] Katecholamine DA und NA untersucht und verglichen. Alle weiteren Screeningversuche in Suspensionskulturen wurden, mit Ausnahme des Vergleiches zwischen der [³H] DA und [³H] NA Aufnahme in Anwesenheit von Corticosteron, nur mit [³H] DA durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von verschiedenen Inhibitoren auf die Aufnahme von [³H] DA in die verschiedenen Zellen untersucht. Dabei wurden mIBG und 6-FDA als kompetitive Inhibitoren eingesetzt, um indirekt über den Hemmeffekt eine Aussage bezüglich der Aufnahme dieser Substanzen in die verschiedenen Zellen machen zu können, da [¹³¹I] mIBG nur einmal und 6-[¹⁸F] FDA im

Rahmen dieser Dissertation gar nicht zur Verfügung stand. Desipramin, Corticosteron und GBR-12909 hingegen wurden als funktionelle Hemmstoffe eingesetzt, um deren Hemmwirkung auf die einzelnen Transporter zu zeigen. Diese Ergebnisse sind unter 4.3 aufgezeigt. Anschließend sind die Versuche zur zeitabhängigen Abgabe von Radioaktivität aus den verschiedenen Zellen dargestellt (4.4). In diesen Untersuchungen wurde analysiert, wie viel Radioaktivität nach einer 15-minütigen Inkubation mit [³H] DA in den folgenden 240 min noch in den Zellen verblieb, wobei nach 60 min auch der Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf das Abgabeverhalten untersucht wurde.

In einem Hauptversuch wurde der Einfluss einer in den Screeningversuchen ermittelten Corticosteron- bzw. mIBG-Konzentration auf die [³H] Katecholamin-aufnahme in die verschiedenen Zelllinien dargestellt (4.5). Der Einfluss der ermittelten Corticosteronkonzentration wurde in einem zweiten Hauptversuch auch auf die Aufnahme von [¹³¹I] mIBG in Suspensionskulturen im Kapitel 4.6 analysiert. Für diese Untersuchungen wurde [¹³¹I] mIBG verwendet, das aus Resten einer klinischen Anwendung zur Neuroblastomtherapie stammte.

Abschließend wurde in diesem Teil unter 4.7 ein Vergleich angestellt, der den Einfluss der verschiedenen Aufnahmesubstrate ([¹³¹I] mIBG, [³H] DA und [³H] NA) auf die radioaktive Aufnahme in die Zellen der getesteten Zelllinien in Abwesenheit oder Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron darstellt.

Im zweiten Teil sind die Ergebnisse der im Transwellsystem durchgeführten Untersuchungen erläutert. In diesen Versuchen sollte die direkte Konkurrenz von neuronalen Zellen (SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen) mit extraneuronalen Zellen (EMT-exprimierende CAKI- bzw. HEK 293-Zellen) um die [³H] Katecholaminaufnahme in Abhängigkeit verschiedener Inhibitoren analysiert werden. Die Ergebnisse der Screeningversuche sind in den Kapiteln 4.8 - 4.9 vor denen des Hauptversuches (4.10) beschrieben.

Die Screeningversuche waren im Transwellsystem v.a. zur Optimierung der Kurzzeitinkubation notwendig. In diesen Optimierungsversuchen, deren Ergebnisse im Kapitel 4.8 präsentiert sind, wurde u.a. getestet, ob das Kompartiment (oben oder unten), in dem die Zellen ausgesät wurden oder die

Radioaktivität angeboten wurde, einen Einfluss auf die radioaktive Aufnahme in Zellen hatte. Außerdem wurde in den Vorversuchen der Einfluss konkurrierender Zellen auf die [³H] Katecholaminaufnahme in die verschiedenen Zelllinien in Abwesenheit oder Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron bzw. mIBG untersucht, deren Ergebnisse unter 4.9 dargestellt sind.

Anschließend sind unter 4.10 die Ergebnisse der Hauptversuche des Transwell-systemes beschrieben. In diesen wurde in Abwesenheit oder Anwesenheit der in den Zellsuspensionsversuchen ermittelten Konzentrationen von Corticosteron bzw. mIBG, die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH/EMT-Co-Kulturen sowie die [³H] NA Aufnahme in SK-N-SH/CAKI-Co-Kulturen untersucht.

Am Ende des Ergebnisteiles werden im Kapitel 4.11 die in dieser Arbeit verwendeten unterschiedlichen Untersuchungssysteme miteinander verglichen. Für diesen Vergleich wurden die Ergebnisse der Hauptversuche mit Suspensionskulturen im Zentrifugenröhrchen (4.5) und die Ergebnisse der Hauptversuche im Transwell-system (4.10) herangezogen.

4.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA

Diese Versuche dienten dazu, das Aufnahmeverhalten von [³H] Katecholaminen in die verschiedenen Zelllinien zu untersuchen. Dabei sollte überprüft werden, ob ein Unterschied in der [³H] DA und [³H] NA Aufnahme besteht und inwiefern die Inkubationszeit einen Einfluss auf die Aufnahme in die Zellen hat.

Laut Versuchsanordnung (Tab. 12, S. 50) sollte die f.c. der Radioaktivität in 500µl Puffer ca. 1×10^{-7} mol/l betragen, wobei den Zellen bei diesem Versuch pro Ansatz eine Menge von $5,6 \times 10^{-11}$ Mole [³H] DA bzw. $7,2 \times 10^{-11}$ Mole [³H] NA angeboten wurde. In den nachfolgenden Abb. 9a+b, 10 und 11a-f ist die Aufnahme von [³H] DA bzw. [³H] NA in die Zellen auf der Ordinate in Prozent angegeben, bezogen auf die angebotene Menge, und gegen die Zeit aufgetragen.

4.2.1 Zeitabhängigkeit der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA

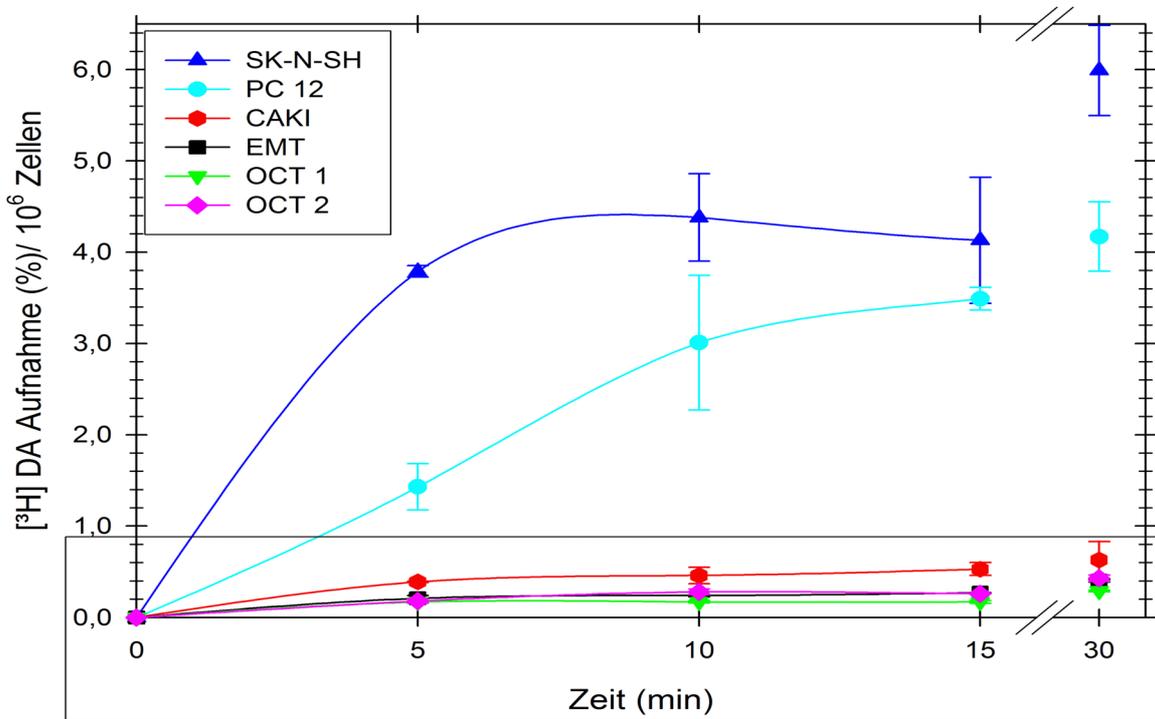


Abb. 9a: Zeitabhängigkeit der $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien. Der mit einem Kasten markierte Bereich ist vergrößert in einer Extragraphik in Abb. 9b dargestellt. 1%-ige Aufnahme/ 10^6 Zellen $\triangleq 5,6 \times 10^{-13}$ Mole/ 10^6 Zellen.

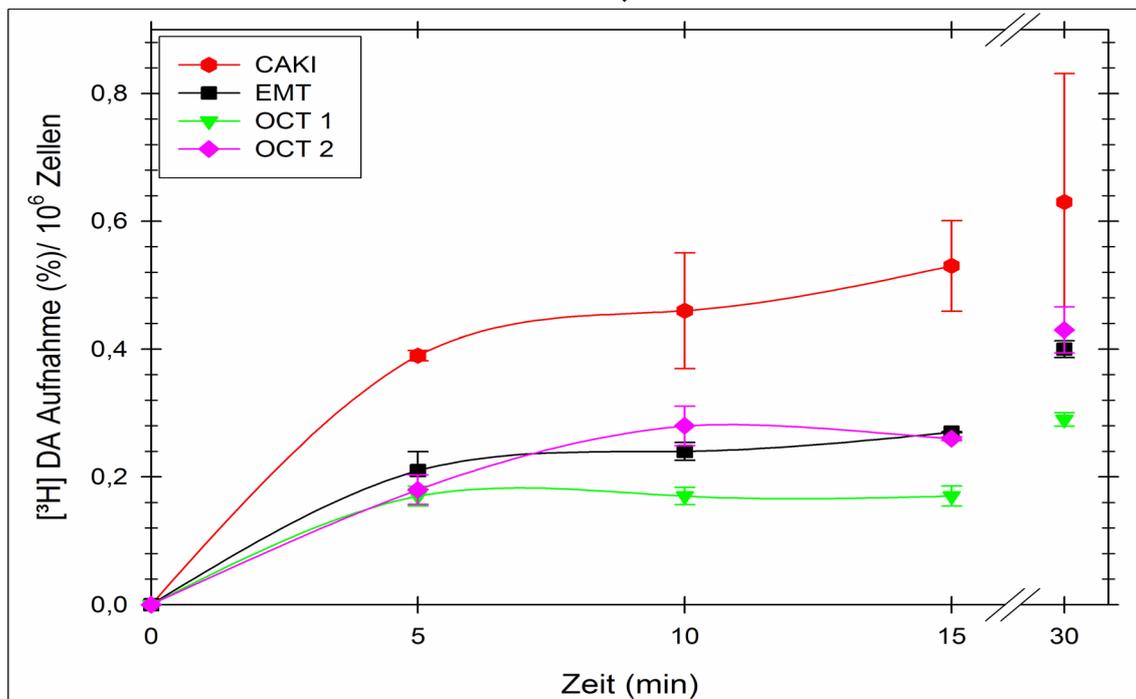


Abb. 9b: Ausschnitt aus Abb. 9a. Diese Vergrößerung enthält nur die zeitabhängige $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in 10^6 extraneuronale Zellen (CAKI, EMT, OCT 1, OCT 2). 1%-ige Aufnahme/ 10^6 Zellen $\triangleq 5,6 \times 10^{-13}$ Mole/ 10^6 Zellen.

In Abb. 9a ist die zeitabhängige [³H] DA Aufnahme in alle 6 getesteten Zelllinien zu sehen, während die Abb. 9b nur einen Ausschnitt der Abb. 9a darstellt. In der Graphik 9b ist nur die [³H] DA Aufnahme in die extraneuronalen Zellen (CAKI, EMT, OCT 1 und OCT 2) vergrößert abgebildet.

In Abb. 9a+b kann man erkennen, dass mit zunehmender Inkubationszeit die [³H] DA Aufnahme in allen getesteten Zellen anstieg. Wird die [³H] DA Aufnahme bei einer Inkubationszeit von 5 min mit der bei 30-minütiger Inkubation verglichen, so sieht man bei der PC 12-Zelllinie eine 3-fache, bei der EMT- und OCT 2-Zelllinie eine 2-fache sowie bei den SK-N-SH-, CAKI- und OCT 1-Zelllinien eine 1,5-fache Steigerung der Inkorporation. Die bei der PC 12-Zelllinie im Vergleich zu den anderen Zelllinien sehr viel höhere Steigerung des [³H]-DA-Gehaltes mit zunehmender Inkubationszeit hängt höchstwahrscheinlich mit der höheren Anzahl an Speichervesikeln in PC 12-Zellen zusammen.

Desweiteren kann man in der Abb. 9a deutlich die Unterschiede in der Aufnahme von [³H] DA in die neuronalen Zellen (SK-N-SH- und PC 12-Zelllinie) und die extraneuronalen Zellen (CAKI-, EMT-, OCT 1- und OCT 2-Zelllinie) erkennen. SK-N-SH-Zellen inkorporierten ca. das 10-fache an [³H] DA wie CAKI-Zellen und ca. das 15-fache wie EMT-Zellen. Vergleicht man die [³H] DA Aufnahme in PC 12-Zellen, so inkorporierten diese ca. das 6-fache der [³H] DA Menge im Vergleich zu CAKI-Zellen und ca. das 9-fache im Vergleich zu EMT-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich für diese beiden Abbildungen nach der Stärke der [³H] DA Aufnahme folgende Reihenfolge der Zelllinien erstellen: **SK-N-SH > PC 12 >> CAKI > OCT 2 ≈ EMT > OCT 1.**

4.2.2 Zeitabhängigkeit der Aufnahme von [³H] NA

Die zeitabhängige [³H] NA Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien ist in Abb. 10 (S. 74) dargestellt.

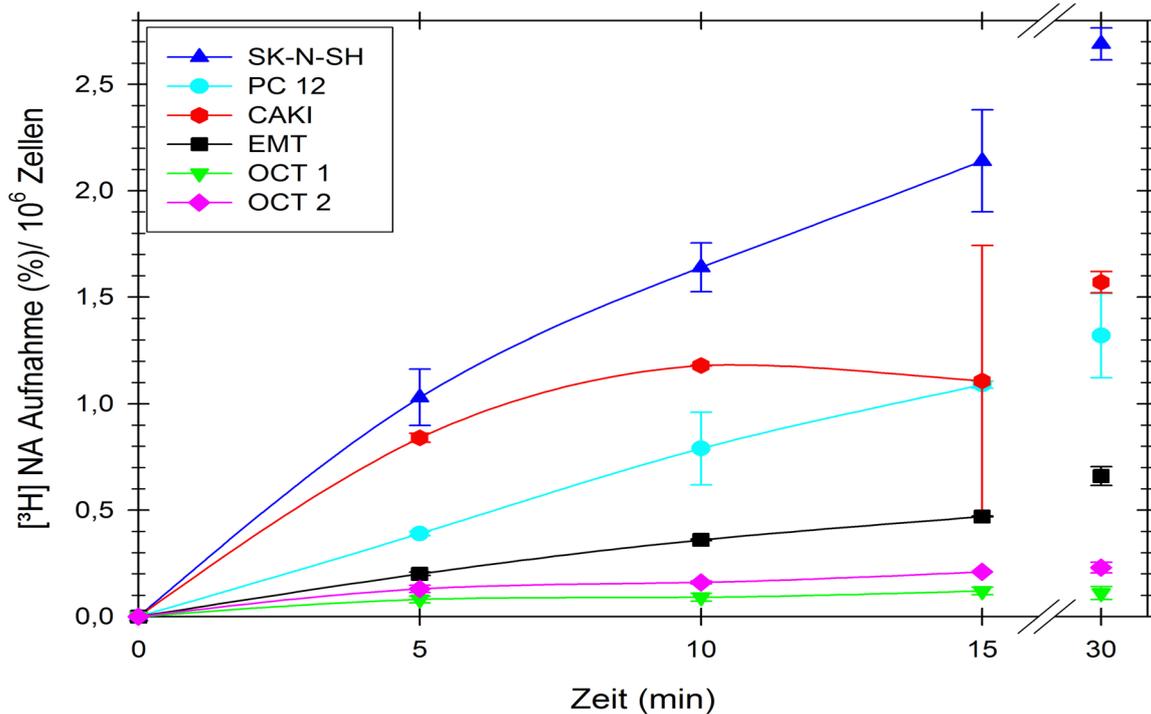


Abb. 10: Zeitabhängigkeit der $[^3\text{H}]$ NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien. 1%-ige Aufnahme/ 10^6 Zellen $\triangleq 7,2 \times 10^{-13}$ Mole/ 10^6 Zellen.

Auch in Abb. 10 ist ein Anstieg der $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme mit zunehmender Inkubationszeit zu verzeichnen. Beim Vergleich der $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme nach 5- und 30-minütiger Inkubation, erkennt man bei der SK-N-SH-, EMT- und PC 12-Zelllinie einen ca. 3-fachen, bei der CAKI- und OCT 2-Zelllinie einen 2-fachen und bei der OCT 1-Zelllinie einen 1,5-fachen Anstieg der Aufnahme. Dabei steigerten PC 12-Zellen von 0,4% auf 1,3% am stärksten ihren $[^3\text{H}]$ -NA-Gehalt. Wie bereits erwähnt, liegt dies wahrscheinlich an der im Vergleich zu den anderen Zellen größeren Anzahl an Speichervesikeln in PC 12-Zellen.

Im Gegensatz zur zeitabhängigen Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA konnte man bei der zeitabhängigen $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme keinen so deutlichen Unterschied zwischen neuronalen und extraneuronalen Zellen erkennen. SK-N-SH-Zellen nahmen ca. das 1,5-fache an $[^3\text{H}]$ NA auf wie CAKI-Zellen und ca. das 4,5-fache wie EMT-Zellen, während extraneuronale CAKI-Zellen beispielsweise ungefähr gleich viel $[^3\text{H}]$ NA inkorporierten wie neuronale PC 12-Zellen.

Ein zusammenfassender Vergleich der $[^3\text{H}]$ NA Aufnahmen aus Abb. 10 ergibt folgende Zelllinienreihe: **SK-N-SH >> CAKI \approx PC 12 > EMT > OCT 2 \approx OCT 1.**

4.2.3 Vergleich der zeitabhängigen Aufnahme von [³H] DA mit der von [³H] NA

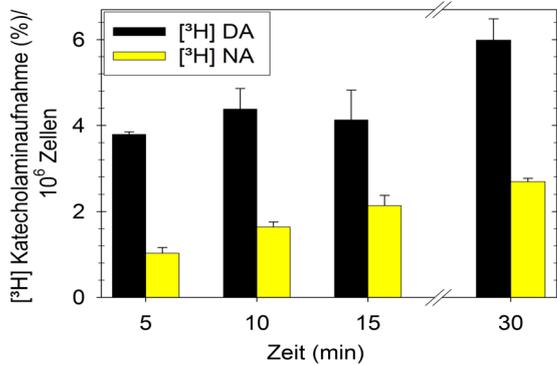


Abb. 11a: Zeitabhängigkeit der [³H] Katecholaminaufnahme (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in **SK-N-SH-Zellen**.

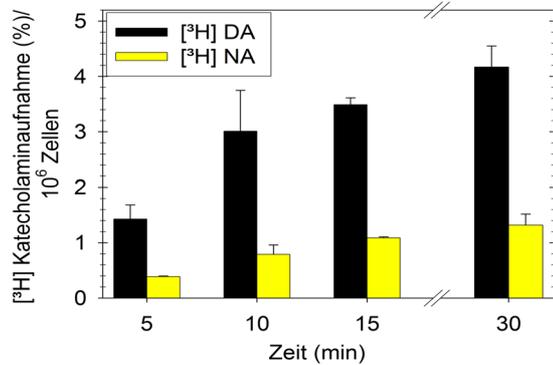


Abb. 11b: Zeitabhängigkeit der [³H] Katecholaminaufnahme (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in **PC 12-Zellen**.

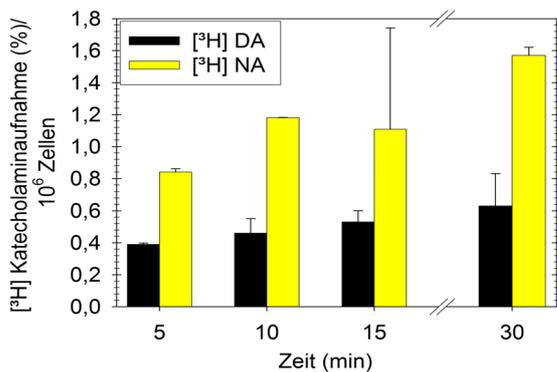


Abb. 11c: Zeitabhängigkeit der [³H] Katecholaminaufnahme (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in **CAKI-Zellen**.

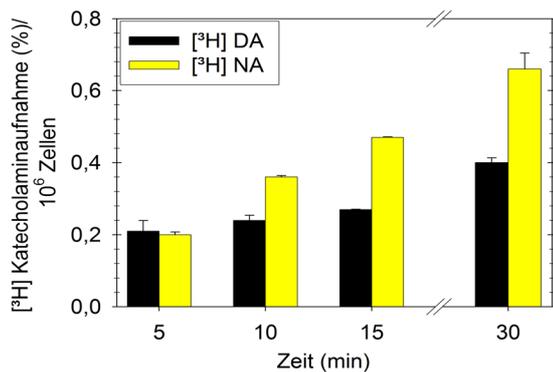


Abb. 11d: Zeitabhängigkeit der [³H] Katecholaminaufnahme (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in **EMT-Zellen**.

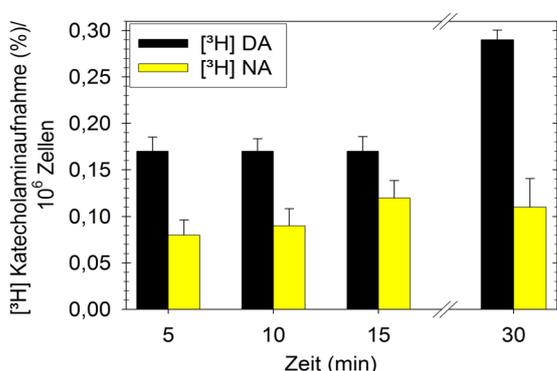


Abb. 11e: Zeitabhängigkeit der [³H] Katecholaminaufnahme (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in **OCT 1-Zellen**.

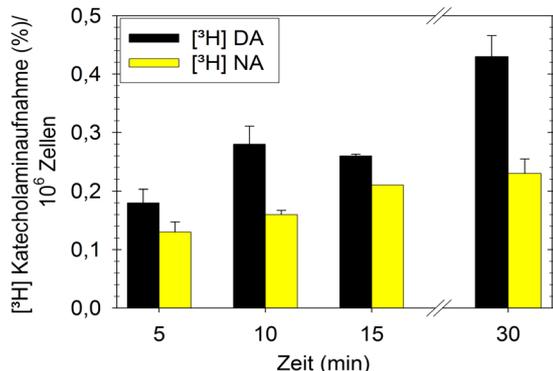


Abb. 11f: Zeitabhängigkeit der [³H] Katecholaminaufnahme (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in **OCT 2-Zellen**.

Abb. 11a-f: Vergleich der zeitabhängigen [³H] DA mit der [³H] NA Aufnahme. Eine 1%-ige [³H] DA Aufnahme/10⁶ Zellen \triangleq 5,6x10⁻¹³ Mole/10⁶ Zellen. Eine 1%-ige [³H] NA Aufnahme/10⁶ Zellen \triangleq 7,2x10⁻¹³ Mole/10⁶ Zellen.

In Abb. 11a-f sind die in Abb. 9+10 erhaltenen Ergebnisse als direkter Vergleich der [³H] DA und [³H] NA Aufnahme dargestellt. Aus diesen vergleichenden Graphiken (Abb. 11a-f) ist ersichtlich, dass die SK-N-SH- und PC 12-Zellen 2-4x mehr [³H] DA als [³H] NA inkorporierten. Im Gegensatz dazu nahmen CAKI- und EMT-Zellen [³H] NA 1,5- bis 3-fach stärker auf als [³H] DA. OCT 1- und OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen nahmen [³H] DA nur 1-2x besser auf als [³H] NA. Allerdings war ihre Aufnahme im Vergleich zu SK-N-SH- und PC 12-Zellen generell weitaus schwächer.

4.3 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse sollen den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von verschiedenen Inhibitoren auf die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH-, PC 12- und CAKI-Zellen sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen zeigen. Getestet wurden die kompetitiven Inhibitoren mIBG und 6-FDA sowie die „funktionellen“ Hemmstoffe Corticosteron, Desipramin und GBR-12909. Um für den Hauptversuch geeignete Konzentrationen mit einem optimalen Hemmeffekt für die jeweiligen Inhibitoren zu finden, wurden in diesen Screeningversuchen mehrere Konzentrationen der genannten Inhibitoren getestet. Die eingesetzten Inhibitor-konzentrationen lagen zwischen 1×10^{-3} mol/l und 1×10^{-9} mol/l (Tab. 9, S. 40).

Für die Fragestellung der in diesem Kapitel dargestellten Untersuchungsreihen war es wichtig zu erfahren, welche Hemmung der Aufnahme mit einem bestimmten Inhibitor bei verschiedenen Zelllinien erzielt werden kann. Um nun die Effekte der einzelnen Hemmstoffe bei verschiedenen Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurde der IC₅₀-Wert herangezogen. Dieser Wert gibt per definitionem die Konzentration des Inhibitors an, bei der, im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor, eine 50%-ige Hemmung der Aufnahme erreicht werden kann. Der IC₅₀-Wert wurde aus den jeweiligen Abbildungen graphisch ermittelt und ist somit kein exakter Wert, sondern stellt nur einen Anhaltswert dar.

Die MW und SD der folgenden Ergebnisse wurden nur aus Doppelbestimmungen eines Wertes berechnet, deshalb kann die SD in einzelnen Fällen groß sein, d.h., dass die beiden einzelnen Messwerte weit auseinander lagen. Da bei diesen Versuchen eine Konzentrationsreihe der jeweiligen Inhibitoren getestet wurde, konnte der Kurvenverlauf der Graphik ungefähr abgeschätzt werden. Lag bei einer großen SD statt des berechneten MWs einer der beiden Messpunkte auf dem erwarteten Kurvenverlauf, so kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, dass der Messpunkt auf dem Kurvenverlauf dem wahren Wert entspricht. In diesem Fall ist nicht der MW in der Graphik eingezeichnet, sondern die beiden einzelnen Messpunkte. Der unwahrscheinlichere Messwert ist in der jeweiligen Abbildung nur als einzelner Punkt dargestellt und wurde nicht in den Kurvenverlauf miteinbezogen. In den Abb. 12-18 ist der Hemmeffekt des jeweiligen Inhibitors in Prozent auf der Ordinate angegeben. Die Konzentration des Inhibitors ist in mol/l logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen.

Die hemmenden Effekte der 5 verwendeten Inhibitoren wurden jeweils nach der gleichen Versuchsanordnung ermittelt, die unter 3.5.2.2 (S. 51-52) und in Tab. 12 (S. 50) genauer beschrieben ist. Nach diesem Schema wurden jeweils 2×10^6 Zellen pro Ansatz in Suspensionskultur 15 min bei 37°C mit [^3H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in Abwesenheit oder Anwesenheit der Inhibitoren inkubiert.

4.3.1 Einfluss von MIBG

MIBG wird von neuronalen Zellen des sympathischen Nervensystems v.a. über den NAT aufgenommen, während ein Transport über DAT unwahrscheinlich und über SERT umstritten ist. Da diese Substanz mit DA und NA um eine Aufnahme über die gleichen Transportsysteme konkurriert, stellt mIBG einen kompetitiven Hemmstoff dar. Mit steigender mIBG-Konzentration sollte eine vermehrte Hemmwirkung bzw. Aufnahme von mIBG zu erwarten sein.

Über den Transport von mIBG in extraneuronale CAKI-Zellen, sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen ist bisher in der Literatur

nichts bekannt. Die Untersuchungen mit mIBG sollten somit vergleichende Daten bezüglich einer möglichen mIBG Aufnahme über die unterschiedlichen Transporter in extraneuronale versus neuronale Zellen liefern. Eine klinische Relevanz dieser Untersuchungen ergibt sich aus der Tatsache, dass [^{123}I] mIBG zur szintigraphischen Diagnostik und [^{131}I] mIBG zur Therapie u.a. von Neuroblastomen und Phäochromozytomen eingesetzt wird. Auf Grund der im Rahmen dieser Dissertation seltenen Verfügbarkeit von radioaktiv markiertem mIBG wurden die meisten Versuche mit den Substraten [^3H] DA bzw. [^3H] NA und unmarkiertem mIBG als kompetitivem Hemmstoff durchgeführt. Dabei sollte der Hemmeffekt von mIBG indirekt eine Aussage über dessen Aufnahme erteilen. Nur in einem Versuch (4.6, S. 122-125) wurde mit [^{131}I] mIBG direkt die Aufnahme untersucht, um die mit unmarkiertem mIBG gewonnene indirekte Aufnahme zu überprüfen.

In der nachfolgend dargestellten Untersuchungsreihe mit unmarkiertem mIBG wurden unterschiedliche Konzentrationen zwischen 5×10^{-7} mol/l und 5×10^{-5} mol/l getestet. Wie aus Vorversuchen aus unserem Labor [237] bekannt war, konnte in Aqua bidest gelöstes mIBG ohne Wirkungsverlust in Aliquoten bei -20°C eingefroren werden, die dann unmittelbar vor dem Versuch aufgetaut wurden.

Die Hemmeffekte der verschiedenen mIBG-Konzentrationen wurden nach dem gleichen Schema (15-minütige Inkubation der Zellen in Suspensionskultur bei 37°C mit [^3H] DA in einer f.c. von ca. 1×10^{-7} mol/l) wie die der anderen Inhibitoren ermittelt. Im Falle des mIBGs wurde jedoch noch zusätzlich die Hemmwirkung von mIBG (f.c. $\approx 1 \times 10^{-5}$ mol/l) auf die [^3H] DA Aufnahme mit der auf die [^3H] NA Aufnahme bei Inkubationszeiten von 15 und 30 min verglichen.

4.3.1.1 Einfluss von mIBG auf die Aufnahme von [^3H] DA

Bevor die Hemmeffekte auf die [^3H] DA Aufnahme gezeigt werden (Abb. 12a-f, S. 80), sollen zunächst in Tab. 19 die ungehemmten [^3H] DA Aufnahmen pro 10^6 Zellen der jeweiligen Zelllinien aufgeführt werden. Diese stellen den 100%-Wert der Aufnahme in Abwesenheit von mIBG dar und können mit den Werten der [^3H] DA Aufnahme in Anwesenheit von mIBG in Relation gesetzt werden.

Tab. 19: Ungehemmte Aufnahme von [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15-minütiger Inkubation, ausgehend vom Angebot im Reaktionsansatz.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
Mole im Ansatz ¹	5,6x10 ⁻¹¹					
Aufnahme (%) ²	1,4	1,7	0,3	0,2	0,3	1,1
Aufnahme (Mole) ³	7,8x10 ⁻¹³	9,5x10 ⁻¹³	1,7x10 ⁻¹³	1,1x10 ⁻¹³	1,7x10 ⁻¹³	6,2x10 ⁻¹³

¹ Die Menge an [³H] DA, die pro 500µl Reaktionsansatz angeboten wurde.

² Die in Prozent dargestellte Aufnahme an [³H] DA pro 10⁶ Zellen, wobei sich die Prozentangabe auf das im Ansatz vorliegende Angebot an [³H] DA bezieht.

³ Die pro 10⁶ Zellen aufgenommene Menge an [³H] DA.

Wie aus den Abbildungen 12a+b (S. 80) ersichtlich ist, zeigte sich schon bei der niedrigsten getesteten mIBG-Konzentration (5x10⁻⁷ mol/l) eine deutliche Hemmwirkung auf die [³H] DA Aufnahme in die neuronalen Zelllinien SK-N-SH und PC 12, die mit zunehmender Konzentration stark anstieg. Auch die radioaktive Aufnahme in EMT- bzw. OCT 2-exprimierenden HEK 293-Zellen wurde bei höheren mIBG-Konzentrationen bis zu ca. 80% gehemmt (Abb. 12d und 12f). In Abb. 12c und 12e ist der deutlich flachere Kurvenverlauf bei CAKI- und OCT 1-Zellen zu sehen. Bei diesen beiden extraneuronalen Zelllinien wurde ein maximaler Hemmeffekt der [³H] DA Aufnahme von ca. 40% bei der höchsten getesteten Konzentration (5x10⁻⁵ mol/l) erreicht. Die aus den Abb. 12a-f ermittelten IC₅₀-Werte sind in Tab. 20 angegeben.

Tab. 20: IC₅₀-Werte des Inhibitors mIBG.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
IC₅₀-Wert (mIBG)	1,6x10 ⁻⁶ mol/l	3,9x10 ⁻⁶ mol/l	>5,0x10 ⁻⁵ mol/l	4,1x10 ⁻⁶ mol/l	>5,0x10 ⁻⁵ mol/l	1,8x10 ⁻⁶ mol/l

MIBG zeigte die intensivsten Hemmeffekte auf die Aufnahme von [³H] DA bei SK-N-SH- und OCT 2-Zellen. Wird der Hemmeffekt bei allen Zelllinien verglichen, so lässt sich folgende absteigende Reihenfolge erstellen: **SK-N-SH ≈ OCT 2 > PC 12 ≈ EMT >> CAKI ≈ OCT 1.**

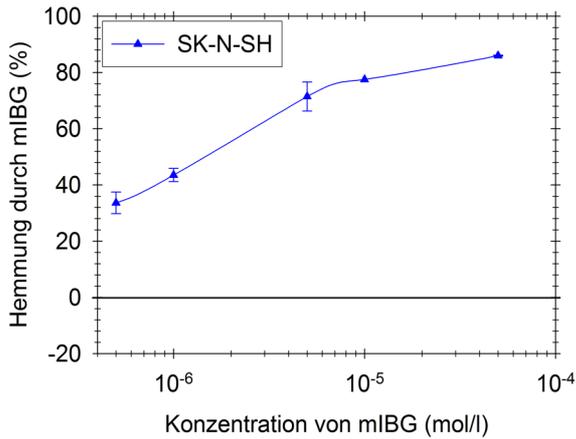


Abb. 12a: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher mIBG-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 SK-N-SH-Zellen.

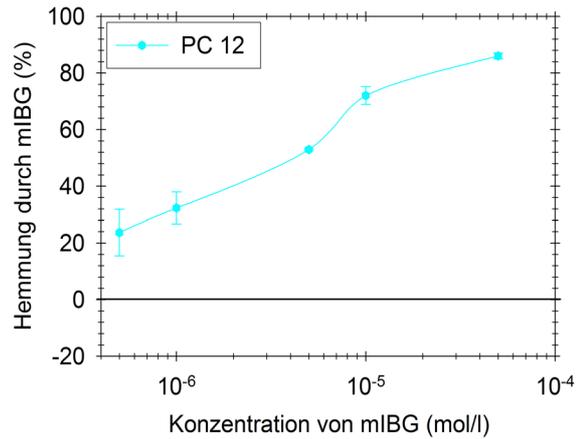


Abb. 12b: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher mIBG-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 PC 12-Zellen.

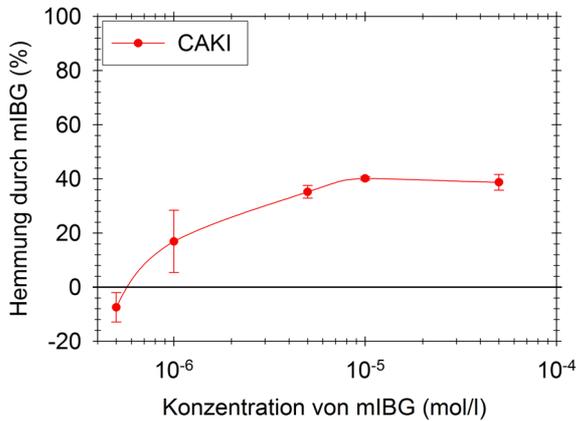


Abb. 12c: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher mIBG-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 CAKI-Zellen.

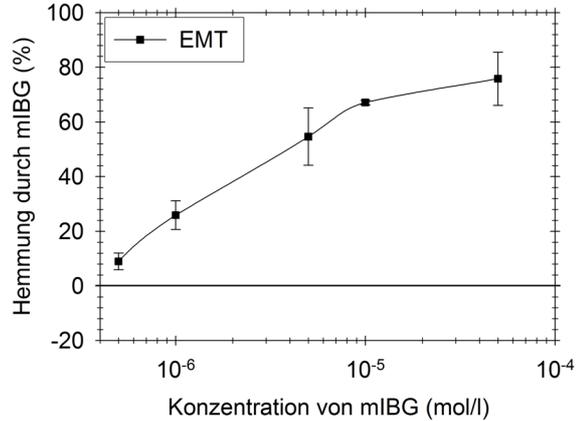


Abb. 12d: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher mIBG-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 EMT-Zellen.

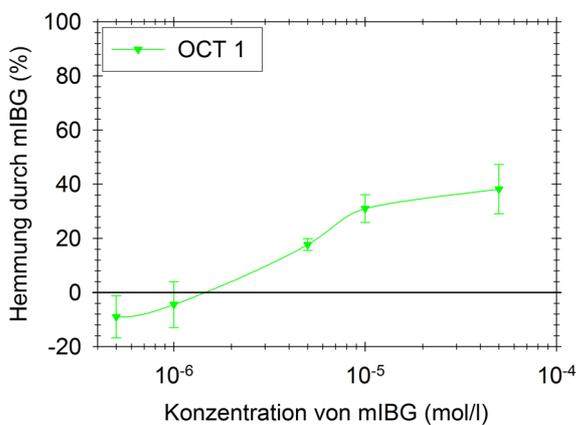


Abb. 12e: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher mIBG-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 1-Zellen.

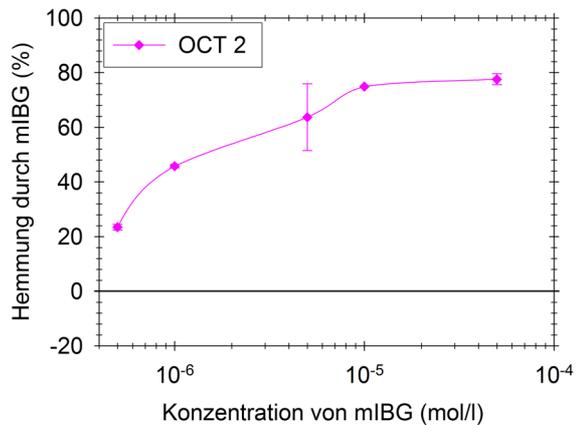


Abb. 12f: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher mIBG-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 2-Zellen.

4.3.1.2 Vergleich des Einflusses von 10^{-5} M mIBG auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA mit dem auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ NA in Zeitabhängigkeit

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Versuchsreihe dargestellt, bei der der Einfluss der Aufnahmesubstrate auf die Hemmwirkung von mIBG getestet wurde. In diesen Untersuchungen wurden die verschiedenen Zellsuspensionen mit ca. 1×10^{-7} mol/l $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA ($\approx 5,6 \times 10^{-11}$ Mole $[^3\text{H}]$ DA bzw. $7,2 \times 10^{-11}$ Mole $[^3\text{H}]$ NA) in Abwesenheit bzw. Anwesenheit eines 100-fach molaren Überschusses an unmarkiertem mIBG (f.c. = 1×10^{-5} mol/l) bei 37°C inkubiert. Die Aufnahme der Radioaktivität wurde nach 5-, 10-, 15- und 30-minütiger Inkubation gemessen.

Die Hemmeffekte von mIBG auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA bei allen getesteten Inkubationszeiten sind in Tab. 21 aufgelistet.

Tab. 21: Hemmeffekte von 10^{-5} M mIBG auf die radioaktive Aufnahme (f.c. $\approx 10^{-7}$ mol/l) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Substrat.

Zeit	Substrat	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
05 min	$[^3\text{H}]$ DA	94%	88%	(-13%)	8%	40%	55%
	$[^3\text{H}]$ NA	77%	57%	47%	67%	35%	53%
10 min	$[^3\text{H}]$ DA	94%	90%	0%	14%	11%	38%
	$[^3\text{H}]$ NA	79%	45%	37%	¹	¹	¹
15 min	$[^3\text{H}]$ DA	92%	88%	7%	13%	(-6%)	36%
	$[^3\text{H}]$ NA	80%	48%	35%	67%	32%	48%
30 min	$[^3\text{H}]$ DA	93%	86%	6%	35%	37%	57%
	$[^3\text{H}]$ NA	78%	38%	31%	65%	2%	50%

¹ Diese Werte wurden nicht getestet.

In Abb. 13a-f (S. 82) sind die Hemmeffekte von mIBG auf die $[^3\text{H}]$ DA und $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme exemplarisch für die in den Zellsuspensions- und Transwellversuchen verwendeten Inkubationszeiten (15 min und 30 min) in einer vergleichenden Graphik dargestellt.

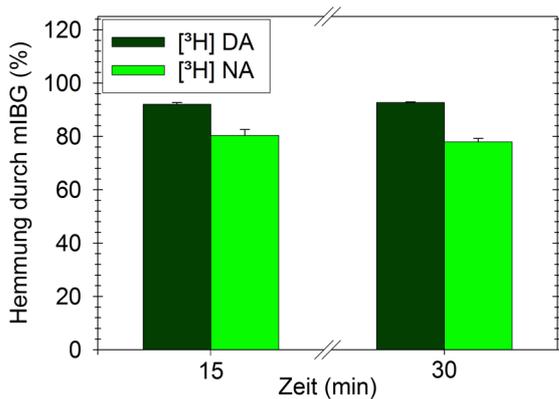


Abb. 13a: Vergleich des Hemmeffektes von mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in **SK-N-SH-Zellen** nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation.

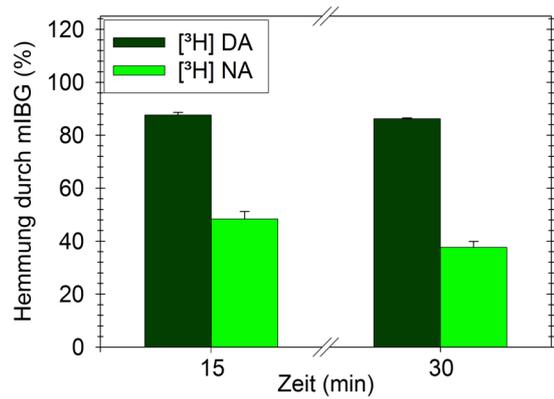


Abb. 13b: Vergleich des Hemmeffektes von mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in **PC 12-Zellen** nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation.

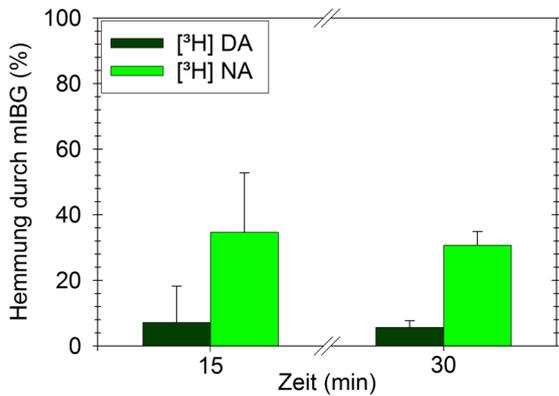


Abb. 13c: Vergleich des Hemmeffektes von mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in **CAKI-Zellen** nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation.

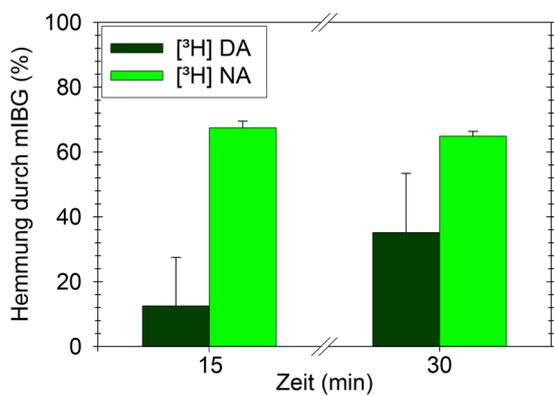


Abb. 13d: Vergleich des Hemmeffektes von mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in **EMT-Zellen** nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation.

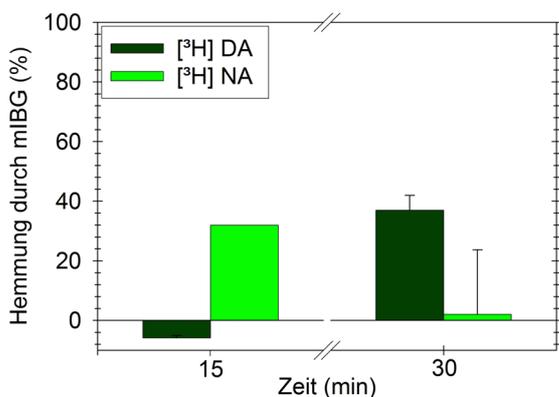


Abb. 13e: Vergleich des Hemmeffektes von mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in **OCT 1-Zellen** nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation.

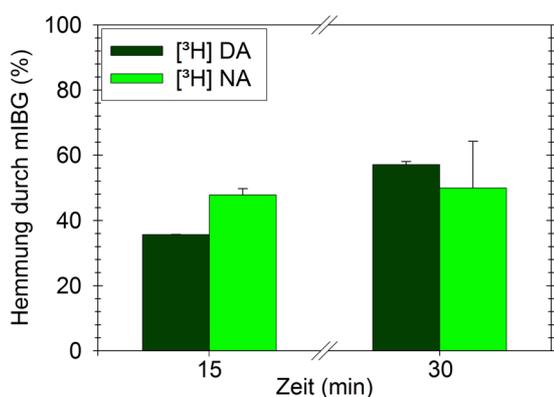


Abb. 13f: Vergleich des Hemmeffektes von mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in **OCT 2-Zellen** nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation.

Zur Berechnung der in den Abb. 13a-f dargestellten Hemmeffekte werden die Werte der Aufnahme in Abwesenheit des Inhibitors mIBG als 100%-Wert benötigt, die in Tab. 22 aufgelistet sind.

Tab. 22: Ungehemmte Aufnahme von [³H] DA bzw. [³H] NA (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation, ausgehend vom Angebot im Reaktionsansatz.

Zeit	Substrat	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
15 min	[³ H] DA	4,1%	3,5%	0,5%	0,3%	0,2%	0,3%
	[³ H] NA	2,1%	1,1%	0,1%	0,5%	0,1%	0,2%
30 min	[³ H] DA	6,0%	4,2%	0,6%	0,4%	0,3%	0,4%
	[³ H] NA	2,7%	1,3%	1,6%	0,7%	0,1%	0,2%

Zusammenfassend kann man anhand der Tab. 21 (S. 81) und Abb. 13a-f (S. 82) folgende Aussagen treffen: Die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH- und PC 12-Zellen wurde durch mIBG 1-2x stärker gehemmt als die Aufnahme von [³H] NA. Im Gegensatz dazu fand bei CAKI- und EMT-Zellen eine 2- bis 6-fach geringere Hemmung der Aufnahme statt, wenn [³H] DA als Aufnahmesubstrat vorlag. Bei OCT 1 und OCT 2-Zellen lässt sich keine allgemeine Aussage für alle Inkubationszeiten treffen. Dennoch kann man sagen, dass v.a. bei OCT 2-Zellen mIBG die Aufnahme von [³H] DA und die von [³H] NA in etwa gleich gut hemmte (36% - 57%).

Die Hemmeffekte von mIBG veränderten sich für ein Aufnahmesubstrat in Zeitabhängigkeit bei der SK-N-SH-, PC 12-, CAKI- und EMT-Zelllinie nur gering. Bei OCT 1- und OCT 2-Zellen wurden bei den unterschiedlichen Inkubationszeiten bei einem Aufnahmesubstrat für die Hemmeffekte von mIBG größere Schwankungen gemessen.

Je nach Inkubationszeit und Aufnahmesubstrat lassen sich aus Tab. 21 (S. 81) für die Stärke des Hemmeffektes unterschiedliche Zelllinienreihen erstellen. Generell wurde jedoch die Aufnahme von [³H] DA bzw. [³H] NA in SK-N-SH-Zellen durch mIBG bei allen Inkubationszeiten und allen Aufnahmesubstraten am stärksten inhibiert. Der zweitstärkste Hemmeffekt trat bei der radioaktiven Aufnahme in PC 12-Zellen bei allen Inkubationszeiten auf, allerdings nur, wenn

[³H] DA als Aufnahmesubstrat verwendet wurde. Wurde [³H] NA im Reaktionsansatz angeboten, so lag die zweitstärkste Hemmwirkung von mIBG bei EMT-Zellen. Relativ wenig wurde die radioaktive Aufnahme in CAKI-Zellen durch 10⁻⁵ M mIBG bei allen Inkubationszeiten und beiden Aufnahmesubstraten ([³H] DA bzw. [³H] NA) blockiert.

4.3.2 Einfluss von 6-Fluordopamin auf die Aufnahme von [³H] DA

In letzter Zeit kam häufiger die Diskussion auf [47,126,172,198,200,205], ob 6-FDA in seiner [¹⁸F]-markierten Form in der PET-Diagnostik des Neuroblastoms bzw. Phäochromozytoms routinemäßig eingesetzt werden könnte.

6-FDA ist eine dopaminanaloge Verbindung und wird deshalb in gleicher Weise wie DA von den geeigneten Transportsystemen aufgenommen (siehe auch Tab. 1, S. 9). Dazu gehören u.a. der DAT, der NAT, sowie wahrscheinlich der EMT, der OCT 1 und der OCT 2. Da die Substanz 6-FDA mit DA um die Aufnahme an den gleichen Transportern konkurriert, wirkt sie als kompetitiver Hemmstoff. Über den Hemmeffekt kann somit indirekt die Aufnahme von 6-FDA über die verschiedenen Transporter in die getesteten Zelllinien ermittelt werden. Die direkt ermittelte 6-FDA Aufnahme wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht, da 6-[¹⁸F] FDA nicht zur Verfügung stand.

Für die Screeningversuche mit 6-FDA wurde eine Konzentrationsreihe von 2,5x10⁻⁷ mol/l bis 2,5x10⁻⁵ mol/l verwendet. Um diese Verdünnungsreihe herzustellen, wurde die 6-FDA-Lösung vor jedem Versuch frisch hergestellt. Dazu wurde als Lösungsmittel 0,01 M HCl verwendet, da 6-FDA bei neutralem pH äußerst oxidationsempfindlich ist [237].

Um die in den Abb. 14a-f dargestellten Hemmwirkungen des Inhibitors berechnen zu können, wurde der Wert der ungehemmten Aufnahme mit den Werten der [³H] DA Aufnahme in Anwesenheit von 6-FDA in Relation gesetzt. Die ungehemmten [³H] DA Aufnahmen pro 10⁶ Zellen in die verschiedenen Zelllinien, nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C, sind in Tab. 23 (S. 86) aufgeführt.

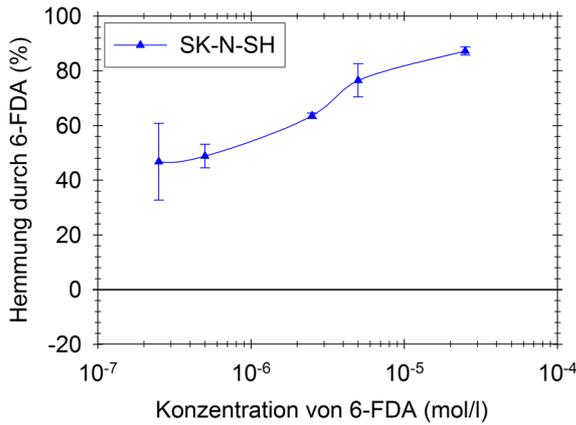


Abb. 14a: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher 6-FDA-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 SK-N-SH-Zellen.

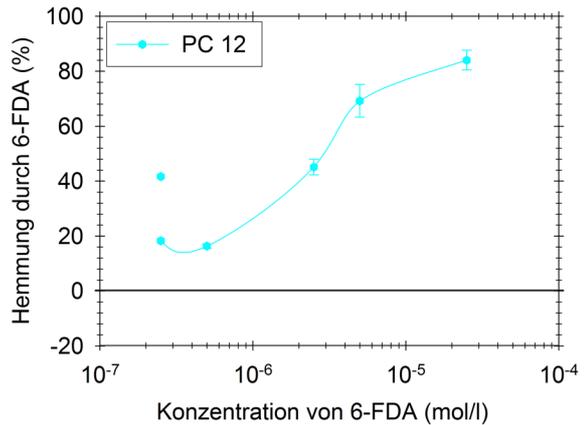


Abb. 14b: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher 6-FDA-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 PC 12-Zellen.

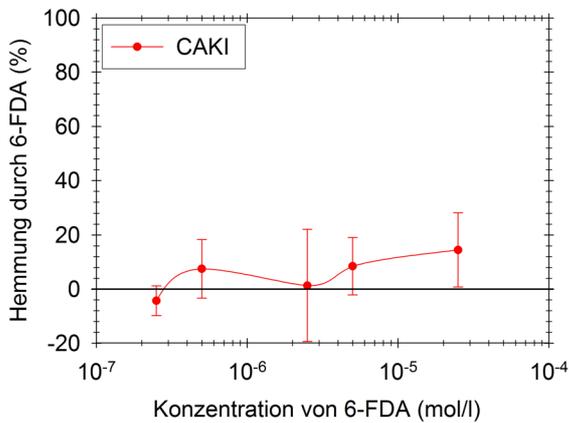


Abb. 14c: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher 6-FDA-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 CAKI-Zellen.

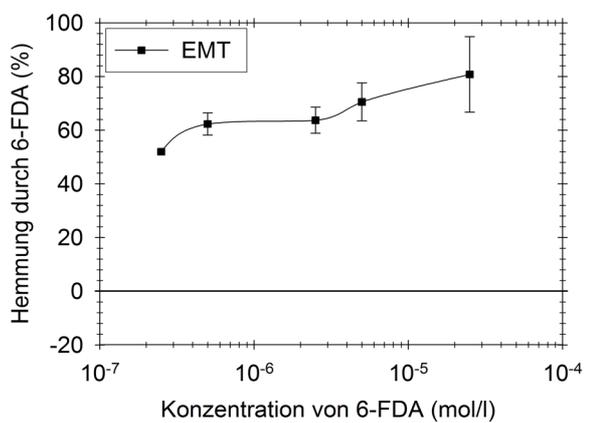


Abb. 14d: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher 6-FDA-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 EMT-Zellen.

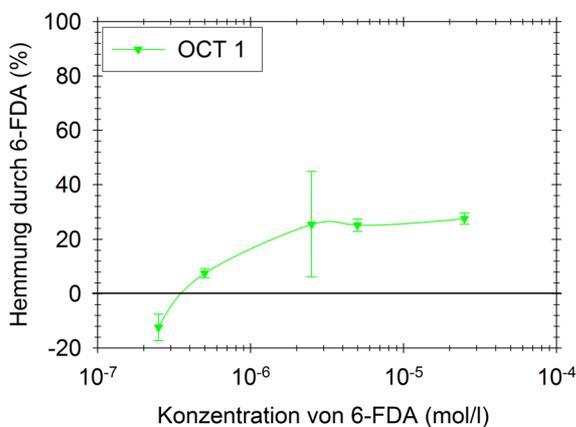


Abb. 14e: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher 6-FDA-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 1-Zellen.

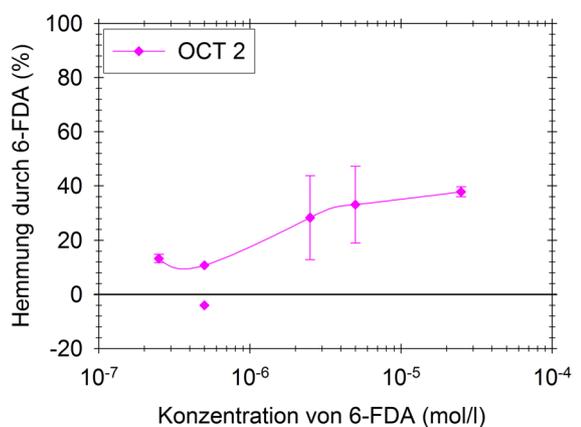


Abb. 14f: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher 6-FDA-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 2-Zellen.

Tab. 23: Ungehemmte Aufnahme von [³H] DA (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15-minütiger Inkubation, ausgehend vom Angebot im Reaktionsansatz.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
Mole im Ansatz ¹	5,6x10 ⁻¹¹					
Aufnahme (%) ²	1,9	1,5	0,7	0,3	0,2	0,8
Aufnahme (Mole) ³	1,1x10 ⁻¹²	8,4x10 ⁻¹³	3,9x10 ⁻¹³	1,7x10 ⁻¹³	1,1x10 ⁻¹³	4,5x10 ⁻¹³

¹ Die Menge an [³H] DA, die pro 500µl Reaktionsansatz angeboten wurde.

² Die in Prozent dargestellte Aufnahme an [³H] DA pro 10⁶ Zellen, wobei sich die Prozentangabe auf das im Ansatz vorliegende Angebot an [³H] DA bezieht.

³ Die pro 10⁶ Zellen aufgenommene Menge an [³H] DA.

Die [³H] DA Aufnahme in die neuronalen Zelllinien SK-N-SH und PC 12 sowie in die extraneuronale Zelllinie EMT wurde durch alle getesteten 6-FDA-Konzentrationen intensiv gehemmt, die mit zunehmender Konzentration stark anstieg. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration (2,5x10⁻⁵ mol/l) ist in den Abb. 14a,b,d noch kein Plateau der Kurve zu sehen. Das bedeutet, dass mit höheren 6-FDA-Konzentrationen eine noch stärkere Hemmung der [³H] DA Aufnahme in diese Zellen erreicht werden könnte. Wie in den Abb. 14e-f zu sehen ist, wurde die radioaktive Aufnahme in die OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierenden HEK 293-Zellen mit einem Hemmeffekt von maximal 38% wesentlich geringer inhibiert, während die CAKI-Zellen nahezu gar nicht durch die getesteten 6-FDA-Konzentrationen gehemmt wurden. Die aus den Abb. 14a-f ermittelten IC₅₀-Werte sind in Tab. 24 gezeigt.

Tab. 24: IC₅₀-Werte des Inhibitors 6-FDA.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
IC₅₀-Wert (6-FDA)	6,5x10 ⁻⁷ mol/l	3,0x10 ⁻⁶ mol/l	>2,5x10 ⁻⁵ mol/l	<2,5x10 ⁻⁷ mol/l	>2,5x10 ⁻⁵ mol/l	>2,5x10 ⁻⁵ mol/l

Vergleicht man die IC₅₀-Werte bei den 6 getesteten Zelllinien, so kann man folgende absteigende Reihenfolge erstellen: **EMT ≈ SK-N-SH > PC 12 >> OCT 2 ≈ OCT 1 > CAKI.**

4.3.3 Einfluss von Desipramin auf die Aufnahme von [³H] DA

Desipramin ist in der Literatur schon lange als Hemmstoff der Katecholaminaufnahme bekannt. Dabei wird der NAT spezifisch inhibiert, aber auch andere katecholamintransportierende Transportsysteme können von diesem Inhibitor gering blockiert werden.

Diese Substanz ist in die Wirkstoffklasse der Trizyklika einzuordnen, zu der u.a. noch Imipramin, Amitriptylin und Nortriptylin gehören. In der Klinik werden diese Substanzen v.a. zur Therapie von Depressionen eingesetzt, da sie durch Blockade der Serotonintransporter (SERT) und NAT an der Präsynapse die Konzentration von Serotonin, NA und DA im synaptischen Spalt erhöhen.

Unmittelbar vor der 15-minütigen Inkubation mit 1×10^{-7} mol/l [³H] DA wurden die unterschiedlichen Desipraminkonzentrationen (1×10^{-8} mol/l - 1×10^{-3} mol/l) den verschiedenen Zellsuspensionskulturen zugegeben.

Wie viele Mole [³H] DA bzw. wie viel Prozent des pro Reaktionsansatz angebotenen [³H] DAs in die verschiedenen Zellen transportiert wurde, ist in Tab. 25 zu sehen. Diese Werte stellen die Ausgangswerte zur Berechnung der Hemmeffekte von Desipramin dar.

Tab. 25: Ungehemmte Aufnahme von [³H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15-minütiger Inkubation, ausgehend vom Angebot im Reaktionsansatz.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
Mole im Ansatz¹	$5,6 \times 10^{-11}$					
Aufnahme (%)²	2,4	1,4	0,3	0,2	0,3	0,5
Aufnahme (Mole)³	$1,3 \times 10^{-12}$	$7,8 \times 10^{-13}$	$1,7 \times 10^{-13}$	$1,1 \times 10^{-13}$	$1,7 \times 10^{-13}$	$2,8 \times 10^{-13}$

¹ Die Menge an [³H] DA, die pro 500µl Reaktionsansatz angeboten wurde.

² Die in Prozent dargestellte Aufnahme an [³H] DA pro 10^6 Zellen, wobei sich die Prozentangabe auf das im Ansatz vorliegende Angebot an [³H] DA bezieht.

³ Die pro 10^6 Zellen aufgenommene Menge an [³H] DA.

Wie in nachfolgenden Abb. 15a+b zu sehen ist, wurde die Aufnahme von [³H] DA in die neuronalen Zelllinien SK-N-SH und PC 12 bei allen getesteten Desipraminkonzentrationen zu ca. 90% gehemmt.

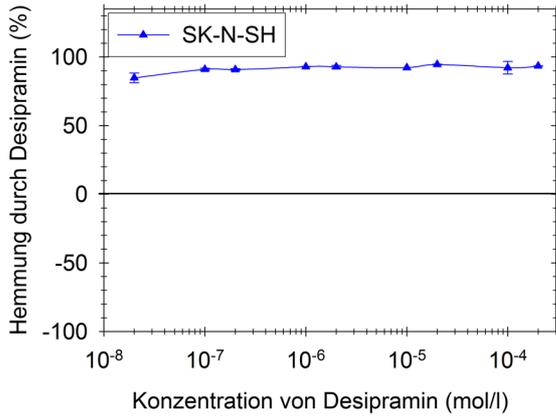


Abb. 15a: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Desipraminkonzentrationen auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in 10⁶ SK-N-SH-Zellen.

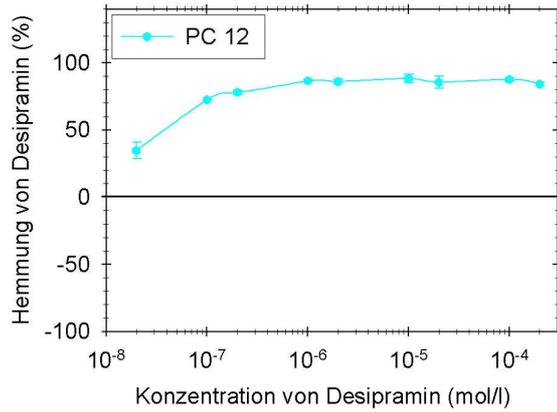


Abb. 15b: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Desipraminkonzentrationen auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in 10⁶ PC 12-Zellen.

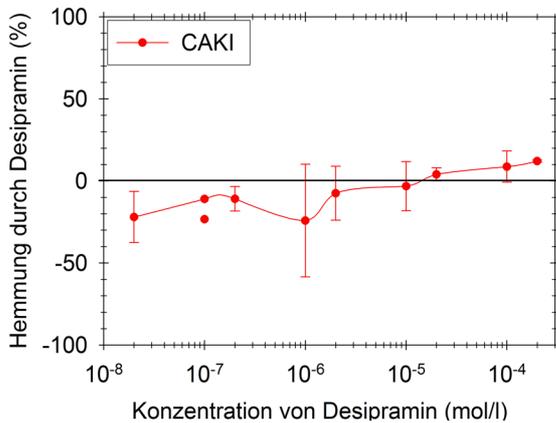


Abb. 15c: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Desipraminkonzentrationen auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in 10⁶ CAKI-Zellen.

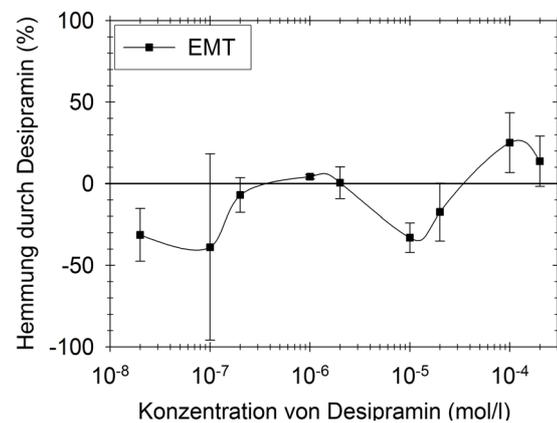


Abb. 15d: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Desipraminkonzentrationen auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in 10⁶ EMT-Zellen.

