

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie u. Onkologie (Abt.I)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Aufnahme und Metabolismus von  
6-Fluoro-DOPA und 6-Fluoro-Dopamin  
in Neuroblastomzellen und  
OCT-exprimierenden Zellen**

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

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

**vorgelegt von  
Jörg Martin Sauer  
aus  
Offenburg**

**2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Reischl

*Meinen Eltern  
in Dankbarkeit  
gewidmet*

# ***Inhaltsverzeichnis***

|   | Seite        |
|---|--------------|
| Abkürzungsverzeichnis   |              |
| <b>1     <i>Einleitung</i></b>  | <b>- 1 -</b> |
| <b>1.1   Einführung in die Fragestellung der Arbeit</b>                           | <b>- 1 -</b> |
| <b>1.2   Theoretische Grundlagen</b>  | <b>- 2 -</b> |
| 1.2.1 Der Katecholaminmetabolismus  | - 2 -        |
| 1.2.2 Der Katecholaminmetabolismus des Neuroblastoms                              | - 5 -        |
| 1.2.3 Das Neuroblastom  | - 7 -        |
| 1.2.3.1     Definition und Ätiologie  | - 7 -        |
| 1.2.3.2     Risikofaktoren  | - 7 -        |
| 1.2.3.3     Tumorstadien und -klassifikationen                                    | - 8 -        |
| 1.2.3.4     Molekulargenetische Aspekte des Neuroblastoms                         | - 9 -        |
| 1.2.3.5     Besonderheit des Neuroblastoms – eine hohe<br>Rückbildungsrate        | - 12 -       |
| 1.2.3.6     Symptomatik   | - 12 -       |
| 1.2.3.7     Diagnostik  | - 13 -       |
| 1.2.3.7.1    Labordiagnostik und die Möglichkeit von<br>Screeninguntersuchungen   | - 13 -       |
| 1.2.3.7.2    Histopathologische Diagnostik  | - 14 -       |
| 1.2.3.7.3    Bildgebung   | - 15 -       |
| 1.2.3.8     Therapie  | - 18 -       |
| 1.2.3.8.1    Therapie des Neuroblastom-Patienten der Niedrigrisikogruppe          | - 18 -       |
| 1.2.3.8.2    Therapie des Neuroblastom-Patienten der Intermediär-<br>Risikogruppe | - 19 -       |
| 1.2.3.8.3    Therapie des Neuroblastom-Patienten der Hochrisikogruppe             | - 19 -       |
| 1.2.3.9     Prognose  | - 20 -       |

|            |  |               |
|------------|--|---------------|
| 1.2.4      | Die Transportsysteme   | - 21 -        |
| 1.2.4.1    | Die Aufnahme von L-DOPA über die L-Typ<br>Aminosäuretransporter (LAT)                          | - 22 -        |
| 1.2.4.2    | Die Aufnahme von Dopamin über die neuronalen<br>Monoamintransporter                            | - 25 -        |
| 1.2.4.2.1  | Der Dopamintransporter (DAT)   | - 25 -        |
| 1.2.4.2.2  | Der Noradrenalintransporter (NAT)  | - 27 -        |
| 1.2.4.3    | Die Aufnahme von Dopamin über die nicht-neuronalen<br>Monoamintransporter                      | - 29 -        |
| 1.2.5      | Aktuelle Entwicklungen in der PET und SPECT Diagnostik   | - 32 -        |
| <b>1.3</b> | <b>Ziel der Arbeit</b>   | <b>- 34 -</b> |
| <br>       |  |               |
| <b>2</b>   | <b><i>Materialien und Methoden</i></b>   | <b>- 36 -</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Materialien</b>   | <b>- 36 -</b> |
| 2.1.1      | Verbrauchsmaterialien  | - 36 -        |
| 2.1.2      | Geräte und Messapparaturen   | - 37 -        |
| 2.1.3      | Chemikalien und Reagenzien   | - 38 -        |
| 2.1.4      | Radioaktive Substanzen   | - 40 -        |
| 2.1.5      | Verwendete Lösungen und Zellkulturmedien   | - 40 -        |
| 2.1.5.1    | Lösungen   | - 40 -        |
| 2.1.5.2    | Zellkulturmedien   | - 41 -        |
| 2.1.6      | Verwendete Zelllinien  | - 42 -        |
| 2.1.6.1    | Charakterisierung der verwendeten Zelllinien   | - 43 -        |
| 2.1.6.1.1  | Die SK-N-SH Neuroblastom-Zelllinie   | - 43 -        |
| 2.1.6.1.2  | Die Kelly Neuroblastom-Zelllinie   | - 43 -        |
| 2.1.6.1.3  | Die Caki-1 Nierenkarzinom-Zelllinie  | - 44 -        |
| 2.1.6.1.4  | Die EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293<br>Zelllinien                                   | - 44 -        |
| 2.1.7      | Übersicht über chemische Strukturen der verwendeten<br>Katecholamine und analogen Verbindungen | - 45 -        |
| <br>       |  |               |
| <b>2.2</b> | <b>Methoden</b>  | <b>- 48 -</b> |
| 2.2.1      | Herstellung der Lösungen   | - 48 -        |
| 2.2.1.1    | Herstellung der Ascorbatlösung   | - 48 -        |

|           |   |        |
|-----------|---|--------|
| 2.2.1.2   | Herstellung der 6-Fluoro-DOPA-Lösung und der 6-Fluoro-Dopamin-Lösung  | - 49 - |
| 2.2.1.3   | Herstellung der Glukoselösung   | - 49 - |
| 2.2.1.4   | Herstellung potentieller Inhibitoren  | - 50 - |
| 2.2.2     | Arbeiten mit Zellkulturen   | - 51 - |
| 2.2.2.1   | Kultivierung der Zellen   | - 51 - |
|           | Der Einsatz von Ascorbat bei der Kultivierung der Zelllinien  | - 52 - |
| 2.2.2.2   | Ernten und Passagieren der Zellen   | - 53 - |
| 2.2.2.3   | Einfrieren und Auftauen von Zelllinien  | - 55 - |
| 2.2.2.3.1 | Das Einfrieren von Zelllinien   | - 55 - |
| 2.2.2.3.2 | Das Auftauen von Zelllinien   | - 55 - |
| 2.2.2.4   | Die Zellzahlbestimmung  | - 56 - |
| 2.2.3     | Beschreibung der Versuchsdurchführung   | - 56 - |
| 2.2.3.1   | Zelluläre Aufnahme von 6-FDOPA und 6-Fluoro-Dopamin   | - 56 - |
| 2.2.3.2   | Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)  | - 59 - |
| 2.2.3.2.1 | Das Prinzip der elektrochemischen Detektion   | - 59 - |
| 2.2.3.2.2 | Der Aufbau einer HPLC-Apparatur   | - 61 - |
| 2.2.3.2.3 | Analysebedingungen der HPLC   | - 62 - |
| 2.2.3.2.4 | Die Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse   | - 64 - |
| 2.2.3.3   | Proteinbestimmung   | - 66 - |
| 2.2.3.3.1 | Die Probenaufarbeitung  | - 66 - |
| 2.2.3.3.2 | Die Messung der Proben  | - 66 - |
| 2.2.3.3.3 | Die Erstellung einer Eichkurve  | - 67 - |
| 2.2.3.3.4 | Beispielhafte Berechnung der Ergebnisse in pMole<br>Katecholamine pro 100 µg Protein                                  | - 68 - |
| 2.2.3.4   | Zelluläre Aufnahme von radioaktiven Substanzen  | - 69 - |
| 2.2.3.4.1 | Enzymatische Decarboxylierung von [ <sup>14</sup> C]-DOPA zu<br>[ <sup>14</sup> C]-Dopamin                            | - 69 - |
| 2.2.3.4.2 | Aufnahmeversuche von [ <sup>14</sup> C]-DOPA, [ <sup>14</sup> C]-Dopamin und<br>[ <sup>3</sup> H]-Dopamin             | - 69 - |
| 2.2.3.4.3 | Beispielhafte Berechnung der Ergebnisse in pMole<br>Katecholamine pro 10 <sup>6</sup> Zellen innerhalb von 15 Minuten | - 72 - |

|            |   |                  |
|------------|---|------------------|
| <b>3</b>   | <b><i>Ergebnisse</i></b>  | <b>- 73 -</b>    |
| <b>3.1</b> | <b>Zelluläre Aufnahme von 6-FDOPA und 6-Fluoro-Dopamin</b>  | <b>- 74 -</b>    |
| 3.1.1      | Proteinbestimmung   | - 74 -           |
| 3.1.1.1    | Die Erstellung einer Eichkurve  | - 75 -           |
| 3.1.1.2    | Die Bestimmung des Proteingehalts   | - 76 -           |
| 3.1.2      | Zeitabhängige Aufnahme von 6-FDOPA und 6-FDA  | - 77 -           |
| 3.1.2.1    | Vorbemerkung zur Kalibrierung der HPLC-Anlage   | - 77 -           |
| 3.1.2.2    | Katecholaminmuster der SK-N-SH und der Kelly Zelllinie  | - 78 -           |
| 3.1.2.3    | Aufnahme und Metabolismus von 6-FDOPA   | - 80 -           |
| 3.1.2.4    | Aufnahme und Metabolismus von 6-Fluoro-Dopamin  | - 87 -           |
| 3.1.2.5    | Zusammenfassung der zellulären Aufnahme von 6-FDOPA<br>und 6-Fluoro-Dopamin   | - 92 -           |
| <b>3.2</b> | <b>Zelluläre Aufnahme von radioaktiven Substanzen</b>   | <b>- 93 -</b>    |
| 3.2.1      | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA und [ <sup>14</sup> C]-Dopamin in SK-N-SH und Kelly<br>Zellen nach dessen Umwandlung aus [ <sup>14</sup> C]-DOPA   | - 93 -           |
| 3.2.1.1    | Enzymatische Umwandlung von [ <sup>14</sup> C]-DOPA zu [ <sup>14</sup> C]-Dopamin   | - 95 -           |
| 3.2.1.2    | Vergleich der Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA mit [ <sup>14</sup> C]-Dopamin<br>Vergleich der Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA und [ <sup>14</sup> C]-Dopamin<br>in SK-N-SH und Kelly Zellen | - 96 -<br>- 99 - |
|            | Hemmung der Aufnahme des enzymatisch aus [ <sup>14</sup> C]-DOPA<br>gebildeten [ <sup>14</sup> C]-Dopamins  | - 100 -          |
|            | Hemmung der Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA  | - 101 -          |
| 3.2.2      | Einbau von [ <sup>14</sup> C]-DOPA und [ <sup>3</sup> H]-Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen<br>im Vergleich zu Kelly Zellen   | - 103 -          |
| 3.2.2.1    | Einbau von [ <sup>14</sup> C]-DOPA in OCT1-HEK 293 Zellen im Vergleich<br>zu Kelly Zellen   | - 104 -          |
| 3.2.2.2    | Einbau von [ <sup>3</sup> H]-Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen im<br>Vergleich zu Kelly Zellen   | - 105 -          |
| 3.2.2.3    | Zusammenfassende Beurteilung der Kapitel 3.2.2.1 und<br>3.2.2.2   | - 107 -          |
| 3.2.3      | Einfluss von Desipramin auf die Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA und<br>[ <sup>3</sup> H]-Dopamin in SK-N-SH Zellen und Zellen mit organischen<br>Kationentransportern (OCT Zellen)               | - 109 -          |

|          |  |                |
|----------|--|----------------|
| <b>4</b> | <b><i>Diskussion</i></b>   | <b>- 114 -</b> |
| 4.1      | Vergleich der Aufnahme von DOPA und Dopamin in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen                | - 116 -        |
| 4.2      | Zeitabhängige Umsetzung von 6-Fluoro-DOPA nach Aufnahme in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen    | - 126 -        |
| 4.3      | Zeitabhängige Umsetzung von 6-Fluoro-Dopamin nach Aufnahme in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen | - 130 -        |
| 4.4      | Fazit  | - 132 -        |
| <b>5</b> | <b><i>Zusammenfassung</i></b>  | <b>- 134 -</b> |
|          | Abbildungsverzeichnis  | - 137 -        |
|          | Tabellenverzeichnis  | - 141 -        |
|          | Literaturverzeichnis   | - 143 -        |
|          | Danksagung   | - 166 -        |
|          | Lebenslauf   | - 168 -        |

# Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung       | Begriffserklärung   |
|-----------------|---|
| A               | Adrenalin   |
| AA              | Ascorbat ( <i>engl. ascorbic acid</i> ), Vitamin C  |
| Abb.            | Abbildung   |
| ATCC            | American Type Culture Collection, Maryland, USA   |
| BCH             | 2-Aminobicyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylsäure   |
| BDNF            | Brain-derived-neurotrophic-factor   |
| Bq              | Becquerel, Maßeinheit der radioaktiven Aktivität  |
| bzw.            | beziehungsweise   |
| °C              | Grad Celsius  |
| ca.             | circa   |
| Caki-1          | humane Nierenkarzinomzelllinie  |
| Ci              | Curie, Maßeinheit der radioaktiven Aktivität  |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid   |
| COMT            | Catechol-O-methyltransferase  |
| cpm             | Zerfälle pro Minute ( <i>engl. Counts per Minute</i> ), Maßeinheit der radioaktiven Aktivität |
| CT              | Computertomografie  |
| DA              | Dopamin   |
| DAT             | Dopamintransporter  |
| DBH             | Dopamin-β-Hydroxylase   |
| DHBA            | 3,4-Dihydroxybenzylamin   |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)   |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid  |
| DOPA            | 3,4-Dihydroxyphenylalanin   |
| DSMZ            | German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, D                        |
| EFS Rate        | Ereignisfreie Überlebensrate ( <i>engl. Event-free survival rate</i> )                        |
| EMT             | Extraneuronalen Monoamintransporter   |
| FCS             | Fetales Kälberserum ( <i>engl. Fetal calf serum</i> )   |

|                            |   |
|----------------------------|---|
| f.c.                       | Endkonzentration ( <i>engl. final concentration</i> )   |
| 6-FDA                      | 6-Fluoro-Dopamin  |
| [ <sup>18</sup> F]-6-FDA   | [ <sup>18</sup> F]-6-Fluoro-Dopamin   |
| [ <sup>18</sup> F]-FDG     | [ <sup>18</sup> F]-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose   |
| 6-FDOPA                    | 6-Fluoro-3,4-Dihydroxyphenylalanin (6-Fluoro-DOPA)  |
| [ <sup>18</sup> F]-6-FDOPA | [ <sup>18</sup> F]-6-Fluoro-3,4-Dihydroxyphenylalanin ([ <sup>18</sup> F]-6-Fluoro-DOPA)                                |
| 6-FNA                      | 6-Fluoro-Noradrenalin   |
| g                          | 1. Gramm<br>2. Maßeinheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung   |
| h                          | Stunde  |
| HCl                        | Salzsäure   |
| HClO <sub>4</sub>          | Perchlorsäure   |
| HEK-293                    | Humane embryonale Nierentumorzelllinie ( <i>engl. Human Embryonic Kidney</i> )  |
| HPLC                       | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>engl. high performance liquid chromatography</i> )                        |
| HVS                        | Homovanillinsäure ( <i>engl. homo vanillic acid</i> )   |
| <sup>123</sup> I           | Radiojodisotop 123  |
| <sup>131</sup> I           | Radiojodisotop 131  |
| INPC                       | International Neuroblastoma Pathology Classification  |
| INRG                       | International Neuroblastoma Risk Group  |
| INRGSS                     | International Neuroblastoma Risk Group Staging System   |
| INSS                       | International Neuroblastoma Staging System  |
| IU                         | Internationale Einheit ( <i>engl. International unit</i> )  |
| IUPAC                      | Internationale Union für reine und angewandte Chemie ( <i>engl. International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ) |
| J.                         | Jahre   |
| keV                        | Kilo-Elektronenvolt   |
| l                          | Liter   |
| λ                          | Lambda, Formelzeichen für die Wellenlänge   |
| L-ADC                      | Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase  |
| LAT                        | L-Typ Aminosäuretransporter   |
| LDH                        | Laktatdehydrogenase   |

---

|                          |  |
|--------------------------|--|
| M                        | Molarität in Mol pro Liter, Stoffmengenkonzentration   |
| MAO                      | Monoaminoxidase  |
| mRNA                     | Boten-Ribonukleinsäure ( <i>engl. messenger-ribonucleic acid</i> )   |
| [ <sup>99m</sup> Tc]-    | [ <sup>99m</sup> Tc]-Methylen-Diphosphat ([ <sup>99m</sup> Tc]-MDP)  |
| MDP                      |  |
| MG                       | Molekulargewicht in Gramm pro Mol, molekulare Masse  |
| mIBG                     | Metajodobenzylguanidin   |
| [ <sup>123</sup> I]-mIBG | [ <sup>123</sup> I]-Metajodobenzylguanidin   |
| [ <sup>131</sup> I]-mIBG | [ <sup>131</sup> I]-Metajodobenzylguanidin   |
| min                      | Minute   |
| Mio.                     | Millionen (10 <sup>6</sup> )   |
| MPP+                     | 1-Methyl-4-phenylpyridinium  |
| MRT                      | Magnetresonanztomografie bzw. Kernspintomografie   |
| MW                       | Mittelwert, Arithmetisches Mittel  |
| n                        | Stichprobenumfang, Fallzahl  |
| NA                       | Noradrenalin   |
| NAT                      | Noradrenalintransporter  |
| ND                       | Nicht nachweisbar ( <i>engl. Non-Detectable</i> )  |
| NGF                      | Nerve-growth-faktor  |
| NSE                      | Neuronspezifische Enolase  |
| NT3                      | Neurotrophin-3   |
| NT4                      | Neurotrophin-4   |
| o.                       | oder   |
| OCT                      | Organischer Kationentransporter ( <i>engl. organic cation transporter</i> )  |
| PBS <sup>-</sup>         | Phosphat gepufferte Saline ohne Kalzium (Ca <sup>2+</sup> ) und Magnesium (Mg <sup>2+</sup> )                              |
| PBS <sup>++</sup>        | Phosphat gepufferte Saline mit Kalzium (Ca <sup>2+</sup> ) und Magnesium (Mg <sup>2+</sup> )                               |
| PET                      | Positronen-Emissions-Tomografie  |
| pH                       | Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration  |
| PNMT                     | Phenylethanolamin-N-methyltransferase  |
| QRT-PCR                  | Quantitative Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion   |
| rpm                      | Umdrehungen pro Minute ( <i>engl. rounds per minute</i> ), geräteabhängige Maßangabe für die Intensität der Zentrifugation |

---

|         |   |
|---------|---|
| RPMI    | Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)  |
| SD      | Standardabweichung ( <i>engl. standard deviation</i> )  |
| sek     | Sekunde   |
| SK-N-SH | humane Neuroblastomzelllinie  |
| SLC     | solute carrier transporter  |
| SPECT   | Einzelphotonen-Emissions-Tomografie ( <i>engl. single photon emission computed tomography</i> ) |
| Tab.    | Tabelle   |
| TAT1    | T-Typ Aminosäuretransporter 1   |
| THL     | Tyrosinhydroxylase  |
| TNFR    | Tumornekrosefaktorrezeptor  |
| Trk     | Tyrosinkinaserzeptor  |
| u.      | und   |
| U       | Umdrehung   |
| u.a.    | unter anderem   |
| V       | Volt  |
| VLE     | Very Low Endotoxin  |
| VMS     | Vanillinmandelsäure, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure ( <i>engl. vanillyl mandelic acid</i> )     |
| w       | mit ( <i>engl. with</i> )   |
| w/o     | ohne ( <i>engl. without</i> )   |
| z.B.    | zum Beispiel  |
| ZNS     | Zentralnervensystem   |

# 1 **Einleitung**

## 1.1 **Einführung in die Fragestellung der Arbeit**

In der Diagnostik und Therapieverlaufkontrolle des Neuroblastoms wird die [ $^{123}\text{I}$ ]-Metajodobenzylguanidin ([ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG)-Szintigrafie mittels Einzelphotonen-Emissions-Tomografie, kurz SPECT (*engl. single photon emission computed tomography*), routinemäßig eingesetzt. Diese Substanz wird über die Noradrenalintransporter (NAT) von den Neuroblastomzellen aufgenommen, unerwünschterweise jedoch über organische Kationentransporter (OCTs) auch von anderen Zellen. In der Tumordiagnostik hat sich seit einigen Jahren die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) in Kombination mit der Computertomografie (CT) bewährt. Hauptsächlich finden bisher die [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) aber auch weitere Radiopharmaka ihren Einsatz. Für das Neuroblastom sind [ $^{18}\text{F}$ ]-6-Fluoro-Dopamin ([ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA) und [ $^{18}\text{F}$ ]-6-Fluoro-3,4-Dihydroxyphenylalanin ([ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA) aussichtsreiche Substanzen für die klinische Anwendung beim PET/CT. [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA kann dabei durch enzymatische Decarboxylierung aus [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA gewonnen werden. [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA verhält sich bei den zellulären Aufnahmevorgängen wie Dopamin und gelangt über die Dopamintransporter (DAT), Noradrenalintransporter (NAT) und die organischen Kationentransporter (OCT) in die Zelle, während [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA, das sich wie 3,4-Dihydroxyphenylalanin, kurz DOPA, verhält, über verschiedene L-Typ Aminosäuretransporter (LAT) in die Zelle gelangt.

In dieser Arbeit wurde in Zellkulturversuchen mit NAT-exprimierenden Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zelllinien die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin und [ $^3\text{H}$ ]-DOPA untersucht. Daneben wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie, kurz HPLC (*engl. high performance liquid chromatography*), die Aufnahme und der intrazelluläre Metabolismus von unmarkiertem 6-FDA und 6-FDOPA charakterisiert.

In der Einleitung werden daher im Folgenden der allgemeine und der Neuroblastom-spezifische Katecholaminmetabolismus, die Entität Neuroblastom, die für die Aufnahme von [<sup>18</sup>F]-6-FDA und [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA relevanten Transporter, sowie aktuelle und für die Fragestellung relevante Entwicklungen im Bereich der Nuklearmedizin vorgestellt.

## **1.2 Theoretische Grundlagen**

### **1.2.1 *Der Katecholaminmetabolismus***

Katecholamine werden im menschlichen Körper physiologischerweise in sympathischen Nervenfasern als Neurotransmitter und in dem sich aus dem Neuralrohr entwickelten Nebennierenmark als Hormone synthetisiert. Ausgangssubstanz für die Synthese der Katecholamine Dopamin (DA), Noradrenalin (NA) und Adrenalin ist die proteinogene und aromatische Aminosäure Tyrosin, welche durch Hydroxylierung aus der essentiellen Aminosäure Phenylalanin entsteht. Tyrosin ist daher eine bedingt essentielle Aminosäure. Durch eine weitere Hydroxylierung durch das zweiwertiges Eisen enthaltende Enzym Tyrosinhydroxylase, dem Coenzym Tetrahydrobiopterin und Sauerstoff entsteht 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) (Nagatsu et al., 1964). Das biogene Amin Dopamin wird anschließend durch die DOPA-Decarboxylase (auch Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase genannt) unter Kohlenstoffdioxidabspaltung synthetisiert (Holtz et al., 1938). Pyridoxalphosphat ist dabei Cofaktor. Die Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin erfolgt mit Hilfe der Dopamin-β-Hydroxylase, Ascorbinsäure und Sauerstoff (Leven et al., 1960). Als weiterer Schritt wird NA unter der N-Methyltransferase und S-Adenosylmethionin zu Adrenalin methyliert (Engelhardt et al., 1954) (siehe Abbildung 1).

Dieser Stoffwechselweg erfolgt in verschiedenen Kompartimenten. Während die ersten Schritte bis zur Synthese von Dopamin sich im Zytoplasma abspielen, erfolgen die weiteren Reaktionsschritte in Vesikeln, die sich in Varikositäten, blasigen

Anschwellungen sympathischer Neuronen, befinden. Im Gegensatz zu sympathischen Neuronen, in denen der Katecholaminstoffwechsel nur bis zur Synthese und Speicherung von Noradrenalin gelangt und als Neurotransmitter seine Anwendung findet, können die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks die Synthese bis zur Bildung von Adrenalin fortsetzen. Das für die Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin benötigte S-Adenosylmethionin befindet sich im Zytosol, sodass für diese abschließende Reaktion vor der Speicherung von Adrenalin innerhalb der Vesikel Noradrenalin in das Zytosol geschleust und anschließend von den Vesikeln wieder aufgenommen werden muss. Der Vesikeltransportvorgang ist ein sowohl  $Mg^{2+}$  als auch ATP-abhängiger Vorgang (siehe Abbildung 1). Ob und in welchen Konzentrationen die einzelnen Stoffwechselprodukte in den verschiedenen Geweben produziert werden, unterliegt den spezifischen Enzymkonzentrationen der Zellen. So findet sich im Nebennierenmark ein Adrenalin-Noradrenalin-Verhältnis von 4:1.

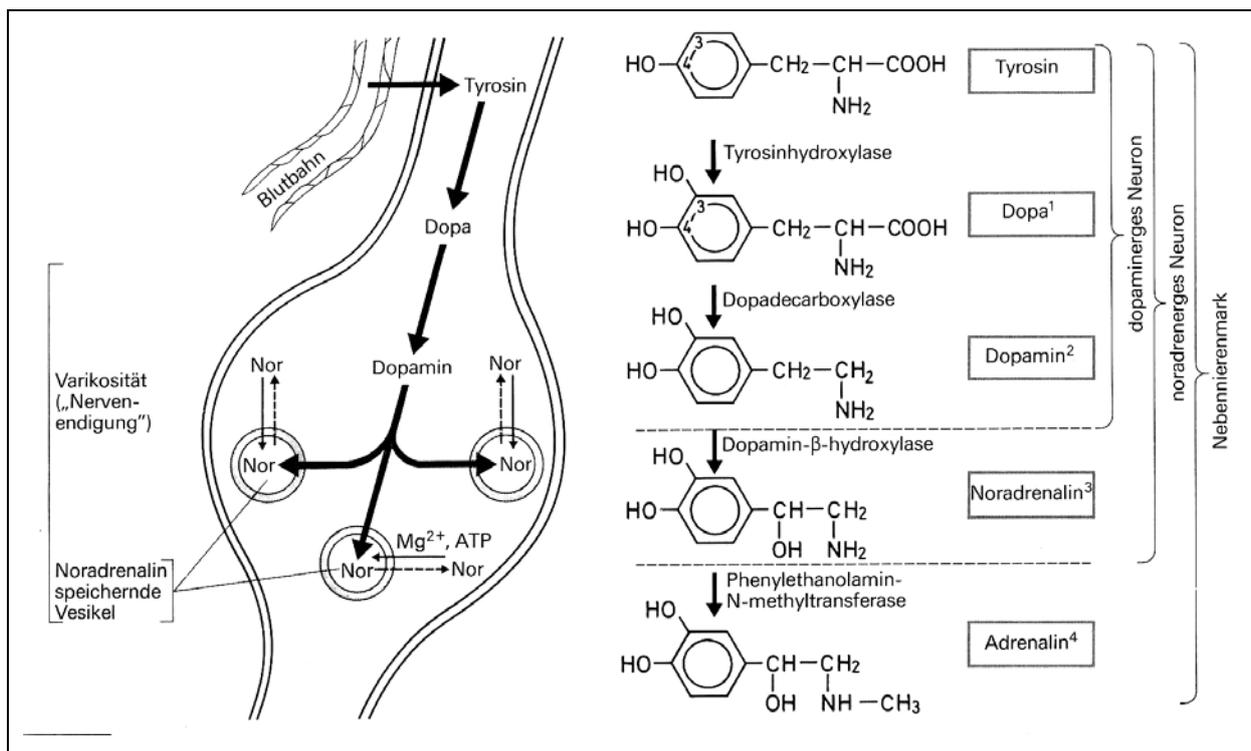


Abbildung 1: Synthese und Speicherung von Katecholaminen in dopaminergen und noradrenergen Neuronen. (Forth et al., 1987)  
 Legende: Nor = Noradrenalin.