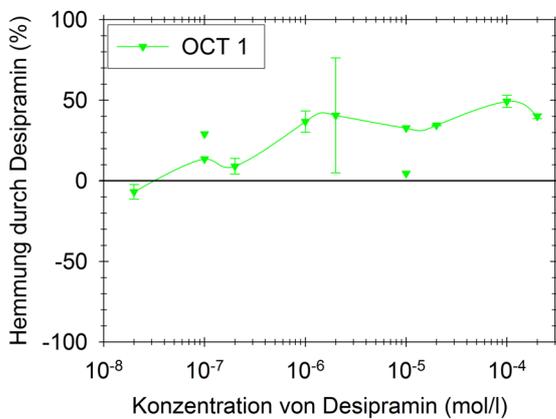


Abb. 15e: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Desipraminkonzentrationen auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in 10⁶ OCT 1-Zellen.

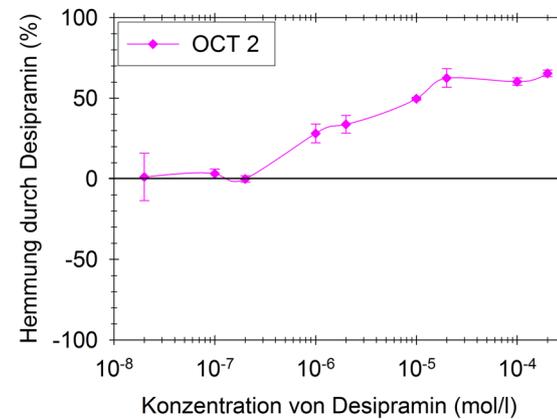


Abb. 15f: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Desipraminkonzentrationen auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in 10⁶ OCT 2-Zellen.

Wie aus den Abb. 15a-d ersichtlich ist, wurde die Aufnahme von [³H] DA in die extraneuronalen Zelllinien CAKI und EMT von Desipramin im Gegensatz zu den neuronalen Zelllinien (SK-N-SH und PC 12) bei allen eingesetzten Inhibitorkonzentrationen praktisch nicht gehemmt. Bei OCT 1- und OCT 2-Zellen (Abb. 15e+f) kam es ab ca. 2×10^{-6} mol/l zu ansteigenden Hemmeffekten, die bei 1×10^{-4} mol/l zwischen 50% und 65% lagen.

Tab. 26: IC₅₀-Werte des Inhibitors Desipramin.

	<i>SK-N-SH</i>	<i>PC 12</i>	<i>CAKI</i>	<i>EMT</i>	<i>OCT 1</i>	<i>OCT 2</i>
IC₅₀-Wert (Desipramin)	<2,0x10 ⁻⁸ mol/l	<2,0x10 ⁻⁸ mol/l	>2,0x10 ⁻⁴ mol/l	>2,0x10 ⁻⁴ mol/l	>2,0x10 ⁻⁴ mol/l	1,0x10 ⁻⁵ mol/l

Vergleicht man die in Tab. 26 aufgelisteten IC₅₀-Werte miteinander, so erkennt man deutlich, dass Desipramin nahezu ausschließlich SK-N-SH- und PC 12-Zellen hemmt. Zieht man zusätzlich die Hemmkurven der Abb. 15 a-f zum Vergleich hinzu, so lässt sich aus den getesteten Zelllinien folgende absteigende Reihenfolge für die Hemmeffekte von Desipramin auf deren [³H] DA Aufnahme erstellen: **SK-N-SH ≈ PC 12 >> OCT 2 > OCT 1 > EMT ≈ CAKI.**

4.3.4 Einfluss von Corticosteron

Das Corticosteroid Corticosteron ist in der Literatur u.a. als Substanz bekannt, die eine Aufnahme über extraneuronale Katecholamintransporter in verschiedene Zellen hemmt. In diesen Screeningversuchen sollte der Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme von [³H]-markierten Katecholaminen über die extraneuronalen Katecholamintransporter am Modell der CAKI-, EMT-, OCT 1- und OCT 2-Zelllinien im Vergleich zum Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme über neuronale Katecholamintransporter am Modell der SK-N-SH- und PC 12-Zelllinie, untersucht werden.

Eine spezifische Inhibition der extraneuronalen Katecholamintransporter hat als potentiell klinisches Ziel, die Aufnahme von radioaktiv markiertem mIBG bzw.

6-FDA gezielter über die neuronalen Katecholamintransporter in die Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomzellen zu lenken. Mit dem Hintergrund der wichtigen klinischen Bedeutung wurde daher der Effekt dieses Hemmstoffes auf die radioaktive Aufnahme in die verschiedenen Zellen besonders ausführlich getestet.

Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend dem Versuchsprotokoll für die Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen in Zellsuspensionen (Tab. 12, S. 50). Vor der 15-minütigen Inkubation bei 37°C mit $7,3 \times 10^{-11}$ Molen [^3H] DA pro Ansatz (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l), musste der Inhibitor Corticosteron, wie unter 2.4.3 (S. 39-40) ausführlich beschrieben, in geeigneter Weise vorbereitet werden.

Da sich das Lyophilisat von Corticosteron nicht vollständig in ddH₂O löste, musste als Lösungsmittel das zelltoxische DMSO verwendet werden. In den jeweiligen Versuchen wurde dementsprechend als Kontrolle die höchste verwendete DMSO-Konzentration (1,2%) mitgeführt, um einen Einfluss auf die Katecholamin- bzw. mIBG Aufnahme auszuschließen bzw. festzustellen. In einer zusätzlichen Versuchsreihe, deren Ergebnisse nachfolgend in Kapitel 4.3.4.1 dargestellt sind, wurde der Einfluss von unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen auf die [^3H] DA Aufnahme getestet. Über die Lagerungsfähigkeit von gelöstem Corticosteron bestanden in unserem Labor noch keine Erfahrungen. Um zu vermeiden, dass Corticosteron an jedem Versuchstag frisch in DMSO gelöst werden musste, wurde der Einfluss der Lagerung des gelösten Corticosterons bei 4°C auf seine biologische Wirksamkeit deshalb systematisch untersucht. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in diesem Kapitel unter 4.3.4.2 beschrieben. Unter 4.3.4.3 ist der Einfluss unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die [^3H] DA Aufnahme in die verschiedenen Zellen erläutert. Für diese Screeningversuche wurde eine Verdünnungsreihe des Inhibitors mit Endkonzentrationen zwischen 1×10^{-8} mol/l und 1×10^{-3} mol/l verwendet. Auf Grund der Wichtigkeit dieses Hemmstoffes wurde mit Corticosteron vergleichend der Einfluss verschiedener Substrate auf den Hemmeffekt von Corticosteron untersucht. Dabei wurde das Substrat [^3H] DA mit [^3H] NA verglichen. Diese Ergebnisse sind unter 4.3.4.4 aufgeführt.

4.3.4.1 Einfluss des Corticosteronlösungsmittels Dimethylsulfoxid

Das zelltoxische Lösungsmittel wurde bei der Herstellung der Corticosteronstammlösung zur Lösung des Lyophilisats benötigt. Dazu wurden, wie in Tab. 8 (S. 40) aufgelistet, 0,6ml DMSO sowie 0,4ml ddH₂O verwendet. Dies entspricht in 500µl Reaktionsansatz einer 1,2%-igen DMSO-Konzentration und war die höchste in den Versuchen eingesetzte Konzentration. Da die Stammlösung für die Konzentrationsreihe des Corticosterons mit ddH₂O weiterverdünnt wurde, nahm die DMSO-Konzentration dementsprechend ab. Die f.c. von DMSO im Reaktionsansatz bei den jeweiligen Corticosteronkonzentrationen sind in Tab. 27 aufgeführt.

Tab. 27: f.c. von DMSO im Reaktionsansatz bei den entsprechenden Corticosteronkonzentrationen.

<i>f.c. von Corticosteron (in mol/l)</i>	<i>f.c. von DMSO (in %)</i>	<i>f.c. von Corticosteron (in mol/l)</i>	<i>f.c. von DMSO (in %)</i>
1×10^{-3} mol/l	1,2%	1×10^{-6} mol/l	0,0012%
1×10^{-4} mol/l	0,12%	5×10^{-7} mol/l	0,0006%
1×10^{-5} mol/l	0,012%	1×10^{-7} mol/l	0,00012%
5×10^{-6} mol/l	0,006%	5×10^{-8} mol/l	0,00006%

In den nachfolgenden Abbildungen 16a-c und 16e erkennt man, dass DMSO in den jeweilig getesteten Konzentrationen praktisch keinen Einfluss auf die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH-, PC 12-, CAKI- und OCT 1-Zellen hat.

Wie in den Abb. 16d und 16f zu sehen ist, hat DMSO in allen verwendeten Konzentrationen eine Hemmwirkung auf die [³H] DA Aufnahme von ca. 15% bei den EMT-Zellen und von ca. 35-40% bei den OCT 2-Zellen. Diese Effekte des DMSO müssen bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden.

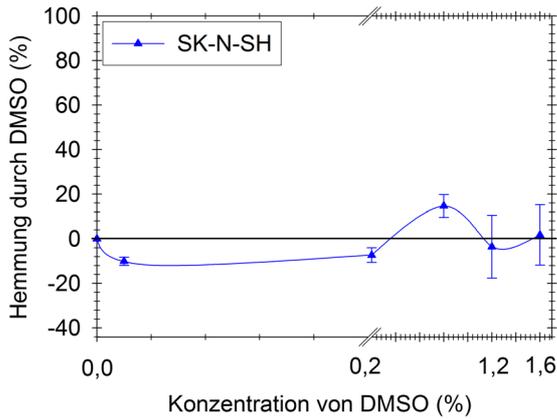


Abb. 16a: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 SK-N-SH-Zellen.

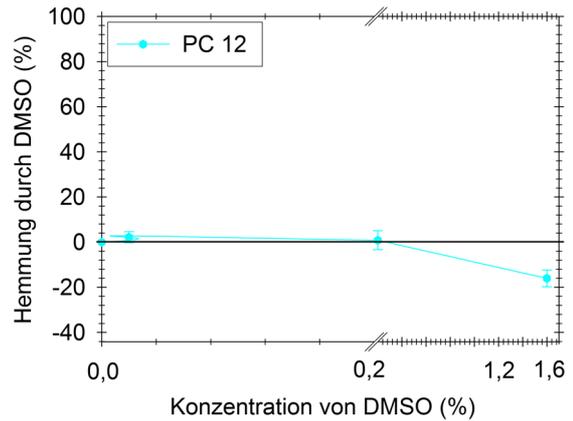


Abb. 16b: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 PC 12-Zellen.

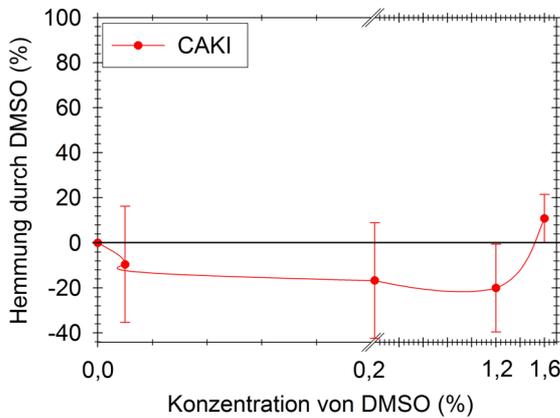


Abb. 16c: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 in CAKI-Zellen.

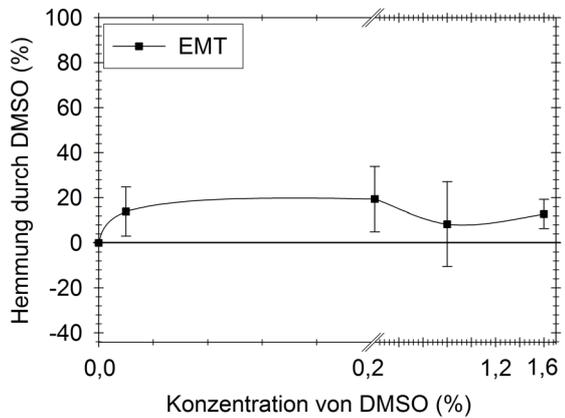


Abb. 16d: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 EMT-Zellen.

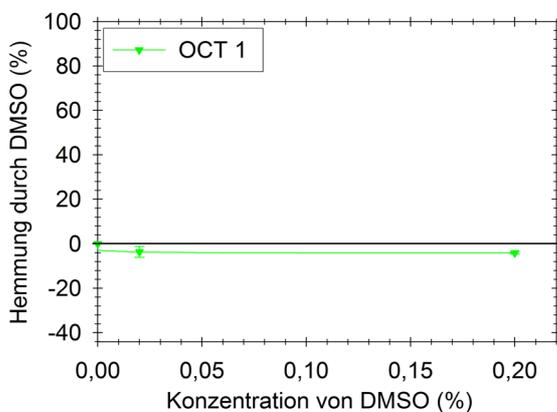


Abb. 16e: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 1-Zellen.

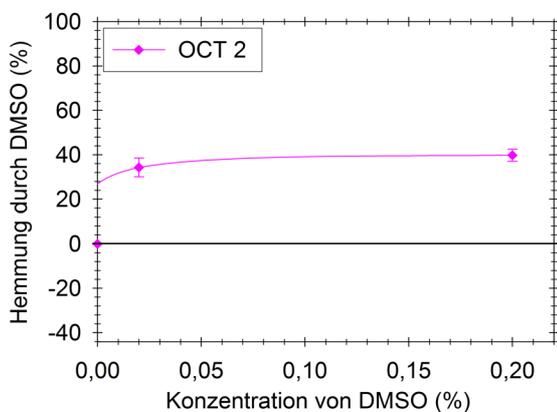


Abb. 16f: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 2-Zellen.

4.3.4.2 Einfluss der Lagerung bei 4°C auf die biologische Wirksamkeit von gelöstem Corticosteron

In dieser Arbeit wurde die Stammlösung und die Verdünnungsreihe von Corticosteron an jedem Versuchstag neu hergestellt, da in unserem Labor keine Erfahrungen zur Stabilität von gelagerten Corticosteronlösungen vorlagen. Damit für zukünftige Versuche nicht an jedem Versuchstag eine frische Corticosteronlösung angesetzt werden muss, wurde die Lagerungsfähigkeit von gelöstem Corticosteron in verschiedenen Konzentrationen getestet.

Dafür wurden die Zentrifugenröhrchen mit den Corticosteronlösungen, wie bereits unter 3.5.2.5 (S. 53) beschrieben, in Aluminiumfolie lichtgeschützt verpackt und im Kühlschrank bei 4°C für 7 bzw. 76 Tage aufbewahrt.

Die Hemmeffekte dieser gelagerten Corticosteronlösungen sind in Abb. 17 mit den Hemmeffekten der frisch hergestellten Corticosteronlösungen an zwei unterschiedlichen Zelllinien (EMT und OCT 2) vergleichend dargestellt.

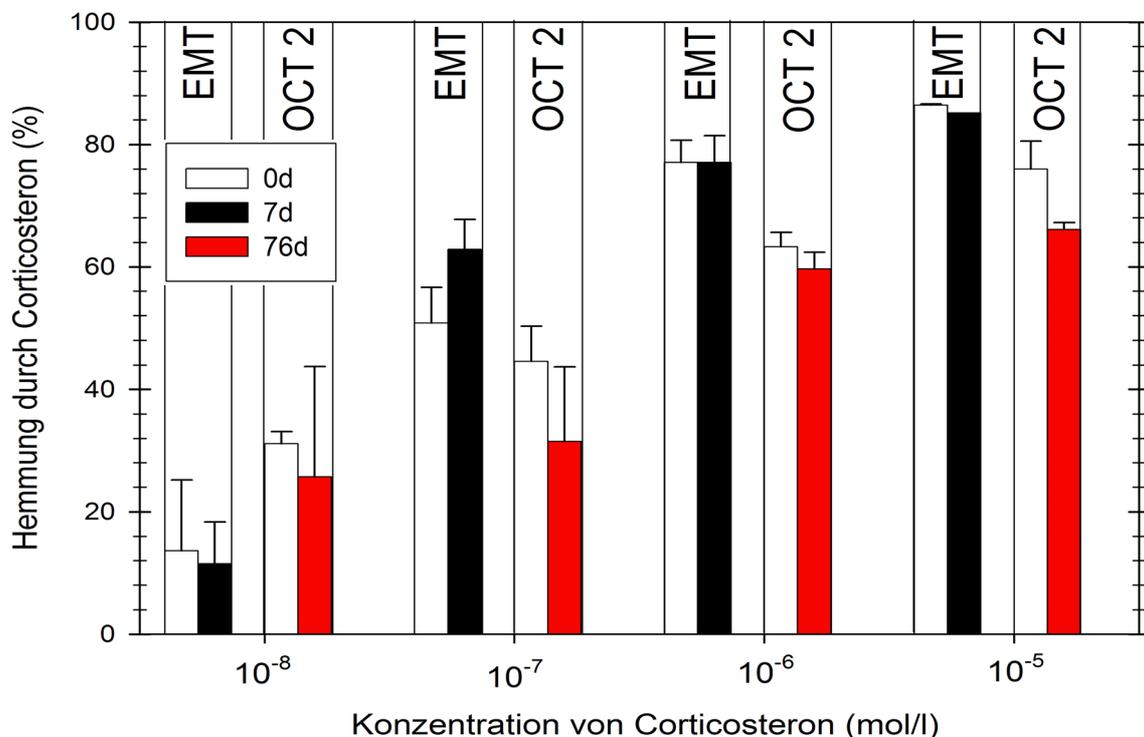


Abb. 17: Einfluss von bei 4°C gelagertem, gelöstem Corticosteron auf die Wirksamkeit. Die Hemmeffekte (in%) verschiedener Corticosteronkonzentrationen auf die [3 H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 EMT-Zellen wurden nach 7 Tagen Lagerung, die auf 10^6 OCT 2-Zellen nach 76-tägiger Lagerung im Vergleich zu frisch gelöstem Corticosteron untersucht. d = Anzahl der Tage, die das Corticosteron gelöst und gekühlt gelagert wurde.

In Abb. 17 kann man erkennen, dass bei den Versuchen mit EMT- und OCT 2-Zellen praktisch kein Unterschied in den Hemmeffekten zwischen frisch hergestelltem und 7 bzw. 76 Tage gelagertem Corticosteron bestand. Die Mittelwertsdifferenzen zwischen den Hemmeffekten des frischen und des gelagerten Corticosterons lagen zwischen 0,05% und 13,13%.

Aus obiger Abb. 17 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Konzentration, in der das Corticosteron gelagert wurde, keinen Einfluss auf einen Unterschied in der Hemmwirkung von frischem und gelagertem Corticosteron hatte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Corticosteronlösungen bei 4°C gekühlt und lichtgeschützt mindestens 2 Monate ohne Funktionsverlust gelagert werden können.

4.3.4.3 Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme von [³H] DA

Bevor die Hemmeffekte des Inhibitors auf die [³H] DA Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien in den Abb. 18a-f (S. 95) gezeigt werden, sollen zunächst in einer Übersicht (Tab. 28) die ungehemmten [³H] DA Aufnahmen pro 10⁶ Zellen der jeweiligen Zelllinien aufgeführt werden, die als Ausgangswert zur Berechnung des Corticosteronhemmeffektes benötigt wurden.

Tab. 28: Ungehemmte Aufnahme von [³H] DA (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15-minütiger Inkubation, ausgehend vom Angebot im Reaktionsansatz.

	<i>SK-N-SH</i>	<i>PC 12</i>	<i>CAKI</i>	<i>EMT</i>	<i>OCT 1</i>	<i>OCT 2</i>
Mole im Ansatz ¹	5,6x10 ⁻¹¹					
Aufnahme (%) ²	2,5	4,4	0,4	0,4	0,4	0,6
Aufnahme (Mole) ³	1,4x10 ⁻¹²	2,5x10 ⁻¹²	2,2x10 ⁻¹³	2,2x10 ⁻¹³	2,2x10 ⁻¹³	3,4x10 ⁻¹³

¹ Die Menge an [³H] DA, die pro 500µl Reaktionsansatz angeboten wurde.

² Die in Prozent dargestellte Aufnahme an [³H] DA pro 10⁶ Zellen, wobei sich die Prozentangabe auf das im Ansatz vorliegende Angebot an [³H] DA bezieht.

³ Die pro 10⁶ Zellen aufgenommene Menge an [³H] DA.

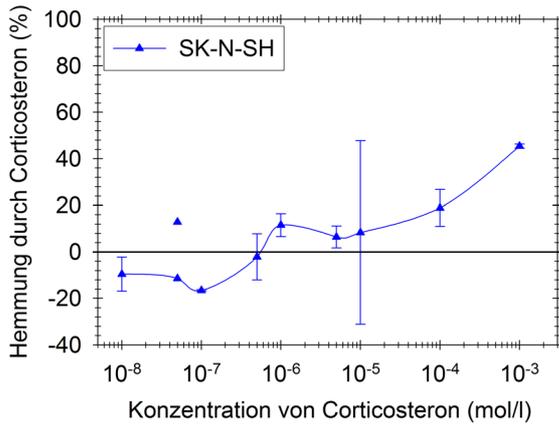


Abb. 18a: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 SK-N-SH-Zellen.

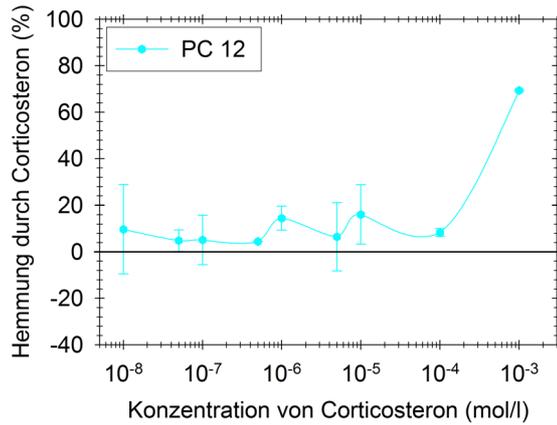


Abb. 18b: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 PC 12-Zellen.

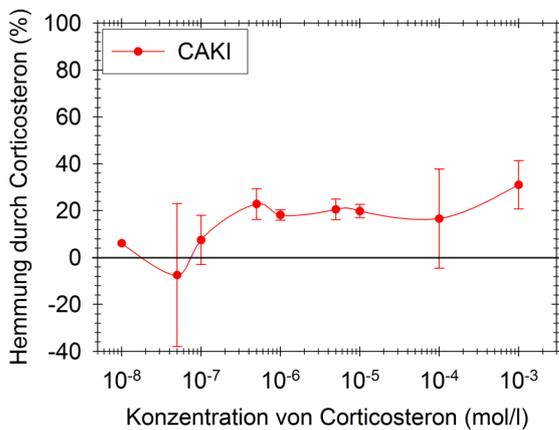


Abb. 18c: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 CAKI-Zellen.

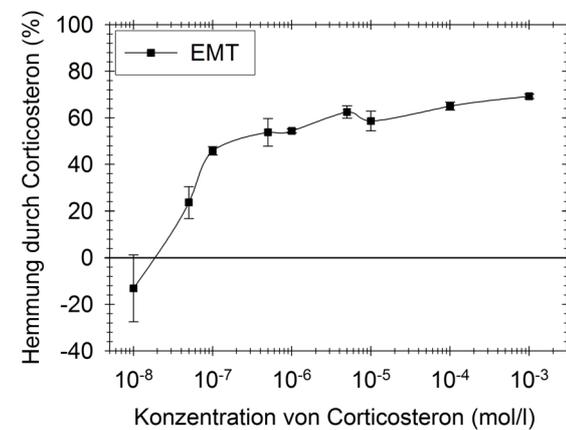


Abb. 18d: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 EMT-Zellen.

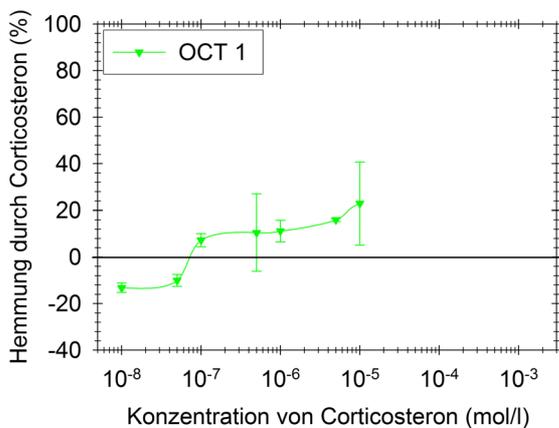


Abb. 18e: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 1-Zellen.

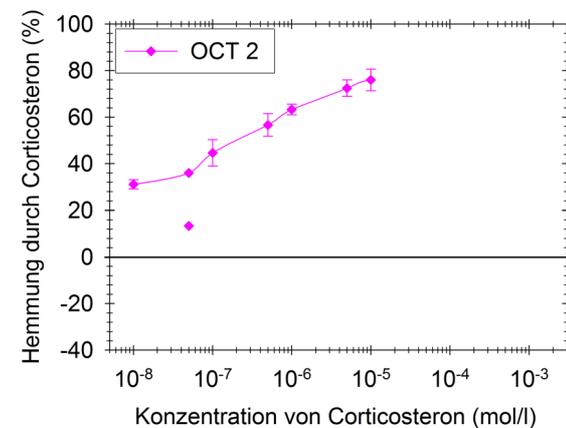


Abb. 18f: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 2-Zellen.

In den Abb. 18a+b kann man gut sehen, dass die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH- und PC 12-Zellen über die neuronalen Transporter bis zu einer Konzentration von ca. 1×10^{-4} mol/l nahezu nicht gehemmt wurde. Erst bei der höchsten getesteten Konzentration (1×10^{-3} mol/l) trat eine deutliche Inhibition auf. Im Gegensatz dazu ist bei den extraneuronalen EMT- bzw. OCT 2-Zellen schon ab einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l ein starker Hemmeffekt zu erkennen (Abb. 18d+f). Einen deutlich geringeren Hemmeffekt von max. 31% zeigten die extraneuronalen CAKI- und OCT 1-Zellen, welche die [³H] DA Aufnahme erst ab einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l inhibierten (Abb. 18 c+e).

Tab. 29: IC₅₀-Werte des Inhibitors Corticosteron.

	<i>SK-N-SH</i>	<i>PC 12</i>	<i>CAKI</i>	<i>EMT</i>	<i>OCT 1</i>	<i>OCT 2</i>
IC₅₀-Wert (Corticosteron)	$>1,0 \times 10^{-3}$ mol/l	$5,0 \times 10^{-4}$ mol/l	$>1,0 \times 10^{-3}$ mol/l	$2,0 \times 10^{-7}$ mol/l	$>1,0 \times 10^{-3}$ mol/l	$2,5 \times 10^{-7}$ mol/l

Bezogen auf die IC₅₀-Werte des Inhibitors Corticosteron (Tab. 29) in Kombination mit den Abb. 18a-f kann man folgende Reihe der 6 getesteten Zelllinien erstellen, welche die Stärke des Corticosteronhemmeffektes auf die [³H] DA Aufnahme anzeigt: **EMT ≈ OCT 2 >> PC 12 ≈ CAKI > OCT 1 ≈ SK-N-SH.**

4.3.4.4 Vergleich des Einflusses von Corticosteron auf die Aufnahme von [³H] DA mit dem auf die Aufnahme von [³H] NA

Ähnlich wie unter 4.3.1.2 (S. 81-84) wurde auch bei diesen Screeningversuchen untersucht, ob das Substrat einen Einfluss auf den Hemmeffekt von Corticosteron hat. Dazu wurde [³H] DA bzw. [³H] NA (f.c. ≈ 1×10^{-7} mol/l) 15 min bei 37°C angeboten und dann der Effekt von Corticosteron auf die jeweilige radioaktive Aufnahme verglichen. Allerdings wurde diese Versuchsreihe nicht wie bei den mIBG-Versuchen (4.3.1.2) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, sondern mit unterschiedlichen Corticosteronkonzentrationen (1×10^{-8} mol/l - $1,0 \times 10^{-3}$ mol/l) durchgeführt. Die ungehemmte Aufnahme ist in Tab. 30 zu sehen.

Tab. 30: Ungehemmte Aufnahme von [³H]-markierten Katecholaminen (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15-minütiger Inkubation.

	SK-N-SH	CAKI	EMT	SK-N-SH	CAKI	EMT
	[³H] DA Aufnahme			[³H] NA Aufnahme		
Mole im Ansatz¹	6,3x10 ⁻¹¹	6,0x10 ⁻¹¹	5,9x10 ⁻¹¹	7,6x10 ⁻¹¹	9,4x10 ⁻¹¹	7,6x10 ⁻¹¹
Aufnahme (%)²	4,1	0,4	0,4	3,1	0,3	0,3
Aufnahme (Mole)³	2,6x10 ⁻¹²	2,4x10 ⁻¹²	2,4x10 ⁻¹³	2,4x10 ⁻¹²	2,8x10 ⁻¹³	2,3x10 ⁻¹³

¹ Die Menge an [³H] DA, die pro 500µl Reaktionsansatz angeboten wurde.

² Die in Prozent dargestellte Aufnahme an [³H] DA pro 10⁶ Zellen, wobei sich die Prozentangabe auf das im Ansatz vorliegende Angebot an [³H] DA bezieht.

³ Die pro 10⁶ Zellen aufgenommene Menge an [³H] DA.

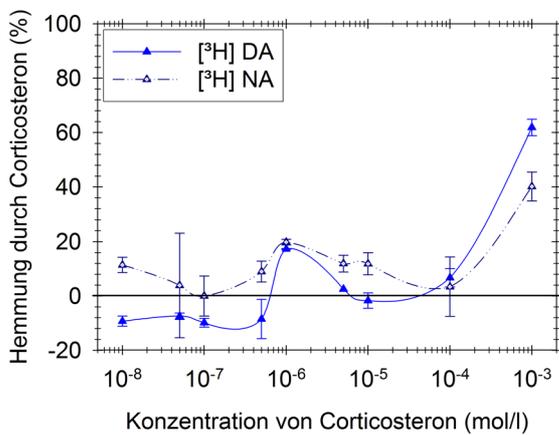


Abb. 19a: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die [³H] Katecholaminaufnahme (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ **SK-N-SH-Zellen**. Vergleich der Hemmeffekte in Abhängigkeit vom Substrat ([³H] DA vs. [³H] NA).

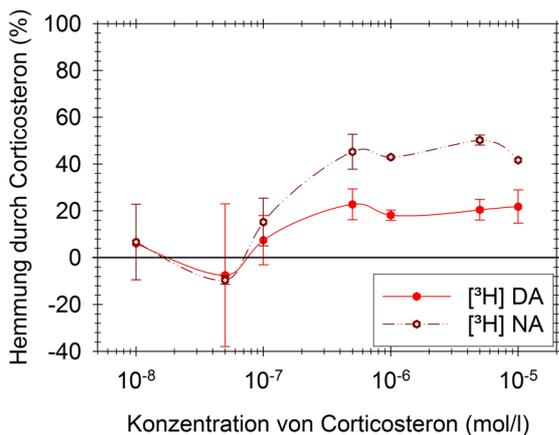


Abb. 19b: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die [³H] Katecholaminaufnahme (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ **CAKI-Zellen**. Vergleich der Hemmeffekte in Abhängigkeit vom Substrat ([³H] DA vs. [³H] NA).

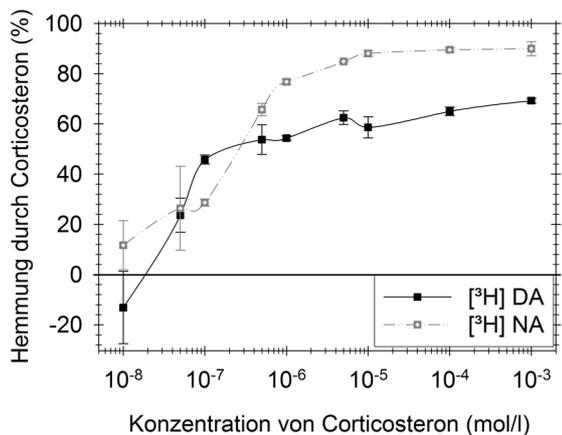


Abb. 19c: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher Corticosteronkonzentrationen auf die [³H] Katecholaminaufnahme (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) in 10⁶ **EMT-Zellen**. Vergleich der Hemmeffekte in Abhängigkeit vom Substrat ([³H] DA vs. [³H] NA).

In Abb. 19a sind die Hemmwirkungen auf die [³H] Katecholaminaufnahme in SK-N-SH-Zellen bei verschiedenen Corticosteronkonzentrationen dargestellt. Vergleicht man nun die Hemmeffekte auf die [³H] DA Aufnahme mit denen auf die [³H] NA Aufnahme, so kann man feststellen, dass nahezu kein Unterschied bestand. Corticosteron hemmte bis zu einer Konzentration von 1×10^{-4} mol/l weder die Aufnahme von [³H] DA, noch die von [³H] NA. Erst bei einer Inhibitorkonzentration von 1×10^{-3} mol/l wurde die [³H] Katecholaminaufnahme gehemmt, wobei die [³H] DA Aufnahme von 10^{-4} M Corticosteron ca. 1,5x stärker inhibiert wurde als die [³H] NA Aufnahme.

Werden die Hemmeffekte von Corticosteron auf die [³H] DA Aufnahme mit denen auf die [³H] NA Aufnahme bei der CAKI-Zelllinie verglichen, so kann man in Abb. 19b sehen, dass bei den zwei niedrigsten verwendeten Konzentrationen (1×10^{-8} mol/l, 5×10^{-8} mol/l) keine Hemmung auftrat. Ab einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l wurde die [³H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen von Corticosteron zunehmend stärker gehemmt als die [³H] DA Aufnahme. Im untersuchten Konzentrationsbereich bestand ein maximaler Unterschied des Hemmeffektes von 30%, d.h. Corticosteron hemmte die radioaktive Aufnahme um das 2,5-fache besser, wenn als Substrat NA angeboten wurde.

In Abb. 19c ist die Hemmung der Aufnahme von [³H]-markierten Katecholaminen in EMT-Zellen durch den Inhibitor Corticosteron zu sehen. Ab einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l wurde die [³H] NA Aufnahme in EMT-Zellen durch Corticosteron zu 12-30% besser gehemmt als die [³H] DA Aufnahme. Das entsprach einem bis zu 1,7-fach stärkeren Hemmeffekt von Corticosteron, wenn [³H] NA zur Aufnahme angeboten wurde.

Zusammenfassend kann man bei allen 3 getesteten Zelllinien als Trend einen stärkeren Hemmeffekt auf die [³H] NA als auf die [³H] DA Aufnahme erkennen.

4.3.5 Einfluss von GBR-12909 auf die Aufnahme von [³H] DA

Wie in Abb. 19b (S. 97) zu sehen ist und in Kapitel 4.3.4.4 (S. 96-98) bereits beschrieben wurde, wurde die [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen durch

Corticosteron um bis zu 2,5x schlechter gehemmt als die [³H] NA Aufnahme. Mögliche Ursachen dafür werden im Diskussionsteil unter 5.6 (S. 189) genauer erläutert. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass CAKI-Zellen neben einem EMT einen weiteren Katecholamintransporter auf ihrer Oberfläche präsentieren, der v.a. DA transportiert. Unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Bruchelt (Kuçi et al.) mit fluoreszierenden Antikörpern gegen DAT ergaben bei CAKI-Zellen einen Hinweis auf die Expression von DAT.

Unter dieser Annahme wurde eine Versuchsreihe mit GBR-12909 durchgeführt. Diese Substanz ist neben GBR-12783, Mazindol und Nomifessin in der Literatur als spezifischer Hemmstoff des DAT bekannt. Ziel dieser Screeningversuche war es, über den Hemmeffekt von GBR-12909 indirekt eine Aussage darüber zu erhalten, ob und wie viele DAT auf den untersuchten Zelllinien exprimiert sind.

Zur korrekten Ermittlung des Hemmeffektes von GBR-12909 musste das Lyophilisat dieser Substanz in geeigneter Weise (2.4.3, S. 39-40) vorbereitet werden. Dazu wurde es in Aqua bidest gelöst und weiter verdünnt, so dass für diese Untersuchungsreihe 5 verschiedene Konzentrationen an GBR-12909 zur Verfügung standen (1×10^{-9} mol/l - 1×10^{-5} mol/l).

Für die Berechnung der Hemmeffekte wurde die Aufnahme an [³H] DA in die verschiedenen Zelllinien in Abwesenheit des Inhibitors GBR-12909 benötigt. In Tab. 31 ist deshalb die Menge aufgelistet, die nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 37°C in 10^6 Zellen transportiert wurde.

Tab. 31: Ungehemmte Aufnahme von [³H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15-minütiger Inkubation in Abwesenheit von GBR-12909, ausgehend vom Angebot im Reaktionsansatz.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI
Mole im Ansatz¹	$5,6 \times 10^{-11}$		
Aufnahme (%)²	2,1	2,1	0,7
Aufnahme (Mole)³	$1,2 \times 10^{-12}$	$1,2 \times 10^{-12}$	$3,9 \times 10^{-13}$

¹ Die Menge an [³H] DA, die pro 500µl Reaktionsansatz angeboten wurde.

² Die in Prozent dargestellte Aufnahme an [³H] DA pro 10^6 Zellen, wobei sich die Prozentangabe auf das im Ansatz vorliegende Angebot an [³H] DA bezieht.

³ Die pro 10^6 Zellen aufgenommene Menge an [³H] DA.

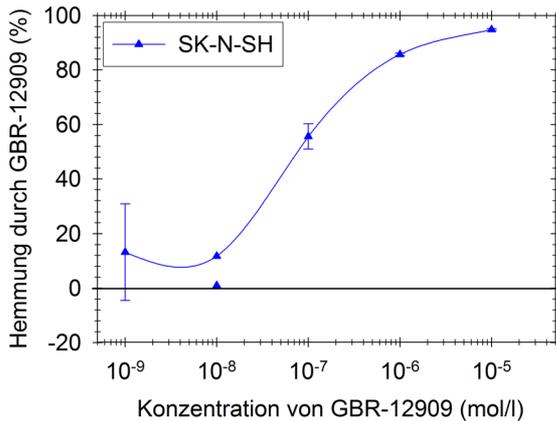


Abb. 20a: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher GBR-12909-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 **SK-N-SH-Zellen**.

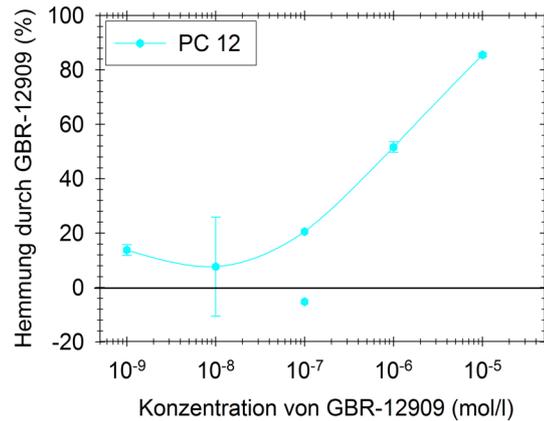


Abb. 20b: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher GBR-12909-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 **PC 12-Zellen**.

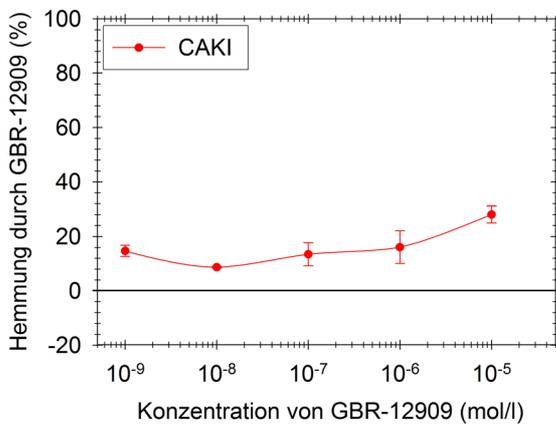


Abb. 20c: Hemmwirkung (in %) unterschiedlicher GBR-12909-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 **CAKI-Zellen**.

Wie aus Abb. 20a ersichtlich, lag bis zu einer Konzentration von 1×10^{-8} mol/l eine Hemmung der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen von unter 13% vor, die dann steil anstieg. Bei der höchsten verwendeten GBR-12909-Konzentration (1×10^{-5} mol/l) betrug die Hemmung der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme 95%. Ein ähnlicher Kurvenverlauf lässt sich in Abb. 20b erkennen. Bei Konzentrationen bis 1×10^{-7} mol/l blieb die Hemmung der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in PC 12-Zellen unter 20%. Bei höheren Konzentrationen stieg der Hemmeffekt von GBR-12909 auf die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme stark an und betrug bei einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l 85%. Die Hemmwirkung von GBR-12909 bei CAKI-Zellen (Abb. 20c) war im Gegensatz zu SK-N-SH und PC 12-Zellen nur schwach ausgeprägt. Erst bei einer hohen Konzentration sah man eine Hemmung von 28%, die durch eine Erhöhung der Konzentrationen wahrscheinlich auch nicht mehr viel weiter gesteigert werden kann.

Tab. 32: IC₅₀-Werte des Inhibitors GBR-12909.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI
IC₅₀-Wert (GBR-12909)	8,0x10 ⁻⁸ mol/l	9,0x10 ⁻⁷ mol/l	>1,0x10 ⁻⁵ mol/l

Bezogen auf die IC₅₀-Werte der Tab. 32, die aus den Abb. 20a-c graphisch ermittelt wurden, lassen sich die Zelllinien nach der Stärke des Hemmeffektes von GBR-12909 folgendermaßen anordnen: **SK-N-SH > PC 12 >> CAKI**.

4.3.6 Vergleich der Hemmeffekte von GBR-12909 und Corticosteron als Einzelinhibitoren mit denen als Kombinationsinhibitoren auf die Aufnahme von [³H] DA

Da auf der CAKI-Zelloberfläche wahrscheinlich zwei verschiedene Katecholamintransportsysteme exprimiert sind, die evt. durch unterschiedliche Inhibitoren blockiert werden, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Anhand dieser Versuche sollte herausgefunden werden, ob eine Kombination zweier verschiedener spezifischer Inhibitoren, nämlich Corticosteron und GBR-12909, die Aufnahme von [³H] DA in CAKI Zellen besser hemmt als eine alleinige Inhibition durch Corticosteron oder GBR-12909. Als Kontrolle wurden SK-N-SH- und PC 12-Zellen mitgeführt, deren [³H] DA Aufnahme durch die Hemmstoffe nicht inhibiert werden sollten.

Der Versuch wurde entsprechend dem Protokoll der Tab. 12 (S. 50) durchgeführt. Hierbei wurden den Zellen während einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 37°C pro Ansatz jeweils 5,6x10⁻¹¹ Mole [³H] DA angeboten, das einer f.c. von etwa 1x10⁻⁷ mol/l in 500µl Reaktionsansatz entsprach.

Bei diesen Versuchen nahmen die CAKI-Zellen ohne Anwesenheit eines Inhibitors ca. 0,9% der angebotenen Mole [³H] DA auf. Ist ausschließlich der Inhibitor GBR-12909 im Inkubationspuffer enthalten, so wurden nur noch 0,8% des angebotenen [³H] DA aufgenommen. Dies entspricht einer Hemmung von ca. 10%, die in nachfolgender Abb. 21 zu sehen ist und auch schon unter 4.3.5

(S. 98-101) beschrieben wurde. Mit einem Rückgang der [^3H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen auf 0,6% in Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron betrug der Hemmeffekt 34%. Desweiteren kann man aus der Abb. 21 erkennen, dass eine Kombination der Inhibitoren Corticosteron und GBR-12909, im Vergleich zur alleinigen Verwendung von Corticosteron, keine verstärkte Hemmung der [^3H] DA Aufnahme in die CAKI-Zellen zur Folge hatte. Die als Kontrolle mitgeführten SK-N-SH- und PC 12-Zellen wurden von den gewählten Inhibitor-konzentrationen nicht gehemmt.

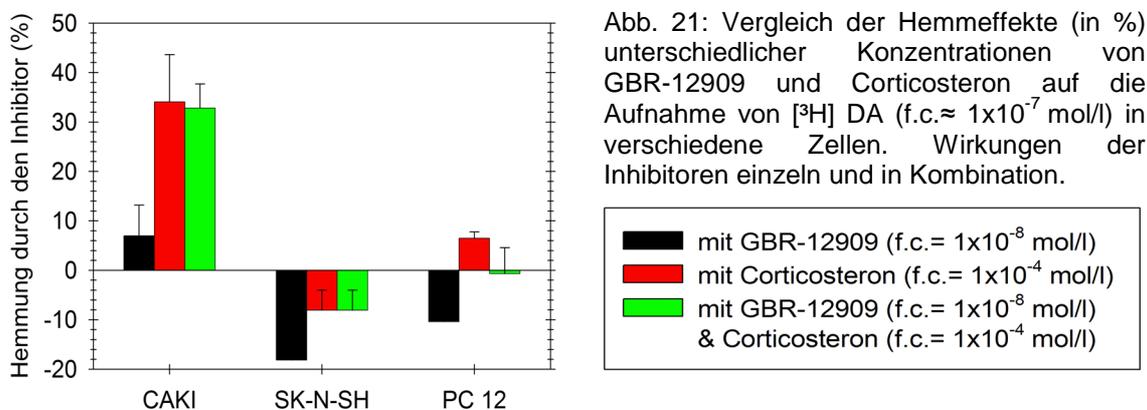


Abb. 21: Vergleich der Hemmeffekte (in %) unterschiedlicher Konzentrationen von GBR-12909 und Corticosteron auf die Aufnahme von [^3H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in verschiedene Zellen. Wirkungen der Inhibitoren einzeln und in Kombination.

Die in Abb. 21 dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass [^3H] DA in CAKI-Zellen wahrscheinlich nicht nennenswert über den DAT aufgenommen wird.

4.3.7 Zusammenfassender Vergleich der Hemmeffekte unterschiedlicher Konzentrationen von verschiedenen Inhibitoren auf die Aufnahme von [^3H] DA

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse dargestellt, die in den Kapiteln 4.3.1.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4.3 und 4.3.5 zu sehen sind und bereits ausführlich beschrieben wurden. Dort wurde aber die Hemmwirkung eines Inhibitors auf verschiedene Zelllinien verglichen. In den Abbildungen 22a-f hingegen sind die Hemmeffekte aller untersuchten Inhibitoren auf jeweils eine Zelllinie dargestellt.

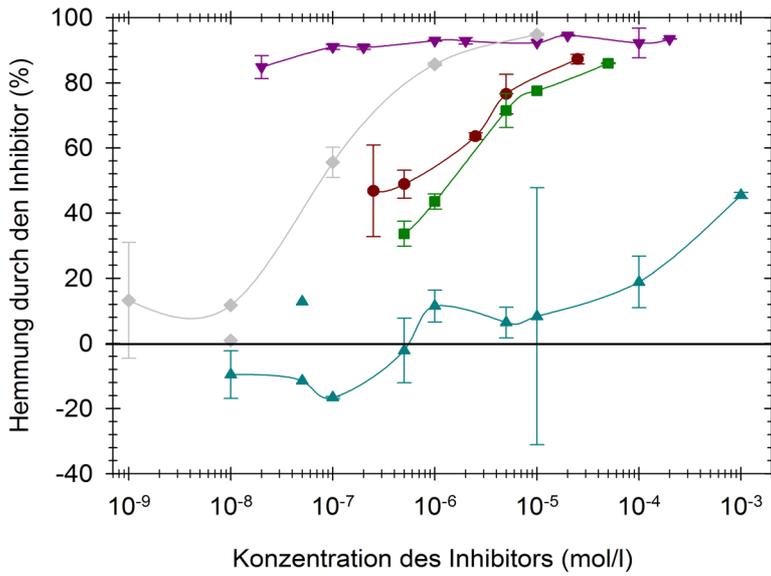


Abb. 22a: Vergleich der Hemmwirkungen (in %) unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 SK-N-SH-Zellen.

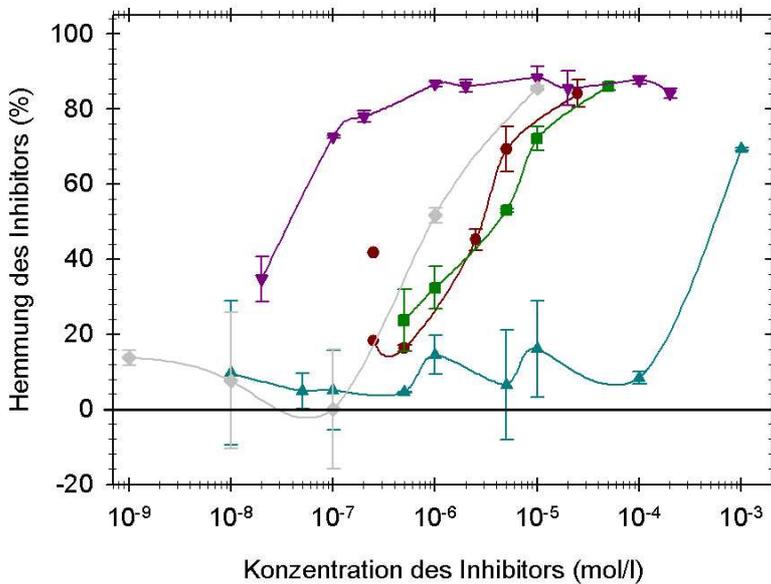
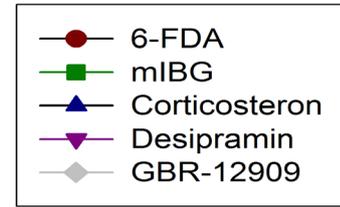


Abb. 22b: Vergleich der Hemmwirkungen (in %) unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 PC 12-Zellen.

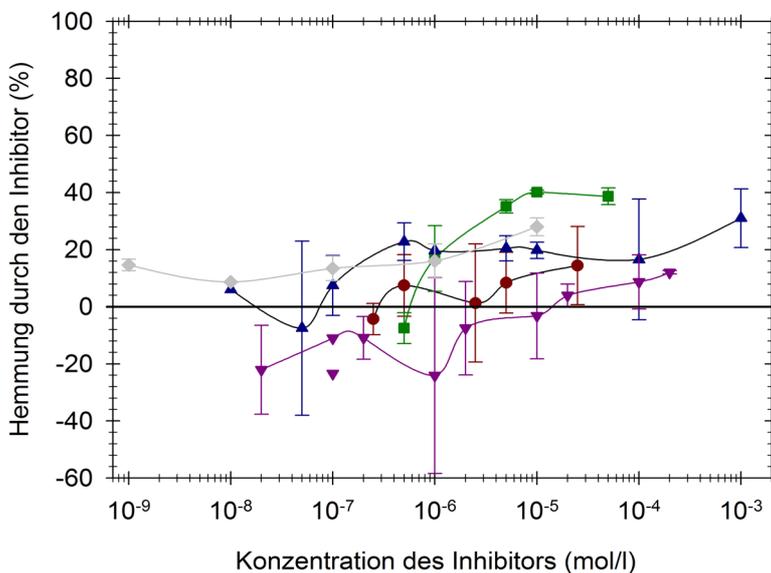
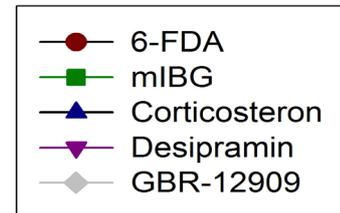
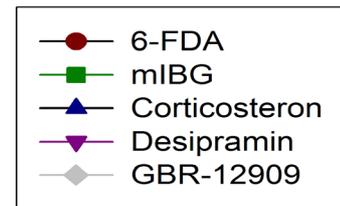


Abb. 22c: Vergleich der Hemmwirkungen (in %) unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 CAKI-Zellen.



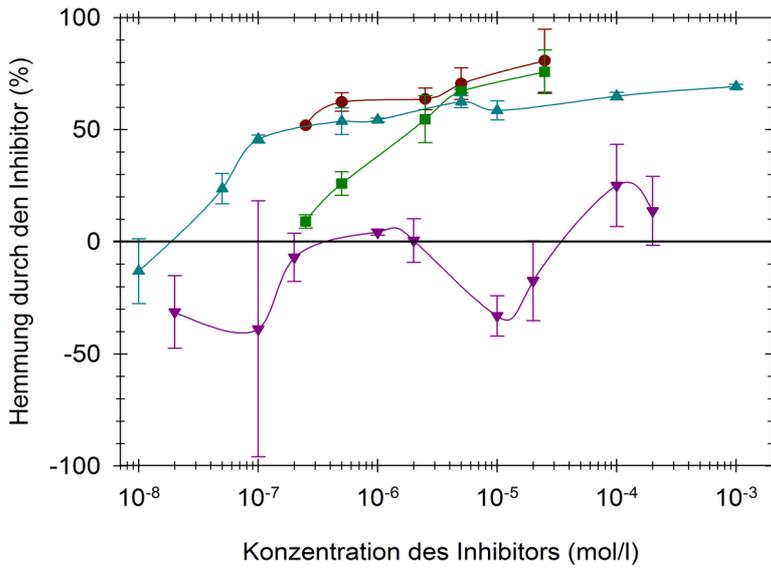


Abb. 22d: Vergleich der Hemmwirkungen (in %) unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 EMT-Zellen.

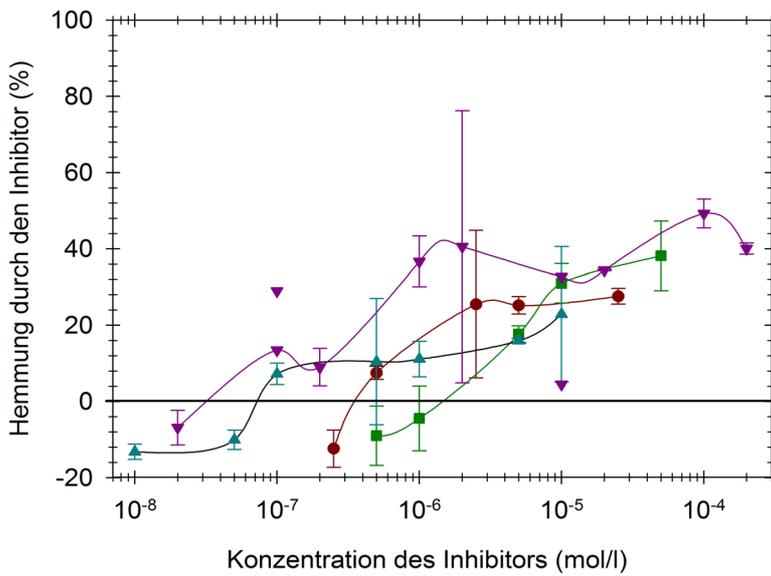
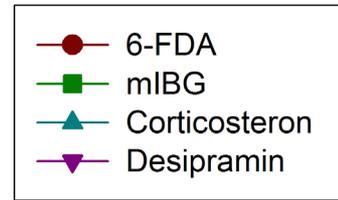


Abb. 22e: Vergleich der Hemmwirkungen (in %) unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 1-Zellen.

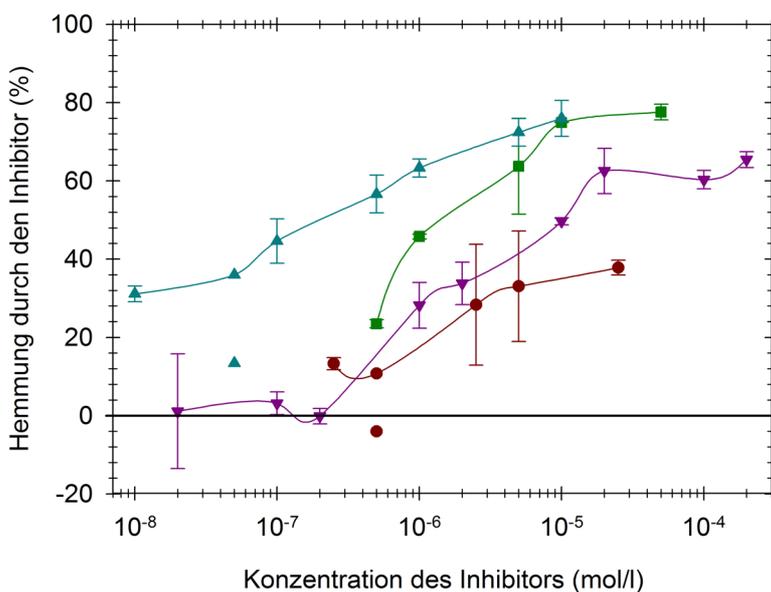
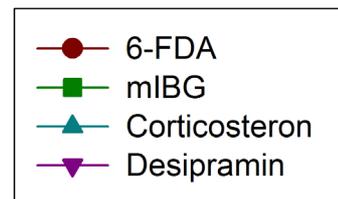
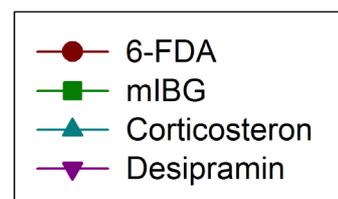


Abb. 22f: Vergleich der Hemmwirkungen (in %) unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Inhibitoren auf die $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 OCT 2-Zellen.



Da die Hemmwirkungen der einzelnen Inhibitoren auf die [³H] DA Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien bereits in den vorherigen Kapiteln ausführlich beschrieben wurden, soll hier nur ein Vergleich der Hemmeffekte aller getesteten Hemmstoffe für jede Zelllinie angestellt werden. Für diesen Vergleich wurden die graphisch ermittelten IC₅₀-Werte der einzelnen Inhibitoren verwendet. Dazu wurden die einzelnen Tabellen der IC₅₀-Werte (Tab. 20, 24, 26, 29, 32) aus den vorherigen Kapiteln zu einer Tabelle (Tab. 33) zusammengefasst.

Tab. 33: Zusammenfassende Darstellung der IC₅₀-Werte aller getesteten Inhibitoren.

		SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
kompetitive Inhibitoren	IC₅₀-Wert (mIBG)	1,6x10 ⁻⁶ mol/l	3,9x10 ⁻⁶ mol/l	>5,0x10 ⁻⁵ mol/l	4,1x10 ⁻⁶ mol/l	>5,0x10 ⁻⁵ mol/l	1,8x10 ⁻⁶ mol/l
	IC₅₀-Wert (6-FDA)	6,5x10 ⁻⁷ mol/l	3,0x10 ⁻⁶ mol/l	>2,5x10 ⁻⁵ mol/l	<2,5x10 ⁻⁷ mol/l	>2,5x10 ⁻⁵ mol/l	>2,5x10 ⁻⁵ mol/l
nicht-kompetitive Inhibitoren	IC₅₀-Wert (Corticost.)	>1,0x10 ⁻³ mol/l	5,0x10 ⁻⁴ mol/l	>1,0x10 ⁻³ mol/l	2,0x10 ⁻⁷ mol/l	>1,0x10 ⁻³ mol/l	2,5x10 ⁻⁷ mol/l
	IC₅₀-Wert (Desipramin)	<2,0x10 ⁻⁸ mol/l	<2,0x10 ⁻⁸ mol/l	>2,0x10 ⁻⁴ mol/l	>2,0x10 ⁻⁴ mol/l	>2,0x10 ⁻⁴ mol/l	1,0x10 ⁻⁵ mol/l
	IC₅₀-Wert (GBR-12909)	8,0x10 ⁻⁸ mol/l	9,0x10 ⁻⁷ mol/l	>1,0x10 ⁻⁵ mol/l			

Aus dieser Tab. 33 lässt sich, bei den CAKI- und OCT 1-Zellen in Kombination mit den Abb. 22c und 22e, für jede Zelllinie eine Reihenfolge nach der Stärke der Inhibitoren erstellen. Dabei liegt das besondere Augenmerk auf den kompetitiven Inhibitoren mIBG und 6-FDA, da sie über ihren Hemmeffekt eine indirekte Aussage über die Stärke der Aufnahme zulassen. Denn die direkte Aufnahme von 6-[¹⁸F] FDA wurde im Rahmen dieser Dissertation aus Gründen der Verfügbarkeit gar nicht und von [¹³¹I] mIBG nur einmal untersucht.

SK-N-SH-Zellen: Desipramin > GBR-12909 > **6-FDA** > **mIBG** >> Corticosteron.

PC 12-Zellen: Desipramin > GBR-12909 > **6-FDA** > **mIBG** >> Corticosteron.

CAKI-Zellen: **mIBG** ≈ Corticosteron > GBR-12909 ≈ **6 FDA** > Desipramin.

EMT-Zellen: Corticosteron ≈ **6-FDA** > **mIBG** >> Desipramin.

OCT 1-Zellen: Desipramin > **mIBG** ≈ **6-FDA** > Corticosteron.

OCT 2-Zellen: Corticosteron > **mIBG** > Desipramin > **6-FDA**.

4.4 Zeitabhängige Abgabe von Radioaktivität in Abwesenheit oder Anwesenheit von Inhibitoren

Diese Versuche sollten eine Aussage darüber liefern, wie viel der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität ($[^3\text{H}]$ DA bzw. seine Metabolite) nach verschiedenen Zeiten noch in den unterschiedlichen Zelllinien verblieb. Ebenfalls untersucht wurde, ob 60 min nach Inkubationsende die Anwesenheit der Inhibitoren mIBG (f.c.= 5×10^{-5} mol/l), 6-FDA (f.c.= $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l), Corticosteron (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) bzw. Desipramin (f.c.= 2×10^{-4} mol/l) einen Einfluss auf die Abgabe bzw. Wiederaufnahme des noch nicht metabolisierten $[^3\text{H}]$ DA über die spezifischen Transporter hatte.

Diese Versuchsreihe wurde nach dem Protokoll der Abgabeversuche (Tab. 13, S. 55) durchgeführt. Während der 15-minütigen Inkubation wurden den Zellen pro Ansatz jeweils $4,9 \times 10^{-11}$ Mole $[^3\text{H}]$ DA angeboten (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l).

Die direkt nach der Inkubation gemessene Menge an $[^3\text{H}]$ DA, die pro 10^6 Zellen aufgenommen wurde, ist für die verschiedenen Zelllinien in Tab. 34 aufgelistet, und stellte den Ausgangswert $t=0$ nach 0-minütiger Abgabezeit dar.

Tab. 34: Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 15-minütiger Inkubation.

	<i>SK-N-SH</i>	<i>PC 12</i>	<i>CAKI</i>	<i>EMT</i>	<i>OCT 1</i>	<i>OCT 2</i>
Mole im Ansatz ¹	$4,9 \times 10^{-11}$					
Aufnahme (%) ²	4,7	6,3	1,6	0,3	0,6	0,6
Aufnahme (Mole) ³	$2,3 \times 10^{-12}$	$3,1 \times 10^{-12}$	$7,8 \times 10^{-13}$	$1,5 \times 10^{-13}$	$2,9 \times 10^{-13}$	$2,9 \times 10^{-13}$

¹ Die Menge an $[^3\text{H}]$ DA, die pro 500 μl Reaktionsansatz angeboten wurde.

² Die in Prozent dargestellte Aufnahme an $[^3\text{H}]$ DA pro 10^6 Zellen, wobei sich die Prozentangabe auf das im Ansatz vorliegende Angebot an $[^3\text{H}]$ DA bezieht.

³ Die pro 10^6 Zellen aufgenommene Menge an $[^3\text{H}]$ DA.

Ausgehend von den Werten der Tab. 34 wurde die Abgabe der Radioaktivität nach 30, 60 und 240 min bestimmt. Dabei wurden die in den Zellen gemessenen Radioaktivitäten bei den verschiedenen Zeitwerten zu diesen Ausgangsaufnahmewerten in Relation gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden

von 100% subtrahiert. Somit erhielt man eine Aussage, wie viel Prozent der ursprünglich in die Zellen aufgenommenen Radioaktivität nach einer bestimmten Zeit abgegeben wurde. Bei $t=0$ min gilt, dass noch keine Radioaktivität aus den Zellen ausgeschieden wurde.

In den Abb. 23 (S. 107) und 24a-f (S. 109) sind auf der Ordinate die Abgabe der Radioaktivität pro 10^6 Zellen in Prozent angegeben und gegen die Zeit auf der Abszisse aufgetragen.

4.4.1 Zeitabhängige Abgabe von Radioaktivität in Abwesenheit von Inhibitoren

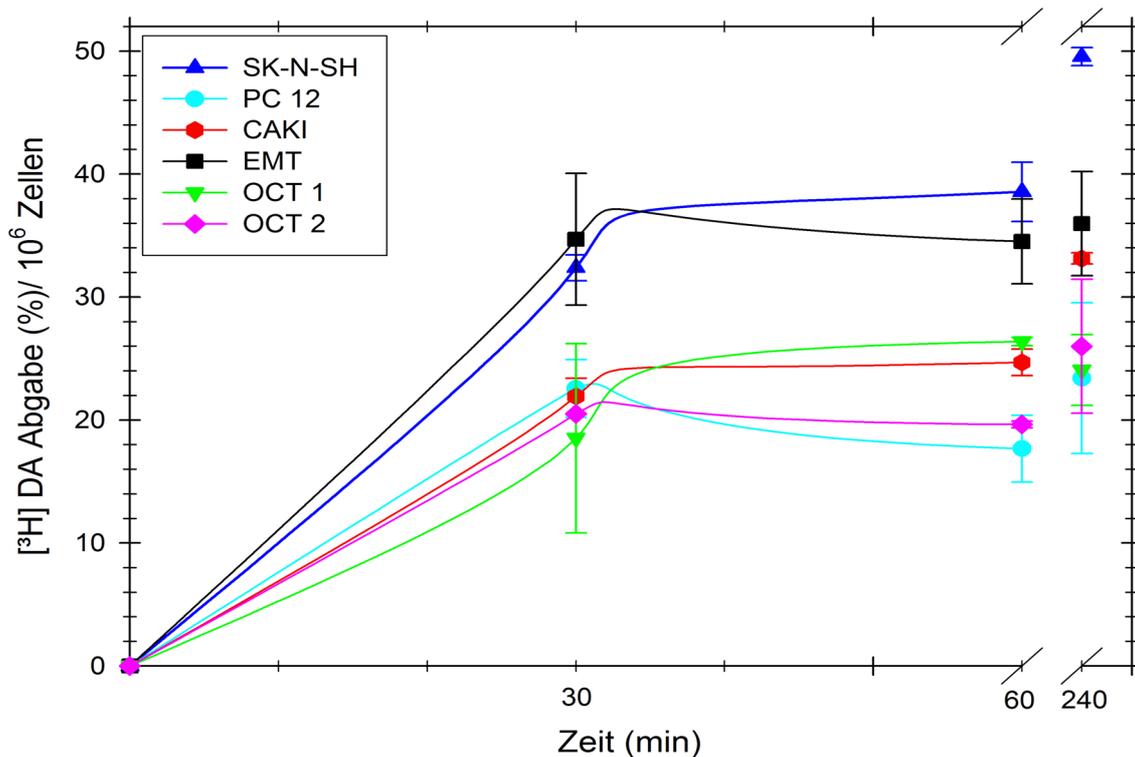


Abb. 23: Zeitabhängige Abgabe (in %) der Radioaktivität aus 10^6 Zellen der verschiedenen getesteten Zelllinien in Abwesenheit eines Inhibitors.

Wie aus Abb. 23 ersichtlich stieg die Abgabe $[^3\text{H}]$ -markierter Substanzen aus SK-N-SH-Zellen mit zunehmender Zeit kontinuierlich an. Nur 30 min nach Beendigung der Inkubation war bereits ca. 32% der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität nicht mehr in den Zellen nachweisbar. Nach

240 min wurde ca. 50% der aufgenommenen Radioaktivität abgegeben. Aus Abb. 23 kann man erkennen, dass die Abgabe der Radioaktivität aus PC 12-Zellen am geringsten war und ab 30 min bis 240 min etwa gleich blieb. Das bedeutet, dass 30 min und 240 min nach Beendigung der 15-minütigen Inkubation pro 10^6 Zellen ca. 23% der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität abgegeben wurde. Offensichtlich ist die hohe Speicherkapazität bei PC 12-Zellen auf seine große Anzahl an Speichervesikeln zurückzuführen. Wie aus Abb. 23 ersichtlich ist, lag die Abgabe aus CAKI-Zellen nach 30 min bei 22%, und stieg mit zunehmender Zeit kontinuierlich an. Bei EMT-Zellen betrug die Abgabe radioaktiv markierter Substanzen nach 30 min bereits 35%, die sich aber im Verlauf der Zeit nur unwesentlich änderte. Die Beurteilung der zeitabhängigen Abgabe aus den OCT 1-Zellen ist unter Berücksichtigung der SD etwas schwierig. Durch die große SD beim ersten Zeitwert kann keine definitive Aussage über die Abgabe der Radioaktivität nach 30 min gemacht werden. Anhand der Abb. 23 kann man jedoch sagen, dass die Abgabe der aufgenommenen Radioaktivität aus OCT 1-Zellen 60 min und 240 min nach Beendigung der Inkubation annähernd gleich war. Nach 1h konnte eine Reduktion der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität von 26% und nach 4h von 24% detektiert werden. Sowohl nach 30 min als auch nach 60 min war die Abgabe von [^3H] DA und deren Metabolite aus den OCT 2-Zellen gleich bleibend bei ca. 20%. Nach 240 min erkennt man in Abb. 23 jedoch einen leichten Anstieg der Abgabe auf 26%.

Vergleicht man bei allen Zelllinien, wie viel der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität nach 240 min abgegeben wurde, so kann man eine absteigende Reihenfolge erstellen. In der folgenden Reihe steht die Zelllinie zu Beginn, die im beobachteten Zeitraum am meisten Radioaktivität abgab: **SK-N-SH > EMT > CAKI > OCT 2 \approx OCT 1 \approx PC 12.**

Die Zelllinie, die nach 30 min die meiste Radioaktivität abgab, schied die ursprünglich aufgenommene Radioaktivität schneller wieder aus als die anderen. In folgender Reihe steht die Zelllinie zu Beginn, die am schnellsten die ursprünglich aufgenommene Radioaktivität abgab: **EMT \approx SK-N-SH \gg PC 12 \approx CAKI \approx OCT 2 \approx OCT 1.**

4.4.2 Abgabe von Radioaktivität in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

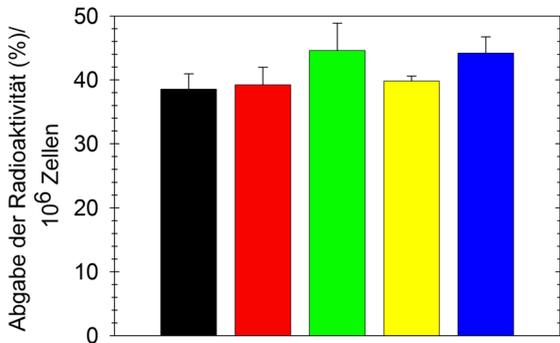


Abb. 24a: **SK-N-SH-Zelllinie.**
1%-ige Abgabe/10⁶ Zellen \triangleq 2,3x10⁻¹⁴ Mole [³H]-markierter Substanzen/10⁶ Zellen.

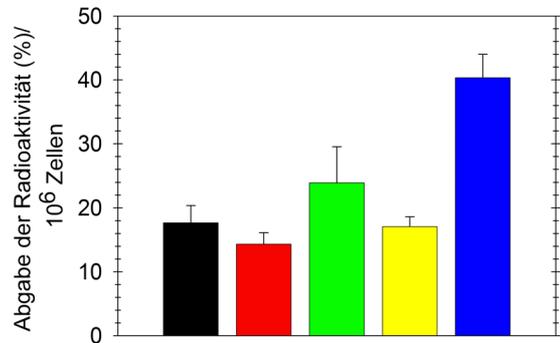


Abb. 24b: **PC 12-Zelllinie.**
1%-ige Abgabe/10⁶ Zellen \triangleq 3,1x10⁻¹⁴ Mole [³H]-markierter Substanzen/10⁶ Zellen.

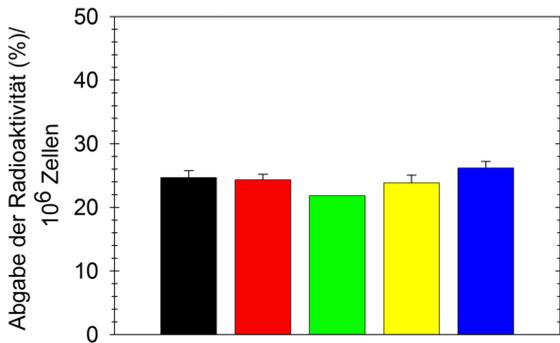


Abb. 24c: **CAKI-Zelllinie.**
1%-ige Abgabe/10⁶ Zellen \triangleq 7,8x10⁻¹⁵ Mole [³H]-markierter Substanzen/10⁶ Zellen.

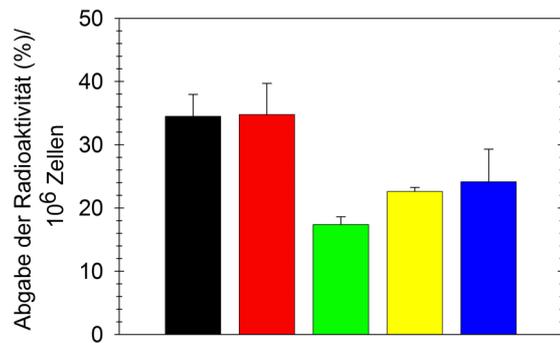


Abb. 24d: **EMT-Zelllinie.**
1%-ige Abgabe/10⁶ Zellen \triangleq 1,5x10⁻¹⁵ Mole [³H]-markierter Substanzen/10⁶ Zellen.

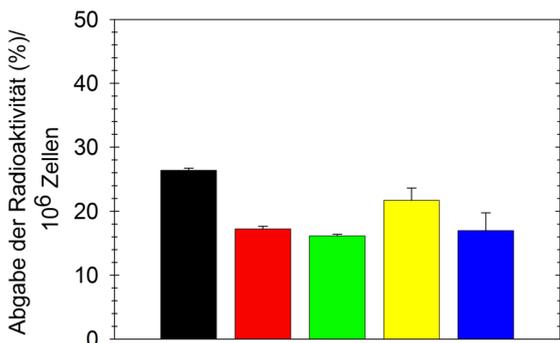


Abb. 24e: **OCT 1-Zelllinie.**
1%-ige Abgabe/10⁶ Zellen \triangleq 2,9x10⁻¹⁵ Mole [³H]-markierter Substanzen/10⁶ Zellen.

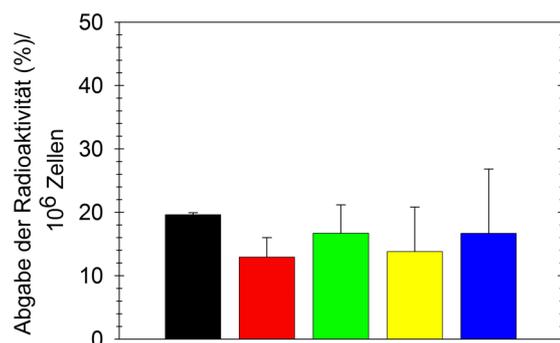
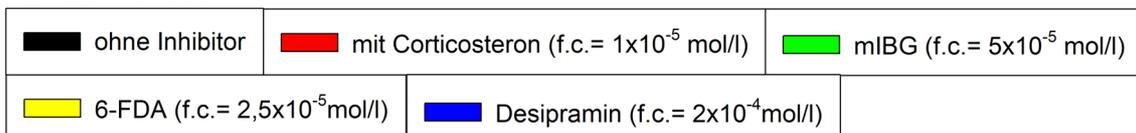


Abb. 24f: **OCT 2-Zelllinie.**
1%-ige Abgabe/10⁶ Zellen \triangleq 2,9x10⁻¹⁵ Mole [³H]-markierter Substanzen/10⁶ Zellen.

Abb. 24a-f: Abgabe (in %) der Radioaktivität aus 10⁶ Zellen der verschiedenen Zelllinien in Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener Inhibitoren 60 min nach Inkubationsende.



Ein Vergleich der Abgabe von Radioaktivität aus den neuronalen SK-N-SH-Zellen ohne Inhibitor mit der Abgabe von Radioaktivität in Anwesenheit der jeweiligen Inhibitoren 60 min nach Beendigung der 15-minütigen Inkubationszeit ist in Abb. 24a dargestellt. In dieser Abb. zeigt sich bei allen eingesetzten Inhibitoren eine teilweise nur sehr gering vermehrte Abgabe der Radioaktivität aus den Zellen. Lediglich mIBG und Desipramin zeigten etwas stärkere Effekte. Dies könnte an einer durch diese Inhibitoren verringerten Wiederaufnahme von noch nicht metabolisiertem [³H] DA liegen. Bei Zugabe von Corticosteron bzw. 6-FDA in den Inkubationspuffer war annähernd genauso viel Radioaktivität am Ende des Experimentes nachweisbar wie ohne Zugabe eines Inhibitors. Bei den neuronalen PC 12-Zellen war der starke Effekt von Desipramin auffällig, der zu einer intensiven (2,2-fachen) Steigerung der radioaktiven Freisetzung führte. Leichte Effekte zeigte auch der kompetitive Inhibitor mIBG mit einer 1,3-fach stärkeren Abgabe. Der Vergleich der radioaktiven Abgabe in Abhängigkeit der Inhibitoren 60 min nach Beendigung der Inkubation ergab, dass in Anwesenheit von 6-FDA mit einer 17%-igen Abgabe in etwa genauso viel der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität ausgeschieden wurde wie in Abwesenheit eines Inhibitors (18%). Im Gegensatz dazu fand in Anwesenheit von 10^{-5} M Corticosteron eine 1,3x geringere Abgabe [³H]-markierter Substanzen aus den Zellen statt.

Abb. 24c-f zeigen, dass die untersuchten Hemmstoffe bei den extraneuronalen Zellen zu keiner Steigerung der Abgabe von Radioaktivität führten. Im Gegensatz dazu konnte in Anwesenheit der Inhibitoren meist sogar eine geringere Abgabe verzeichnet werden. Vergleich man nach 60 min die Abgabe der Radioaktivität aus CAKI-Zellen in Abwesenheit eines Inhibitors mit der Abgabe von Radioaktivität in Anwesenheit der jeweiligen Inhibitoren, so war nahezu kein Unterschied im Abgabeverhalten erkennbar. Im Vergleich zur Abwesenheit wurden in Anwesenheit der Inhibitoren in den EMT-Zellen 1,1- bis 1,5-fach mehr, in den OCT 1-Zellen 1,2- bis 1,6-fach mehr und in den OCT 2-Zellen ca. 1,5-fach mehr [³H]-markierter DA und dessen Metabolite gemessen.

4.5 Einfluss von 10^{-4} M Corticosteron bzw. 10^{-5} M mIBG auf die Aufnahme von [3 H] DA oder [3 H] NA in SK-N-SH-Zellen sowie EMT-exprimierende CAKI- und HEK 293-Zellen

(Untersuchungen in Zellsuspensionen)

Der Einfluss von Corticosteron und mIBG auf die Aufnahme von [3 H]-markierten Katecholaminen wurde bereits in den Screeningversuchen ermittelt. Da diese Ergebnisse eine potentiell wichtige Bedeutung in der Klinik haben könnten, sollten die in den Screeningversuchen gewonnenen Ergebnisse in den Hauptversuchen in einem 3-fachen, unabhängigen Versuchsansatz bestätigt werden. Dafür wurden diese Versuche zum Einen mit Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen durchgeführt, deren Ergebnisse im folgenden Kapitel dargestellt sind. Zum anderen wurden diese Versuche mit Co-Kulturen im Transwellsystem durchgeführt, deren Ergebnisse separat im Kapitel 4.10 (S. 139-150) beschrieben sind.

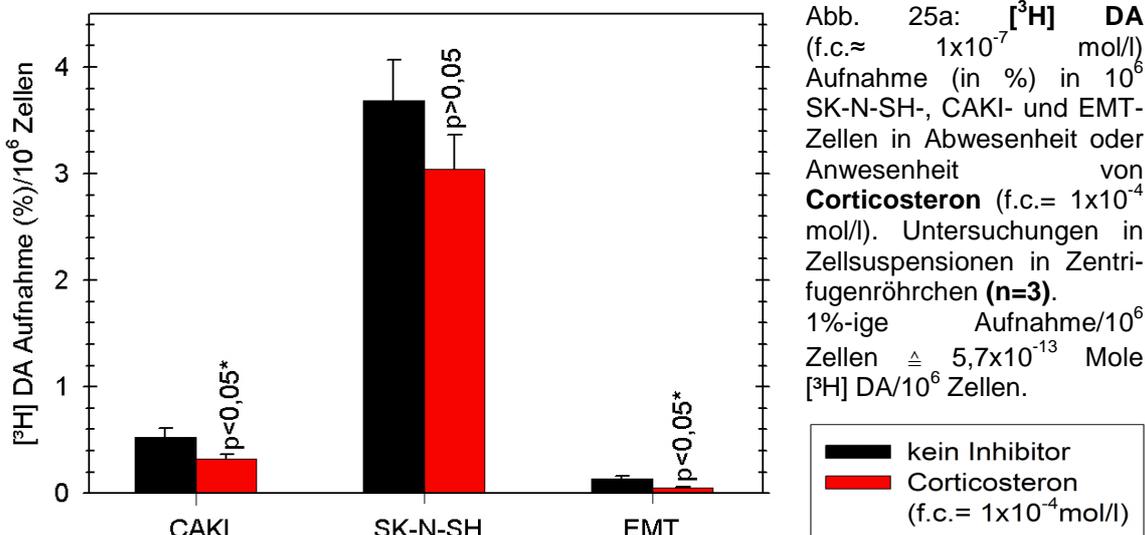
Anhand der Ergebnisse der Vorversuche (4.2 - 4.3) kristallisierten sich eine optimale Inkubationszeit von 15 min und die Konzentrationen der Inhibitoren mit einem optimalen Hemmeffekt heraus. Corticosteron wurde für den Hauptversuch in einer Konzentration von 1×10^{-4} mol/l verwendet, da bei dieser Konzentration die [3 H] Katecholaminaufnahme in extraneuronale EMT- und CAKI-Zellen sehr gut gehemmt wurde, während der [3 H] Katecholamintransport in neuronale SK-N-SH- und PC 12-Zellen nur sehr gering blockiert wurde. Hauptziel dieser Arbeit war es, die extraneuronalen Katecholamintransporter mit einem Hemmstoff spezifisch zu blockieren, so dass über die neuronalen Katecholamintransporter verstärkt radioaktiv markierte Katecholamine bzw. katecholaminanaloge Verbindungen aufgenommen werden konnten. Da bei der höchsten getesteten mIBG-Konzentration von 1×10^{-5} mol/l eine maximale Hemmung der [3 H] Katecholaminaufnahme in SK-N-SH-, EMT- und CAKI-Zellen erzielt werden konnte, wurde diese Konzentration für die Hauptversuche eingesetzt.

Die Hauptversuche wurden wie die Screeningversuche nach dem Versuchsprotokoll für die Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen in Zellsuspensionen (Tab. 12, S. 50) durchgeführt. Dabei wurden den getesteten Zelllinien pro 500µl Reaktionsansatz bei einer 15-minütigen Inkubation im Wasserbad (37°C) $5,7 \times 10^{-11}$ Mole ^3H DA bzw. $6,8 \times 10^{-11}$ Mole ^3H NA angeboten, das einer f.c. von ca. 1×10^{-7} mol/l entsprach. Die Ergebnisse, die in den Abb. 25a-28a (S. 112-117) für Corticosteron und in den Abb. 25b-28b (S. 118-121) für mIBG dargestellt sind, basieren auf einer Dreifachbestimmung eines Wertes pro Versuch. Der Versuch wurde an drei unabhängigen Versuchstagen wiederholt, so dass der dargestellte Mittelwert aus 9 Messwerten gemittelt wurde.

4.5.1 Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme von ^3H DA

4.5.1.1 Aufnahme von ^3H DA in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron

In Abb. 25a sind die ^3H DA Aufnahmen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron in SK-N-SH-, CAKI- und EMT-Zellen dargestellt, sowie die p-Werte des gepaarten t-Testes, bei dem die statistische Signifikanz des Rückganges der ^3H DA Aufnahme in Anwesenheit des Inhibitors analysiert wurde.



Ohne Inhibitor wurde in CAKI-Zellen $0,53\% \pm 0,09\%$, in SK-N-SH-Zellen $3,68\% \pm 0,38\%$ und in EMT-Zellen $0,13\% \pm 0,03\%$ des ursprünglich angebotenen $[^3\text{H}]$ DA aufgenommen (Abb. 25a). Das bedeutet, dass SK-N-SH-Zellen im Vergleich zu CAKI-Zellen ca. die 7-fache Menge an DA aufnahmen und im Vergleich zu EMT-Zellen ca. die 28-fache Menge (Tab. 35). Es ergab sich somit folgende Reihenfolge der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme: **SK-N-SH > CAKI > EMT**. Diese Ergebnisse stimmen in etwa mit den Vorversuchen überein, die bereits unter 4.2.1 (S. 72-73) beschrieben wurden.

In Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron verringerte sich die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in CAKI-Zellen statistisch signifikant von $0,53\% \pm 0,09\%$ auf $0,32\% \pm 0,05\%$ ($p < 0,05$), während sie sich in EMT-Zellen statistisch hochsignifikant von $0,13\% \pm 0,03\%$ auf $0,05\% \pm 0,01\%$ ($p < 0,01$) verringerte. Die Aufnahme in SK-N-SH-Zellen in Gegenwart von Corticosteron blieb nahezu gleich und sank lediglich von $3,68\% \pm 0,38\%$ auf $3,04\% \pm 0,32\%$ ($p > 0,05$).

In folgender Tabelle (Tab. 35) wird das Verhältnis der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme zwischen SK-N-SH-Zellen und CAKI sowie SK-N-SH-Zellen und EMT-Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron dargestellt.

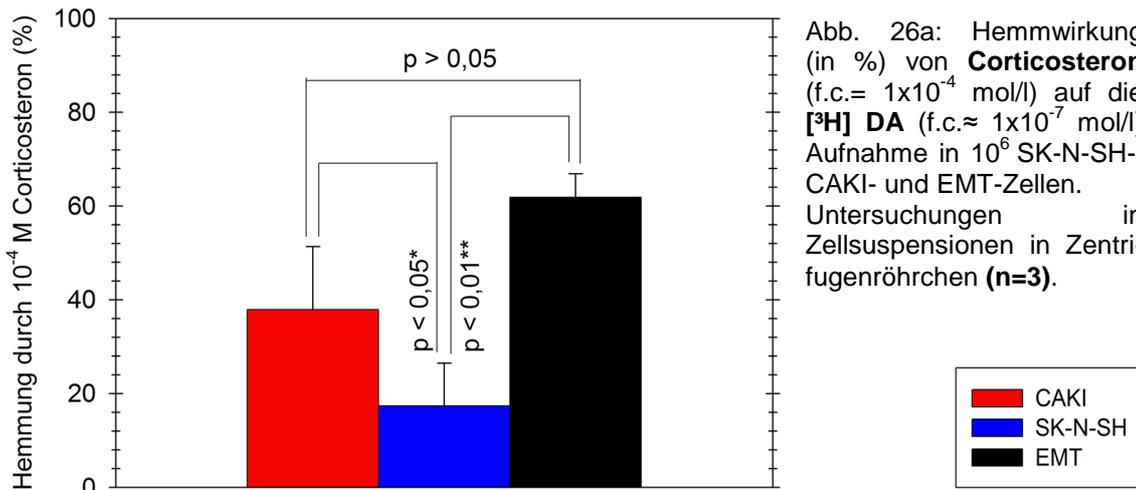
Tab. 35: Verhältnis der $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in SK-N-SH-Zellen zur $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in CAKI-Zellen bzw. in EMT-Zellen.

Versuchsansatz	SK-N-SH : CAKI	SK-N-SH : EMT
ohne Inhibitor	6,9 : 1	28,3 : 1
mit Corticosteron (f.c.= 1×10^{-4} mol/l)	9,5 : 1	60,8 : 1

In Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron verschob sich das Verhältnis der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in Richtung der SK-N-SH-Zellen. Das bedeutet, dass mit einer 10^{-4} M Corticosteronlösung mehr $[^3\text{H}]$ DA in die neuronale Zelllinie SK-N-SH und dafür weniger $[^3\text{H}]$ DA in die extraneuronalen Zelllinien CAKI bzw. EMT aufgenommen wurde. Dabei war dieser Effekt mit einer Verschiebung um das 1,5-fache bei der CAKI-Zelllinie relativ gering ausgeprägt. Beim Vergleich der Aufnahme zwischen der SK-N-SH- und der EMT-Zelllinie ließ sich eine deutliche Verschiebung um das 2,2-fache, von 28,3:1 auf 60,8:1 feststellen.

Eine vermehrte Katecholaminaufnahme in neuronale Zellen im Verhältnis zu extraneuronalen Zellen in Anwesenheit von Corticosteron stellt eine interessante Option für die klinische Verwendung dar.

4.5.1.2 Hemmeffekt von 10^{-4} M Corticosteron auf die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme

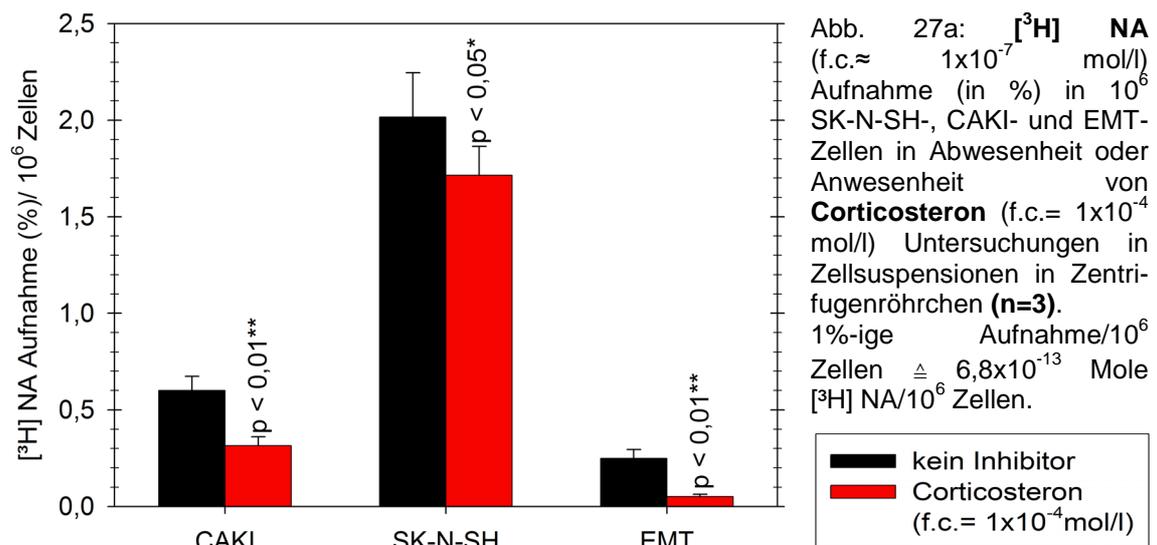


Die statistische Signifikanz des Rückganges der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron und somit die Stärke des Hemmeffektes auf eine bestimmte Zelllinie ist bereits in Abb. 25a gezeigt. In Abb. 26a ist allerdings die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen dem Hemmeffekt des Inhibitors auf die verschiedenen Zelllinien dargestellt, wobei die statistischen Unterschiede mit dem gepaarten t-Test ermittelt wurden. In Abb. 26a erkennt man die starke Hemmwirkung von 10^{-4} M Corticosteron bei den EMT-Zellen ($62\% \pm 5\%$) und bei den CAKI-Zellen ($38\% \pm 13\%$). Auf die SK-N-SH-Zellen hatte Corticosteron allerdings nur einen geringen Hemmeffekt von $<20\%$ ($17\% \pm 9\%$). Vergleicht man die Hemmeffekte von Corticosteron auf die EMT- bzw. CAKI-Zellen mit dem Hemmeffekt auf die SK-N-SH-Zellen, so ergab sich eine statistische Signifikanz. Dabei war der Corticosteronhemmeffekt auf die EMT-Zellen 3,6x höher als der Hemmeffekt auf die SK-N-SH-Zellen, was einem statistisch hochsignifikanten ($p < 0,01$) Unterschied entsprach. Der Unterschied des Corticosteronhemmeffektes auf CAKI-Zellen, im Vergleich zu dem auf SK-N-SH-Zellen, war signifikant ($p < 0,05$), wobei eine 2,2-fach höhere

Hemmung auf die CAKI-Zellen vorlag. Im Vergleich der Hemmwirkungen des Corticosterons auf die [^3H] DA Aufnahme in CAKI- und in EMT-Zellen ließ sich mit einer 1,6-fach stärkeren Hemmung auf die radioaktive Aufnahme in EMT-Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) nachweisen. Nach der Stärke der Corticosteronhemmeffekte lässt sich folgende Zelllinienreihenfolge aufstellen: **EMT > CAKI >> SK-N-SH**. Diese stimmt mit der bereits in den Screeningversuchen ermittelten überein (4.3.4.3 und 4.3.4.4, S. 94-98).

4.5.2 Einfluss von Corticosteron auf die Aufnahme von [^3H] NA

4.5.2.1 Aufnahme von [^3H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron



In Abb. 27a ist die [^3H] NA Aufnahme in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron dargestellt. Ohne Inhibitor wurde in CAKI-Zellen $0,60\% \pm 0,07\%$, in SK-N-SH-Zellen $2,01\% \pm 0,23\%$ und in EMT-Zellen $0,25\% \pm 0,05\%$ des ursprünglich angebotenen [^3H] NA aufgenommen. Wie in nachfolgender Tab. 36 dargestellt ist, nahmen die SK-N-SH-Zellen im Vergleich zu den CAKI-Zellen ca. die 3-fache Menge an NA auf und im Vergleich zu den EMT-Zellen ca. die 8-fache Menge (Tab. 36). Für die Menge der [^3H] NA Aufnahme kann

man folgende Reihenfolge erstellen: **SK-N-SH > CAKI > EMT**, die auch in den Vorversuchen (4.2.2, S. 73-74) ermittelt werden konnte.

In Anwesenheit von Corticosteron verringerte sich die [³H] NA Aufnahme in CAKI- bzw. EMT-Zellen hochsignifikant von 0,60% ± 0,07% auf 0,31% ± 0,05% bzw. von 0,25% ± 0,05% auf 0,05% ± 0,01% (p<0,01). Mit einer Reduktion der radioaktiven Aufnahme um das 1,2-fache (von 2,01% ± 0,23% auf 1,71% ± 0,15%) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme war die Hemmwirkung von 10⁻⁴ M Corticosteron auf die SK-N-SH-Zelllinie nur sehr gering.

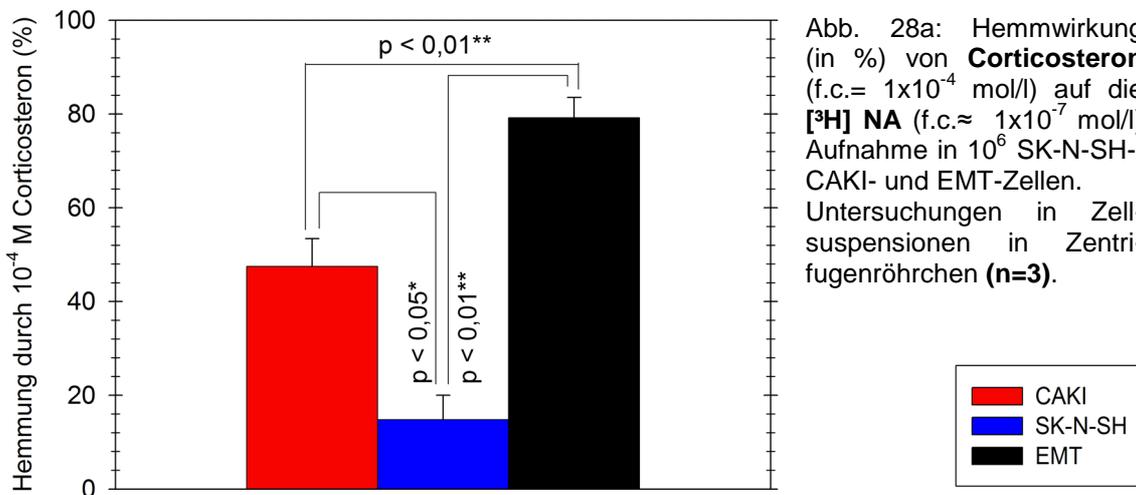
Das Verhältnis der radioaktiven Aufnahme zwischen der neuronalen Zelllinie SK-N-SH sowie den extraneuronalen Zelllinien CAKI bzw. EMT in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron ist in Tab. 36 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 36: Verhältnis der [³H] NA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in SK-N-SH-Zellen zur [³H] NA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in CAKI-Zellen bzw. in EMT-Zellen.

Versuchsansatz	SK-N-SH : CAKI	SK-N-SH : EMT
ohne Inhibitor	3,4 : 1	8,0 : 1
mit Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l)	5,5 : 1	34,2 : 1

Beim Vergleich der [³H] NA Aufnahmen zwischen den verschiedenen Zelllinien in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10⁻⁴ M Corticosteron kam es zu einer Verschiebung der radioaktiven Aufnahme in Richtung der SK-N-SH-Zellen. Dieser Effekt war mit einer 4,3-fachen Verschiebung der radioaktiven Aufnahme deutlicher ausgeprägt, wenn man die SK-N-SH- mit den EMT-Zellen verglich. Eine nur um 1,6-fach stärkere Inkorporation in SK-N-SH-Zellen in Anwesenheit von Corticosteron fand im Verhältnis zu CAKI-Zellen statt. Eine im Verhältnis verstärkte Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen in neuronale Zellen bei Blockade von extraneuronalen Katecholamintransportern konnte somit nicht nur mit [³H] DA als Aufnahmesubstrat nachgewiesen werden (Tab. 35, S. 113), sondern auch wenn [³H] NA angeboten wurde.

4.5.2.2 Hemmeffekt von 10^{-4} M Corticosteron auf die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme



In Abb. 28a sind die Hemmeffekte von Corticosteron auf die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme dargestellt sowie die p-Werte des statistischen Vergleiches der Hemmeffektunterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien.

Corticosteron hemmte die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme in EMT-Zellen zu $79\% \pm 4\%$ und in CAKI-Zellen zu $48\% \pm 6\%$. Wie aus Abb. 28a ebenfalls zu erkennen ist, wurde die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen von Corticosteron weitaus geringer gehemmt ($15\% \pm 5\%$). Beim Vergleich der Hemmeffekte von Corticosteron auf die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme in CAKI-, EMT- und SK-N-SH-Zellen miteinander lassen sich im gepaarten t-Test für den Unterschied zwischen CAKI- und SK-N-SH-Zellen sowie für den Unterschied zwischen EMT- und SK-N-SH-Zellen p-Werte von $<0,01$ ermitteln. Dabei hemmte 10^{-4} M Corticosteron die radioaktive Aufnahme in die extraneuronalen CAKI-Zellen 3,2x stärker als in die neuronalen SK-N-SH-Zellen, während die extraneuronalen EMT-Zellen im Vergleich zu den SK-N-SH-Zellen sogar um das 5,3-fache mehr inhibiert wurden. Beim Vergleich zwischen CAKI- und EMT-Zellen konnte ein um 1,6-fach höherer Hemmeffekt von Corticosteron auf die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme in EMT-Zellen detektiert werden ($p < 0,01$). Nach der Stärke des Corticosteron-hemmeffektes auf die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme ließ sich folgende Reihenfolge ermitteln: **EMT > CAKI >> SK-N-SH**, womit die Ergebnisse der Screeningversuche bestätigt wurden (4.3.4.4, S. 96-98).

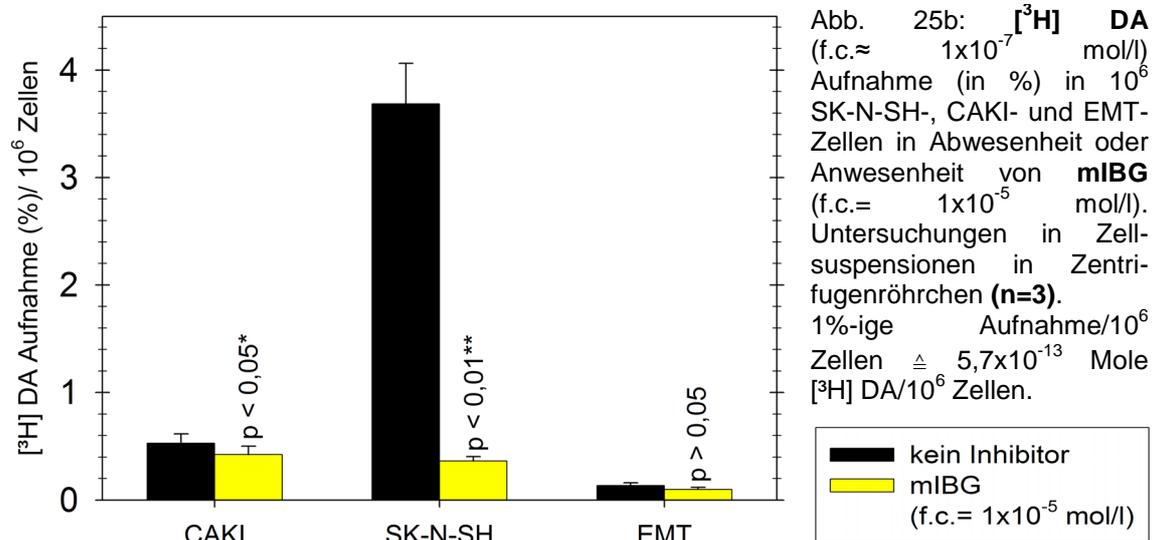
4.5.3 Vergleich der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA mit der von $[^3\text{H}]$ NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron

Vergleicht man aus den vorherigen Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme mit der $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron, so lässt sich zusammenfassend sagen, dass die in den Vorversuchen ermittelten Ergebnisse in diesen Hauptversuchen mit einer größeren Versuchsanzahl reproduzierbar waren.

Ohne Inhibitor wurde in SK-N-SH-Zellen 1,8x mehr $[^3\text{H}]$ DA aufgenommen als $[^3\text{H}]$ NA. In CAKI- bzw. EMT-Zellen hingegen wurde 1,1x bzw. 1,9x stärker $[^3\text{H}]$ NA inkorporiert, das in etwa den Vorversuchen (4.2.3, S. 75-76) entspricht. Im Vergleich ist auch erkennbar, dass die Hemmwirkung von 10^{-4} M Corticosteron auf EMT- und CAKI-Zellen mit $[^3\text{H}]$ NA als Aufnahmesubstrat um das 1,3-fache höher war als mit $[^3\text{H}]$ DA. Das Aufnahmesubstrat spielte beim Hemmeffekt von Corticosteron auf die SK-N-SH-Zelllinie nahezu keine Rolle (siehe auch Ergebnisse der Screeningversuche: 4.3.4.4, S. 96-98).

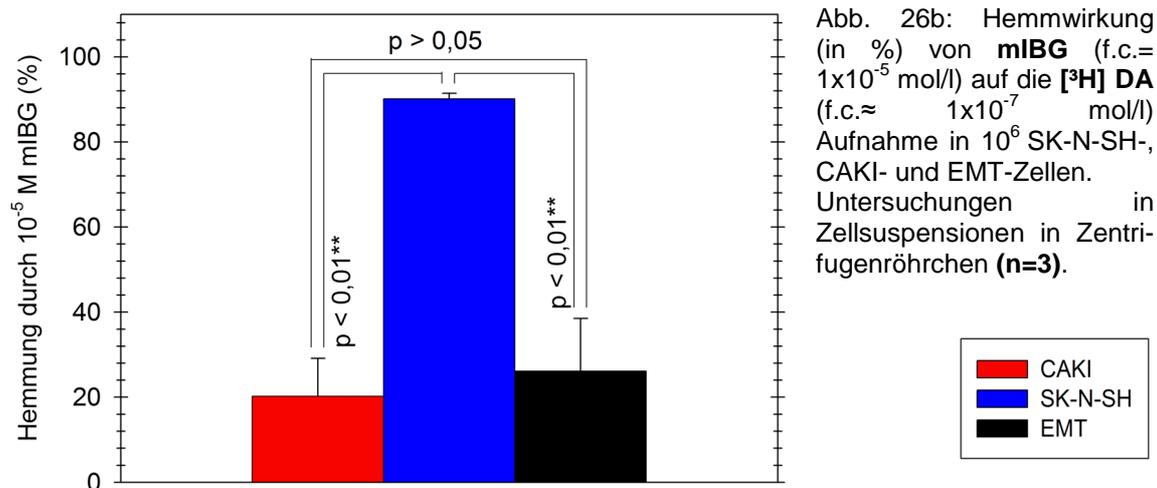
4.5.4 Einfluss von mIBG auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA

4.5.4.1 Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA in Abwesenheit oder Anwesenheit von mIBG



In Abb. 25b sind die [^3H] DA Aufnahmen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG in SK-N-SH-, CAKI- und EMT-Zellen dargestellt, sowie die p-Werte des gepaarten t-Testes, bei dem die statistische Signifikanz des Rückganges der [^3H] DA Aufnahme in Anwesenheit des Inhibitors analysiert wurde. MIBG reduzierte die Aufnahme von [^3H] DA in CAKI-Zellen signifikant von $0,53\% \pm 0,09\%$ auf $0,42\% \pm 0,08\%$ ($p < 0,05$) und in EMT-Zellen nicht signifikant von $0,13\% \pm 0,03\%$ auf $0,10\% \pm 0,02\%$ ($p > 0,05$). Im Vergleich dazu erfolgte eine ca. 10x geringere Inkorporation von [^3H] DA in SK-N-SH-Zellen, das einem statistisch hochsignifikanten Rückgang ($p < 0,01$) von $3,68\% \pm 0,38\%$ auf $0,36\% \pm 0,04\%$ entsprach.

4.5.4.2 Hemmeffekt von 10^{-5} M mIBG auf die [^3H] DA Aufnahme



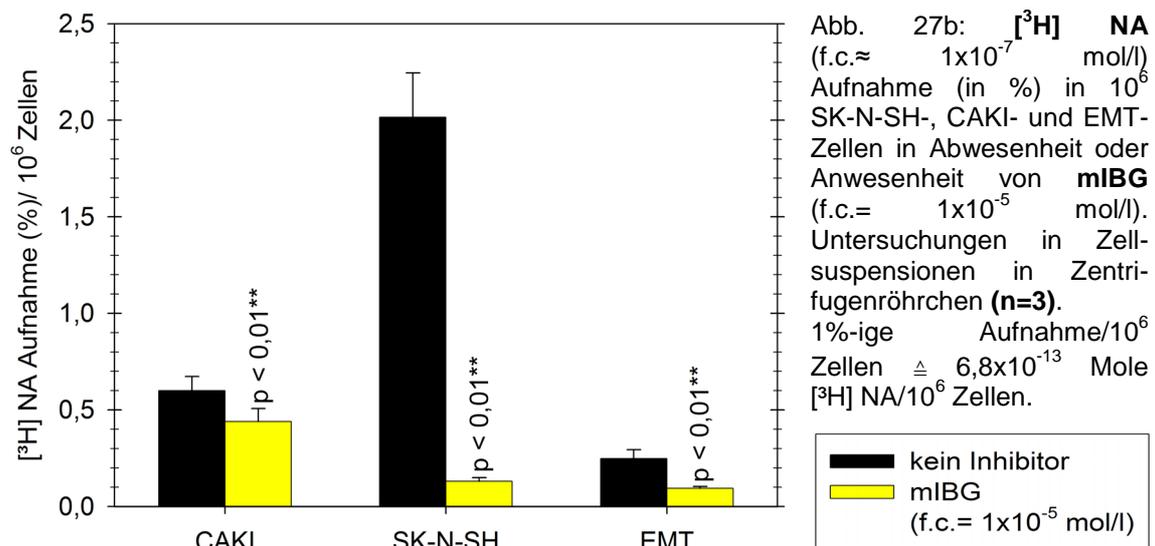
In Abb. 26b ist die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen dem Hemmeffekt von mIBG auf die verschiedenen Zelllinien dargestellt, wobei die statistischen Unterschiede mit dem gepaarten t-Test ermittelt wurden.

In Anwesenheit von mIBG konnte ein großer Hemmeffekt auf die [^3H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen ($90\% \pm 1\%$) nachgewiesen werden. Die Hemmwirkung von mIBG auf die CAKI- bzw. die EMT-Zelllinie ist sichtbar kleiner und betrug $20\% \pm 9\%$ bzw. $26\% \pm 12\%$. Das heißt, dass die radioaktive Aufnahme durch mIBG in CAKI-Zellen 4,5x bzw. in EMT-Zellen 3,5x geringer

gehemmt wurde als die Aufnahme von [^3H] DA in SK-N-SH-Zellen. Ein geringer Unterschied der mIBG-Hemmeffekte bestand zwischen den beiden extraneuronalen Zelllinien, wobei EMT-Zellen eine um 1,3-fach stärkere Aufnahmehemmung erfuhren. Die bereits in den Vorversuchen gefundene Reihenfolge der Hemmwirkung von mIBG auf die verschiedenen Zelllinien, **SK-N-SH >> EMT > CAKI** (4.3.1, S. 77-84), war auch in den Hauptversuchen zu sehen.

4.5.5 Einfluss von mIBG auf die Aufnahme von [^3H] NA

4.5.5.1 Aufnahme von [^3H] NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von mIBG



In Abb. 27b ist die [^3H] NA Aufnahme in die verschiedenen Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG dargestellt.

mIBG reduzierte die Aufnahme von [^3H] NA in CAKI-Zellen im Vergleich zur Aufnahme ohne Inhibitor statistisch hochsignifikant von $0,60\% \pm 0,07\%$ auf $0,44\% \pm 0,07\%$ (p < 0,01). Die [^3H] NA Aufnahme in EMT-Zellen wurde in Anwesenheit von mIBG von $0,25\% \pm 0,05\%$ auf $0,09\% \pm 0,01\%$ (p < 0,01) und in SK-N-SH-Zellen von $2,01\% \pm 0,23\%$ auf $0,13\% \pm 0,02\%$ (p < 0,01) des ursprünglich angebotenen NA verringert.

4.5.5.2 Hemmeffekt von 10^{-5} M mIBG auf die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme

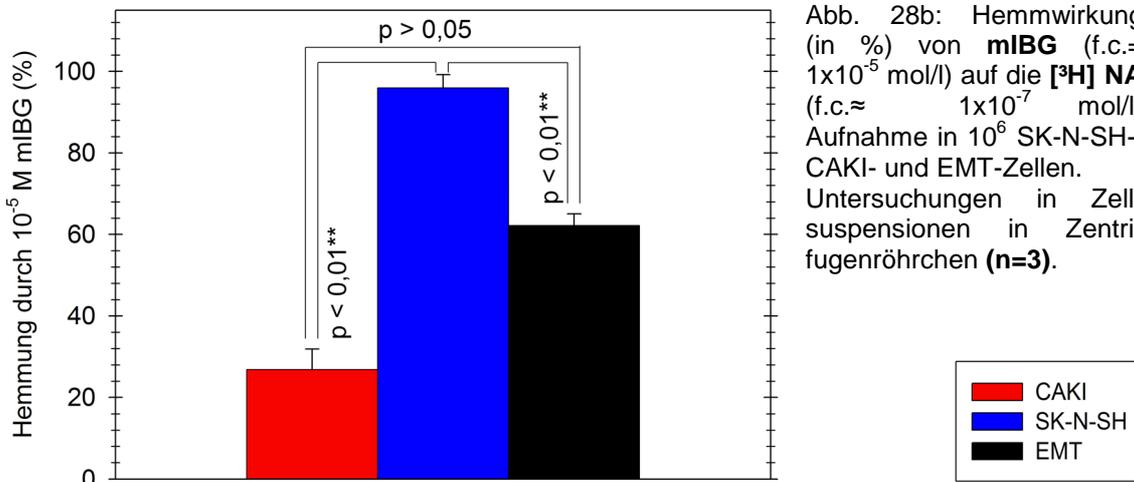


Abb. 28b: Hemmwirkung (in %) von **mIBG** (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die **$[^3\text{H}]$ NA** (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 SK-N-SH-, CAKI- und EMT-Zellen. Untersuchungen in Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen (**n=3**).

Wie in Abb. 28b zu sehen ist, hemmte mIBG die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme in CAKI-Zellen zu $27\% \pm 5\%$, in EMT-Zellen zu $62\% \pm 3\%$ und in SK-N-SH-Zellen zu $96\% \pm 3\%$. Vergleich man diese Hemmeffekte der verschiedenen Zelllinien miteinander, so konnte eine um 3,6-fach schwächere Hemmung der CAKI-Zelllinie bzw. eine um 1,5-fach schwächere Hemmung der EMT-Zelllinie im Vergleich zur SK-N-SH-Zelllinie nachgewiesen werden. Auch der Unterschied zwischen CAKI- und EMT-Zellen war, mit einer 2,3x stärkeren Inhibition der EMT-Zelllinie, nicht unwesentlich. Bei den Screeningversuchen (4.3.1.2, S. 81-84) mit dem Substrat $[^3\text{H}]$ NA entsprach die nach der Stärke des mIBG-Hemmeffektes erstellte Zelllinienreihenfolge, der Reihenfolge, die aus diesen Versuchsergebnissen erstellt werden konnte: **SK-N-SH > EMT > CAKI**.

4.5.6 Vergleich der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA mit der von $[^3\text{H}]$ NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG

Anhand der in Abb. 26b und 28b (Kapitel 4.5.4 und 4.5.5) dargestellten Ergebnisse lässt sich sagen, dass die Hemmwirkung von 10^{-5} M mIBG auf SK-N-SH-Zellen bei beiden Substraten ($[^3\text{H}]$ DA, $[^3\text{H}]$ NA) praktisch gleich war, wobei die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme durch mIBG um das 1,1-fache geringfügig besser

gehemmt wurde als die [^3H] DA Aufnahme. Ein um 1,3-fach größerer Hemmeffekt durch mIBG auf CAKI-Zellen konnte mit [^3H] NA als Substrat erzielt werden. Eine deutlich stärkere Hemmwirkung von mIBG zeigte sich allerdings bei der [^3H] NA Aufnahme in EMT-Zellen. Die Hemmung war hier 2,4x größer im Vergleich zur Hemmung der [^3H] DA Aufnahme. Der Einfluss des Substrates ([^3H] DA versus [^3H] NA) auf den Hemmeffekt von mIBG wurde bereits in den Screeningversuchen untersucht (4.3.1.2, S. 81-84). Die dort gefundenen Ergebnisse stimmten weitgehend mit den bei den Hauptversuchen gefundenen Ergebnissen überein, wobei bei den Vorversuchen eine geringfügig bessere Hemmung durch mIBG auf die [^3H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen im Vergleich zur [^3H] NA Aufnahme beobachtet werden konnte.

4.6 Aufnahme von [^{131}I] mIBG in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron (*Untersuchungen in Zellsuspensionen*)

Es ist schon lange bekannt, dass die Aufnahme von radioaktiv markiertem mIBG in Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomzellen über den NAT erfolgt. Bei der diagnostischen mIBG-Szintigraphie erfolgt aber auch eine Aufnahme in verschiedene andere Zellen und erschwert somit die Differenzierung zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe. Über welche Transporter diese Aufnahme stattfindet, ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Mit der molekularen Identifizierung und der Verteilung der EMT bzw. OCT 1+2 im Organismus wurden Vermutungen aufgestellt, dass das radioaktiv markierte mIBG in gesunde Zellen, die nicht dem sympathischen Nervensystem angehören, über diese Transporter inkorporiert werden könnte.

Um nun herauszufinden, ob mIBG über die extraneuronalen Katecholamintransporter EMT bzw. OCT 1+2 transportiert wird, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuchsreihen durchgeführt. Da [^{131}I] mIBG aus der klinischen Neuroblastomtherapie im Rahmen dieser Arbeit nur eingeschränkt zur

Verfügung stand, wurde die mIBG Aufnahme in Vorversuchen indirekt durch die kompetitive Hemmwirkung von mIBG auf die $[^3\text{H}]$ DA bzw. $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme sowohl in Zellsuspensionsversuchen (DA: 4.5.4.2, S. 119-120, Abb. 26b; NA: 4.5.5.2, S. 121, Abb. 28b) als auch in Transwellversuchen (DA: 4.10.1.3, S. 144-145, Abb. 36; NA: 4.10.2.3, S. 149-150, Abb. 39) ermittelt. Durch die direkten Aufnahmeversuche mit $[^{131}\text{I}]$ mIBG ohne Inhibitor in die verschiedenen Zellen sollten diese Ergebnisse überprüft werden. Wenn eine spezifische Aufnahme über die Transporter erfolgte, sollte in Anwesenheit von Corticosteron die Hemmwirkung des Inhibitors getestet werden.

Diese Untersuchungen wurden entsprechend dem Versuchsprotokoll der Tab. 12 (S. 50) durchgeführt. Dabei wurden bei einer 30-minütigen Inkubationszeit pro 500 μl Inkubationspuffer jeweils 10 μl $[^{131}\text{I}]$ mIBG (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) verwendet, das einem Angebot von ca. 5×10^{-11} Molen $[^{131}\text{I}]$ mIBG pro Ansatz entsprach.

4.6.1 Aufnahme von $[^{131}\text{I}]$ mIBG in Abwesenheit von Corticosteron

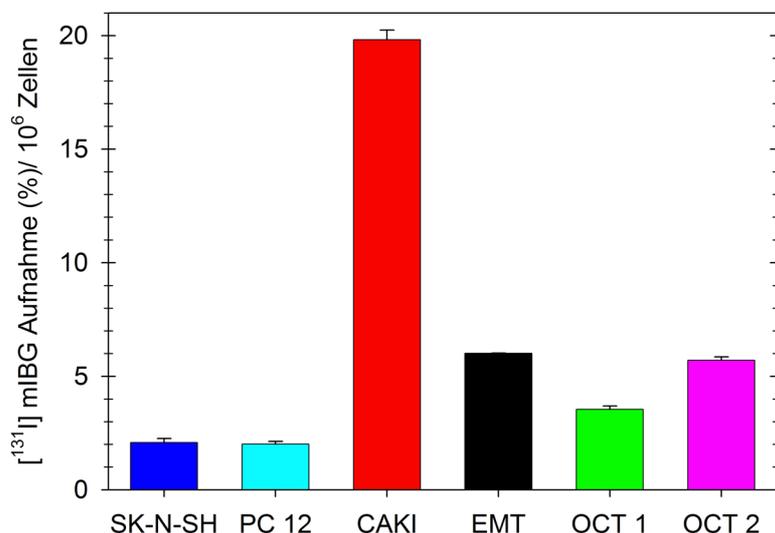


Abb. 29: Aufnahme (in %) von $[^{131}\text{I}]$ mIBG (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien nach 30-minütiger Inkubation in Abwesenheit eines Inhibitors. Untersuchungen in Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen. (**n=1**) 1%-ige Aufnahme/ 10^6 Zellen $\triangleq 5 \times 10^{-13}$ Mole $[^{131}\text{I}]$ mIBG 10^6 Zellen.

In Abb. 29 ist die $[^{131}\text{I}]$ mIBG Aufnahme in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien in Prozent vom ursprünglichen radioaktiven Angebot pro Ansatz dargestellt. Wie aus dieser Abbildung deutlich zu erkennen ist, wurde in

Abwesenheit eines Inhibitors in SK-N-SH- und PC 12-Zellen nahezu die gleiche Menge [¹³¹I] mIBG aufgenommen (2,08% ± 0,20%). Auffällig ist, dass über alle extraneuronalen Katecholamintransporter mehr [¹³¹I] mIBG inkorporiert wurde als über die neuronalen Katecholamintransporter. Dabei nahmen die CAKI-Zellen am stärksten [¹³¹I] mIBG auf. Mit einer Aufnahme von 19,82% ± 0,43% der ursprünglich angebotenen Menge an [¹³¹I] mIBG wurde in diese Zelllinie ca. 10x mehr Radioaktivität aufgenommen als in die SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen. EMT- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen nahmen mit 6,00% ± 0,02% bzw. 5,71% ± 0,14% etwa 3x mehr Radioaktivität auf als die neuronalen SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen, während über den OCT 1 mit 3,55% ± 0,15% ca. 1,5-fach weniger radioaktiv markiertes mIBG inkorporiert wurde.

Zusammenfassend kann aus Abb. 29 folgende Zelllinienreihe erstellt werden, in der die Zelllinie zu Beginn steht, die am meisten [¹³¹I] mIBG inkorporierte: **CAKI >> EMT ≈ OCT 2 > OCT 1 > SK-N-SH ≈ PC 12.**

Ein Ziel dieses Versuches war es herauszufinden, ob die Ergebnisse der direkt ermittelten mIBG Aufnahme mit den Ergebnissen der über den Hemmeffekt indirekt ermittelten mIBG Aufnahme übereinstimmen. Für diesen Vergleich wurden die Ergebnisse der zeitabhängigen [³H] Katecholaminaufnahme in Anwesenheit von 10⁻⁵ M mIBG (4.3.1.2, S. 81-84) und die Ergebnisse der in diesem Kapitel beschriebenen [¹³¹I] mIBG Aufnahme herangezogen.

Dabei ließ sich für die Stärke des Hemmeffektes durch 10⁻⁵ M mIBG nach einer 30-minütigen Inkubation mit [³H] DA eine Zelllinienreihenfolge von **SK-N-SH > PC 12 > OCT 2 > OCT 1 > EMT > CAKI** festlegen. Für die Stärke des Hemmeffektes durch mIBG auf die [³H] NA Aufnahme nach 30-minütiger Inkubationszeit konnte man folgende Reihe aufstellen: **SK-N-SH > EMT > OCT 2 > PC 12 > CAKI > OCT 1**. Vergleicht man diese beiden Reihen mit der in diesem Kapitel ermittelten Reihenfolge (**CAKI >> EMT ≈ OCT 2 > OCT 1 > SK-N-SH ≈ PC 12**), welche die Zelllinien nach der Stärke der [¹³¹I] mIBG Inkorporation bei 30-minütiger Inkubation anordnet, so stellt man nicht identische Reihenfolgen fest. Das bedeutet, dass sich die indirekt ermittelte mIBG Aufnahme von der direkt ermittelten mIBG Aufnahme unterschied.

4.6.2 Einfluss von 10^{-4} M Corticosteron auf die [131 I] mIBG Aufnahme

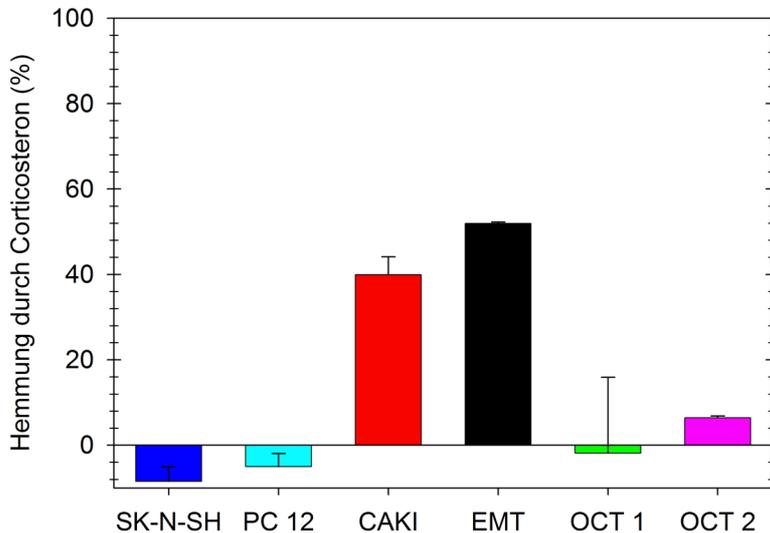


Abb. 30: Hemmeffekt (in %) von Corticosteron (f.c.= 1×10^{-4} mol/l) auf die [131 I] mIBG (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien. Untersuchungen in Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen. (n=1)

Aus Abb. 30, in der der Hemmeffekt von 10^{-4} M Corticosteron auf die [131 I] mIBG Aufnahme pro 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien zu sehen ist, kann man erkennen, dass die neuronalen SK-N-SH- und PC 12-Zellen von 10^{-4} M Corticosteron nicht gehemmt wurden. Geringe Hemmeffekte wurden bei OCT 2-Zellen ($6\% \pm 0,4\%$) und evt. bei OCT 1-Zellen beobachtet. Der tatsächliche Hemmeffekt auf OCT 1-exprimierende HEK 293-Zellen ist auf Grund der großen SD unklar und müsste durch erneute Versuche überprüft werden. Im Gegensatz dazu führte 10^{-4} M Corticosteron bei extraneuronalen EMT- und CAKI-Zellen zu sehr starken Hemmeffekten ($52\% \pm 0,3\%$ bzw. $40\% \pm 4\%$). Zusammenfassend kann nach der Stärke des Corticosteronhemmeffektes auf die [131 I] mIBG Aufnahme folgende Zelllinienreihe erstellt werden: **EMT > CAKI >> OCT 2 > (OCT 1 >) PC 12 \approx SK-N-SH**. Ein Vergleich des Corticosteronhemmeffektes in Abhängigkeit vom Substrat ist im Kapitel 4.7 (S. 126) beschrieben.

4.7 Vergleich der radioaktiven Aufnahme in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron in Abhängigkeit vom Substrat

Die meisten radioaktiven Aufnahme- und Abgaberversuche dieser Arbeit wurden mit [^3H] DA bzw. [^3H] NA durchgeführt. Dabei stellten diese Tritium-markierten Katecholamine nur einen Ersatz für die [^{131}I] mIBG Aufnahme dar, da [^{131}I] mIBG aus Resten einer klinischen Therapie nur begrenzt zur Verfügung stand. Diese beiden Katecholamine DA und NA wurden als Ersatzsubstanzen ausgewählt, da die katecholaminähnliche Substanz mIBG ein ähnliches Aufnahmeverhalten über die Katecholamintransporter zeigt. Dabei wird mIBG, ähnlich wie NA, hauptsächlich über den NAT, nicht jedoch über den DAT aufgenommen. DA hingegen wird sowohl über den DAT als auch über den NAT in die Zellen transportiert. In diesen Vergleichen sollte überprüft werden, ob sich die mit [^3H] DA bzw. [^3H] NA gewonnenen Ergebnisse mit denen, die mit [^{131}I] mIBG als Aufnahmesubstrat erhalten wurden, vergleichen lassen.

4.7.1 Vergleich der radioaktiven Aufnahme in Abwesenheit von Corticosteron

In diesem Kapitel werden die [^{131}I] mIBG Aufnahmen mit den [^3H] DA und den [^3H] NA Aufnahmen in verschiedenen Zelllinien miteinander verglichen. Damit man diesen Vergleich anstellen kann, wurden Versuche ausgewählt, bei denen die Versuchsbedingungen annähernd gleich waren. Es wurden die Versuchsreihen verglichen, deren Ergebnisse durch eine einmalige Doppelbestimmung ermittelt wurden und unter 4.2.1 (S. 72-73), 4.2.2 (S. 73-74) und 4.6.1 (S. 123-124) bereits beschrieben wurden. Alle drei ausgewählten Versuche wurden in Zellsuspensionen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden pro Ansatz radioaktiv markierte Substanzen mit einer f.c. von etwa 1×10^{-7} mol/l 30 min lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Da die

in Tab. 37 aufgelisteten Versuche jedoch mit Zellen unterschiedlicher Passagen durchgeführt wurden, stellt dieser Vergleich nur Trends dar.

In Tab. 37 ist die radioaktive Aufnahme in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien in Prozent dargestellt. Das heißt, es wurde angegeben, wie viel Prozent der ursprünglich im Reaktionsansatz enthaltenen Mole an [^{131}I] mIBG bzw. [^3H] DA bzw. [^3H] NA pro 10^6 Zellen der jeweiligen Zelllinie nach einer 30-minütigen Inkubationszeit aufgenommen wurde. Dabei wurden die erhaltenen Ergebnisse auf eine Zellzahl von 10^6 umgerechnet.

Tab. 37: Vergleich der radioaktiven Aufnahme (in %) in 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien nach einer 30-minütigen Inkubationszeit in Abhängigkeit vom Aufnahmesubstrat.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
[^3H] NA	2,7%	1,3%	1,6%	0,7%	0,1%	0,2%
[^3H] DA	6,0%	4,2%	0,6%	0,4%	0,3%	0,4%
[^{131}I] mIBG	2,1%	2,0%	19,8%	6,0%	3,5%	5,7%

Der Vergleich erfolgte zwischen den Aufnahmesubstraten [^{131}I] mIBG, [^3H] DA und [^3H] NA (f.c. jeweils ca. 1×10^{-7} mol/l).

Auffällig war beim Vergleich der Aufnahmen der unterschiedlichen Substrate in die verschiedenen Zelllinien v.a., dass die SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen in etwa die gleiche Menge von [^{131}I] mIBG wie von [^3H] NA aufnahmen. Markant ist ebenfalls der nur geringe Unterschied zwischen der [^3H] DA und [^3H] NA Aufnahme über die EMT, OCT 1 und OCT 2, während [^{131}I] mIBG über diese Transporter wesentlich stärker inkorporiert wurde.

Ungewöhnlich war auch die wesentlich stärkere Inkorporation von [^{131}I] mIBG in CAKI-, EMT-, OCT 1- und OCT 2-Zellen im Vergleich zu SK-N-SH- und PC 12-Zellen. Bei den Substraten [^3H] DA und [^3H] NA konnte man diesen Effekt nicht beobachten. Hier war die Aufnahme der [^3H] Katecholamine über die neuronalen Katecholamintransporter in SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen stärker als über die extraneuronalen Katecholamintransporter in die anderen Zellen.

Unabhängig vom Aufnahmesubstrat fällt auf, dass in etwa genauso viel über EMT transportiert wurde wie über OCT 2. Über OCT 2 bzw. EMT wurde etwa 1-2x so viel radioaktiv markierte Substanz in HEK 293-Zellen aufgenommen wie

über OCT 1. In CAKI-Zellen konnte man bei allen Substraten eine ca. 2-fach stärkere Aufnahme im Vergleich zu EMT-Zellen feststellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Aufnahmeverhalten der unterschiedlichen Substrate bei den beiden Zelllinien mit neuronalen Katecholamintransporten (SK-N-SH und PC 12) in etwa gleich war. Auch das Aufnahmeverhalten der getesteten Substrate bei den Zelllinien mit extraneuronalen Katecholamintransportern (CAKI, EMT, OCT 1 und OCT 2) ähnelte sich.

4.7.2 Vergleich der Hemmeffekte von 10^{-4} M Corticosteron

Der Vergleich der Hemmeffekte einer 10^{-4} M Corticosteronlösung auf die [131 I] mIBG, [3 H] DA bzw. [3 H] NA Aufnahme in 10^6 Zellen der verschiedenen Zellen ist in Tab. 38 (S. 129) aufgeführt. Für den Vergleich wurden die Versuche herangezogen, deren Ergebnisse unter 4.3.4.3 - 4.3.4.4 (S. 94-98) und 4.6.2 (S. 125) dargestellt sind.