Der Abbau der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin mündet zum größten Teil in die von der Leber synthetisierte 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (auch Vanillinmandelsäure genannt, kurz VMS) (Armstrong et al., 1957). Zwei Enzyme spielen bei diesem Abbauvorgang eine entscheidende Rolle: die zytoplasmatische Catechol-O-methyltransferase (COMT) und die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Monoaminoxidase (MAO) (Richter, 1937). Im Gegensatz zum Nebennierenmark findet sich in sympathischen Nervenzellen zwar auch eine MAO, eine COMT hingegen fehlt (Graefe & Henseling, 1983). Noradrenalin und Adrenalin werden durch Methylierung von der COMT mit Hilfe von S-Adenosylmethionin zu 3-Methoxynoradrenalin (auch Normetanephrin genannt) bzw. zu 3-Methoxyadrenalin (auch Metanephrin genannt) methyliert. In einem zweiten Schritt werden die Stoffwechselzwischenprodukte durch die MAO zu einem Aldehyd und weiter zu Vanillinmandelsäure oxidiert. Hauptsächlich entsteht Vanillinmandelsäure aus 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (Kopin, 1985), welches zu einem geringen Anteil auch direkt neben der Vanillinmandelsäure als Abbauprodukt der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin ausgeschieden wird (Axelrod et al., 1959) (siehe Abbildung 2).

Die MAO findet sich neben den dopaminergen und noradrenergen Neuronen – u.a. dem Bildungs- und Speicherort der Katecholamine – vor allen Dingen in der Leber und auch in der Niere, wo die im Blut zirkulierenden Katecholamine abgebaut werden (Eisenhofer et al., 1995, 1996). Vanillinmandelsäure wird schließlich im Urin ausgeschieden.

Der Abbau des Katecholamins Dopamin mündet im Gegensatz zu Noradrenalin und Adrenalin in Homovanillinsäure (HVS). Die Ausscheidungsmenge ist dabei etwa doppelt so groß wie die von Vanillinmandelsäure (Elchisak et al., 1982). Außerdem findet der Abbaumetabolismus über 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure, kurz DOPAC, oder 3-Methoxytyramin (3-MT) außerhalb der Leber statt, u.a. im Gastrointestinaltrakt, in der Milz und im Pankreas (Eisenhofer et al., 1997) (siehe Abbildung 2). Die Ausscheidung von Homovanillinmandelsäure erfolgt ebenfalls über den Urin.

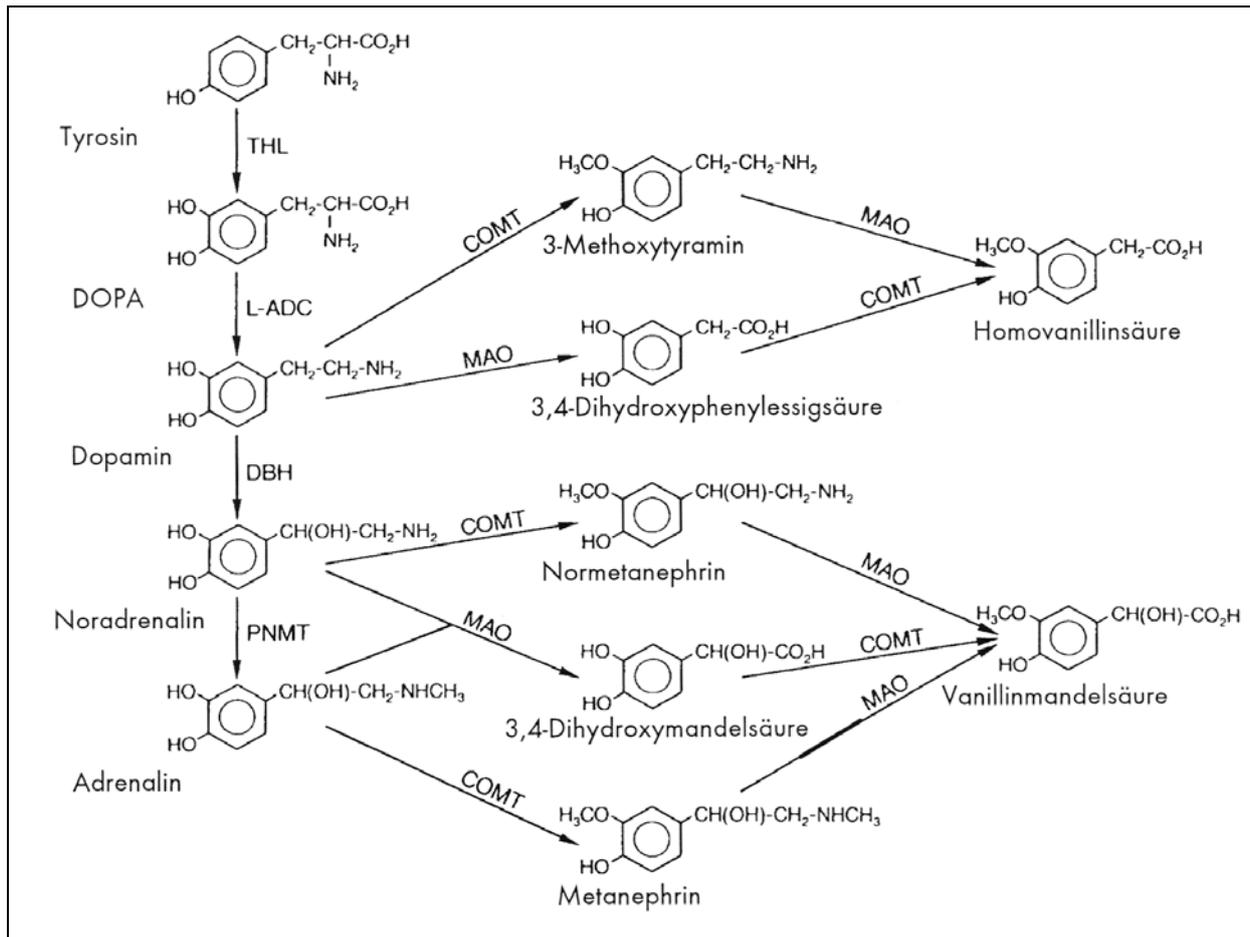


Abbildung 2: Stoffwechsel der Katecholamine und Metanephrine (aus einer Firmenschrift von Chromsystems: Arbeitsvorschrift für HPLC-Bestimmung Katecholamine im Plasma)

Legende: THL = Tyrosinhydroxylase; L-ADC = Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase; DBH = Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase; PNMT = Phenylethanolamine-N-methyltransferase; MAO = Monoaminoxidase; COMT = Catechol-O-methyltransferase.

## 1.2.2 Der Katecholaminmetabolismus des Neuroblastoms

Beim Neuroblastom handelt es sich um eine bösartige Neubildung des adrenergen Nervensystems, das embryologisch der Neuralleiste entspringt. Daher findet auch in den meisten Neuroblastomen die oben beschriebene Synthese der Katecholamine statt. Lediglich 5 - 12% der Tumoren sind nicht sekretorisch. Besonders häufig lassen sich Dopamin und die Abbauprodukte Homovanillinsäure (HVS) und Vanillinmandelsäure (VMS) im Urin nachweisen (Candito et al., 1992, 1996). Katecholaminurie im Urin von Kleinkindern sind wegweisend für eine

Neuroblastomerkrankung: Für das Neuroblastom gaben Strenger und Mitarbeiter (2007) eine Sensitivität von 80,7% für VMS, von 71,9% für HVS und eine von 61,3% für Dopamin an, wobei in 91,2% der Fälle zumindest ein Parameter erhöht war. Anhand der unterschiedlichen Sekretion lassen sich aber auch aufgrund unterschiedlicher Differenzierungsgrade der Tumorzellen eine Prognose für den Patienten ableiten: So weisen hohe VMS-Werte auf eine gute, hohe Dopaminwerte hingegen auf einen unvorteilhaften Verlauf hin. Weiter weisen erhöhte Dopamin/Noradrenalin- und Dopamin/VMS-Quotienten auf eine schlechte Prognose, niedrige Dopamin/Noradrenalin-Quotienten auf ein besseres Überleben hin (Strenger et al., 2007). Erhöhte DOPA-Werte gehen ebenfalls mit unvorteilhaften zytogenetischen Eigenschaften der Tumorzellen und einer schlechten Prognose einher (Ikeda et al., 1995, 1996). Begründen lassen sich diese Beobachtungen damit, dass undifferenzierte Tumorzellen, die mit einer schlechten Prognose einher gehen, auch enzymatische Defizite aufweisen. Ikeda und Mitarbeiter (1994) beschrieben, dass diejenigen Neuroblastome mit hohen Urin- und Plasmawerten von DOPA einen Mangel der DOPA-Decarboxylase aufweisen und so sich das DOPA in den Zellen ansammelt und in das Plasma sezerniert wird. Auch fehlt undifferenzierten Tumoren oft die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase, so dass vermehrt Dopamin oder das Abbauprodukt HVS abgegeben wird (Abramowsky et al., 1989). Noradrenalin, Adrenalin und VMS fehlen oder finden sich daher oft nur in geringen Mengen bei biochemischen Untersuchungen der Katecholamine beim Neuroblastom. Aufgrund dieses Sachverhaltes wird verständlich, warum ein niedriger Quotient aus VMS/HVS mit einem undifferenzierten Tumorwachstum, mit enzymatischen Defekten und einer schlechteren Prognose einhergeht (Berthold et al., 1992) (siehe dazu auch Kapitel 1.2.3.7.1).

## **1.2.3 Das Neuroblastom**

### **1.2.3.1 Definition und Ätiologie**

Das Neuroblastom zählt zu den embryonalen Tumoren, was den hohen Erkrankungsanteil von Kleinkindern begründet. Im frühen Kindesalter ist das Neuroblastom mit knapp 10% aller kindlichen Krebserkrankungen der häufigste extrakranielle solide Tumor und liegt nach den Leukämien, den Lymphomen und den ZNS Tumoren auf dem 4. Rang der kindlichen malignen Tumoren (Young & Miller, 1975). 40% der Neuroblastome werden im ersten Lebensjahr, 90% in den ersten fünf Lebensjahren diagnostiziert. Die Inzidenz bei den unter 15 Jahre alten Kindern beträgt in Deutschland 1,1/100.000 (Powell et al., 1998).

### **1.2.3.2 Risikofaktoren**

Verschiedene Autoren konnten ein Risikoprofil für die Entstehung eines Neuroblastoms herausarbeiten: Neugeborene, deren Mütter während der Schwangerschaft Alkohol konsumiert oder Diuretika eingenommen hatten, haben ein erhöhtes Risiko an diesem Tumor zu erkranken. Die Einnahme von Multivitamin- und Folsäurepräparaten während der Schwangerschaft, Vitamineinnahme der Säuglinge und bestehende Allergien wirken sich hingegen protektiv auf die Neuroblastomentstehung aus (Heck et al., 2009; Olshan et al., 2002). Im Gegensatz zu vielen anderen malignen Erkrankungen ist eine familiäre Häufung mit 1-2% eher selten. Knudson & Strong (1972) fanden heraus, dass der Anteil bilateraler Tumoren mit 24% gegenüber den sporadischen Fällen erhöht ist. Auch das durchschnittliche Erkrankungsalter von familiären Verläufen liegt mit 9 Monaten früher als das bei sporadischen mit 18 Monaten. Für das hereditäre Neuroblastom wurden mittlerweile verschiedene Genloki nachgewiesen wie Mutationen auf den Chromosomen 2p, 12p und 16p (Longo et al., 2007; Maris et al., 2002).

### 1.2.3.3 Tumorstadien und -klassifikationen

Die Tumoren lassen sich morphologisch nach dem „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS) in folgende Stadien einteilen (Brodeur et al., 1993).

*Tabelle 1: International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Brodeur et al., 1993)*

| <b>Stadium</b>     | <b>Beschreibung</b>   |
|--------------------|---|
| <b>Stadium I</b>   | Tumor auf Ursprungsstruktur begrenzt, komplette makroskopische Resektion möglich, Lymphknotenbefall negativ.  |
| <b>Stadium IIa</b> | Mittellinie nicht überschritten, komplette makroskopische Resektion möglich, Lymphknotenbefall negativ.   |
| <b>Stadium IIb</b> | Mittellinie nicht überschritten, komplette oder inkomplette makroskopische Resektion möglich, regionale Lymphknoten positiv homolateral. Kapseldurchbrechende Mittellinientumore. |
| <b>Stadium III</b> | Mittellinie überschritten, mit oder ohne Lymphknotenbefall, einseitiger Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall, Mittellinientumor mit beidseitigem Lymphknotenbefall.        |
| <b>Stadium IV</b>  | Fernmetastasen in Lymphknoten, Knochenmark, Leber, anderen Organen.   |
| <b>Stadium IVS</b> | Primärtumor begrenzt wie bei Stadium I und II, Metastasen in Leber, Haut, Knochenmark (Befall < 10% der nukleären Knochenmarkszellen).  |

Da die bisherigen Klassifikationen teilweise uneinheitlich waren und sich durch zunehmende molekulargenetische Aspekte weiter verkomplizierten, wurde zur prätherapeutischen Risikoabschätzung im Jahr 2009 das „International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System“ und das „International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)“ eingeführt. Im Gegensatz zum postoperativen Stagingssystem INSS gehen in dieses nur klinische Kriterien und definierte Bildgebungsparameter ein (Cohn et al., 2009; Monclair et al., 2009).

*Tabelle 2: International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) (Monclair et al., 2009)*

| <b>Stadium</b> | <b>Beschreibung</b>   |
|----------------|---|
| <b>L1</b>      | Lokalisierte Tumor, der lebenswichtige Strukturen nicht beeinflusst und auf ein Körperkompartiment beschränkt ist.                |
| <b>L2</b>      | Lokoregionaler Tumor mit einem oder mehreren durch die Bildgebung definierten Risikofaktoren.                                     |
| <b>M</b>       | Krankheitsbild mit Fernmetastasen, die nicht dem Stadium MS angehören.  |
| <b>MS</b>      | Metastasiertes Krankheitsbild bei Kindern <18 Monate, dessen Metastasierung sich auf Haut, Leber und/oder Knochenmark beschränkt. |

#### **1.2.3.4 Molekulargenetische Aspekte des Neuroblastoms**

Molekulargenetische Faktoren wie ein Allelzugewinn oder -verlust, die Aktivierung eines Onkogens und chromosomale Veränderungen spielen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Tumorzellen und auch für den weiteren Verlauf der Erkrankung und die Prognose. So fanden sich in einer großen Zahl an Tumorgewebe Veränderungen des Karyogramms hin zu triploiden, hypo- und hypertetraploiden Erscheinungsformen, die gehäuft in charakteristischen Tumorstadien zu finden waren. Diploidie zeigte eine raschere Entwicklung einer Resistenz auf Chemotherapeutika, während Patienten mit einer Triploidie eine günstige Prognose haben (Kaneko & Knudson, 2000; Maris et al., 2007). Weiter ist für die Prognostik der Nachweis einer N-MYC Amplifikation von Bedeutung: Das MYC Protoonkogen liegt auf dem kurzen Teil des 2. Chromosoms (2p24) und konnte von Schwab und Mitarbeitern 1983 und 1984 bei vielen Neuroblastomen erstmals nachgewiesen werden. Deren Proteine sind Transkriptionsfaktoren, deren Überexpression das Wachstum und die Zellproliferation aus dem Gleichgewicht bringen. Eine hohe N-MYC Amplifikation korreliert mit höheren Tumorstadien (Stadium III und IV), einem raschen Wachstum und einer schlechten Prognose für den Patienten, wie von Brodeur und Mitarbeitern 1984 und von Seeger und Mitarbeitern 1985 erstmals beschrieben wurde und in zahlreichen Studien

mittlerweile bestätigt wurde (Brodeur, 2003). So finden sich in niedrigen Stadien nur eine N-MYC Amplifikation von 4% bei einem 3-Jahres-Überleben von 90%. Dem gegenüber zeigt sich bei fortgeschrittenen Stadien eine N-MYC Amplifikation von 31% bei einem wesentlich geringeren 3-Jahres-Überleben von nur 30% (Brodeur et al., 1997).

*Tabelle 3: Korrelation zwischen der N-MYC Amplifikation und dem Stadium bei 3000 Neuroblastomen (Brodeur et al., 1997)*

| <b>Stadium bei Diagnose</b>                        | <b>N-MYC Amplifikation</b> | <b>3-Jahres-Überleben</b> |
|--|----------------------------|---------------------------|
| Benigne Ganglioneurome                             | 0/64 (0%)                  | 100%                      |
| Niedrige Stadien (I und II nach INSS)              | 31/772 (4%)                | 90%                       |
| Stadium IVS nach INSS                              | 15/190 (8%)                | 80%                       |
| Fortgeschrittene Stadien<br>(III und IV nach INSS) | 612/1.974 (31%)            | 30%                       |
| GESAMT   | 658/3.000 (22%)            | 50%                       |

Weitere DNA Amplifikationen wie auf den Chromosomen 2p22, 2p13, das MDM2 Gen auf 12q13 und das L-MYC Gen auf dem Chromosom 1p32 wurden außerdem entdeckt (Brodeur et al., 1997, 2003; Corvi et al., 1995; Van Roy et al., 1995). In mehr als der Hälfte der Neuroblastome wurde eine Trisomie des langen Armes von Chromosom 17q identifiziert, was mit einer erhöhten Aggressivität der Tumoren einhergeht und eine schlechtere Prognose voraussagt. Diese Veränderung findet sich stets zusammen mit einer Amplifikation von N-MYC und ist für einjährige oder ältere Patienten charakteristisch (Bown et al., 1999; Łastowska et al., 2002). Hingegen wirkt sich eine hohe Expression des Onkogens N-RAS positiv auf die Aggressivität des Tumors aus und zeigt eine hohe Korrelation mit niedrigen INSS-Tumorstadien bei Diagnosestellung (Tanaka et al., 1988). Zu den weiteren chromosomalen Veränderungen zählen Deletionen auf dem Chromosom 1(1p) (Attiyeh et al., 2005, Hiyama et al., 2001, Maris et al., 2001), die nicht nur mit einer N-MYC Amplifikation korrelieren, sondern auch mit fortgeschrittenen Stadien einhergehen, eine 11q Deletion, die sich häufig bei fortgeschrittenen Stadien bei fehlenden N-MYC Amplifikation findet (Attiyeh et al., 2005, Plantaz et al., 2001) und einem Verlust von 14q, welcher als universaler Marker in allen Tumorstadien

vorkommt und umgekehrt proportional zur N-MYC Amplifikation auftritt (Thompson et al., 2001). Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie P53, die den Zellzyklus kontrollieren, finden sich bei primären Neuroblastomen eher selten. Veränderungen weisen jedoch auf eine Therapieresistenz gegen Chemotherapeutika hin oder entstehen erst durch eine zytotoxische Therapie (Keshelava et al., 2001; Tweddle et al., 2001). Hingegen scheint es einen Zusammenhang zwischen einer Transkription von CDKN2B und dem Tumorphänotyp zu geben; so fand sich eine Expression des CDKN2B Gens in allen Stadium IV Neuroblastomen, während sie beim Stadium I fehlte (Iolascon et al., 1998). Für die maligne Transformation und Differenzierung der Tumorzellen spielen darüber hinaus Neurotrophin Rezeptoren eine Rolle. Als Liganden für diese Rezeptoren dienen der Nerve-growth-faktor (NGF), der Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT3) und Neurotrophin-4 (NT4) (Patapoutian & Reichardt, 2001). Die Tyrosinkinaserzeptoren (Trk) TrkA und TrkC gehen mit einem jungen Erkrankungsalter (< 1 Jahr), niedrigen Tumorstadien (Stadien I, II und IVS nach INSS) und dem Fehlen einer N-MYC Amplifikation einher. Deren Bestimmung dient daher als Indikator für eine gute Prognose (Nakagawara et al., 1993 und Rydén et al., 1996). Im Gegensatz dazu findet sich bei einer hohen TrkB Expression zusammen mit dem TrkB Liganden BDNF gleichzeitig auch eine hohe N-MYC Amplifikation (Nakagawara et al., 1994). Ho und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass das Vorkommen des Rezeptors TrkB mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und einem verkürzten Überleben einhergeht. Weiter ist der Transmembranrezeptor p75 bekannt, der zur Familie der Tumornekrosefaktorrezeptoren (TNFR) gehört und dessen Effekt auf die Zellen von der An- bzw. Abwesenheit der Trk Rezeptoren abhängt (Casaccia-Bonofil et al., 1999).

All die oben beschriebenen molekularen Aspekte beeinflussen die Entstehung, das Wachstum und somit auch die Prognose der am Neuroblastom erkrankten Patienten. Die N-MYC Amplifikation und der Ploidiestatus scheinen jedoch die wichtigsten Faktoren für die Therapieentscheidung und die Prognose der Patienten zu sein. Diese Parameter haben daher auch Einzug in den Therapiealgorithmus der „Children´s Oncology Group“ gefunden (siehe Kapitel 1.2.3.8 und 1.2.3.9).

### **1.2.3.5 Besonderheit des Neuroblastoms – eine hohe Rückbildungsrate**

Das Neuroblastom ist der menschliche Tumor mit der höchsten Rate an spontanen Rückbildungen. Hero und Mitarbeiter (2008) konnten zeigen, dass es aus 93 ausgewählten Residualtumoren unter Ultraschall- und Kernspinkontrolle bei 44 Fällen zu einer Spontanregression kam, in 28 Fällen kam es zu einer lokalen Progression und bei je 4 Fällen setzte sich der Krankheitsverlauf in die Stadien IV und IVS fort. Diese Erkenntnisse über eine verhältnismäßig häufige Rückbildung beeinflussen auch die aktuelle Diskussion über Urinscreeninguntersuchungen auf HVS und VMS (siehe Kapitel 1.2.3.6.1).

### **1.2.3.6 Symptomatik**

Neben den allgemeinen Symptomen wie reduziertem Allgemeinzustand, erhöhte Temperatur und Blässe kommt es je nach Sitz des Tumors zu spezifischen Symptomen: Das Neuroblastom wächst überall dort, wo es sympathisches Nervengewebe gibt, also im Bereich des Nebennierenmarks und des Grenzstranges. Somit kann es durch lokale Kompressionen zu Schmerzen, zu Störungen des Gastrointestinaltraktes, zu Harnabflussstörungen, zu Atemnot durch thorakales Wachstum und bei zervikalem Wachstum zu einem Horner-Syndrom mit Miosis, Ptosis und Enophthalmus (Mahoney et al., 2006) kommen. Als weiteres Symptom sind Rückenmarkskompressionen mit Ausfällen typisch, von denen 14% der Fälle auf ein Neuroblastom zurückzuführen sind (Wilson et al., 2007). Beschrieben sind außerdem paraneoplastische Symptome wie Fieber, Diarrhö, Hypertonie, Muskelschwäche, das erwähnte Horner-Syndrom und eine myoklone Enzephalopathie (Winkler 1976). Bei einem Olfaktoriusneuroblastom kann eine nasale Obstruktion mit Atembeschwerden ähnlich wie bei einer Poliposis nasi auftreten (Gudziol et al., 1986).

### 1.2.3.7 Diagnostik

#### 1.2.3.7.1 Labordiagnostik und die Möglichkeit von Screeninguntersuchungen

Die meisten Neuroblastome produzieren Katecholamine und deren Metabolite wie VMS und HVS, die dann im Urin ausgeschieden werden und gemessen werden können. Demnach finden sich bei 91% der Neuroblastompatienten erhöhte Konzentrationen an VMS, HVS und/oder Dopamin im Urin (Strenger et al., 2007). Diese Tumormarker lassen sich sowohl zur Diagnostik als auch zur Verlaufskontrolle qualitativ mittels Teststreifen oder quantitativ mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC) bestimmen (Tuchman et al., 1987). Neben VMS und HVS im Serum und Urin geben das Serumferritin, die neuronspezifische Enolase (NSE) und die Laktatdehydrogenase (LDH) Auskunft über den Verlauf der Erkrankung (Brodeur et al., 1993). Ein erhöhter Serumferritinwert findet sich normalerweise nur in fortgeschrittenen Stadien (Stadium III und IV nach INSS), erhöhte Werte weisen dann auf eine signifikant schlechtere Prognose hin (Hann et al., 1985). Das zytoplasmatische Protein neuronaler Zellen NSE deutet bei erhöhten Werten bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien ebenfalls auf eine geringere Überlebenschance hin (Zeltzer et al., 1986). Im Falle einer lokalisierten Erkrankung (Stadium I bis III) kann für die weitere Prognose ein Quotient aus VMS/HVS hilfreich sein. Patienten mit einem Quotienten  $< 0,7$  haben somit eine schlechtere Prognose als Patienten mit einem Quotienten  $\geq 0,7$ . Im metastasierten Stadium verliert dieser Quotient seine Aussagekraft (Berthold et al., 1992).

Die Studienlage bezüglich eines Urinroutinescreenings bei Kleinkindern zur Früherkennung eines Neuroblastoms ist kontrovers: einige Autoren konnten einen Vorteil und eine Reduktion der Sterblichkeit bei sechs Monate alten Kleinkindern nachweisen (Hiyama et al., 2008). Dem gegenüber sahen Woods et al. (2002) keine Reduktion der Sterblichkeit nach einem Massenscreening bei drei Wochen und sechs Monate alten Säuglingen. Auch Schilling und Kollegen (2002) konnten keinen Benefit bezüglich der Inzidenz fortgeschrittener Erkrankungen und einer reduzierten

Mortalität bei einjährigen Kindern ausmachen. Die Autoren folgern aus ihrer Untersuchung, dass es zu einer Überdiagnostik kommen würde. Alle Patienten, auch diejenigen mit einer guten Prognose und einer potentiellen Rückbildung der Krankheit (siehe Kapitel 1.2.3.5), würden einer anschließenden aggressiven Therapie unterzogen werden. Der Schaden durch diese unangemessene Therapie würde aber dann den Nutzen dieser verbesserten Diagnostik zunichte machen. Dem folgend empfiehlt die aktuelle Interdisziplinäre S1-Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie aus dem Jahr 2008 keine prophylaktische Bestimmung der Katecholaminmetabolite im Urin (Hero et al., 1997, überarbeitet 2008).

### **1.2.3.7.2 Histopathologische Diagnostik**

Wie bei allen malignen Erkrankungen ist die Gewinnung und histopathologische Aufarbeitung von Gewebe unerlässlich. Das Neuroblastom zählt zur heterogenen Gruppe der „small blue round cell“-Tumoren. Die histopathologische Einteilung des Neuroblastoms erfolgt nach der von Shimada und Mitarbeitern (1999) etablierten „International Neuroblastoma Pathology Classification“ (INPC).

Diese unterteilt die neuroblastischen Tumore in

- 1) Schwanzzell-Stroma arme Neuroblastome,
- 2) Schwanzzell-Stroma reiche gemischte Ganglioneuroblastome,
- 3) Schwanzzell-Stroma dominante Ganglioneurome und
- 4) noduläre Ganglioneuroblastome.

Die Neuroblastome lassen sich weiter in

- a) undifferenzierte,
- b) wenig differenzierte und
- c) differenzierte Subtypen

gliedern.

Mikroskopisch zeigen sich kleine, runde, blaue Zellen mit einem großen, hyperchromatischen Nukleus und einer veränderten Kern-Plasma-Relation. Weiter wird ein gefäßreiches Stroma, teilweise mit Einblutungen, Verkalkungen, bindegewebigen Septen und sogenannten Homer-Wright-Rosetten beobachtet. Immunhistochemisch können neuronale Marker wie die NSE, Synaptophysin, Neurofilament Protein, Gangliosid GD2, Chromogranin A und die Tyrosinhydroxylase bestimmt werden (Park et al., 2008).

Die Knochenmarkdiagnostik zum Ausschluss einer Metastasierung ist unerlässlich, welche durch mindestens vier Punktionen erfolgt. Zur weiteren Diagnostik gehört die morphologische sowie eine immunhistochemische Untersuchung oben erwähnter Marker. Für kleine Läsionen empfiehlt sich die Durchführung einer Quantitativen Reversen Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion (QPT-PCR) (Beiske et al., 2009).

### **1.2.3.7.3 Bildgebung**

Bei Verdacht eines Tumors, zur Therapieentscheidung und zur weiteren Verlaufskontrolle ist die Bildgebung zur Bestimmung der Lokalisation des Primärherdes und möglicher Metastasen unerlässlich. Heutzutage stehen mit der Sonografie, der Röntgenübersichtsaufnahme, der Computertomografie, der Kernspintomografie, der Szintigrafie und der Positronen-Emissions-Tomografie eine große Auswahl an diagnostischen Instrumenten zur Verfügung, denen je nach Fragestellung und Krankheitsverlauf unterschiedliche Bedeutung zukommt.

Als Screeningsdiagnostikum bei unklaren abdominellen oder pelvinen Raumforderung findet der Ultraschall seinen Einsatz. Neben der Primärdiagnostik kommt die Sonografie bei Staginguntersuchungen, insbesondere zur Beurteilung von Lebermetastasen zur Anwendung. Weiter wird sie neben der Kernspinuntersuchung in der Pränataldiagnostik bei unklaren Fragestellungen eingesetzt (Hamada et al., 1999; Kesrouani et al., 1999; Sauvat et al., 2002; Tomà et al., 1994). Mit Hilfe der Dopplersonografie lassen sich hypervaskularisierte Raumforderungen nachweisen,

was auf Malignität hinweisen kann. Ein häufiges Phänomen des Neuroblastoms sind Verkalkungen des Tumors, die im Ultraschall, bei der Röntgenübersichtsaufnahme, aber vor allen Dingen auch in der Computertomografie (CT) darstellbar und wegweisend sind. Mittels Schnittbilduntersuchung wie Computertomografie oder Kernspintomografie (auch Magnetresonanztomografie, MRT) kann die Tumorage und -ausdehnung und ein präoperativer Lymphknotenbefall bestimmt werden, was für das Staging und die Operationsvorbereitung von Bedeutung ist. Mittlerweile rückt das MRT gegenüber dem CT immer mehr in den Vordergrund: Siegel und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass das MRT eine Sensitivität von 83% für ein Stadium-IV-Kollektiv aufwies, mittels CT hingegen wurde das entsprechende Krankheitsstadium nur in 43% richtig eingeordnet. Gerade auch bei spinalen Beteiligungen, Knochenmarkinfiltrationen und Lymphknotenbefall ist das MRT dem CT überlegen (Hugosson et al., 1999; Slovis et al., 1997; Sofka et al., 1999). Weiter weist das MRT aufgrund seiner variablen Schnittführung im Bereich der Abgrenzung gegenüber anderen Strukturen wie Gefäßen sowie in der Darstellung von Binnenstrukturen gegenüber dem CT Vorteile auf. Die Frage des Gefäßbezugs lässt sich mit kontrastmittelgestützten Untersuchungen besser beantworten.

Die Szintigrafie ist heutzutage unerlässlich bei der ausführlichen Diagnostik und dem Staging dieser Entität: Das Meta-Iodobenzylguanidin (mIBG) ist ein in Bezug auf Transport und Speicherung dem Noradrenalin ähnliches Pharmakon, welches sich in neuroendokrin aktivem Gewebe wie beispielsweise dem Neuroblastom anreichert (Vaidyanathan, 2008). Mit radioaktiv markiertem  $^{131}\text{I}$  oder  $^{123}\text{I}$  lassen sich mit [ $^{131}\text{I}$ ]- oder [ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG Neuroblastome und eventuelle Metastasen in Knochen, Knochenmark oder Lymphknoten nachweisen. Erste szintigraphische Untersuchungen mit [ $^{131}\text{I}$ ]-mIBG zur Darstellung des Neuroblastoms wurden von einer Tübinger Arbeitsgruppe im Jahr 1984 durchgeführt (Treuner et al., 1984). Shulkin und Mitarbeiter konnten 1986 zeigen, dass für diagnostische Zwecke das [ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG dem [ $^{131}\text{I}$ ]-mIBG überlegen ist. Für das Neuroblastom weist [ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von knapp 100% auf (Boubaker & Bischof Delaloye, 2008). Durch die Einbeziehung der Einzelphotonen-Emissions-Tomografie (*engl. Single Photon Emission Computed Tomography*, kurz SPECT)

konnte die Sensitivität weiter erhöht und die anatomische Zuordnung des Herdes verbessert werden, wie Rufini und Mitarbeiter 1996 herausfanden. In einer aktuellen Studie erreichten Vik und Mitarbeiter (2009) für die  $^{123}\text{I}$ -mIBG Szintigrafie eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 83%, bei weiteren Untersuchungen ergaben sich sogar noch bessere Werte. Neben der diagnostischen Aussagekraft hat die mIBG Szintigrafie bei Diagnosestellung auch Bedeutung für die Prognose des Patienten, wie Suc und Mitarbeiter (1996) anhand eines Punktesystems zeigen konnten. Als weiteres szintigrafisches Verfahren wäre die [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-Methylen Diphosphate ([ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-MDP) Knochenszintigrafie zu nennen. Obwohl auch der Primärtumor oder viszerale Metastasen detektiert werden können, beschränkt sich heutzutage sein Einsatz auf die Suche nach Knochenmetastasen. Bei dieser Fragestellung ist die [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-MDP Knochenszintigraphie der mIBG Szintigrafie überlegen (Howman-Giles et al., 2007). Ein neueres bildgebendes Verfahren der Onkologie, in dem der gesteigerte Glucosestoffwechsel des Tumors sichtbar wird, ist die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) in Kombination mit einem CT und dem Pharmakon [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) welches anatomische und metabolische Pathologika vereint (Lamki et al., 1996). In wenigen Studien konnte beim Neuroblastom gezeigt werden, dass das PET mit FDG der [ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG Szintigrafie in den meisten Fragestellungen leicht überlegen ist. Einzig im Stadium IV unter Chemotherapie zeigte sich aufgrund der bessere Detektion von Knochen- und Knochenmarkmetastasen ein Vorteil zugunsten der [ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG Szintigrafie (Kushner et al., 2001; Sharp et al., 2009).

Da bei über der Hälfte der Fälle bei Diagnosestellung bereits ein metastasiertes Krankheitsbild vorliegt, ist ein ausgiebiges Staging unerlässlich. Aufgrund der unterschiedlichen Aussagekraft oben beschriebener Verfahren sollte ein solches Staging eine CT- oder MRT-Untersuchung, eine [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-MDP-Knochenszintigrafie, eine [ $^{131}\text{I}$ ]- oder [ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG-Szintigrafie, die histochemische Knochenmarksuntersuchungen und die Bestimmung des Urinkatecholaminstatus umfassen (Kushner et al., 2004).

### 1.2.3.8 Therapie

Für das Neuroblastom steht heute eine multimodale Therapie zur Verfügung, welche sich an dem Krankheitsstadium, Alter des Patienten und den Prognoseparametern orientiert. Dazu gehören die chirurgische Resektion, die Chemo- und die Strahlentherapie. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass bei regionalen Ausbreitungen die Indikation zum Einsatz von Chemotherapeutika zurückhaltend gestellt werden sollte, dasselbe gilt auch für den Einsatz einer Radiotherapie bei fortgeschrittenen Erkrankungen mit unvorteilhaften biologischen Parametern.

*Tabelle 4: Patienteneinordnung in Risikogruppen anhand klinischer und biologischer Merkmale (Brodeur, 2003)*

| <b>Tumorstadium nach INSS</b> | <b>Niedrigrisikogruppe</b>   | <b>Intermediär-Risikogruppe</b>                                    | <b>Hochrisikogruppe</b>   |
|-------------------------------|--|--|---|
| <b>I</b>                      | alle   | -  | -   |
| <b>Ila, I Ib</b>              | Alter < 1 J., o.<br>1-21 J. u. N-MYC n-ampl., o.<br>1-21 J. u. N-MYC ampl.<br>+ VH | -  | Alter 1-21 J. u. N-MYC ampl. + UH                                 |
| <b>III</b>                    | -  | Alter < 1 J. u. N-MYC n-ampl., o.<br>1-21 J. u. N-MYC n-ampl. + VH | Alter 0-21 J. u. N-MYC ampl., o.<br>1-21 J. u. N-MYC n-ampl. + UH |
| <b>IV</b>                     | -  | Alter < 1 J. u. N-MYC n-ampl.                                      | Alter < 1 J. u. N-MYC ampl., o.<br>1-21 J.                        |
| <b>IVS</b>                    | N-MYC n-ampl.; VH;<br>hyperploid   | N-MYC n-ampl.; UH; diploid   | N-MYC ampl.   |

*Legende: J. = Jahre; o. = oder; u. = und; ampl. = amplifiziert; n-ampl. = nicht amplifiziert; VH = vorteilhafte Histologie; UH = unvorteilhafte Histologie*

#### **1.2.3.8.1 Therapie des Neuroblastom-Patienten der Niedrigrisikogruppe**

Bei Patienten im Stadium I nach INSS, bei denen eine sehr gute Prognose besteht, ist eine alleinige chirurgische Resektion ausreichend (Alvarado et al., 2000; Perez et al., 2000). Auch bei inkomplett resezierten Tumoren (INSS Stadium Ila und I Ib) kann wie auch beim Stadium IVS Neuroblastom ohne N-MYC Amplifikation aufgrund der

hohen Regressionsrate auf eine postoperative Chemotherapie in den meisten Fällen verzichtet werden (Perez et al., 2000; Simon et al., 2004). Einsatz von Chemotherapie oder Niedrigdosisbestrahlung sollten symptomatischen Patienten bei großen Tumoren vorbehalten bleiben (Nickerson et al., 2000).

#### **1.2.3.8.2 Therapie des Neuroblastom-Patienten der Intermediär-Risikogruppe**

Die Säulen dieser inhomogenen Patientengruppe bestehend aus höheren Tumorstadien (Stadium III, IV und IVS nach INSS) und niedriger N-MYC Amplifikation bilden die Chirurgie und die moderate Chemotherapie. Neben der postoperativen konventionellen Chemotherapie werden zusammen mit 13-cis-Retinoidsäure und Interleukin-2 oft ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht (Moon et al., 2009). Zu den gängigen Chemotherapeutika zählen Cisplatin (bzw. Carboplatin), Doxorubicin, Etoposid und Cyclophosphamid (Schmidt et al., 2000, 2005). Bei nicht vollständiger Resektion kann in ausgewählten Fällen auch eine Nachbestrahlung in Frage kommen, auch Spontanregressionen wurden in diesem Tumorstadium beobachtet.

#### **1.2.3.8.3 Therapie des Neuroblastom-Patienten der Hochrisikogruppe**

In dieser Krankheitsgruppe mit fortgeschrittenem Wachstum und unvorteilhaften biologischen Markern, die 40% der Patienten betreffen, beginnt die Therapie mit einer Induktionstherapie. Diese Induktionschemotherapie beispielsweise mit Anthracyclinen, Alkylantien, Platinverbindungen und Topoisomerase-II-Inhibitoren (Etoposid, Doxorubicin) verbessert das Ansprechen der weiteren Therapie (Valteau-Couanet et al., 2005). Der Induktionstherapie schließt sich eine myeloablative Hochdosischemotherapie mit Carboplatin, Etoposid und Melphalan (CEM) mit einer autologen Stammzelltransplantation an (Berthold et al., 2005; George et al., 2006; Matthay et al., 1999; Pritchard et al., 2005), von der vor allen Dingen Patienten mit nur partiellem Ansprechen nach der Induktionstherapie und Kinder mit hoher N-MYC Amplifikation profitieren. Die Lokaltherapie wird anschließend mittels chirurgischer

Therapie oder Radiotherapie durchgeführt (Adkins et al., 2004; Bradfield et al., 2004; Kushner et al., 2001). Der Benefit eines adjuvanten Einsatzes von 13-cis-Retinoidsäure konnte in der CCG-3891 Studie gezeigt werden (Matthay et al., 1999).

Weitere neue Therapieoptionen stehen zur Verfügung wie der Einsatz einer Radiotherapie. Durch die Noradenalintransporter (NAT) gelangt das radioaktive [<sup>131</sup>I]-mIBG spezifisch in die Neuroblastomzellen, welche zu 90% empfindlich für das Radiopharmakon sind, und kann so die etablierten Therapien verbessern (DuBois & Matthay, 2008; Matthay et al., 2006). Arbeiten an Anti-GD2 monoklonalen Antikörpern - u.a. durch Handgretinger und Kollegen - weisen vielversprechende Ergebnisse auf (Handgretinger et al., 2002; Modak & Cheung, 2007; Simon et al., 2004, 2005; Otto et al., 2005). Als zukunftsweisende Therapiestrategien sollen außerdem erwähnt werden die IGF-1 Rezeptorantagonisten (Coulter et al., 2008), das Arsentrioxid (Pettersson et al., 2007), der Tubulin-Inhibitor ABT-751 (Fox et al., 2008), Vinblastin und Rapamycin als Angiogenesehemmer (Marimpietri et al., 2007), der Einsatz von Bisphosphonaten bei Knochenmetastasen (Peng et al., 2007), die Verwendung des Parasitenmedikaments Nifurtimox (Saulnier Sholler et al., 2006), sowie weitere molekulare Inhibitoren.

### **1.2.3.9 Prognose**

Trotz oben beschriebener individueller und stark verbesserter Therapie entfallen auf das Neuroblastom 15% der gesamten kindlichen Tumorsterblichkeit. Die Prognose des Neuroblastoms hängt von verschiedenen Faktoren ab wie z.B. dem Tumorstadium bei Diagnosestellung, Alter des Patienten, histologische Differenzierung, DNA-Ploidiestatus und N-MYC Amplifikation (Park et al., 2008). Nach oben beschriebener Einordnung und entsprechender Therapie lag die ereignisfreie Überlebensrate (*engl. Event-free survival rate*, EFS Rate) für Patienten der Niedrigrisikogruppe zwischen 86% und 92% (Nickerson et al., 2000), während die 3-Jahres-Überlebensrate bei Patienten der Hochrisikogruppe unter 40% lag (Matthay et al., 1999).

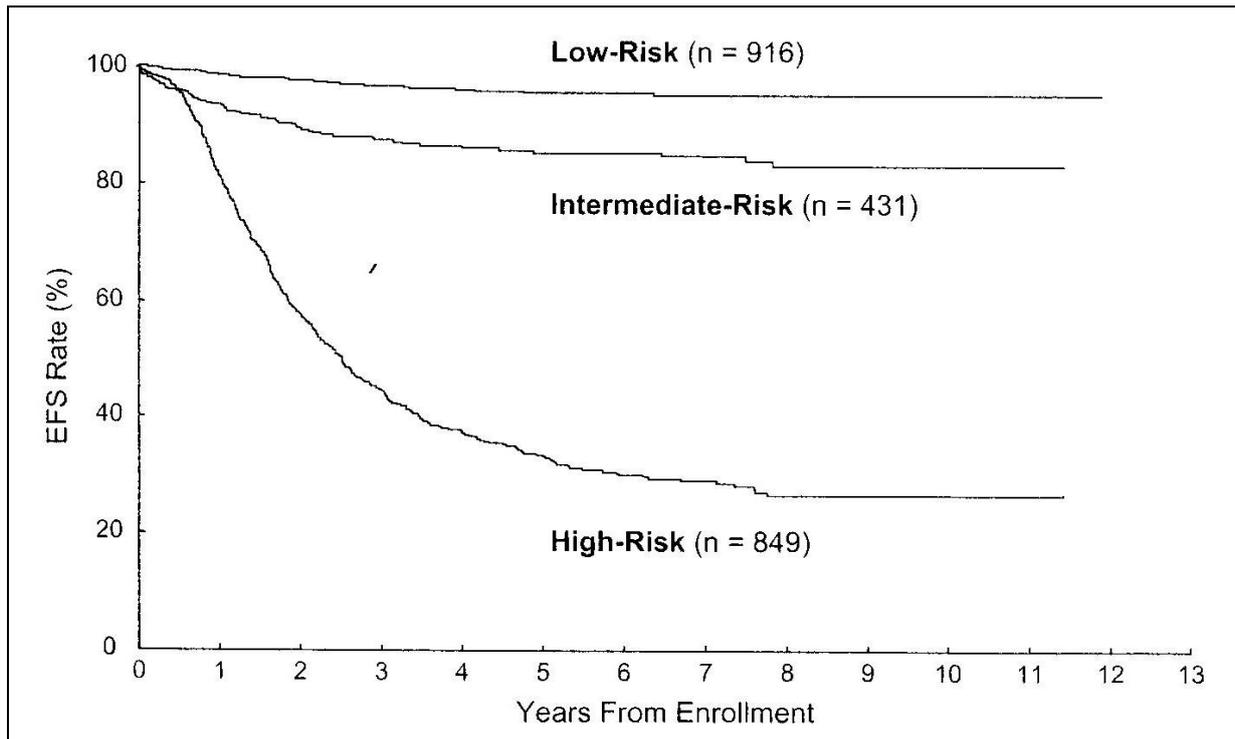


Abbildung 3: Analyse des ereignisfreien Überlebens nach Risikostratifikation (Park et al., 2008; aus London et al., Children's Oncology Group Statistical Office)  
Legende: EFS = Ereignisfreie Überlebensrate (engl. Event-free survival rate)

## 1.2.4 Die Transportsysteme

Für die zelluläre Aufnahme von Substanzen gibt es im menschlichen Körper verschiedene Transportsysteme. Die „Solute Carrier Transporter“ (SLC) Superfamilie umfasst über 300 Mitglieder teilweise sehr spezifischer Transporter. Auf einige wenige - für die Aufnahme von L-DOPA und der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin relevanten - Transporter soll im Folgenden eingegangen werden.

### 1.2.4.1 Die Aufnahme von L-DOPA über die L-Typ Aminosäuretransporter (LAT)

Die aromatische Aminosäure 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA) ist ein Zwischenprodukt auf dem Weg zur Dopaminbiosynthese, das bei neutralem pH als Zwitterion gelöst vorliegt. Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft kann es kaum durch Diffusion Zellmembrane überwinden und bedarf daher eines Transportsystems. Über verschiedene Aminosäuretransporter ist eine zelluläre Aufnahme jedoch möglich.

Diese L-Typ Aminosäuretransporter (*engl. L-type amino acid transporter*), kurz LAT, sind heterodimere Aminosäuretransporter und werden in einer großen Anzahl von Geweben exprimiert um die Zellen mit Aminosäuren zu versorgen. Verschiedene LAT-Subtypen wurden mittlerweile entdeckt, zuerst LAT1 (Kanai et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998; Torrents et al., 1998) und im darauffolgenden Jahr LAT2 (Segawa et al., 1999). Bei beiden handelt es sich um ein Natrium-abhängiges Transportsystem. Diese heterodimeren Aminosäuretransporter bestehen aus zwei Untereinheiten, einer schweren Kette (SLC3 Familie) und einer aus 12 Transmembrandomänen bestehenden assoziierten Leichtkette (SLC7 Familie). Zu den schweren Ketten der Aminosäuretransporter gehören die beiden Typ II transmembrane Glykoproteine rBAT (related to b<sup>0,+</sup> aminoacid transport) und 4F2hc (heavy chain). Die schwere Kette rBAT interagiert mit der Leichtkette b<sup>0,+</sup>AT und bildet so das Aminoportersystem b<sup>0,+</sup> (Bertran et al., 1992). Hingegen bildet die schwere Kette 4F2hc mit den leichten Ketten LAT1 und LAT2 das System L (Rossier et al., 1999). Die schweren Ketten sind über Disulfidbrücken mit den Leichtketten verbunden (Pfeiffer et al., 1998) und ihre Funktion liegt im Einschleusen der Leichtketten in die Plasmamembran, während diese für die Transportfunktion des heterodimeren Aminosäuretransporters verantwortlich sind (Wagner et al., 2001). Das System L, also LAT1 und LAT2, spielt eine wichtige Rolle für die zelluläre Versorgung mit neutralen, verzweigten und aromatischen Aminosäuren, aber auch für die zelluläre Aufnahme von L-DOPA. Weiter gehören dem System L die Transporter LAT3 (Babu et al., 2003) und LAT4 (Bodoy et al., 2005) an, die aber, da

sie keine heterodimeren Transporter und somit unabhängig von 4F2hc sind, sich von LAT1 und LAT2 unterscheiden und zur Familie SLC43 gehören. Allen gemeinsam ist jedoch, dass sie Natrium-abhängige Transporter sind, neutrale Aminosäuren und auch L-DOPA transportieren und sich durch das nicht-metabolisierbare Aminosäureanalogon 2-Aminobicyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylsäure (BCH) hemmen lassen. Neben BCH ist die Aminosäureaufnahme über LAT2 auch abhängig vom intrazellulären pH-Wert: Gomes & Soares-da-Silva (2002) konnten zeigen, dass die Aufnahme von L-DOPA im sauren gegenüber einem neutralen Milieu erhöht war. Die Aufnahme über LAT1 ist hingegen pH-unabhängig (Prasad et al., 1999). Auch die Affinität der beiden Transporter ist gegenüber verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich, ganz abgesehen davon zeigt LAT2 eine niedrigere Affinität und eine niedrigere Substratselektivität als LAT1. LAT1 ist demnach recht spezifisch für den Transport der Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin und Histidin (Kanai et al., 1998), sowie für die dem Tyrosin ähnliche aromatische Aminosäure DOPA. Dem gegenüber kann LAT2 aufgrund seiner geringeren Spezifität neben den oben erwähnten auch Aminosäuren wie Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Cystein, Glutamin und Aspargin transportieren (Segawa et al., 1999). Auch aus pharmakologischer Sicht sind diese beiden Transporter für die Aufnahme und Reduktion der Aufnahme durch kompetitive Hemmung von Medikamenten in die Zelle, aber auch für die Überwindung der Bluthirnschranke zur Beeinflussung des Zentralen Nervensystems von großer Bedeutung (Duelli et al., 2000; Kageyama et al., 2000; Kido et al., 2001). So werden neben oben beschriebenen Aminosäuren auch folgende Medikamente über LAT1 und LAT2 in die Zellen eingeschleust: die Dopaminvorstufe L-DOPA (Fraga et al., 2002a,b; Gomes & Soares-da-Silva, 1999; Kageyama et al., 2000; Quiñones et al., 2004; Soares-da-Silva & Serrão, 2004, 2005; Uchino et al., 2002), das Alkylanz Melphalan (Cornford et al., 1992; Uchino et al., 2002), das Muskelrelaxans Baclofen, 3-O-Methyldopa (Gomes & Soares-da-Silva, 1999), Alpha-Methyltyrosin, das Antikonvulsivum Gabapentin (Uchino et al., 2002), das Antihypertensivum Alpha-Methyldopa und die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Thyroxin (Ritchie et al., 1999; Uchino et al., 2002). Für das Pharmakon L-DOPA soll noch herausgehoben werden, dass es vermehrt durch den unspezifischeren

säureabhängigen Natrium-abhängigen Aminosäuretransporter LAT2 transportiert wird (Soares-da-Silva & Serrão, 2004, 2005). Die Transporterexpressivität ist in verschiedenen Geweben unterschiedlich und kann so für diagnostische und therapeutische Fragestellungen ausgenutzt werden. Hohe Werte für LAT1 finden sich im Gehirn und den Endothelien der Bluthirnschranke, Plazenta, Herzmuskulatur und Tumoren (Chrostowski et al., 2009; Duelli et al., 2000; Kageyama et al., 2000; Kido et al., 2001), die einen hohen Bedarf an Aminosäuren aufweisen. LAT2 gibt es vermehrt in der Niere und in Organen des Verdauungstraktes (Rossier et al., 1999; Segawa et al., 1999). Gerade auch maligne Tumoren weisen aufgrund ihres gesteigerten Stoffwechsels eine erhöhte Anzahl von Transportern des L-Systems auf: So konnte in einer ganzen Reihe von Tumorentitäten wie Lebertumoren (Ohkame et al., 2001), Blasen- (Kim et al., 2001), Mamma- (Shennan et al., 2003), oralen Epidermoid- (Yoon et al., 2004), Ösophagus- (Kobayashi et al., 2005) und Prostatakarzinomen (Sakata et al., 2009), Adenokarzinomen der Lunge (Nakanishi et al., 2006), Osteosarkomen (Kim et al., 2006) und Gliomen (Yanagida et al., 2001; Kim et al., 2004) eine erhöhte Expression an LAT1 nachgewiesen werden. Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen der Höhe der LAT1 Expression und der weiteren Prognose für den Patienten, wie Kaira und Mitarbeiter (2008) für resektable nichtkleinzellige Bronchialkarzinome herausfanden. Auch für das Neuroblastom konnten Sampaio-Maia und Mitarbeiter (2001) eine gesteigerte L-DOPA Aufnahme über L-Typ Aminosäuretransporter bei Neuro-2a Neuroblastomzellen der Maus nachweisen.