Im Gegensatz zum vorherigen Vergleich in Tab. 37 waren bei diesen 3 Versuchsreihen die Versuchsbedingungen nicht komplett gleich. So fand bei den radioaktiven Aufnahmeversuchen mit [3 H] Katecholaminen eine Inkubation von nur 15 min statt, während die Ansätze in den Aufnahmeversuchen mit [131 I] mIBG 30 min inkubiert wurden. Ein Vergleich ist dennoch zulässig, da die in Tab. 38 aufgeführten Hemmeffekte relative Werte sind. Denn die Hemmwirkungen wurden aus den radioaktiven Aufnahmen in Anwesenheit des Inhibitors berechnet, die in Relation zur ungehemmten Aufnahme gesetzt wurden. Die anderen Versuchsparameter der miteinander verglichenen Untersuchungen waren hingegen gleich. Das heißt, dass alle Aufnahmesubstrate im Reaktionsansatz in einer f.c. von etwa 1×10^{-7} mol/l vorlagen, die Inkubationen bei 37°C im Wasserbad stattfanden und all diese Untersuchungen in Zellsuspensionen durchgeführt wurden.

Die Hemmwirkung von Corticosteron auf die [3 H] NA Aufnahme wurde bei PC 12-, OCT 1- sowie OCT 2-Zellen nicht, und bei CAKI-Zellen nur bei einer

InhibitorKonzentration von 1×10^{-5} mol/l untersucht. Auch die Hemmeffekte auf die [^3H] DA Aufnahme in OCT 1- und OCT 2-Zellen wurden nur mit Konzentrationen bis 1×10^{-5} mol/l getestet. Durch Extrapolation der Hemmkurven von Corticosteron in den Abb. 18e+f (S. 95) und Abb. 19b (S. 97) können die Hemmeffekte einer 10^{-4} M Corticosteronlösung in etwa abgeschätzt werden.

Tab. 38: Vergleich der Hemmeffekte (in %) von Corticosteron (f.c.= 1×10^{-4} mol/l) in Abhängigkeit vom Aufnahmesubstrat.

	SK-N-SH	PC 12	CAKI	EMT	OCT 1	OCT 2
[^3H] NA	3,4%	—	(~50%) ¹	90,0%	—	—
[^3H] DA	18,9%	8,3%	16,6%	65,0%	(~25%) ¹	(~80%) ¹
[^{131}I] mIBG	-8,5%	-5,0%	40,0%	51,9%	-1,8%	6,4%

Der Vergleich erfolgte zwischen den Aufnahmesubstraten [^{131}I] mIBG, [^3H] DA und [^3H] NA (f.c. jeweils ca. 1×10^{-7} mol/l).

¹ (Extrapolierte Angabe des Hemmeffektes auf die [^3H] NA bzw. [^3H] DA Aufnahme in CAKI-, OCT 1- bzw. OCT 2-Zellen bei einer 10^{-4} M Corticosteronlösung).

Zusammenfassend kann anhand Tab. 38 gesagt werden, dass unabhängig vom Aufnahmesubstrat nahezu keine Inhibition der radioaktiven Aufnahme in SK-N-SH- und PC 12-Zellen durch 10^{-4} M Corticosteron stattfand, während die Aufnahme von Radioaktivität in CAKI- und EMT-Zellen unabhängig vom Substrat durch 10^{-4} M Corticosteron sehr stark gehemmt wurde. Die Aufnahme von [^{131}I] mIBG in die OCT 1- und OCT 2-Zellen wurde von Corticosteron praktisch nicht gehemmt. Auffällig ist, dass im Gegensatz zur geringen Hemmung der [^{131}I] mIBG Aufnahme die Aufnahme von [^3H] DA in die OCT 1- bzw. OCT 2-Zellen mit bis zu 76% relativ stark gehemmt wurde.

4.8 Optimierung der Kurzzeitinkubation im Transwellssystem

Da in unserem Labor keine Erfahrungen mit dem Wachstumsverhalten der EMT-, CAKI- und SK-N-SH-Zellen auf den Transwellplatten vorhanden waren, wurden zunächst einige Vorversuche zur Optimierung der Untersuchungen im

Transwellsystem gemacht. In den Vorversuchen wurde untersucht, ob die [³H] DA Aufnahme in die Zellen abhängig ist von dem Ort (d.h. oberem oder unterem Kompartiment), an dem die Radioaktivität angeboten wurde, bzw. von dem Ort, an dem die Zellen ausgesät wurden. Die Protokolle dieser Versuche sind in Tab. 15 (S. 60) sowie unter 3.6.3.1 und 3.6.3.2 (S. 61-62) beschrieben, während die Ergebnisse unter 4.8.1 und 4.8.2 (S. 131-136) dargestellt sind.

Dabei wurden verschiedene Zelllinien verwendet, um eine möglichst generelle und nicht auf eine Zelllinie konzentrierte Aussage zu erhalten. Die Kultivierung der Zellen im Transwellsystem erfolgte, wie unter 3.6.2 (S. 58-59) erläutert, in den jeweiligen Wachstumsmedien. Dabei wurden 3 Tage vor dem Versuch, mit Ausnahme der CAKI-Zellen, pro Kompartiment $1,0 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Wegen der Größe der CAKI-Zellen wurden nur $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Kompartiment verwendet.

Vorteil der 3-tägigen Inkubation vor Versuchsbeginn war die bessere Adhärenz der Zellen am Untergrund. Nachteil war allerdings, dass die genaue Zellzahl am Versuchstag nicht bekannt war. Zwar wurde eine definierte Anzahl an Zellen pro Kompartiment ausgesät, die Zellen der unterschiedlichen Zelllinien haben jedoch evt. eine unterschiedliche Wachstumsrate. Außerdem war auch nicht bekannt, ob die Zellen der gleichen Zelllinie auf dem Wellboden und auf dem Membraneinsatz genauso schnell wuchsen. Diese Problematiken werden im Zusammenhang mit der Verwertbarkeit der im Transwellsystem gefundenen Ergebnisse ausführlich unter 5.2 (S. 163-169) diskutiert.

Da in den Transwellversuchen keine exakten Daten zur Anzahl der für die Aufnahme zur Verfügung stehenden Zellen vorlagen, wurden bei der Beschreibung der Ergebnisse vorrangig die relativen Unterschiede herausgearbeitet. In den Abb. 31 und 32a-c wurde die [³H] DA Aufnahme pro ca. 10^6 Zellen dargestellt, da von den meisten Zelllinien $1,0 \times 10^6$ Zellen je Kompartiment ausgesät wurden. Im Fall der CAKI-Zellen wurden die bei den Versuchen erhaltenen Ergebnisse auf ca. 10^6 Zellen hochgerechnet (d.h. verdoppelt). Diese Prozentangaben können jedoch nur ungefähr auf 10^6 Zellen bezogen werden.

4.8.1 Einfluss des Ortes der Zellaussaat auf die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA

Diese Ergebnisse sollten zeigen, ob der Ort, an dem die Zellen ausgesät wurden, einen Einfluss auf die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme hat. Dafür wurde die gleiche Zelllinie einmal auf dem Boden im unteren Kompartiment und einmal auf der Membran im oberen Kompartiment 3 Tage vor dem Versuch ausgesät. Verwendet wurden dafür CAKI- bzw. PC 12-Zellen.

Die 30-minütige Inkubation erfolgte, entsprechend dem Versuchsprotokoll der Transwellversuche (Tab. 15, S. 60), mit jeweils 2ml Inkubationspuffer pro Kompartiment. Dabei wurde das komplette radioaktiv markierte DA (= $80\mu\text{l}$ $[^3\text{H}]$ DA) in das untere Kompartiment pipettiert. Pro Ansatz standen somit $4,5 \times 10^{-10}$ Mole $[^3\text{H}]$ DA zur Verfügung, das einer f.c. von etwa 1×10^{-7} mol/l entsprach.

In Abb. 31 wird pro Zelllinie die Aufnahme in Zellen des oberen Kompartimentes mit der Aufnahme in das untere Kompartiment verglichen. Die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme ist in Prozent des ursprünglich angebotenen DA pro ca. 10^6 Zellen angegeben. Da nur $0,5 \times 10^6$ CAKI-Zellen pro Kompartiment ausgesät wurden, wurden die erhaltenen Werte auf ungefähr $1,0 \times 10^6$ Zellen umgerechnet.

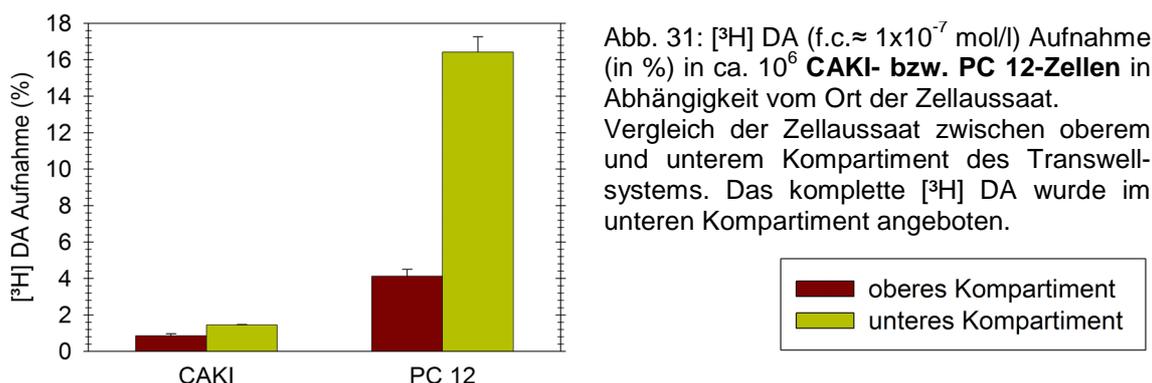


Abb. 31: $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in ca. 10^6 CAKI- bzw. PC 12-Zellen in Abhängigkeit vom Ort der Zellaussaat. Vergleich der Zellaussaat zwischen oberem und unterem Kompartiment des Transwell-systems. Das komplette $[^3\text{H}]$ DA wurde im unteren Kompartiment angeboten.

Wird das komplette $[^3\text{H}]$ DA ausschließlich im unteren Kompartiment angeboten, so nahmen Zellen, die auf dem Boden im unteren Kompartiment anwuchsen, nach einer 30-minütigen Inkubation mehr $[^3\text{H}]$ DA auf, als die auf der Membran ausgesäten Zellen. In Abb. 31 ist zu sehen, dass dies sowohl bei

den CAKI- als auch bei den PC 12-Zellen der Fall war. Dabei erfolgte in CAKI-Zellen des unteren Kompartimentes eine 1,7-fach stärkere Inkorporation der Radioaktivität im Vergleich zu den CAKI-Zellen des oberen Kompartimentes. In die im unteren Kompartiment ausgesäten PC 12-Zellen wurde ca. 4x so viel aufgenommen wie in die im oberen Kompartiment ausgesäten PC 12-Zellen.

4.8.2 Einfluss des Ortes des Radioaktivitätsangebotes auf die Aufnahme von [³H] DA

In drei weiteren Versuchen sollte herausgefunden werden, ob der Ort, an dem die radioaktiv markierte Substanz angeboten wurde, einen Einfluss auf die [³H] DA Aufnahme hat. Die Ergebnisse sind in Abb. 32a-c dargestellt.

Für diese Screeningversuche wurden 3 Tage vorher jeweils $1,0 \times 10^6$ SK-N-SH- und PC 12-Zellen bzw. $0,5 \times 10^6$ CAKI-Zellen in jedem Kompartiment ausgesät. Im ersten Ansatz wurde die Hälfte der in diesem Versuch eingesetzten Radioaktivität im oberen Kompartiment angeboten und die andere Hälfte im unteren Kompartiment. Im zweiten Ansatz wurde die komplette Menge des radioaktiv markierten DAs nur im oberen Kompartiment zur Aufnahme bereitgestellt. In einem dritten Ansatz wurde die verwendete [³H] DA Konzentration zu Beginn der 30-minütigen Inkubation nur in das untere Kompartiment pipettiert. (siehe auch 3.6.3.2, S. 61-62 und Tab. 15, S. 60)

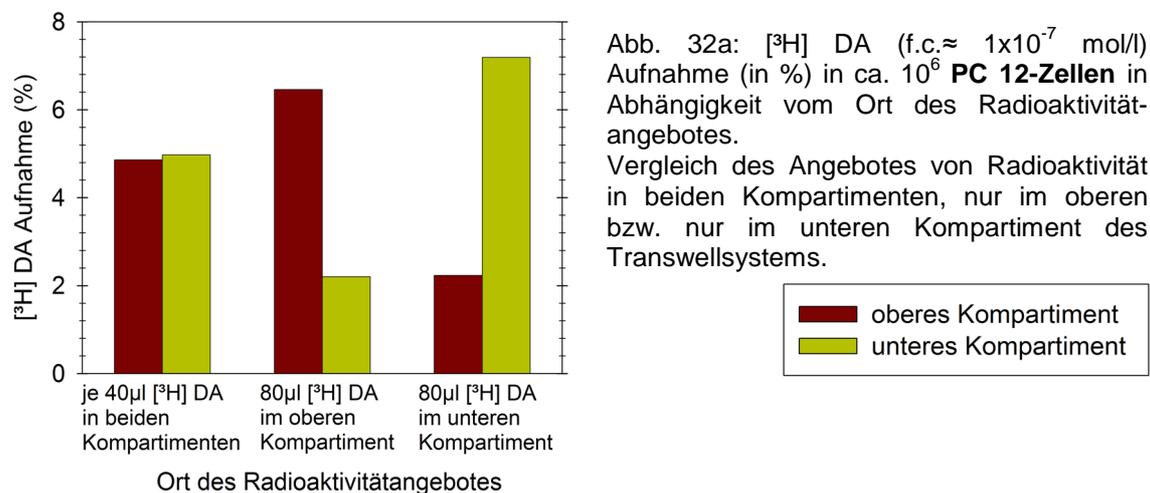


Abb. 32a: [³H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in ca. 10^6 **PC 12-Zellen** in Abhängigkeit vom Ort des Radioaktivitätsangebotes.

Vergleich des Angebotes von Radioaktivität in beiden Kompartimenten, nur im oberen bzw. nur im unteren Kompartiment des Transwellsystems.

In Abb. 32a ist keine SD zu sehen, da jeder Wert nur einmal gemessen wurde. Bei diesem Versuch standen den PC 12-Zellen pro Ansatz $4,5 \times 10^{-10}$ Mole $[^3\text{H}]$ DA zur Aufnahme zur Verfügung (Δ f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l).

In dem Ansatz, in dem jeweils die Hälfte der verwendeten Radioaktivität in beiden Kompartimenten angeboten wurde, ist die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in die Zellen beider Kompartimente nahezu gleich. Stand das komplette $[^3\text{H}]$ DA zu Beginn der Inkubation im oberen Kompartiment zur Verfügung, so wurde es auch hauptsächlich von den dort angezüchteten Zellen aufgenommen. Den umgekehrten Effekt kann man auch im dritten Ansatz sehen. Beim Vergleich der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in beide Kompartimente konnte festgestellt werden, dass in die Zellen desjenigen Kompartimentes ca. 3x mehr Radioaktivität aufgenommen wurde, in dem zu Beginn der Inkubation das $[^3\text{H}]$ DA zur Verfügung stand.

Dies deutet darauf hin, dass kein ausreichender Austausch des Inkubationspuffers zwischen den beiden Kompartimenten innerhalb der kurzen Inkubationszeit von nur 30 min stattfand.

Um den Austausch zu verbessern und zu beschleunigen, wurden im nächsten Versuch, wie unter 3.6.3.2 (S. 61-62) beschrieben, 10 Löcher in die Seitenwand des Membraneinsatzes gelötet. In diesem Versuch wurden CAKI-Zellen verwendet und pro Ansatz $4,5 \times 10^{-10}$ Mole $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) angeboten.

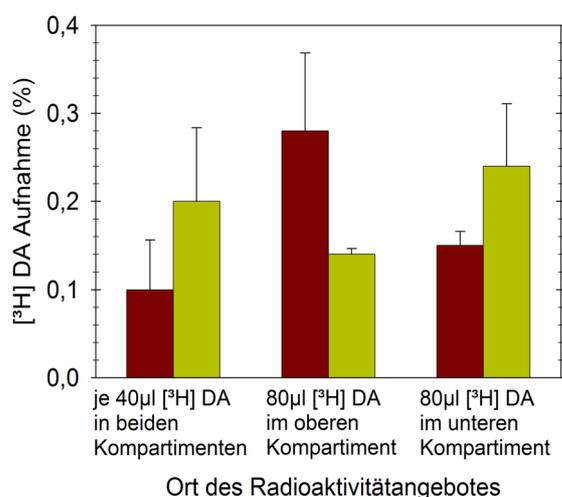


Abb. 32b: $[^3\text{H}]$ DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in ca. 10^6 CAKI-Zellen in Abhängigkeit vom Ort des Radioaktivitätsangebotes.

Vergleich des Angebotes von Radioaktivität in beiden Kompartimenten, nur im oberen bzw. nur im unteren Kompartiment des Transwellsystems.



In Abb. 32b ist eine relativ große SD zu erkennen. Berücksichtigt man diese SD, so kann man annehmen, dass sich die [³H] DA Aufnahme in die Zellen des oberen Kompartimentes und die [³H] DA Aufnahme in die Zellen des unteren Kompartimentes nicht wesentlich unterscheiden, wenn zu Beginn der Inkubation in beiden Kompartimenten gleiche Konzentrationen an [³H] DA zur Verfügung standen. Im zweiten Ansatz der Abb. 32b lässt sich eine 2-fach stärkere Aufnahme in die Zellen des oberen Kompartimentes verzeichnen, wenn in diesem Kompartiment zu Beginn der Inkubation [³H] DA angeboten wurde. Den umgekehrten Effekt kann man im dritten Ansatz der Abb. 32b erkennen, wenn die komplette [³H] DA Konzentration in das untere Kompartiment pipettiert wurde. Mit einer 1,5-fachen Aufnahme in Zellen des unteren Kompartimentes ist der Effekt allerdings hier nicht so stark ausgeprägt. Lässt man auch bei diesen beiden Ansätzen die hohe SD nicht außer Acht, so sind die Aufnahmeunterschiede zwischen den beiden Kompartimenten wahrscheinlich etwas geringer ausgeprägt als in der Versuchsreihe mit der PC 12-Zelllinie (Abb. 32a).

Das könnte bedeuten, dass ein besserer Austausch des Inkubationspuffers zwischen den Kompartimenten stattfand als im vorherigen Versuch. Somit wären die in die Seitenwand des Membraneinsatzes hineingelöteten Löcher von Vorteil.

In einem weiteren Versuch, der mit der SK-N-SH-Zelllinie durchgeführt wurde, wurden zusätzlich zu den Löchern in der Seitenwand weitere Optimierungsmaßnahmen zum schnelleren Austausch der Radioaktivität getestet. Zum Einen wurden Membrane mit einer größeren Porenweite (3,0µm statt 0,4µm) verwendet. Außerdem wurden statt 4ml Inkubationspuffer und 80µl radioaktiv markierter Substanzen 6ml Puffer und 120 µl [³H] DA pro Vertiefung angeboten. Pro Ansatz waren nun $6,8 \times 10^{-10}$ Mole [³H] DA enthalten, während die f.c. von [³H] DA mit etwa 1×10^{-7} mol/l gleich blieb.

Aus nachfolgender Abb. 32c ist ersichtlich, dass die [³H] DA Aufnahme in die Zellen beider Kompartimente nahezu gleich war, wenn in beiden Kompartimenten gleich viel [³H] DA angeboten wurde. Stand die komplette Radioaktivität zu Beginn der Inkubation im oberen Kompartiment zur Verfügung,

so wurde ca. 2,3x mehr [^3H] DA von diesen Zellen aufgenommen, die auf der Membran ausgesät waren. Wurde [^3H] DA im unteren Kompartiment angeboten, so wurde in diese Zellen 3x mehr [^3H] DA aufgenommen, als in Zellen des oberen Kompartimentes.

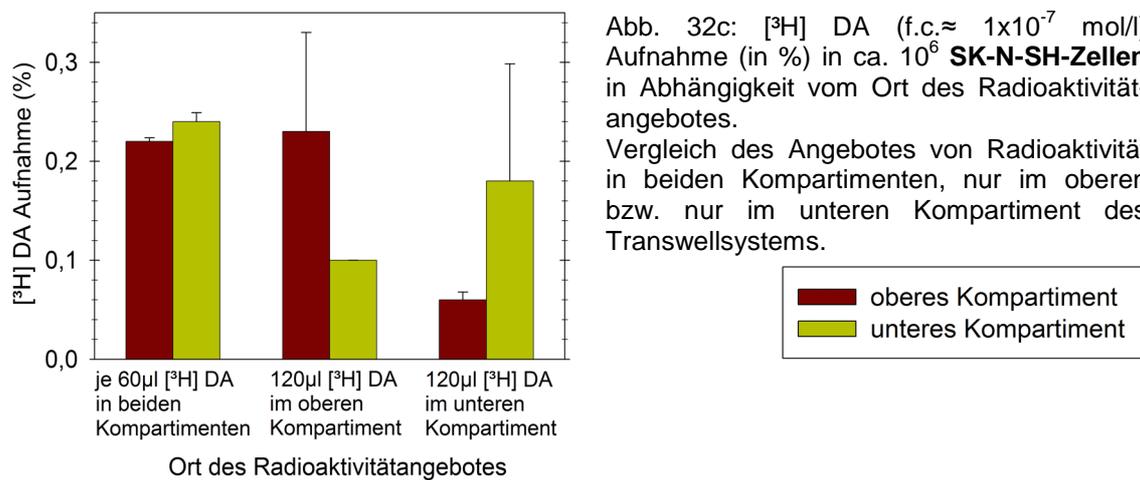


Abb. 32c: [^3H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in ca. 10^6 **SK-N-SH-Zellen** in Abhängigkeit vom Ort des Radioaktivitätsangebotes.

Vergleich des Angebotes von Radioaktivität in beiden Kompartimenten, nur im oberen bzw. nur im unteren Kompartiment des Transwellsystems.

Beim Vergleich der beiden neuronalen Zelllinien in Abb. 32a und 32c fällt auf, dass SK-N-SH-Zellen wesentlich weniger [^3H] DA inkorporierten als PC 12-Zellen. Dies liegt wahrscheinlich an den Problemen bei der Versuchsdurchführung im Transwellsystem 5.2.1 (S. 163-166), insbesondere dem unbestimmten Zellverlust beim Waschvorgang.

Da man auf Grund der relativ hohen SD im zweiten und dritten Ansatz der Abb. 32c keine genauen Angaben zum Aufnahmeunterschied in den beiden Kompartimenten machen kann, ist nicht sicher, ob die durchgeführten Optimierungsmaßnahmen von Vorteil sind. Da sie aber auch keinen Nachteil darstellten, wurden die getesteten Maßnahmen in den weiteren Transwellversuchen angewendet.

Aus den Abb. 32a-c kann man zusammenfassend festhalten, dass die Aufnahme von [^3H] DA in die Zellen beider Kompartimente am ähnlichsten ist, wenn zu Inkubationsbeginn eine Hälfte der eingesetzten Radioaktivität in das obere Kompartiment und die andere Hälfte der Radioaktivität in das untere Kompartiment pipettiert wurde. Diese Art der Zugabe scheint, im Bezug auf

vergleichbare Aufnahmen im oberen und unteren Kompartiment, die Beste zu sein. Deshalb wurden die radioaktiv markierten Katecholamine in den nachfolgenden Versuchen im Transwellsystem in dieser Weise angeboten.

4.9 Einfluss der Präsenz konkurrierender Zellen auf die Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA in Zellen des Transwellsystems in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10⁻⁴ M Corticosteron bzw. 10⁻⁵ M mIBG

Da das Transwellsystem, wie unter 3.6.1 (S. 57-58) beschrieben, ein Co-Kultursystem ist, können zwei verschiedene Zelllinien im gleichen Puffer inkubiert werden. Diese beiden Zelllinien stehen also theoretisch in Konkurrenz um die gleichen Stoffe des Inkubationspuffers, wie dies bei den verschiedenen Zellen im Körper auch der Fall ist.

Anhand dieses Versuches sollte geklärt werden, ob die Konkurrenzsituation einen Einfluss auf die [³H] Katecholaminaufnahme in die verschiedenen Zellen hatte. Dafür wurden pro Zelllinie 2 Reaktionsansätze miteinander verglichen. In beiden Ansätzen war die Zelllinie, die getestet werden sollte, im unteren Kompartiment des Transwellsystems ausgesät. In einem der beiden Ansätze war zusätzlich im oberen Kompartiment auf dem Membraneinsatz eine andere Zelllinie ausgesät, während das obere Kompartiment beim anderen Ansatz leer blieb. Bei diesen Screeningversuchen wurden die in den Hauptversuchen verwendeten extraneuronalen Zelllinien CAKI und EMT sowie die neuronale Zelllinie SK-N-SH untersucht.

Die Durchführung der Untersuchungen fand entsprechend dem Versuchsprotokoll der Transwellversuche (Tab. 15, S. 60) und der Versuchsbeschreibung unter 3.6.3.4 (S. 64-65) statt. Dabei wurden alle getesteten Optimierungsmaßnahmen beachtet. Das heißt, dass in die

Seitenwand der Membraneinsätze 10 Löcher hineingelötet wurden, eine Membranporengröße von 3,0µm verwendet wurde sowie vom Inkubationspuffergemisch (\pm 6ml Inkubationspuffer + 120µl Radioaktivität \pm 120µl Inhibitor, (siehe Tab. 17, S. 64)) eine Hälfte im oberen Kompartiment und die andere Hälfte im unteren Kompartiment angeboten wurde.

Pro Reaktionsansatz wurden $7,2 \times 10^{-10}$ Mole [^3H] DA bzw. [^3H] NA angeboten (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l). Dabei wurde für die Ansätze mit den SK-N-SH-Zellen in Zellkonkurrenz zu EMT-Zellen sowie für die EMT-Zellen in Konkurrenz zu SK-N-SH-Zellen als Aufnahmesubstrat [^3H] DA eingesetzt. Für die Aufnahme in CAKI-Zellen, die in Konkurrenz zur SK-N-SH-Zelllinie standen und für die SK-N-SH-Zellen, die mit den CAKI-Zellen konkurrierten, wurde radioaktiv markiertes NA verwendet.

In Abb. 33a-c (S. 138) ist die Aufnahme der Katecholamine in die verschiedenen Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation (bei 37°C und 0,5% CO₂) in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron bzw. 10^{-5} M mIBG zu sehen. Die prozentuale Aufnahme ist pro ungefähr 10^6 Zellen angegeben, wobei die Ergebnisse der CAKI-Zellen auf ca. 10^6 Zellen hochgerechnet, d.h. verdoppelt wurden. Die Zellzahl kann, wie bereits beschrieben, nicht exakt angegeben werden, da $1,0 \times 10^6$ SK-N-SH- und EMT-Zellen sowie $0,5 \times 10^6$ CAKI-Zellen drei Tage vor dem Versuch auf Grund der besseren Adhärenz ausgesät wurden.

Die Aufnahme der radioaktiv markierten Katecholamine in die getesteten Zelllinien ist pro Zelllinie jeweils durch zwei verschiedene Balken dargestellt. Der erste, hellere Balken jeder Zelllinie steht dabei für die Menge der aufgenommenen Radioaktivität, wenn keine andere Zelllinie auf dem Membraneinsatz im Transwellsystem ausgesät war, d.h. keine Konkurrenzsituation vorlag. Der zweite, dunklere Balken zeigt die Menge der inkorporierten [^3H] Katecholamine in den getesteten Zelllinien an, wenn außer der auf dem Boden der Transwellplatte angezüchteten, zu überprüfenden Zelllinie eine zweite Zelllinie auf der Membran ausgesät war, d.h. eine Konkurrenzsituation zwischen zwei verschiedenen Zellen bestand.

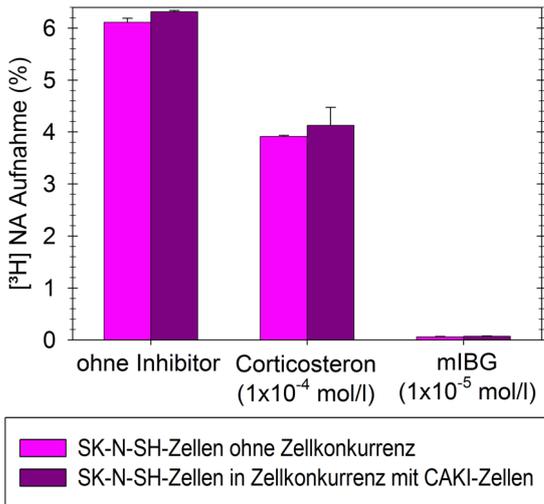


Abb. 33a: Aufnahme (in %) von $[^3\text{H}] \text{NA}$ (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) in ca. 10^6 **SK-N-SH-Zellen** ohne und mit dem Inhibitor Corticosteron (f.c. = $1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) bzw. mIBG (f.c. = $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$). Vergleich der radioaktiven Aufnahme im Transwellssystem in Anwesenheit und Abwesenheit von **konkurrierenden CAKI-Zellen**. Die getestete Zelllinie lag im unteren Kompartiment vor, während die konkurrierenden Zellen im oberen Kompartiment ausgesät waren.

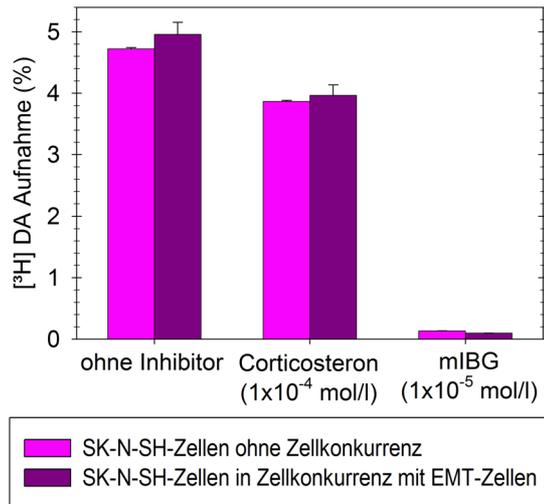


Abb. 33b: Aufnahme (in %) von $[^3\text{H}] \text{DA}$ (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) in ca. 10^6 **SK-N-SH-Zellen** ohne und mit dem Inhibitor Corticosteron (f.c. = $1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) bzw. mIBG (f.c. = $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$). Vergleich der radioaktiven Aufnahme im Transwellssystem in Anwesenheit und Abwesenheit von **konkurrierenden EMT-Zellen**. Die getestete Zelllinie lag im unteren Kompartiment vor, während die konkurrierenden Zellen im oberen Kompartiment ausgesät waren.

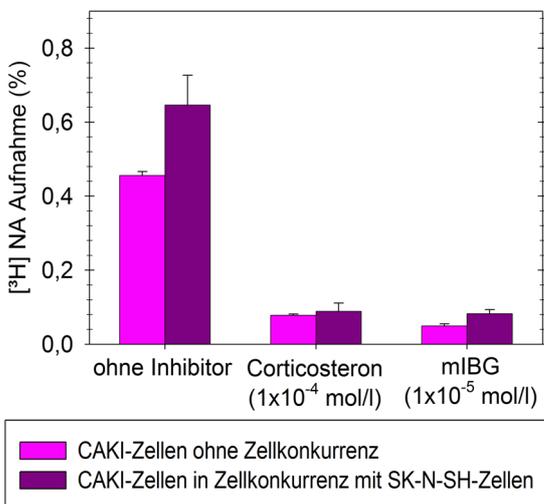


Abb. 33c: Aufnahme (in %) von $[^3\text{H}] \text{NA}$ (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) in ca. 10^6 **CAKI-Zellen** ohne und mit dem Inhibitor Corticosteron (f.c. = $1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) bzw. mIBG (f.c. = $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$). Vergleich der radioaktiven Aufnahme im Transwellssystem in Anwesenheit und Abwesenheit von **konkurrierenden SK-N-SH-Zellen**. Die getestete Zelllinie lag im unteren Kompartiment vor, während die konkurrierenden Zellen im oberen Kompartiment ausgesät waren.

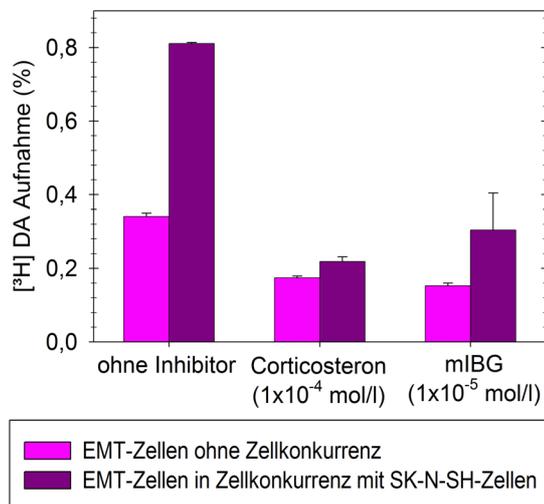


Abb. 33d: Aufnahme (in %) von $[^3\text{H}] \text{DA}$ (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) in ca. 10^6 **EMT-Zellen** ohne und mit dem Inhibitor Corticosteron (f.c. = $1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) bzw. mIBG (f.c. = $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$). Vergleich der radioaktiven Aufnahme im Transwellssystem in Anwesenheit und Abwesenheit von **konkurrierenden SK-N-SH-Zellen**. Die getestete Zelllinie lag im unteren Kompartiment vor, während die konkurrierenden Zellen im oberen Kompartiment ausgesät waren.

In den Abb. 33a-d kann man erkennen, dass die Aufnahme der Radioaktivität in die getesteten Zellen, nicht wie erwartet reduziert, sondern sogar leicht erhöht war, wenn eine andere Zelllinie im oberen Kompartiment zu ihr in Konkurrenz stand. Die größte Steigerung fand mit der um 2,4-fach höheren radioaktiven Aufnahme in EMT-Zellen in Anwesenheit von konkurrierenden SK-N-SH-Zellen im Reaktionsansatz ohne Inhibitor im Vergleich zur Aufnahme in die EMT-Zellen ohne Zellkonkurrenz. (Vergleich Vorversuche mit Zellsuspensionen: 4.3.1, S. 77-84; 4.3.4, S. 89-98; 4.5, S. 111-122).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dem als Modell verwendeten Transwellsystem eine Konkurrenzsituation der Zellen die [³H] Katecholamin-aufnahme in die verschiedenen Zellen nahezu nicht beeinflusste.

4.10 Einfluss von 10^{-4} M Corticosteron bzw. 10^{-5} M mIBG auf die Aufnahme von [³H] DA oder [³H] NA in Abhängigkeit vom Ort der Zellaussaat (*Untersuchungen im Transwellsystem*)

Nach den Untersuchungen des Einflusses von 10^{-4} M Corticosteron bzw. 10^{-5} M mIBG auf die [³H] Katecholaminaufnahme in Zellsuspensionen (4.5, S. 111-122) wurde dieser auch mit Co-Kulturen im Transwellsystem analysiert. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte nach dem Versuchsprotokoll der radioaktiven Aufnahme in Zellen des Transwellsystemes (Tab. 15, S. 60) und ist unter 3.6.3.3 (S. 62-65) genauer beschrieben. Dementsprechend wurde die 30-minütige Inkubation (37°C und 0,5% CO₂), bei der pro Well ca. $6,3 \times 10^{-10}$ Mole [³H] DA bzw. $7,2 \times 10^{-10}$ Mole [³H] NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) vorlagen, mit den zuvor getesteten Optimierungsmaßnahmen durchgeführt. Das bedeutet, dass in die Seitenwand der Membraneinsätze 10 Löcher hineingelötet wurden, eine Membranporengröße von 3,0µm verwendet wurde, sowie vom Inkubationspuffergemisch (\pm 6ml Inkubationspuffer + 120µl Radioaktivität \pm 120µl Inhibitor, (siehe Tab. 17, S. 64)) eine Hälfte im oberen Kompartiment und die andere Hälfte im unteren Kompartiment angeboten wurde. Da trotz dieser

Optimierungsmaßnahmen keine komplette Gleichheit der [^3H] Katecholamin-aufnahme in die Zellen der unterschiedlichen Kompartimente erzielt werden konnte, wurden bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen die jeweiligen Untersuchungen vergleichend in beiden Kompartimenten durchgeführt.

In den Abb. 34-39 sind die $\text{MW}\pm\text{SD}$ dargestellt, wobei der Mittelwert aus 9 Messwerten berechnet wurde. Die prozentuale [^3H] DA bzw. [^3H] NA Aufnahme ist in den Abb. 34 und 37 auf der Ordinate pro ca. 10^6 Zellen angegeben. Diese Zellzahl stellt jedoch nur eine ungefähre Angabe dar, da die Aussaat von $1,0\times 10^6$ SK-N-SH- bzw. EMT-Zellen sowie $0,5\times 10^6$ CAKI-Zellen in das Transwellsystem bereits 3 Tage vor dem Versuch auf Grund der besseren Adhärenz erfolgte.

Wie in Abb. 19b (S. 97) bei den Screeningversuchen zu sehen ist, hemmte 10^{-4} M Corticosteron die [^3H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen besser als die [^3H] DA Aufnahme. Da das Substrat auf den Hemmeffekt von Corticosteron bei SK-N-SH-Zellen nahezu keinen Einfluss hatte (Abb. 19a, S. 97), wurde im Transwellsystem für die Co-Kulturversuche mit SK-N-SH- und CAKI-Zellen [^3H] NA als Substrat verwendet. Dieses Substrat diente als Ersatz für das in der Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomtherapie verwendete [^{131}I] mIBG, das ähnlich wie NA v.a. über die NAT, nicht jedoch über die DAT aufgenommen wird.

Da überlegt wird, zukünftig das [^{18}F]-markierte DA-Analogon 6-FDA routinemäßig in der PET-Diagnostik des Neuroblastoms bzw. Phäochromozytoms einzusetzen, sollte in den Hauptversuchen auch der Hemmeffekt von Corticosteron und mIBG auf die [^3H] DA Aufnahme untersucht werden, da das Aufnahmeverhalten von 6-FDA eher dem von DA als dem von NA entspricht. Bei den Versuchen mit SK-N-SH- und EMT-Zellen im Transwellsystem wurde daher [^3H] DA benutzt.

4.10.1 Aufnahme von [^3H] DA in SK-N-SH- und EMT-Zellen

4.10.1.1 Aufnahme von [^3H] DA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron bzw. 10^{-5} M mIBG

Abb. 34 ist in drei Abschnitte gegliedert: Der erste Abschnitt zeigt die [^3H] DA Aufnahme in EMT- und SK-N-SH-Zellen in Abwesenheit eines Inhibitors. Die

[³H] DA Aufnahme in Anwesenheit des „funktionellen“ Inhibitors Corticosteron ist im zweiten Abschnitt dargestellt und im dritten Abschnitt in Anwesenheit des kompetitiven Hemmstoffes mIBG. In jedem Abschnitt ist jeweils die [³H] DA Aufnahme in die Zellen des oberen Kompartimentes im ersten Balken zu sehen und im zweiten Balken die in die Zellen des unteren Kompartimentes.

Desweiteren sind in Abb. 34 pro Kompartiment die p-Werte des gepaarten t-Testes dargestellt, bei dem die statistische Signifikanz des Rückganges der [³H] DA Aufnahme in Anwesenheit eines Inhibitors analysiert wurde.

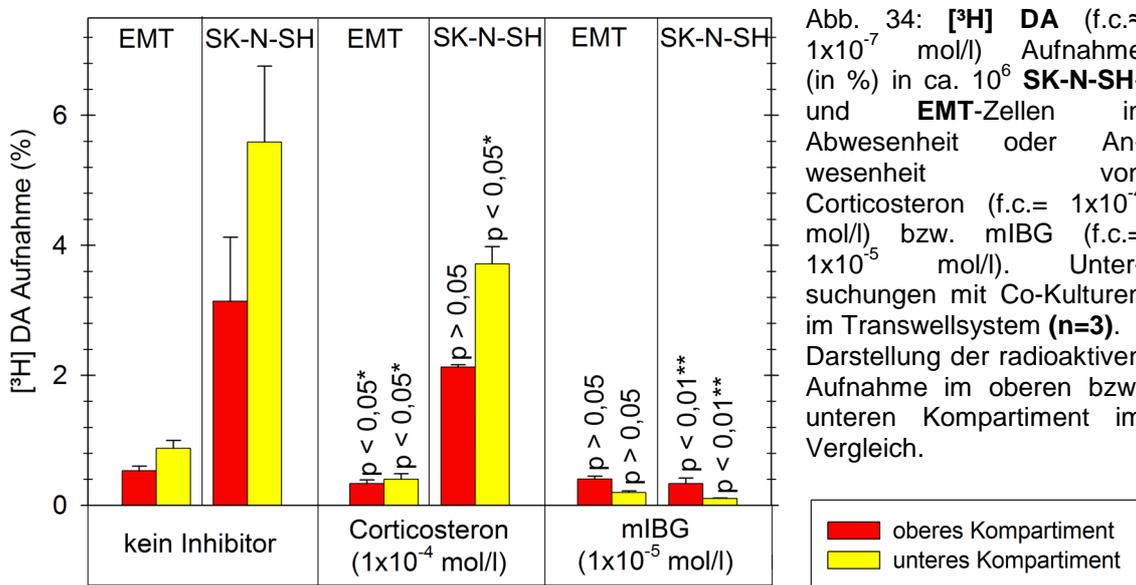


Abb. 34: [³H] DA (f.c. ≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme (in %) in ca. 10⁶ SK-N-SH- und EMT-Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron (f.c. = 1x10⁻⁴ mol/l) bzw. mIBG (f.c. = 1x10⁻⁵ mol/l). Untersuchungen mit Co-Kulturen im Transwellssystem (n=3). Darstellung der radioaktiven Aufnahme im oberen bzw. unteren Kompartiment im Vergleich.

Im Inkubationsansatz **ohne Inhibitor** nahmen die EMT-Zellen im unteren Kompartiment 0,88% ± 0,12% des ursprünglich angebotenen [³H] DA auf. Im Vergleich dazu wurde mit einer 0,53% ± 0,07%-igen Aufnahme in die EMT-Zellen des oberen Kompartimentes 1,7-fach weniger radioaktiv markiertes DA inkorporiert. Die SK-N-SH-Zellen nahmen im unteren Kompartiment 5,59% ± 1,17% der angebotenen Radioaktivität auf, während im oberen Kompartiment eine 1,8-fach geringere Menge inkorporiert wurde (= 3,14% ± 0,98%).

Wie im zweiten Abschnitt der Abb. 34 zu erkennen ist, wurde die [³H] DA Aufnahme in Anwesenheit des Inhibitors **Corticosteron** mit der [³H] DA Aufnahme in Abwesenheit des Inhibitors statistisch miteinander verglichen. Dabei fand dieser Vergleich zwischen oberem und oberem Kompartiment sowie

unterem und unterem Kompartiment statt. In EMT-Zellen des oberen Kompartimentes wurden in Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron nur noch $0,33\% \pm 0,06\%$ der ursprünglich angebotenen Radioaktivität aufgenommen. Das entsprach einem 1,6-fachen Rückgang, der statistisch signifikant ($p < 0,05$) ist. Auch in den EMT-Zellen des unteren Kompartimentes konnte, im Vergleich zur [^3H] DA Aufnahme ohne Inhibitor, in Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron eine um die Hälfte reduzierte radioaktive Aufnahme gemessen werden (von $0,88\% \pm 0,12\%$ auf $0,40\% \pm 0,08\%$, $p < 0,05$). Im Vergleich zum oberen Kompartiment ließ sich im unteren Kompartiment eine um 1,2-fach stärkere Inkorporation nachweisen. Die [^3H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen des oberen Kompartimentes sank in Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron auf $2,12\% \pm 0,03\%$ ($p > 0,05$). Das bedeutete eine 1,4-fach verminderte Inkorporation in Anwesenheit von Corticosteron. In SK-N-SH-Zellen des unteren Kompartimentes sank der Transport der Radioaktivität in Anwesenheit von Corticosteron um das 1,5-fache auf $3,70\% \pm 0,27\%$ ($p < 0,05$). War Corticosteron im Reaktionsansatz enthalten, so nahmen die SK-N-SH-Zellen des unteren Kompartimentes im Vergleich zum oberen Kompartiment 1,8x mehr Radioaktivität auf.

Der kompetitive Inhibitor **mIBG**, der über seinen Hemmeffekt indirekt eine Aussage über dessen Aufnahme erlaubt, senkte die [^3H] DA Aufnahme in EMT-Zellen des oberen Kompartimentes von $0,53\% \pm 0,07\%$ auf $0,40\% \pm 0,04\%$ ($p > 0,05$). Im unteren Kompartiment erfolgte ein 4,9-facher Rückgang auf $0,19\% \pm 0,03\%$ ($p > 0,05$). Beim Vergleich der [^3H] DA Aufnahme in EMT-Zellen zwischen den beiden Kompartimenten fiel eine 2,1-fach vermehrte Aufnahme im oberen Kompartiment auf. Bei SK-N-SH-Zellen wurde sowohl im oberen als auch im unteren Kompartiment ein starker Rückgang der [^3H] DA Aufnahme in Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG beobachtet. Dabei fand im oberen Kompartiment eine Reduktion um das 9,5-fache von $3,14\% \pm 0,98\%$ auf $0,33\% \pm 0,08\%$ ($p < 0,01$) statt und im unteren Kompartiment ein 55,9-facher Rückgang von $5,59\% \pm 1,17\%$ auf $0,10\% \pm 0,016\%$ ($p < 0,01$). Eine 3,3-fach stärkere Aufnahme erfolgte in SK-N-SH-Zellen des oberen Kompartimentes im Vergleich zum unteren Kompartiment.

Tab. 39: Verhältnis der [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in ca.10⁶ SK-N-SH-Zellen zur [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in ca. 10⁶ EMT-Zellen.

Versuchsansatz	SK-N-SH : EMT	
	oben	unten
ohne Inhibitor	5,9 : 1	6,4 : 1
mit Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l)	6,4 : 1	9,3 : 1

Das Aufnahmeverhältnis ist in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron für jedes Kompartiment separat aufgelistet; oben = oberes Kompartiment, unten = unteres Kompartiment.

Tabelle 39 zeigt den Unterschied in der radioaktiven Aufnahme der beiden Zelllinien in den beiden Kompartimenten in Abwesenheit oder Anwesenheit der Inhibitoren. Hervorzuheben ist, dass sich in Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron das Verhältnis der [³H] DA Aufnahme in Richtung der SK-N-SH-Zellen verschob. Die gesteigerte Anreicherung von Radioaktivität in neuronale Zellen ist ein wichtiger Befund im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung von Corticosteron, die im Diskussionsteil noch erörtert wird.

4.10.1.2 Vergleich der Hemmeffekte von 10⁻⁴ M Corticosteron auf die Aufnahme von [³H] DA in SK-N-SH- und EMT-Zellen

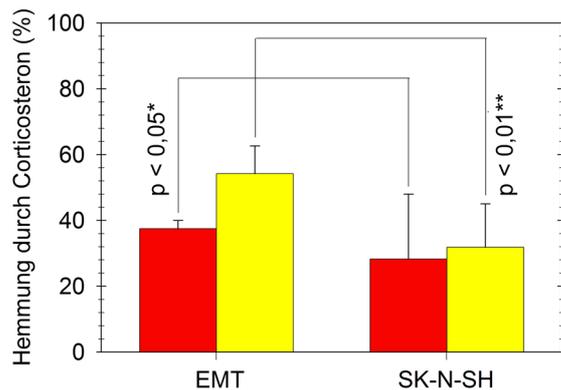


Abb. 35: Hemmwirkung (in %) von 10⁻⁴ M Corticosteron auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in ca. 10⁶ SK-N-SH- bzw. EMT-Zellen. Untersuchungen mit Co-Kulturen im Transwellsystem (n=3).

Darstellung der Hemmwirkung im oberen bzw. unteren Kompartiment im Vergleich.



In Abb. 35 ist der Hemmeffekt von Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l) auf die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen bzw. EMT-Zellen vergleichend zwischen den beiden Kompartimenten dargestellt sowie die statistische Signifikanz des

Unterschiedes zwischen dem Corticosteronhemmeffekt auf EMT-Zellen und dem Corticosteronhemmeffekt auf SK-N-SH-Zellen.

Für das obere Kompartiment lässt sich aus Abb. 35 ein Hemmeffekt von 10^{-4} M Corticosteron auf die [^3H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen von $28\% \pm 19\%$ ablesen. Die Hemmwirkung auf die radioaktive Aufnahme in EMT-Zellen des oberen Kompartimentes war 1,3-fach stärker und betrug $37\% \pm 3\%$ ($p > 0,05$). Die [^3H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen des unteren Kompartimentes wurde von Corticosteron zu $32\% \pm 13\%$ gehemmt, während der Hemmeffekt auf EMT-Zellen des unteren Kompartimentes um 1,7-fach höher war ($54\% \pm 8\%$). Im Gegensatz zum oberen Kompartiment war beim Vergleich der Hemmeffekte zwischen den beiden Zelllinien im unteren Kompartiment ein hochsignifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zu verzeichnen.

Die Corticosteronhemmeffekte, die auf die [^3H] DA Aufnahme in Zellsuspensionsversuchen erzielt wurden, sind unter 4.5.1.2 (S. 114-115) beschrieben.

4.10.1.3 Vergleich der Hemmeffekte von 10^{-5} M mIBG auf die Aufnahme von [^3H] DA in SK-N-SH- und EMT-Zellen

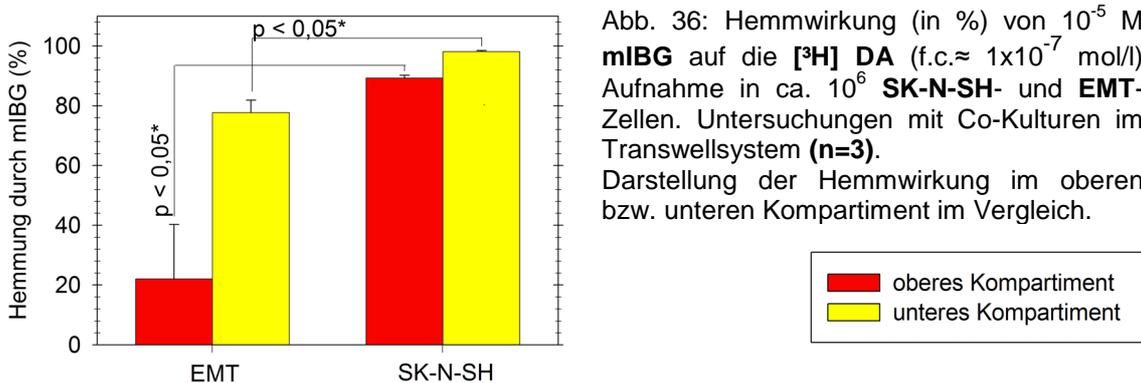


Abb. 36: Hemmwirkung (in %) von 10^{-5} M mIBG auf die [^3H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in ca. 10^6 SK-N-SH- und EMT-Zellen. Untersuchungen mit Co-Kulturen im Transwellssystem ($n=3$).

Darstellung der Hemmwirkung im oberen bzw. unteren Kompartiment im Vergleich.

In Abb. 36 sind die Hemmeffekte von 10^{-5} M mIBG vergleichend auf die [^3H] DA Aufnahme in EMT- und SK-N-SH-Zellen beider Kompartimente zu sehen sowie der mit dem gepaarten t-Test ermittelte statistische Vergleich der mIBG-Hemmwirkung zwischen den Zelllinien. Diese Ergebnisse sind für die Zellsuspensionsversuche unter 4.5.1.2 (S. 114-115) beschrieben.

In EMT-Zellen des oberen Kompartimentes erreichte der Inhibitor mIBG nur einen Hemmeffekt von $22\% \pm 18\%$, während er in SK-N-SH-Zellen eine um 4-fach höhere Hemmung der $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme von $89\% \pm 1\%$ bewirkte ($p < 0,05$). Für das untere Kompartiment lässt sich aus Abb. 36 ein Hemmeffekt von mIBG auf die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in EMT-Zellen von $78\% \pm 4\%$ ablesen. Die Hemmwirkung auf die Aufnahme in SK-N-SH-Zellen des unteren Kompartimentes war 1,3x stärker ($98\% \pm 0,4\%$), das im Vergleich zu EMT-Zellen einem statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Effekt entsprach.

Beim Vergleich der Hemmeffekte auf die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme in EMT- bzw. SK-N-SH-Zellen zwischen den beiden Kompartimenten fiel bei beiden Inhibitoren ein höherer Hemmeffekt bei den Zellen des unteren Kompartimentes auf. Diesen Effekt konnte man sowohl mit dem „funktionellen“ Inhibitor Corticosteron als auch mit dem kompetitiven Inhibitor mIBG (Abb. 35 und 36) sehen, bei EMT-Zellen in Anwesenheit von mIBG jedoch in einem unerklärlich hohem Ausmaß.

4.10.2 Aufnahme von $[^3\text{H}]$ NA in SK-N-SH- und CAKI-Zellen

4.10.2.1 Aufnahme von $[^3\text{H}]$ NA in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron bzw. 10^{-5} M mIBG

Im vorherigen Kapitel wurde die $[^3\text{H}]$ DA Aufnahme einer neuronalen Zelllinie (SK-N-SH) mit einer extraneuronalen Zelllinie (EMT) in Abwesenheit oder Anwesenheit des Inhibitors Corticosteron bzw. mIBG verglichen. Im Folgenden beschriebenen zweiten Versuchsblock wurde, wie auf S. 140 erläutert, $[^3\text{H}]$ NA anstelle von $[^3\text{H}]$ DA als Katecholamin verwendet, sowie die extraneuronale CAKI-Zelllinie anstelle von EMT.

Abb. 37 (S. 146) ist genauso aufgebaut wie Abb. 34 (S. 141) des vorherigen Kapitels und enthält die drei Abschnitte für die $[^3\text{H}]$ NA Aufnahme in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von 10^{-4} M Corticosteron bzw. von 10^{-5} M mIBG. In allen Abschnitten sind pro Zelllinie die radioaktiven Aufnahmen im oberen und unteren Kompartiment vergleichend nebeneinander abgebildet.

Die [^3H] NA Aufnahmen in CAKI-Zellen wurden auf eine Zellzahl von ungefähr 10^6 Zellen hochgerechnet. Das heißt, die in den Versuchen erhaltenen Ergebnisse wurden verdoppelt, da 3 Tage vor Versuchsbeginn eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ CAKI-Zellen in das Transwellsystem ausgesät wurde, während von der SK-N-SH Zelllinie $1,0 \times 10^6$ Zellen angezchtet wurden.

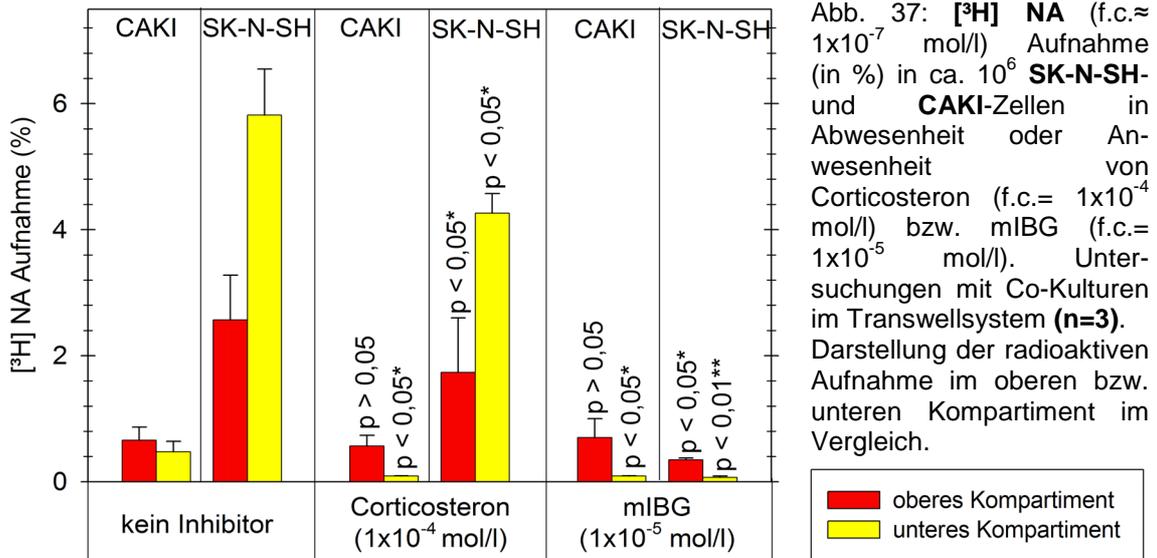


Abb. 37: [^3H] NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme (in %) in ca. 10^6 SK-N-SH- und CAKI-Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron (f.c. = 1×10^{-4} mol/l) bzw. mIBG (f.c. = 1×10^{-5} mol/l). Untersuchungen mit Co-Kulturen im Transwellsystem (n=3). Darstellung der radioaktiven Aufnahme im oberen bzw. unteren Kompartiment im Vergleich.

In Abb. 37 ist aufgezeigt, dass CAKI-Zellen im oberen Kompartiment **ohne Inhibitor** $0,66\% \pm 0,21\%$ der angebotenen Radioaktivität aufnehmen. Im unteren Kompartiment wurde im Vergleich $1,4\text{x}$ weniger [^3H] NA inkorporiert (= $0,47\% \pm 0,17\%$). SK-N-SH-Zellen nahmen ohne Inhibitor im oberen Kompartiment $2,57\% \pm 0,71\%$ der angebotenen Radioaktivität auf, während in das untere Kompartiment $2,3\text{x}$ mehr inkorporiert wurde ($5,82\% \pm 0,73\%$).

In CAKI-Zellen des oberen Kompartimentes änderte sich in Anwesenheit von **Corticosteron** die [^3H] NA Aufnahme mit einer um $1,2\text{-fach}$ reduzierten Inkorporation im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme praktisch nicht ($0,56\% \pm 0,17\%$ versus $0,66\% \pm 0,21\%$). In CAKI-Zellen des unteren Kompartimentes wurden in Anwesenheit von Corticosteron nur $0,09\% \pm 0,004\%$ ($\approx 5,2\text{-fache}$ Reduktion mit $p < 0,05$) aufgenommen. Vergleicht man in Anwesenheit von Corticosteron die Aufnahme von [^3H] NA in CAKI-Zellen zwischen oberem und unterem Kompartiment, so läßt sich eine $6,2\text{-fach}$ vermehrte Aufnahme in CAKI-Zellen des oberen Kompartimentes feststellen. Die [^3H] NA Aufnahme in

SK-N-SH-Zellen des oberen Kompartimentes sank in Anwesenheit von Corticosteron auf $1,73\% \pm 0,86\%$ ($p < 0,05$), d.h. im Vergleich dazu wurde ohne Inhibitor 1,5x mehr [^3H] NA aufgenommen. Auch in SK-N-SH-Zellen des unteren Kompartimentes wurde die Aufnahme in Anwesenheit von Corticosteron um das 1,4-fache auf $4,26\% \pm 0,31\%$ reduziert ($p < 0,05$). SK-N-SH-Zellen des unteren Kompartimentes nahmen im Vergleich zu denen des oberen Kompartimentes 2,5x mehr Radioaktivität auf.

MIBG beeinflusste die [^3H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen des oberen Kompartimentes praktisch nicht ($0,70\% \pm 0,30\%$ versus $0,66\% \pm 0,21\%$). In den CAKI-Zellen des unteren Kompartimentes fand in Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme jedoch eine 7,3-fache, statistisch signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der radioaktiven Aufnahme von $0,66\% \pm 0,21\%$ auf $0,35\% \pm 0,03\%$ statt. Beim Vergleich der [^3H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen zwischen den beiden Kompartimenten fiel eine 7,8-fach vermehrte Aufnahme im oberen Kompartiment auf. In SK-N-SH-Zellen des oberen Kompartimentes wurde die [^3H] NA Aufnahme durch mIBG statistisch signifikant ($p < 0,05$) um das 7,3-fache von $2,57\% \pm 0,71\%$ auf $0,35\% \pm 0,03\%$ gehemmt. In den SK-N-SH-Zellen des unteren Kompartimentes kam es in Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG zu einem starken Rückgang ($p < 0,01$) der [^3H] NA Aufnahme auf $0,07\% \pm 0,02\%$, was eine 83,1-fache Reduzierung bedeutete. War mIBG im Reaktionsansatz vorhanden, erfolgte im Vergleich zum unteren Kompartiment eine 5,0-fach stärkere Aufnahme in SK-N-SH-Zellen des oberen Kompartimentes.

Tab. 40: Verhältnis der [^3H] NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in SK-N-SH-Zellen zur [^3H] NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in CAKI-Zellen.

Versuchsansatz	SK-N-SH : CAKI	
	oben	unten
ohne Inhibitor	3,9 : 1	12,4 : 1
mit Corticosteron (f.c. = 1×10^{-4} mol/l)	3,1 : 1	47,3 : 1

Das Aufnahmeverhältnis ist in Abwesenheit oder Anwesenheit von Corticosteron für jedes Kompartiment separat aufgelistet; oben= oberes Kompartiment, unten = unteres Kompartiment.

In Tab. 40 wird für jedes Kompartiment extra die [³H] NA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen im Verhältnis zur [³H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit der Inhibitoren dargestellt. Im oberen Kompartiment konnte in Anwesenheit von Corticosteron keine Verschiebung des Aufnahmeverhältnisses in Richtung der SK-N-SH-Zellen nachgewiesen werden. Im unteren Kompartiment verschob sich das Verhältnis der [³H] NA Aufnahme in Anwesenheit von Corticosteron jedoch um das 3,8-fache von 12,4:1 auf 47,3:1 in Richtung der SK-N-SH-Zellen. Dieser gewünschte Effekt in Richtung einer stärkeren Anreicherung in SK-N-SH-Zellen in Gegenwart von Corticosteron konnte schon bei der [³H] DA Aufnahme in EMT- und SK-N-SH-Zellen festgestellt werden (S. 143), allerdings nicht in diesem starken Ausmaß.

4.10.2.2 Vergleich der Hemmeffekte von 10^{-4} M Corticosteron auf die Aufnahme von [³H] NA in SK-N-SH- und CAKI-Zellen

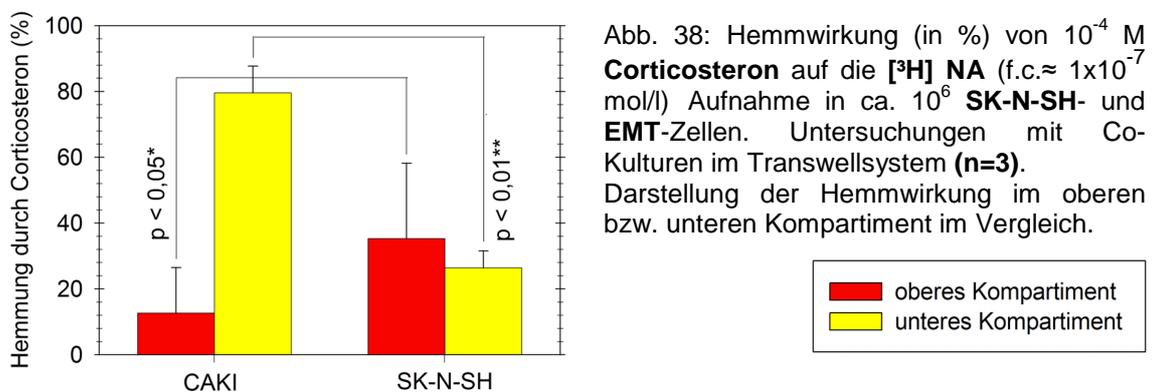


Abb. 38: Hemmwirkung (in %) von 10^{-4} M Corticosteron auf die [³H] NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in ca. 10^6 SK-N-SH- und EMT-Zellen. Untersuchungen mit Co-Kulturen im Transwellsystem (n=3). Darstellung der Hemmwirkung im oberen bzw. unteren Kompartiment im Vergleich.

Der Hemmeffekt von 10^{-4} M Corticosteron auf die [³H] NA Aufnahme in SK-N-SH- bzw. CAKI-Zellen sowie die p-Werte des statistischen Vergleiches der Hemmeffekte auf die getesteten Zelllinien sind in Abb. 38 für beide Kompartimente dargestellt (vgl. Zellsuspensionsergebnisse 4.5.2.2, S. 117).

Im oberen Kompartiment wurde die [³H] NA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen von Corticosteron 2,7-fach stärker inhibiert als die Aufnahme in CAKI-Zellen ($35\% \pm 23\%$ versus $13\% \pm 14\%$). Auf Grund der relativ hohen SD sind diese beiden Hemmeffekte nicht besonders aussagekräftig und es ergab sich ein statistisch nicht signifikanter ($p > 0,05$) Unterschied. Die SK-N-SH-Zellen des

unteren Kompartimentes erfuhren durch 10^{-4} M Corticosteron eine Aufnahmehemmung von $26\% \pm 5\%$, während die CAKI-Zellen 3,1-fach stärker gehemmt wurden ($80\% \pm 8\%$). Beim Vergleich der Corticosteronhemmeffekte zwischen der neuronalen und der extraneuronalen Zelllinie ergab sich im Gegensatz zum oberen Kompartiment ein statistisch hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

4.10.2.3 Vergleich der Hemmeffekte von 10^{-5} M mIBG auf die Aufnahme von [^3H] NA in SK-N-SH- und CAKI-Zellen

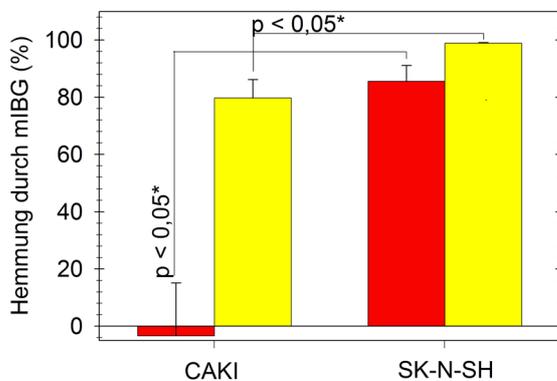


Abb. 39: Hemmwirkung (in %) von 10^{-5} M mIBG auf die [^3H] NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in ca. 10^6 SK-N-SH- und CAKI-Zellen. Untersuchungen mit Co-Kulturen im Transwellsystem ($n=3$).

Darstellung der Hemmwirkung im oberen bzw. unteren Kompartiment im Vergleich.



Die Hemmeffekte von mIBG auf neuronale SK-N-SH- versus extraneuronale CAKI-Zellen sowie die p-Werte des statistischen Vergleichs der Hemmeffektunterschiede von mIBG zwischen den beiden Zelllinien sind in Abb. 39 zu sehen.

mIBG hemmte die [^3H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen des oberen Kompartimentes praktisch nicht. Die Hemmwirkung von mIBG auf SK-N-SH-Zellen des oberen Kompartimentes lag dagegen bei $86\% \pm 6\%$ ($p < 0,05$). Für das untere Kompartiment lässt sich aus Abb. 39 ein Hemmeffekt von mIBG auf die [^3H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen von $80\% \pm 6\%$, sowie auf die SK-N-SH-Zellen von $99\% \pm 0,3\%$ ablesen, was einem statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) entsprach.

Die Hemmeffekte, die mit 10^{-5} M mIBG auf die [^3H] NA Aufnahme in Zellsuspensionsversuchen erzielt wurden, sind unter 4.5.2.2 (S. 117) beschrieben.

In Abb. 38 und 39 kann man sehr große Unterschiede bei den Hemmeffekten von Corticosteron und mIBG auf die CAKI-Zellen, nicht jedoch auf die SK-N-SH-Zellen, zwischen den beiden Kompartimenten erkennen. Mögliche Ursachen des nur schwer zu deutenden Unterschiedes werden im Diskussionsteil unter 5.2 erläutert (S. 163-169).

4.11 Vergleich der Untersuchungssysteme - Zentrifugenröhrchen versus Kompartimente des Transwellsystems

Im folgenden Kapitel werden die Versuchsergebnisse der [³H] Katecholamin-aufnahmen in Zellsuspensionen im Zentrifugenröhrchen mit denen in Co-Kulturen im Transwellsystem verglichen. Für diesen Vergleich wurden jeweils die Hauptversuche aus den Kapiteln 4.5 und 4.10 herangezogen, da diese mit einer Versuchszahl von n=3 aussagekräftiger sind als Einzelversuche.

Der Aufbau und die Versuchsbedingungen der beiden Hauptversuche waren ähnlich und sind unter 3.5.2.3 (S. 52) sowie unter 3.6.3.3 (S. 62-64) genauer beschrieben. Sowohl bei den Untersuchungsreihen in den Zentrifugenröhrchen als auch bei denen im Transwellversuch wurden pro Reaktionsansatz [³H] Katecholamine in einer f.c. von etwa 1×10^{-7} mol/l angeboten. In beiden Hauptversuchen wurden die Hemmungen der radioaktiven Aufnahme durch die Inhibitoren Corticosteron (f.c.= 1×10^{-4} mol/l) bzw. mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) getestet. Die Inkubation erfolgte dabei jeweils bei 37°C.

Die bei der Inkubation enthaltene CO₂-Konzentration war ein Unterschied dieser beiden Untersuchungsreihen. Bei den Transwellversuchen lag im Brutschrank eine 0,5%-ige CO₂-Konzentration vor, während diese bei den Versuchen im Zentrifugenröhrchen im Wasserbad 0,03% (\triangleq CO₂-Gehalt der Raumluft) betrug. Ein weiterer Unterschied war die Zusammensetzung und das Volumen des Inkubationspuffers pro Reaktionsansatz. Bei den Zellsuspensionsversuchen im Zentrifugenröhrchen wurden 500µl Inkubationspuffer (\triangleq 98% (v/v)

PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucose, 1% (v/v) freie Ascorbinsäure) verwendet, während in eine Vertiefung des Transwellsystems 6ml Inkubationspuffer pipettiert wurden (98% (v/v) PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucose, 1% (v/v) Natriumascorbat). Die pro Reaktionsansatz eingesetzten Zellzahlen waren bei den beiden Hauptversuchen ebenfalls verschieden. In den Zellsuspensionsversuchen waren pro 500µl Inkubationspuffer 2×10^6 Zellen im Zentrifugenröhrchen enthalten. In den Untersuchungen im Transwellsystem wurden 3 Tage vor dem Versuch pro Kompartiment eine Zahl von 1×10^6 SK-N-SH- bzw. EMT-Zellen sowie eine Zahl von $0,5 \times 10^6$ CAKI-Zellen ausgesät. Wie viele Zellen am Versuchstag pro Kompartiment exakt vorlagen, war nicht bekannt. Desweiteren betrug die Inkubation bei den Zellsuspensionsversuchen im Zentrifugenröhrchen 15 min und bei den Co-Kulturversuchen im Transwellsystem 30 min. Wie in den Screeningversuchen zur Abhängigkeit der Inkubationszeit auf die [³H] Katecholaminaufnahme (4.2, S. 71-76) ermittelt werden konnte, wurde nach 30 min in allen getesteten Zellen, unabhängig vom Substrat, mehr Radioaktivität gemessen als nach 15 min.

Ein Vergleich der Aufnahmen von [³H] Katecholaminen in die verschiedenen Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit der Inhibitoren in Abhängigkeit vom Untersuchungssystem war auf Grund teilweise unterschiedlicher Versuchsbedingungen nicht möglich. In diesem Kapitel wurden daher nur die Hemmeffekte von 10^{-4} M Corticosteron bzw. von 10^{-5} M mIBG auf die [³H] Katecholaminaufnahmen in verschiedene Zellen bei den unterschiedlichen Untersuchungssystemen miteinander verglichen. Der Hemmeffekt ist ein relativer Wert, da die Aufnahme in Anwesenheit eines Inhibitors in Relation zur ungehemmten Aufnahme gesetzt wurde. Da bei einem relativen Wert die Einflüsse der unterschiedlichen Inkubationszeiten und Zellzahlen keine Rolle spielen, ist ein Vergleich der Hemmeffekte in den verschiedenen Untersuchungssystemen zulässig.

In nachfolgenden Graphiken (Abb. 40-43, S. 153) sind jeweils die Hemmeffekte von 10^{-4} M Corticosteron und von 10^{-5} M mIBG auf die [³H] DA bzw. [³H] NA Aufnahme in die Zellen in den unterschiedlichen Untersuchungssystemen zu sehen. In diesen Abbildungen stellt jeder der drei unterschiedlich farbigen

Balken ein Untersuchungssystem dar. Dabei steht der erste Balken für die Inhibitorhemmung auf die [³H] Katecholaminaufnahme in Zellsuspensionen im Zentrifugenröhrchen. Der zweite Balken zeigt den Hemmeffekt auf die Zellen im unteren Kompartiment an, während die Hemmwirkung der Inhibitoren auf die Zellen des oberen Transwellkompartimentes im dritten Balken dargestellt ist.

In dem jeweils anderen Kompartiment wuchsen entsprechend andere konkurrierende Zellen (Abb. 40: SK-N-SH + EMT, Abb. 41: SK-N-SH + CAKI, Abb. 42: EMT + SK-N-SH, Abb. 43: CAKI + SK-N-SH). Da in den Vorversuchen (4.9, S. 136-139) gezeigt wurde, dass die „Konkurrenzzellen“ praktisch keinen Einfluss auf die Menge der [³H] DA bzw. [³H] NA Aufnahme hatten, konnte dieser Vergleich zu den Zellsuspensionsversuchen im Zentrifugenröhrchen gemacht werden, stellt jedoch nur Trends dar, da die Passagezahlen der heterogenen Tumorzellen an den verschiedenen Versuchstagen unterschiedlich waren. Anhand dieses Vergleiches sollten folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Stimmen im Transwellsystem die Corticosteron- bzw. mIBG-Hemmeffekte des oberen Kompartimentes mit denen des unteren Kompartimentes überein?
- 2) Besteht ein Unterschied der Inhibitorhemmeffekte zwischen dem Transwellsystem und den Zentrifugenröhrchen? Unterscheiden sich die Untersuchungssysteme, so ergeben sich weitere Fragen:
 - 3) In welchem Kompartiment sind die Hemmeffekte denen der Zentrifugenröhrchenversuche am ähnlichsten?
 - 4) Ist der Hemmeffekt von Corticosteron bzw. mIBG generell in einem der Untersuchungssysteme stärker?

Wie in der nachfolgenden Abb. 40 (S. 153) zu sehen ist, waren die Hemmwirkungen von 10^{-4} M **Corticosteron** auf die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen bei den verschiedenen Untersuchungssystemen tendentiell relativ ähnlich. Die Hemmeffekte waren sehr gering und lagen zwischen 17-30%, wobei der größte Unterschied zwischen unterem Kompartiment (mit EMT als Konkurrenzzelle) und Zentrifugenröhrchen lag, mit einem um nur bis zu 1,8-fach höheren Hemmeffekt im unteren Kompartiment des Transwellsystems.

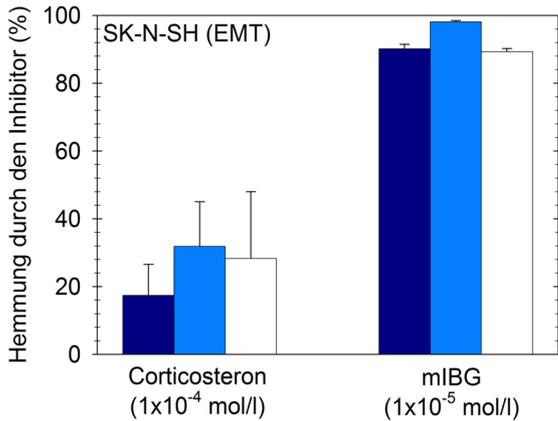


Abb. 40: Hemmwirkung (in %) von Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l) bzw. mIBG (f.c.= 1x10⁻⁵ mol/l) auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in ca. 10⁶ SK-N-SH-Zellen (n=3).

Vergleichende Darstellung der Hemmeffekte im Zentrifugenröhrchen, im unteren und im oberen Kompartiment des Transwellsystems. Im Transwellsystem standen die SK-N-SH-Zellen bei der [³H] DA Aufnahme in **Konkurrenz zu EMT-Zellen.**

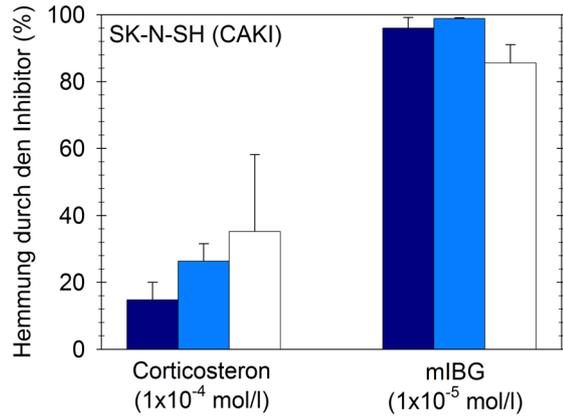


Abb. 41: Hemmwirkung (in %) von Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l) bzw. mIBG (f.c.= 1x10⁻⁵ mol/l) auf die [³H] NA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in ca. 10⁶ SK-N-SH-Zellen (n=3).

Vergleichende Darstellung der Hemmeffekte im Zentrifugenröhrchen, im unteren und im oberen Kompartiment des Transwellsystems. Im Transwellsystem standen die SK-N-SH-Zellen bei der [³H] NA Aufnahme in **Konkurrenz zu CAKI-Zellen.**

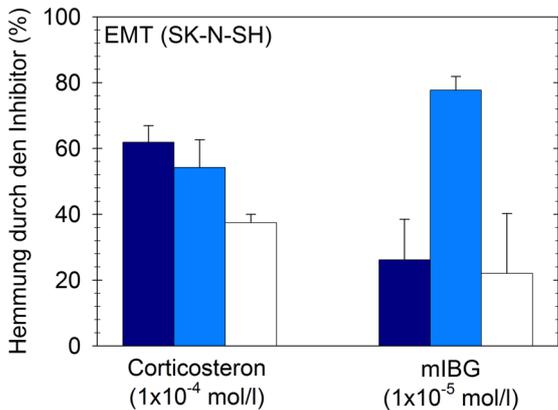
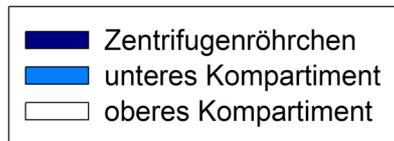


Abb. 42: Hemmwirkung (in %) von Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l) bzw. mIBG (f.c.= 1x10⁻⁵ mol/l) auf die [³H] DA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in ca. 10⁶ EMT-Zellen (n=3).

Vergleichende Darstellung der Hemmeffekte im Zentrifugenröhrchen, im unteren und im oberen Kompartiment des Transwellsystems. Im Transwellsystem standen die EMT-Zellen bei der [³H] DA Aufnahme in **Konkurrenz zu SK-N-SH-Zellen.**

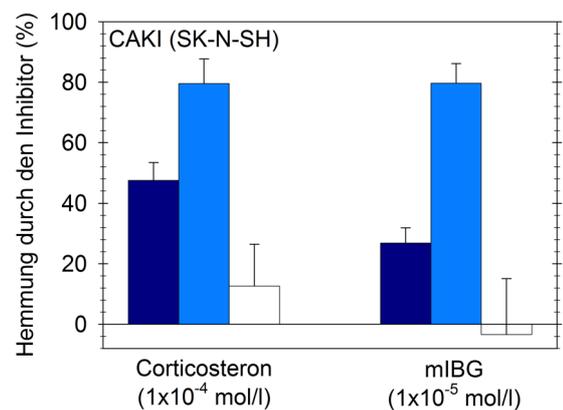


Abb. 43: Hemmwirkung (in %) von Corticosteron (f.c.= 1x10⁻⁴ mol/l) bzw. mIBG (f.c.= 1x10⁻⁵ mol/l) auf die [³H] NA (f.c.≈ 1x10⁻⁷ mol/l) Aufnahme in ca. 10⁶ CAKI-Zellen (n=3).

Vergleichende Darstellung der Hemmeffekte im Zentrifugenröhrchen, im unteren und im oberen Kompartiment des Transwellsystems. Im Transwellsystem standen die CAKI-Zellen bei der [³H] NA Aufnahme in **Konkurrenz zu SK-N-SH-Zellen.**

Die gleiche Tendenz ergab sich bei den Hemmeffekten von Corticosteron auf die [³H] NA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen (Abb. 41). Dabei wurden nur geringe Hemmeffekte zwischen 15% im Zentrifugenröhrchen und 35% im oberen Kompartiment des Transwellsystems (mit CAKI als Konkurrenzellen) erreicht. Eine etwas abweichende Tendenz zwischen den verschiedenen Untersuchungssystemen war bei der Hemmung der [³H] DA Aufnahme in EMT-Zellen durch Corticosteron in Abb. 42 zu sehen. Bei diesen extraneuronalen Zellen wurde ein sehr starker Hemmeffekt von 62% bei den Suspensionsversuchen im Zentrifugenröhrchen beobachtet. Die Hemmung bei den Transwellansätzen (Konkurrenzellen = SK-N-SH) war mit 38% im oberen Kompartiment und 54% im unteren Kompartiment hingegen schwächer, trotzdem aber noch deutlich ausgeprägter als bei den neuronalen SK-N-SH-Zellen (Abb. 40 und 41).

In Abb. 43 sind die Hemmeffekte von Corticosteron auf die [³H] NA Aufnahme in CAKI-Zellen dargestellt. Ähnlich wie bei den EMT-Zellen waren auch bei diesen extraneuronalen Zellen abweichende Hemmeffekte in den unterschiedlichen Untersuchungssystemen erkennbar. Der größte Hemmeffekt war mit 80% im unteren Kompartiment des Transwellsystems (Konkurrenzelle = SK-N-SH) zu verzeichnen, während im oberen Kompartiment nur ein Hemmeffekt von 13% detektiert werden konnte. Dennoch lagen die Hemmeffekte von Corticosteron auf die extraneuronalen CAKI-Zellen wie bei den EMT-Zellen über den Corticosteronhemmeffekten auf die neuronalen SK-N-SH-Zellen.

Die Hemmwirkungen von 10^{-5} M **mIBG** auf die [³H] Katecholaminaufnahmen in die verschiedenen Zelllinien sind ebenfalls in den Abb. 40-43 zu sehen. Wie bereits erwähnt, wurden die Inhibitionsversuche mit dem kompetitiven Inhibitor mIBG durchgeführt, um über die Hemmeffekte indirekt eine Aussage bezüglich der Aufnahme dieser Substanz in die verschiedenen Zellen zu erhalten, da auf Grund der schlechten Verfügbarkeit die direkte Aufnahme von [¹³¹I] mIBG im Rahmen dieser Arbeit nur einmal untersucht werden konnte. Die Ergebnisse der direkten [¹³¹I] mIBG Aufnahme sind unter 4.6 (S. 122-125) dargestellt. Aus Abb. 40 ist ersichtlich, dass die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen (mit EMT

als Konkurrenzellen im Transwellsystem) durch mIBG in allen Untersuchungssystemen sehr stark gehemmt wurde (90-98%). Den gleichen Effekt und die gleiche Größenordnung sieht man in Abb. 41 bei der Inhibition der [³H] NA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen (Konkurrenzellen im Transwellsystem = CAKI).

Einen deutlichen Unterschied im Hemmeffekt von mIBG in den unterschiedlichen Untersuchungssystemen sah man allerdings bei den extraneuronalen Zelllinien. Die Inhibition auf die [³H] DA Aufnahme in EMT-Zellen, die im Transwellsystem mit SK-N-SH-Zellen konkurrierten, lag zwischen 22-78%. Auch bei der [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen (Konkurrenzellen im Transwellsystem = SK-N-SH) war der höchste Hemmeffekt von mIBG mit 80% im unteren Kompartiment zu verzeichnen. Dagegen war im oberen Kompartiment keine Inhibition detektierbar.

Die relativ großen Unterschiede der Hemmeffekte, sowohl von Corticosteron als auch von mIBG, zwischen den Versuchen im Zentrifugenröhrchen und denen im Transwellsystem bei den extraneuronalen Zelllinien lagen an den Problematiken, die sich bei der Versuchsdurchführung im Transwellsystem ergaben und im Kapitel 5.2 (S. 163-169) ausführlich diskutiert sind. Hierbei spielten wahrscheinlich v.a. die geringere Adhärenz von CAKI- bzw. EMT-Zellen und die evt. geringere Wachstumstendenz dieser beiden Zelllinien auf dem Membraneinsatz (Δ oberes Kompartiment) die Hauptrolle.

5 DISKUSSION

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche unter Berücksichtigung der in der Literatur bereits zu diesem Thema beschriebenen Forschungsergebnisse integrativ verglichen und beurteilt.

Zuvor sollte erwähnt werden, dass bei den Ergebnissen nicht die spezifische Aufnahme der radioaktiv markierten Substanzen angegeben ist, sondern die Gesamtmenge. Die Radioaktivität wird nämlich nicht nur über die verschiedenen Transporter spezifisch in die Zellen inkorporiert. Ein gewisser Teil diffundiert unspezifisch über die Zellmembran.

Um die Menge der energieunabhängigen, unspezifischen Aufnahme darzustellen, führten Seitz et al. [¹³¹I] mIBG Inkubationen auf Eis durch, da bei dieser niedrigen Temperatur kein energieabhängiger, spezifischer Transport mehr stattfindet [237]. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die unspezifische Aufnahme von [¹³¹I] mIBG in SK-N-SH-Zellen weniger als 10% betrug. In anderen Untersuchungen wurde eine Zelllinie, die keine Transporter auf ihrer Oberfläche exprimierte, als Kontrolle mitgeführt. Die Radioaktivität, die in diesen Zelllinien gemessen werden konnte, wurde als unspezifische Aufnahme definiert und lag nie über 3% [95]. Da die unspezifische Aufnahme in die verschiedenen Zellen sehr gering und bei den unterschiedlichen Zelllinien wahrscheinlich annähernd gleich ist, wurde sie bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht gemessen. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse jedoch nicht gänzlich außer Acht gelassen werden.

Grundsätzlich stellen Zellkulturen ein sehr gutes in-vitro Modell zur Untersuchung pharmakodynamischer Effekte auf einzelne Zellen dar. Jedoch muss klar sein, dass sich die in-vitro Untersuchungen als experimentelles Modell von der Situation im Organismus unterscheiden können.

Denn die Zelllinien sind nur Subklone aus einem ursprünglichen heterogenen Tumorgewebe, dem sie entnommen wurden. So ist es möglich, dass sie in

Kulturen eine andere Zellkinetik als in-vivo haben. Denn die Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Transportproteine kann im Organismus von der in den Zellkulturen divergieren. Somit muss bei der Interpretation der Aufnahmeversuche berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse der experimentellen Modelle in-vitro zwar einen Anhalt für das Aufnahmeverhalten in-vivo geben, aber keine definitive Aussage zulassen. Außerdem kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die in-vitro am besten geeignete Konzentration einer Substanz auch in-vivo passend ist. Durch die Verteilung im Körper wird die verabreichte Konzentration um ein Vielfaches unbestimmt verdünnt und metabolisiert, so dass die Konzentrationsfindung für eine klinische Anwendung in klinischen Studien erfolgen muss. In experimentellen Versuchen an einzelnen Zellen ist es außerdem schwierig, die Konkurrenz um Substanzen zwischen verschiedenen Zellarten darzustellen. Unterschiede von in-vitro und in-vivo Versuchen sind evt. auch damit erklärbar, dass die Anreicherung von radioaktiv markiertem Substrat im Gewebe von der Anzahl der Zellkontakte abhängig ist. Guerreau et al. fanden 1990 heraus, dass bei hoher Zelldichte eine verlängerte Speicherung der Radioaktivität in SK-N-SH-Zellen zu beobachten ist [101].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse dieser in-vitro Versuche an Zelllinien eine Grundlage für Tierversuche bieten, die wiederum Ausgangspunkt für klinische Studien sein sollten. Um die Divergenz zwischen in-vitro und in-vivo so klein wie möglich zu halten, ist man bemüht, die Versuchsbedingungen den im Organismus herrschenden Bedingungen so gut wie möglich anzupassen.

5.1 Auswahl geeigneter Parameter für die Aufnahmeversuche

5.1.1 Zusammensetzung des Inkubationspuffers

Die Aufgabe eines Puffers besteht darin, den pH-Wert auf einem bestimmten Niveau zu halten. Für die radioaktiven Aufnahmeversuche sollte der pH-Wert konstant auf einem physiologischen Wert von ca. 7,4 bleiben, so dass die

Zellen von einem dem Organismus entsprechendem Milieu umgeben sind. Dafür wurde ein Inkubationspuffer (\triangleq 98% (v/v) PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucoselösung und 1% (v/v) Ascorbinsäurelösung) ausgewählt, dessen genaue Zusammensetzung unter 2.4.2 (S. 38-39) beschrieben ist.

Die radioaktiven Aufnahmeversuche im Zentrifugenröhrchen wurden mit offenem Deckel bei Raumluft ($\text{CO}_2 = 0,03\%$) im 37°C warmen Wasserbad durchgeführt. Der Inkubationspuffer im Transwellssystem kam, im Gegensatz zu den Zentrifugenröhrchen, während der 30-minütigen Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank mit CO_2 -angereicherter Luft ($\text{CO}_2 = 0,5\%$) in Berührung. Steht Kohlendioxid in Kontakt mit Wasser, so läuft folgende Reaktion ab: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^{(-)} + \text{H}^{(+)}$. Das bei dieser Reaktion entstehende Proton sollte vom im Inkubationspuffer enthaltenen Na_2HPO_4 abgepuffert werden. Reicht die Pufferwirkung nicht aus, so rutscht der pH-Wert ins Saure ab. Deshalb wurden in einem Versuch, dessen Aufbau unter 3.2 (S. 43-44) erläutert ist, die Stabilität des pH-Wertes in offenen Systemen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationspuffers analysiert.

In diesem Versuch wurden zwei Messreihen mit Zentrifugenröhrchen ohne Deckel in einem Brutschrank mit 5%-igem CO_2 durchgeführt. Bei der einen Messreihe wurde dem Inkubationspuffer (\triangleq 98% (v/v) PBS⁺⁺, 1% (v/v) Glucoselösung) 1% (v/v) freie Ascorbinsäure zugegeben, bei der anderen Messreihe 1% (v/v) Natriumascorbat. In dem Natriumascorbat-haltigen Puffer fiel der pH-Wert, im Gegensatz zum Ascorbinsäure-haltigen Puffer, im Brutschrank ($\text{CO}_2 = 5\%$) nicht so schnell ab und betrug nach 30 min 7,0. Ein Grund dafür ist, dass die freie Ascorbinsäure als Gegenion zum Ascorbat⁽⁻⁾ das saure $\text{H}^{(+)}$ in den Puffer miteinbringt. Das Natriumascorbat hingegen enthält als Gegenion das alkalische $\text{Na}^{(+)}$, das einer zusätzlichen Übersäuerung entgegenwirkt.

Für die radioaktiven Aufnahmeversuche im Transwellssystem wurde auf Grund der etwas besseren Stabilität des pH-Wertes das Inkubationspuffergemisch mit Natriumascorbat verwendet. Außerdem fand die 30-minütige Inkubation der Transwellplatten im Brutschrank bei nur 0,5%-igem CO_2 anstelle von 5%-igem

CO₂ statt. Durch diese Maßnahme wurde dem Abrutschen des Puffers ins Saure während der Inkubationszeit ebenfalls entgegen gewirkt. Für die Experimente in den Zentrifugenröhrchen ist die Auswahl des Inkubationspuffergemisches von untergeordneter Bedeutung. Denn der Kontakt zwischen Puffer und Kohlendioxid ruft auf Grund der kürzeren Inkubationszeit (15 min statt 30 min) und auf Grund eines geringeren CO₂-Gehaltes (0,03% statt 0,5%) keine nennenswerte H₂CO₃-Produktion im Puffer hervor und kann somit die niedermolekulare Vitamin C-Konzentration (f.c. von Natriumascorbat $\approx 5 \times 10^{-5}$ mol/l) gut abpuffern. Es wurde festgelegt, das Inkubationspuffergemisch mit freier Ascorbinsäure für die Versuche im Zentrifugenröhrchen zu verwenden, da diese Zusammensetzung des Puffers bereits für die ersten Experimente benutzt wurde.

5.1.2 Inkubationszeit

Für die Inhibitionsversuche mit den verschiedenen Hemmstoffen sollte eine geeignete Inkubationszeit gefunden werden. Folgende Anforderungen mussten dabei erfüllt sein: Zum Einen sollte die Inkubation lange genug sein, damit genügend radioaktiv markierte Katecholamine in die Zellen aufgenommen werden können. Zum anderen sollte diese Zeit aber nicht zu lange sein, da DA und NA relativ instabile Substanzen sind. Laut Herstellerangaben liegen die Zersetzungsraten von [³H] DA bei einer Lagerung von -20°C nicht über 2,22% pro Woche und von [³H] NA bei einer Lagerung von +2°C nicht über 0,4% pro Woche. Während der Inkubationszeit im Brutschrank beträgt die Temperatur allerdings 37°C, bei der sich die Zersetzungsraten durch Autoxidation bei neutralem pH-Wert deutlich beschleunigen dürfte. Außerdem können die Katecholamine nach Inkorporation in die entsprechenden Zelllinien durch die intrazellulär vorhandene MAO und COMT enzymatisch abgebaut werden.

Bei den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Aufnahme, deren Ergebnisse unter 4.2 (S. 71-76) dargestellt sind, ist bei allen Zelllinien ein kontinuierlicher Anstieg sowohl bei der [³H] NA als auch bei der [³H] DA Aufnahme über einen Zeitraum von 30 min zu verzeichnen. Dies deckt sich mit Ergebnissen, die Wüstermann

in seiner Dissertationsarbeit erhielt [296]. In dieser Arbeit wurde die Aufnahme von 1×10^{-7} M mIBG in SK-N-SH-Zellen über einen Zeitraum von 2h verfolgt. Nach 60 min flachte die Aufnahmekurve deutlich ab und nach 90 min erfolgte keine Steigerung der Inkorporation mehr. Eine maximale Aufnahme des Substrates wurde bei diesen Untersuchungen erst nach 90 min erreicht.

Da nur SK-N-SH-Zellen getestet wurden ist unklar, ob sich das Gleichgewicht der Aufnahme bei anderen Zelllinien ebenfalls erst nach 1,5h einstellt. Außerdem wurden in den Experimenten der vorliegenden Arbeit vor allem Katecholamine als Aufnahmesubstrate verwendet, die weit weniger stabil sind als mIBG [57,175]. Somit wurde für die meisten Versuche eine kurze Inkubationszeit von nur 15 min ausgewählt. Bei den Untersuchungen im Transwellsystem wurde allerdings eine Inkubationszeit von 30 min verwendet, um einen längeren Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten zu gewährleisten.

5.1.3 $[^3\text{H}]$ DA und $[^3\text{H}]$ NA als „Ersatz“substrate für $[^{131}\text{I}]$ mIBG

Vergleicht man die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DA mit der von $[^3\text{H}]$ NA in die verschiedenen Zelllinien miteinander, so konnte man feststellen, dass von SK-N-SH-, PC 12-, OCT 1- und OCT 2-Zellen bei gleichem Angebot mehr DA als NA aufgenommen wurde. In CAKI- und EMT-Zellen erfolgte allerdings eine stärkere Inkorporation von NA über den EMT. Dies beschrieben Gründemann et al. bereits 1998 nach der molekularen Identifizierung des EMT [100]. Auch Jonker et al. fanden in einem Vergleich eine stärkere Aufnahme von NA über den EMT als von DA [130]. Da von den jeweiligen Zelllinien in etwa bekannt ist, welche Transporter sie auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (siehe 2.5, S. 41-42), können Rückschlüsse gezogen werden, über welche Transporter die verschiedenen Substanzen besser aufgenommen werden. Laut Goodman und Gilman [90] haben NAT, DAT, OCT 1 und OCT 2 eine höhere Substratspezifität bezüglich DA, über den EMT hingegen wird besser NA inkorporiert. Diese Angaben decken sich gut mit den aus dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen.

In SK-N-SH- und PC 12-Zellen wurde mehr NA inkorporiert als in die EMT-Zelllinie. Dies ist eine interessante Beobachtung, da man meinen könnte, dass bei einer höheren Spezifität bezüglich des Substrates NA viel NA über den EMT aufgenommen wird. Zwar wäre es theoretisch auch möglich, dass in der Membran der SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen eine größere Anzahl an Transportern eingebaut ist, aber auch Gründemann et al. fanden heraus, dass der K_m -Wert für NA bei dem extraneuronalen Katecholamintransporter (EMT) höher ist als bei den neuronalen Katecholamintransportern [100]. Da diese Arbeitsgruppe die Aufnahme von NA über die Transporter in die Zellen auf eine gleiche Anzahl an Transportproteinen in der Membran beziehen, könnte das auch auf das in der vorliegenden Arbeit gefundene Ergebnis zutreffen.

Im Vergleich war die Aufnahme von [^3H] DA in SK-N-SH- und PC 12-Zellen auch höher als in die HEK 293-Zellen, die den EMT exprimieren. Der EMT nimmt das Substrat DA weniger gut auf als NA. NAT und DAT hingegen nehmen besser DA als NA auf. Somit ist es verständlich, dass über den NAT (bzw. über den evt. in geringen Mengen exprimierten DAT) mehr [^3H] DA in SK-N-SH- und PC 12-Zellen inkorporiert wurde.

Unerwarteterweise inkorporierten CAKI-Zellen nahezu genauso viel NA wie PC 12-Zellen. Auch bei der [^3H] DA Aufnahme wurde beobachtet, dass CAKI-Zellen mehr Substrat aufnahmen als EMT-Zellen. Dafür gibt es zwei Erklärungsansätze. Zum Einen wäre es möglich, dass CAKI-Zellen mehr EMT auf ihrer Zelloberfläche besitzen als HEK 293-Zellen und somit auch mehr Substrat aufnehmen können. Zum anderen wäre es denkbar, dass die CAKI-Zelllinie zusätzlich zu dem EMT noch einen weiteren Transporter exprimiert. Dies stände in Einklang mit unveröffentlichten Ergebnissen von Z. Kuçi aus unserem Labor, die auf CAKI-Zellen fluoreszenzmikroskopisch einen DAT nachweisen konnte.

Obwohl ein Ziel dieser Arbeit darin bestand, die Aufnahme von [^{131}I] mIBG in verschiedene Zelllinien zu ermitteln, wurde dieser direkte Ansatz nur einmal durchgeführt, da [^{131}I] mIBG im Rahmen dieser Dissertation nur einmal als Restmaterial einer klinischen Neuroblastombehandlung zur Verfügung stand.

Es standen aber zwei „Ersatz“-Substanzen zur Verfügung die mit einem nur gering strahlenden β -Strahler, dem Tritium, markiert waren: [^3H] DA und [^3H] NA, die beide strukturelle Ähnlichkeiten zum mIBG aufweisen. Aus theoretischen Überlegungen wäre [^3H] NA als Aufnahmesubstrat geeigneter, da mIBG, ähnlich wie NA, hauptsächlich über den NAT, nicht jedoch über den DAT aufgenommen wird, während ein Transport über SERT in der Literatur umstritten ist [86,252]. DA hingegen wird sowohl über den NAT als auch über den DAT aufgenommen. Somit wäre es möglich, dass die Ergebnisse, die mit dem Aufnahmesubstrat [^3H] DA erzielt werden, nicht so gut mit einer [^{131}I] mIBG Aufnahme korrelieren. Es bestehen aber Überlegungen, zukünftig verstärkt 6- ^{18}F FDA routinemäßig zur Detektion von Neuroblastomen und Phäochromozytomen mit Hilfe der PET einzusetzen [47,126,172,198,200,205]. Hierfür wäre die Aussagekraft der Ergebnisse höher, wenn [^3H] DA als Aufnahmesubstrat verwendet wird, da es mehr Ähnlichkeiten zum DA-Analogon 6-FDA hat als NA. Nachdem DA in die meisten Zellen besser aufgenommen wird als NA und Seitz et al. zeigen konnten, dass DA und mIBG qualitativ und quantitativ am NAT eine ähnliche Aufnahmecharakteristik haben [237], wurde als Substrat für die meisten Versuche [^3H] DA verwendet. Für einige wichtige Versuche wurde zusätzlich [^3H] NA benutzt, um evt. Unterschiede herauszuarbeiten.

Inwiefern die Ergebnisse, die mit den „Ersatz“substraten ([^3H] DA bzw. [^3H] NA) gewonnen wurden, mit denen übereinstimmen, die mit [^{131}I] mIBG erzielt wurden, ist unter 5.5 (S. 186-189) beschrieben.

Als Konzentration der Aufnahmesubstrate wurde durchgehend etwa 1×10^{-7} mol/l verwendet, da sich diese aus vielen vorausgegangenen Versuchen als geeignete Konzentration erwies. In den Aufnahmeversuchen von Wüstermann, der die Inkorporation verschiedener Konzentrationen von [^{125}I] mIBG, [^3H] DA und [^3H] NA in SK-N-SH-Zellen untersuchte, war bei 2×10^{-7} mol/l noch keine Sättigung der Aufnahme zu sehen, die Kurve flachte allerdings schon bei 4×10^{-8} mol/l ab [296]. Eine Sättigung der mIBG Aufnahme in SK-N-SH-Zellen zeigte sich in Studien von Smets et al. allerdings erst bei 1×10^{-6} mol/l [252].

5.2 Aufnahmeversuche im Transwellsystem

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war, die EMT der gesunden Zellen spezifisch zu blocken, so dass radioaktiv markierte Substanzen vermehrt über NAT bzw. über die evt. in geringen Mengen exprimierte DAT der Tumorzellen (v.a. Neuroblastom, Phäochromozytom) aufgenommen werden können. In Experimenten im Zentrifugenröhrchen mit nur einer Zelllinie kann zwar dargestellt werden, dass die EMT, nicht jedoch die neuronalen Katecholamintransporter (NAT bzw. DAT) durch einen Inhibitor spezifisch blockiert werden. Allerdings kann mit diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden, ob das radioaktiv markierte Aufnahmesubstrat durch Blockade der einen Zellart vermehrt in eine nicht geblockte Zellart aufgenommen wird. Dazu müssten die beiden verschiedenen Zelllinien in einem System mit gleichem Inkubationspuffer vorliegen. Solch ein experimentelles in-vitro Modell bietet das Transwellsystem, dessen Aufbau unter 3.6.1 (S. 57-58) genauer beschrieben ist.

5.2.1 Problematik der Methode

Aus theoretischen Überlegungen sollte das Transwellsystem sehr gut für die eben erwähnten Experimente geeignet sein. In der praktischen Durchführung ergaben sich jedoch einige Probleme, die im Folgenden dargestellt werden.

Das Transwellsystem wird schon seit langem als Co-Kultursystem für Experimente benutzt. Es wird jedoch v.a. für Langzeitinkubationen verwendet, bei denen genügend Zeit für den Stoffaustausch über die Membran zwischen den Kompartimenten vorhanden ist. Da als Inkubationszeit für die Aufnahmeversuche der vorliegenden Arbeit auf Grund der Instabilität der Katecholamine nur 30 min vorgesehen waren, mussten einige Vorversuche durchgeführt werden, deren Ergebnisse unter 4.8 (S. 129-136) dargestellt sind, um eine geeignete Versuchsanordnung für diese Kurzzeitinkubation zu finden. Als Optimierungsmaßnahmen für einen schnelleren Substanz Austausch zwischen den beiden Kompartimenten wurden eine größere Porengröße der Membranen

(3µm statt 0,4µm), zusätzliche Verbindungslöcher in der Seitenwand des Membraneinsatzes und ein vermehrtes Volumen des Inkubationspuffergemisches (6ml statt 4ml) getestet.

Wie in den Abb. 31 und 32a-c (S. 131-135) zu sehen ist, wurde in die Zellen desjenigen Kompartimentes mehr Radioaktivität aufgenommen, in dem die radioaktiv markierten Katecholamine angeboten wurden. Dies weist darauf hin, dass trotz aller durchgeführten Optimierungsmaßnahmen kein ausreichender Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten innerhalb der kurzen Inkubationszeit stattfand. Um ein gleiches Angebot an radioaktiv markierten Katecholaminen für die Zellen in beiden Kompartimenten zu gewährleisten, wurde ein Inkubationspuffergemisch hergestellt (Tab. 17, S. 64), das zu Inkubationsbeginn auf beide Kompartimente zu gleichen Teilen verteilt wurde. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, ob damit noch die gewünschte Konkurrenzsituation gegeben war. Eine weitere mögliche Optimierung könnte die Aussaat der Zellen auf der Unterseite der Membran darstellen, da somit die Diffusion der Stoffe durch die Membran entfallen würde. Dies wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht getestet.

Ein sehr ernstes Problem bei der Durchführung der Versuche im Transwell-system stellten die unterschiedlichen Materialien der beiden Kompartimente dar. Der Boden des unteren Kompartimentes ist aus Polystyrol, während die Membran des Hängeeinsatzes (= oberes Kompartiment) aus Polyester hergestellt ist. Die Problematik der verschiedenen Materialien lag darin, dass die jeweilige Zelllinie in den beiden Kompartimenten unterschiedlich gut an der Oberfläche festhaftete, sowie unterschiedlich schnell und gut wuchs. Da dadurch in den beiden Kompartimenten evt. unterschiedliche Zellzahlen vorlagen, wurden teilweise deutliche Unterschiede in der radioaktiven Aufnahme zwischen den beiden Kompartimenten verzeichnet. Für zukünftige Versuche im Transwell-system ist zu überlegen, ob ein anderes Material der Membran den Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den beiden Kompartimenten minimiert. Von der Firma Corning, die u.a. die Trans-

wellsysteme herstellt, werden außer der Polyestermembran noch Polycarbonat- und Kollagen-bezogene Polytetrafluorethylenmembrane angeboten.

Eine weitere Problematik des Transwellsystems hing ebenfalls mit den unterschiedlichen Materialien der beiden Kompartimente zusammen. Denn bei der Lyse der Zellen mit Triton-X-100 lösten sich die Zellen schlechter von der Membran (Polyester) als vom Boden (Polystyrol). In der Suspension, die aus dem oberen Kompartiment stammte, sind somit weniger aufgelöste Zellen enthalten. So wurde evt. weniger Radioaktivität gemessen als eigentlich in die Zellen aufgenommen wurde. Dies ist aus Abb. 34 (S. 141) und Abb. 37 (S. 146) ersichtlich, wo in beiden Kompartimenten zu Inkubationsbeginn die gleiche Menge an Radioaktivität angeboten wurde. Es wurde zwar versucht, die Zellen mechanisch durch Abkratzen mit der Pipettenspitze besser von der Membran zu lösen. Wie erfolgreich dies in den einzelnen Versuchen allerdings war, ist schwierig zu sagen. Um den Unterschied zwischen Membran und Plattenboden zu erfassen, wurden die Versuche doppelt durchgeführt und die jeweiligen Zelllinien einmal am Plattenboden (= unteres Kompartiment) und einmal auf der Membran des Einsatzes (= oberes Kompartiment) ausgesät.

Da die Zellen im Transwellsystem, anders als in den Zentrifugenröhrchen, am Boden anhafteten, sich ausbreiteten und einen Zellrasen bildeten, ergab sich ein weiteres Problem: Die verschiedenen Zelllinien adhärirten unterschiedlich stark an der jeweiligen Oberfläche. Zum Einen hing die Stärke der Adhärenz von der Zelldichte ab, zum anderen war sie von der Zellart abhängig. Während sich EMT- und CAKI-Zellen leicht von der Oberfläche lösten, adhärirten SK-N-SH-Zellen etwas stärker. Dies stellte vor allem ein Problem beim Waschvorgang dar, da sich hierbei eine unbestimmte Anzahl an Zellen von der Oberfläche löste. Dabei gingen durch die unterschiedliche Adhärenz nicht bei jeder Zelllinie in etwa gleich viele Zellen verloren. Durch das Waschen lösten sich wesentlich mehr EMT- bzw. CAKI-Zellen als SK-N-SH-Zellen ab. Das bedeutet, dass die in den extraneuronalen EMT- bzw. CAKI-Zellen gemessene Radioaktivität im Vergleich zu den neuronalen SK-N-SH-Zellen evt. niedriger ist, als die tatsächlich aufgenommene Radioaktivität. Als Optimierungsversuch wurden die Zellen schon 3 Tage vor Versuchsbeginn in das Transwellsystem

ausgesät. Dies brachte zwar eine gewisse Verbesserung der Zelladhärenz, reichte aber nicht aus, um die Unterschiede im Zellverlust ganz aufzuheben.

Diese frühere Zellaussaat zur besseren Adhärenz ergab allerdings ein neues Problem. Die Anzahl der Zellen pro Well waren am Versuchstag nicht mehr genau bestimmbar. Zwar wurden pro Boden bzw. Membran 1×10^6 Zellen (bzw. $0,5 \times 10^6$ CAKI) ausgesät, da die verschiedenen Zellen aber vielleicht unterschiedlich schnell wuchsen, ist eine gleiche Zellzahl nach 3-tägiger Kulturzeit vermutlich nicht mehr gegeben.

PC 12-Zellen sind für diese Versuche im Transwellsystem nicht geeignet. Da die Zellen nicht an der Oberfläche adhären, ergaben sich einige Probleme bei der praktischen Durchführung. Durch die Verbindungslöcher in der Seitenwand können die in Suspension vorliegenden Zellen aus dem oberen Kompartiment in das untere Kompartiment abschwimmen. Dadurch wären mehr Zellen im unteren Kompartiment vorhanden, in dem dann auch mehr Radioaktivität gemessen wird. Außerdem gestaltete sich der Waschvorgang sehr schwierig, da die komplette Suspension aus den Wells abpipettiert und anschließend zentrifugiert werden musste. Dabei gingen beim Zentrifugieren ebenfalls eine unbestimmte Anzahl an Zellen verloren. Die Vergleichbarkeit zu den anderen Zelllinien, die nicht zentrifugiert wurden, war somit nicht mehr gegeben.

5.2.2 Aussagekraft der Untersuchungen im Transwellsystem

Im Kapitel 4.11 (S. 150-155) wurden die Ergebnisse der radioaktiven Aufnahmeversuche im Transwellsystem mit denen in den Zentrifugenröhrchen verglichen. Allerdings muss man bei der Interpretation dieses Vergleiches beachten, dass die Inkubationszeit in den Versuchen im Zentrifugenröhrchen 15 min und im Transwellsystem 30 min betrug.

In einer zusammenfassenden Tabelle (Tab. 41, S. 167) sind die Verhältnisse der Inhibitorhemmeffekte zwischen den Untersuchungssystemen aufgeführt. Lagen zwischen den Untersuchungssystemen nur geringe Unterschiede ($< 1 : 1,6$ bzw. $< 1,6 : 1$) der Hemmeffekte vor, so wurden sie in der Tabelle gelb markiert.

Tab. 41: Verhältnisse der Hemmeffekte zwischen den einzelnen Untersuchungssystemen.

Zelllinie; Substrat	Inhibitor	o : u	R : u	R : o
SK-N-SH; [³H] DA	Corticosteron	1 : 1,1	1 : 1,8	1 : 1,6
	mIBG	1 : 1,1	1 : 1,1	1 : 1
EMT; [³H] DA	Corticosteron	1 : 1,4	1,1 : 1	1,7 : 1
	mIBG	1 : 3,5	1,2 : 1	1 : 3
SK-N-SH; [³H] NA	Corticosteron	1,3 : 1	1 : 1,8	1 : 2,4
	mIBG	1 : 1,2	1 : 1	1,1 : 1
CAKI; [³H] NA	Corticosteron	1 : 6,3	1 : 1,7	3,4 : 1
	mIBG	1 : >100	1 : 3	>100 : 1

Aufgeführt sind die Hemmeffekte von Corticosteron (f.c.= 1×10^{-4} mol/l) bzw. mIBG (f.c.= 1×10^{-5} mol/l) auf die [³H] DA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) bzw. [³H] NA (f.c. $\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) Aufnahme in ca. 10^6 Zellen der verschiedenen Zelllinien.

o = oberes Kompartiment des Transwellsystems, u = unteres Kompartiment des Transwellsystems, R = Zentrifugenröhrchen. Die gelbe Markierung hebt einen nur geringen Unterschied der Hemmeffekte zweier verschiedener Untersuchungssysteme hervor.

Zusammenfassend kann man, als Fazit dieses Vergleiches der unterschiedlichen Untersuchungssysteme, die unter 4.11 (S. 152) gestellten Fragen wie folgt beantworten:

- 1) Setzte man die Inhibitorhemmeffekte auf Zellen des oberen Kompartimentes ins Verhältnis zu den Hemmeffekten auf Zellen des unteren Kompartimentes (Tab. 41), so konnte man feststellen, dass im Transwellsystem die Hemmeffekte in den beiden Kompartimenten häufig gut übereinstimmten. Wie man an der gelben Markierung der 1. Spalte in Tab. 41 erkennen kann, wurden von 8 Vergleichen 5 gute Übereinstimmungen gefunden.
- 2) Ein Unterschied der Hemmeffekte von Corticosteron bzw. mIBG zwischen Transwellversuchen und Zentrifugenröhrchenversuchen bestand v.a. bei den extraneuronalen CAKI- und EMT-Zellen (2. und 3. Spalte der Tab. 41).
- 3) Ein Vergleich der Hemmeffekte im Zentrifugenröhrchen mit denen im oberen Kompartiment sowie mit denen im unteren Kompartiment ist ebenfalls in Tab. 41 dargestellt (2. und 3. Spalte). Daraus ist ersichtlich, dass die Hemmung der [³H] Katecholaminaufnahme der in den Zentrifugenröhrchen enthaltenen Zellen durch die Inhibitoren Corticosteron und mIBG am ehesten

der Hemmung der radioaktiven Aufnahme den in den unteren Kompartimenten enthaltenen Zellen entsprachen (4 von 8 Übereinstimmungen).

- 4) Die Frage, ob der Hemmeffekt von Corticosteron bzw. mIBG generell in einem der Untersuchungssysteme stärker war, lässt sich am besten aus den Abb. 40-43 (S. 153) beantworten. Unabhängig von der Zelllinie wurde in Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG die Aufnahme von [3 H] Katecholaminen am stärksten in Zellen gehemmt, die im unteren Kompartiment des Transwellsystems angezüchtet waren. Im Gegensatz zum Inhibitor mIBG ist für 10^{-4} M Corticosteron keine Tendenz erkennbar. Beim Inhibitor Corticosteron trat je nach getesteter Zelllinie der stärkste Hemmeffekt in unterschiedlichen Untersuchungssystemen auf.

Die Versuche im Transwellsystem wurden v.a. durchgeführt, um die im Organismus herrschende Konkurrenzsituation zwischen den verschiedenen Zellarten in den in-vitro Experimenten zu simulieren. Eine zentrale Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit war, ob Tumorzellen des einen Kompartimentes (SK-N-SH) mehr Radioaktivität über die NAT bzw. die evt. exprimierten DAT inkorporieren, wenn im anderen Kompartiment die radioaktive Aufnahme über den EMT in die Zellen mittels eines spezifischen Inhibitors geblockt wird. Dies wäre theoretisch möglich, da die Konkurrenz zwischen den verschiedenen Zellarten um diese Substanz wegfallen würde und somit die komplette angebotene Radioaktivität den Tumorzellen zur Verfügung stünde.

In einem Vorversuch wurde getestet, ob die Anwesenheit einer anderen Zelllinie im Transwellsystem einen Einfluss auf das Aufnahmeverhalten in die Zellen hat. Wie unter 4.9 (S. 136-139) bereits beschrieben, ist der Unterschied im Aufnahmeverhalten vernachlässigbar klein, d.h., es besteht bei dem verwendeten Substratkonzentrat ($\approx 1 \times 10^{-7}$ mol/l) keine Konkurrenz um die Aufnahme der radioaktiven Substanzen. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Es wäre möglich, dass die angebotene Konzentration an [3 H] Katecholaminen so hoch ist, dass genügend Substrat vorhanden ist, um alle Transporter beider Zelllinien abzusättigen. Ist ausreichend Substrat im Inkubationspuffer vorhanden, so kann um diese Substanz auch keine Konkurrenz entstehen. Laut Smets et al. liegt die

Sättigung der mIBG Aufnahme erst bei 1×10^{-6} mol/l [252]. Man darf allerdings eine weitere Erklärung nicht außer Acht lassen. Durch die kurze Inkubationszeit ist der Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten sehr gering und evt. nicht ausreichend, um eine Konkurrenzsituation herzustellen.

Zusammenfassend lässt sich über die Versuche im Transwellsystem sagen, dass sie auf Grund der Schwierigkeiten in der praktischen Durchführung im Vergleich zu den Ergebnissen in den Zentrifugenröhrchen vielfach keinen Mehrwert in der Aussage erbrachten. Durch verschiedene weitere Optimierungen, die unter 5.2.1 (S. 163-166) diskutiert wurden (z.B. Verwendung anderer Membranmaterialien, Aussaat der Zellen auf der Unterseite der Membran, Optimierung des Waschvorganges, etc.), sind aber Bedingungen denkbar, die diese Situation deutlich verbessern könnten. Letzten Endes müssten aber Tierversuche durchgeführt werden, um realistische Versuchsbedingungen zu schaffen, die denen des menschlichen Körpers ähnlicher sind.

5.3 Interpretation der Abgabe von Radioaktivität nach [³H] DA Inkorporation

Mit diesen Abgaberversuchen sollte die Frage geklärt werden, wie lange das angebotene [³H] DA in den unterschiedlichen Zellen verbleibt und ob die Abgabe bzw. Wiederaufnahme durch verschiedene Substanzen beeinflusst werden kann.

Den Ausgangspunkt $t=0$ dieser Versuche stellt die Radioaktivität dar, die nach 15-minütiger Inkubation in den Zellen gemessen wurde (Versuchsbeschreibung S. 54-55). Dabei ergab sich folgende absteigende Reihenfolge: **PC 12 > SK-N-SH > CAKI > OCT 2 > OCT 1 > EMT** (Tab. 34, S. 106).

Nachdem die Zellpellets mit 500µl Inkubationspuffer aufgefüllt wurden, ergab sich nach 240 min folgende Reihenfolge der in den Zellpellets verbliebenen Radioaktivität: **PC 12 ≈ OCT 1 ≈ OCT 2 > EMT ≈ CAKI > SK-N-SH.**

Ohne Inhibitoren waren auf Grund der Vielzahl der Speichervesikel nach 4h in PC 12-Zellen noch 77% der ursprünglich aufgenommenen Radioaktivität nachweisbar. Denn nach der Inkorporation wird der Großteil des [³H] DA in die intrazellulären Vesikel aufgenommen und dort gespeichert. Dadurch sind die äußerst oxidationsempfindlichen Katecholamine vor Autoxidation und der Metabolisierung durch die MAO und COMT geschützt. Aus der PC 12-Zelle ausgeschiedenes, unverstoffwechseltes [³H] DA könnte somit wieder über die Transporter aufgenommen werden. In OCT 1-, OCT 2- bzw. EMT-exprimierenden, transformierten HEK 293-Zellen konnte nach 4h ebenfalls noch das Meiste der aufgenommenen Radioaktivität (64-76%) detektiert werden, da in diesen Zellen nur eine geringe Metabolisierung stattfindet. Zwar haben sie keine Speichervesikel, in der die Katecholamine schützend gespeichert werden können, allerdings sind wahrscheinlich auch keine abbauenden Enzyme (MAO bzw. COMT) vorhanden. In geringem Maß könnte die Metabolisierung allerdings über Autoxidation erfolgen. In SK-N-SH- und CAKI-Zellen wurde nach 4h nur noch relativ wenig der vorher aufgenommenen Radioaktivität nachgewiesen (50-66%). Da diese Zellen nur sehr wenige Vesikel haben, sind die Katecholamine der im Zytoplasma liegenden MAO und COMT ausgeliefert und werden im Laufe der Zeit enzymatisch abgebaut und autoxydiert. Aus der Zelle abgegebene Katecholaminmetabolite können auf Grund struktureller Unterschiede nicht wieder über die Transporter aufgenommen werden.

Beim Vergleich des Effluxes der Radioaktivität in Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener Inhibitoren sollte festgestellt werden, ob die Inhibitoren einen Einfluss auf die Speicherung, Abgabe bzw. Wiederaufnahme haben.

Bei Untersuchungen in SK-N-SH-Zellen war in Anwesenheit von Corticosteron bzw. 6-FDA annähernd genauso viel Radioaktivität am Ende des Experimentes nachweisbar wie ohne Inhibitor. In Gegenwart von mIBG bzw. Desipramin wurde eine um ca. 6% verringerte Menge an Radioaktivität in SK-N-SH-Zellen

detektiert, was vermutlich durch eine Hemmung der Wiederaufnahme über den NAT bedingt war. Diese Inhibition der Wiederaufnahme in SK-N-SH-Zellen in Gegenwart von NAT-blockierenden Inhibitoren ist jedoch relativ gering. Erklärbar wäre dieses Ergebnis durch eine starke intrazelluläre Verstoffwechslung des DA. Denn durch die sehr geringe Anzahl an Speichervesikeln in den SK-N-SH-Zellen sind die Katecholamine den Enzymen MAO und COMT, sowie der Autoxidation ausgeliefert und werden wahrscheinlich innerhalb von 60 min zum Großteil metabolisiert. Die durch passive Diffusion aus der Zelle ausgeschleusten Metabolite können dann nicht mehr über den NAT bzw. die evt. exprimierten DAT aufgenommen werden. Da SK-N-SH-Zellen auch eine geringe Zahl an schützenden Vesikeln besitzen, wird [³H] DA wahrscheinlich nicht vollständig abgebaut, so dass dieses unveränderte DA nochmals über den NAT bzw. DAT inkorporiert werden könnte. In Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors mIBG bzw. Desipramin verringert sich diese Wiederaufnahme allerdings. Die Hemmpotenz von Corticosteron auf die neuronalen Katecholamintransporter ist sehr viel geringer, weshalb eine mögliche Wiederaufnahme von [³H] DA in die SK-N-SH-Zellen nahezu nicht gehemmt wird. Warum allerdings die erneute Inkorporation durch 6-FDA ebenfalls so wenig inhibiert wird, ist nicht ganz verständlich, da diese Substanz ebenfalls kompetitiv über den NAT bzw. DAT aufgenommen wird.

Ähnliche Ergebnisse wurden beim Experiment mit PC 12-Zellen gesehen. Auch hier fällt auf, dass 6-FDA bzw. Corticosteron die Wiederaufnahme von [³H] DA praktisch nicht hemmt. Bei Corticosteron ist dies verständlich, wenn man bedenkt, dass die Hemmpotenz dieses Inhibitors am NAT bzw. DAT nicht sehr hoch ist. Da PC 12-Zellen eine sehr große Anzahl an intrazellulären Speichervesikeln aufweisen, sind die Katecholamine weitgehend vor dem Abbau geschützt. Angenommen, die Vesikel geben innerhalb von 60 min unverändertes [³H] DA aus PC 12-Zellen ab, so könnte die Wiederaufnahme der Katecholamine über den NAT mit Desipramin reduziert werden, womit die bei diesen Untersuchungen gefundene 22% geringere [³H] DA Speicherung in PC 12-Zellen in Gegenwart von Desipramin erklärbar ist. In Anwesenheit von mIBG wurde eine nur um 6% geringere radioaktive Speicherung gefunden. Dies

liegt wahrscheinlich daran, dass mIBG am NAT einen geringeren Hemmeffekt hat als Desipramin, was in den Inhibitionsversuchen bestätigt werden konnte (4.3.7, S. 102-105).

Vergleicht man den [³H] DA Efflux aus CAKI-Zellen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit eines Inhibitors, so lässt sich nahezu kein Unterschied feststellen. Dies wäre zum Einen durch eine nahezu komplette Metabolisierung der Katecholamine erklärbar, da CAKI-Zellen nahezu keine Speichervesikel haben und somit keinen Schutz vor den abbauenden Enzymen MAO und COMT bieten. Zum anderen wäre es denkbar, dass im Abgabemedium eine zu geringe Konzentration des abgegebenen [³H] DAs vorlag, um eine detektierbare Wiederaufnahme zu ermöglichen, da nur 1,6% der angebotenen Radioaktivität in CAKI-Zellen inkorporiert wurde. Eine Wiederaufnahme von [³H] DA Metaboliten bzw. einer zu geringen Konzentration an unverstoffwechseltem DA, wäre somit nicht möglich, so dass der fehlende Unterschied im Abgabeverhalten in Anwesenheit von Inhibitoren verständlich ist.

Das äußerst oxidationsempfindliche [³H] DA wird in den EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierenden HEK 293-Zellen nur über Autoxidation verstoffwechselt, da diese Zellen keine katecholaminabbauenden Enzyme besitzen. Daher müsste der Anteil an ausgeschiedenen Metaboliten relativ gering sein, so dass unverändertes [³H] DA in Abwesenheit eines Inhibitors nochmals über die Transporter inkorporiert werden könnte. Ist allerdings der Inhibitor Corticosteron, mIBG oder 6-FDA im Abgabemedium vorhanden, der mit DA um die Aufnahme über den Transporter konkurriert, müsste eine geringere Wiederaufnahme von [³H] DA und somit auch eine geringere Radioaktivität in den Zellen nachweisbar sein. Dies ist bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht der Fall. Statt dessen wurde in Anwesenheit eines Inhibitors mehr Radioaktivität in den Zellen gemessen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Abgabe von unverstoffwechseltem DA aus den Zellen über die Katecholamintransporter erfolgt. Diese Annahme bestätigte Fritz bereits 1986, indem sie zeigte, dass eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration einen gesteigerten Efflux von [³H] NA aus PC 12-Zellen nach sich zog, der sich durch Kokain, einem spezifischen Inhibitor des NAT, hemmen ließ [72]. Dieses

Ergebnis spricht für eine Abgabe des [³H] NA über den Na⁺- abhängigen NAT. Jonker et al. beschrieben einen bidirektionalen Transport über OCT 1, OCT 2 und EMT [130]. Auch Russ et al. konnten zeigen, dass MPP⁺ nicht nur über EMT in die Zellen aufgenommen, sondern auch abgegeben wird [222]. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene vermehrte Speicherung von Radioaktivität in den Zellen ohne Inhibitors ließe sich somit erklären. Denn wenn die Abgabe von [³H] DA über den Transporter durch die spezifischen Inhibitoren gehemmt wird, reichert sich die Radioaktivität in der Zelle an. Allerdings dürfte Desipramin die Abgabe kaum inhibieren, da es kein spezifischer Inhibitor der EMT, OCT 1 bzw. OCT 2 ist, während Corticosteron den Efflux am stärksten verhindern müsste. Dies ließ sich in den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht feststellen.

Für die Therapie und Diagnostik des Neuroblastoms und des Phäochromozytoms ist es nützlich, Aussagen zu erhalten, wie lange die radioaktiv markierte Substanz in den Tumorzellen bzw. den gesunden Zellen verbleibt und ob mittels eines Inhibitors die Abgabe von Radioaktivität aus den Tumorzellen beeinflusst werden könnte. Diese Fragestellungen können mit vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht eindeutig beantwortet werden, da DA in einigen der verwendeten Zelllinien enzymatisch abgebaut wird und somit nicht repräsentativ für das stabile mIBG ist, das im Körper kaum metabolisiert wird [86]. Außerdem haben DA und das NA-ähnliche mIBG ein etwas unterschiedliches Aufnahme- und Abgabeverhalten. Allerdings sind Aussagen für 6-[¹⁸F] FDA möglich, das es ein ähnliches Aufnahme- bzw. Abgabeverhalten wie [³H] DA haben müsste und ebenfalls in-vivo verstoffwechselt wird.

5.4 Effekte der getesteten Inhibitoren auf die verschiedenen Zelllinien

5.4.1 Desipramin

Desipramin ist in der Literatur schon lange als Hemmstoff bekannt. Neben Kokain und Nisoxetin hemmt es den NAT spezifisch [206] und wird somit durch

die verminderte Aufnahme von Katecholaminen und Serotonin u.a. in der Therapie der Depression eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die in der Literatur beschriebene spezifische Hemmung des NAT durch Desipramin bestätigt werden. Außerdem sollte die Stärke des Hemmeffektes eine indirekte Aussage liefern, wie stark die NAT-Expression auf den getesteten Zellen war.

Wie bereits unter 4.3.3 (S. 87-89) beschrieben, hemmt Desipramin die [³H] DA Aufnahme in die neuronalen SK-N-SH- und PC 12-Zellen schon bei der geringsten eingesetzten Konzentration (2×10^{-8} mol/l) nahezu zu 100%. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Literaturangaben überein, bei der eine komplette Blockade des NAT durch 10^{-5} M Desipramin erwähnt wird [235]. Dies lässt den Rückschluss zu, dass NAT auf SK-N-SH und PC 12-Zellen stark exprimiert ist, was in der Literatur bestätigt wird [166,237].

Im Gegensatz dazu wurden extraneuronale Zellen (CAKI, EMT, OCT 1, OCT 2), die keine NAT exprimieren, von Desipramin praktisch nicht gehemmt. Somit kann die Aussage bekräftigt werden, dass Desipramin NAT spezifisch hemmt.

5.4.2 6-FDA

Das erstmals 1979 von Kirk et al. [148] synthetisierte 6-FDA müsste auf Grund großer struktureller Ähnlichkeiten annähernd genauso gut über die Katecholamintransporter aufgenommen werden wie DA. Untersuchungen konnten zeigen, dass die Affinität des DAT zu 6-FDA ähnlich ist wie zu DA, da die direkte Aufnahme von 6-[¹⁸F] FDA über diesen Transporter ebenfalls nahezu identisch ist mit der DA Aufnahme [62]. Sowohl Pacholczyk als auch Lode konnten nachweisen, dass DA nicht nur ein gutes Substrat für den DAT darstellt, sondern auch über den NAT in Zellen aufgenommen wird [166,206]. Diese Ergebnisse konnten von Seitz bestätigt werden [237]. Sie zeigte in ihrer Dissertation, dass 6-FDA dosisabhängig und im gleichen quantitativen Umfang wie DA über den NAT inkorporiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob 6-FDA nur über den NAT bzw. den evt. in SK-N-SH- und PC 12-Zellen exprimierten DAT (S. 41) in die Zellen aufgenommen wird oder auch über andere Katecholamintransporter. Die Aufnahme von 6-FDA wurde indirekt durch kompetitive Hemmung der [³H] DA Aufnahme bestimmt, da 6-[¹⁸F] FDA im Rahmen dieser Dissertation für direkte Aufnahmeversuche nicht zur Verfügung stand. Die Hemmwirkung erlaubt eine qualitative und quantitative Aussage über die aktive Aufnahme von potentiellen Kompetitoren, wie in diesem Fall 6-FDA.