Erwähnt werden soll auch noch der von Kim und Mitarbeitern (2001) entdeckte Natrium-unabhängige T-Typ Aminosäuretransporter 1 (TAT1). TAT1 ist ein Protein, das die intrazelluläre Diffusion erleichtert, jedoch nur eine niedrige Substrataffinität besitzt. Auf diese Weise ist in geringen Mengen Natrium-unabhängig die Aufnahme von aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, aber auch von verwandten Substanzen wie 3-O-Methyldopa und der Katecholaminvorstufe L-DOPA möglich.

Neue Therapieoptionen ergeben sich durch die bereits erwähnte die Aminosäuretransporter des L-Systems hemmende Wirkung von BCH. Da bisher alle

untersuchten Tumorgewebe eine erhöhte Expression von LAT1 aufwiesen, konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass so durch eine verringerte Aufnahme von Aminosäuren der Tumor „ausgehungert“ und eine Apoptose eingeleitet werden kann (Kim et al., 2008). Shennan & Thomson (2008) konnten ebenfalls diesen Effekt für Mammakarzinom Zellkulturen nachweisen. Yamauchi und Kollegen (2000) sahen sogar einen verstärkten Effekt bei gleichzeitiger BCH- und Cisplatintherapie bei Plattenepithelzellkulturen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher für L-DOPA kein spezifischer Transporter entdeckt wurde, sondern dass es aufgrund seiner ähnlichen molekularen Eigenschaften zusammen mit anderen Aminosäuren und einigen weiteren Medikamenten über die L-Typ Aminosäuretransporter in das Zellinnere gelangt. Wie weitere neuronale und maligne Gewebe besitzt auch das Neuroblastom eine große Anzahl dieser Transporter. Inwieweit im klinischen Alltag diese Strukturen in der Molekularpathologie bestimmend werden oder die Hemmung dieser Transportsysteme in der medikamentösen Tumorthherapie Eingang findet, bleibt abzuwarten.

#### **1.2.4.2 Die Aufnahme von Dopamin über die neuronalen Monoamintransporter**

Die Dopamin-, Noradrenalin- und Serotonintransporter werden als neuronale Monoamintransporter bezeichnet und bilden zusammen das Uptake 1 System.

##### **1.2.4.2.1 Der Dopamintransporter (DAT)**

Die zelluläre Aufnahme von Dopamin entweder aus dem synaptischen Spalt zurück in das Neuron oder aber zwischen den Nervenzellen im Zentralnervensystem (ZNS) erfolgt unter anderem über spezielle Dopamintransporter (DAT). Nach ersten Vermutungen über die Existenz eines Dopaminrezeptors durch Iversen im Jahr 1971 konnte im Jahr 1991 ein solcher Transporter aus diversen Geweben von

verschiedenen Autoren als ein „cocaine-sensitive dopamine transporter“ erstmals geklont werden (Giros et al., 1991; Kilty et al., 1991; Shimada et al., 1991; Usdin et al., 1991).

Die DAT gehören zusammen mit den Noradrenalin- und den Serotonintransportern zur Familie der Monoamintransporter, denen eine ähnliche Struktur gemeinsam ist. So sind 66% der für den Dopamintransporter kodierten Basenpaare deckungsgleich mit denen des Noradrenalintransporters (NAT). Beim DAT handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches aus 620 Aminosäuren und 12 Transmembrandomänen besteht (Giros et al., 1992). Das Gen des Dopaminrezeptors (SLC6A3) ist auf dem Chromosom 5p15.3 (Vandenbergh et al., 1992) lokalisiert und dehnt sich über 64kB bestehend aus 15 Exons und 14 Introns aus (Kawarai et al., 1997). Eine Reihe von Krankheiten resultiert aus einer fehlerhaften und zu geringen Expression an DATs wie die Schizophrenie, bipolare Störungen und Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), die Crowe & Vieland (1998) alle mit einem Defekt auf Chromosom 5 in Verbindung bringen. Gainetdinov und Mitarbeiter (1999) konnten bei Knockout-Mäusen für das DAT-Gen eine Hyperaktivität - besonders auch bei einem Umgebungswechsel - belegen und sahen so einen Zusammenhang zum ADHS des Menschen. Im Gegensatz dazu weist eine erhöhte Expression des DATs einen erniedrigten Dopamingehalt im synaptischen Spalt auf und begünstigt somit die Entstehung einer Depression (Laasonen-Balk et al., 1999). Therapeutisch sind hier Dopamin-Wiederaufnahmehemmer wirksam. Weiter konnte ein Zusammenhang zwischen den DAT Genpolymorphismen und Suchtverhalten wie Alkohol- und Nikotinabusus gezeigt werden (Ueno et al., 1999; Ueno, 2003).

Der Dopamintransportvorgang ist ein Natrium- und Chlorid-abhängiger Prozess, bei dem zwei Natriumionen und ein Chloridion zusammen mit einem Dopaminmolekül dem Konzentrationsgefälle in die Zelle folgen, welches durch eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase generiert wird (Gu et al., 1994; Torres et al., 2003). Unter gewissen Voraussetzungen ist dieser Transportvorgang auch umkehrbar. Zum einen ändert sich der Transport durch einen geänderten  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Gradienten (Piffl et al., 1997). Pharmakologisch

bedeutsam ist, dass sich durch gewisse Substanzen die intrazelluläre Aufnahme von Dopamin durch den DAT hemmen, gelegentlich auch umkehren lässt. So lassen sich die Transportvorgänge durch Amphetamine und deren Derivate wie beispielsweise Methamphetamin (auch bekannt als „Ecstasy“) oder Methylphenidate (bekannt als „Ritalin“) hemmen, aber auch umkehren (Johnson et al., 1998; Sandoval et al., 2001; Wall et al., 1995). Kokain und ihm verwandte Stoffe wirken hingegen als nicht-selektive, kompetitive Inhibitoren lediglich hemmend auf die Monoamintransporter (Ritz et al., 1987). Beiden gemeinsam ist jedoch ein erhöhter Dopamingehalt im synaptischen Spalt, eine erhöhte Stimulation der Neuronen und eine daraus resultierende psychostimulierende Wirkung des ZNS. Eine selektive Hemmung einzig des DATs ist durch Substanzen wie Mazindol oder durch die Kokainanaloga GBR 12909 und GBR12783 möglich (Giros et al., 1992). Extraneuronal findet sich der DAT im Gewebe der Niere und des Gastrointestinaltraktes, wie in den Parietal- und Endothelzellen des Magens und den Endothelzellen des Pankreas (Eisenhofer, 2001). Auch beim Neuroblastom könnte der DAT in gewissen Konzentrationen vorliegen (Z. Kuçi, persönliche Mitteilung).

#### **1.2.4.2.2 Der Noradrenalintransporter (NAT)**

Dopamin gelangt nicht nur über den DAT aus dem synaptischen Spalt zurück in die Nervenzelle. Auch Noradrenalintransporter (NAT) beteiligen sich an der zellulären Wiederaufnahme von Dopamin, wie durch einige selektive Hemmversuche der DAT gezeigt werden konnte (Carboni et al., 1990; Morón et al., 2002; Yamamoto & Novotney, 1998). Erstmals konnte dieser Transporter im Jahr 1991 von Susan Amara und Kollegen geklont werden (Pacholczyk et al., 1991), dessen Gen (SLC6A2) auf Chromosom 16q12.2 lokalisiert ist, 45 kB umfasst und aus 14 Exons und 13 Introns besteht (Gelernter et al., 1993; Pörzgen et al., 1995). Wie der DAT verfügt auch der NAT über 12 Transmembrandomänen und setzt sich aus 3 Aminosäuren weniger als der DAT – nämlich aus 617 Aminosäuren – zusammen. Ebenfalls erfolgt der Aufnahmeprozess in die Zelle über einen  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen Cotransport, wobei das Substrat jedoch zusammen mit nur einem Natrium- und einem Chloridion in die Zelle gelangt (Gu et al., 1994). Lokalisiert ist dieser

Transporter hauptsächlich an der präsynaptischen Membran noradrenerger Neuronen, wo sie für den Rücktransport der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt zurück ins Axon verantwortlich sind. Darüber hinaus finden sich große Mengen auch intrazellulär in der Membran der Speichervesikel (Kippenberger, 1999).

Neben den sympathischen Neuronen findet sich dieser Katecholamintransporter besonders in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, in den kapillären Endothelzellen der Lunge und in den Synzytiotrophoblasten des Plazentagewebes (Eisenhofer, 2001). Ein inhomogenes Bild zeigt sich bei Tumoren des Nebennierenmarks: So liegt beim Phäochromozytom eine sehr variable Expression dieses Transporters vor (Cleary et al., 2005), während sich beim Neuroblastom eine hohe Anzahl an NAT findet, wie durch Aufnahmeversuche mit dem Noradrenalinanalogon [<sup>131</sup>I]-mIBG gezeigt werden konnte (Carlin et al., 2003; Lode et al., 1995; Mairs et al., 1994). Eine weitere für diese Arbeit relevante Besonderheit des NAT ist seine geringe Substanzspezifität: Wie in einem PET-Review beschrieben gelangen neben den Neurotransmittern Dopamin und Noradrenalin auch sogenannte „falsche Neurotransmitter“ wie mIBG, Metaraminol, Phenylephrin und Hydroxyephedrin über die NAT in die Zelle (Ding et al., 2006). Gehemmt wird der NAT neben den allgemeinen Monoamin-Transporter Inhibitoren Kokain und Amphetamine selektiv durch die Substanzen Desipramin, Nisoxetin und Reboxetin (Torres et al., 2003).

Sowohl dem DAT als auch dem NAT ist eine hohe Affinität für Katecholamine, bei jedoch nur einer geringen Kapazität, gemeinsam. Bei beiden Transportern weist Dopamin die höchste Transporteffektivität auf, besonders eindeutig zeigt sich dieser Unterschied bei dem danach benannten DAT. Die Transportleistung für Noradrenalin ist beim NAT doppelt so hoch wie für Adrenalin (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Neuronale und nicht-neuronale Katecholamintransporter, Spezifitäten für endogene Katecholamine und Inhibitoren (modifiziert nach Bayer, 2009 und Eisenhofer, 2001)

|                                    | Substratspezifität | Inhibitoren (Auswahl)                               |
|------------------------------------|--------------------|---|
| <b>Neuronale Transporter</b>       |                    |   |
| NAT                                | DA > NA > A        | Desipramin, Kokain, Nisoxetin                       |
| DAT                                | DA >> NA > A       | Kokain, Mazindol, GBR-12909                         |
| <b>Nicht-neuronale Transporter</b> |                    |   |
| OCT1                               | DA ≈ A >> NA       | Isocyanine, Corticosterone                          |
| OCT2                               | DA >> NA > A       | Isocyanine, Corticosterone                          |
| OCT3 (EMT)                         | A >> NA > DA       | Isocyanine, Corticosterone,<br>O-methylisoprenaline |

Legende: NAT = Noradrenalintransporter; DAT = Dopamintransporter; OCT = organischer Kationentransporter; EMT = extraneuronaler Monoamintransporter; DA = Dopamin; NA = Noradrenalin; A = Adrenalin.

### 1.2.4.3 Die Aufnahme von Dopamin über die nicht-neuronalen Monoamintransporter

Die nicht-neuronalen Monoamintransporter, die auch als Uptake 2 System bezeichnet werden, umfassen die organischen Kationentransporter (*engl. organic cation transporter*, kurz OCT) OCT1, OCT2 und OCT3 (Synonym: Extraneuronaler Monoamintransporter, EMT). Ihnen gemeinsam im Vergleich zum Uptake 1 System ist eine geringere Katecholaminaffinität bei höherer maximaler Katecholaminaufnahmerate sowie die Bevorzugung von Adrenalin vor Noradrenalin. Weiter handelt es sich dabei im Unterschied zu den neuronalen Monoamintransportern um einen Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-unabhängigen Transportvorgang, welcher ein völlig anderes pharmakologisches Inhibitionsprofil aufweist.

Erstmals wurde ein extraneuronaler Monoamintransporter (EMT) im Jahr 1990 bei der geklonten Nierenzellkarzinom Zelllinie Caki-1 beschrieben (Schömig & Schönfeld, 1990; Schömig et al., 1990), welcher 1998 bei Caki-1 Zellen und bei Plazentagewebe als organischer Kationentransporter OCT3 identifiziert werden

konnte (Gründemann et al., 1998b; Kekuda et al., 1998; Wu et al., 1998). Kurz zuvor wurden bereits die beiden anderen organischen Kationentransporter OCT1 und OCT2 geklont (Gründemann et al., 1994, 1997). Ihnen gemeinsam sind zwölf Transmembrandomänen und eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen, besonders zwischen OCT1 und OCT2. Ihre Gene SLC22A1-3 sind alle auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6q26-27) lokalisiert (Gründemann & Schömig, 2000; Koehler et al., 1997; Verhaagh et al., 1999), Veränderungen dieser Region wurden ebenfalls bei Erkrankungen wie Diabetes und Atherosklerose beobachtet, sodass ein Verdacht eines Zusammenhangs dieser Entitäten mit Veränderungen der OCTs besteht.

Sie alle weisen ein breites Spektrum an aufzunehmenden Substanzen auf und können u.a. die Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), 5-Hydroxytryptamin und mIBG transportieren (Bayer et al., 2009). Aber es bestehen auch Substratspezifitäten der einzelnen Transporter: Tetraethylammonium ist ein gutes Substrat für OCT1 und OCT2, Cholin wird hingegen nur über den OCT1 transportiert, Histamin wird als Substrat von OCT2 und OCT3 bevorzugt und Guanidin und Kreatinin werden von OCT2 präferiert (Gründemann et al., 1999). Aber auch in Bezug auf die Katecholamine gibt es gewisse Unterschiede: Für den Dopamintransport ist der OCT2 derjenige mit der höchsten Transportleistung (Gründemann et al., 1998a). Bei dem OCT1 ist ebenfalls der Transport von Dopamin zusammen mit Adrenalin dem von Noradrenalin überlegen (Breidert et al., 1998). Der OCT3 bevorzugt hingegen Adrenalin vor Noradrenalin; Dopamin wird über diesen Transporter nur in geringen Mengen in die Zelle aufgenommen (Gründemann et al., 1998b; Martel et al., 1999) (siehe Tabelle 1.5). Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entgiftung im Kreislauf zirkulierender kationischer Abbauprodukte (Breidert et al., 1998; Gründemann et al., 1998a).

Die nicht-neuronalen Monoamintransporter kommen auf sympathisch innervierten Geweben vor (Gründemann et al., 1998b). Aufgrund der unterschiedlichen Katecholamineigenschaften der drei nicht-neuronalen Katecholamintransporter

finden sich diese auch in unterschiedlichen Geweben entsprechend ihres Stoffwechselbedarfs: Die OCT1 finden sich in den Hepatozyten, in den Epithelzellen des Verdauungstraktes und in geringen Mengen auch in der Niere (Breidert et al., 1998; Gründemann et al., 1994; Hilgendorf et al., 2007; Lee et al., 2009). In dopaminreichen Geweben wie den Nieren und den Gliazellen des ZNS trifft man auf die OCT2 (Gründemann et al., 1998a; Lee et al., 2009). Hingegen findet sich der OCT3 in einem breiten Spektrum an Geweben. Vor allen Dingen kommt dieser Transporter in Zellen vor, welche einen hohen Adrenalinbedarf haben wie Leber, Gehirn, Herz, Lunge, Blutgefäße, Niere, Plazenta, Retina und andere (Haag et al., 2004; Kekuda et al., 1998; Rajan et al., 2000; Wu et al., 2000).

Im Gegensatz zu den neuronalen Monoamintransportern lassen sie sich pharmakologisch nicht durch trizyklische Antidepressiva oder Kokain hemmen. Wegen ihrer Hemmbarkeit durch das Steroid Corticosteron wurden die OCTs bei ihrer Identifizierung als Corticosteron-sensitive extraneuroanale Katecholamintransporter beschrieben (Gründemann et al., 1998b), was in Zukunft für die Bildgebung des Phäochromozytoms und des Neuroblastoms bedeutsam sein kann (Bayer et al., 2009). Neben dem Corticosteron lassen sich diese Transporter durch Isocyanine und Pseudoisocyanine hemmen (Gründemann et al., 1998b; Russ et al., 1993). Weiter sind in der Literatur auch einige spezifische Hemmstoffe beschrieben: OCT1 wird selektiv durch Prazosin gehemmt; auch Phenoxybenzamin hemmt den OCT1 reversibel, zusätzlich aber auch die OCT2 und 3 irreversibel. Auch SKF550 inhibiert irreversibel OCT2 und 3 (Hayer-Zillgen et al., 2002). Ranitidin und Famotidin sind beide zwei potente Inhibitoren der OCT1 und 2, darüber hinaus scheint Famotidin einer der stärksten Hemmstoffe des OCT3 zu sein (Bourdet et al., 2005) (siehe Tabelle 5).

## 1.2.5 Aktuelle Entwicklungen in der PET und SPECT Diagnostik

Die Positronen-Emissions-Tomografie (*engl. positron emission tomography*, PET) und Einzelphotonen-Emissions-Tomografie (*engl. single photon emission computed tomography*, SPECT) zählen wie auch die Szintigrafie zu den funktionellen bildgebenden Verfahren, die auf Stoffwechseleigenschaften der Organe oder Organsysteme basieren. Gepaart werden diese Techniken zur anatomischen Darstellung gerne mit morphologischen bildgebenden Verfahren wie dem CT und dem MRT. Sowohl bei PET als auch bei SPECT werden Radionukleotide als Radiopharmakon (sogenannte „Tracer“) dem Patienten intravenös verabreicht. Beim PET werden Positronen, positiv geladene Teilchen ( $\beta^+$ -Strahlung) verwendet. Ein solches Positron interagiert mit einem benachbarten Elektron, sodass Vernichtungsstrahlung entsteht, bei der zwei Photonen ( $\gamma$ -Strahlung) mit 511 keV in entgegengesetzter Richtung geschleudert werden, die dann mittels ringförmigem Detektor aufgefangen werden. Die bei SPECT eingesetzten Tracer emittieren  $\gamma$ -Strahlen, welche mittels Gamma-Kamera gemessen werden. Für die PET werden neben  $^{18}\text{F}$  die radioaktiven Isotope  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{82}\text{Rb}$  oder  $^{68}\text{Ga}$  eingesetzt, wobei diese im Vergleich zu denen bei SPECT eingesetzten Isotopen  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$  und  $^{201}\text{Tl}$  eine wesentlich kürzere Halbwertszeit aufweisen.

Tabelle 6: Auswahl an Isotopen mit Halbwertszeit und deren Einsatz als Radiopharmakon

| Isotop           | Halbwertszeit | Radiopharmakon   |
|------------------|---------------|--|
| $^{18}\text{F}$  | 109 Minuten   | $[^{18}\text{F}]$ -FDG, $[^{18}\text{F}]$ -6-FDOPA, $[^{18}\text{F}]$ -6-FDA |
| $^{123}\text{I}$ | 13 Stunden    | $[^{123}\text{I}]$ -mIBG   |
| $^{131}\text{I}$ | 8 Tage        | $[^{131}\text{I}]$ -mIBG   |

Legende:  $[^{18}\text{F}]$ -FDG =  $[^{18}\text{F}]$ -Fluor-2-Desoxy-D-Glukose;  
 $[^{18}\text{F}]$ -6-FDOPA =  $[^{18}\text{F}]$ -6-Fluoro-3,4-Dihydroxyphenylalanine;  
 $[^{18}\text{F}]$ -6-FDA =  $[^{18}\text{F}]$ -6-Fluoro-Dopamin;  $[^{123}\text{I}]$ -mIBG =  $[^{123}\text{I}]$ -Metajodobenzylguanidin;  
 $[^{131}\text{I}]$ -mIBG =  $[^{131}\text{I}]$ -Metajodobenzylguanidin.

Beim PET wird bei Tumoren oder Entzündungen aufgrund der gesteigerten Glykolyse hauptsächlich das Radiopharmakon  $[^{18}\text{F}]$ -Fluor-2-Desoxy-D-Glukose, kurz

[<sup>18</sup>F]-FDG, eingesetzt. Nach einer präklinischen Studie für den Einsatz des [<sup>18</sup>F]-FDG PET (Wahl et al., 1991) und ersten kleineren klinischen Studien, bei den Shulkin und Mitarbeiter im Jahr 1995 nachweisen konnten, dass das Neuroblastom und seine Metastasen die radioaktiv markierte Glukose aufnimmt und speichert, konnte Kushner und Mitarbeiter (2001) in einer ersten größeren Studie den Benefit dieser neuen Methode für die Neuroblastompatienten nachweisen. In den letzten Jahren konnte das [<sup>18</sup>F]-FDG PET durch die gleichzeitige Durchführung eines CTs oder MRTs weiter verbessert werden. Tracer wie [<sup>18</sup>F]-6-Fluoro-3,4-Dihydroxyphenylalanin ([<sup>18</sup>F]-6-FDOPA) werden bislang u.a. bei der Parkinsonfrühdagnostik und bei der Diagnostik neuroendokriner Tumoren wie Karzinoiden, Inselzelltumoren des Pankreas, Phäochromozytomen, Paragangliomen, medullärem Schilddrüsenkarzinom, dem Hyperinsulinismus, kleinzelligen Lungenkarzinomen und beim Melanom eingesetzt. Obwohl Analogieschlüsse möglich sind, liegen für das Neuroblastom bis Mai 2007 - und darüber hinaus - keine Studien vor (Jager et al., 2008). [<sup>18</sup>F]-6-Fluoro-Dopamin ([<sup>18</sup>F]-6-FDA) ist ein weniger gebräuchlicher Tracer, der jedoch seinen Einsatz u.a. in der Kardiagnostik und ebenfalls in der Diagnostik neuroendokriner Tumoren wie dem Phäochromozytom und dem medullären Schilddrüsenkarzinom findet (Gourgiotis et al., 2003).

Diese beiden Substanzen - [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA und [<sup>18</sup>F]-6-FDA - sind im Hinblick auf diese Arbeit von besonderem Interesse. Deshalb wurde ihre Aufnahme in Form des Analogens [<sup>3</sup>H]-DOPA und [<sup>3</sup>H]-Dopamin sowie ihr Metabolismus in Neuroblastomzellen nach Inkubation mit unmarkiertem 6-FDOPA und 6-FDA speziell untersucht.

Das mit dem Isotop <sup>123</sup>I markierte Noradrenalinanalogon mIBG ist mittlerweile ein etablierter Tracer für die Diagnostik des Neuroblastoms. Bereits 1995 konnten Rufini und Mitarbeiter beim Neuroblastom nachweisen, dass das [<sup>123</sup>I]-mIBG SPECT eine knapp 10% höhere Sensitivität aufweist als die planare Szintigrafie. Durch den zusätzlichen Einsatz der SPECT neben der planaren Szintigrafie konnte in einer aktuellen Studie die Sensitivität von 88% auf 93% erhöht werden (Vik et al., 2009). Das mIBG SPECT/CT schließt die Lücke zwischen funktioneller und

morphologischer Diagnostik und konnte die diagnostische Sicherheit erhöhen (Rozovsky et al., 2008). Als Tracer kann auch [<sup>111</sup>In]-Pentetreotid verwendet werden, im Vergleich zu mIBG weist dieses Somatostatinanalogon jedoch eine geringere Aufnahme und Anreicherung in Neuroblastomzellen auf (Jacobsson et al., 2007).

Unterschiedliche vergleichende Studien zwischen PET und SPECT liegen mittlerweile bei verschiedenen Tumoren mit unterschiedlichen Tracern vor: Bei unklaren Katecholaminerhöhungen weist das [<sup>18</sup>F]-FDOPA PET eine höhere Sensitivität für die Lokalisation von Tumoren auf als die [<sup>123</sup>I]-mIBG Szintigrafie oder als das CT bzw. das MRT. Diese Studie schloss Phäochromozytome, Nebennierenhyperplasien, Paragangliome und Ganglioneurome ein (Fiebrich et al., 2009). Ebenso ist bei der Diagnostik des metastasierten Phäochromozytoms das [<sup>18</sup>F]-6-FDA PET der [<sup>131</sup>I]-mIBG Szintigrafie überlegen (Ilias et al., 2003). Für das Ganzkörper-PET/CT mit dem radioaktiven Noradrenalinanalogon [<sup>11</sup>C]-Meta-Hydroxyephedrin als Tracer besteht bei der Detektion von verschiedenen Tumoren des sympathischen Nervensystem eine Überlegenheit gegenüber dem [<sup>123</sup>I]-mIBG SPECT/CT (Franzius et al., 2006). Beim metastasierten Paragangliom und Phäochromozytom ist das [<sup>18</sup>F]-6-FDA PET/CT die beste diagnostische Methode, gefolgt vom [<sup>18</sup>F]-FDOPA PET und der [<sup>123</sup>I]-mIBG Szintigrafie (Timmers et al., 2009). Der Einsatz dieser Tracer ist aber nur so lange sinnvoll, solange der Tumor nicht zu sehr entdifferenziert ist und keine Veränderungen der NAT vorliegen. Dann ist das [<sup>18</sup>F]-FDG PET/CT das Diagnostikum der Wahl (Shulkin et al., 1996).

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Die beiden Substanzen [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA und [<sup>18</sup>F]-6-FDA finden bei der Positronen-Emissions-Tomografie in Kombination mit der Computertomografie (PET/CT) bisher bei der Bildgebung verschiedener Entitäten ihren Einsatz. Das verbreitetere [<sup>18</sup>F]-6-FODPA wird bei der Parkinsonfrühdagnostik und bei der Diagnostik einer Reihe onkologischer Erkrankungen wie den neuroendokrin aktiven Tumoren eingesetzt. [<sup>18</sup>F]-6-FDA findet als Radiopharmakon sowohl Verwendung bei der

Darstellung des Phäochromozytoms und möglicher Metastasen, als auch des medullären Schilddrüsenkarzinoms und der adrenergen Innervation des Herzens. Physiologische Grundlage für diese Mechanismen ist die Anwesenheit von spezifischen Transportsystemen in diesen Geweben. So wird das radioaktiv markierte 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA über die L-Typ Aminosäuretransporter (LAT), das radioaktiv markierte Dopamin [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA über die Dopamin- und die Noradrenalintransporter transmembranär aufgenommen. Da das Neuroblastom wie auch das Phäochromozytom über solche Katecholamintransporter verfügt, besteht für den Einsatz des spezifischeren [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA beim PET/CT große Hoffnung. Klinisches Ziel dieser Arbeit ist es die beiden Substanzen [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA und [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA auf ihren möglichen Einsatz zur Tumorverlaufskontrolle des Neuroblastoms zu untersuchen. Sowohl die zelluläre Aufnahme als auch der intrazelluläre Metabolismus dieser Substanzen stehen somit im Zentrum der Fragestellung dieser Arbeit. Dabei wurden die Versuche an Neuroblastom-Zelllinien und an organische Kationentransporter (OCT) exprimierende Zellen durchgeführt und die Aufnahme- und Stoffwechseleigenschaften miteinander verglichen. Zur praktikableren Handhabung wurden die Aufnahmecharakteristika mit [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin, [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA und nach dessen enzymatischen Umsetzung mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin untersucht. Unmarkiertes 6-FDOPA und 6-FDA wurde eingesetzt um neben den Aufnahmeeigenschaften auch den intrazellulären Metabolismus in den beiden verwendeten Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly und den OCT exprimierenden Zellen beschreiben zu können.

## 2 *Materialien und Methoden*

### 2.1 **Materialien**

#### 2.1.1 *Verbrauchsmaterialien*

| <b>Material</b>                                | <b>Firma</b>   |
|--|--|
| Aluminiumoxidsäulchen                         | Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München, D       |
| Einmalspritze 50 ml                            | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D                          |
| Eppendorf-Cups 1,5 und 2,0 ml                  | Eppendorf AG, Hamburg, D                                     |
| Glaspipettenspitzen 5 ml, 10 ml und 25 ml      | Corning Incorporated, New York, USA                          |
| Kryoröhrchen                                  | Corning Incorporated, New York, USA                          |
| Parafilm „M“                                   | American National Can Company, Chicago, USA                  |
| Pasteurpipetten 230 mm                         | Firma WU, Mainz, D   |
| Photometermesskuvetten                         | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D                             |
| Pipettenspitzen 200 und 1000 $\mu$ l           | Eppendorf AG, Hamburg, D<br>SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D |
| Röhrchen 5 ml, 15 ml und 50 ml                | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D                       |
| Sterilfilter Minisart® 0,2 $\mu$ m Porengröße | Sartorius AG, Göttingen, D                                  |
| 5000 D-Ultrafiltriersystem                     | Millipore Research & Development, Bedford (MA), USA          |
| Wagepapier                                    | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D                       |
| Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>          | BD Falcon Biosciences, Heidelberg, D                         |
| Zellkulturflaschen 162 cm <sup>2</sup>         | Corning Incorporated, New York, USA                          |

Zentrifugenröhrchen 5 ml, 15 ml und 50 ml | BD Falcon Biosciences, Heidelberg, D

Außerdem wurden Alufolie, Latexhandschuhe, Spatel, Pinzetten und Zentrifugenständer verschiedener Hersteller verwendet.

## 2.1.2 Geräte und Messapparaturen

| Gerät   | Firma   |
|---|---|
| β-Counter (Tri Carb 2900 TR)  | Canberra Packard Central Europe Gesellschaft GmbH, Schwadorf, A     |
| Brutschrank   | Heraeus Holding GmbH, Hanau, D                                      |
| <u>HPLC-Anlage:</u>   | Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, D:                                 |
| Binäre Pumpe (G1312A)   | komplett vertrieben von der Firma Bio-                              |
| Autosampler (G1313A)  | Rad Laboratories GmbH, München, D                                   |
| Säulentermaostat (G1316A)   |   |
| C 18 Reversed Phase Säule<br>für Urinkatecholamine<br>(5 µm, 4,6 mm x 150 mm) |   |
| Elektrochemischer Detektor<br>Typ HP 1049A                                    |   |
| Computer HP ChemServer  |   |
| Software HP ChemStation   |   |
| Drucker   | EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch, D                                |
| Mikroskop   | Carl Zeiss AG, Oberkochen, D<br>Firma Will, Wetzlar, D              |
| Mikrowaage  | Sartorius AG, Göttingen, D  |
| Neubauer-Zählkammern  | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön, D |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Photometer Ultrospec Plus | Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, S   |
| Pipetten                  | Eppendorf AG, Hamburg, D<br>Gilson, Inc., Middleton, USA                                    |
| Pipettierhilfe            | INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, D   |
| Sterile Werkbank          | Heraeus Holding GmbH, Hanau, D  |
| Über-Kopf-Schüttler       | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D  |
| Vortexer                  | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D<br>Bioblock Scientific AG, Frenkendorf, CH |
| Wasserbad                 | Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D   |
| Zentrifuge Rotixa 50 RS   | Hettich AG, Bäch, CH  |
| Zentrifuge Mikro 22 R     | Hettich AG, Bäch, CH  |

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

| Substanzen                     | Firma                                    |
|--------------------------------|--|
| Ampuwa                         | Fresenius SE, Bad Homburg, D             |
| L-Ascorbinsäure                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D  |
| Desipramin                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D  |
| 3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D  |
| Dopamin                        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D  |
| EcoLume                        | ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a. M., D |

|  |   |
|--|---|
| Ethanol (70 %)   | Apotheke des Universitätsklinikums<br>Tübingen  |
| Fetales Kalberserum  | Biochrom AG, Berlin, D  |
| 6-Fluoro-DOPA  | ABX GmbH, Radeberg, D   |
| 6-Fluoro-Dopamin   | Institut für Organische Chemie der<br>Universität Tübingen nach dem Protokoll<br>von Seitz et al., 2000 |
| D-(+)-Glucose  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim, D  |
| D-MEM Medium 500 ml<br>(+ 1000 mg/l Glucose, L-Glutamin,<br>Pyruvat)                         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim, D  |
| VLE RPMI Medium 500 ml<br>(w 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w/o L-Glutamin)                    | Biochrom AG, Berlin, D  |
| Penicillin / Streptomycin<br>(10000 U / 10000 µg/ml)   | Biochrom AG, Berlin, D  |
| Perchlorsäure (HClO <sub>4</sub> ) (60%)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim, D  |
| Phosphat gepufferte Saline mit Ca <sup>2+</sup> und<br>Mg <sup>2+</sup> (PBS <sup>++</sup> ) | Biochrom AG, Berlin, D  |
| Phosphat gepufferte Saline ohne Ca <sup>2+</sup><br>und Mg <sup>2+</sup> (PBS <sup>-</sup> ) | Biochrom AG, Berlin, D  |
| Trypanblau-Lösung (0,4%)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim, D  |
| Trypsin / EDTA Lösung<br>(0,05% / 0,02% in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )     | Biochrom AG, Berlin, D  |
| Tyrosin  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim, D  |

## 2.1.4 Radioaktive Substanzen

| Substanzen   | Firma   |
|--|---|
| <u>[<sup>14</sup>C]-3,4-Dihydroxyphenylalanine</u><br><u>([<sup>14</sup>C]-DOPA)</u><br>MG = 199 g/mol<br>50 µCi / 1000 µl<br>54 mCi / mM (2 GBq / mM) | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D  |
| <u>[<sup>14</sup>C]-Dopamin</u><br>MG = 156 g/mol<br>50 µCi / 1000 µl<br>54 mCi / mM (2 GBq / mM)  | Durch enzymatische Decarboxylierung aus [ <sup>14</sup> C]-DOPA hergestellt (siehe Kapitel 2.2.3.4.1 und Kapitel 3.2.1) |
| <u>[<sup>3</sup>H]-Dopamin</u><br>MG = 156 g/mol<br>250 µCi / 250 µl<br>49 Ci / mM (1.81 TBq / mM)   | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D  |

## 2.1.5 Verwendete Lösungen und Zellkulturmedien

### 2.1.5.1 Lösungen

PBS:

| Substanz                         | Konzentration |
|----------------------------------|---------------|
| NaCl                             | 0,14 M        |
| KCl                              | 2,7 mM        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 3,2 mM        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 mM        |

PBS<sup>++</sup>:

Wie PBS<sup>-</sup>, aber zusätzlich:

| <b>Substanz</b>  | <b>Konzentration</b> |
|------------------|----------------------|
| Ca <sup>2+</sup> | 3,2 mM               |
| Mg <sup>2+</sup> | 4,1 mM               |

Aufbewahrt wurden beide Lösungen bei 4 °C.

**2.1.5.2 Zellkulturmedien**RPMI 1640 Zellkulturmedium:

| <b>Substanz</b>                              | <b>Konzentration</b> |
|--|----------------------|
| Very Low Endotoxin RPMI 1640 (VLE-RPMI 1640) |                      |
| Fetales Kälberserum (FCS)                    | 10 %                 |
| L-Glutamin                                   | 2 mM                 |
| Penicillin                                   | 100 IU/ml            |
| Streptomycin                                 | 100 IU/ml            |

DMEM Zellkulturmedium:

| <b>Substanz</b>  | <b>Konzentration</b> |
|--|----------------------|
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit Earle's Salzen |                      |
| Natriumbikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )                    | 0,85 mg/ml           |
| Fetales Kälberserum (FCS)                                  | 10 %                 |
| Penicillin   | 100 IU/ml            |
| Streptomycin   | 100 IU/ml            |

Aufbewahrt wurden die beiden Medien bei 4 °C.

Einfriermedium:

| <b>Substanz</b>           | <b>Konzentration</b> |
|---------------------------|----------------------|
| Medium                    | 80 %                 |
| Fetales Kälberserum (FCS) | 10 %                 |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | 10 %                 |

Bis zu seiner Verwendung wurde es bei -20 °C eingefroren.

## 2.1.6 Verwendete Zelllinien

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien mit Beschreibung, Herkunft und Literaturangaben

| <b>Zelllinie</b>    | <b>Charakteristik</b>   | <b>Transporter</b> | <b>Herkunft</b>   | <b>Literatur</b>   |
|---------------------|---|--------------------|---|--|
| <b>SK-N-SH</b>      | monoklonale Zelle eines differenzierten, homogenen Neuroblastoms (human)  | NAT                | American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA                        | Biedler et al., 1973, 1978; Kuçi et al., 2002; Lode et al., 1995; Ross et al., 1981                |
| <b>Kelly</b>        | monoklonale Zelle eines Neuroblastoms (human)                             | (NAT)              | German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Braunschweig, D | Kuçi et al., 2002; Preis et al., 1988; Schwab et al., 1983   |
| <b>Caki-1</b>       | monoklonale Zelle eines Nierenzellkarzinoms (human)                       | OCT3 (EMT)         | American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA                        | Fogh et al., 1977; Gründemann et al., 1998b, 1999; Schömig & Schönfeld, 1990; Schömig et al., 1990 |
| <b>EMT-HEK 293</b>  | monoklonale, embryonale Nierenzelle (human), transformiert mit OCT3 (EMT) | OCT3 (EMT)         | Institut für Pharmakologie der Universität Heidelberg (Prof. Schömig), D      | Graham et al., 1977; Gründemann et al., 1998b, 1999  |
| <b>OCT1-HEK 293</b> | monoklonale, embryonale Nierenzelle (human), transformiert mit OCT1       | OCT1               | Institut für Pharmakologie der Universität Heidelberg (Prof. Schömig), D      | Graham et al., 1977; Martel et al., 1996   |
| <b>OCT2-HEK 293</b> | monoklonale, embryonale Nierenzelle (human), transformiert mit OCT2       | OCT2               | Institut für Pharmakologie der Universität Heidelberg (Prof. Schömig), D      | Graham et al., 1977; Gründemann et al., 1997, 1998a  |

## **2.1.6.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien**

### **2.1.6.1.1 Die SK-N-SH Neuroblastom-Zelllinie**

Unter den vielen mittlerweile kultivierten menschlichen Neuroblastom-Zelllinien fand die SK-N-SH zusammen mit der Kelly Zelllinie in dieser Arbeit stellvertretend für das Neuroblastom im Organismus ihren Einsatz. Diese SK-N-SH Zelllinie wurde 1970 aus dem Gewebe eines Knochenmarkaspirats eines vierjährigen Mädchens gewonnen und seither für Tumorzellforschungen und für Studien der neuronalen Zellbiologie kultiviert (Biedler et al., 1973). Sie gehört zu den adrenergen - also zu den Katecholamin-produzierenden - Neuroblastom-Zelllinien. Die SK-N-SH Neuroblastom-Zelllinie ist in Bezug auf ihre neuronale Enzymexpression multipotent (Biedler et al., 1978). Die für den Katecholaminstoffwechsel notwendigen einzelnen Enzyme wurden in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. So zeigte sich für die Tyrosin-Hydroxylase eine niedrige, für die Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase eine mäßige und für die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase eine hohe Konzentration in den SK-N-SH Zellen. Die N-Methyl-Transferase zur Synthese von Adrenalin war nicht nachweisbar (Kuçi et al., 2002; Ross et al., 1981). Damit lässt sich erklären, dass im Katecholaminstoffwechsel der SK-N-SH Zelllinie Noradrenalin das Endprodukt ist. Die Aufnahme der Katecholamine in die SK-N-SH erfolgt über den NAT, ein DAT kommt bei dieser Zelllinie nicht vor (Lode et al., 1995), bzw. höchstens in sehr geringer Ausprägung (Kuçi et al., unveröffentlicht). Die Verdopplungszeit der adhärent wachsenden Zellen in der Zellkultur wird in der Literatur mit ca. 46 Stunden angegeben (Ross et al., 1981).

### **2.1.6.1.2 Die Kelly Neuroblastom-Zelllinie**

Die Kelly Neuroblastom-Zelllinie unterscheidet sich von der SK-N-SH Zelllinie durch ihre hohe 100-120 fache DNA N-MYC Amplifikation (Schwab et al., 1983). Dies weist auf eine geringere Differenzierung und ein rascheres Wachstum hin und dient als Modell eines rasch fortschreitenden Tumors (Preis et al., 1988). Die Kelly Zellen produzieren die aromatische Aminosäure DOPA und die Katecholamine Dopamin

und Noradrenalin in großen Mengen. Adrenalin wird nicht synthetisiert. Der für die Aufnahme der Katecholamine notwendige NAT wird synthetisiert, die Genexpression liegt jedoch nur bei 20% im Vergleich zur SK-N-SH Zelllinie (Kuçi et al., 2002).

#### **2.1.6.1.3 Die Caki-1 Nierenkarzinom-Zelllinie**

Die erste Beschreibung eines extraneuronalen Transportmechanismus von Noradrenalin fand durch Experimente mit der humanen Nierenkarzinom-Zelllinie Caki-1 1990 statt (Schömig & Schönfeld, 1990; Schömig et al., 1990). Gründemann und Mitarbeiter (1998b, 1999) konnten einige Jahre später den Transportmechanismus dieser Nierenkarzinom-Zelllinie als einen organischen Kationentransporter beschreiben. Ursprünglich entstammt die Caki-1 Zelllinie einem 49-jährigen männlichen kaukasischen Patienten mit einem klarzelligen Nierenkarzinom (Fogh et al., 1977).

Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da bei ihr die extraneuronale Aufnahme von 6-FDA über den extraneuronalen Monoamintransporter OCT3 - wie auch bei der EMT-HEK 293 Zelllinie - untersucht werden kann (siehe dazu auch Kapitel 1.2.4.3).

#### **2.1.6.1.4 Die EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 Zelllinien**

Graham und Mitarbeitern gelang 1977 die Transformation menschlicher embryonaler Nierenzellen mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5. Diese so künstlich synthetisierte und adhärent wachsende Nierentumorzelllinie HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) wurde später für unterschiedliche Fragestellungen weiter transformiert. Die für organische Kationentransporter OCT1-3 kodierenden DNA-Sequenzen wurden auf die Nierentumorzelllinie HEK-293 übertragen und kultiviert (Gründemann et al., 1997, 1998a,b, 1999; Martel et al., 1996). So weisen die einzelnen Zelllinien jeweils spezifische Transporter mit unterschiedlichen Substratspezifitäten auf (siehe dazu Tabelle 1.5, Seite 29). Die Zelllinien OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 haben für Dopamin eine hohe Affinität, die Zelllinie EMT-

HEK 293 hingegen eine niedrige (Breidert et al., 1998; Gründemann et al., 1998a,b; Martel et al., 1999) (siehe Kapitel 1.2.4.3).

Verwendet wurden diese Zellen, um die Aufnahme von 6-FDA über die extra-neuronalen Monoamintransporter OCT1-3 jeweils selektiv zu untersuchen.

## 2.1.7 Übersicht über chemische Strukturen der verwendeten Katecholamine und analogen Verbindungen

### Tyrosin:

IUPAC-Nomenklatur:

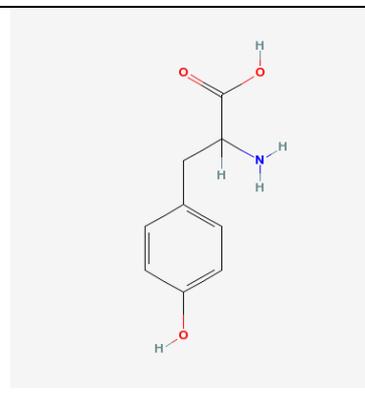
2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid

Summenformel:

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>

Molekulargewicht:

181,19 g/Mol



Legende: IUPAC = Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl. International Union of Pure and Applied Chemistry)

### 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA):

IUPAC-Nomenklatur:

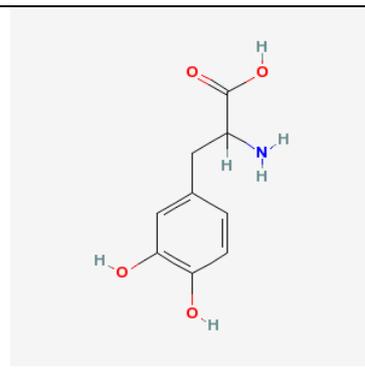
(2S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid

Summenformel:

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>

Molekulargewicht:

197,19 g/Mol



### 6-Fluoro-3,4-Dihydroxyphenylalanine (6-Fluoro-DOPA):

IUPAC-Nomenklatur:

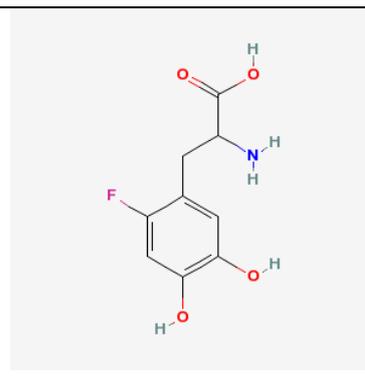
(2S)-2-amino-3-(2-fluoro-4,5-dihydroxyphenyl)propanoic acid

Summenformel:

$C_9H_{10}FNO_4$

Molekulargewicht:

215,18 g/Mol



### Dopamin:

IUPAC-Nomenklatur:

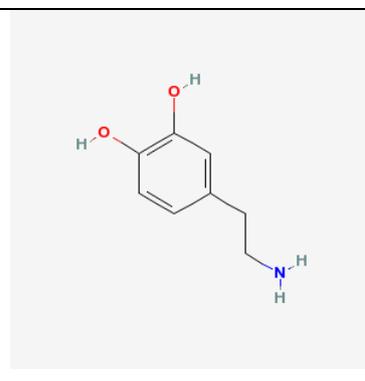
4-(2-aminoethyl)benzene-1,2-diol

Summenformel:

$C_8H_{11}NO_2$

Molekulargewicht:

153,18 g/Mol



### 6-Fluoro-Dopamin:

IUPAC-Nomenklatur:

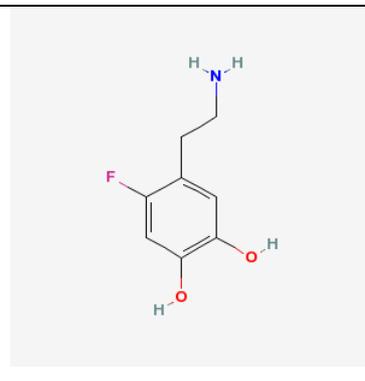
4-(2-aminoethyl)-5-fluorobenzene-1,2-diol

Summenformel:

$C_8H_{10}FNO_2$

Molekulargewicht:

171,17 g/Mol



**Desipramin:**

IUPAC-Nomenklatur:

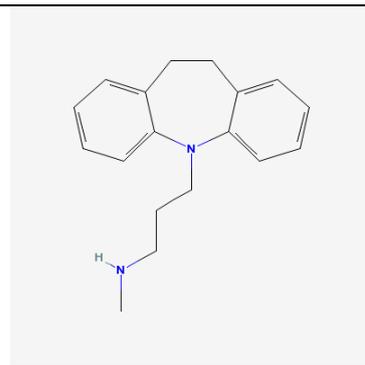
3-(5,6-dihydrobenzo[b][1]benzazepin-11-yl)-N-methylpropan-1-amine

Summenformel:

$C_{18}H_{22}N_2$

Molekulargewicht:

266,38 g/Mol



## **2.2 Methoden**

Die im Folgenden beschriebenen Methoden mit Zellkulturen setzten ein steriles Arbeiten voraus, um Kontaminationen mit Bakterien, Mykoplasmen oder Pilzen zu vermeiden. Neben dem Einsatz von Antibiotika fand daher ein Großteil der Arbeit an der Sterilbank statt, und bei diesen Tätigkeiten wurden Einmalhandschuhe getragen. Die Arbeitsfläche, die Handschuhe sowie die eingesetzten Gegenstände - sofern diese nicht steril verpackt waren - wurden vor dem Einsatz mit Ethanol (70 %) besprüht und so desinfiziert. Hergestellte Reagenzien wurden durch den Einsatz steriler Filter gereinigt. Vor dem Arbeiten mit Zellkulturen wurden die eingesetzten Reagenzien und Medien im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

### **2.2.1 Herstellung der Lösungen**

#### **2.2.1.1 Herstellung der Ascorbatlösung**

Um den Zellkulturen während des Wachstums Ascorbinsäure (ascorbic acid, AA) (final concentration (f.c.): 50 µM) begeben zu können, wurde eine 175 mM Ascorbinsäurelösung hergestellt, die dann in Eppendorf-Cups bei -20°C eingefroren wurde. Vor dem Einsatz wurde diese Lösung in einem Verhältnis von 1:10 mit PBS<sup>-</sup> verdünnt, sodass eine 17,5 mM Lösung entstand.

Dazu wurde Ascorbinsäure (MG = 176,1 g/Mol) in sterilem Wasser (Ampuwa) gelöst, mit einem Filter (0,2 µm Porengröße) steril filtriert und bis zum jeweiligen Einsatz eingefroren. Da die gelöste Ascorbinsäure instabil und lichtempfindlich ist, musste bei jedem Arbeitsschritt versucht werden, die Lösung von Licht fernzuhalten. Dies geschah durch Umwickeln der Eppendorf-Cups mit Alufolie.

Auf dieselbe Weise wurden für die Durchführung der Versuche Aliquote von 10 µl mit einer Ascorbatkonzentration von 10 mM hergestellt.

### **2.2.1.2 Herstellung der 6-Fluoro-DOPA-Lösung und der 6-Fluoro-Dopamin-Lösung**

Für die Durchführung der Versuche zur zellulären Aufnahme (Kapitel 2.2.3.1) wurden 10 µl Aliquote mit 10 mM 6-Fluoro-DOPA (6-FDOPA) und 10 mM 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) hergestellt:

Das dafür abgewogene 6-FDOPA Pulver (MG = 252 g/Mol) und das 6-FDA Pulver (MG = 208 g/Mol) wurde zuerst in 1 mM Salzsäure (HCl) gelöst, die aus 1 M HCl und sterilem Wasser (Ampuwa) im Verhältnis 1:1000 hergestellt wurde. Nach einem sterilen Filtriervorgang mit Sterilfilter Minisart® 0,2 µm Porengröße wurde sowohl die 6-FDOPA als auch 6-FDA Lösung in Eppendorf-Hütchen pipettiert und bei -20°C eingefroren. Beim weiteren Arbeiten musste ebenfalls darauf geachtet werden, dass die 6-FDOPA und die 6-FDA Lösung nicht dem Licht ausgesetzt wurde. Die Eppendorf-Cups wurden daher ebenfalls mit Alufolie umwickelt.

### **2.2.1.3 Herstellung der Glukoselösung**

Bei der Durchführung der Versuche wurden die Zellen in einer 5,5 mM Glukoselösung als Energiespender suspensiert. Glukosepulver (MG = 180 g/Mol) wurde daher entsprechend in PBS<sup>++</sup> gelöst, mit einem Filter (0,2 µm Porengröße) steril filtriert und anschließend ebenfalls bei -20°C eingefroren.

### 2.2.1.4 Herstellung potentieller Inhibitoren

Für die Durchführung der Aufnahmeversuche mit radioaktiven Substanzen wurden Aliquote folgender Substanzen zur potentiellen Hemmung der Transporter hergestellt:

#### Desipramin·HCl:

1,5 mg Desipramin (MG = 303 g/Mol) wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O (Ampuwa) gelöst. Dadurch entstand eine  $5 \times 10^{-4}$  M Lösung. Davon wurde dann bei der Versuchsdurchführung 10 µl zu 500 µl Zellsuspension gegeben (f.c.:  $1 \times 10^{-5}$  M) (siehe Kapitel 2.2.1.2).