Die im Ergebnisteil dargestellte Zelllinienreihenfolge, welche die Hemmpotenz des kompetitiven Inhibitors 6-FDA anzeigt, erlaubt somit auch eine indirekte Aussage über die Quantität, in der die verschiedenen Zellen 6-FDA aufnehmen. Da von den Zelllinien in etwa bekannt ist, welche Katecholamintransporter sie auf ihrer Oberfläche exprimieren (2.5, S. 41-42), ist somit ein Rückschluss möglich, über welchen Transporter 6-FDA am besten aufgenommen wird.

Die Aufnahme von [³H] DA wurde von 6-FDA ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/l) am intensivsten in SK-N-SH-Zellen gehemmt, die NAT und evt. in geringen Mengen auch DAT exprimieren. Somit nehmen NAT und evt. DAT am stärksten 6-FDA auf. Im Vergleich dazu inkorporierten PC 12-Zellen über die gleichen Transporter weniger 6-FDA. Ohne Zugabe von Kompetitoren zeigte sich ebenfalls eine stärkere Aufnahme von [³H] DA in SK-N-SH-Zellen als in PC 12-Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Aufnahmeversuchen von Seitz [237] überein. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass mehr Transporterproteine in der Membran der SK-N-SH-Zellen als in der PC 12- Zellmembran exprimiert waren. Diese Annahme kann durch die Genexpressionsdaten des NAT für diese beiden Zelllinien von Seitz et al. [237] bestätigt werden. Bei einer 6-FDA-Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l wurde die Aufnahme von [³H] DA in die extraneuronalen EMT-Zellen nahezu genauso stark gehemmt wie in die neuronalen SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen, d.h., über den EMT wurde nahezu genauso viel 6-FDA aufgenommen wie über NAT bzw. evt. DAT. Da bei diesen Untersuchungen die Anzahl der Transportproteine in der Zellmembran nicht bestimmt wurde, lässt sich nicht genau sagen, ob die annähernd gleiche

radioaktive Aufnahme in einer annähernd gleichen Affinität der Transporter zu 6-FDA begründet ist, oder ob bei geringerer Affinität mehr EMT-Proteine in der Zellmembran zur Verfügung standen. Die [³H] DA Aufnahme in OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen sowie in CAKI-Zellen wurde durch die getesteten 6-FDA-Konzentrationen wesentlich geringer gehemmt, d.h. es wurde weniger 6-FDA aufgenommen. Auch bei diesen Zelllinien lässt sich nicht definitiv sagen, ob eine geringere Transporterzahl oder eine geringere Affinität der Grund dafür ist.

Um eine Aussage über die Affinität der Transporter bezüglich des Substrates 6-FDA machen zu können, müssten weitere Experimente durchgeführt werden, in denen sowohl die Anzahl der in der Zellmembran exprimierten Transporter bestimmt wird, als auch die Menge der Aufnahme von 6-FDA in die Zellen. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Versuche kann nur spekulativ angenommen werden, dass die Reihenfolge der 6-FDA Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien folgendermaßen aussehen könnte: **EMT ≈ SK-N-SH > PC 12 >> OCT 2 ≈ OCT 1 > CAKI.**

Ziel dieser Untersuchungen war es, über den Hemmeffekt indirekt das Aufnahmeverhalten von 6-FDA in die verschiedenen Zellen zu ermitteln. Es steht nämlich zur Diskussion [47,126,172,198,200,205], zukünftig routinemäßig in der Diagnostik des Neuroblastoms und Phäochromozytoms 6-[¹⁸F] FDA anstelle von [¹²³I] mIBG zu verwenden. Denn bereits 1983 zeigten Garnett et al. [76], dass mittels [¹⁸F]-markiertem DOPA dopaminerge Neurone des ZNS in PET-Untersuchungen dargestellt werden konnten. Im gleichen Jahr stellten Chiueh et al. fest, dass 6-Fluorkatecholamine die Kriterien eines adrenergen falschen Neurotransmitters erfüllen und somit für die Detektion des adrenergen sympathischen Nervensystems im PET geeignet sind [47].

Dies könnte mehrere Vorteile bieten. Zum Einen ist es möglich, dass mit 6-[¹⁸F] FDA, im Gegensatz zu [¹²³I] mIBG, mehr Radioaktivität in die Zellen inkorporiert wird, da 6-FDA über den NAT und den DAT aufgenommen wird, während mIBG hauptsächlich über den NAT in den Tumorzellen angereichert wird [86,252]. Die Vermutung, dass 6-FDA im Vergleich zu mIBG besser in die

neuronalen Zelllinien (SK-N-SH und PC 12) aufgenommen wird, da diese neben NAT wahrscheinlich auch DAT exprimieren, konnte beim Vergleich der verschiedenen Inhibitorhemmeffekte auf eine bestimmte Zelllinie erhärtet werden (4.3.7, S. 102-105). Zum anderen könnte bei PET Untersuchungen 6-[¹⁸F] FDA parallel zu 2-[¹⁸F] FDG angewendet werden. Diese Kombination erscheint v.a. wegen der Heterogenität der Tumore sinnvoll. Zwar exprimiert ein Großteil der Neuroblastome und Phäochromozytome den NAT und evt. zum Teil auch den DAT und kann somit mit radioaktiv markiertem mIBG bzw. 6-FDA dargestellt werden. Ein Teil der Tumore, meist relativ undifferenzierte, die keine oder nur eine geringe Anzahl an Transporter auf ihrer Zelloberfläche besitzen, entziehen sich allerdings der Darstellung mit [¹²³I] mIBG bzw. 6-[¹⁸F] FDA. Diese undifferenzierten Tumorzellen zeigen jedoch meist eine höhere metabolische Aktivität, was sich durch eine erhöhte Aufnahme von 2-[¹⁸F] FDG bemerkbar machen würde. Untersuchungen an Patienten mit malignen Phäochromozytomen zeigten folgende Reihenfolge der Detektion von Tumorerkrankungen: [¹⁸F] FDG > 6-[¹⁸F] FDA > [¹²³I] mIBG [172].

Ein Nachteil der Anwendung von 6-[¹⁸F] FDA könnte allerdings sein, dass nach der spezifischen Aufnahme von 6-FDA über NAT bzw. DAT eine Umwandlung zu 6-OHDA über zwei oxidative Elektronentransfers und eine nukleophile Substitutionsreaktion, gefolgt von zwei Reduktionsreaktionen, erfolgen kann [237]. Diese langsame Reaktion führt zu einer intrazellulären Anreicherung von 6-OHDA mit nachfolgender schneller Oxidation zum para-Chinon unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Diese bewirken in höherer Konzentration, mittels Destabilisierung von Membranen und Beeinflussung von Enzymen, Membranproteinen und Rezeptoren [107] eine Schädigung der Zelle. Somit wirken Radioaktivität und reaktive Sauerstoffverbindungen kumulativ toxisch auf die Zellen, was bei einer diagnostischen Markierung der Tumorzellen eher unerwünscht ist. Für die PET-Analysen mit 6-[¹⁸F] FDA ist es daher sinnvoll zusätzlich Vitamin C (Ascorbat) zu verabreichen, da damit die Umwandlung von 6-FDA zu 6-OHDA verhindert wird [237].

5.4.3 mIBG

Da das 1960 aus Bretylium und Guanethidin synthetisierte mIBG [243] strukturelle Ähnlichkeiten zum NA aufweist, wird es ähnlich wie dieses über NAT (1.3, S. 8-12) aufgenommen. Auf dieser Grundlage wurde [^{123}I] mIBG zur szintigraphischen Detektion und in entsprechend hohen Dosen [^{131}I] mIBG zur Therapie des Neuroblastoms sowie des Phäochromozytoms eingeführt. Dabei wirkt nicht nur die Radioaktivität toxisch auf die Tumorzellen. Auch unmarkiertes mIBG ist zytotoxisch, da durch die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette die ATP-Produktion gesenkt und somit die Glykolyse und Laktatproduktion gesteigert wird [168]. Als Folge fällt der pH-Wert ab und trägt zur Zerstörung des Tumors bei [168]. Die beiden Tumore neuroektodermalen Ursprungs exprimieren zum Großteil NAT und evt. in geringer Menge DAT auf ihrer Zelloberfläche. Die gute Aufnahme von mIBG über NAT in die Zellen wurde bereits ausführlich erforscht und ist in etlichen Quellen in der Literatur zu finden. Der Transport über DAT ist hingegen eher unwahrscheinlich [86], während die Aufnahme über den SERT in der Literatur umstritten ist [86,276]. Bei den Untersuchungen von Glowniak et al. [86] stammten die Zellen mit den Transportern allerdings aus Rindern und Ratten. Da zwischen den unterschiedlichen Spezies verschiedene Verteilungen und pharmakologische Charakteristika der Transporter bestehen [55,113,141,151], ist eine Aufnahme von mIBG über humane DAT und v.a. über SERT nicht ganz ausgeschlossen. Ein Nachteil dieser Diagnostik und Therapie ist, dass das radioaktiv markierte mIBG nicht nur in Tumorzellen aufgenommen wird, sondern auch in Leber, Herz, Speicheldrüsen, Lunge, Niere, Harnblase, Darm, NNM, Milz und Skelettmuskulatur [26,79,207,267,268,270]. Diese Aufnahme in gesunde Zellen könnte entweder über passive Diffusion oder über spezifische Transporter erfolgen. Mit der molekularen Identifizierung der OCT 1, der OCT 2 sowie der EMT und der anschließenden Erforschung der Verteilung dieser Transporter im Organismus, konnte man erstmals die Vermutung anstellen, dass mIBG nicht nur über die NAT, sondern auch über diese extraneuronalen Katecholamintransporter aufgenommen werden könnte. Diese Vermutung sollte u.a im

Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. In Untersuchungen mit verschiedenen mIBG-Konzentrationen sollte zunächst eine geeignete Konzentration von mIBG gefunden werden, bei der die Hemmung der [³H] DA Aufnahme am größten war. Da der kompetitive Inhibitor mIBG mit DA auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten um die Bindungsstelle am jeweiligen Transporter konkurrieren, kann man anhand der Stärke des Hemmeffektes von mIBG indirekt eine Aussage bezüglich der quantitativen Aufnahme über den Transporter treffen. Das bedeutet, dass bei der Konzentration, bei der die stärkste Hemmung der [³H] DA Aufnahme beobachtet wurde, am meisten mIBG in die Zellen inkorporiert wurde. Die mIBG Aufnahme wurde im Rahmen dieser Dissertation meist indirekt ermittelt, da [¹³¹I] mIBG als Rest einer Neuroblastomtherapie für direkte Aufnahmeversuche nur einmal zur Verfügung stand.

Bei den durchgeführten Experimenten konnte man bei allen untersuchten Zellen spätestens ab einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l eine Abflachung bzw. ein Plateau der Hemmkurve erkennen (Abb. 12a-f, S. 80). Da die Transporter wahrscheinlich bei dieser Konzentration abgesättigt sind, ist trotz höherer Konzentrationen keine Steigerung des Hemmeffektes und somit auch keine vermehrte Aufnahme von mIBG zu erwarten. Die Reihenfolge des mIBG-Hemmeffektes auf die [³H] DA Aufnahme in die Zellen (**SK-N-SH** \approx **OCT 2** > **PC 12** \approx **EMT** >> **CAKI** \approx **OCT 1**) zeigt auch in absteigender Reihe an, welche Zellen am meisten mIBG über ihre Transporter inkorporierten. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man annehmen, dass bei einer mIBG-Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l über NAT, OCT 2 und EMT annähernd gleich viel mIBG aufgenommen wurde, während über OCT 1 nur halb so viel inkorporiert wurde.

Diese mIBG Aufnahme wurde allerdings nur indirekt über den Hemmeffekt bestimmt. Für eine definitive Aussage müssten weitere Aufnahmeversuche mit [¹³¹I] mIBG in verschiedenen Konzentrationen erfolgen.

Bei den Aufnahmeversuchen in Anwesenheit von mIBG fiel auf, dass der maximale Hemmeffekt von mIBG auf die [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen, an

deren Oberfläche v.a. EMT exprimiert sind [231,233], nur halb so groß ist wie auf die [³H] DA Aufnahme in EMT-Zellen. Unter der Annahme, dass außer den EMT noch andere Transporter in der Membran der CAKI-Zellen vorhanden sind, die durch mIBG nicht so stark gehemmt werden, ließe sich dieses Ergebnis erklären. Denn dann kann trotz Hemmung der EMT weiter [³H] DA über das andere Transportsystem in die CAKI-Zellen aufgenommen werden. Somit könnte der Hemmeffekt von mIBG auf die CAKI-Zellen nicht so hoch sein wie auf die HEK 293-Zellen, die ausschließlich den EMT exprimieren. Dabei stellt sich die Frage, welches Transportsystem neben den EMT in der Membran der CAKI-Zellen exprimiert sein könnte. Unveröffentlichte Ergebnisse aus unserem Labor von Z. Kuçi zeigten anhand von fluoreszierenden Antikörpern einen DAT auf CAKI-Zellen. Dies würde gut zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen passen. Denn bei den zeitabhängigen Aufnahmeversuchen wird die [³H] DA Aufnahme durch mIBG wesentlich weniger gehemmt als die [³H] NA Aufnahme (Abb. 13c, S. 82). Ist auf der CAKI-Zelloberfläche zusätzlich ein DAT vorhanden, dann kann die [³H] Katecholaminaufnahme außer über den durch mIBG kompetitiv inhibierten EMT auch über DAT erfolgen, der mIBG nicht kompetitiv aufnimmt und somit wahrscheinlich auch nicht blockiert wird. Da DA eine höhere Substratspezifität zum DAT hat als NA (Tab. 1, S. 9) und somit weniger NA über den DAT aufgenommen wird, wäre es auch erklärbar, warum die Hemmung von mIBG bei der [³H] NA Aufnahme stärker ist (siehe auch 5.6, S. 189).

Eine weitere theoretische Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass auf HEK 293-Zellen weniger EMT als auf CAKI-Zellen exprimiert sind und nicht genügend mIBG Moleküle vorhanden sind, um diese größere Anzahl an EMT auf den CAKI-Zellen ausreichend zu blockieren. Dieser Erklärungsansatz ist aber nahezu auszuschließen, da die Hemmkurve bei CAKI-Zellen ein Plateau zeigt, was auf eine Sättigung der EMT mit mIBG schließen lässt.

5.4.4 GBR-12909

Wie bereits beschrieben, wurde durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in unserem Labor beobachtet, dass DAT auf extraneuronalen CAKI-Zellen exprimiert sein könnten (unveröffentlichte Ergebnisse von Z. Kuçi). Deshalb wurden an den Zelllinien, die potentiell einen DAT besitzen könnten, nämlich an SK-N-SH-, PC 12- und CAKI-Zellen, [³H] DA Aufnahmeversuche in Abwesenheit oder Anwesenheit von GBR-12909 durchgeführt. In der Literatur ist GBR-12909 [114] neben GBR-12783 [25] und Mazindol [85] als spezifischer Inhibitor des DAT beschrieben. Diese Inhibitionsversuche mit GBR-12909 sollten experimentell einen Anhalt liefern, ob und in welchem Ausmaß die untersuchten Zelllinien DAT exprimieren. Dieses Wissen ist wichtig im Hinblick auf einen möglichen routinemäßigen Einsatz von 6-[¹⁸F] FDA in der PET-Diagnostik von Neuroblastomen bzw. Phäochromozytomen. Denn das DA-Analogon 6-FDA wird neben dem NAT v.a. über den DAT inkorporiert.

Giros et al. fanden 1991 bei ihren Untersuchungen des DAT einen Hemmeffekt von nahezu 100% bei einer GBR-12909-Konzentration von 1×10^{-6} mol/l [85]. In vorliegender Arbeit wurde mit 10^{-5} M GBR-12909 eine 85%-ige Inhibition der [³H] DA Aufnahme in PC 12-Zellen beobachtet. Unter der Annahme, dass GBR-12909, wie in der Literatur beschrieben, den DAT spezifisch inhibiert, weist dieses Ergebnis auf eine nicht unerhebliche Expression von DAT in PC 12-Zellen hin. Dass mit 10^{-5} M GBR-12909 eine nahezu 100%-ige Hemmung der [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH-Zellen erreicht werden konnte, ist allerdings erstaunlich. Denn eigentlich geht man davon aus, dass die SK-N-SH-Zelllinie, wenn überhaupt, nur eine geringe Anzahl an DAT in ihrer Zellmembran exprimiert (siehe auch 2.5, S. 41-42). Lode et al. konnten bei Genexpressionsversuchen weder DAT noch SERT in SK-N-SH-Zellen nachweisen [166]. Eine mögliche Erklärung für diese starke Hemmwirkung auf SK-N-SH-Zellen wäre, dass GBR-12909 auch den NAT hemmt. Dazu wurde allerdings keine Literatur gefunden, die diese Vermutung bestätigen oder

entkräften konnte. Eine weitere Erklärung dafür wäre, dass in den heterogenen SK-N-SH-Zellen weit mehr DAT exprimiert sind als bisher angenommen wurde. In der Annahme, dass auf SK-N-SH- und PC 12-Zellen DAT exprimiert sind, wäre eine bessere Aufnahme von 6-[¹⁸F] FDA im Vergleich zu [¹²³I] mIBG zu erwarten. Denn 6-[¹⁸F] FDA wird, ähnlich wie DA, sowohl über den NAT als auch über den DAT aufgenommen, während [¹²³I] mIBG, ähnlich wie NA, hauptsächlich über den NAT inkorporiert wird. Beim Vergleich der Hemmeffekte der verschiedenen Inhibitoren auf eine Zelllinie (4.3.7, S. 102-105) war im Vergleich zu mIBG die stärkere Hemmwirkung von 6-FDA auf die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen ersichtlich. Da dieser Hemmeffekt die Stärke der Aufnahme dieser kompetitiven Inhibitoren indirekt anzeigt, liegt die Vermutung nahe, dass 6-[¹⁸F] FDA besser als [¹²³I] mIBG in Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomzellen aufgenommen wird.

Auch die geringe Hemmwirkung durch GBR-12909 auf die [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen von maximal 30% ist auffällig. Zum Einen wäre es möglich, dass GBR-12909 in einer zu geringen Konzentration verwendet wurde, da bei 1×10^{-5} mol/l noch kein Plateau der Hemmkurve zu sehen ist. Zum anderen wäre es möglich, dass das Transportsystem, das unter dem Mikroskop durch fluoreszierende DAT-Antikörper sichtbar gemacht wurde, zwar Ähnlichkeiten zum DAT hat, nicht jedoch der DAT ist. Ist das der Fall, so kann sich der spezifische Inhibitor GBR-12909 evtl. durch kleine strukturelle Unterschiede dieses Transportsystems nicht so gut an der Bindestelle anlagern. Das fluoreszenzmikroskopische Ergebnis wäre ebenfalls mit der geringen Inhibition der CAKI-Zellen durch GBR-12909 vereinbar, wenn der DAT hauptsächlich intrazellulär, jedoch nicht auf der Zelloberfläche, exprimiert wäre. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diese nur geringe Hemmung der [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen durch GBR-12909 wäre, dass die Anzahl der DAT wesentlich geringer ist als die Anzahl der EMT, so dass trotz Hemmung der DAT noch genügend [³H] DA über den EMT aufgenommen werden kann.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem GBR-12909 in Kombination mit Corticosteron verwendet wurde, um

herauszufinden, ob die [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen durch diese Kombination besser gehemmt wird als durch die alleinige Inhibition des jeweiligen Inhibitors. Auch bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass GBR-12909 in der verwendeten Konzentration die [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen nahezu nicht beeinflusst. Die Kombination von GBR-12909 mit Corticosteron hemmt die [³H] DA Aufnahme nahezu genauso stark wie Corticosteron allein. Somit ist sehr unwahrscheinlich, dass das zusätzlich auf den CAKI-Zellen vorhandene Transportsystem ein „normaler“ DAT ist (siehe auch 5.6, S. 189).

5.4.5 Corticosteron

DMSO wurde zur Lösung der Substanz Corticosteron benötigt. Um Hemmeffekte dieser zelltoxischen Substanz auf die [³H] Katecholaminaufnahme in die verschiedenen Zellen auszuschließen, wurde bei jedem Hemmversuch mit Corticosteron die höchste verwendete DMSO-Konzentrationen (1,2%) als Kontrolle mitgeführt. Zudem wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe der Einfluss von unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen auf die [³H] DA Aufnahme in die verschiedenen Zellen getestet. Wie unter 4.3.4.1 (S. 91-92) bereits beschrieben, hemmt das DMSO selbst bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen die [³H] Katecholaminaufnahme in fast allen untersuchten Zelllinien praktisch nicht. Lediglich bei OCT 2-Zellen führte DMSO zu einer deutlichen Hemmung der [³H] DA Aufnahme (35%). Ob es sich dabei um einen tatsächlichen Hemmeffekt oder nur um einen Fehler bei dieser Versuchsdurchführung (n=1) handelt, müssten weitere Untersuchungen klären.

Bei den Hemmeffekten des Corticosterons auf die [³H] Katecholaminaufnahme in die verschiedenen Zellen, die im Ergebnisteil unter 4.3.4 (S. 89-98) beschrieben sind, wurden die Hemmeffekte des DMSO nicht abgezogen. Denn bei fast allen Zelllinien war die Hemmung vernachlässigbar gering. Bei der Betrachtung der Hemmeffekte von Corticosteron auf die [³H] Katecholaminauf-

nahme in OCT 2-Zellen muss die Hemmwirkung von DMSO berücksichtigt und in die Interpretation dieser Ergebnisse miteinbezogen werden.

Wie bereits erwähnt, nehmen auch gesunde Zellen bei der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms bzw. des Phäochromozytoms radioaktiv markiertes mIBG auf. Anhand des Verteilungsmusters der OCT 1, OCT 2 und EMT ist es sehr wahrscheinlich, dass die Aufnahme in die gesunden Zellen zum Einen über diese extraneuronalen Katecholamintransporter, insbesondere den EMT, und zum anderen über die Katecholamintransporter des gesunden sympathischen Nervengewebes erfolgt. Diese Annahme konnte im Rahmen dieser Arbeit bekräftigt werden. Die Aufnahme von mIBG in Tumorzellen findet dagegen v.a. über die neuronalen NAT und die evt. exprimierten DAT statt. Da die Aufnahme von mIBG über verschiedene Transportersysteme erfolgt, wäre es denkbar, die extraneuronalen Transporter mit einem Hemmstoff spezifisch zu blockieren. Dies herauszufinden war Hauptziel der vorliegenden Arbeit.

Mit der molekularen Identifizierung der OCT 1+2 und des EMT wurde nicht nur die Verteilung dieser Transporter im Organismus und die Substratspezifität aufgeklärt, sondern auch Hemmstoffe für diese Transporter gefunden. Zu den spezifischen Inhibitoren der OCT 1-3 zählen u.a. das seit langem bekannte Corticosteroid Corticosteron mit mineralokortikoider Wirkung sowie die neu synthetisierten Isozyanine, Disprocynium 24 und Decynium 22. Zwar wird in der Literatur [95,98,113,130] die Hemmwirkung dieser Inhibitoren auf OCT 1+2 und EMT beschrieben. Welchen Effekt sie allerdings auf NAT und DAT haben, ist in der Literatur nicht zu finden.

Um eine geeignete Konzentration von Corticosteron zu finden, bei der die extraneuronalen Katecholamintransporter maximal und die neuronalen Katecholamintransporter minimal gehemmt werden, wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Die Hemmwirkungen dieser Konzentrationsreihe von Corticosteron sind unter 4.3.4.3 beschrieben (S. 94-96) und in den Abb. 18a-f graphisch dargestellt. Erst bei einer sehr hohen Konzentration des Corticosterons von 1×10^{-3} mol/l wird die Aufnahme von [^3H] DA über den neuronalen NAT in die SK-N-SH- und PC 12-Zellen nennenswert gehemmt. Bei

geringeren Konzentrationen wird der NAT praktisch nicht von Corticosteron blockiert.

Der EMT hingegen wird bereits bei einer Corticosteronkonzentration von 1×10^{-7} mol/l gut gehemmt und erreicht eine maximale Hemmung von ca. 70% bei einer Konzentration von 1×10^{-3} mol/l. Dieses Ergebnis stimmt zwar nicht ganz mit den Ergebnissen von Gründemann et al. überein, der bereits bei einer Corticosteronkonzentration von 3×10^{-6} mol/l eine Hemmung von ca. 90% erreichte [100]. Allerdings wurden diese Untersuchungen mit [3 H] MPP⁺ als Aufnahmesubstrat durchgeführt, das wesentlich besser über den EMT in die Zellen aufgenommen wird als [3 H] DA oder [3 H] NA.

Vergleicht man die Hemmwirkung von Corticosteron auf die verschiedenen OCT miteinander, so lässt sich feststellen, dass die [3 H] DA Aufnahme über den **OCT 2 > EMT (= OCT 3) > OCT 1** gehemmt wird. Beachtet man nun die Hemmwirkung, die DMSO auf OCT 2 hat, so wird **EMT > OCT 2 \approx OCT 1** von Corticosteron blockiert. Diese Reihenfolge steht in Übereinstimmung mit mehreren Literaturquellen: Gründemann et al. fanden bereits 1997 heraus, dass die Substanz Corticosteron mit einem K_i von $0,13 \mu\text{mol/l}$ für EMT ein besserer Inhibitor ist als für OCT 2 ($K_i = 0,67 \mu\text{mol/l}$) und Corticosteron bei OCT 2 eine 100-fach höhere Hemmpotenz hat als bei OCT 1 ($K_i = 72 \mu\text{mol/l}$) [95,100]. Da diese Untersuchungen mit OCT 1 aus Ratten, OCT 2 aus Schweinen sowie humanen EMT durchgeführt wurden und bekannt ist, dass bei der Hemmung von Transportern artspezifische Unterschiede auftreten [55,113,141,151], untersuchte Hayer-Zillgen et al. 2002 nochmals die Hemmpotenz verschiedener Inhibitoren auf humane OCT. Auch bei diesen Experimenten wurde bestätigt, dass Corticosteron ein guter Inhibitor des EMT ($K_i = 0,29 \mu\text{mol/l}$) ist [113]. Mit K_i -Werten von $22 \mu\text{mol/l}$ und $34 \mu\text{mol/l}$ hatte Corticosteron eine ca. 100-fach schwächere Hemmpotenz auf OCT 1+2. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Gründemann et al. fällt auf, dass bei den Untersuchungen von Hayer-Zillgen OCT 1+2 in etwa gleich stark von Corticosteron inhibiert wurden, was bei Beachtung des Hemmeffektes auf OCT 2 auch bei den Versuchen in vorliegender Arbeit beobachtet wurde.

Vergleicht man die Hemmwirkung von Corticosteron auf die [³H] DA Aufnahme zwischen CAKI-Zellen und EMT-Zellen, so tritt der gleiche Effekt auf, der bereits bei der Hemmung durch mIBG und 6-FDA beobachtet wurde. CAKI-Zellen wurden von den Inhibitoren etwa zur Hälfte weniger gehemmt als EMT-Zellen. Unter der Annahme, dass außer den EMT noch ein weiteres Transportsystem in der Membran der CAKI-Zellen vorhanden ist, das nicht bzw. geringer von Corticosteron inhibiert wird, ließe sich dieser Unterschied evt. erklären (siehe 5.6, S. 189).

Da die Katecholamintransporter eine unterschiedliche Affinität zu DA und NA haben, wurden bei den im Rahmen dieser Arbeit wichtigen Versuchen beide Katecholamine verwendet, um evt. Unterschiede herauszuarbeiten.

Über den EMT wurde die Aufnahme von [³H] NA besser durch Corticosteron gehemmt als die Aufnahme von [³H] DA. Das war sowohl bei CAKI- als auch bei EMT-Zellen (Abb. 19b+c, S. 97) zu sehen und ist evt. erklärbar, wenn man weiß, dass mehr NA als DA über den EMT aufgenommen wird [90,100]. Der NAT hat eine in etwa gleich hohe Affinität zu DA wie zu NA (Tab. 1, S. 9). Da auf SK-N-SH-Zellen wahrscheinlich v.a. NAT und evt. in geringer Menge DAT exprimiert sind, könnte man beim Vergleich der [³H] DA mit der [³H] NA Aufnahme in Anwesenheit von Corticosteron ebenfalls erklären, weshalb die Hemmwirkung von Corticosteron bei beiden Aufnahmesubstraten in etwa gleich ist.

5.5 Vergleich der Aufnahme von [¹³¹I] mIBG, [³H] DA, [³H] NA in verschiedene Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10⁻⁴ M Corticosteron

5.5.1 Vergleich der Aufnahme verschiedener Substrate

Die etwa gleich stark ausgeprägte Aufnahme von [³H] NA und [¹³¹I] mIBG in SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen (Tab. 37, S. 127) ist dadurch erklärbar, dass mIBG genau wie NA v.a. über den NAT aufgenommen wird, der auf diesen

beiden Zelllinien in großer Menge exprimiert wird. Die 2- bis 3-fach stärkere Aufnahme von [^3H] DA in SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass DA besser als NA über den NAT transportiert wird (Tab. 1, S. 9). Auch eine zusätzliche Expression von DAT auf diesen Zellen ist möglich, die v.a. DA, aber kaum NA oder mIBG transportieren (siehe auch 2.5, S. 41-42).

Nach den Ergebnissen der Inhibitorversuche mit einem 100-fach molaren Überschuss an mIBG war die starke Aufnahme von [^{131}I] mIBG über die extraneuronalen Katecholamintransporter EMT, OCT 1, OCT 2 unerwartet, obwohl man annimmt, dass die Aufnahme von radioaktiv markiertem mIBG in gesunde Zellen v.a. über diese Transporter erfolgt. Bei der diagnostischen [^{123}I] mIBG-Szintigraphie werden viele gesunde Zellen intensiv dargestellt. Bei den Aufnahmeversuchen ließen sich nach 30-minütiger Inkubation mit [^3H] DA in Anwesenheit von 10^{-5} M mIBG folgende indirekt ermittelte mIBG Aufnahmen beobachten: **SK-N-SH > PC 12 > OCT 2 > OCT 1 \approx EMT > CAKI** (Tab. 21, S. 81). Die nach 30-minütiger Inkubation mit [^3H] NA indirekt ermittelte Aufnahme von mIBG ließ sich in folgender Reihe darstellen: **SK-N-SH > EMT > OCT 2 > PC 12 \approx CAKI > OCT 1** (Tab. 21, S. 81). Die Reihenfolge, die bei der direkt ermittelten [^{131}I] mIBG Aufnahme erhalten wurde (**CAKI >> EMT \approx OCT 2 > OCT 1 > SK-N-SH \approx PC 12**, siehe 4.6.1, S. 123-124), wich jedoch von den beiden oben genannten ab.

Auffälligerweise nahmen CAKI-Zellen, die laut Literatur v.a. EMT exprimieren [233,235], im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zellen bis zu 10 mal mehr [^{131}I] mIBG auf. Eine stärkere Inkorporation von Radioaktivität in CAKI-Zellen im Vergleich zu EMT-Zellen ist aber nicht nur zu beobachten, wenn [^{131}I] mIBG als Substrat verwendet wurde (Tab. 37, S. 127), sondern auch, wenn [^3H] DA oder [^3H] NA angeboten wurden. Diese Ergebnisse könnten durch eine größere Anzahl an Transportern auf der CAKI- als auf der EMT-Zelloberfläche erklärt werden. Eine andere bereits mehrfach diskutierte Erklärung wäre, dass CAKI-Zellen in ihrer Membran außer den EMT noch andere Transporter exprimieren (siehe auch 5.6, S. 189). Auffällig ist auch, dass etwa doppelt so viel [^3H] DA bzw. [^3H] NA in CAKI-Zellen transportiert

wurde wie in EMT-Zellen. Dagegen wurde ca. 3x mehr [¹³¹I] mIBG in CAKI-Zellen als in EMT-Zellen aufgenommen. Diese Ergebnisse wären unter der Annahme erklärbar, dass CAKI-Zellen einen Transporter exprimieren, der **mIBG > NA > DA** inkorporiert.

5.5.2 Vergleich der unterschiedlichen Hemmwirkung von 10⁻⁴ M Corticosteron in Abhängigkeit vom Substrat

Der Transport aller verwendeten Aufnahmesubstrate ([³H] DA, [³H] NA und [¹³¹I] mIBG) über NAT bzw. evtl. DAT in SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen wurde auch bei hohen Corticosteronkonzentrationen (1x10⁻⁴ mol/l) kaum gehemmt (Tab. 38, S. 129). Auffällig war jedoch, dass die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH- und PC 12-Zellen durch den Inhibitor mehr als doppelt so stark inhibiert wurde im Vergleich zur [¹³¹I] mIBG bzw. [³H] NA Aufnahme. Dies könnte zum Einen an der variablen Expression der Transporter auf der Zelloberfläche bei unterschiedlichen Passagen an den verschiedenen Versuchstagen liegen. Zum anderen wäre es aber auch möglich, dass der DAT durch Corticosteron ebenfalls minimal blockiert wird. SK-N-SH- und v.a. PC 12-Zellen exprimieren wahrscheinlich neben dem NAT auch in geringen Mengen DAT. DA wird hauptsächlich über den DAT, aber auch über den NAT aufgenommen, während NA und mIBG über den NAT, nicht jedoch über den DAT, inkorporiert werden. Bei einer schwachen Inhibition der DAT durch Corticosteron könnte somit der etwas stärkere Hemmeffekt von Corticosteron auf die [³H] DA Aufnahme erklärt werden.

Im Gegensatz dazu hemmte 10⁻⁴ M Corticosteron die Aufnahme von [³H] DA, [³H] NA bzw. [¹³¹I] mIBG in CAKI- und EMT-Zellen sehr gut. Eine Ausnahme stellt allerdings die relativ geringe Hemmung von nur 16,6% auf die [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen dar. Zum Einen wäre bei einer Versuchsanzahl von nur n=1 ein Messfehler möglich, zum anderen eine variable Expression der Transporter in den CAKI-Zellen bei unterschiedlichen Passagen. Der Corticosteronhemmeffekt auf die Aufnahme von Radioaktivität in CAKI-Zellen

ist bei allen drei getesteten Substraten geringer als auf die radioaktive Aufnahme in EMT-Zellen. Möglich ist, dass der bereits erwähnte zusätzliche Transporter der CAKI-Zellen von Corticosteron nicht bzw. schwächer gehemmt wird und die radioaktive Aufnahme über diesen Transporter weiter erfolgen kann (siehe 5.6).

Auffällig ist die Tatsache, dass die Aufnahme von [³H] DA über OCT 1 bzw. OCT 2 durch Corticosteron ca. 13x stärker gehemmt wird als die [¹³¹I] mIBG Aufnahme über diese beiden Transporter, wobei der Grund dafür unklar ist.

5.6 Expression eines weiteren Katecholamintransporters in der CAKI-Zellmembran?

Beim Vergleich der humanen Nierenkarzinomzelllinie CAKI und der künstlich mit EMT transfizierten HEK 293-Zelllinie fällt auf, dass sie sich in der Höhe der Inhibitoreffekte bei den verschiedenen Hemmstoffen sowie in der Menge der Aufnahme bei den verschiedenen Substraten unterscheiden. Diese Ergebnisse sind nicht verständlich unter der Annahme, dass auf der Zelloberfläche der CAKI-Zellen nur der EMT präsent ist [231,233]. Die Expression zusätzlicher Katecholamintransporter (OCT 1, OCT 2 oder DAT) auf CAKI-Zellen wäre denkbar. Möglicherweise wird der DAT auf CAKI-Zellen exprimiert, da unveröffentlichte Ergebnisse von Z. Kuçi fluoreszenzmikroskopisch DAT auf diesen Zellen zeigten. Allerdings wurde die Aufnahme von [³H] DA in CAKI-Zellen durch GBR-12909 kaum gehemmt (4.3.5, S. 98-101).

Da CAKI-Zellen humane Nierenkarzinomzellen sind, wäre auch eine Expression von OCT möglich, da Gründemann et al. mRNA von OCT 1 erstmals in der Leber, der Niere und im Darm von Ratten nachweisen konnten [96]. Zwar gelang der Nachweis von OCT 1 auf gesunden, menschlichen Nierenzellen nicht [91,301], dennoch ist dies bei Tumorzellen vorstellbar. Die Expression von OCT 2 in der Membran der CAKI-Zellen wäre ebenfalls vorstellbar, da OCT 2 in humanen Tubuluszellen der Niere nachgewiesen werden konnte [91,202].

5.7 Klinischer Nutzen von Corticosteron beim Neuroblastom bzw. Phäochromozytom?

Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Screeningversuche mit verschiedenen Inhibitoren ergaben sich im Hinblick auf den Inhibitor Corticosteron neue Perspektiven für die Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms und Phäochromozytoms. Um die in den Screeningversuchen gefundenen Ergebnisse bezüglich des Corticosteronhemmeffektes zu bestätigen, wurden mit dem Inhibitor Corticosteron drei unabhängige [³H] DA bzw. [³H] NA Aufnahmeversuche mit SK-N-SH-, CAKI- und EMT-Zellen durchgeführt.

Die statistische Auswertung ergab, dass ein signifikanter Unterschied des Hemmeffektes von Corticosteron zwischen CAKI- und SK-N-SH-Zellen sowie EMT- und SK-N-SH-Zellen bestand. Das bedeutet, dass die extraneuronalen CAKI- bzw. EMT-Zellen von 10^{-4} M Corticosteron statistisch signifikant stärker gehemmt wurden als die neuronalen SK-N-SH-Zellen. Dieses Ergebnis erhielt man sowohl in den Suspensionsversuchen im Zentrifugenröhrchen (Abb. 26a, S. 114 und Abb. 28a, S. 117) als auch in den Experimenten im Transwellssystem (Abb. 35, S. 143 und Abb. 38, S. 148).

5.7.1 Verbesserung der Spezifität und Sensitivität der diagnostischen [¹²³I] mIBG-Szintigraphie?

Die Spezifität der mIBG-Szintigraphie im Nachweis primärer und sekundärer Neuroblastom- bzw. Phäochromozytomherde liegt je nach Literaturquelle bei nahezu 100%. Per definitionem bedeutet die Spezifität eines diagnostischen Verfahrens, dass die als krank erkannte Population auch tatsächlich krank ist. Bezogen auf die mIBG-Szintigraphie bedeutet es, dass die szintigraphisch dargestellten Zellen auch wirklich Neuroblastom- und Phäochromozytomzellen sind. Die hohe Spezifität kann somit nur bei Kenntniss des Aufnahmemusters von [¹²³I] mIBG in gesunde Zellen erreicht werden.

Die Sensitivität liegt dagegen deutlich niedriger und erreicht maximal 90%. Per definitionem bedeutet die Sensitivität eines Testverfahrens, dass die kranke Population als krank erkannt wird. Bezogen auf die mIBG-Szintigraphie bedeutet es, dass möglichst alle primären und sekundären Tumorherde entdeckt werden. Für die Detektion des Primärtumors sind in der Literatur [169] aber auch geringere Sensitivitäten von 73% und von nur 50% für die Detektion von Leber- bzw. Lymphknotenmetastasen angegeben. Laut Lumbroso et al. [169] liegt die Ursache dafür, dass ein Teil der Primärtumore und Metastasen in der Szintigraphie nicht sichtbar gemacht werden kann, eher in der Überlappung der mIBG Aufnahme in gesunde Zellen mit der in Tumorzellen als daran, dass ein geringer Teil der Neuroblastome bzw. Phäochromozytome keine NAT exprimieren, über die [¹²³I] mIBG aufgenommen wird.

Durch eine spezifische Inhibition der physiologischen, extraneuronalen mIBG Aufnahme könnte somit nicht nur eine verbesserte Spezifität, sondern auch eine verbesserte Sensitivität erreicht werden. Da die Aufnahme in gesunde Zellen, neben der Aufnahme über die Katecholamintransporter des sympathischen Nervensystems, wahrscheinlich v.a. über die EMT erfolgt, könnte sie durch den spezifischen Inhibitor Corticosteron drastisch verringert werden. Dies würde eine wesentliche Verbesserung in der Diagnostik des Neuroblastoms und des Phäochromozytoms bedeuten.

5.7.2 Reduzierung der Nebenwirkungen der [¹³¹I] mIBG-Therapie?

Auch wenn die [¹³¹I] mIBG-Therapie im Vergleich zur Chemotherapie eine relativ nebenwirkungsarme Therapie ist, treten dennoch sowohl akute als auch späte Nebenwirkungen auf.

Zu den frühen Nebenwirkungen zählen v.a. Übelkeit und Erbrechen [124], die evt. durch eine Aufnahme der Radioaktivität über die OCT 1+2 und den EMT in gesunde Zellen des Magen-Darm-Traktes mit bedingt sind. Die bedeutendste akute Nebenwirkung ist aber die Knochenmarksuppression [18,51,73,250] und

hierbei v.a die Thrombozytopenie [5], die wahrscheinlich hauptsächlich aus der Inkorporation von radioaktiv markiertem mIBG in gesunde Thrombozyten und andere hämatopoetische Zellen resultiert. Wie Tytgat et al. 2002 nachweisen konnten, erfolgt die Aufnahme von [¹³¹I] mIBG in die Thrombozyten über den SERT und wahrscheinlich auch über den VMAT 2 [276]. Der Nachweis, über welchen Transporter die anderen hämatopoetischen Zellen [¹³¹I] mIBG aufnehmen, gelang bislang noch nicht. Bisher weiß man nur, dass die hämatopoetischen Zellen Katecholamine aufnehmen und selbst auch in geringem Maße produzieren können [176]. Laut Amenta et al. besitzen Lymphozyten DAT und VMAT [5]. VMAT 2 werden auch in Mastzellen, Megakaryozyten, Thrombozyten, basophilen Granulozyten und Langerhanszellen exprimiert, nicht jedoch in normalen hämatopoetischen Zellen [6]. Ob die Thrombozyten oder die anderen Zellen des Knochenmarkes über einen EMT, OCT 1 oder OCT 2 verfügen, ist in der Literatur nicht beschrieben und wurde im Rahmen dieser Arbeit auch nicht untersucht.

Zu den späten Nebenwirkungen zählt u.a. die Hypothyreose, die durch Aufnahme von abgespaltetem [¹³¹I] erklärbar ist. Eine verringerte Aufnahme von radioaktiv markiertem Jodid in die Schilddrüse wurde bisher durch die vorherige Applikation von Kaliumjodid versucht. Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei nahezu 22% der Patienten trotzdem eine szintigraphische Darstellung der Schilddrüse erfolgt und bis zu 56% eine Schilddrüsendysfunktion erleiden [282]. Kombiniert man Kaliumjodid mit Thyroxin und Methimazol, so wurde die Schilddrüse nur noch zu 5% szintigraphisch dargestellt und die Schilddrüsendysfunktion nach [¹³¹I] mIBG-Therapie reduzierte sich auf 14% [282]. Eine geringere Aufnahme von radioaktiv markiertem Jodid kann ebenfalls mit Perchlorat erreicht werden und ist zur Blockade der Schilddrüse beim Neuroblastomprotokoll NB04 standardmäßig vorgeschrieben. Aber auch eine Niereninsuffizienz kann Folge einer [¹³¹I] mIBG-Therapie sein. Denn über EMT und OCT 2 wird radioaktiv markiertes mIBG auch in Zellen des proximalen und distalen Tubulus angereichert, weshalb es zu einer Schädigung der Niere kommen könnte. Kürzlich konnten Noskova et al. im Endometrium während der Proliferations- und Sekretionsphase funktionale EMT und VMAT 2 nachweisen

[201]. Durch Inhibition der EMT mittels Corticosteron oder einem anderen spezifischen Hemmstoff könnte die Aufnahme von [¹³¹I] mIBG in Zellen des Endometriums reduziert werden. Zu den späten Nebenwirkungen der [¹³¹I] mIBG-Therapie zählen auch sekundäre Neoplasien [74,255]. Retrospektive klinische Untersuchungen [74] zeigten für Patienten nach einer [¹³¹I] mIBG-Therapie im Vergleich zu Neuroblastompatienten ohne radioaktive Therapie ein um 6,59-fach erhöhtes Risiko sekundäre Malignome zu entwickeln. Eine Vorschädigung gesunder Zellen durch die Aufnahme von [¹³¹I] mIBG über die EMT und OCT 1+2 ist möglich, wird in der Literatur jedoch nicht beschrieben.

Durch eine Inhibition der Aufnahme von [¹³¹I] mIBG über die verschiedenen Transporter in gesunde Zellen könnten diese Nebenwirkungen vielleicht stark gesenkt werden und somit die radioaktive Dosis gesteigert werden. Da der Transport in gesunde Zellen wahrscheinlich hauptsächlich über die EMT erfolgt, wäre die Gabe eines spezifischen Inhibitors des EMT vor der [¹³¹I] mIBG Applikation sinnvoll. Wie aus der Literatur [97,100,130] und aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bekannt ist, blockierte Corticosteron die EMT sehr gut. Auch die Aufnahme über OCT 1 und OCT 2 wird durch Corticosteron in geringem Maße gehemmt [95,98,113]. Ob eine Aufnahme von [¹³¹I] mIBG über die SERT stattfindet und ob eine radioaktive Aufnahme über SERT durch Corticosteron inhibiert wird, ist in der Literatur umstritten. Während Maines et al. nach 3-wöchiger Applikation von 600mg Corticosteron bei 3 Monate alten Ratten signifikant verminderte Bindung von [³H] Citalopram an SERT feststellten [171], fanden Owens et al. nach 6-wöchiger Hypercorticosteronämie keine veränderte Bindung von [³H] Citalopram an SERT oder an den 5-HAT-2_α-Rezeptor [204]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu keine Untersuchungen durchgeführt, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob durch Corticosteron evt. die [¹³¹I] mIBG Aufnahme in Thrombozyten inhibiert wird.

Corticosteroide werden in der Klinik schon lange für die Therapie der unterschiedlichsten Erkrankungen verwendet, so dass deren Nebenwirkungen gut bekannt sind. Vor allem Corticosteroide mit glukokortikoider Wirkung haben

die bekannten Nebenwirkungen wie Umverteilung der Körperdepotfette, Osteoporose, diabetogene Stoffwechsellage, Hypertonie usw. Außerdem konnte in erst kürzlich veröffentlichten Studien [191] gezeigt werden, dass sowohl chronische als auch kurzzeitige Glukokortikoidapplikationen durch Veränderung von Anzahl und Funktion der NMDA-Glutamatrezeptoren das ZNS, v.a den Hippocampus anfälliger für toxische Substanzen macht. Im Gegensatz dazu haben Corticosteroide mit mineralokortikoider Wirkung, zu denen auch das Corticosteron zählt, nur relativ geringe Nebenwirkungen. Die Symptome, die bei Applikation von Corticosteron auftreten können, ähneln am ehesten den Symptomen des Conn-Syndroms (= primärer Hyperaldosteronismus). Dazu zählen die Hypertonie- und Hypokaliämie-symptome, wie z.B. Muskelschwäche, Obstipation, Polyurie und metabolische Azidose mit Parästhesien. Somit wäre der Inhibitor Corticosteron, der wenige Nebenwirkungen hat, eine geeignete Substanz, um die Diagnostik und die Therapie des Neuroblastoms und des Phäochromozytoms mit radioaktiv markiertem mIBG zu verbessern.

5.8 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Im Folgenden sind die Kernaussagen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zusammenfassend stichpunktartig aufgelistet:

- 1) Mit zunehmender Inkubationszeit, zwischen 5 min und 30 min, stieg die [³H] DA und die [³H] NA Aufnahme in allen getesteten Zellen (SK-N-SH, PC 12, CAKI, EMT, OCT 1, OCT 2) kontinuierlich an.
- 2) [³H] DA wurde besser über NAT, bzw. evt. DAT, OCT 1 und OCT 2 in SK-N-SH-, PC 12-, OCT 1- bzw. OCT 2-Zellen aufgenommen als [³H] NA, während [³H] NA besser als [³H] DA über EMT in CAKI- bzw. EMT-Zellen inkorporiert wurde.
- 3) Im Vergleich zur [³H] DA bzw. [³H] NA Aufnahme wurde [¹³¹I] mIBG um ein Vielfaches besser in CAKI-, EMT-, OCT 1- und OCT 2-Zellen über die

extraneuronalen Katecholamintransporter inkorporiert. Nur bei SK-N-SH- und PC 12-Zellen war die [¹³¹I] mIBG Aufnahme über die neuronalen Transporter geringer als die [³H] DA Aufnahme. Im Gegensatz dazu hemmte ein 100-fach molarer Überschuss an mIBG besser die Aufnahme von [³H] DA und [³H] NA in NAT-, bzw. evt. in geringer Menge DAT-exprimierende Zellen (SK-N-SH, PC 12) als in EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende Zellen.

- 4) Nach 15-minütiger [³H] DA Inkorporation stieg die Abgabe von Radioaktivität aus den Zellen zwischen 0 min und 240 min kontinuierlich mit der Zeit an. Die Ausscheiderate der Radioaktivität war innerhalb der ersten 30 min groß und flachte dann ab. Innerhalb von 4h wurde die Radioaktivität in folgender absteigender Reihenfolge aus den Zellen freigesetzt: SK-N-SH > EMT > OCT 2 ≈ OCT 1 ≈ PC 12. Eine Aussage, ob die Abgabe der Radioaktivität über die Transporter oder durch Diffusion über die Zellmembran erfolgte und ob diese Abgabe mit spezifischen Inhibitoren hemmbar war, konnte mittels der durchgeführten Versuche nicht eindeutig getroffen werden.
- 5) Bezüglich der Rolle der verwendeten Inhibitoren bei der Aufnahme von [³H] DA, [³H] NA bzw. [¹³¹I] mIBG wurden folgende Ergebnisse erreicht:
 - 5.1) Desipramin hemmte spezifisch die [³H] DA Aufnahme in NAT-exprimierende Zellen (SK-N-SH, PC 12).
 - 5.2) GBR-12909 hemmte die [³H] DA Aufnahme in SK-N-SH- bzw. PC 12-Zellen sehr gut, während die [³H] DA Aufnahme in CAKI-Zellen kaum inhibiert wurde. Da GBR-12909 in der Literatur als spezifischer Inhibitor des DAT beschrieben ist, lassen diese Ergebnisse eine DAT-Expression auf SK-N-SH- und PC 12-Zellen vermuten, während eine DAT-Expression auf CAKI-Zellen doch eher unwahrscheinlich ist.
 - 5.3) Anhand der graphisch ermittelten IC₅₀-Werte ließ sich nach der Stärke des mIBG-Hemmeffektes folgende absteigende Reihenfolge erstellen: SK-N-SH ≈ OCT 2 > PC 12 ≈ EMT >> CAKI ≈ OCT 1.
 - 5.4) Anhand der graphisch ermittelten IC₅₀-Werte ließ sich nach der Stärke des 6-FDA-Hemmeffektes folgende absteigende Reihenfolge erstellen: EMT ≈ SK-N-SH > PC 12 >> OCT 2 ≈ OCT 1 > CAKI. Da 6-FDA ein

kompetitiver Inhibitor ist, gibt diese Reihe auch die indirekt ermittelte Aufnahme von mIBG in die verschiedenen Zellen wieder.

5.5) Hemmwirkungen von Corticosteron

5.5.1) 10^{-4} M Corticosteron inhibierte stark die extraneuronalen Katecholamintransporter. OCT 1 und OCT 2 wurden in etwa gleich stark von Corticosteron gehemmt, während die Hemmpotenz von Corticosteron auf die EMT um etwa das 100-fache stärker war. Im Gegensatz dazu wurde die [^3H] DA bzw. [^3H] NA Aufnahme in SK-N-SH- und PC 12-Zellen, welche die neuronalen NAT und evt. in geringen Mengen auch DAT exprimieren, von 10^{-4} M Corticosteron kaum beeinflusst.

5.5.2) Eine Kombination von 10^{-4} M Corticosteron und 10^{-8} M GBR-12909 erzielte bei CAKI-Zellen keine stärkere Hemmung der [^3H] DA Aufnahme als eine alleinige Inhibitor durch 10^{-4} M Corticosteron.

5.5.3) Wurde [^3H] NA statt [^3H] DA als Aufnahmesubstrat verwendet, so konnte ein stärkerer Hemmeffekt von Corticosteron auf EMT-exprimierende Zellen (CAKI, EMT) beobachtet werden, während bei der v.a. NAT-exprimierenden Zelllinie (SK-N-SH) eine gleich bleibende geringe Hemmwirkung von Corticosteron unabhängig vom Aufnahmesubstrat zu sehen war.

6) Anhand der IC_{50} -Werte konnte im Vergleich zu mIBG ein stärkerer Hemmeffekt von 6-FDA auf die [^3H] DA Aufnahme in neuronale SK-N-SH- und PC 12-, sowie in CAKI-Zellen beobachtet werden, während HEK 293-Zellen, welche die extraneuronalen EMT, OCT 1 und OCT 2 exprimieren, stärker mIBG als 6-FDA aufnahmen. Da diese kompetitiven Inhibitoren ihre Aufnahme indirekt über den Hemmeffekt anzeigen, kann vermutet werden, dass 6- ^{18}F] FDA stärker als [^{123}I] mIBG in Neuroblastome und Phäochromozytome aufgenommen wird.

7) Das Transwellsystem sollte die Konkurrenzsituation der verschiedenen Zellarten um die Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen ([^3H] DA bzw. [^3H] NA) im Organismus simulieren. Unter den gewählten Inkubations-

bedingungen zeigte sich keine Reduzierung der Katecholaminaufnahme, weder in SK-N-SH-Zellen (Konkurrenz zu CAKI- bzw. EMT-Zellen), noch in CAKI- bzw. EMT-Zellen (Konkurrenz zu SK-N-SH), wenn konkurrierende Zellen im anderen Kompartiment anwesend waren. Versuche bezüglich der Inhibitorwirkung zeigten tendentiell die gleichen Ergebnisse wie bei den Zellsuspensionsversuchen in den Zentrifugenröhrchen. Generell muss allerdings vermerkt werden, dass sich die Verwendung des Transwell-systems für einige der geplanten und durchgeführten Versuche als nicht geeignet erwies, v.a. durch die unterschiedliche Anhaftung der Zellen in den beiden Kompartimenten sowie durch den unzureichenden Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten innerhalb der 30-minütigen Inkubation.

Aus diesen zusammengefassten Ergebnissen, kombiniert mit Literaturangaben, ergeben sich Möglichkeiten für neue Ansätze der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms bzw. des Phäochromozytoms:

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms bzw. des Phäochromozytoms wäre eine spezifische, möglichst komplette Blockierung aller extraneuronalen Katecholamintransporter inklusive der SERT. Corticosteron inhibiert den Transport über die EMT, OCT 1 und OCT 2. Der Hemmeffekt von Corticosteron auf die SERT ist in der Literatur allerdings umstritten [171,204].

Zur vollständigen Blockade aller extraneuronalen Katecholamintransporter wäre wahrscheinlich eine Kombination von Corticosteron mit einem spezifischen Inhibitor des SERT, wie z.B. Fluvoxetin oder Fluvoxamin, besser als eine alleinige Anwendung von Corticosteron. Im Jahre 2002 konnten Tytgat et al. nach Gabe von Fluvoxamin ($K_i = 0,3\text{nM}$) eine um $44\% \pm 3\%$ reduzierte Aufnahme von Serotonin über die SERT in die Thrombozyten nachweisen [276]. Der Serotoninauström- und -einstrom sowie die Speicherung in Thrombozyten kann aber auch durch andere selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) gesenkt werden [186].

Theoretisch könnte statt Corticosteron auch Disprocynium 24 verwendet werden, da diese Substanz die OCT 1 und OCT 2 wesentlich besser inhibiert als Corticosteron [95,97,98,113]. Disprocynium 24 hat aber den Nachteil, dass es bislang am Menschen noch nicht getestet wurde. Zwar wurden bereits Tierversuche mit diesem Inhibitor durchgeführt, über Langzeittoxizitäten sind in der Literatur jedoch keine Angaben zu finden. Bekannt ist nur, dass Disprocynium 24 die Diurese und Natriurese steigert, die Herzfrequenz, den Blutdruck und die glomeruläre Filtrationsrate hingegen senkt [190].

Mit einer Applikation von Corticosteron in einer Konzentration von ca. 1×10^{-4} mol/l, evt. in Kombination mit einem Inhibitor des SERT ca. 30 min vor Gabe von radioaktiv markiertem mIBG, könnte evt. eine vermehrte Aufnahme von Radioaktivität über NAT in Tumorzellen erreicht werden, da extraneuronale Katecholamintransporter, über die radioaktiv markiertes mIBG aufgenommen werden könnte, durch die Inhibitoren mehr oder weniger stark blockiert sind. Die Vorteile für die Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms und Phäochromozytoms, die sich daraus ergeben, wurden bereits unter 5.7 (S. 190-194) erörtert. Ein Nachteil bei der Blockade der extraneuronalen Katecholamintransporter könnte allerdings die Erhöhung der Plasmakonzentration der endogenen Katecholamine sein, wie DA, NA und A. Dies könnte zu Bewegungsstörungen und Psychosen [291] sowie zu Blutdruckanstiegen führen. Da die extraneuronale Aufnahme der Katecholamine aber nur bei ca. 5% liegt [58], sind diese Nebenwirkungen eher unwahrscheinlich.

Trotz einer relativ guten initialen Ansprechrate zwischen 20-60% [150] auf die [^{131}I] mIBG-Therapie kommt es wenige Wochen nach Therapieende oft zu Rezidiven. Da mehrere Studien [122,185,304] zeigen konnten, dass mit einer gesteigerten radioaktiven Tumordosis ein gesteigerter Rückgang der Tumorgröße erzielt werden kann, ist eine Hochdosistherapie mit [^{131}I] mIBG durchaus indiziert. Limitiert v.a. durch die Knochenmarktoxizität, wurde in klinischen Studien bislang kaum mehr als 770 MBq/kg [^{131}I] mIBG eingesetzt, was einer Tumorabsorptionsdosis von bis zu 30500 cGy entspricht [185]. Durch

Blockade der extraneuronalen Katecholamintransporter und somit Schutz von gesundem Gewebe könnte man möglicherweise diese Dosis erhöhen. Damit können evtl. mehr Patienten eine Remission erreichen und diese auch längerfristig aufrechterhalten. Die Hoffnung liegt darin, mit einer höheren Tumorabsorptionsdosis das maligne Gewebe maximal zu zerstören und das tumorfreie Überleben bzw. die Gesamtüberlebenszeit zu erhöhen.

Eine höhere Dosis des radioaktiv markierten mIBGs wäre aber nicht nur in der Therapie sinnvoll. Auch in der Diagnostik könnte es Vorteile bringen. Parisi et al. fanden heraus, dass die Sensitivität der mIBG-Diagnostik dosisabhängig ist. In diesen Untersuchungen konnten mit therapeutischen Dosen von [¹²³I] mIBG 50% mehr Läsionen detektiert werden [208].

Ein Gemisch aus [¹³¹I]-markiertem und [¹²⁵I]-markiertem mIBG wäre ein ebenfalls vorstellbarer neuer Ansatz in der Therapie des Neuroblastoms und des Phäochromozytoms. Denn wie bereits in in-vitro Versuchen untersucht und in der Literatur diskutiert wurde, eignet sich [¹³¹I] mIBG nicht besonders gut zur Zerstörung von Mikrometastasen bzw. kleinen Tumoren und somit nicht als Einzelsubstanz zur kurativen Therapie [223]. [¹³¹I] ist ein γ -Strahler mit hoher Energie und großer Reichweite, die Areale in geringem Radius werden allerdings nicht ausreichend bestrahlt und daher nicht so gut zerstört [78,288]. [¹²⁵I] mIBG als Einzelsubstanz ist sicherlich auch nicht ausreichend, da es nur in einem geringen Radius strahlt und größere Tumore somit nicht zerstören kann [223]. Eine Kombination dieser weit- und kurzstrahlenden radioaktiven Iodide wäre sicherlich von Vorteil, um der unregelmäßigen Radioaktivitätsverteilung im inhomogenen Tumor mit unterdosierten Arealen entgegen zu wirken.

Um kleine Neuroblastome oder Phäochromozytome zu zerstören, könnte an Stelle des kurz strahlenden [¹²⁵I] mIBGs allerdings auch das an Benzylguanidin gebundene Astatin 211, das als α -Strahler eine sehr kurze Reichweite hat, zusammen mit [¹³¹I] mIBG verwendet werden [37,278].

Von großem Vorteil in der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms bzw. Phäochromozytoms wäre die Darstellung von Tumoren, die den NAT nicht oder

nur gering exprimieren. Da mIBG spezifisch über diesen neuronalen Katecholamintransporter aufgenommen wird, werden auch nur die Tumorzellen detektiert, die diese Transportsysteme besitzen. Zum Einen könnte laut Quellen in der Literatur [264,285,302] eine vermehrte Expression durch Interferon, Retinsäure, Kokain, Nerve growth factor (NGF) und Dexamethason erreicht werden. Jedoch besteht hierbei die Frage, ob der Vorteil einer eventuell vermehrten Tumordetektion auf Grund einer vermehrten NAT-Expression die Nebenwirkungen dieser Substanzen überwiegt.

Zum anderen wäre es aber auch denkbar, den kleinen Teil der Tumore, die neuronale Katecholamintransporter nicht exprimieren, mittels 2-[¹⁸F] FDG im PET darzustellen. Denn diese Substanz wird wie Glucose durch die gesteigerte Glykolyse vieler Tumorzellen vermehrt von diesen aufgenommen. Gerade weil das v.a. in aggressiven, weniger differenzierten Neuroblastomen und Phäochromozytomen passiert, die den NAT bzw. den evt. exprimierten DAT nicht besitzen und keine Katecholamine produzieren, könnte dieses Verfahren eine ideale Ergänzung zur bisherigen Diagnostik sein.

Anstelle von [¹²³I] mIBG, das über SPECT dargestellt wird, könnte auch 6-[¹⁸F] FDA eingesetzt werden, das im Gegensatz zu [¹²³I] mIBG außer über den NAT auch noch über den DAT aufgenommen wird. Da Neuroblastome und Phäochromozytome evt. auch DAT in geringer Menge exprimieren, könnte mit 6-[¹⁸F] FDA eine vermehrte Aufnahme von Radioaktivität und somit eine bessere Detektion der Tumorzellen erreicht werden. Die Inkorporation von 6-[¹⁸F] FDA in gesunde Zellen kann durch Blockierung der extraneuronalen Katecholamintransporter mittels spezifischer Inhibitoren (z.B. Corticosteron) wahrscheinlich weitgehend verhindert werden, da 6-[¹⁸F] FDA spezifisch über Katecholamintransporter aufgenommen wird.

Desweiteren könnte auf Grund der kurzen HWZ von [¹⁸F] (109 min) mit 2-[¹⁸F] FDG und 6-[¹⁸F] FDA innerhalb kurzer Zeitabstände eine kombinierte PET- und CT-Diagnostik durchgeführt werden, die sich ideal ergänzende Informationen erbringen sollte. Hierbei würde man zunächst 6-[¹⁸F] FDA und ca. 2-6h später 2-[¹⁸F] FDG applizieren, wobei die radioaktive Aufnahme mit dem

gleichen Gerät (PET) detektiert werden kann. Alternativ dazu könnte diese kombinierte Diagnostik auch mit 2-[¹⁸F] FDG und [¹²³I] mIBG erfolgen. Ein Nachteil ist hierbei allerdings, dass die Detektion der Radioaktivität mit zwei verschiedenen Geräten (PET und SPECT) stattfinden müsste. Da [¹⁸F] eine kürzere HWZ als [¹²³I] hat, sollte zuerst 2-[¹⁸F] FDG und dann [¹²³I] mIBG appliziert werden.

Neben der mIBG-Therapie, der Operation und der Strahlentherapie gehört auch die Chemotherapie zum Standard der therapeutischen Versorgung des Neuroblastoms. Das gegenwärtige Spektrum der Zytostatika beinhaltet u.a. Cisplatin, das in hoher Dosierung allerdings schädigend auf die Nieren wirkt. Kürzlich fanden Yonezawa et al. heraus, dass die Cisplatin-induzierte tubuläre Nephrotoxizität mit der OCT 2-Expression korreliert. Der Transport von Cisplatin in OCT 2-Zellen, und somit die Zytotoxizität, konnte durch die Inhibitoren Corticosteron und Cimetidin effektiv verringert werden [298].

Zur Hemmung der OCT 2 sind auch Ranitidin und Famotidin vorstellbar [28]. Laut Gründemann et al. wird die [³H] Katecholaminaufnahme über die OCT 2 von Decynium 22 > O-methylisoprenalin > Reserpin > Kokain gehemmt [98].

Durch Inhibition der extraneuronalen Katecholamintransporter sind nicht nur Verbesserungen in der Therapie und Diagnostik des Neuroblastoms und des Phäochromozytoms möglich. Durch Blockade der OCT 1+2 sind auch weitere klinische Anwendungsmöglichkeiten der spezifischen Hemmstoffe vorstellbar.