#### Dopamin·HCl:

9,5 mg Dopamin (MG = 190 g/Mol) wurden in 10 ml 1 mM Salzsäure (HCl) gelöst. Aus der so entstandene  $5 \times 10^{-3}$  M Lösung wurde bei der Versuchsdurchführung 10 µl zu 500 µl Zellsuspension gegeben (f.c.:  $1 \times 10^{-4}$  M) (siehe Kapitel 2.2.1.2).

#### Tyrosin·HCl:

Zur Herstellung von 10 µl Tyrosin zur Zugabe in die 500 µl Zellsuspensionen (f.c.:  $1 \times 10^{-4}$  M) wurden 10,85 mg Tyrosin (MG = 218 g/Mol) in 10 ml 1 mM HCl gelöst (siehe Kapitel 2.2.1.2).

#### 6-Fluoro-DOPA·HCl (6-FDOPA):

0,2 mg 6-FDOPA (MG = 252 g/Mol) wurde in 100 µl 1 mM HCl und 100 µl PBS<sup>++</sup> mit Ascobat (AA) gelöst und so eine  $5 \times 10^{-3}$  M Lösung hergestellt. Davon wurde bei der Versuchsdurchführung 10 µl in die 500 µl Zellsuspension pipettiert (f.c.:  $1 \times 10^{-4}$ ) (siehe Kapitel 2.2.1.2).

### 6-Fluoro-Dopamin·HCl (6-FDA):

Bei der Herstellung von 6-FDA wurde 1,6 mg 6-FDA (MG = 208 g/Mol) in 800 µl 1 mM HCl gelöst und davon 200 µl zu 200 µl PBS<sup>++</sup> + AA gegeben. Der Versuchsansatz aus 500 µl Zellsuspension hatte dann nach Zugabe von 10 µl der hergestellten 6-FDA Lösung eine f.c. von  $10^{-4}$  M (siehe Kapitel 2.2.1.2).

## **2.2.2 Arbeiten mit Zellkulturen**

### **2.2.2.1 Kultivierung der Zellen**

Die Zellen wurden in 162 cm<sup>2</sup>, seltener auch in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in 35 ml Medium bei großer bzw. in 25 ml Medium bei mittlerer Flaschengröße kultiviert. Als Medium diente je nach Zelllinie das RPMI 1640 Zellkulturmedium zur Kultivierung der SK-N-SH, Kelly und der Caki-1 Zelllinie. Das DMEM Zellkulturmedium wurde bei den Zelllinien EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 eingesetzt. Bei konstanten Inkubationsbedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre von 100 % wurden die Zellen angezüchtet. Alle 48 Stunden (h) wurde zur Optimierung der Kulturbedingungen 100 µl 17,5 mM Ascorbinsäure (f.c. 50 µM) in die Zellkulturflaschen pipettiert. In regelmäßigen Abständen wurde das Wachstum mittels Mikroskop kontrolliert und Verunreinigungen oder das Wachstum von Mikroorganismen ausgeschlossen. Bei farblichen Veränderungen des Mediums, die eine pH-Änderung signalisieren, von rot zu orange, wurde dieses ausgetauscht. Sobald ein konfluenter Zellrasen entstanden war, wurden die Zellen abgeerntet, passagiert oder für Versuche weiterverwendet.

Tabelle 8: Verwendete Medien und Erntebedingungen der einzelnen Zelllinien

| Zelllinie           | Zellkulturmedium           | Ernten       |
|---------------------|----------------------------|--------------|
| <b>SK-N-SH</b>      | RPMI 1640 Zellkulturmedium | mit Trypsin  |
| <b>Kelly</b>        | RPMI 1640 Zellkulturmedium | mit Trypsin  |
| <b>Caki-1</b>       | RPMI 1640 Zellkulturmedium | mit Trypsin  |
| <b>EMT-HEK 293</b>  | DMEM Zellkulturmedium      | ohne Trypsin |
| <b>OCT1-HEK 293</b> | DMEM Zellkulturmedium      | ohne Trypsin |
| <b>OCT2-HEK 293</b> | DMEM Zellkulturmedium      | ohne Trypsin |

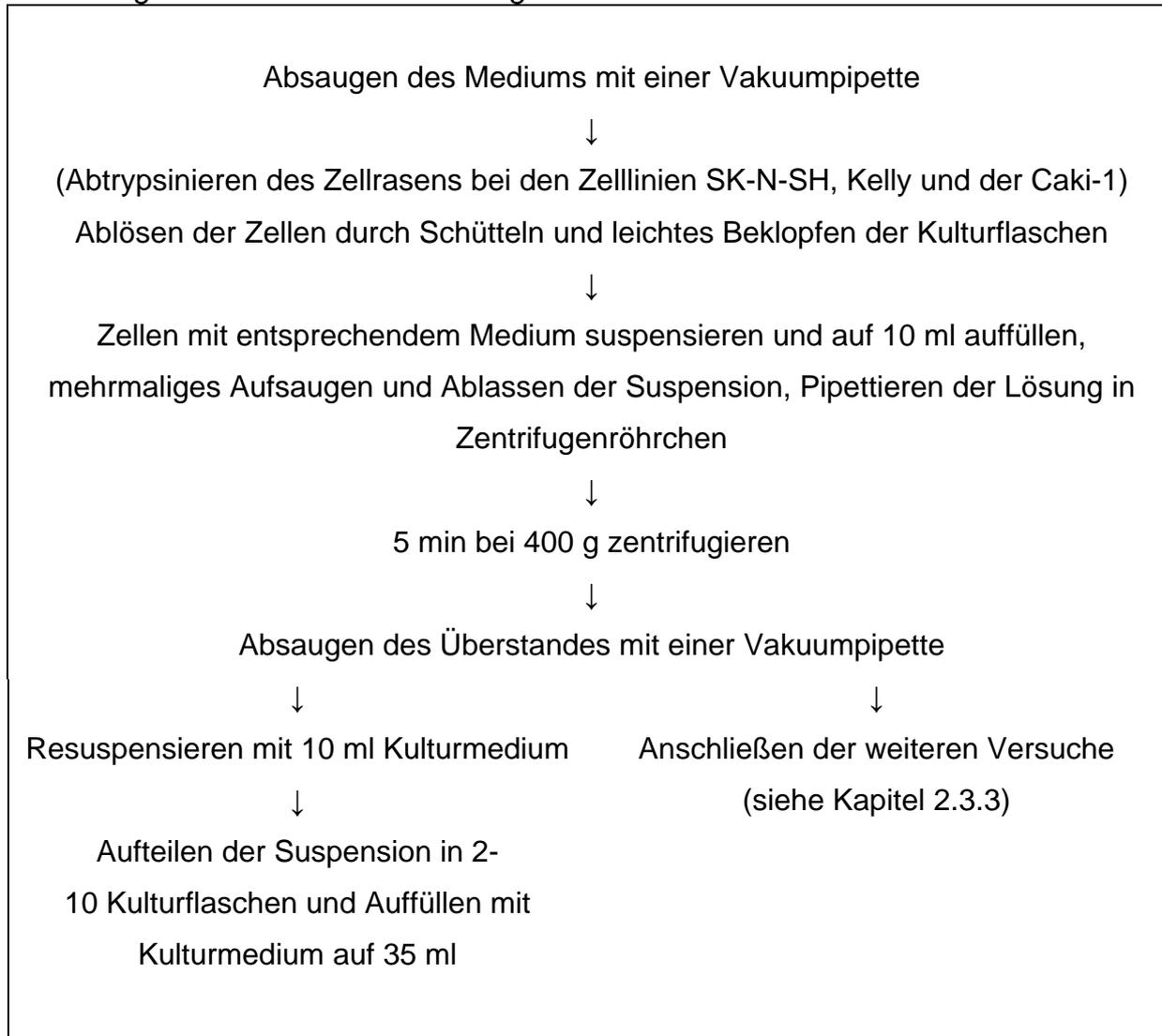
### Der Einsatz von Ascorbat bei der Kultivierung der Zelllinien

Als Modifikation der konventionellen Zellkultivierung wurden die wachsenden Zelllinien alle 48 h mit Ascorbinsäure (f.c.: 50  $\mu$ M) versorgt. Ascorbat dient im Katecholaminstoffwechsel als Cofaktor der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase bei der Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin (Levine et al., 1985). Seitz und Mitarbeiter konnten weitere Effekte bei der SK-N-SH Zelllinie ausmachen wie einen allgemein gesteigerten Katecholaminstoffwechsel in den Neuroblastomzellen. So wirkt sich eine kurzfristige Gabe (2 h) von Ascorbat in einer erhöhten enzymatischen Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase und verstärkt synthetisiertem DOPA aus. Vermutlich daraus resultierend sind auch die Katecholamine Dopamin und Noradrenalin erhöht. Bei einer Langzeitexposition (5 Tage) erhöht sich die Genexpression der Tyrosin-Hydroxylase bis auf das Dreifache. Weiter konnte gezeigt werden, dass der Ascorbatgehalt im Medium nach 24 h auf 20-25 % sinkt, während der intrazelluläre Gehalt sich auf ein Mehrfaches erhöht (Seitz et al., 1998). Ein so gesteigerter Metabolismus war bei den weiteren Untersuchungen und enzymatischen Umwandlungen in dieser Arbeit hilfreich.

### **2.2.2.2 Ernten und Passagieren der Zellen**

Zur Vorbereitung der Versuche oder zum erneuten Aussäen der Zellen in mehreren neuen Zellkulturflaschen wurden die Zellen abgeerntet. Mit einer Vakuumpipette wurde das Medium aus den Flaschen abgesaugt. Bei den Zelllinien SK-N-SH, Kelly und Caki-1 wurde der Zellrasen mit 2,5 ml auf 37°C aufgewärmtem Trypsin bei großen, mit 1,3 ml bei kleinen Kulturflaschen benetzt. Nach kurzer Einwirkzeit von einer Minute wurden durch Schütteln und leichtes Beklopfen die adhärenen Zellen gelöst. Die Trypsin-Zell-Suspension wurde mit ebenfalls auf 37°C vorgewärmtem Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt und die Toxizität des Trypsins so neutralisiert. Die Zelllinien EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 konnten ohne Einsatz von Trypsin mit dem DMEM Zellkulturmedium von dem Flaschenboden abgeschwemmt werden (siehe Tabelle 8). Die so entstandene Zellsuspension wurde nach mehrmaligem Aufsaugen und Ablassen entsprechend in 15 ml oder bei Zellen mehrerer Kulturflaschen in 50 ml Zentrifugenröhren pipettiert und 5 min bei 400 x g zentrifugiert (Zentrifuge Rotixa 50 RS, Hettich AG, Bäch, CH). Anschließend wurden einzelne Versuche durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3) oder nach Absaugen des Überstandes mit einer Vakuumpipette zur Entfernung der Trypsinreste die Zellpellets mit 10 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Anteile des Suspensats wurden dann im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 in 2 bis 10 Zellkulturflaschen pipettiert und mit dem entsprechenden Medium wieder auf 35 ml (bzw. auf 25 ml) aufgefüllt.

*Flussdiagramm 1: Ernten und Passagieren der Zellen*



### **2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien**

#### ***2.2.2.3.1 Das Einfrieren von Zelllinien***

Nach dem Ernten der Zellen wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben konnten diese, wenn sie für Versuche gerade nicht benötigt wurden, eingefroren werden und so für mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff konserviert werden. Das Zellsediment wurde nach dem Zentrifugieren nicht mit 10 ml Kulturmedium, sondern mit 1 ml Gefriermedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.5.2) suspensiert und anschließend in Kryoröhrchen pipettiert und mit Zellstofftüchern umwickelt. Diese wurden dann bei -80°C eingefroren und nach einigen Tagen zur besseren Konservierung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Gefriermedium muss zum Schutz der Zellen Dimethylsulfoxid (DMSO) enthalten, welches wie eine Art „Frostschutzmittel“ die Zellen vor Schäden bewahrt. Zeitabhängig kann diese Substanz in warmem Zustand aber die Zellen schädigen, sodass sowohl das Einfrieren als auch das Auftauen möglichst wenig Zeit in Anspruch nehmen darf.

#### ***2.2.2.3.2 Das Auftauen von Zelllinien***

Möglichst rasch wurden die gefrorenen Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend sofort in 10 ml kaltem Kulturmedium resuspensiert. Es folgte ein fünfminütiges Zentrifugieren bei 400 x g, sodass anschließend der DMSO-haltige Überstand mit einer Vakuumpipette entfernt werden konnte. In frischem Medium wurden die aufgetauten Zellen dann in Kulturflaschen ausgesät.

### **2.2.2.4 Die Zellzahlbestimmung**

Um eine relativ konstante Anzahl an Zellen für die Durchführung der Versuche zu haben und auch zur Überprüfung des Zellgehaltes während des Passagierens der Zellen, wurde eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dabei wurden 50 µl einer PBS<sup>++</sup>-Zellsuspension mit 50 µl bzw. 150 µl der Trypanblau-Lösung (0,4%) in einem Eppendorf-Cup gemischt und ein Tropfen der gefärbten Zellsuspension zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer gegeben. Durch das Mikroskop ließen sich so vitale Zellen als ungefärbte, tote als gefärbte Zellen darstellen. Die toten Zellen wurden beim Zählen nicht berücksichtigt. Da die Trypanblau-Lösung zytotoxisch ist, war auch hier ein rasches Arbeiten vonnöten. Die Zellzahl wurde in allen 4 Quadranten (je 16 Kleinquadrate) bestimmt, das arithmetische Mittel gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor 2 bzw. 4 und mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert, da sich in jedem Quadranten 0,1 µl Zelllösung befanden. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, wie viele Zellen sich in einem Milliliter der Ausgangssuspension befanden.

### **2.2.3 Beschreibung der Versuchsdurchführung**

#### **2.2.3.1 Zelluläre Aufnahme von 6-FDOPA und 6-Fluoro-Dopamin**

Wie im Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, wurden die Zellen aus den Kulturflaschen abgelöst, für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde dann mit 10 ml PBS<sup>++</sup> resuspendiert. Daraufhin wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt, wie es im Kapitel 2.2.2.4 vorgestellt wurde. Aus den 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden daraufhin die entsprechenden Volumina für  $10 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^6$  Zellen entnommen und jeweils in zwei 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nachdem diese Suspensionen erneut 5 min bei 400 x g zentrifugiert wurden und die Überstände abgesaugt waren, wurden die aus  $10 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^6$  Zellen bestehenden Zellpellets mit 1 ml einer Lösung aus PBS<sup>++</sup> und Glucose (5,5 mM) resuspendiert und in ein 37°C warmes Wasserbad

gestellt. In jedes dieser zwei Röhrchen wurde schließlich noch 10 µl Ascorbinsäure (AA) (10 mM; f.c.: 100 µM) hinzugegeben. In den ersten Ansatz wurde 10 µl 6-FDOPA (10 mM; f.c.: 100 µM) und in den zweiten Ansatz 10 µl 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA, 10 mM; f.c.: 100 µM) pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation im Wasserbad wurde von jedem Ansatz nach gutem Homogenisieren der Probe die Hälfte entnommen. Diese 0,5 ml (diese entsprechen ungefähr  $5 \times 10^6$  bzw.  $2,5 \times 10^6$  Zellen) wurden in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Zur Beendigung der Substanzaufnahme und des intrazellulären Katecholaminmetabolismus wurde das Zentrifugenröhrchen mit 14 ml 4°C kaltem PBS<sup>++</sup> aufgefüllt. Mit den im Wasserbad bei 37°C verbliebenen Proben (0,5 ml, ungefähr  $5 \times 10^6$  bzw.  $2,5 \times 10^6$  Zellen) wurde nach insgesamt 30 min dasselbe Verfahren durchgeführt. Die mit 14 ml kaltem PBS<sup>++</sup> (4°C) aufgefüllten Proben wurden dann 5 min bei 400 x g zentrifugiert und die Überstände mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Ziel dieses Schrittes war es, die nicht von den Zellen aufgenommenen 6-FDOPA- und 6-FDA-Reste zu entfernen. Um diesen Anteil möglichst gering zu halten, wurde dieser Schritt ein zweites Mal wiederholt, indem die Zellpellets erneut mit 14 ml kaltem PBS<sup>++</sup> resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden dann zuerst mit einer Pasteurpipette, anschließend mit einer 200 µl Pipette abgesaugt um nach Möglichkeit nur die Zellpellets zurückzulassen. Diese ca.  $5 \times 10^6$  bzw.  $2,5 \times 10^6$  Zellen wurden dann mit 300 µl Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>, 0,5 M) resuspendiert, in Eppendorf-Cups umgefüllt und anschließend auf Eis gekühlt und 5 min lang gevortext. Dann wurde die Suspensionen bei 9°C 5 min lang bei 15000 x g zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 22 R, Hettich AG, Bäch, CH). Der Überstand (ca. 300 µl), welcher die Katecholamine enthält, wurde vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette entnommen und bis zur HPLC-Analyse bei -80°C eingefroren. Die Zellpellets, bestehend aus Zelltrümmern, wurden durch Klopfen gelöst und bis zur Proteinbestimmung ebenfalls bei -80°C tiefgefroren.

Flussdiagramm 2: Zelluläre Aufnahme von 6-FDOPA und 6-Fluoro-Dopamin



### **2.2.3.2 Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC) ist ein chromatografisches Trennverfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung u.a. von Katecholaminen in Plasma oder Urin. Diese von Keller und Mitarbeitern (1976) und Watson (1981) entwickelte Technik bildet die zentrale Methode dieser Arbeit.

Bei der HPLC gelangt eine Lösung aus zu untersuchenden Substanzen zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase (auch „Eluent“ genannt) durch eine Trennsäule, die auch stationäre Phase genannt wird. Je nach Substanzeigenschaft verweilen diese unterschiedlich lange in der Trennsäule, bevor sie nach einer gewissen Zeit wieder gelöst werden und dann mit einem geeigneten Detektor bestimmt werden. Dieser Schritt des Zurücklösens (Desorption) ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion. Verschiedene Detektoren werden eingesetzt, wobei in dieser Arbeit ausschließlich ein elektrochemischer Detektor Verwendung fand.

#### **2.2.3.2.1 Das Prinzip der elektrochemischen Detektion**

Als elektrochemisches Detektionsverfahren wurde bei den Messungen die Amperometrie durchgeführt. Dabei werden Drei-Elektroden-Messzellen bestehend aus einer Arbeitselektrode, einer Referenzelektrode und einer Gegenelektrode verwendet. Zwischen der Referenzelektrode und der Arbeitselektrode wird dabei ein Potential (Polarisationsspannung) aufgebaut, sodass beim Durchfluss einer elektrochemisch aktiven Substanz diese oxidiert oder reduziert wird. Die Gegenelektrode dient lediglich der Aufrechterhaltung der Spannung und verhindert einen Stromfluss an der Referenzelektrode.

Eine solche Redoxreaktion verursacht eine Abgabe bzw. Aufnahme von Elektronen ( $e^-$ ) und erzeugt somit einen Stromfluss, welcher abgeleitet und erfasst wird und so als chromatographisches Signal dargestellt werden kann. Dieser Stromfluss verhält

sich proportional zur Konzentration der elektrochemisch aktiven Verbindung. Bei der Messung von Katecholaminen wird der Dihydroxybenzolring der Katecholamine durch Abgabe von Elektronen zu einem Ortho-Chinon oxidiert (siehe Abbildung 2.1).

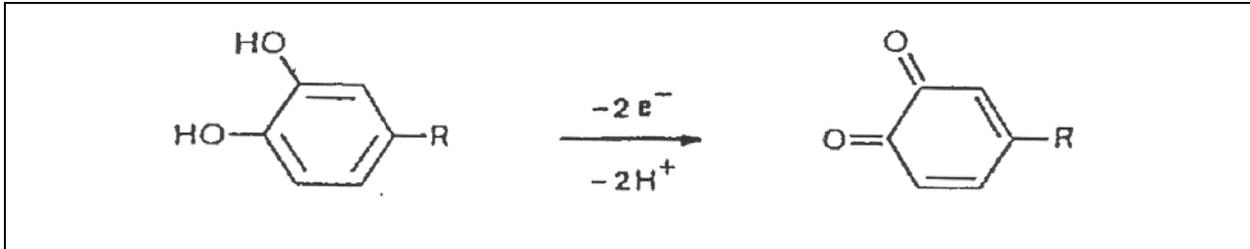


Abbildung 4: Prinzip der elektrochemischen Detektion von Katecholaminen (aus einer Firmenschrift von Chromsystems: Arbeitsvorschrift für HPLC-Bestimmung Katecholamine im Plasma)

Dabei reichen zur Bestimmung von Katecholaminen schon relativ niedrige Potentiale von 0,4 - 0,6V aus. Bei höheren Potentialen können schon geringere Mengen an Katecholaminen gemessen werden, wobei sich das Signal asymptotisch einem Plateaubereich annähert (siehe  $P_3 = P_{opt}$  bei Abbildung 2.2). Ab einem gewissen Potential werden alle Dihydroxybenzolringe zu Ortho-Chinonen oxidiert, der Elektronenfluss ist maximal und auch eine höhere Spannung könnte kein höheres Signal erzeugen.

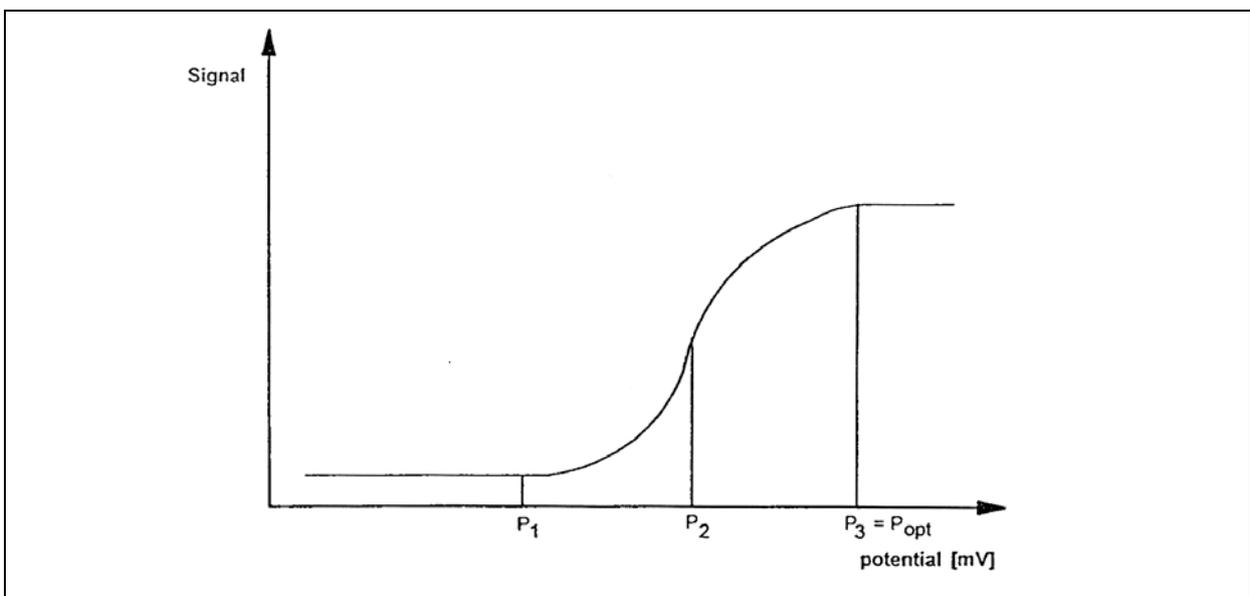


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen Arbeitspotential und Detektorsignal (aus einer Firmenschrift von Chromsystems: Arbeitsvorschrift für HPLC-Bestimmung Katecholamine im Plasma)

Da nur eine beschränkte Anzahl an funktionellen Gruppen und chemischen Strukturen einer solchen Redoxreaktion bei einem bestimmten Arbeitspotenzial zugänglich ist, zeichnet sich diese elektrochemische Detektion durch ihre hohe Empfindlichkeit und Selektivität aus.

### 2.2.3.2 Der Aufbau einer HPLC-Apparatur

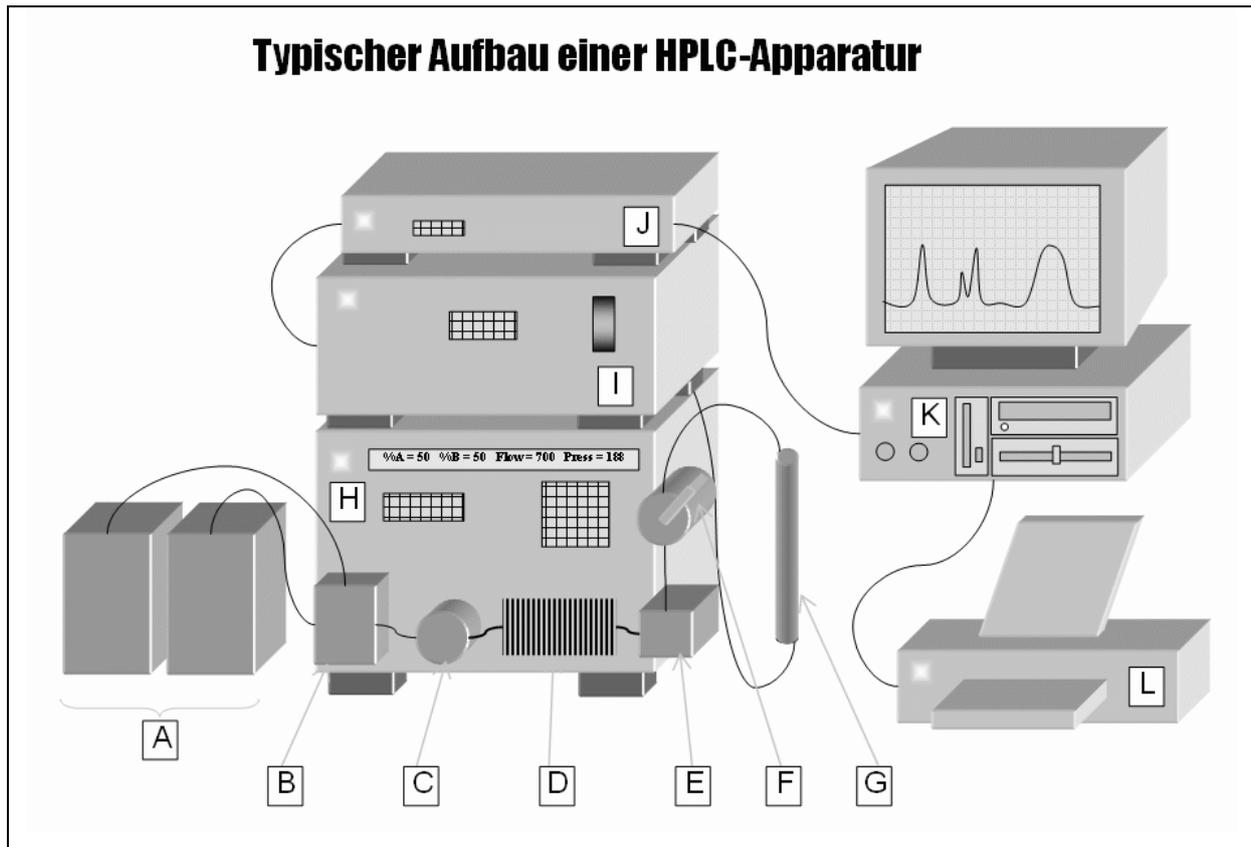


Abbildung 6a: Der typische Aufbau einer HPLC-Apparatur

(<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:HPLC.gif&filetimestamp=20060105161715>)

Autor: Cornelius Schumacher, Berlin, D, 2003

Legende: A = Eluentenreservoir; B = Elektromagnetische Mischventile mit Doppelhubkolbenpumpe; C = Überdruckventil; D = Druckkompensationsschleife, um Pumpimpulse der Pumpe zu egalisieren; E = Mischkammer; F = Einspritzventil; G = Trennsäule; H = HPLC-Einheit; I = Detektor-Einheit; J = Computer-Interface; K = PC; L = Drucker zur Ausgabe der Ergebnisse.

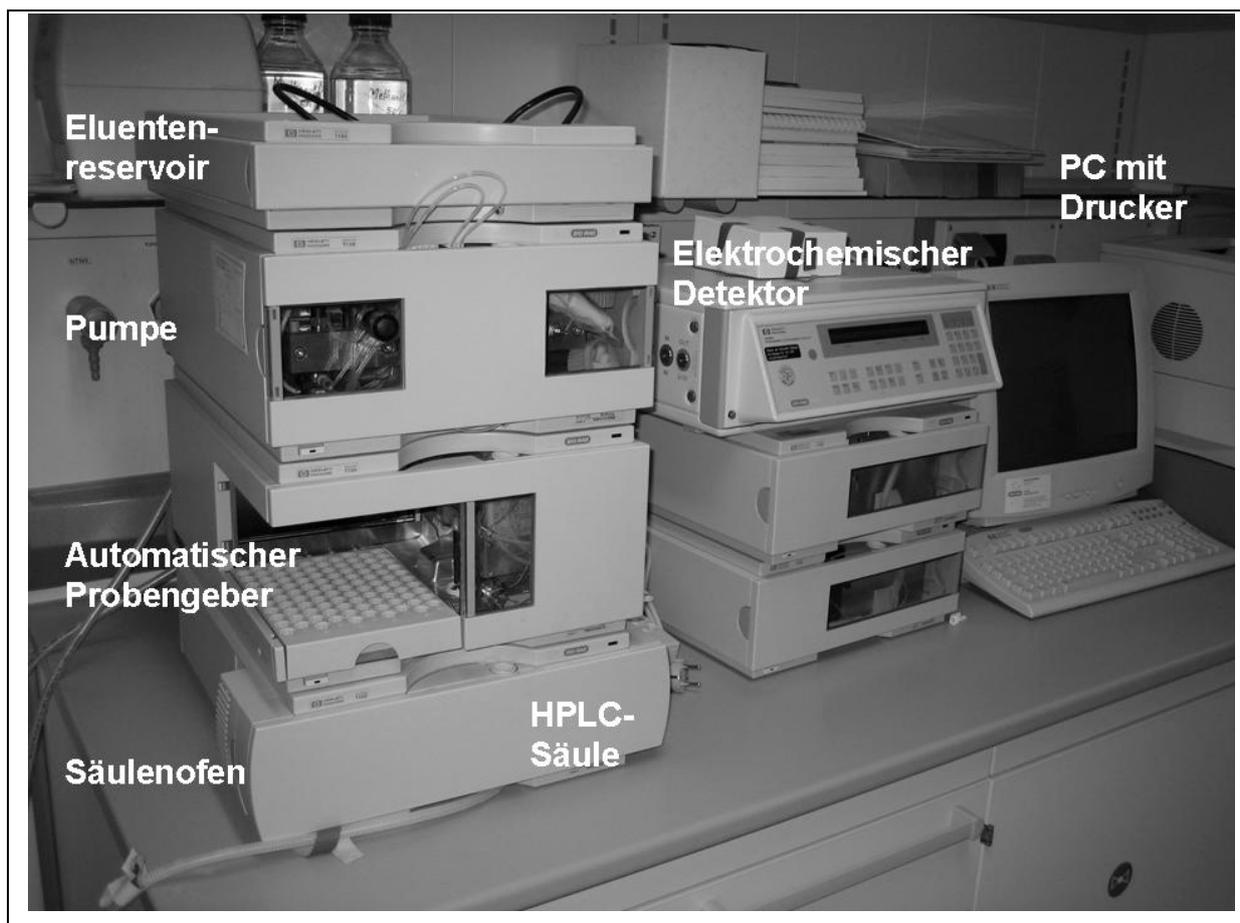


Abbildung 6b: Verwendete HPLC-Apparatur der Firma Hewlett-Packard GmbH, vertrieben von der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH

### 2.2.3.2.3 Analysebedingungen der HPLC

Die Messungen wurden bei folgenden Einstellungen des HPLC-Systems durchgeführt:

|                    |                         |
|--------------------|-------------------------|
| Flussrate:         | 0,7 ml/min              |
| Potential:         | 0,650 Volt              |
| Temperatur:        | 22°C                    |
| Druck:             | zwischen 98 und 104 Bar |
| Injektionsvolumen: | 50 µl                   |

Die stationäre Phase:

C18 Reversed Phase (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 150 mm) Analysesäule für Urinkatecholamine

Die mobile Phase:

11,36 g/l Trilithiumcitrat-Tetrahydrat, 1,97 g/l Citronensäure-1-hydrat, 0,3 g/l Octan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, 0,1 g/l EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, 3% Methanol, 3% Acetonitril und destilliertes Wasser, pH 2,55, eingestellt mit o-Phosphorsäure.

Die Kalibrierung des Messsystems erfolgte mit einem Chromatografie-Datensystem der Firma Chromsystems, bei der eine qualitative Analyse der entstandenen Peaks durchgeführt wurde. Reinsubstanzen wurden bei diesem Eichungsvorgang verwendet, um die Retentionszeiten den Substanzen zuordnen zu können. Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Substanzen wurde das Integral unter den Peaks anhand der Internen-Standard-Methode bestimmt.

Als Interner Standard wurde 3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA) verwendet. DHBA eignet sich aufgrund seines Katecholanteils sehr gut als Interner Standard bei Katecholaminmessungen. Eine stets gleiche Menge dieser Referenzsubstanz wurde bei der Kalibrierung und bei den sich daran anschließenden Messungen eingesetzt. Anhand dieses konstanten Standards lassen sich Verluste ableiten, die bei der Aufarbeitung der Proben entstehen: Wird eine geringere Menge an DHBA gemessen als ursprünglich in die Proben pipettiert wurde, muss ebenfalls mit einem Verlust der zu messenden Katecholamine in ähnlicher Größenordnung gerechnet werden.

Folgende Substanzen wurden bei der Kalibrierung des HPLC-Systems eingesetzt:

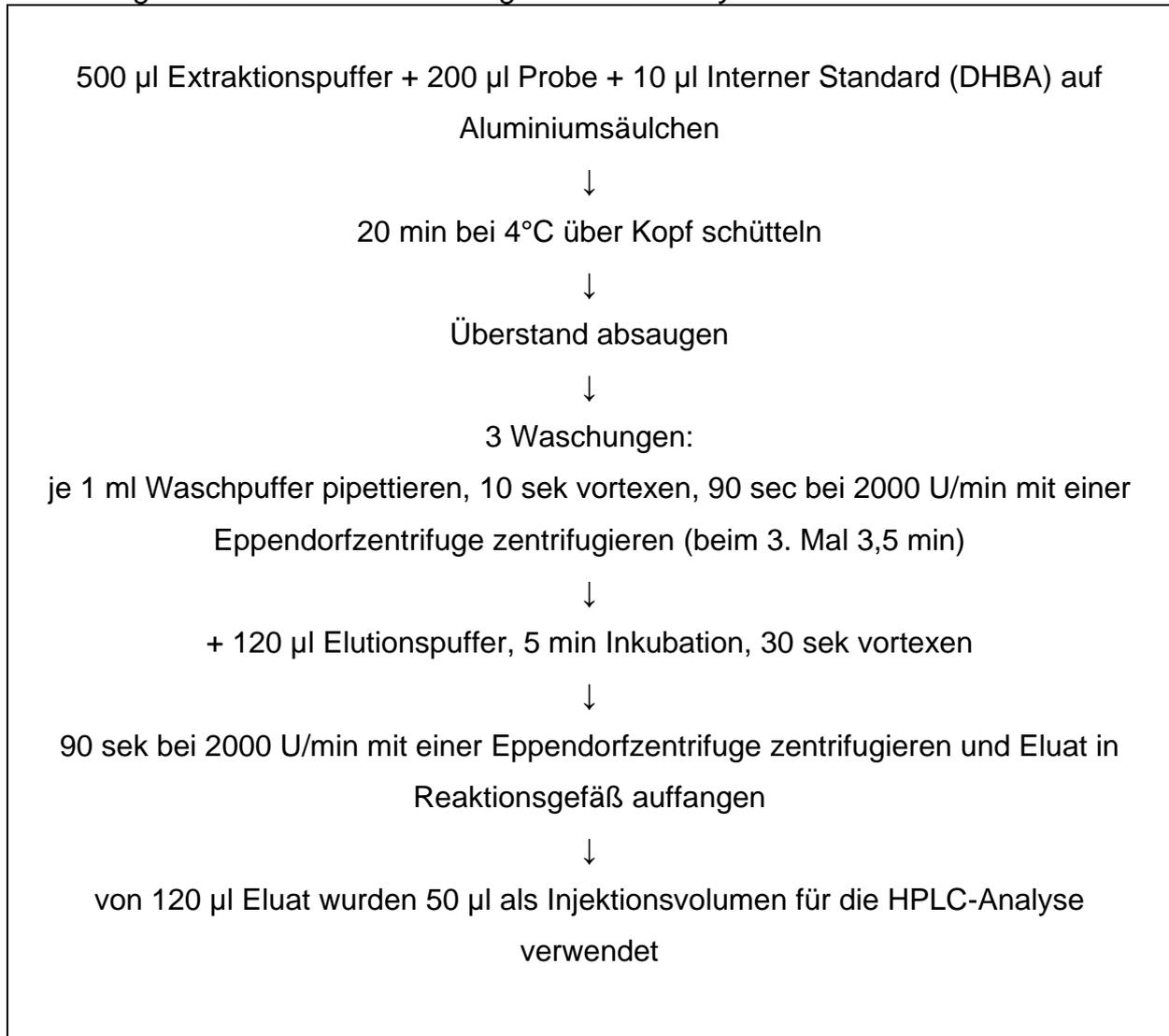
|  |
|--|
| DHBA als Interner Standard ( $2,5 \times 10^{-8} \text{ M} \approx 1,25 \text{ pMole}/50 \mu\text{l}$ ), DOPA ( $3,5 \times 10^{-8} \text{ M} \approx 1,75 \text{ pMole}/50 \mu\text{l}$ ), 6-FDOPA ( $2 \times 10^{-7} \text{ M} \approx 10 \text{ pMole}/50 \mu\text{l}$ ), Dopamin ( $3 \times 10^{-8} \text{ M} \approx 1,5 \text{ pMole}/50 \mu\text{l}$ ), 6-FDA ( $2 \times 10^{-7} \text{ M} \approx 10 \text{ pMole}/50 \mu\text{l}$ ), Noradrenalin ( $1,5 \times 10^{-8} \text{ M} \approx 0,75 \text{ pMole}/50 \mu\text{l}$ ) und Adrenalin ( $2,5 \times 10^{-8} \text{ M} \approx 1,25 \text{ pMole}/50 \mu\text{l}$ ). |
|--|

#### **2.2.3.2.4 Die Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse**

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Überstände aus den Versuchen zur zellulären Aufnahme von 6-FDOPA und 6-FDA (siehe Kapitel 2.2.3.1) wurden möglichst rasch aufgetaut. In Aluminiumoxidsäulchen (Firma Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München, D) wurden dann der Reihe nach  $500\ \mu\text{l}$  Extraktionspuffer,  $200\ \mu\text{l}$  der oben genannten Proben und  $10\ \mu\text{l}$  des Internen Standards (DHBA; f.c.:  $1\ \text{nM}$ ) pipettiert. Anschließend wurden die Aluminiumoxidsäulchen für 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlraum über Kopf geschüttelt. Bei diesem Vorgang wurden die Katecholamine an das Aluminiumoxid gebunden. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurden die Überstände abgesaugt, dann folgten drei Waschungen: je  $1\ \text{ml}$  Waschpuffer wurden jeweils in die Säulchen gegeben; die Proben wurden 10 sek lang gevortext und anschließend bei  $4^{\circ}\text{C}$  90 sek lang bei  $2000\ \text{U/min}$  mit einer Eppendorfzentrifuge (Zentrifuge Mikro 22 R, Hettich AG, Bäch, CH) zentrifugiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei beim dritten Schritt das Zentrifugieren  $3,5\ \text{min}$  dauerte. Zum Schluss wurden  $120\ \mu\text{l}$  Elutionspuffer in die Röhrchen pipettiert, die Röhrchen anschließend geschüttelt, 5 min stehen gelassen und dann ca. 30 sec gevortext. Die bei einer letzten  $1,5\ \text{min}$  dauernden Zentrifugation ( $2000\ \text{U/min}$  mit einer Eppendorfzentrifuge) aufgefangenen Proben wurden dann anschließend gemessen.

Von dem erhaltenen Eluat ( $120\ \mu\text{l}$ ) wurden daraufhin  $50\ \mu\text{l}$  über eine manuelle Probeauftragung mit einer Hamilton-Spritze für die HPLC-Analyse verwendet.

*Flussdiagramm 3: Probeaufbereitung für HPLC-Analyse*



### **2.2.3.3 Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt der in Kapitel 2.2.3.1 bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Zellpellets wurde mit Hilfe der von Lowry und Mitarbeitern (1951) entwickelten Methode gemessen.

#### ***2.2.3.3.1 Die Probenaufarbeitung***

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Zellpellets (ca.  $2,5 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^6$  Zellen) wurden bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut,  $100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  hinzugegeben und im Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Anschließend wurden die Proben ca. 10 sek lang gevortext und erneut ins Wasserbad gestellt. Mit Hilfe einer  $200 \mu\text{l}$  Pipette wurden die Proben resuspendiert und nach einer weiteren Phase im Wasserbad erneut ca. 10 sek lang gevortext. Anschließend wurden die Proben eine Nacht lang stehen gelassen.

#### ***2.2.3.3.2 Die Messung der Proben***

Folgende Reagenzien werden für die Proteinbestimmung verwendet:

Lösung A: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 0,1 M NaOH + 20 mg K-Na Tartrat / 100ml

Lösung B: 75 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  / 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Lösung C:  $200 \mu\text{l}$  Lösung B + 10 ml Lösung A

Lösung E: unverdünntes Folin-Reagenz

Vor Beginn der Messungen wurden die Proben erneut mit einer  $200 \mu\text{l}$  Pipette resuspendiert und  $10 \mu\text{l}$  in die Messkuvetten pipettiert. Mit einer Repetierpipette wurden zu jeder Probe  $500 \mu\text{l}$  der Lösung C hinzugegeben und fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden  $20 \mu\text{l}$  der Lösung E dazugegeben, die Lösung vermischt und 20 Minuten inkubiert. Die Messungen wurden mittels Photometer (Photometer Ultrospec Plus, LKB Pharmacia) bei  $\lambda = 540 \text{ nm}$  durchgeführt. Vor dem Messvorgang wurde eine Messung gegen  $10 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt und das Messgerät kalibriert.

### 2.2.3.3.3 Die Erstellung einer Eichkurve

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden je 10 µl unten aufgeführter Reagenzien aus menschlichem Serumalbumin nach oben genanntem Verfahren (siehe Kapitel 2.2.3.3.2) aufgearbeitet und bei einer Extinktion von  $\lambda = 540$  nm gemessen.

Tabelle 9: Pipettierschema zur Erstellung einer Eichkurve

|          | Verdünnung                         | Proteingehalt pro 10 µl |
|----------|------------------------------------|-------------------------|
| <b>a</b> | 4 mg Albumin / ml H <sub>2</sub> O | 40,0 µg                 |
| <b>b</b> | 500 µl a + 500 µl H <sub>2</sub> O | 20,0 µg                 |
| <b>c</b> | 500 µl b + 500 µl H <sub>2</sub> O | 10,0 µg                 |
| <b>d</b> | 500 µl c + 500 µl H <sub>2</sub> O | 5,0 µg                  |
| <b>e</b> | 500 µl d + 500 µl H <sub>2</sub> O | 2,5 µg                  |

Anhand der somit erstellten Eichkurve konnten alle anderen Proteinwerte umgerechnet werden und so die Messungen im Ergebnisteil in pMole pro 100 µg Protein angegeben und miteinander verglichen werden.

Dieser Schritt (d.h. Protein als Bezugssystem anstelle der Zellzahl) war notwendig, da es durch die zahlreichen Zentrifugierschritte zu Zellverlusten kommt. Weiter gelang es nicht trotz guter Homogenisierung der Proben nach fünfminütiger Inkubation genau die Hälfte der Ansätze zu entnehmen (siehe Kapitel 2.2.3.1). Die zu Beginn der Versuche eingestellte Zellzahl war somit nur noch ein Näherungswert, der ohne anschließende Proteinbestimmung zu große Schwankungen der Ergebnisse geführt hätte. Die statistische Aufarbeitung der Messungen war daher erst nach der Umrechnung der Werte in pMole pro 100 µg Protein möglich.

### 2.2.3.3.4 Beispielhafte Berechnung der Ergebnisse in pMole Katecholamine pro 100 µg Protein

Messwert: 195 nM 6-FDA nach 5 minütiger Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100 µM)

Verdünnung: 1:100\* der Zellsuspension

Proteingehalt: 20,7 µg Protein / 10 µl Suspension (↔ Extiktion von 0,417)

(siehe Kapitel 3.1.1)

200 µl Zellextrakt → Proteingehalt\*\* (siehe oben)

↓

120 µl Eluat

↓

50 µl Einspritzvolumen in HPLC (≈ ¼ der Proteinmenge von \*\*)

195 nMole / Liter

195000 pMole / l (1000 ml)

195 pMole / 1 ml (1000 µl)

≈ **23,4 pMole\*\*\* / 120 µl Eluat**

20,7 µg Protein / 10 µl Suspension

**= 207 µg Protein / 100 µl Suspension**

(≈ Proteingehalt von 300 µl Überstand)

(207 µg Protein / 100 µl Suspension) x (200 µl / 300 µl Überstand)

**= 138 µg Protein\*\*\*\* / 100 µl Suspension**

23,4 pMole\*\*\* x (100 µg / 138 µg Protein\*\*\*\*) = 16,96 pMole

16,96 pMole x 100 (Verdünnung)\* = **1695,6 pMole pro 100 µg Protein**

## 2.2.3.4 Zelluläre Aufnahme von radioaktiven Substanzen

### 2.2.3.4.1 Enzymatische Decarboxylierung von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA zu [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin

Klinisches Ziel bei einer Reihe von Versuchen ist die Anwendung von [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA zur PET von Neuroblastomen. Dazu wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem das häufig synthetisierte [ $^{18}\text{F}$ ]-DOPA enzymatisch zu [ $^{18}\text{F}$ ]-Dopamin decarboxyliert werden kann. Mit Hilfe der DOPA-Decarboxylase, die aus Enzymextrakten aus Kelly Zellen gewonnen wurde, konnte in vitro 6-FDOPA zu 6-FDA enzymatisch umgesetzt werden, wobei die Kinetik den gleichen Verlauf zeigt wie die bei der Umsetzung von DOPA zu Dopamin (Kuçi et al., unpublizierte Ergebnisse). Auf diese Weise wurde [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin durch enzymatische Decarboxylierung aus [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA synthetisiert (siehe Kapitel 3.2.1).

### 2.2.3.4.2 Aufnahmeversuche von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA, [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin und [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin

Für die Aufnahmeversuche von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA, [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin und [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin wurden Zellen der Zelllinien SK-N-SH, Kelly, Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 verwendet.

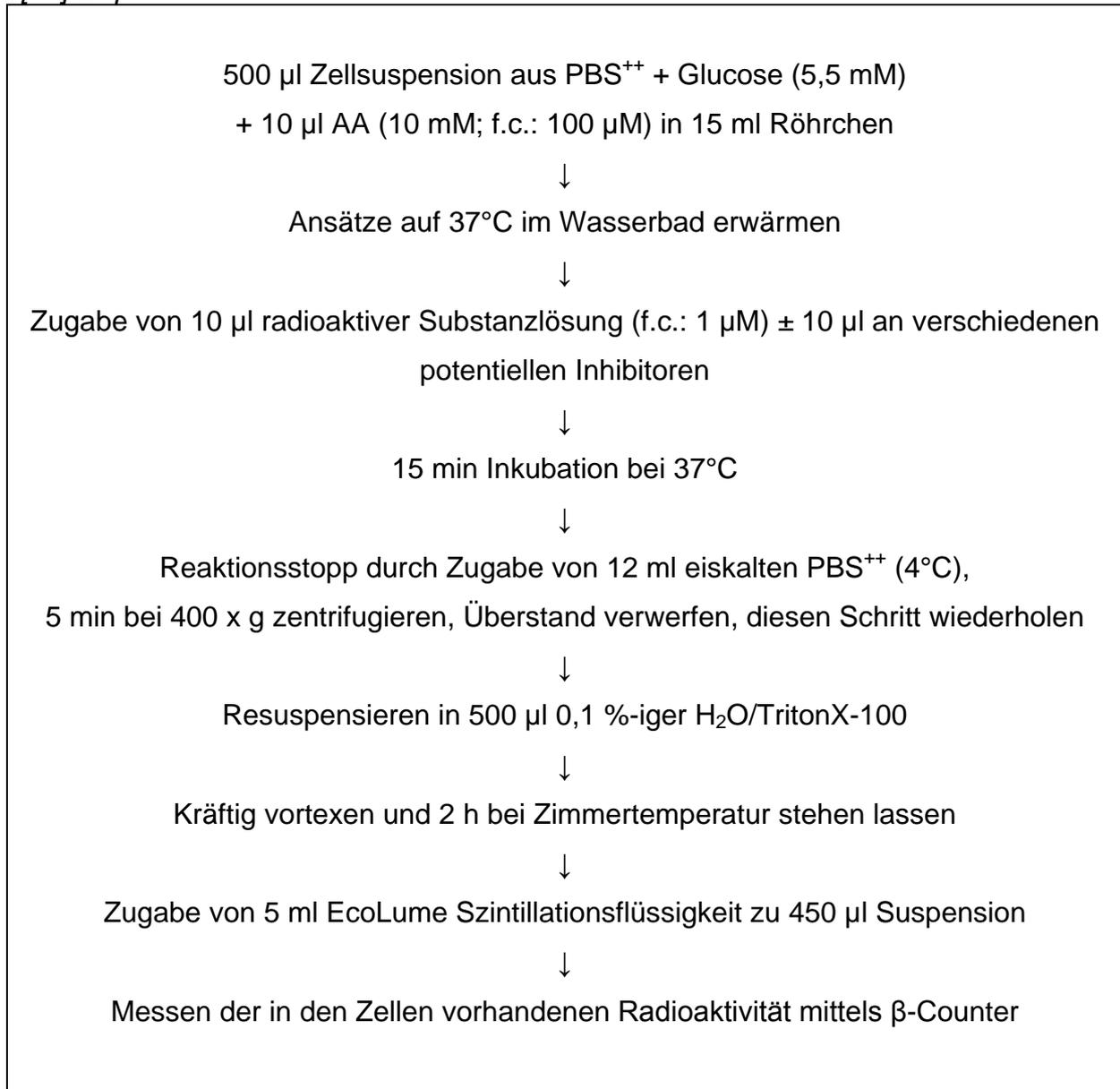
Zellsuspensionen der oben angeführten Zellen wurden in PBS<sup>++</sup> + Glucose (5,5 mM) + 10  $\mu\text{l}$  AA (10 mM; f.c.: 100  $\mu\text{M}$ ) in 15 ml Röhren in Portionen zu je 500  $\mu\text{l}$  vorgelegt. Diese enthielten Zellkonzentrationen zwischen ca. 2 bis 5  $\times 10^6$  Zellen pro ml. Die genaue Zellzahl eines jeden Versuchs wurde bestimmt und die Messwerte anschließend auf Angaben in 1  $\times 10^6$  Zellen umgerechnet. Zu den auf 37°C im Wasserbad erwärmten Zellsuspensionen wurden 10  $\mu\text{l}$  radioaktiver Substanzlösung (f.c.: 1  $\mu\text{M}$ ) und bei einigen Ansätzen 10  $\mu\text{l}$  an verschiedenen potentiellen Inhibitoren dazu gegeben (genaue Angaben zu den Inhibitoren finden sich im Ergebnisteil für jeden Versuch aufgelistet (siehe Kapitel 3.1)). Nach der Zugabe der radioaktiven Substanzen wurden die Zellsuspensionen 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden den Reaktionsansätzen 12 ml einkaltes PBS<sup>++</sup> (4°C) zugegeben, die Ansätze

5 min bei 400 x g zentrifugiert, die Überstände verworfen und das verbliebene Zellpellet nochmals mit 12 ml eiskaltem PBS<sup>++</sup> resuspendiert. Der Vorgang wurde nochmals wiederholt, der Überstand vollständig abgesaugt und die Zellpellets wurden schließlich mit 500 µl 0,1 %-iger H<sub>2</sub>O/TritonX-100 versetzt. Nach kräftigem Vortexen wurden die Proben mindestens 2 Stunden (h) bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden 450 µl Suspension mit 5 ml EcoLume Szintillationsflüssigkeit versetzt und an einem β-Counter (Tri Carb 2900 TR, Canberra Packard Central Europe Gesellschaft GmbH, Schwadorf, A) gemessen.