Bei Versuchen mit Knockout-Mäusen von Jonker et al. [131] zeigte sich 2001 bei OCT 1-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen eine um bis zu 85% geringere Anreicherung eines radioaktiv markierten organischen Kations (TEA) in der Leber und eine um 50% reduzierte Exkretion dieser Substanz in den Dünndarm. Über den OCT 1 werden aber nicht nur organische Kationen transportiert, sondern auch Pharmaka oder deren Metabolite. Durch eine spezifische Inhibition des OCT 1 mittels eines Hemmstoffes könnte somit eine geringere Aufnahme mancher Medikamente in die Leber erreicht werden. Dies wäre bei bereits bestehenden Leberschäden zum Schutz dieses Organes

sinnvoll. Auch eine Aufnahme von Pharmaka, die in der Leber zu toxischen Metaboliten verstoffwechselt werden, wie z.B. Paracetamol, könnte vermieden oder verringert werden. Wang et al. [286,287] fanden heraus, dass Biguanide über den OCT 1 in die Leber aufgenommen werden und dort durch Interaktionen eine Laktatazidose verursachen, die durch Kombination der Biguanide mit Inhibitoren des OCTs 1 evt. verhindert werden könnte. Eine spezifische Hemmung des OCTs 1 könnte laut Literatur [113] durch Prazosin erfolgen, das allerdings in geringem Maße auch den EMT hemmt.

OCT 2-defiziente Mäuse zeigten nahezu keinen Effekt auf die Pharmakokinetik von Tetraethylammonium (TEA) [132], so dass kein klinischer Nutzen in der alleinigen Inhibition des OCT 2 besteht. Bei Knockout-Mäusen, die weder den OCT 1 noch den OCT 2 exprimierten, erfolgte jedoch keine renale Sekretion von TEA in den Tubulus. Diese Substanz wurde nur noch über glomeruläre Filtration aus dem Organismus ausgeschieden, so dass die Plasmakonzentration von TEA deutlich erhöht war. Eine kombinierte Inhibition der OCT 1+2 könnte durch eine geringere renale Ausscheidung eventuell eine Reduktion der verabreichten Medikamentenkonzentration nach sich ziehen, was evt. geringere Nebenwirkungen zur Folge hätte. In der Literatur ist jedoch keine Substanz erwähnt, die ausschließlich OCT 1+2 blockiert. Decynium 22 inhibiert diese beiden Transporter zwar gut, allerdings hat diese Substanz zusätzliche eine um 10-fach höhere Hemmwirkung auf den EMT.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abbruzzese J. L., Madden T., Sugarman S. M., Ellis A. L., Loughlin S., Hess K. R., Newman R. A., Zwelling L. A., Raber M. N.** (1996) *Phase I clinical and plasma and cellular pharmacological study of topotecan without and with granulocyte colony-stimulating factor.* Clin Cancer Res; 2: 1489-1497.
2. **Abemayor E., Chang B., Sidell N.** (1990) *Effects of retinoic acid on the in vivo growth of human neuroblastoma cells.* Cancer Lett; 55: 1-5.
3. **Alexander F.** (2000) *Neuroblastoma.* Urol Clin North Am; 27: 383-392.
4. **Alvarado C. S., Faraj B. A., Kim T. H., Camp V. M., Bain R. P., Ragab A. H.** (1985) *Plasma dopa and catecholamines in the diagnosis and follow-up of children with neuroblastoma.* Am J Pediatr Hematol Oncol; 7: 221-227.
5. **Amenta F., Bronzetti E., Cantalamessa F., El-Assouad D., Felici L., Ricci A., Tayebati S. K.** (2001) *Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes.* J Neuroimmunol; 117: 133-142.
6. **Anlauf M., Schäfer M. K., Schwark T., von Wurmb-Schwark N., Brand V., Sipos B., Horny H. P., Parwaresch R., Hartschuh W., Eiden L. E., Kloppel G., Weihe E.** (2006) *Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT 2) expression in hematopoietic cells and in patients with systemic mastocytosis.* J Histochem Cytochem; 54: 201-213.
7. **Anton A. H., Greer M., Sayre D. F., Williams C. M.** (1967) *Dihydroxyphenylalanine secretion in a malignant pheochromocytoma.* Am J Med; 42: 469-475.
8. **August C., August K., Schröder S., Bahn H., Hinze R., Baba H. A., Kersting C., Bürger H.** (2004) *CGH and CD 44/MIB-1 immunohistochemistry are helpful to distinguish metastasized from nonmetastasized sporadic pheochromocytomas.* Mod Pathol; 17: 1119-1128.
9. **Averbuch S. D., Steakley C. S., Young R. C., Gelmann E. P., Goldstein D. S., Stull R., Keiser H. R.** (1988) *Malignant pheochromocytoma: effective treatment with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine.* Ann Intern Med; 109: 267-273.
10. **Axelrod J.** (1965) *The metabolism, storage, and release of catecholamines.* Recent Prog Horm Res; 21: 597-622.
11. **Bader J. L., Miller R. W.** (1979) *US cancer incidence and mortality in the first year of life.* Am J Dis Child; 133: 157-159.
12. **Barbacid M.** (1995) *Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors.* Ann N Y Acad Sci; 766: 442-458.
13. **Bast A., Haenen G. R., Doelman C. J.** (1991) *Oxidants and antioxidants: state of the art.* Am J Med; 91: 2S-13S.
14. **Baysal B. E., Ferrell R. E., Willett-Brozick J. E., Lawrence E. C., Myssiorek D., Bosch A., van der Mey A., Taschner P. E., Rubinstein**

- W. S., Myers E. N., Richard C. W., 3rd, Cornelisse C. J., Devilee P., Devlin B. (2000) *Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma*. Science; 287: 848-851.
15. **Beard J. L., Wiesinger J. A., Jones B. C.** (2006) *Cellular iron concentrations directly affect the expression levels of norepinephrine transporter in PC 12 cells and rat brain tissue*. Brain Res; 1092: 47-58.
16. **Beckwith J. B., Perrin E. V.** (1963) *In Situ Neuroblastomas: A Contribution To The Natural History Of Neural Crest Tumors*. Am J Pathol; 43: 1089-1104.
17. **Bell S., Parker L., Craft A. W., Dale G., McGill A. C., Seviour J., Cole M., Smith J.** (1994) *False positive results in a neuroblastoma screening programme*. Med Pediatr Oncol; 22: 181-186.
18. **Bestagno M., Guerra P., Puricelli G. P., Colombo L., Calculi G.** (1987) *Treatment of neuroblastoma with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine: the experience of an Italian Study Group*. Med Pediatr Oncol; 15: 203-204.
19. **Biedler J. L., Helson L., Spengler B. A.** (1973) *Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture*. Cancer Res; 33: 2643-2652.
20. **Biersack H. J., Ezziddin S., Risse J., Bender H., Palmedo H.** (2005) *Therapy with radioisotopes in oncology. Palliative and curative approaches*. Schmerz; 19: 9-17.
21. **Biocca S., Cattaneo A., Calissano P.** (1983) *A macromolecular structure favouring microtubule assembly in NGF-differentiated pheochromocytoma cells (PC 12)*. Embo J; 2: 643-648.
22. **Bodary S. C., McLean J. W.** (1990) *The integrin beta 1 subunit associates with the vitronectin receptor alpha v subunit to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line*. J Biol Chem; 265: 5938-5941.
23. **Boltze C., Heutling D., Lehnert H.** (2002) *Molecular pathogenesis of endocrine tumors*. Internist (Berl); 43: 157-173.
24. **Boltze C., Mundschenk J., Unger N., Schneider-Stock R., Peters B., Mawrin C., Hoang-Vu C., Roessner A., Lehnert H.** (2003) *Expression profile of the telomeric complex discriminates between benign and malignant pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab; 88: 4280-4286.
25. **Bonnet J. J., Costentin J.** (1986) *GBR 12783, a potent and selective inhibitor of dopamine uptake: biochemical studies in vivo and ex vivo*. Eur J Pharmacol; 121: 199-209.
26. **Bonnin F., Lumbroso J., Tenenbaum F., Hartmann O., Parmentier C.** (1994) *Refining interpretation of MIBG scans in children*. J Nucl Med; 35: 803-810.
27. **Borowsky B., Hoffman B. J.** (1995) *Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation*. Int Rev Neurobiol; 38: 139-199.
28. **Bourdet D. L., Pritchard J. B., Thakker D. R.** (2005) *Differential substrate and inhibitory activities of ranitidine and famotidine toward human organic cation transporter 1 (hOCT1; SLC22A1), hOCT2*

- (SLC22A2), and hOCT3 (SLC22A3). *J Pharmacol Exp Ther*; 315: 1288-1297.
29. **Bown N., Cotterill S., Lastowska M., O'Neill S., Pearson A. D., Plantaz D., Meddeb M., Danglot G., Brinkschmidt C., Christiansen H., Laureys G., Speleman F., Nicholson J., Bernheim A., Betts D. R., Vandesompele J., Van Roy N.** (1999) *Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma*. *N Engl J Med*; 340: 1954-1961.
30. **Bradshaw D. M., Arceci R. J.** (1998) *Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance*. *J Clin Oncol*; 16: 3674-3690.
31. **Breidert T., Spitzenberger F., Gründemann D., Schömig E.** (1998) *Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1)*. *Br J Pharmacol*; 125: 218-224.
32. **Brodeur G. M., Maris J. M., Yamashiro D. J., Hogarty M. D., White P. S.** (1997) *Biology and genetics of human neuroblastomas*. *J Pediatr Hematol Oncol*; 19: 93-101.
33. **Brodeur G. M., Nakagawara A., Yamashiro D. J., Ikegaki N., Liu X. G., Azar C. G., Lee C. P., Evans A. E.** (1997) *Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas*. *J Neurooncol*; 31: 49-55.
34. **Brodeur G. M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N. L., Castel V., Castelberry R. P., De Bernardi B., Evans A. E., Favrot M., Hedborg F., et al.** (1993) *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment*. *J Clin Oncol*; 11: 1466-1477.
35. **Brodeur G. M., Seeger R. C., Schwab M., Varmus H. E., Bishop J. M.** (1984) *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. *Science*; 224: 1121-1124.
36. **Brodeur G. M., Sekhon G., Goldstein M. N.** (1977) *Chromosomal aberrations in human neuroblastomas*. *Cancer*; 40: 2256-2263.
37. **Bruchelt G., Klingebiel T., Treuner J., Beck G., Lode H. N., Seitz G., Niethammer D.** (1995) *Radiolabeled meta-iodobenzylguanidine (mIBG) in diagnosis and therapy of neuroblastoma: Results from basic research (Review)*. *International Journal of Oncology*; 6: 705-712.
38. **Bryant J., Farmer J., Kessler L. J., Townsend R. R., Nathanson K. L.** (2003) *Pheochromocytoma: the expanding genetic differential diagnosis*. *J Natl Cancer Inst*; 95: 1196-1204.
39. **Candito M., Thyss A., Albertini M., Deville A., Politano S., Mariani R., Chambon P.** (1992) *Methylated catecholamine metabolites for diagnosis of neuroblastoma*. *Med Pediatr Oncol*; 20: 215-220.
40. **Carman C. T., Brashear R. E.** (1960) *Pheochromocytomas as an inherited abnormality. Report of the tenth affected kindred and review of the literature*. *N Engl J Med*; 263: 419-423.
41. **Carmichael S. W., Winkler H.** (1985) *The adrenal chromaffin cell*. *Sci Am*; 253: 40-49.
42. **Caron H., Pearson A.** (1998) *Neuroblastoma*. Hrsg.: Voute, Kalifa, Barrett: *Cancer in Children, Clinical Management*; Oxford Press:

43. **Caron H., van Sluis P., de Kraker J., Bokkerink J., Egeler M., Laureys G., Slater R., Westerveld A., Voute P. A., Versteeg R.** (1996) *Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma.* N Engl J Med; 334: 225-230.
44. **Cerutti P. A.** (1994) *Oxy-radicals and cancer.* Lancet; 344: 862-863.
45. **Chauvin F., Mathieu P., Frappaz D., Lasset C., Favrot M. C., Greffe J., Esteve J., Thiesse P., Combaret V., Chauvot P., Boschetti R., David L., Brunat-Mentigny M., Philip T.** (1997) *Screening for neuroblastoma in France: methodological aspects and preliminary observations.* Med Pediatr Oncol; 28: 81-91.
46. **Chen F., Kishida T., Yao M., Hustad T., Glavac D., Dean M., Gnarra J. R., Orcutt M. L., Duh F. M., Glenn G., et al.** (1995) *Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype.* Hum Mutat; 5: 66-75.
47. **Chiueh C. C., Zukowska-Grojec Z., Kirk K. L., Kopin I. J.** (1983) *6-Fluorocatecholamines as false adrenergic neurotransmitters.* J Pharmacol Exp Ther; 225: 529-533.
48. **Christiansen H., Sahin K., Berthold F., Hero B., Terpe H. J., Lampert F.** (1995) *Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma.* Eur J Cancer; 31A: 541-544.
49. **Clarke M. R., Weyant R. J., Watson C. G., Carty S. E.** (1998) *Prognostic markers in pheochromocytoma.* Hum Pathol; 29: 522-526.
50. **Cohn S. L., London W. B., Huang D., Katzenstein H. M., Salwen H. R., Reinhart T., Madafiglio J., Marshall G. M., Norris M. D., Haber M.** (2000) *MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN.* J Clin Oncol; 18: 3604-3613.
51. **Cottino F., Mussa G. C., Madon E., Favero A., Silvestro L., Grazia G.** (1987) *[¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine treatment in neuroblastoma: report of two cases.* Med Pediatr Oncol; 15: 216-219.
52. **Cubells J. F., Kim K. S., Baker H., Volpe B. T., Chung Y., Houpt T. A., Wessel T. C., Joh T. H.** (1995) *Differential in vivo regulation of mRNA encoding the norepinephrine transporter and tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla and locus ceruleus.* J Neurochem; 65: 502-509.
53. **Dahllof G., Borgstrom P., Lundell G., Jacobsson H., Kogner P.** (2001) *Severe oral mucositis after therapeutic administration of [¹³¹I] mIBG in a child with neuroblastoma.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 92: 420-423.
54. **Davis S., Rogers M. A., Pendergrass T. W.** (1987) *The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the United States.* Am J Epidemiol; 126: 1063-1074.
55. **Dresser M. J., Gray A. T., Giacomini K. M.** (2000) *Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1).* J Pharmacol Exp Ther; 292: 1146-1152.
56. **Edstrom Elder E., Hjelm Skog A. L., Hoog A., Hamberger B.** (2003) *The management of benign and malignant pheochromocytoma and abdominal paraganglioma.* Eur J Surg Oncol; 29: 278-283.

57. **Ehninger G., Klingebiel T., Kumbier I., Schuler U., Feine U., Treuner J., Waller H. D.** (1987) *Stability and pharmacokinetics of [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine in patients.* *Cancer Res*; 47: 6147-6149.
58. **Eisenhofer G.** (2001) *The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines.* *Pharmacol Ther*; 91: 35-62.
59. **Eisenhofer G., Bornstein S. R., Brouwers F. M., Cheung N. K., Dahia P. L., de Krijger R. R., Giordano T. J., Greene L. A., Goldstein D. S., Lehnert H., Manger W. M., Maris J. M., Neumann H. P., Pacak K., Shulkin B. L., Smith D. I., Tischler A. S., Young W. F., Jr.** (2004) *Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress.* *Endocr Relat Cancer*; 11: 423-436.
60. **Eisenhofer G., Huynh T. T., Pacak K., Brouwers F. M., Walther M. M., Linehan W. M., Munson P. J., Mannelli M., Goldstein D. S., Elkahoun A. G.** (2004) *Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome.* *Endocr Relat Cancer*; 11: 897-911.
61. **Eisenhofer G., McCarty R., Pacak K., Russ H., Schömig E.** (1996) *Disprocyonium 24, a novel inhibitor of the extraneuronal monoamine transporter, has potent effects on the inactivation of circulating noradrenaline and adrenaline in conscious rat.* *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; 354: 287-294.
62. **Endres C. J., Swaminathan S., DeJesus O. T., Sievert M., Ruoho A. E., Murali D., Rommelfanger S. G., Holden J. E.** (1997) *Affinities of dopamine analogs for monoamine granular and plasma membrane transporters: implications for PET dopamine studies.* *Life Sci*; 60: 2399-2406.
63. **Eng C., Clayton D., Schuffenecker I., Lenoir G., Cote G., Gagel R. F., van Amstel H. K., Lips C. J., Nishisho I., Takai S. I., Marsh D. J., Robinson B. G., Frank-Raue K., Raue F., Xue F., Noll W. W., Romei C., Pacini F., Fink M., Niederle B., Zedenius J., Nordenskjold M., Komminoth P., Hendy G. N., Mulligan L. M., et al.** (1996) *The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis.* *Jama*; 276: 1575-1579.
64. **Eng C., Maher E. R.** (1999) *Dominant genes and phakomatoses associated with multiple primary cancers.* Hrsg.: Neugut A. I., Robinson E., Meadows A. T.: *Multiple Primary Cancers*; Williams and Wilkins: Philadelphia, Lipincott.
65. **Esteban M. A., Maxwell P. H.** (2005) *HIF, a missing link between metabolism and cancer.* *Nat Med*; 11: 1047-1048.
66. **European Association of Nuclear Medicine** (2003) *Guidelines for [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine Therapy.* *Eur J Nucl Med*; 30: 23-26.
67. **Evans A. E., D'Angio G. J., Propert K., Anderson J., Hann H. W.** (1987) *Prognostic factor in neuroblastoma.* *Cancer*; 59: 1853-1859.

68. **Evans A. E., D'Angio G. J., Randolph J.** (1971) *A proposed staging for children with neuroblastoma.* *Children's cancer study group A.* *Cancer*; 27: 374-378.
69. **Favier J., Plouin P. F., Corvol P., Gasc J. M.** (2002) *Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors.* *Am J Pathol*; 161: 1235-1246.
70. **Fogh J.** (1978) *Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors.* *Natl Cancer Inst Monogr*: 5-9.
71. **Forth W., Henschler D., Rummel W.** (1987) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 5. Auflage; Bl. Wissenschaftsverlag: Mannheim, Wien, Zürich.
72. **Fritz L.** (1986) *Efflux von [³H] Noradrenalin aus Rattenphäochromozytomzellen (PC-12 Zellen).* Unter Anleitung von PD Dr. rer. nat. H. Bönisch; Medizinische Fakultät, Bayrische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
73. **Garaventa A., Bellagamba O., Lo Piccolo M. S., Milanaccio C., Lanino E., Bertolazzi L., Villavecchia G. P., Cabria M., Scopinaro G., Claudiani F., De Bernardi B.** (1999) [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine ([¹³¹I] mIBG) therapy for residual neuroblastoma: a mono-institutional experience with 43 patients. *Br J Cancer*; 81: 1378-1384.
74. **Garaventa A., Gambini C., Villavecchia G., Di Cataldo A., Bertolazzi L., Pizzitola M. R., De Bernardi B., Haupt R.** (2003) *Second malignancies in children with neuroblastoma after combined treatment with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine.* *Cancer*; 97: 1332-1338.
75. **Garaventa A., Guerra P., Arrighini A., Bertolazzi L., Bestagno M., De Bernardi B., Lanino E., Villavecchia G. P., Claudiani F.** (1991) *Treatment of advanced neuroblastoma with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine.* *Cancer*; 67: 922-928.
76. **Garnett E. S., Firnau G., Nahmias C.** (1983) *Dopamine visualized in the basal ganglia of living man.* *Nature*; 305: 137-138.
77. **Gasnier B., Roisin M. P., Scherman D., Coornaert S., Desplanches G., Henry J. P.** (1986) *Uptake of meta-Iodobenzylguanidine by bovine chromaffin granule membranes.* *Mol Pharmacol*; 29: 275-280.
78. **Gaze M. N., Mairs R. J., Boyack S. M., Wheldon T. E., Barrett A.** (1992) [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine therapy in neuroblastoma spheroids of different sizes. *Br J Cancer*; 66: 1048-1052.
79. **Gelfand M. J.** (1993) *meta-Iodobenzylguanidine in children.* *Semin Nucl Med*; 23: 231-242.
80. **Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie** (1997) *Neuroblastomstudie NB97.*
81. **Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie** (2004) *Neuroblastomstudie NB04.*
82. **Gilbert J.** (1984) *Human neuroblastoma and abnormalities of chromosome 1 and 17.* *Cancer Res*; 44: 5444-5449.
83. **Gimm O., Armanios M., Dziema H., Neumann H. P., Eng C.** (2000) *Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial*

- complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. Cancer Res; 60: 6822-6825.*
84. **Giordano T. J.** (2003) *Gene expression profiling of endocrine tumors using DNA microarrays: progress and promise. Endocr Pathol; 14: 107-116.*
85. **Giros B., el Mestikawy S., Bertrand L., Caron M. G.** (1991) *Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. FEBS Lett; 295: 149-154.*
86. **Glowniak J. V., Kilty J. E., Amara S. G., Hoffman B. J., Turner F. E.** (1993) *Evaluation of meta-Iodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine and serotonin transporters. J Nucl Med; 34: 1140-1146.*
87. **Godard T., Deslandes E., Sichel F., Poul J. M., Gauduchon P.** (2002) *Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. Mutat Res; 520: 47-56.*
88. **Goldstein D. S., Stull R., Eisenhofer G., Sisson J. C., Weder A., Averbuch S. D., Keiser H. R.** (1986) *Plasma 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) and catecholamines in neuroblastoma or pheochromocytoma. Ann Intern Med; 105: 887-888.*
89. **Goldstein R. E., O'Neill J. A., Jr., Holcomb G. W., 3rd, Morgan W. M., 3rd, Neblett W. W., 3rd, Oates J. A., Brown N., Nadeau J., Smith B., Page D. L., Abumrad N. N., Scott H. W., Jr.** (1999) *Clinical experience over 48 years with pheochromocytoma. Ann Surg; 229: 755-764; discussion 764-756.*
90. **Goodman, Gilman`s** (2006) *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* eleventh; McGraw-Hill: New York.
91. **Gorboulev V., Ulzheimer J. C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A. E., Koepsell H.** (1997) *Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. DNA Cell Biol; 16: 871-881.*
92. **Gow K. W., Lensing S., Hill D. A., Krasin M. J., McCarville M. B., Rai S. N., Zacher M., Spunt S. L., Strickland D. K., Hudson M. M.** (2003) *Thyroid carcinoma presenting in childhood or after treatment of childhood malignancies: An institutional experience and review of the literature. J Pediatr Surg; 38: 1574-1580.*
93. **Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R.** (1977) *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol; 36: 59-74.*
94. **Greene L. A., Tischler A. S.** (1976) *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A; 73: 2424-2428.*
95. **Gründemann D., Babin-Ebell J., Martel F., Ording N., Schmidt A., Schömig E.** (1997) *Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. J Biol Chem; 272: 10408-10413.*
96. **Gründemann D., Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M., Koepsell H.** (1994) *Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. Nature; 372: 549-552.*

97. **Gründemann D., Koschker A. C., Haag C., Honold C., Zimmermann T., Schömig E.** (2002) *Activation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) from rat expressed in 293 cells.* Br J Pharmacol; 137: 910-918.
98. **Gründemann D., Koster S., Kiefer N., Breidert T., Engelhardt M., Spitzenberger F., Obermüller N., Schömig E.** (1998) *Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2.* J Biol Chem; 273: 30915-30920.
99. **Gründemann D., Liebich G., Kiefer N., Koster S., Schömig E.** (1999) *Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters.* Mol Pharmacol; 56: 1-10.
100. **Gründemann D., Schechinger B., Rappold G. A., Schömig E.** (1998) *Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter.* Nat Neurosci; 1: 349-351.
101. **Guerreau D., Thedrez P., Fritsch P., Saccavini J. C., Metivier H., Nolibe D., Masse R., Coornaert S., Chatal J. F.** (1990) *In vitro therapeutic targeting of neuroblastomas using [¹²⁵I]-labelled meta-Iodobenzylguanidine.* Int J Cancer; 45: 1164-1168.
102. **Gurney J. G., Severson R. K., Davis S., Robison L. L.** (1995) *Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type.* Cancer; 75: 2186-2195.
103. **Gutjahr P.** (1999) *Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie.* Deutscher Ärzte-Verlag: Köln.
104. **Haag C., Berkels R., Gründemann D., Lazar A., Taubert D., Schömig E.** (2004) *The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain.* J Neurochem; 88: 291-297.
105. **Hachitanda Y., Ishimoto K., Hata J., Shimada H.** (1994) *One hundred neuroblastomas detected through a mass screening system in Japan.* Cancer; 74: 3223-3226.
106. **Hägele W.** (1989) *Wertigkeit der Szintigraphie mit meta-Iodobenzylguanidin (mIBG) in der Diagnostik des Neuroblastoms.* Unter Anleitung von Prof. Dr. med. U. Feine; Medizinische Fakultät, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
107. **Halliwell B., Gutteridge J. M. C.** (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press: Oxford.
108. **Handgretinger R., Anderson K., Lang P., Dopfer R., Klingebiel T., Schrappe M., Reuland P., Gillies S. D., Reisfeld R. A., Niethammer D.** (1995) *A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma.* Eur J Cancer; 31A: 261-267.
109. **Hardwick J. C., Ehrlich Y. H., Hendley E. D.** (1989) *Extracellular ATP stimulates norepinephrine uptake in PC 12 cells.* J Neurochem; 53: 1512-1518.
110. **Harms D.** (1984) *Pathologische Anatomie der soliden Tumoren des Kindesalters unter Berücksichtigung ihres biologischen Verhaltens.* Springer Verlag: Berlin - Heidelberg - New York.

111. **Hartmann O., Scopinaro M., Tournade M. F., Sarrazin D., Lemerle J.** (1983) *Neuroblastomas treated at the Gustave-Roussy Institute from 1975 to 1979. 173 cases.* Arch Fr Pediatr; 40: 15-21.
112. **Hashimoto T., Koizumi K., Nishina T., Abe K.** (2003) *Clinical usefulness of [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine scintigraphy for patients with neuroblastoma detected by a mass screening survey.* Ann Nucl Med; 17: 633-640.
113. **Hayer-Zillgen M., Bruss M., Böhnisch H.** (2002) *Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3.* Br J Pharmacol; 136: 829-836.
114. **Heikkila R. E., Manzano L.** (1984) *Behavioral properties of GBR-12909, GBR 13069 and GBR 13098: specific inhibitors of dopamine uptake.* Eur J Pharmacol; 103: 241-248.
115. **Helson L., Johnson G. A., Smith R.** (1980) *DOPA metabolism in neuroblastoma.* Med Pediatr Oncol; 8: 317-322.
116. **Hero B., Christiansen H.** (2004) *Neuroblastom.* Hrsg.: Hiddemann W., Huber H., Bartram C. R.: Die Onkologie, Teil 2; Springer Verlag: Berlin - Heidelberg - New York.
117. **Hibi S., Todo S., Imashuku S., Miyazaki T.** (1987) *[¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with neuroblastoma.* Pediatr Radiol; 17: 308-313.
118. **Hiyama E., Hiyama K., Ohtsu K., Yamaoka H., Fukuba I., Matsuura Y., Yokoyama T.** (2001) *Biological characteristics of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1.* Med Pediatr Oncol; 36: 67-74.
119. **Hiyama E., Hiyama K., Ohtsu K., Yamaoka H., Ichikawa T., Shay J. W., Yokoyama T.** (1997) *Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour?* Eur J Cancer; 33: 1932-1936.
120. **Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T., Fukuba I., Yamaoka H., Shay J. W., Matsuura Y.** (1999) *Rapid detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma.* Clin Cancer Res; 5: 601-609.
121. **Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T., Matsuura Y., Piatyszek M. A., Shay J. W.** (1995) *Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes.* Nat Med; 1: 249-255.
122. **Howard J. P., Maris J. M., Kersun L. S., Huberty J. P., Cheng S. C., Hawkins R. A., Matthay K. K.** (2005) *Tumor response and toxicity with multiple infusions of high dose [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine for refractory neuroblastoma.* Pediatr Blood Cancer; 44: 232-239.
123. **Hughes M., Marsden H. B., Palmer M. K.** (1974) *Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging.* Cancer; 34: 1706-1711.
124. **Hutchinson R. J., Sisson J. C., Shapiro B., Miser J. S., Normole D., Shulkin B. L., Francis I. R., Zasadny K., Carey J. E., Johnson J. W., et al.** (1992) *[¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine treatment in patients with refractory advanced neuroblastoma.* Am J Clin Oncol; 15: 226-232.
125. **Iehara T., Hosoi H., Akazawa K., Matsumoto Y., Yamamoto K., Suita S., Tajiri T., Kusafuka T., Hiyama E., Kaneko M., Sasaki F., Sugimoto**

- T., Sawada T. (2006) *MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening*. Br J Cancer; 94: 1510-1515.
126. Ilias I., Yu J., Carrasquillo J. A., Chen C. C., Eisenhofer G., Whatley M., McElroy B., Pacak K. (2003) *Superiority of 6-[¹⁸F]-fluorodopamine positron emission tomography versus [¹³¹I]-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in the localization of metastatic pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab; 88: 4083-4087.
127. Iversen L. L. (1965) *The Uptake Of Adrenaline By The Rat Isolated Heart*. Br J Pharmacol Chemother; 24: 387-394.
128. Januszewicz W., Wocial B., Januszewicz A., Gryglas P., Prejbisz A. (2001) *Dopamine and dopa urinary excretion in patients with pheochromocytoma-diagnostic implications*. Blood Press; 10: 212-216.
129. John H., Ziegler W. H., Hauri D., Jäger P. (1999) *Pheochromocytomas: can malignant potential be predicted?* Urology; 53: 679-683.
130. Jonker J. W., Schinkel A. H. (2004) *Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3)*. J Pharmacol Exp Ther; 308: 2-9.
131. Jonker J. W., Wagenaar E., Mol C. A., Buitelaar M., Koepsell H., Smit J. W., Schinkel A. H. (2001) *Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (OCT1[Slc22a1]) gene*. Mol Cell Biol; 21: 5471-5477.
132. Jonker J. W., Wagenaar E., Van Eijl S., Schinkel A. H. (2003) *Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations*. Mol Cell Biol; 23: 7902-7908.
133. **Kinderkrebsregister 2004**, www.kinderkrebsregister.de.
134. Kadota T., Yamaai T., Saito Y., Akita Y., Kawashima S., Moroi K., Inagaki N., Kadota K. (1996) *Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells*. J Histochem Cytochem; 44: 989-996.
135. Kagedal B., Goldstein D. S. (1988) *Catecholamines and their metabolites*. J Chromatogr; 429: 177-233.
136. Kalashnikov S. A., Trofimova V. M., Veresova A. A. (1979) *Prognostic significance of the morphological signs of the malignancy of a pheochromocytoma*. Vopr Onkol; 25: 47-51.
137. Kancherla R. R., Nair J. S., Ahmed T., Durrani H., Seiter K., Mannancheril A., Tse-Dinh Y. C. (2001) *Evaluation of topotecan and etoposide for non-Hodgkin lymphoma: correlation of topoisomerase-DNA complex formation with clinical response*. Cancer; 91: 463-471.
138. Kang H. J., Song I. S., Shin H. J., Kim W. Y., Lee C. H., Shim J. C., Zhou H. H., Lee S. S., Shin J. G. (2007) *Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters (hOCTs) in a Korean population*. Drug Metab Dispos.
139. Karhunen T., Tilgmann C., Ulmanen I., Julkunen I., Panula P. (1994) *Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues*. J Histochem Cytochem; 42: 1079-1090.

140. **Kaufman S.** (1985) *Regulatory properties of phenylalanine, tyrosine and tryptophan hydroxylases.* Biochem Soc Trans; 13: 433-436.
141. **Kekuda R., Prasad P. D., Wu X., Wang H., Fei Y. J., Leibach F. H., Ganapathy V.** (1998) *Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta.* J Biol Chem; 273: 15971-15979.
142. **Kerbl R., Urban C., Starz I., Ambros I. M., Strehl S., Kovar H., Gadner H., Ambros P. F.** (1993) *Neuroblastoma with N-myc amplification detected by urine: mass screening in infants after the sixth month of life.* Med Pediatr Oncol; 21: 625-626.
143. **Kerbl R., Urban C. E., Ambros I. M., Dornbusch H. J., Schwinger W., Lackner H., Ladenstein R., Strenger V., Gadner H., Ambros P. F.** (2003) *Neuroblastoma mass screening in late infancy: insights into the biology of neuroblastic tumors.* J Clin Oncol; 21: 4228-4234.
144. **Khorram-Manesh A., Ahlman H., Jansson S., Nilsson O.** (2002) *N-cadherin expression in adrenal tumors: upregulation in malignant pheochromocytoma and downregulation in adrenocortical carcinoma.* Endocr Pathol; 13: 99-110.
145. **Kimmig B., Brandeis W. E., Eisenhut M., Bubeck B., Hermann H. J., zum Winkel K.** (1984) *Scintigraphy of a neuroblastoma with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine.* J Nucl Med; 25: 773-775.
146. **Kimura N., Sasano N.** (1990) *A comparative study between malignant and benign pheochromocytoma using morphometry, cytophotometry, and immunohistochemistry.* Hrsg.: Lechago J., Kameya T.: Endocrine Pathology Update; Field & Wood: New York.
147. **Kippenberger A. G., Palmer D. J., Comer A. M., Lipski J., Burton L. D., Christie D. L.** (1999) *Localization of the noradrenaline transporter in rat adrenal medulla and PC 12 cells: evidence for its association with secretory granules in PC12 cells.* J Neurochem; 73: 1024-1032.
148. **Kirk K. L., Cantacuzene D., Nimitkitpaisan Y., McCulloh D., Padgett W. L., Daly J. W., Creveling C. R.** (1979) *Synthesis and biological properties of 2-, 5-, and 6-fluoronorepinephrines.* J Med Chem; 22: 1493-1497.
149. **Klingebiel T., Bader P., Bares R., Beck J., Hero B., Jürgens H., Lang P., Niethammer D., Rath B., Handgretinger R.** (1998) *Treatment of neuroblastoma stage 4 with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine, high-dose chemotherapy and immunotherapy. A pilot study.* Eur J Cancer; 34: 1398-1402.
150. **Klingebiel T., Berthold F., Treuner J., Schwabe D., Fischer M., Feine U., Maul F. D., Waters W., Wehinger H., Niethammer D.** (1991) *meta-Iodobenzylguanidine (mIBG) in treatment of 47 patients with neuroblastoma: results of the German Neuroblastoma Trial.* Med Pediatr Oncol; 19: 84-88.
151. **Koepsell H., Gorboulev V., Arndt P.** (1999) *Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney.* J Membr Biol; 167: 103-117.
152. **Kolomecki K., Stepien H., Bartos M., Kuzdak K.** (2001) *Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours.* Endocr Regul; 35: 9-16.

153. **Koyama T., Kanadani T., Tanaka M., Nakahara S., Yamadori I.** (1999) *A case of Down's syndrome associated with progressive extradural neuroblastoma.* *Pediatr Surg Int*; 15: 373-375.
154. **Kushner B. H.** (2004) *Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies.* *J Nucl Med*; 45: 1172-1188.
155. **Kushner B. H., Gilbert F., Helson L.** (1986) *Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations.* *Cancer*; 57: 1887-1893.
156. **Lambert S. R., Yang L. L., Stone C.** (2000) *Tonic pupil associated with congenital neuroblastoma, Hirschsprung disease, and central hypoventilation syndrome.* *Am J Ophthalmol*; 130: 238-240.
157. **Lastowska M., Roberts P., Pearson A. D., Lewis I., Wolstenholme J., Bown N.** (1997) *Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas.* *Genes Chromosomes Cancer*; 19: 143-149.
158. **Laug W. E., Siegel S. E., Shaw K. N., Landing B., Baptista J., Gutenstein M.** (1978) *Initial urinary catecholamine metabolite concentrations and prognosis in neuroblastoma.* *Pediatrics*; 62: 77-83.
159. **Lehnert H., Hahn K., Dralle H.** (2002) *Benign and malignant pheochromocytoma.* *Internist (Berl)*; 43: 196, 199-209.
160. **Lenders J. W., Pacak K., Walther M. M., Linehan W. M., Mannelli M., Friberg P., Keiser H. R., Goldstein D. S., Eisenhofer G.** (2002) *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best?* *Jama*; 287: 1427-1434.
161. **Leventhal B. G.** (1987) *Neuroblastoma.* Hrsg.: Behrman R. E., Vaughan V. C., Nelson W. E.: *Nelson Textbook of Pediatrics*; 13.; Saunders, W.B.: Philadelphia.
162. **Levine M.** (1986) *Ascorbic acid specifically enhances dopamine beta-monooxygenase activity in resting and stimulated chromaffin cells.* *J Biol Chem*; 261: 7347-7356.
163. **Levine M., Morita K.** (1985) *Ascorbic acid in endocrine systems.* *Vitam Horm*; 42: 1-64.
164. **Li L. B., Chen N., Ramamoorthy S., Chi L., Cui X. N., Wang L. C., Reith M. E.** (2004) *The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter.* *J Biol Chem*; 279: 21012-21020.
165. **Linnoila R. I., Keiser H. R., Steinberg S. M., Lack E. E.** (1990) *Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas: clinicopathologic study of 120 cases including unusual histologic features.* *Hum Pathol*; 21: 1168-1180.
166. **Lode H. N., Bruchelt G., Seitz G., Gebhardt S., Gekeler V., Niethammer D., Beck J.** (1995) *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastoma cell lines: correlations to meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression.* *Eur J Cancer*; 31A: 586-590.
167. **Lode H. N., Handgretinger R., Schürmann U., Seitz G., Klingebiel T., Niethammer D., Beck J.** (1997) *Detection of neuroblastoma cells in CD34+ selected peripheral stem cells using a combination of tyrosine*

- hydroxylase nested RT-PCR and anti-ganglioside GD2 immunocytochemistry. *Eur J Cancer*; 33: 2024-2030.
168. **Loesberg C., Van Rooij H., Nooijen W. J., Meijer A. J., Smets L. A.** (1990) *Impaired mitochondrial respiration and stimulated glycolysis by meta-iodobenzylguanidine (mIBG)*. *Int J Cancer*; 46: 276-281.
169. **Lumbroso J., Guermazi F., Hartmann O., Coornaert S., Rabarison Y., Lemerle J., Parmentier C.** (1988) *Sensitivity and specificity of meta-iodobenzylguanidine (mIBG) scintigraphy in the evaluation of neuroblastoma: analysis of 115 cases*. *Bull Cancer*; 75: 97-106.
170. **Lumbroso J. D., Guermazi F., Hartmann O., Coornaert S., Rabarison Y., Leclere J. G., Couanet D., Bayle C., Caillaud J. M., Lemerle J., et al.** (1988) *meta-iodobenzylguanidine (mIBG) scans in neuroblastoma: sensitivity and specificity, a review of 115 scans*. *Prog Clin Biol Res*; 271: 689-705.
171. **Maines L. W., Keck B. J., Smith J. E., Lakoski J. M.** (1999) *Corticosterone regulation of serotonin transporter and 5-HT_{1A} receptor expression in the aging brain*. *Synapse*; 32: 58-66.
172. **Mamede M., Carrasquillo J. A., Chen C. C., Del Corral P., Whatley M., Ilias I., Ayala A., Pacak K.** (2006) *Discordant localization of 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in 6-[¹⁸F]-fluorodopamine- and [¹²³I] meta-iodobenzylguanidine-negative metastatic pheochromocytoma sites*. *Nucl Med Commun*; 27: 31-36.
173. **Mandela P., Ordway G. A.** (2006) *The norepinephrine transporter and its regulation*. *J Neurochem*; 97: 310-333.
174. **Manger W. M., Gifford R. W.** (1995) *Pheochromocytoma: A clinical overview*. Hrsg.: Laragh J. H., Brenner B. N.: Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management.; 2nd; Raven Press: New York.
175. **Mangner T. J., Tobes M. C., Wieland D. W., Sisson J. C., Shapiro B.** (1986) *Metabolism of [¹³¹I] meta-iodobenzylguanidine in patients with metastatic pheochromocytoma*. *J Nucl Med*; 27: 37-44.
176. **Marino F., Cosentino M., Bombelli R., Ferrari M., Lecchini S., Frigo G.** (1999) *Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells*. *Exp Hematol*; 27: 489-495.
177. **Maris J. M., Chatten J., Meadows A. T., Biegel J. A., Brodeur G. M.** (1997) *Familial neuroblastoma: a three-generation pedigree and a further association with Hirschsprung disease*. *Med Pediatr Oncol*; 28: 1-5.
178. **Maris J. M., Matthay K. K.** (1999) *Molecular biology of neuroblastoma*. *J Clin Oncol*; 17: 2264-2279.
179. **Maris J. M., Weiss M. J., Guo C., Gerbing R. B., Stram D. O., White P. S., Hogarty M. D., Sulman E. P., Thompson P. M., Lukens J. N., Matthay K. K., Seeger R. C., Brodeur G. M.** (2000) *Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study*. *J Clin Oncol*; 18: 1888-1899.
180. **Martel F., Keating E., Calhau C., Gründemann D., Schömig E., Azevedo I.** (2001) *Regulation of human extraneuronal monoamine*

- transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; 364: 487-495.*
181. **Martel F., Vetter T., Russ H., Gründemann D., Azevedo I., Koepsell H., Schömig E.** (1996) *Transport of small organic cations in the rat liver. The role of the organic cation transporter OCT1. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; 354: 320-326.*
182. **Mattern M. R., Mong S. M., Bartus H. F., Mirabelli C. K., Crooke S. T., Johnson R. K.** (1987) *Relationship between the intracellular effects of camptothecin and the inhibition of DNA topoisomerase I in cultured L1210 cells. Cancer Res; 47: 1793-1798.*
183. **Matthay K. K.** (2000) *MYCN expression in neuroblastoma: A mixed message? J Clin Oncol; 18: 3591-3594.*
184. **Matthay K. K., DeSantes K., Hasegawa B., Huberty J., Hattner R. S., Ablin A., Reynolds C. P., Seeger R. C., Weinberg V. K., Price D.** (1998) *Phase I dose escalation of [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine with autologous bone marrow support in refractory neuroblastoma. J Clin Oncol; 16: 229-236.*
185. **Matthay K. K., Panina C., Huberty J., Price D., Glidden D. V., Tang H. R., Hawkins R. A., Veatch J., Hasegawa B.** (2001) *Correlation of tumor and whole-body dosimetry with tumor response and toxicity in refractory neuroblastoma treated with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine. J Nucl Med; 42: 1713-1721.*
186. **Maurer-Spurej E.** (2005) *Serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular diseases: a platelet connection. Cell Mol Life Sci; 62: 159-170.*
187. **McEwan A. J., Shapiro B., Sisson J. C., Beierwaltes W. H., Ackery D. M.** (1985) *Radio-iodobenzylguanidine for the scintigraphic location and therapy of adrenergic tumors. Semin Nucl Med; 15: 132-153.*
188. **McNeil A. R., Blok B. H., Koelmeyer T. D., Burke M. P., Hilton J. M.** (2000) *Phaeochromocytomas discovered during coronial autopsies in Sydney, Melbourne and Auckland. Aust N Z J Med; 30: 648-652.*
189. **Miller R. W., Young J. L., Jr., Novakovic B.** (1995) *Childhood cancer. Cancer; 75: 395-405.*
190. **Mühlbauer B., Luippold G., Vallon V., Spitzenberger F., Russ H., Osswald H., Schömig E.** (1997) *Disprocynium 24 induces a dopamine-independent, eukaliuric diuresis and natriuresis in the anaesthetized rat. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; 356: 846-849.*
191. **Mulholland P. J., Self R. L., Hensley A. K., Little H. J., Littleton J. M., Prendergast M. A.** (2006) *A 24 h corticosterone exposure exacerbates excitotoxic insult in rat hippocampal slice cultures independently of glucocorticoid receptor activation or protein synthesis. Brain Res; 1082: 165-172.*
192. **Mulligan L. M., Kwok J. B., Healey C. S., Elsdon M. J., Eng C., Gardner E., Love D. R., Mole S. E., Moore J. K., Papi L., et al.** (1993) *Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. Nature; 363: 458-460.*

193. **Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S.** (1964) *Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step In Norepinephrine Biosynthesis.* J Biol Chem; 239: 2910-2917.
194. **Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda N. J., Azar C. G., Cantor A. B., Brodeur G. M.** (1993) *Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma.* N Engl J Med; 328: 847-854.
195. **Nakagawara A., Arima M., Azar C. G., Scavarda N. J., Brodeur G. M.** (1992) *Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas.* Cancer Res; 52: 1364-1368.
196. **Nakagawara A., Ikeda K., Tasaka H.** (1988) *Dopaminergic neuroblastoma as a poor prognostic subgroup.* J Pediatr Surg; 23: 346-349.
197. **Nakajo M., Shapiro B., Glowniak J., Sisson J. C., Beierwaltes W. H.** (1984) *Inverse relationship between cardiac accumulation of [¹³¹I] meta-iodobenzylguanidine and circulating catecholamines in suspected pheochromocytoma.* J Nucl Med; 24: 1127-1134.
198. **Neumann D. R., Basile K. E., Bravo E. L., Chen E. Q., Go R. T.** (1996) *Malignant pheochromocytoma of the anterior mediastinum: PET findings with [¹⁸F] FDG and 82Rb.* J Comput Assist Tomogr; 20: 312-316.
199. **Neumann H. P., Berger D. P., Sigmund G., Blum U., Schmidt D., Parmer R. J., Volk B., Kirste G.** (1993) *Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and von Hippel-Lindau disease.* N Engl J Med; 329: 1531-1538.
200. **Neumann K., Langer R.** (1997) *Imaging methods in diagnosis of pheochromocytoma.* Zentralbl Chir; 122: 438-442.
201. **Noskova V., Bottalico B., Olsson H., Ehniger A., Pilka R., Casslen B., Hansson S. R.** (2006) *Histamine uptake by human endometrial cells expressing the organic cation transporter EMT and the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT 2).* Mol Hum Reprod; 27.
202. **Okuda M., Saito H., Urakami Y., Takano M., Inui K.** (1996) *cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2.* Biochem Biophys Res Commun; 224: 500-507.
203. **Olivier P., Colarinha P., Fettich J., Fischer S., Frokier J., Giammarile F., Gordon I., Hahn K., Kabasakal L., Mann M., Mitjavila M., Piepsz A., Porn U., Sixt R., van Velzen J.** (2003) *Guidelines for radioiodinated mIBG scintigraphy in children.* Eur J Nucl Med Mol Imaging; 30: B45-50.
204. **Owens M. J., Ballenger C. A., Knight D. L., Nemeroff C. B.** (1996) *Platelet 5-hydroxytryptamine (5-HT) transporter and 5-HT_{2A} receptor binding after chronic hypercorticotesteronemia, (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane administration or neurotoxin-induced depletion of central nervous system 5-HT in the rat.* J Pharmacol Exp Ther; 278: 1040-1049.
205. **Pacak K., Eisenhofer G., Carrasquillo J. A., Chen C. C., Li S. T., Goldstein D. S.** (2001) *6-[¹⁸F]fluorodopamine positron emission tomographic (PET) scanning for diagnostic localization of pheochromocytoma.* Hypertension; 38: 6-8.

206. **Pacholczyk T., Blakely R. D., Amara S. G.** (1991) *Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter.* Nature; 350: 350-354.
207. **Paltiel H. J., Gelfand M. J., Elgazzar A. H., Washburn L. C., Harris R. E., Masters P. R., Golsch G. J.** (1994) *Neural crest tumors: [¹²³I] meta-iodobenzylguanidine imaging in children.* Radiology; 190: 117-121.
208. **Parisi M. T., Matthay K. K., Huberty J. P., Hattner R. S.** (1992) *Neuroblastoma: dose-related sensitivity of mIBG scanning in detection.* Radiology; 184: 463-467.
209. **Patel A., Uhl G., Kuhar M. J.** (1993) *Species differences in dopamine transporters: postmortem changes and glycosylation differences.* J Neurochem; 61: 496-500.
210. **Piepsz A., Hahn K., Roca I., Ciofetta G., Toth G., Gordon I., Kolinska J., Gwidlet J.** (1990) *A radiopharmaceuticals schedule for imaging in paediatrics. Paediatric Task Group European Association Nuclear Medicine.* Eur J Nucl Med; 17: 127-129.
211. **Pommier Y., Jenkins J., Kohlhagen G., Leteurtre F.** (1995) *DNA recombinase activity of eukaryotic DNA topoisomerase I; effects of camptothecin and other inhibitors.* Mutat Res; 337: 135-145.
212. **Poremba C., Hero B., Heine B., Scheel C., Schäfer K. L., Christiansen H., Berthold F., Kneif S., Stein H., Jürgens H., Böcker W., Dockhorn-Dworniczak B.** (2000) *Telomerase is a strong indicator for assessing the proneness to progression in neuroblastomas.* Med Pediatr Oncol; 35: 651-655.
213. **Poremba C., Willenbring H., Hero B., Christiansen H., Schäfer K. L., Brinkschmidt C., Jürgens H., Böcker W., Dockhorn-Dworniczak B.** (1999) *Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis.* Ann Oncol; 10: 715-721.
214. **Powell J. E., Esteve J., Mann J. R., Parker L., Frappaz D., Michaelis J., Kerbl R., Mutz I. D., Stiller C. A.** (1998) *Neuroblastoma in Europe: differences in the pattern of disease in the UK. SENSE. Study group for the Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe.* Lancet; 352: 682-687.
215. **Pritchard J., Hickman J. A.** (1994) *Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously?* Lancet; 344: 869-870.
216. **Ramamoorthy S., Prasad P. D., Kulanthaivel P., Leibach F. H., Blakely R. D., Ganapathy V.** (1993) *Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast.* Biochemistry; 32: 1346-1353.
217. **Reynolds C. P., Zuo J. J., Kim N. W., Wang H., Lukens J. N., Matthay K. K., Seeger R. C.** (1997) *Telomerase expression in primary neuroblastomas.* Eur J Cancer; 33: 1929-1931.
218. **Ricardi V. M.** (1981) *Von Recklinghausen neurofibromatosis.* N Engl J Med; 305: 1617-1627.
219. **Ross R. A., Spengler B. A., Biedler J. L.** (1983) *Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells.* J Natl Cancer Inst; 71: 741-747.

220. **Rubie H., Delattre O., Hartmann O., Combaret V., Michon J., Benard J., Peyroulet M. C., Plantaz D., Coze C., Chastagner P., Baranzelli M. C., Frappaz D., Lemerle J., Sommelet D.** (1997) *Loss of chromosome 1p may have a prognostic value in localised neuroblastoma: results of the French NBL 90 Study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique (SFOP).* Eur J Cancer; 33: 1917-1922.
221. **Rufini V., Giordano A., Di Giuda D., Petrone A., Deb G., De Sio L., Donfrancesco A., Troncone L.** (1995) *[¹²³I] meta-Iodobenzylguanidine scintigraphy in neuroblastoma: a comparison between planar and SPECT imaging.* Q J Nucl Med; 39: 25-28.
222. **Russ H., Staust K., Martel F., Gliese M., Schömig E.** (1996) *The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia.* Eur J Neurosci; 8: 1256-1264.
223. **Rutgers M., Buitenhuis C. K., van der Valk M. A., Hofnagel C. A., Voute P. A., Smets L. A.** (2000) *[¹³¹I] and [¹²⁵I] meta-Iodobenzylguanidine therapy in macroscopic and microscopic tumors: a comparative study in SK-N-SH human neuroblastoma and PC 12 rat pheochromocytoma xenografts.* Int J Cancer; 90: 312-325.
224. **Salmenkivi K., Haglund C., Arola J., Heikkila P.** (2001) *Increased expression of tenascin in pheochromocytomas correlates with malignancy.* Am J Surg Pathol; 25: 1419-1423.
225. **Salmenkivi K., Haglund C., Ristimaki A., Arola J., Heikkila P.** (2001) *Increased expression of cyclooxygenase-2 in malignant pheochromocytomas.* J Clin Endocrinol Metab; 86: 5615-5619.
226. **Salmenkivi K., Heikkila P., Liu J., Haglund C., Arola J.** (2003) *VEGF in 105 pheochromocytomas: enhanced expression correlates with malignant outcome.* Apmis; 111: 458-464.
227. **Sano H., Bonadio J., Gerbing R. B., London W. B., Matthay K. K., Lukens J. N., Shimada H.** (2006) *International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age.* Eur J Cancer; 42: 1113-1119.
228. **Schilling F. H., Erttmann R., Dohrmann S., Erb N., Winkler K., Gross U., Treuner J.** (1992) *Early neuroblastoma detection in Germany. On the status of the Hamburg-Stuttgart cooperative pilot study.* Klin Padiatr; 204: 282-287.
229. **Schilling F. H., Spix C., Berthold F., Erttmann R., Fehse N., Hero B., Klein G., Sander J., Schwarz K., Treuner J., Zorn U., Michaelis J.** (2002) *Neuroblastoma screening at one year of age.* N Engl J Med; 346: 1047-1053.
230. **Schilling F. H., Spix C., Berthold F., Erttmann R., Sander J., Treuner J., Michaelis J.** (2003) *Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated results of the population based controlled trial in Germany.* Cancer Lett; 197: 19-28.
231. **Schömig E., Babin-Ebell J., Schönfeld C. L., Russ H., Trendelenburg U.** (1990) *Human Caki-1 cells are the first model for extraneuronal*

- transport of noradrenaline (uptake2) which is based on a clonal cell line. *J Neural Transm Suppl*; 32: 437-440.
232. **Schömig E., Lazar A., Gründemann D.** (2006) *Extraneuronal monoamine transporter and organic cation transporters 1 and 2: A review of transport efficiency.* *Handb Exp Pharmacol*: 151-180.
233. **Schömig E., Schönfeld C. L.** (1990) *Extraneuronal noradrenaline transport (uptake2) in a human cell line (Caki-1 cells).* *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 341: 404-410.
234. **Schwab M., Alitalo K., Klempnauer K. H., Varmus H. E., Bishop J. M., Gilbert F., Brodeur G., Goldstein M., Trent J.** (1983) *Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour.* *Nature*; 305: 245-248.
235. **Schwartz J. W., Blakely R. D., DeFelice L. J.** (2003) *Binding and transport in norepinephrine transporters. Real-time, spatially resolved analysis in single cells using a fluorescent substrate.* *J Biol Chem*; 278: 9768-9777.
236. **Seeger R. C., Rayner S. A., Banerjee A., Chung H., Laug W. E., Neustein H. B., Benedict W. F.** (1977) *Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines.* *Cancer Res*; 37: 1364-1371.
237. **Seitz G.** (2000) *Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung von Neuroblastomzelllinien und klinischen Tumorproben - Catecholaminstoffwechsel, oxidativer Streß und Zelltod.* Unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt; Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
238. **Shapiro B., Gross M. D.** (1987) *Radiochemistry, biochemistry, and kinetics of [¹³¹I] meta-Iodbenzylguanidine (mIBG) and [¹²³I] mIBG: clinical implications of the use of [¹²³I]-MIBG.* *Med Pediatr Oncol*; 15: 170-177.
239. **Shikata A., Shikata T., Sotozono Y., Hosoi H., Matsumura T., Sugimoto T., Sawada T.** (2000) *Neuronal differentiation in human neuroblastoma cells by nerve growth factor following TrkA up-regulation by interferon-gamma.* *Med Pediatr Oncol*; 34: 394-401.
240. **Shimada H., Ambros I. M., Dehner L. P., Hata J., Joshi V. V., Roald B., Stram D. O., Gerbing R. B., Lukens J. N., Matthay K. K., Castleberry R. P.** (1999) *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system).* *Cancer*; 86: 364-372.
241. **Shimada H., Chatten J., Newton W. A., Jr., Sachs N., Hamoudi A. B., Chiba T., Marsden H. B., Misugi K.** (1984) *Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas.* *J Natl Cancer Inst*; 73: 405-416.
242. **Shimada S., Kitayama S., Lin C. L., Patel A., Nanthakumar E., Gregor P., Kuhar M., Uhl G.** (1991) *Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA.* *Science*; 254: 576-578.
243. **Short J. H., Darby T. D.** (1967) *Sympathetic nervous system blocking agents. 3. Derivatives of benzylguanidine.* *J Med Chem*; 10: 833-840.

244. **Shuster J. J., McWilliams N. B., Castleberry R., Nitschke R., Smith E. I., Altshuler G., Kun L., Brodeur G., Joshi V., Vietti T., et al.** (1992) *Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study.* Am J Clin Oncol; 15: 295-303.
245. **Simon T.** (2005) *Neuroblastoma.* Urologe A; 44: 543-554; 555.
246. **Simon T., Hero B., Faldum A., Handgretinger R., Schrappe M., Niethammer D., Berthold F.** (2004) *Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma.* J Clin Oncol; 22: 3549-3557.
247. **Simon T., Hero B., Faldum A., Handgretinger R., Schrappe M., Niethammer D., Berthold F.** (2005) *Infants with stage 4 neuroblastoma: the impact of the chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 consolidation therapy.* Klin Padiatr; 217: 147-152.
248. **Simon T., Spitz R., Faldum A., Hero B., Berthold F.** (2004) *New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status.* J Pediatr Hematol Oncol; 26: 791-796.
249. **Sisson J. C., Frager M. S., Valk T. W., Gross M. D., Swanson D. P., Wieland D. M., Tobes M. C., Beierwaltes W. H., Thompson N. W.** (1981) *Scintigraphic localization of pheochromocytoma.* N Engl J Med; 305: 12-17.
250. **Sisson J. C., Hutchinson R. J., Carey J. E., Shapiro B., Johnson J. W., Mallette S. A., Wieland D. M.** (1988) *Toxicity from treatment of neuroblastoma with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine.* Eur J Nucl Med; 14: 337-340.
251. **Sisson J. C., Shapiro B., Shulkin B. L., Urba S., Zempel S., Spaulding S.** (1999) *Treatment of malignant pheochromocytomas with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine and chemotherapy.* Am J Clin Oncol; 22: 364-370.
252. **Smets L. A., Loesberg C., Janssen M., Metwally E. A., Huiskamp R.** (1989) *Active uptake and extraventricular storage of m-Iodobenzylguanidine in human neuroblastoma SK-N-SH cells.* Cancer Res; 49: 2941-2944.
253. **Spina M. B., Cohen G.** (1988) *Hydrogen peroxide production in dopamine neurons.* Basic Life Sci; 49: 1011-1014.
254. **Stein P. P., Black H. R.** (1990) *A Simplified Diagnostic Approach to Pheochromocytoma: A Review of the Literature and Report of One Institution's Experience.* Medicine.
255. **Strahlentherapie Onkologie** (2002) *Ergebnisse der Childhood Cancer Survivor Study.* Urban & Vogel.
256. **Swart J. F., de Kraker J., van der Lely N.** (2002) *meta-Iodobenzylguanidine total-body scintigraphy required for revealing occult neuroblastoma in opsoclonus-myoclonus syndrome.* Eur J Pediatr; 161: 255-258.
257. **Szatrowski T. P., Nathan C. F.** (1991) *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells.* Cancer Res; 51: 794-798.
258. **Taal B. G., Hofnagel C., Boot H., Valdes Olmos R., Rutgers M.** (2000) *Improved effect of [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine treatment by predosing*

- with non-radiolabeled MIBG in carcinoid patients, and studies in xenografted mice. *Ann Oncol*; 11: 1437-1443.
259. **Tenenbaum F., Lumbroso J., Schlumberger M., Mure A., Plouin P. F., Caillou B., Parmentier C.** (1995) *Comparison of radiolabeled octreotide and meta-Iodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy in malignant pheochromocytoma.* *J Nucl Med*; 36: 1-6.
260. **Thiele C. J., Deutsch L. A., Israel M. A.** (1988) *The expression of multiple proto-oncogenes is differentially regulated during retinoic acid induced maturation of human neuroblastoma cell lines.* *Oncogene*; 3: 281-288.
261. **Thompson L. D.** (2002) *Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases.* *Am J Surg Pathol*; 26: 551-566.
262. **Tischler A. S., Greene L. A.** (1978) *Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.* *Lab Invest*; 39: 77-89.
263. **Tobes M. C., Jaques S., Jr., Wieland D. M., Sisson J. C.** (1985) *Effect of uptake-one inhibitors on the uptake of norepinephrine and metaiodobenzylguanidine.* *J Nucl Med*; 26: 897-907.
264. **Toyohira Y., Yanagihara N., Minami K., Ueno S., Uezono Y., Tachikawa E., Kondo Y., Kashimoto T., Izumi F.** (1998) *Down-regulation of the noradrenaline transporter by interferon-alpha in cultured bovine adrenal medullary cells.* *J Neurochem*; 70: 1441-1447.
265. **Trendelenburg U., Weiner N.** (1988) *Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer: New York.
266. **Treuner J., Feine U., Niethammer D., Müller-Schaumburg W., Meinke J., Eibach E., Dopfer R., Klingebiel T., Grumbach S.** (1984) *Scintigraphic imaging of neuroblastoma with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine.* *Lancet*; 1: 333-334.
267. **Treuner J., Klingebiel T., Bruchelt G., Feine U., Niethammer D.** (1987) *Treatment of neuroblastoma with meta-Iodobenzylguanidine: results and side effects.* *Med Pediatr Oncol*; 15: 199-202.
268. **Treuner J., Klingebiel T., Feine U., Buck J., Bruchelt G., Dopfer R., Girgert R., Müller-Schaumburg W., Meinke J., Kaiser W., et al.** (1986) *Clinical experiences in the treatment of neuroblastoma with [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine.* *Pediatr Hematol Oncol*; 3: 205-216.
269. **Treuner J., Schilling F. H.** (1995) *Neuroblastoma mass screening: the arguments for and against.* *Eur J Cancer*; 31A: 565-568.
270. **Tronccone L.** (1994) *Radiolabelled meta-Iodobenzylguanidine in the diagnosis of neural crest tumours.* Hrsg.: Murray I. P. C., Ell P. J., Strauss H. W.: *Nuclear Medicine in Clinical Diagnosis and Treatment*; Churchill Livingstone: Edinburgh - London - Melbourne - New York.
271. **Tronccone L., Rufini V.** (1999) *Nuclear medicine therapy of pheochromocytoma and paraganglioma.* *Q J Nucl Med*; 43: 344-355.
272. **Tronccone L., Rufini V., Maussier M. L., Valenza V., Daidone M. S., Luzi S., De Santis M.** (1991) *The role of [¹³¹I] meta-Iodobenzylguanidine*

- in the treatment of medullary thyroid carcinoma: results in five cases.* J Nucl Biol Med; 35: 327-331.
273. **Tronccone L., Rufini V., Montemaggi P., Danza F. M., Lasorella A., Mastrangelo R.** (1990) *The diagnostic and therapeutic utility of radioiodinated meta-Iodobenzylguanidine (mIBG). 5 years of experience.* Eur J Nucl Med; 16: 325-335.
274. **Tsubono Y., Hisamichi S.** (2004) *A halt to neuroblastoma screening in Japan.* N Engl J Med; 350: 2010-2011.
275. **Tuchman M., Lemieux B., Auray-Blais C., Robison L. L., Giguere R., McCann M. T., Woods W. G.** (1990) *Screening for neuroblastoma at 3 weeks of age: methods and preliminary results from the Quebec Neuroblastoma Screening Project.* Pediatrics; 86: 765-773.
276. **Tytgat G. A., van den Brug M. D., Voute P. A., Smets L. A., Rutgers M.** (2002) *Human megakaryocytes cultured in vitro accumulate serotonin but not meta-Iodobenzylguanidine whereas platelets concentrate both.* Exp Hematol; 30: 555-563.
277. **Usdin T. B., Mezey E., Chen C., Brownstein M. J., Hoffman B. J.** (1991) *Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter.* Proc Natl Acad Sci U S A; 88: 11168-11171.
278. **Vaidyanathan G., Zhao X. G., Larsen R. H., Zalutsky M. R.** (1997) *$3\text{-}[^{211}\text{At}]$ astato-4-fluorobenzylguanidine: a potential therapeutic agent with prolonged retention by neuroblastoma cells.* Br J Cancer; 76: 226-233.
279. **van der Harst E., Bruining H. A., Jaap Bonjer H., van der Ham F., Dinjens W. N., Lamberts S. W., de Herder W. W., Koper J. W., Stijnen T., Proye C., Lecomte-Houcke M., Bosman F. T., de Krijger R. R.** (2000) *Proliferative index in pheochromocytomas: does it predict the occurrence of metastases?* J Pathol; 191: 175-180.
280. **van der Harst E., de Herder W. W., Bruining H. A., Bonjer H. J., de Krijger R. R., Lamberts S. W., van de Meiracker A. H., Boomsma F., Stijnen T., Krenning E. P., Bosman F. T., Kwekkeboom D. J.** (2001) *^{123}I meta-Iodobenzylguanidine and ^{111}In octreotide uptake in benign and malignant pheochromocytomas.* J Clin Endocrinol Metab; 86: 685-693.
281. **van der Harst E., de Herder W. W., de Krijger R. R., Bruining H. A., Bonjer H. J., Lamberts S. W., van den Meiracker A. H., Stijnen T. H., Boomsma F.** (2002) *The value of plasma markers for the clinical behaviour of pheochromocytomas.* Eur J Endocrinol; 147: 85-94.
282. **van Santen H. M., de Kraker J., van Eck B. L., de Vijlder J. J., Vulsma T.** (2003) *Improved radiation protection of the thyroid gland with thyroxine, methimazole, and potassium iodide during diagnostic and therapeutic use of radiolabeled metaiodobenzylguanidine in children with neuroblastoma.* Cancer; 98: 389-396.
283. **Vassal G., Pondarre C., Cappelli C., Terrier-Lacombe M. J., Boland I., Morizet J., Benard J., Venuat A. M., Ardouin P., Hartmann O., Gouyette A.** (1997) *DNA-topoisomerase I, a new target for the treatment of neuroblastoma.* Eur J Cancer; 33: 2011-2015.
284. **Vasudevan S. A., Nuchtern J. G., Shohet J. M.** (2005) *Gene profiling of high risk neuroblastoma.* World J Surg; 29: 317-324.

285. **Wakade A. R., Wakade T. D., Poosch M., Bannon M. J.** (1996) *Noradrenaline transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells are controlled by dexamethasone and nerve growth factor.* J Physiol; 494 (Pt 1): 67-75.
286. **Wang D. S., Jonker J. W., Kato Y., Kusuhara H., Schinkel A. H., Sugiyama Y.** (2002) *Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin.* J Pharmacol Exp Ther; 302: 510-515.
287. **Wang D. S., Kusuhara H., Kato Y., Jonker J. W., Schinkel A. H., Sugiyama Y.** (2003) *Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin.* Mol Pharmacol; 63: 844-848.
288. **Weber W., Meidel J., Senekowitsch R., Bruchelt G., Klingebiel T., Pabst H. W.** (1992) *Tumor spheroid model for therapy of neuroblastoma micro-metastases using radio-iodinated mIBG and anti-GD2 (14.G2a) antibody.* Proceedings of Eur Nucl Med Congress in Vienna; Hrsg.: Schmidt H.;Schattauer.
289. **Wieland D. M., Swanson D. P., Brown L. E., Beierwaltes W. H.** (1979) *Imaging the adrenal medulla with an [¹³¹I]-labeled antiadrenergic agent.* J Nucl Med; 20: 155-158.
290. **Wieland D. M., Wu J., Brown L. E., Mangner T. J., Swanson D. P., Beierwaltes W. H.** (1980) *Radiolabeled adrenergi neuron-blocking agents: adrenomedullary imaging with [¹³¹I] meta-Iodbenzylguanidine.* J Nucl Med; 21: 349-353.
291. **Wolkowitz O. M.** (1994) *Prospective controlled studies of the behavioral and biological effects of exogenous corticosteroids.* Psychoneuroendocrinology; 19: 233-255.
292. **Woods W. G., Lemieux B., Tuchman M.** (1992) *Neuroblastoma represents distinct clinical-biologic entities: a review and perspective from the Quebec Neuroblastoma Screening Project.* Pediatrics; 89: 114-118.
293. **Woods W. G., Tuchman M., Bernstein M. L., Leclerc J. M., Brisson L., Look T., Brodeur G. M., Shimada H., Hann H. L., Robison L. L., et al.** (1992) *Screening for neuroblastoma in North America. 2-year results from the Quebec Project.* Am J Pediatr Hematol Oncol; 14: 312-319.
294. **Woodward E. R., Eng C., McMahon R., Voutilainen R., Affara N. A., Ponder B. A., Maher E. R.** (1997) *Genetic predisposition to pheochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET and VHL.* Hum Mol Genet; 6: 1051-1056.
295. **Wu X., Kekuda R., Huang W., Fei Y. J., Leibach F. H., Chen J., Conway S. J., Ganapathy V.** (1998) *Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain.* J Biol Chem; 273: 32776-32786.
296. **Wüstermann P.-R.** (1991) *Untersuchungen zu Aufnahme und Abgabe von [¹²⁵I] meta-Iodbenzylguanidin, [³H] Dopamin und [³H] Noradrenalin an der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH.* Unter Anleitung von Prof. Dr. med. U. Feine; Medizinische Fakultät, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

297. **Yon L., Guillemot J., Montero-Hadjadje M., Grumolato L., Leprince J., Lefebvre H., Contesse V., Plouin P. F., Vaudry H., Anouar Y.** (2003) *Identification of the secretogranin II-derived peptide EM66 in pheochromocytomas as a potential marker for discriminating benign versus malignant tumors.* J Clin Endocrinol Metab; 88: 2579-2585.
298. **Yonezawa A., Masuda S., Nishihara K., Yano I., Katsura T., Inui K.** (2005) *Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat.* Biochem Pharmacol; 70: 1823-1831.
299. **Zamboni W. C., Stewart C. F., Thompson J., Santana V. M., Cheshire P. J., Richmond L. B., Luo X., Poquette C., Houghton J. A., Houghton P. J.** (1998) *Relationship between topotecan systemic exposure and tumor response in human neuroblastoma xenografts.* J Natl Cancer Inst; 90: 505-511.
300. **Zeltzer P. M., Marangos P. J., Sather H., Evans A., Siegel S., Wong K. Y., Dalton A., Seeger R., Hammond D.** (1985) *Prognostic importance of serum neuron specific enolase in local and widespread neuroblastoma.* Prog Clin Biol Res; 175: 319-329.
301. **Zhang L., Dresser M. J., Gray A. T., Yost S. C., Terashita S., Giacomini K. M.** (1997) *Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter.* Mol Pharmacol; 51: 913-921.
302. **Zhu M. Y., Ordway G. A.** (1997) *Down-regulation of norepinephrine transporters on PC 12 cells by transporter inhibitors.* J Neurochem; 68: 134-141.
303. **Zielke A., Middeke M., Hoffmann S., Colombo-Benkmann M., Barth P., Hassan I., Wunderlich A., Hofbauer L. C., Duh Q. Y.** (2002) *VEGF-mediated angiogenesis of human pheochromocytomas is associated to malignancy and inhibited by anti-VEGF antibodies in experimental tumors.* Surgery; 132: 1056-1063; discussion 1063.
304. **Zimmermann D. F.** (2006) *Ergebnisse der Hochdosis [¹³¹I] meta-iodbenzylguanidin Therapie bei fortgeschrittenen Neuroblastomen. Eine retrospektive Analyse.* Unter Anleitung von Prof. Dr. med. R. Bares; Medizinische Fakultät, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die größte Chance, zu einer spezifischeren und deshalb weniger toxischen Therapieform zu gelangen, besteht darin, physiologische Charakteristika des jeweiligen Tumorgewebes auszunutzen. Phäochromozytome sowie ein Großteil der Neuroblastome sind in der Lage Katecholamine zu synthetisieren, und exprimieren neuronale Katecholamintransporter, v.a. den Noradrenalintransporter (NAT) und evt. auch wenige Dopamintransporter (DAT). Durch die Fähigkeit des NAT zur spezifischen Aufnahme von radioaktiv markiertem meta-Iodobenzylguanidin (mIBG) hat er in der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms und Phäochromozytoms eine große Bedeutung. In der Literatur beschriebene Nebenwirkungen sind u.a. durch die Aufnahme von radioaktivem mIBG in gesundes Gewebe bedingt, die wahrscheinlich über Serotonintransporter (SERT) und extraneuronale Katecholamintransporter stattfindet. Dazu gehören extraneuronale Monoamintransporter (EMT) und organische Kationentransporter 1+2 (OCT 1+2), die breit im Organismus verteilt sind. Ziel dieser Dissertation war es, die Aufnahme von mIBG über die EMT und OCT nachzuweisen und mit spezifischen Inhibitoren zu blockieren, um somit eine noch selektivere Anreicherung der Radioaktivität über die NAT in die Tumorzellen zu erreichen.

Hierbei dienten als Modellsysteme für die neuronalen Katecholamintransporter die Neuroblastomzelllinie SK-N-SH und die Phäochromozytomzelllinie PC 12, während die CAKI-Zelllinie, sowie EMT-, OCT 1- bzw. OCT 2-exprimierende HEK 293-Zellen die Modellsysteme für die extraneuronalen Katecholamintransporter darstellten. Die Versuche wurden sowohl mit Suspensionskulturen durchgeführt als auch mit Co-Kulturen im Transwellsystem, um mit letzterem die direkte Konkurrenzsituation zwischen neuronalen und extraneuronalen Katecholamintransportern darzustellen. Untersucht wurden Desipramin als spezifischer Inhibitor der NAT und GBR-12909 als spezifischer Inhibitor der DAT, um über deren Hemmeffekte indirekt eine Aussage über die Expression von NAT und DAT auf SK-N-SH- und PC 12-Zellen zu erhalten. Die Hemmeffekte auf die [³H] Dopamin- bzw. [³H] Noradrenalin-aufnahme durch den kompetitiven Inhibitor mIBG wurden ermittelt, um eine indirekte Aussage über die mIBG Aufnahme in die verschiedenen Zellen zu erhalten, da [¹³¹I] mIBG für direkte Aufnahmeversuche nur einmal zur Verfügung stand. Hierbei ergab sich nach der Stärke des mIBG-Hemmeffektes folgende absteigende Zelllinienreihenfolge: SK-N-SH ≈ OCT 2 > PC 12 ≈ EMT >> CAKI ≈ OCT 1. Als weiterer kompetitiver Inhibitor wurde 6-Fluordopamin (6-FDA) verwendet, da Studien laufen, um 6-[¹⁸F] FDA zur routinemäßigen Darstellung von Neuroblastomen bzw. Phäochromozytomen mittels PET einzusetzen. Bei diesen Untersuchungen wurden EMT ≈ SK-N-SH > PC 12 >> OCT 2 ≈ OCT 1 > CAKI inhibiert. Im Vergleich zu mIBG konnte ein stärkerer Hemmeffekt von 6-FDA auf die [³H] Dopaminaufnahme in neuronale SK-N-SH- und PC 12- sowie in CAKI-Zellen beobachtet werden, während die extraneuronalen EMT-, OCT 1- und OCT 2-exprimierenden HEK 293-Zellen stärker mIBG als 6-FDA aufnahmen. Corticosteron, das in der Literatur als spezifischer Inhibitor der EMT bekannt ist, bewirkte eine nur schwache Hemmung der

Katecholaminaufnahme in Neuroblastom- und Phäochromozytomzellen, jedoch eine intensive Schwächung der Aufnahme über extraneuronale Katecholamintransporter in EMT- ≈ CAKI- > OCT 1- ≈ OCT 2-Zellen. Die durch Corticosteron hervorgerufenen Hemmeffekte konnten auch bei der direkten Aufnahme von [¹³¹I] mIBG bestätigt werden.

Somit ergeben sich mit diesem Corticosteroid evt. in Kombination mit weiteren Substanzen (z.B. Fluvoxetin, einem spezifischen Inhibitor des SERT), über die hinreichende klinische Erfahrungen bezüglich der geringen Nebenwirkungen vorhanden sind, neue Ansätze für die Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms bzw. des Phäochromozytoms. Durch die spezifische Blockade der extraneuronalen Katecholamintransporter besteht die Möglichkeit, die Aufnahme von radioaktiv markiertem mIBG bzw. 6-FDA selektiver in Richtung der neuronalen NAT- bzw. DAT-exprimierenden Tumorzellen zu lenken. Dadurch könnte evt. die radioaktive Aufnahme in gesundes Gewebe weitgehend verhindert und somit die diagnostische Spezifität verbessert sowie die akuten und späten Nebenwirkungen vermindert werden. Durch diese Blockade wäre eine Erhöhung der radioaktiven Dosis denkbar, mit der Hoffnung eines besseren und längeren therapeutischen Tumoransprechens sowie einer verbesserten diagnostischen Sensitivität. Dabei wäre für die therapeutische Anwendung ein Gemisch aus einem weitstrahlendem [¹³¹I] mIBG und einem kurzstrahlendem [¹²⁵I] mIBG möglicherweise sinnvoll, um sowohl große Tumore als auch Mikrometastasen zu zerstören. Anstelle von [¹²³I] mIBG, das über SPECT dargestellt wird, könnte diagnostisch auch 6-[¹⁸F] FDA eingesetzt werden, das außer über NAT auch über DAT aufgenommen wird. Neben einer alleinigen Anwendung wäre auch eine kombinierte PET- und CT-Diagnostik mit 2-[¹⁸F] FDG vorstellbar, die sich ideal ergänzende Informationen erbringen sollte. Durch spezifische Inhibition der OCT 1+2, z.B. durch Ranitidin, Famotidin, Disprocynium 24 oder Decynium 22, über die allerdings unzureichende klinische Erfahrungen vorhanden sind, könnte evt. u.a. die Reduktion der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität (Blockade der OCT 2), ein Schutz der Leber durch Reduktion der Aufnahme von Pharmaka (Blockade der OCT 1), sowie eine Reduktion der verabreichten Medikamentenkonzentration über ein geringere renale Ausscheidung (Blockade der OCT 1 und OCT 2) erreicht werden.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
Abb.	Abbildung
AD	Aldehydehydrogenase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celcius
c	Konzentration
ca.	circa
CAKI	Humane Nierenkarzinomzellen
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
cpm	counts per minute (Zerfall pro Minute)
CT	Computertomographie
d	days (Tage)
D 22	Decynium 22
DA	Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin)
DA*	[³ H]-markiertes Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
ddH ₂ O	Aqua bidest = Reinstwasser (hergestellt mit dem Milli-Q)
def.	definiert
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOMA	3,4-Dihydroxymandelsäure
Dopa	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DP 24	Disprocynium 24
EMT	Extraneuronaler Monoamintransporter
EMT-Zellen	EMT-exprimierende HEK 293-Zellen
evt.	eventuell
¹⁸ F	radioaktives Fluorisotop
f.c.	final concentration (Endkonzentration)
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
6-FDA	6-Fluordopamin
FDG	Fluordesoxyglucose
G	Relative Zentrifugenbeschleunigung
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HEK 293	Human Embryonal Kidney Cells (humane embryonale Nierenzellen)
HIF-1α	Hypoxie induzierter Faktor 1α
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
HS	horse serum (Pferdeserum)
HVA	Homovanillinsäure
HWZ	Halbwertszeit
IC ₅₀ -Wert	Konzentration, bei der eine Hemmung von 50% erreicht ist
¹³¹ I, ¹²³ I, ¹²⁵ I	radioaktive Iodisotope
¹¹¹ In	radioaktives Indium
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INSS	International Neuroblastoma Staging System
K _i - Wert	Gleichgewichtskonstante, die angibt, welcher Anteil des Substrates/Hemmstoffes an einen Rezeptor gebunden ist
K _m - Wert	Michaeliskonstante
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)
M	Molar (mol/l)
MACS	Magnet Activated Cell Sorting
MAO	Monoaminoxidase
MEN	Multiple Endokrine Neoplasien
mIBG	meta-Iodbenzylguanidin
min	Minute
MKI	Mitose-Karyohexis-Index
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MRP	Multidrug Resistance associated Protein
MW	Mittelwert
n	Fallzahl
NA	Noradrenalin (4-(2-Amino-1-hydroxyethyl)-1,2-benzenediol)
NAT	Noradrenalintransporter
NGF	Nerve Growth Factor
NNM	Nebennierenmark
NSE	Neuronspezifische Enolase
OH	Hydroxylgruppe
OCT	Organischer Cationentransporter
OCT-Zellen	OCT-exprimierende HEK 293-Zellen
6-OHFDA	6-Hydroxyfluordopamin
O-MISP	O-methylisoprenalin
p	kurzer Arm eines Chromosoms
Pb	Phenoxybenzamin

PBS	Phosphatgepufferte Saline ohne Calcium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+})
PBS ⁺⁺	Phosphatgepufferte Saline mit Ca^{2+} und Mg^{2+}
PC 12	Phäochromozytomzelllinie aus Ratten
PNMT	Phenylethanolamin-N-Monoaminoxidase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen Emissionstomographie
q	langer Arm eines Chromosoms
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDH	Succinyldehydrogenase
SERT	Serotonintransporter
SKF-550	Phenoxybenzamidinderivat (= (9-fluorenyl)-N-methyl- β -chloroethylamin)
SK-N-SH = SH	humane Neuroblastomzelllinie
SLC	Solute Liquid Carrier
SPECT	Single Photon Emissions Computertomographie
t	Zeitpunkt
Tab.	Tabelle
TRK	Tyrosinkinase
u.a.	unter anderem
U	Unit (Einheiten)
v.a.	vor allem
VMA	Vanillinmandelsäure
versch.	verschiedene
VLE	very low Endotoxin
VHL	Von-Hippel-Lindau-Syndrom
VIP	Vasointestinales Peptid
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
v/v	Volumenprozent
w	with
w/o	without
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Verzeichnis aufgeführter Firmen

- Amersham Buchler GmbH & Co. KG (*Braunschweig, Deutschland*)
- ATCC (*Maryland, USA*)
- B. Braun Petzold GmbH (*Melsung, Deutschland*)
- Berthold Technologies GmbH & Co. KG (*Bad Wildbad, Deutschland*)
- Biochrom KG seromed[®], Biochrom Beteiligungs-GmbH & Co. Produktionsgesellschaft (*Berlin, Deutschland*)
- Brand GmbH (*Wertheim, Deutschland*)
- Canberra-Packard GmbH (*Frankfurt am Main, Deutschland*)
- Corning Inc., Life Sciences (*Acton, USA*)
- Costar[®], Corning Inc., Life Sciences (*New York, USA*)
- Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH (*Hamburg, Deutschland*)
- Falcon[®], Becton Dickinson GmbH (*Heidelberg, Deutschland*)
- Gibco BRL, Life Technologies GmbH (*Eggenstein, Deutschland*)
- Gilson (*Villiers Le Bel, Frankreich*)
- Greiner Bio-One GmbH (*Frickenhausen, Deutschland*)
- Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (*Schwabach, Deutschland*)
- Heraeus Holdings GmbH (*Hanau, Deutschland*)
- Hettich Zentrifugen GmbH (*Tuttlingen, Deutschland*)
- ICN Radiochemicals (*Costa Mesa, USA*)
- Integra Biosciences GmbH (*Fernwald, Deutschland*)
- Invitrogen GmbH (*Karlsruhe, Deutschland*)
- Karl Hecht Assistant KG (*Sondheim, Deutschland*)
- Köttermann GmbH & Co. KG (*Uetze/Hänigsen, Deutschland*)
- Memmert GmbH & Co. KG (*Schwabach, Deutschland*)
- Merck KG (*Darmstadt, Deutschland*)
- Millipore GmbH (*Molsheim, Frankreich*)
- Olympus Optical GmbH (*Hamburg, Deutschland*)
- PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc. (*Boston, USA*)
- Sarstedt AG & Co. (*Nümbrecht, Deutschland*)
- Sartorius AG (*Göttingen, Deutschland*)
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH (*Freiburg, Deutschland*)
- WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (*Weilheim, Deutschland*)
- WU, Ulbrich Wilhelm Glaswaren (*Mainz, Deutschland*)

8.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitätskinderklinik Tübingen in der Abteilung Hämatologie und Onkologie (Leitung: Prof. Dr. med. R. Handgretinger) unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn **Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt** für die Bereitstellung des interessanten Themas. Zu jedem Zeitpunkt meiner Arbeit war er mir durch sein außerordentliches Engagement und seine freundschaftliche Motivation eine unerlässliche Unterstützung. Durch die ständige Gesprächsbereitschaft und die kontinuierliche Diskussion der Ergebnisse hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt noch einmal danken, dass er es geschafft hat, mich für die Forschung zu begeistern. Mir hat diese experimentelle Arbeit sehr viel Spaß gemacht. VIELEN DANK!

Natürlich möchte ich mich auch bei Herrn **Prof. Dr. med. R. Handgretinger** für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Abteilung bedanken.

Ebenso gedankt sei dem Zweitgutachter/ der Zweitgutachterin meiner Dissertation.

Bei allen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe des Hämatologisch-Onkologischen Forschungslabors möchte ich mich für die freundliche Hilfsbereitschaft und für das stets angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ganz besonders danke ich Frau **Dr. med. Zyrafete Kuçi** und Frau **Gisela Merkel** für ihr Interesse an meiner Arbeit. Ihre Ratschläge bei Schwierigkeiten in der praktischen Umsetzung waren sehr wertvoll. Sie haben mir durch Ihre hervorragende Unterstützung, die über das übliche Maß hinausging, manchen langen Arbeitstag im Labor verkürzt.

Frau **Birgit Kustermann** und Frau **Johanna Backes** vom Neurometabolischen Labor danke ich ebenfalls für Ihre Hilfe.

Bei **Stephanus maximus** möchte ich mich herzlich bedanken, dass er mir während der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit, sowohl persönlich als auch telefonisch, immer wieder bei größeren und kleineren Problemen mit der Software geholfen hat.

Meiner Freundin **Nina** möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die aufwendige Durchsicht dieser Arbeit danken.

Ein großes persönliches Dankeschön gilt meinem **Großschnuckler** für die Unterstützung, die er mir gibt. Durch sein ständiges Vorantreiben und seine liebevolle Art, mich zu motivieren, hatte ich das Durchhaltevermögen diese Arbeit schnell und ohne größere Probleme zu meistern.

Schließlich danke ich ganz herzlich meinen **Eltern**, die mir dieses Studium und damit diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Insbesondere gilt der Dank meinem Vater für die Durchsicht der Dissertation, bei der er sich durch den „Dschungel der Fachtermini“ kämpfen musste.

Die Dissertation wurde im Rahmen des Forschungsprojektes mit dem Thema „Synthese, Aufnahme und Wirkung von neuen Katecholamin- und mIBG-analogen Verbindungen zur Therapie des Neuroblastoms“ von der Deutschen Krebshilfe Gesellschaft finanziell unterstützt.

8.4 Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

- ◆ Geburtsdatum: 21. Mai 1982
- ◆ Geburtsort: Werneck
- ◆ Nationalität: Deutsch

Schulische Ausbildung

- ◆ Sept. 1992 - Juni 2001: Gymnasium Bad Kissingen
Leistungskurse: Mathematik, Biologie
Facharbeit: Erstellung eines Karyogrammes
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- ◆ Sept. 1988 - Aug. 1992: Anton-Kliegel-Grundschule Bad Kissingen

Studium der Humanmedizin

- ◆ 11.12. 2007: 2. Ärztliche Prüfung an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- ◆ Seit Juli 2006: Klinischer Abschnitt an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- ◆ Okt. 2004 - Juli 2006: Klinischer Abschnitt an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- ◆ Okt. 2003 - Sept. 2004: Klinischer Abschnitt an der Universität Regensburg
- ◆ Aug. 2003: Ärztliche Vorprüfung an der Universität Regensburg
- ◆ Okt. 2001 - Aug. 2003: Vorklinischer Abschnitt an der Universität Regensburg

Praktisches Jahr

- ◆ April 2007 - Juli 2007: Innere Medizin, Gastroenterologie (4 Monate)
Klinikum Neumarkt
- ◆ Dez. 2006 - März 2007: Pädiatrie, Neonatologie (2 Monate)
Universitätsklinikum Erlangen
Pädiatrie, Endokrinologie und Diabetologie (2 Monate)
Royal Children`s Hospital of Melbourne, Australien
- ◆ Aug. 2006 - Dez. 2006: Chirurgie, Allgemein und Orthopädisch (4 Monate)
Klinikum Neumarkt

Praktische Erfahrungen

- ◆ März 2006 - April 2006: Famulatur in der Kardiologie (6 Wochen)
Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
- ◆ Juli 2005 – Aug. 2005: Famulatur in der Neurologie (2 Wochen)
Bezirksklinikum Regensburg
- ◆ Sept. 2004: Famulatur in der Pädiatrie (2 Wochen)
Universitätsklinikum Tübingen
- ◆ März 2004: Famulatur in der Anästhesiologie (4 Wochen)
Gemeinschaftspraxen Marienpark, Stuttgart
- ◆ März 2002 - April 2002: Pflegepraktikum in der Gefäßchirurgie (3 Wochen)
Universitätsklinikum Regensburg

Auslandserfahrungen

- ◆ März 2005: Famulatur in der Chirurgie (4 Wochen)
Asiri Hospital of Colombo, Sri Lanka
- ◆ Aug. 2002 - Sept. 2002: Pflegepraktikum in der Inneren Medizin (4 Wochen)
Baptist Hospital of East Tennessee, Knoxville, USA
- ◆ Juli 2002 - Aug. 2002: Pflegepraktikum in der Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie (4 Wochen)
Calixto Garcia Hospital of Havanna, Cuba

Zusatzkurse

- ◆ März 2007: zertifizierter Fortbildungskurs: EKG im Kindesalter
- ◆ Juni 2006: Sonographiekurse
- ◆ April 2006 - Juli 2006: Wahlfach: Plastische Chirurgie
- ◆ April 2006 - Juli 2006: Praktischer Kurs in Nähen, Knoten, Gipsen und
Osteosynthesepraktiken
- ◆ Jan. 2006 - Feb. 2006: Seminar: Computertomographie des
Körperstammes
- ◆ Jan. 2006: Seminar: Kinderkardiologie
- ◆ Okt. 2005 - Feb. 2006: Seminar: Begleitung sterbender und schwerkranker
Kinder
- ◆ Nov. 2005: Endoskopiekurs
- ◆ April 2004 - Aug. 2004: Akupunkturkurs
- ◆ April 2004 - Aug. 2004: Wahlfach: Sportmedizin

Nebentätigkeiten

- ◆ Okt. 2005 - Juni 2006: Hilfswissenschaftliche Angestellte am Zentrum für
Weichteilsarkome am Universitätsklinikum Tübingen
- ◆ Okt. 2002 - Juli 2004: Sitzwache am Universitätsklinikum Regensburg

Dissertation

- ◆ Seit Jan. 2005 : unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Bruchelt im
Hämato-Onkologischen Forschungslabor der
Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin I am
Universitätsklinikum Tübingen

*Thema: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die
Aufnahme von Katecholaminen und mIBG in
neuronale und extraneuronale Monoamintransporter
exprimierende Zellen*

Auszeichnung

- ◆ Juli 2001: Bestes Abitur im Fach Biologie

Uptake of mIBG and catecholamines in noradrenaline- and organic cation transporter-expressing cells: potential use of corticosterone for a preferred uptake in neuroblastoma- and pheochromocytoma cells[☆]

Melanie Bayer^{a,*}, Zyrafete Kuçi^a, Edgar Schömig^c, Dirk Gründemann^c,
Helmut Dittmann^b, Rupert Handgretinger^a, Gernot Bruchelt^a

^aDepartment of Hematology and Oncology, Children's University Hospital, D-72072 Tuebingen, Germany

^bDepartment of Nuclear Medicine, University of Tuebingen, D-72072 Tuebingen, Germany

^cDepartment of Pharmacology, University of Koeln, D-50924 Koeln, Germany

Received 14 November 2008; received in revised form 18 December 2008; accepted 24 December 2008

Abstract

For imaging of neuroblastoma and pheochromocytoma, [¹²³I]meta-iodobenzylguanidine ([¹²³I]mIBG) is routinely used, whereas [¹⁸F]6-fluorodopamine ([¹⁸F]6-FDA) is sporadically applied for positron emission tomography in pheochromocytoma. Both substances are taken up by catecholamine transporters (CATs). In competition, some other cell types are able to take up catecholamines and related compounds probably by organic cation (OCT) [extraneuronal monoamine (EMT)] transporters (OCT1, OCT2, OCT3=EMT). In this study, we investigated the uptake of radioiodine-labeled meta-iodobenzylguanidine (mIBG) as well as [³H]dopamine (mimicking 6-fluorodopamine) and [³H]noradrenaline. SK-N-SH (neuroblastoma) and PC-12 (pheochromocytoma) cells were used and compared with HEK-293 cells transfected with OCT1, OCT2 and OCT3, respectively. In order to gain a more selective uptake in CAT expressing tumor cells, different specific inhibitors were measured. Uptake of mIBG into OCT-expressing cells was similar or even better as into both CAT-expressing cell lines, whereas dopamine and noradrenaline uptake was much lower in OCT-expressing cells. In presence of corticosterone (f.c. 10⁻⁴ M), catecholamine and mIBG uptake into SK-N-SH and PC-12 cells was only slightly reduced. In contrast, this process was significantly inhibited in OCT2 and OCT3 transfected HEK-293 as well as in Caki-1 cells, which naturally express OCT3. We conclude that the well-known corticosteroid corticosterone might be used in combination with [¹⁸F]6-FDA or [¹²³I]mIBG to improve specific imaging of neuroblastoma and pheochromocytoma and to reduce irradiation dose to nontarget organs in [¹³¹I]mIBG treatment.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

Keywords: mIBG; 6-FDA; Catecholamine transporter; Organic cation transporter; Corticosterone; Neuroblastoma

1. Introduction

Pheochromocytoma and most neuroblastoma express neuronal catecholamine transporters [CATs: noradrenaline

(NA) transporter (NAT); dopamine (DA) transporter (DAT) [1,2]]. Because of the capability of these two tumors to take up radioiodine-labeled meta-iodobenzylguanidine (mIBG) by NAT [3], this compound is widely used for diagnostics and therapy. Since 1981 and 1984, respectively, pheochromocytoma and neuroblastoma can be imaged by scintigraphy with radioiodine-labeled mIBG. An alternate imaging method, which is only sporadically used up to now, is positron emission tomography (PET) with [¹⁸F]6-fluorodopamine ([¹⁸F]6-FDA) [4–7]. 6-Fluorodopamine (6-FDA) has a similar structure compared to DA. Therefore, 6-FDA (like DA) can be taken up by NAT and DAT [8]. In addition, several other cells types can incorporate catecholamines and related compounds. Table 1 gives an overview of the characteristics of the different catecholamine-transporting

Abbreviations: CAT, catecholamine transporter; DA, dopamine; DAT, dopamine transporter; DMSO, dimethylsulfoxide; EMT, extraneuronal monoamine transporter; f.c., final concentration; 6-FDA, 6-fluorodopamine; mIBG, meta-iodobenzylguanidine; NA, noradrenaline; NAT, noradrenaline transporter; OCT, organic cation transporter; PBS, phosphate-buffered saline; PET, Positron emission tomography.

[☆] Part of this manuscript was presented as a poster (abstract TR49) at the Advances in Neuroblastoma Research 2008, Chiba, Japan, May 21–24, 2008.

* Corresponding author. Tel.: +0049 7071 2980894; fax: +0049 7071 294713.

E-mail address: melanie.bayer@med.uni-tuebingen.de (M. Bayer).

Table 1
 Characteristics of the different neuronal and extraneuronal catecholamine transporters [9–22]

Transporter	Specificity of the substrate	Physiological distribution in the organism	Cells	Inhibitors
NAT	DA>NA>A	Sympathetic tissue Adrenal medulla Liver Placenta	Neurones Chromaffin cells Endothelial cells Syncytiotrophoblast	Cocaine Desipramine Tricyclic anti-depressants Nisoxetine
DAT	DA≫NA>A	Kidney Stomach Pancreas	Endothelial cells Endothelial cells Ductus pancreaticus	GBR-12783 GBR-12909 Cocaine Mazindol
OCT1	DA≈A>NA	Liver Intestine	Hepatocytes Epithelial cells	D 22 DP 24 Corticosterone Famotidin Ranitidine Prazosin Pb
OCT2	DA≫NA>A	Kidney CNS	Tubulus cells Glia, neurones	D 22 DP 24 Corticosterone Famotidin Ranitidine Cimetidine SKF-550
OCT3=EMT	A≫NA>DA	Liver CNS Heart Vessels Kidney Placenta Retina Intestine Lung	Hepatocytes Glia Myocytes Endothelial cells Tubulus, cortex Syncytiotrophoblast Photo receptors Epithelial cells	DP 24 D 22 Corticosterone O-MISP Estrogene Famotidin

A, adrenaline; D 22, decynium; 22; DP 24, disprocynium 24; O-MISP: *o*-methylisoprenaline; Pb, phenoxybenzamine; SKF-550, (9-fluorenyl)-*N*-methyl- β -chloroethylamin.

neuronal and extraneuronal monoamine [organic cation (OCT)] transporters. Up to now, little is known about whether mIBG is also taken up by OCT-expressing cells. Nevertheless, this assumption is obvious if the nontumoral uptake pattern [23–25] is compared to the distribution of the OCTs in the body. This is, e.g., shown in Fig. 1, presenting a 4-year-old boy with a paravertebral neuroblastoma. Fig. 1A represents anterior (left) and posterior (right) images acquired 4 h after injection of [123 I]mIBG, while Fig. 1B demonstrates equal projections, acquired 24 h after injection. Noticeable is the intense liver and moderate lung uptake after 4 h, which is considerably reduced after 24 h. Only with the decrease of liver uptake on the late image does intensive tumor uptake (see arrow) become evident. In contrast, uptake into myocardium is prominent throughout. Since many other cells in different tissues compete with neuroblastoma cells for mIBG and catecholamine uptake, it would be advantageous to inhibit this transport in order to shift mIBG/6-FDA uptake towards the CAT-expressing tumor cells. As we assume that most of the nontumoral uptake is caused by OCT, we were looking for a less toxic specific inhibitor, which

does not inhibit NAT or DAT. Among the different inhibitors of extraneuronal catecholamine transporters described in the literature (Table 1), corticosteroids, like corticosterone, are already widely used in different clinical applications.

Therefore, the aim of this study was to investigate (1) whether mIBG can be taken up by OCT-expressing cells and (2) whether the uptake of mIBG or 6-FDA into OCT-expressing cells can be preferentially inhibited by corticosterone in order to gain concentration in CAT-expressing tumor cells. Since DA behaves like 6-FDA and mIBG is taken up like NA, uptake studies were carried out using [3 H]DA, [3 H]NA and [123 I/ 131 I]-labeled mIBG.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

7,8- 3 H]DA (37 MBq/ml; specific activity: 1.52 TBq/mmol), 7,8- 3 H] NA (37 MBq/ml; specific activity: 0.44 TBq/mmol), [123 I]mIBG (4.1 MBq (<2.95 μ g mIBG)/ml H₂O at the beginning of the experiment) and [131 I]mIBG (aliquots

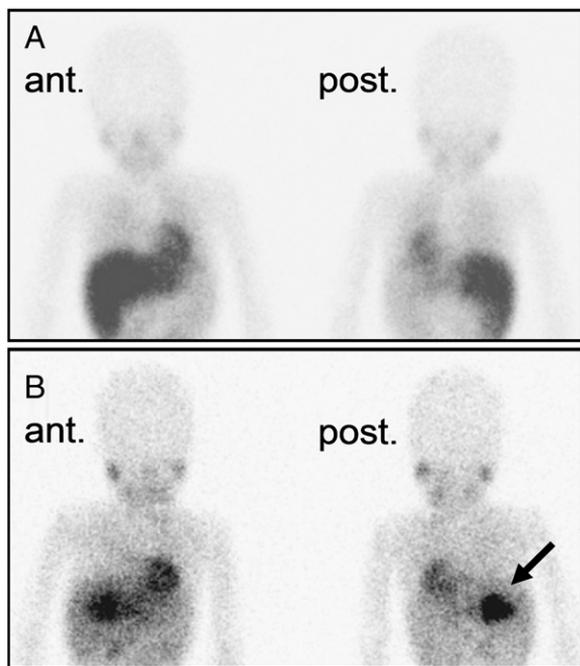


Fig. 1. mIBG Scans in a 4-year-old boy presenting with a right paravertebral neuroblastoma. (A) Anterior (left) and posterior (right) images acquired 4 h after injection of 40 MBq radioiodine-labeled mIBG. (B) Equal projections acquired 24 h after injection.

from samples used for clinical therapy) were obtained by Amersham Biosciences/GE Healthcare (Freiburg, Germany).

6-FDA was synthesised starting with 4-fluoroveratrol as described in detail in Ref. [8]. Unlabeled DA, NA, mIBG, corticosterone, Triton-X-100, glucose and ascorbic acid were from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany) and dimethyl-sulfoxide (DMSO), from Merck (Darmstadt, Germany). Ecolume scintillation solution was obtained by ICN (Costa Mesa, CA, USA).

2.2. Cell culture

SK-N-SH cells, PC-12 cells and Caki-1 cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). HEK-293 cells separately transfected with OCT1, OCT2 and OCT3, respectively, were generated as described [26].

SK-N-SH and Caki-1 cells were maintained in the logarithmic growth phase in 750-ml plastic tissue culture flasks (Costar, New York, USA) in RPMI-1640 medium (Biochrom, Berlin, Germany), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 1% (v/v) glutamine (200 mM) and 1% penicillin/streptomycin (10,000 U/10,000 µg) at 37°C in a 5% CO₂/95% humidified atmosphere. PC-12 cells were maintained as above, with the exception of serum, which was 5% heat-inactivated fetal calf serum and 10% heat-inactivated horse serum (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Transfected HEK-293 cells were reared in D-MEM medium (Gibco, Eggenstein, Germany), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (10,000 U/10,000 µg).

2.3. Uptake experiments

The strong adherent-growing cell lines SK-N-SH and Caki-1 were treated with trypsin/EDTA-solution [0.05%/0.02% (v/v)]. All other cell lines were only slightly adherent and could be detached by mechanical irritation. Cells were resuspended in culture medium, and after centrifugation (5 min, 400×g), all cell pellets were resuspended in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) containing calcium and magnesium (PBS⁺⁺) supplemented with glucose [final concentration (f.c.) 5.5 mM] and ascorbic acid (f.c. 50 µM). The uptake experiments were performed in 15 ml test tubes (Greiner, Frickenhausen, Germany), each containing 2×10⁶ cells in 0.5 ml incubation buffer.

2.3.1. Uptake of [³H]DA and [³H]NA

[³H]DA and [³H]NA uptake into SK-N-SH, PC-12, Caki-1 and HEK-293 cells separately transfected with OCT1, OCT2 and OCT3 was measured at a catecholamine concentration of 10⁻⁷ M. 10 µl [³H]DA and [³H]NA, respectively, were added to 500-µl cell suspension. For time-dependent experiments, reaction was stopped by addition of 10-ml ice-cold PBS after 5-, 10-, 15- and 30-min incubation time at 37°C, respectively. Tubes were centrifuged at 400×g for 5 min, the supernatant was removed and the process was repeated twice. Finally, the pellets were treated with 500 µl distilled water, containing 0.1% Triton X-100. After 30 min, 450 µl cell lysate was added to 5 ml scintillation cocktail (Ecolume scintillation solution) and measured (β-counter Tri Carb 2900TR, Canberra-Packard, Frankfurt, Germany). Unspecific uptake/binding was measured at 4°C and proved to be neglectable.

2.3.2. Influence of inhibitors on uptake of [³H]DA and [³H]NA

For competitive uptake experiments, increasing concentrations of unlabeled mIBG (5×10⁻⁷–5×10⁻⁵ M) or 6-FDA (2,5×10⁻⁷–5×10⁻⁶ M) were poured into the appropriate tubes (10–500-µl cell suspension) directly before adding 10 µl [³H]DA or [³H]NA (f.c. 10⁻⁷ M). For experiments using desipramine (2×10⁻⁸ M – 2×10⁻⁴ M) and corticosterone (1×10⁻⁸ M – 1×10⁻⁴ M) as inhibitors, the corticosteroid had to be dissolved in DMSO (f.c. 0.12%). In this concentration, DMSO did not significantly inhibit uptake of [³H]DA or [³H]NA (analysed in separate test systems).

2.3.3. Uptake of [¹²³I]/[¹³¹I] mIBG

Aliquotes of [¹²³I] or [¹³¹I] labeled mIBG, generated by the manufacture for clinical use, were employed for the cell culture experiments. Since the exact specific activity was not obtainable, mIBG concentration adjusted for the uptake experiments could only be given as “approximately 10⁻⁷ M.” Uptake experiments were carried out using 2×10⁶ cells/500 µl incubation medium in 5 ml tubes. After incubation in the absence or presence of 10⁻⁴ M corticosterone, tubes were washed three times, and the radioactivity incorporated into the cell pellet was measured, using a 12-channel Gamma-

counter (Multi-Crystal γ -Counter LB 2111, Berthold, Wildbad, Germany).

2.4. Statistical analysis

The screening experiments of time-dependent [^3H]DA and [^3H]NA uptake, as well as the preliminary concentration-dependent inhibition experiments were carried out in duplicates. The radioiodine-labeled mIBG uptake experiments and the inhibition experiments with 10^{-4} M corticosterone were done in triplicates, and each experiment was carried out three times. These data represent mean \pm standard deviation. The statistical significance level of the results was determined by means of the paired *t* test.

3. Results

3.1. Uptake of [^3H]DA and [^3H]NA into NAT- and OCT-expressing cells

[^3H]DA, which can be taken up by DAT and NAT, was used for uptake studies instead of radiolabeled 6-FDA (commercially not available). Fig. 2A shows the time-dependent uptake of [^3H]DA (f.c. 10^{-7} M), which is much better incorporated by SK-N-SH and PC-12 cells compared to OCT1-, OCT2- or OCT3-transfected HEK-293 cells. Additionally, 6-FDA uptake was indirectly measured by competitive inhibition (used in a 2.5–500-fold molar excess compared to [^3H]DA). It reduced strongly the uptake of [^3H]DA into SK-N-SH and PC-12 cells but was less effective in OCT1- and OCT2-expressing cells (Fig. 2B).

The time-dependent uptake of [^3H]NA (f.c. 10^{-7} M), which is incorporated like mIBG by the NAT, is shown in Fig. 3. Like [^3H]DA, [^3H]NA is also taken up preferentially by SK-N-SH and PC-12 cells compared to OCT-expressing cells. A 100-fold molar excess of unlabeled mIBG (10^{-5} M) inhibited the uptake of [^3H]NA but, even more effectively, the uptake of [^3H]DA into SK-N-SH and PC-12 cells. Compared to these CAT-expressing cells, the incorporation of [^3H]NA and [^3H]DA into OCT-expressing cells was inhibited in a smaller dimension (Table 2).

3.2. Uptake of radioiodine-labeled mIBG into NAT- and OCT-expressing cells

mIBG uptake into pheochromocytoma cells was first shown in 1981 [27], and its uptake by the neuroblastoma cell line SK-N-SH was demonstrated in 1985 [28], but nothing is known about the uptake by OCTs. For these experiments, [^{123}I]- as well as [^{131}I]-labeled mIBG was used. Since the exact specific radioactivity (Bq/mol) was not known (see 2.1), molarity of mIBG could be only indicated approximately (ca. $0.9\text{--}2 \times 10^{-7}$ M). Fig. 4 shows that OCT-expressing cells incorporated mIBG equally or even better than SK-N-SH and PC-12 cells, which is in strict contrast to the uptake of [^3H]DA and [^3H]NA (Fig. 2A and Fig. 3).

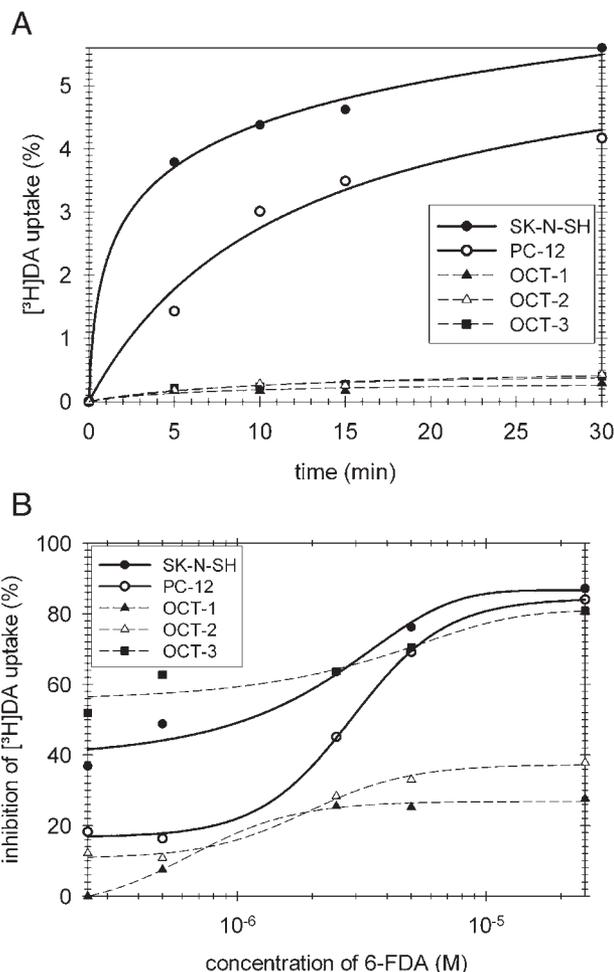


Fig. 2. (A) Time-dependent [^3H]DA (f.c. 10^{-7} M) uptake in SK-N-SH, PC-12 and HEK-293 cells transfected with OCT1, OCT2 or OCT3; 1% [^3H]DA uptake/ 10^6 cells $\approx 5.6 \times 10^{-13}$ mol DA/ 10^6 cells. (B) Concentration-dependent competitive inhibition of [^3H]DA uptake (f.c. 10^{-7} M) by 6-FDA in SK-N-SH, PC-12, and HEK-293 cells transfected with OCT1, OCT2 or OCT3 after a 15 min incubation period at 37°C . 100%: uptake of [^3H]DA in the absence of 6-FDA.

3.3. Influence of corticosterone and desipramine on the uptake of [^3H]DA in NAT and OCT expressing cells

Corticosterone is a well-known inhibitor of uptake into OCT-expressing cells (Table 1), whereas desipramine effectively inhibits the uptake into NAT-expressing cells [29]. Fig. 5A shows the concentration-dependent effect of corticosterone on the uptake of [^3H]DA into SK-N-SH and PC-12 cells compared to OCT-expressing cells. Uptake into OCT2 and OCT3 cells was strongly inhibited, whereas the reduction was much lower in SK-N-SH and PC-12 (and OCT1 expressing) cells. Vice versa, desipramine effectively inhibited [^3H]DA incorporation into SK-N-SH and PC-12 cells, even at very low concentration (10^{-7} M), but to a much smaller extent, into OCT-expressing cells (Fig. 5B). These different effects open the possibility to use corticosterone for a preferred uptake of [^{18}F]6-FDA or [^{123}I]mIBG in

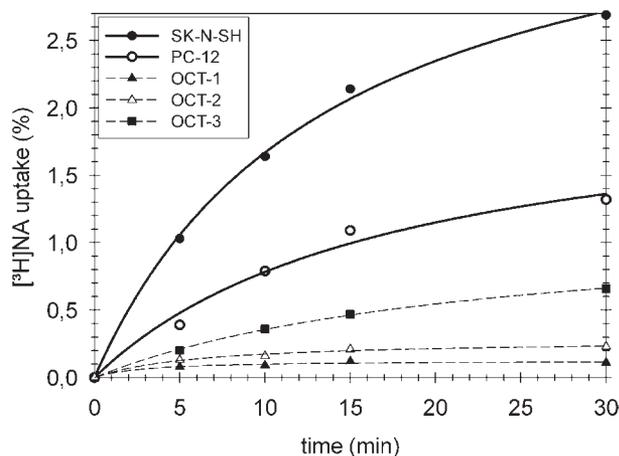


Fig. 3. Time-dependent [^3H]NA (f.c. 10^{-7} M) uptake in SK-N-SH, PC-12 and HEK-293 cells transfected with OCT1, OCT2 or OCT3; 1% [^3H]NA uptake/ 10^6 cells $\approx 7.2 \times 10^{-13}$ mol NA/ 10^6 cells.

neuroblastoma and pheochromocytoma cells compared to OCT-expressing cells.

3.4. Inhibition on the [^3H]DA-, [^3H]NA- and radioiodine-labeled mIBG uptake into SK-N-SH compared to OCT3 expressing HEK-293 and Caki-1 cells by 10^{-4} M corticosterone

Based on the results presented in Fig. 5A, the influence of corticosterone on the DA, NA or mIBG uptake was studied in more detail using the NAT expressing cell line SK-N-SH compared to OCT3-transfected HEK-293 cells. In addition, the renal carcinoma cell line Caki-1, which naturally expresses OCT3 [30], was also used. Fig. 6 shows comparatively the inhibitory effect of corticosterone (10^{-4} M) on [^3H]DA, [^3H]NA and radioiodine-labeled mIBG uptake. Corticosterone inhibited the uptake of all three substances to a similar extent. However, this inhibition was much stronger in the OCT3 expressing cells than in SK-N-SH cells. Table 3 shows, that the uptake ratio of [^3H]DA-, [^3H]NA- as well as of radioiodine-labeled mIBG between SK-N-SH and OCT3-expressing cells is strongly shifted towards the neuroblastoma cell line in the presence of 10^{-4} M corticosterone.

4. Discussion

Radiolabeled mIBG is widely used in diagnostics (^{123}I mIBG) and therapy (^{131}I mIBG) of neuroblastoma and

Table 2
Inhibition (in%) of the [^3H]DA and [^3H]NA (f.c. 10^{-7} M each) uptake by an 100-fold excess of unlabeled mIBG (f.c. 10^{-5} M)

Substrate	SK-N-SH	PC-12	OCT1	OCT2	OCT3
[^3H]DA	93.3 \pm 1.0	88.0 \pm 1.6	29.3 \pm 15.9	43.0 \pm 9.6	11.7 \pm 3.2
[^3H]NA	78.5 \pm 1.3	47.0 \pm 7.9	33.0 \pm 2.1	50.3 \pm 2.1	66.3 \pm 1.3

Mean \pm S.D.; $n=3-4$; Incubation time: 5–30 min.

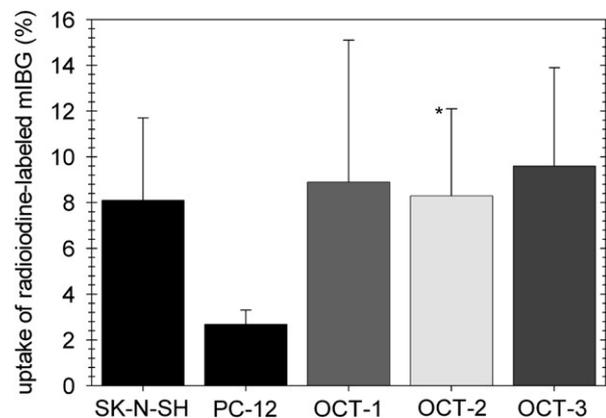


Fig. 4. Uptake of radioiodine-labeled mIBG (f.c. about 10^{-7} M) in SK-N-SH, PC-12 and HEK-293 cells transfected with OCT1, OCT2 or OCT3 after a 30-min incubation period at 37°C ; 1% mIBG uptake/ 10^6 cells \approx about 5×10^{-13} mol mIBG/ 10^6 cells [mean \pm S.D. ($n=3$; $*n=2$)].

pheochromocytoma. Some attempts have already been done to use another derivative of catecholamines, [^{18}F]6-FDA, for imaging of pheochromocytoma using PET where it seems to be superior to mIBG [4,6]. Since it may also be useful in neuroblastoma imaging, we established a method which allows a rapid enzymatic transformation of [^{18}F]6-FDOPA to [^{18}F]6-FDA. [^{18}F]6-FDA was already used in small animal PET using mice bearing a neuroblastoma [31]. 6-FDA behaves in many circumstances like DA and can therefore be taken up by cells of the sympathetic nervous system via the NAT and DAT. However, the positively charged monoamines (catecholamines) and related cationic substances cannot only be taken up via the NAT and DAT but also by organic cation transporters (OCT1, OCT2, OCT3), which are widely distributed on many cell types (Table 1). Therefore, many organs which contain OCT-expressing cells are competing with the uptake of catecholamines and related compounds (like 6-FDA and mIBG) and may lower their specific accumulation into cells of the sympathetic nervous system. Several compounds have been characterised with respect to the preferential uptake via the different OCTs [9,32]. Concerning mIBG, no data were available up to now, but scintigraphic imaging patterns suggest its uptake via one or more OCTs. In this paper we comparatively investigated the uptake of [^3H]DA, [^3H]NA as well as radiolabeled mIBG in SK-N-SH and PC-12 cells compared to HEK-293 cells separately transfected with OCT1, OCT2 and OCT3. The catecholamines DA and NA were taken up much better by the NAT expressing cell lines (DA: SK-N-SH \gg PC-12 \gg OCT1 \sim OCT2 \sim OCT3; NA: SK-N-SH \gg PC-12>OCT3>OCT2>OCT1). In contrast, mIBG was taken up equally or even better by OCT-expressing cells than by SK-N-SH and PC-12 cells (mIBG: OCT1 \sim OCT2 \sim OCT3 \sim SK-N-SH>PC-12). These contrary uptake profiles of mIBG compared to catecholamines resemble the uptake of another strong cationic substrate, [^3H]MPP $^+$, which is taken up much better than catecholamines by OCT-expressing

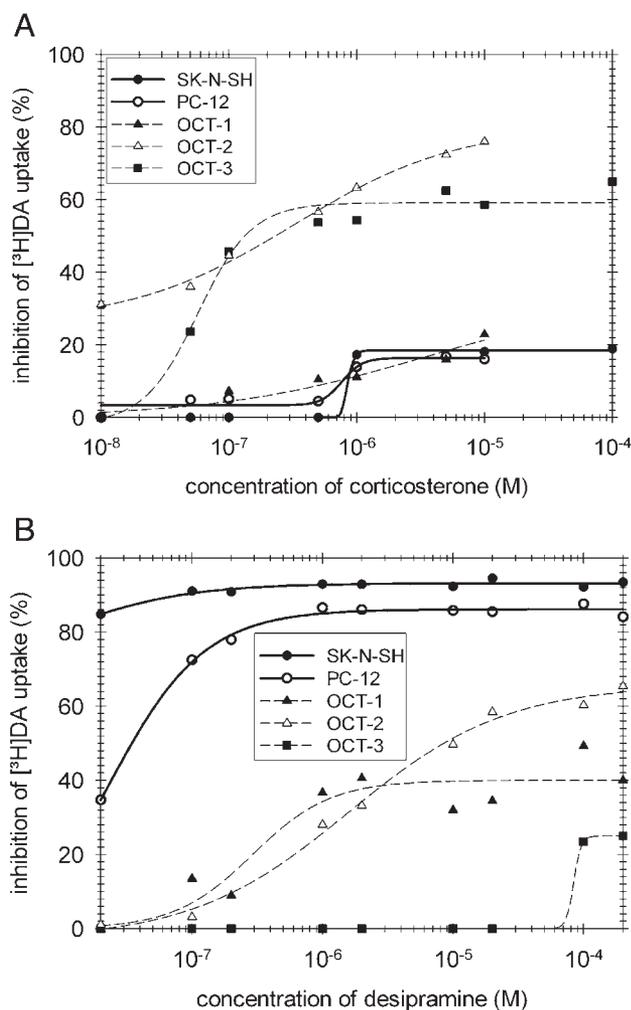


Fig. 5. Concentration-dependent inhibition of [^3H]DA uptake (f.c. 10^{-7} M) (A) by corticosterone and (B) by desipramine in SK-N-SH, PC-12 and HEK-293 cells transfected with OCT1, OCT2 or OCT3 after a 15-min incubation period at 37°C .

cells [32]. From these in vitro data and from clinical data showing the distribution of mIBG in many organs (Fig. 1), it can be presumed that a significant part of mIBG is taken up by OCT-expressing cells at the expense of neuroblastoma or pheochromocytoma cells. Therefore, specific inhibition of mIBG/6-FDA uptake into OCT-expressing cells could shift the uptake ratio towards tumor cells. Several inhibitors with various specificities for the different OCTs were already described, among them, the highly effective disprocynium 24 and decynium 22, as well as corticosterone. Although OCT1 and OCT2 show a higher homology in amino acid sequence (70%) than OCT3 with OCT1 and OCT2 (each 50%), OCT3 is similar, concerning pharmacological features, to OCT2, but not to OCT1 [10–14,33]. In contrast to OCT1, OCT2 and OCT3 were strongly and similarly inhibited by the mentioned specific inhibitors. Among the different inhibitors, the corticosteroid corticosterone, with only small glucocorticoid and mineralocorticoid side effects, may be a promising candidate for a combined use with [$^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$]mIBG or [^{18}F]-

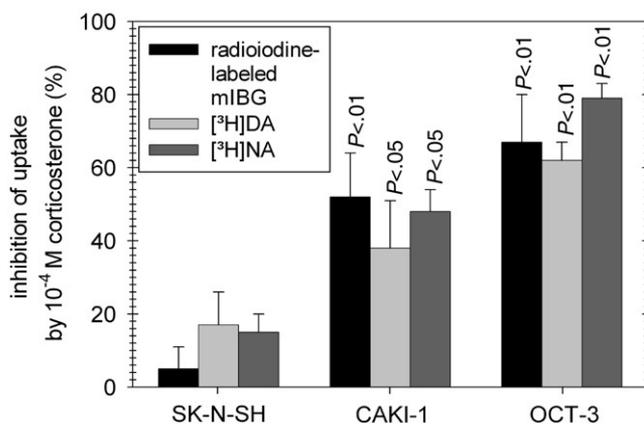


Fig. 6. Compared inhibition of the [^3H]DA, [^3H]NA and radioiodine-labeled mIBG by 10^{-4} M corticosterone in SK-N-SH, Caki-1 and HEK-293 cells transfected with OCT3 after a 30-min incubation at 37°C . Mean \pm S.D. ($n=3$). $P<0.05$, statistical significant; $P<0.01$, statistical highly significant.

FDA for improving the imaging or therapy. We therefore investigated comparatively the influence of corticosterone on the uptake of mIBG and catecholamines into SK-N-SH-, PC-12- and OCT-expressing cells. As shown in Fig. 5a, uptake of [^3H]DA was strongly inhibited by corticosterone in OCT2- and OCT3-expressing cells, but to a smaller degree in SK-N-SH and PC-12 cells, as well as in OCT1 expressing cells. Like [^3H]DA, uptake of [^3H]NA and radiolabeled mIBG into OCT3-expressing cells was inhibited in a similar way. In this set of experiments, a human renal carcinoma cell line (Caki-1) was also used, which naturally expresses OCT3 [30], showing similar results as HEK-293 cells artificially transfected with OCT3 (Fig. 6). Consequently, the relative amount of catecholamines and mIBG is shifted towards NAT-expressing tumor cells in the presence of 10^{-4} M corticosterone (Table 3).

For completion, the effects of desipramine, a well-known inhibitor of NAT [29], were also analysed, showing the expected strong inhibiting effect on the uptake into

Table 3

Shift of the uptake ratios of [^3H]DA, [^3H]NA and radioiodine-labeled mIBG towards SK-N-SH cells compared to HEK-293 cells transfected with OCT3 and Caki-1 cells in the presence of 10^{-4} M corticosterone

Substrate	Comparison	In absence of corticosterone	In presence of 10^{-4} M corticosterone	Factor
Radioiodine-labeled mIBG	SK-N-SH:OCT3	0.8:1	2.8:1	3.5
	SK-N-SH:Caki-1	0.7:1	1.5:1	2.1
[^3H]DA	SK-N-SH:OCT3	28.3:1	60.8:1	2.2
	SK-N-SH:Caki-1	6.9:1	9.5:1	1.4
[^3H]NA	SK-N-SH:OCT3	8.0:1	34.2:1	4.3
	SK-N-SH:Caki-1	3.4:1	5.5:1	1.6

Uptake into OCT3 transfected HEK-293 cells as well as uptake into Caki-1 cells, respectively, was arbitrarily set as 1 in each experiment. Factor: x -times increased uptake into SK-N-SH cells in the presence of corticosterone compared to OCT3 expressing cells ($n=3$).

SK-N-SH and PC-12 cells and only small effects of OCT-expressing cells (Fig. 5B).

Based on these experiments, we will conduct clinical studies using radiolabeled mIBG in combination with corticosterone. Corticosteroids, like corticosterone, are already clinically used in the treatment of children. However, corticosterone itself is not used yet; therefore, animal experiments are necessary first. The uptake of radiolabeled mIBG in mice will be comparatively measured in the absence and presence of different corticosteroids.

Besides its potential shift of mIBG uptake towards neuroblastoma cells, there are some other possible, positive effects of corticosterone. On the one hand, it could reduce cisplatin-induced nephrotoxicity. Cisplatin, which is taken up by OCT2 in the kidney [34], is a chemotherapeutic agent used in the therapy of neuroblastoma in addition to [¹³¹I]mIBG. On the other hand the glucocorticoid effect of corticosterone may be useful in reducing inflammation, sometimes observed during [¹³¹I]mIBG therapy.

Acknowledgment

We thank Gisela Merkel for excellent technical assistance and John Anderson for critical reading of the manuscript.

The project was supported by the Deutschen Krebshilfe, Grant 10-2082-Br.

References

- [1] Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, et al. Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 1996;44:989–96.
- [2] Lode HN, Bruchelt G, Seitz G, Gebhardt S, Gekeler V, Niethammer D, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastoma cell lines: correlations to meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression. *Eur J Cancer* 1995;31A:586–90.
- [3] Glowniak JV, Kilty JE, Amara SG, Hoffman BJ, Turner FE. Evaluation of metaiodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine and serotonin transporters. *J Nucl Med* 1993;34:1140–6.
- [4] Ilias I, Yu J, Carrasquillo JA, Chen CC, Eisenhofer G, Whatley M, et al. Superiority of 6-[18F]-fluorodopamine positron emission tomography versus [131I]-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in the localization of metastatic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4083–7.
- [5] Mamede M, Carrasquillo JA, Chen CC, Del Corral P, Whatley M, Ilias I, et al. Discordant localization of 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in 6-[18F]-fluorodopamine- and [(123)I]-metaiodobenzylguanidine-negative metastatic pheochromocytoma sites. *Nucl Med Commun* 2006;27:31–6.
- [6] Pacak K, Eisenhofer G, Carrasquillo JA, Chen CC, Li ST, Goldstein DS. 6-[18F]fluorodopamine positron emission tomographic (PET) scanning for diagnostic localization of pheochromocytoma. *Hypertension* 2001;38:6–8.
- [7] Timmers HJ, Carrasquillo JA, Whatley M, Eisenhofer G, Chen CC, Ling A, et al. Usefulness of standardized uptake values for distinguishing adrenal glands with pheochromocytoma from normal adrenal glands by use of 6-18F-fluorodopamine PET. *J Nucl Med* 2007;48:1940–4.
- [8] Seitz G, Stegmann HB, Jäger HH, Schlude HM, Wolburg H, Roginsky VA, et al. Neuroblastoma cells expressing the noradrenaline transporter are destroyed more selectively by 6-fluorodopamine than by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* 2000;75:511–20.
- [9] Schömig E, Lazar A, Gründemann D. Extraneuronal monoamine transporter and organic cation transporters 1 and 2: a review of transport efficiency. *Handb Exp Pharmacol* 2006;151–80.
- [10] Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Ording N, Schmidt A, Schömig E. Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *J Biol Chem* 1997;272:10408–13.
- [11] Gründemann D, Koster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, et al. Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem* 1998;273:30915–20.
- [12] Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* 1998;1:349–51.
- [13] Hayer-Zillgen M, Bruss M, Bonisch H. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* 2002;136:829–36.
- [14] Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:2–9.
- [15] Borowsky B, Hoffman BJ. Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. *Int Rev Neurobiol* 1995;38:139–99.
- [16] Breidert T, Spitzenberger F, Gründemann D, Schömig E. Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br J Pharmacol* 1998;125:218–24.
- [17] Eisenhofer G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* 2001;91:35–62.
- [18] Giros B, el Mestikawy S, Bertrand L, Caron MG. Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett* 1991;295:149–54.
- [19] Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. eleventh ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
- [20] Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 1994;372:549–52.
- [21] Haag C, Berkels R, Gründemann D, Lazar A, Taubert D, Schömig E. The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain. *J Neurochem* 2004;88:291–7.
- [22] Ramamoorthy S, Prasad PD, Kulanthaivel P, Leibach FH, Blakely RD, Ganapathy V. Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast. *Biochemistry* 1993;32:1346–53.
- [23] Bonnin F, Lumbroso J, Tenenbaum F, Hartmann O, Parmentier C. Refining interpretation of MIBG scans in children. *J Nucl Med* 1994;35:803–10.
- [24] Paltiel HJ, Gelfand MJ, Elgazzar AH, Washburn LC, Harris RE, Masters PR, et al. Neural crest tumors: I-123 MIBG imaging in children. *Radiology* 1994;190:117–21.
- [25] Treuner J, Klingebiel T, Feine U, Buck J, Bruchelt G, Dopfer R, et al. Clinical experiences in the treatment of neuroblastoma with 131I-metaiodobenzylguanidine. *Pediatr Hematol Oncol* 1986;3:205–16.
- [26] Gründemann D, Koschker AC, Haag C, Honold C, Zimmermann T, Schömig E. Activation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) from rat expressed in 293 cells. *Br J Pharmacol* 2002;137:910–8.
- [27] Sisson JC, Frager MS, Valk TW, Gross MD, Swanson DP, Wieland DM, et al. Scintigraphic localization of pheochromocytoma. *N Engl J Med* 1981;305:12–7.

- [28] Buck J, Bruchelt G, Girgert R, Treuner J, Niethammer D. Specific uptake of *m*-[125I]iodobenzylguanidine in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Cancer Res* 1985;45:6366–70.
- [29] Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG. Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 1991;350:350–4.
- [30] Schömig E, Babin-Ebell J, Schonfeld CL, Russ H, Trendelenburg U. Human Caki-1 cells are the first model for extraneuronal transport of noradrenaline (uptake2) which is based on a clonal cell line. *J Neural Transm Suppl* 1990;32:437–40.
- [31] Bruchelt G, Kuçi Z, Reischl G, Mueller I, Pirsig S, Handgretinger R, et al. [18F]6-FluoroDOPA and [18F]6-Fluorodopamine for PET in neuroblastoma: Comparative in vitro and first in vivo experiments using the small animal PET model. *Advances in neuroblastoma research*, abstract TR125 2008 Chiba, Japan; May 21-24.
- [32] Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, Koster S, Schömig E. Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* 1999;56:1–10.
- [33] Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhondova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, et al. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 1997; 16:871–81.
- [34] Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K. Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1823–31.