Weiter wurden bei jedem Versuch Dreifachansätze ohne Zellen mit den jeweils verwendeten radioaktiven Substanzen durchgeführt. Dabei wurde 10 µl der Radioaktivität mit 500 µl 0,1 % iger H<sub>2</sub>O/TritonX-100 kombiniert, 450 µl dieser Lösung mit 5 ml EcoLume Szintillationsflüssigkeit versetzt und anschließend an einem β-Counter gemessen. Der Mittelwert des Dreifachansatzes gemessen in Zerfälle pro Minute (*engl. Counts per Minute, cpm*) wurde dann als 100 %-Wert angegeben. Da von diesen 100 %-Werten die Molzahlen bekannt waren, konnten diese Werte als Referenzwerte verwendet werden. Die Messwerte der zellulären Aufnahme mit oder ohne Aufnahmehemmung konnten so miteinander verglichen werden.

Anhand der β-Zerfälle, die mittels β-Counter in cpm gemessen wurden, konnte bestimmt werden, wie hoch der intrazelluläre Gehalt an radioaktiv markiertem DOPA und Dopamin waren. Als Modell für [<sup>18</sup>F]-FDOPA und [<sup>18</sup>F]-FDA wurde dies zur Charakterisierung der transmembranären Transportsysteme der einzelnen Zelllinien durchgeführt.

*Flussdiagramm 4: Aufnahmeversuche von [<sup>14</sup>C]-DOPA, [<sup>14</sup>C]-Dopamin und [<sup>3</sup>H]-Dopamin*



### **2.2.3.4.3 Beispielhafte Berechnung der Ergebnisse in pMole Katecholamine pro $10^6$ Zellen innerhalb von 15 Minuten**

100%-Wert für [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin in Dreifachmessung: 33120 cpm ( $\approx 460$  pMole\*)

Zellzahlbestimmung:  $2,15 \times 10^6$  SK-N-SH Zellen pro 500  $\mu\text{l}$  Ansatz

Inkubationszeit: 15 Minuten

Messung: 3050 cpm

3050 cpm /  $2,15 \times 10^6$  Zellen

**1418,6 cpm /  $1,0 \times 10^6$  Zellen**

**500  $\mu\text{l}$  einer ca.  $1 \times 10^{-6}$  M Lösung enthält  $\approx 460$  pMole\***

1418,6 cpm  $\approx (1418,6 \text{ cpm} / 33120 \text{ cpm}) \times 460 \text{ pMole}^*$

**= 19,7 pMole**

**$\rightarrow 19,7 \text{ pMole} / 10^6 \text{ Zellen} / 15 \text{ Minuten}$**

### **3 Ergebnisse**

Zu Beginn sollen einige allgemeingültige Bemerkungen zur Auswertung und zur Darstellung der Ergebnisse angeführt werden.

Die Ergebnisse aus mehreren Messungen werden als Mittelwert (MW), auch arithmetisches Mittel, und als Standardabweichung (SD) angegeben. Die Standardabweichung gibt die Streuung der Werte um ihren Mittelwert an. Zur Berechnung und zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme Sigma Plot 8.0 und Microsoft Office Excel 2003 verwendet.

Das Zellwachstum variierte zu unterschiedlichen Zeiten der Versuchsdurchführung, sodass an den einzelnen Versuchstagen eine unterschiedliche Anzahl an Zellen zur Verfügung stand. Um die einzelnen Versuche aber miteinander vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse auf Ansätze pro eine Million ( $1 \times 10^6$ ) Zellen umgerechnet oder nach einer Proteinbestimmung in pMole pro 100  $\mu\text{g}$  Protein angegeben. Auf diese Weise waren dann ein Vergleichen und eine statistische Aufarbeitung der Ergebnisse möglich. Bei Versuchen der Aufnahmehemmung von radioaktiv markiertem DOPA oder Dopamin wurde die Aufnahme in % angegeben. Vergleichen wurden diese Hemmversuche mit der ungehemmten Substanzaufnahme, die als 100 % Wert definiert wurden.

### **3.1 Zelluläre Aufnahme von 6-FDOPA und 6-Fluoro-Dopamin**

Für die Versuchsreihe zur zellulären Aufnahme von 6-FDOPA und 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) wurden die Ansätze nach einer Zellzahlbestimmung auf eine gewisse Zellzahl eingestellt (siehe Kapitel 2.2.3.1). Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension gründlich und mehrfach gewaschen, um das nicht aufgenommene 6-FDOPA und 6-FDA zu entfernen. Diese Waschschrte aber waren immer auch mit einem gewissen Zellverlust verbunden. Daher werden die Messwerte nicht auf die ursprünglich eingestellte Zellzahl sondern auf den Proteingehalt der Zellpellets bezogen, um so den Zellverlusten Rechnung zu tragen.

Neben dem Lysat, das die gelösten Katecholamine enthielt, wurden daher auch die Zellpellets bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Mit den Zellpellets wurde anschließend eine Proteinbestimmung durchgeführt. Auf diese Weise wurden die Ergebnisse der mittels HPLC durchgeführten Katecholaminbestimmungen mit Hilfe der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben korrigiert. Die so korrigierten Messungen konnten dann als pMol Katecholamine pro 100  $\mu\text{g}$  Protein miteinander verglichen werden.

#### **3.1.1 *Proteinbestimmung***

Um konkrete Proteinkonzentrationen in  $\mu\text{g}$  Protein pro 10  $\mu\text{l}$  Lösung messen zu können, musste zuerst eine Eichkurve erstellt werden. So wurde neben den eingefrorenen Zellpellets auch eine standardisierte Reihe an Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an menschlichem Serumalbumin gemessen.

### 3.1.1.1 Die Erstellung einer Eichkurve

Für die Erstellung einer Eichkurve wurden je 10 µl aus Reagenzien mit Albumin aus Humanserum bei  $\lambda = 540 \text{ nm}$  gemessen, wie in Kapitel 2.2.3.3.3 beschrieben. Nachfolgende Tabelle 10 stellt wiederholend das Pipettierschema dar und gibt außerdem in der rechten Spalte die bestimmten Extinktionen wieder.

*Tabelle 10: Pipettierschema zur Erstellung der Eichkurve samt photometrisch bestimmter Messwerte*

|          | <b>Verdünnung:</b>                 | <b>Proteingehalt:</b> | <b>Messwerte (Extinktionen):</b> |
|----------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| <b>a</b> | 4 mg/ml H <sub>2</sub> O           | 40,0 µg / 10 µl       | 0,751                            |
| <b>b</b> | 500 µl a + 500 µl H <sub>2</sub> O | 20,0 µg / 10 µl       | 0,436                            |
| <b>c</b> | 500 µl b + 500 µl H <sub>2</sub> O | 10,0 µg / 10 µl       | 0,249                            |
| <b>d</b> | 500 µl c + 500 µl H <sub>2</sub> O | 5,0 µg / 10 µl        | 0,165                            |
| <b>e</b> | 500 µl d + 500 µl H <sub>2</sub> O | 2,5 µg / 10 µl        | 0,122                            |

Die Werte des Proteingehaltes wurden der Abszisse (x-Achse), die gemessenen Extinktionswerte der Ordinate (y-Achse) zugeordnet. Die Ausgleichsgerade wurde anschließend so angelegt, dass ihre Abweichung von der entstandenen Datenpunktwolke minimal war.

Für die lineare Funktion  $f(x) = ax + b$  ergaben sich somit folgende Werte:

|   |
|---|
| $f(x) = ax + b$<br>$a = 0,01856$<br>$b = 0,03254$ |
|---|

Die Datenpunktwolke sowie die Ausgleichsgerade ergeben folgendes Schaubild (Abbildung 7):

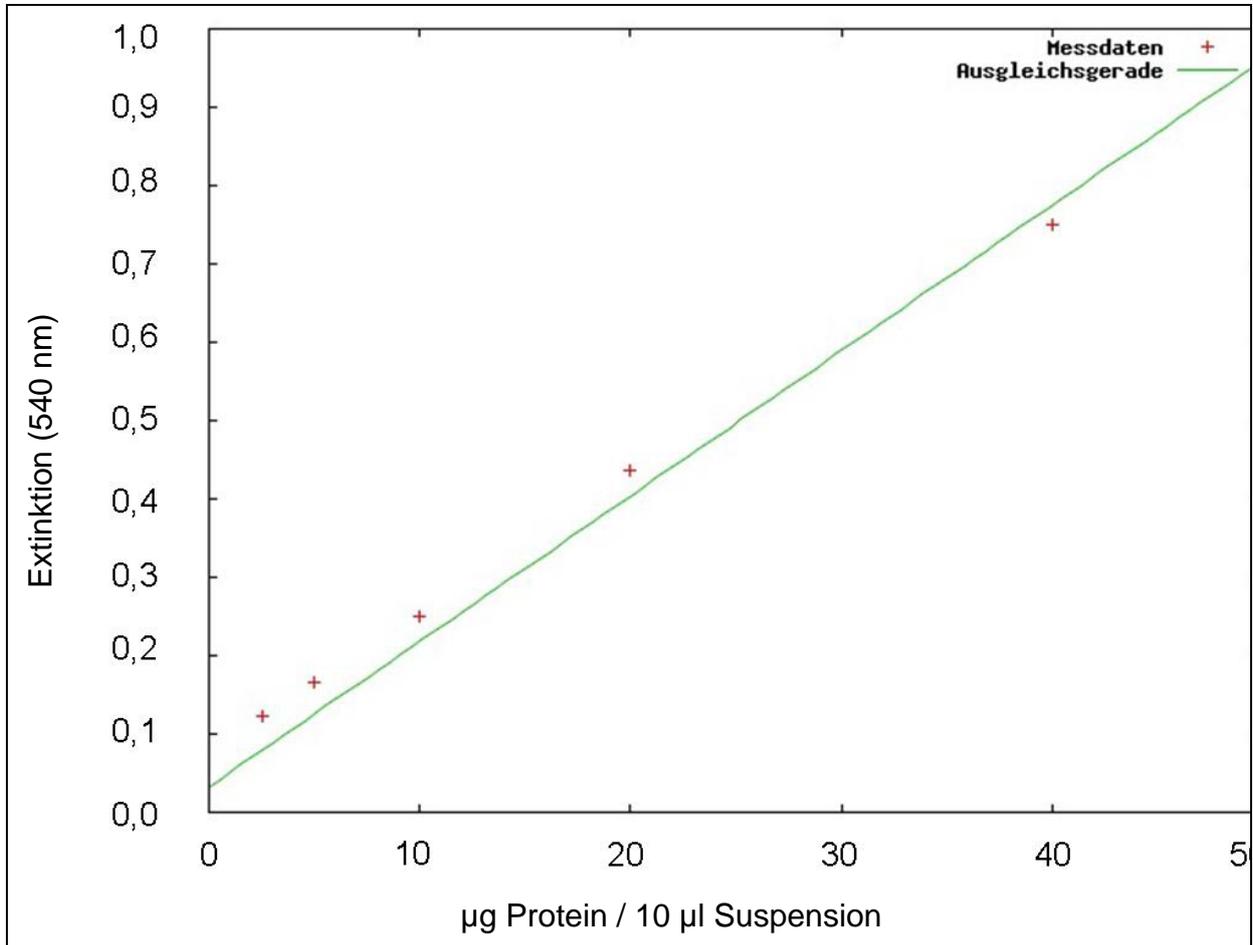


Abbildung 7: Proteineichkurve unter Verwendung von Albumin

### 3.1.1.2 Die Bestimmung des Proteingehalts

Nach der Messung der aufgearbeiteten Zellpellets wurden die Extinktionen mit Hilfe der linearen Funktion der Ausgleichsgeraden (siehe Kapitel 3.1.1.1) in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Auf diese Weise konnte dann die gemessene Katecholaminkonzentration in pMole Katecholamine pro 100 µg Protein angegeben werden. Dies ermöglichte ein einheitliches Vergleichen der Ergebnisse (siehe Kapitel 3.1.2).

### 3.1.2 Zeitabhängige Aufnahme von 6-FDOPA und 6-FDA

#### 3.1.2.1 Vorbemerkung zur Kalibrierung der HPLC-Anlage

Bevor die Proben nach zuvoriger Inkubation mit 6-FDOPA und 6-FDA mit der HPLC-Anlage gemessen werden konnten und so die Aufnahme und der weitere Metabolismus der beiden Substanzen bestimmt werden konnte, musste zuerst eine Kalibrierung der Apparatur erfolgen. Dabei wurden - wie schon in Kapitel 2.2.3.2.3 (Seite 62f) ausführlich beschrieben - zur Kalibrierung folgende Substanzen eingesetzt: DHBA als Interner Standard, DOPA, 6-FDOPA, Dopamin, 6-FDA, Noradrenalin und Adrenalin.

In Abbildung 8 ist exemplarisch ein Chromatogramm einer solchen Kalibrierung abgebildet um die weiteren Chromatogramme interpretieren zu können.

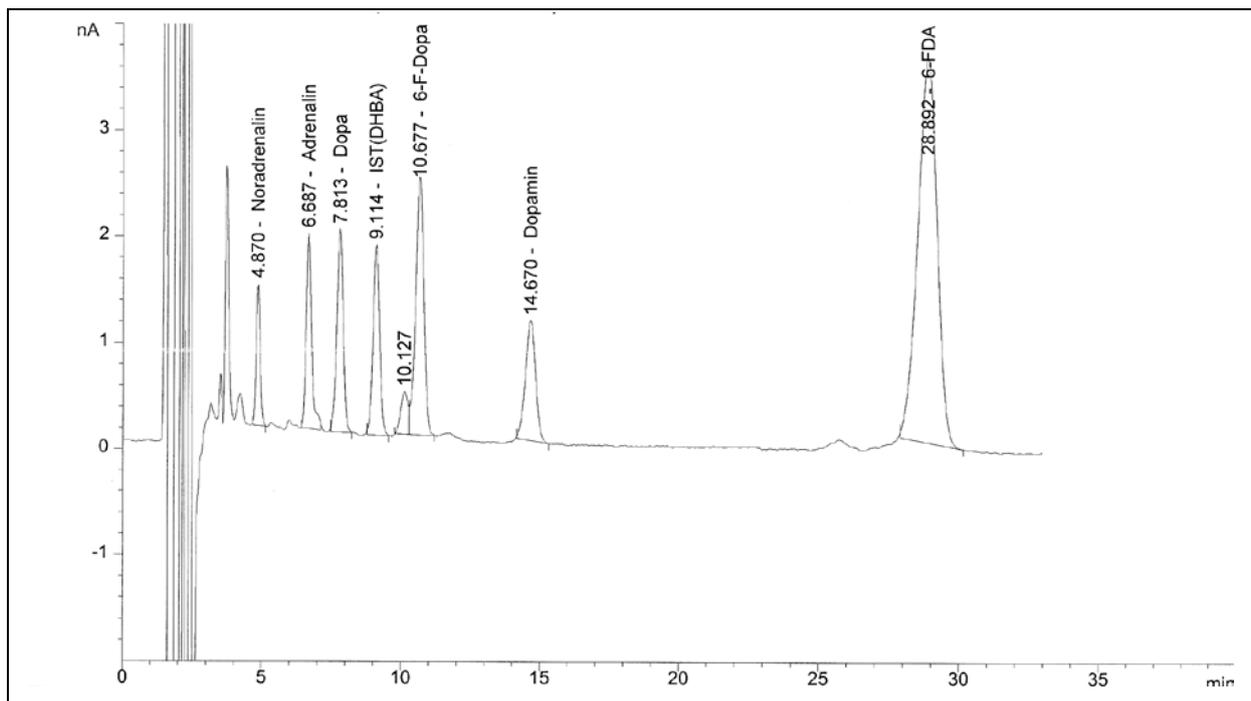


Abbildung 8: Beispielchromatogramm einer Kalibrierung (Einspritzmenge: 50  $\mu$ l). Nähere Informationen zu Konzentrationen und Absolutmengen siehe Tabelle 11

*Tabelle 11: Bei der Kalibrierung verwendete Konzentrationen, Absolutmengen und Ausschläge der Peaks in nA*

|                     | <b>Ausschläge<br/>in nA</b> | <b>Konzentrationen<br/>in Mole / Liter [M]</b> | <b>Absolutmengen<br/>in Mole / 50 µl</b> |
|---------------------|-----------------------------|--|--|
| <b>DHBA</b>         | 1,9 nA                      | 25,0 nM  | 1,25 pMole / 50 µl                       |
| <b>DOPA</b>         | 2,0 nA                      | 35,0 nM  | 1,75 pMole / 50 µl                       |
| <b>6-FDOPA</b>      | 2,6 nA                      | 200,0 nM                                       | 10,00 pMole / 50 µl                      |
| <b>Dopamin</b>      | 1,2 nA                      | 30,0 nM  | 1,50 pMole / 50 µl                       |
| <b>6-FDA</b>        | 3,7 nA                      | 200,0 nM                                       | 10,00 pMole / 50 µl                      |
| <b>Noradrenalin</b> | 1,5 nA                      | 15,0 nM  | 0,75 pMole / 50 µl                       |
| <b>Adrenalin</b>    | 2,0 nA                      | 25,0 nM  | 1,25 pMole / 50 µl                       |

Die Tabelle 11 gibt die für die Kalibrierung verwendeten Substanzen, die jeweiligen Konzentrationen, die Höhe der Peaks und die injizierten Absolutmengen wider.

### **3.1.2.2 Katecholaminmuster der SK-N-SH und der Kelly Zelllinie**

Die endogenen Katecholaminmuster der beiden Zelllinien SK-N-SH und Kelly sind in den nachfolgenden Abbildungen 9a und 9b dargestellt.

Abbildung 9a zeigt ein Chromatogramm eines Zellextraktes von SK-N-SH Zellen nach zuvoriger Behandlung mit Ascorbat (f.c.: 50 µM) über mehrere Wochen. Aufgrund früherer Untersuchungen (Seitz et al., 1998) wurden alle Zelllinien mit Ascorbat vorbehandelt um den Katecholaminmetabolismus verstärkt zu aktivieren, da Ascorbat als Coenzym der Dopamin-β-Hydroxylase fungiert. Auch während der Versuchsdurchführung wurden die Zellen mit Ascorbat versorgt, um die Autooxidation der Katecholamine zu verhindern. Neben dem Internen Standard sieht man auf diesem Chromatogramm lediglich einen Peak für das Noradrenalin. Wie in der Literatur beschrieben liegt die Dopamin-β-Hydroxylase in den SK-N-SH Zellen in der höchsten Konzentration von allen für die Katecholaminsynthese notwendigen Enzyme dieser Zelllinie vor (Kuçi et al., 2002; Ross et al., 1981).

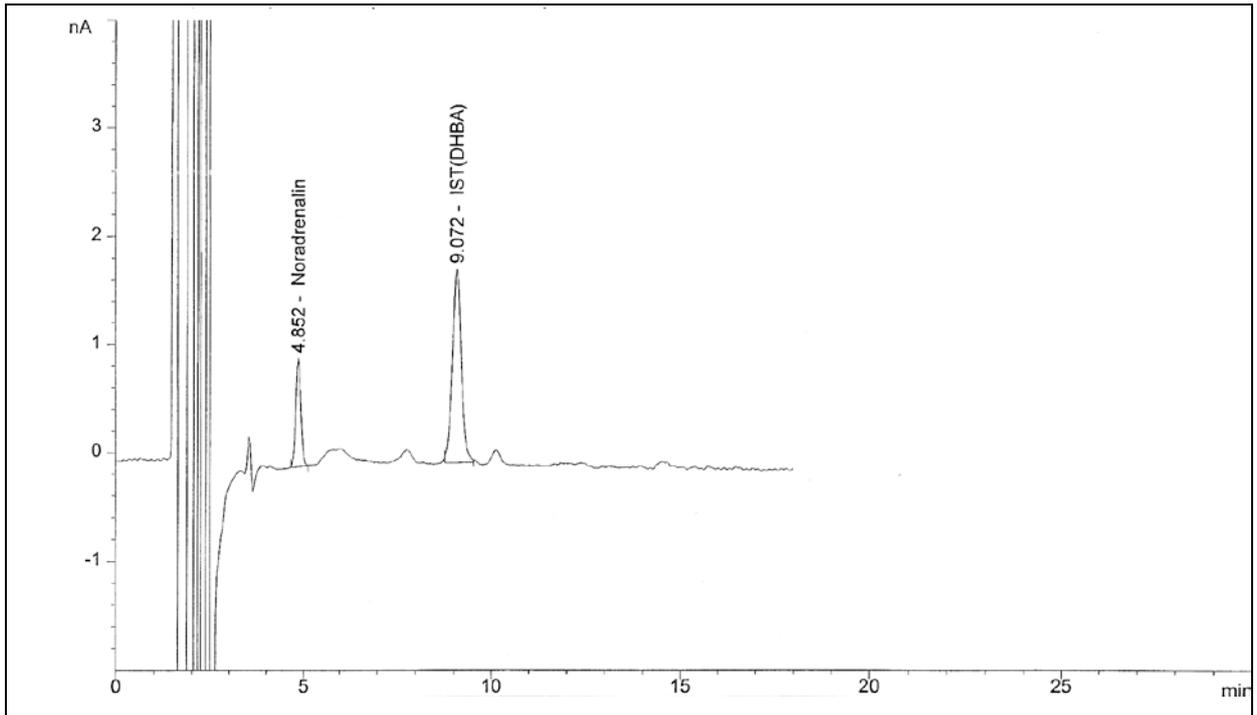


Abbildung 9a: Endogenes Katecholaminmuster von SK-N-SH Zellen.  
Extrakt aus ca.  $2,1 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

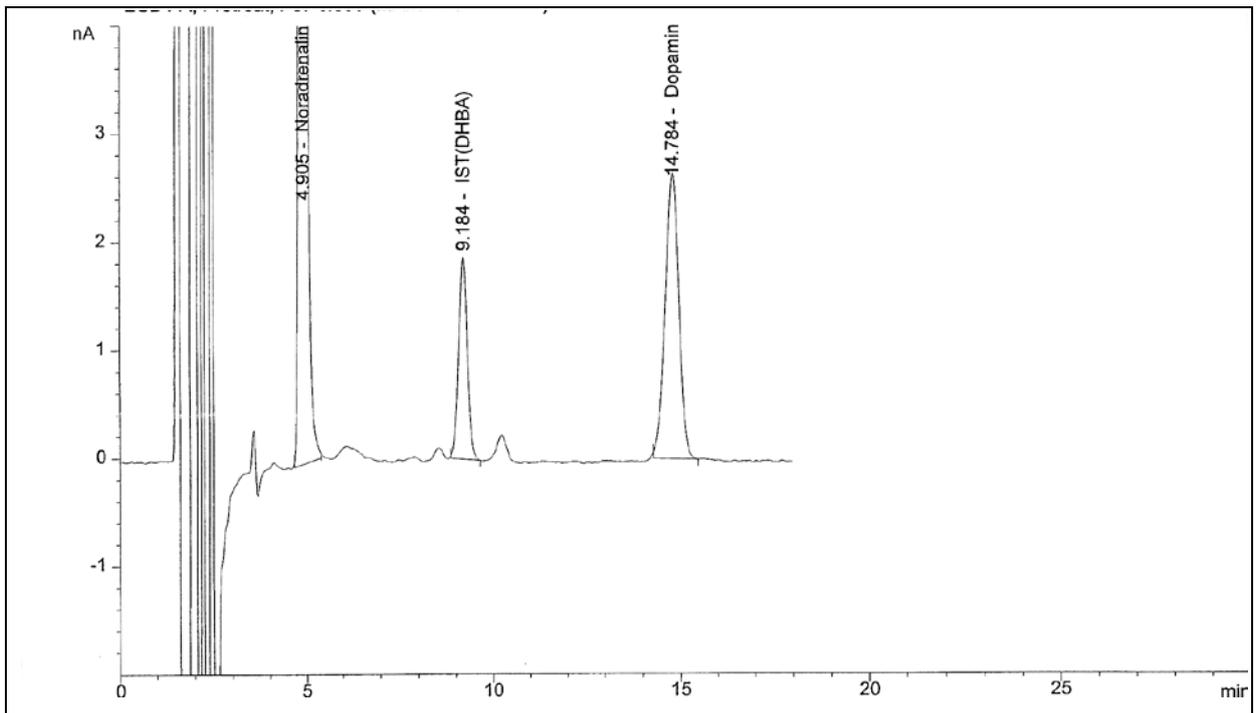


Abbildung 9b: Endogenes Katecholaminmuster von Kelly Zellen.  
Extrakt aus ca.  $2,1 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

Das Chromatogramm in Abbildung 9b zeigt das Katecholaminmuster eines Zellextraktes von Kelly Zellen ebenfalls nach vorheriger Ascorbatbehandlung. Neben dem Noradrenalin Peak zeigt sich ein zweiter deutlicher Peak für Dopamin. Die Kelly Zellen weisen neben der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase auch eine hohe Aktivität der DOPA-Decarboxylase auf (Ikeda et al., 1994; Kuçi et al., 2002).

### **3.1.2.3 Aufnahme und Metabolismus von 6-FDOPA**

Alle sechs Zelllinien (SK-N-SH, Kelly, Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK293 und OCT2-HEK 293) wurden sowohl 5 Minuten als auch 30 Minuten mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend wurde mittels HPLC der zelluläre 6-FDOPA (Abbildung 11a und 11b) und 6-FDA (Abbildung 11c und 11d) Gehalt gemessen.

Exemplarisch sind einige Chromatogramme in den Abbildungen 10a bis 10f dargestellt. Wie in den Abbildungen 10a bis 10d zu erkennen ist, wird in den beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly 6-FDOPA sehr rasch zu 6-FDA umgesetzt. Zusätzlich kommt es zum Auftreten eines starken Peaks bei ca. 18,2 bis 18,4 Minuten. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um 6-Fluoro-Nordrenalin, da beide Neuroblastom-Zelllinien eine hohe Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase Aktivität aufweisen (Kuçi et al., 2002; Ross et al., 1981). Weiter sieht man bei den Kelly Zellen bei 15,7 Minuten einen deutlichen Peak, der allerdings nicht zugeordnet werden kann und einen kleineren bei ca. 10 Minuten. Diese beiden Peaks treten auch bei den SK-N-SH Zellen auf, aber bedeutend schwächer. Bei den Caki-1 Zellen wird das aufgenommene 6-FDOPA nicht weiter in die Katecholamine umgesetzt (siehe Abbildung 10e und f).

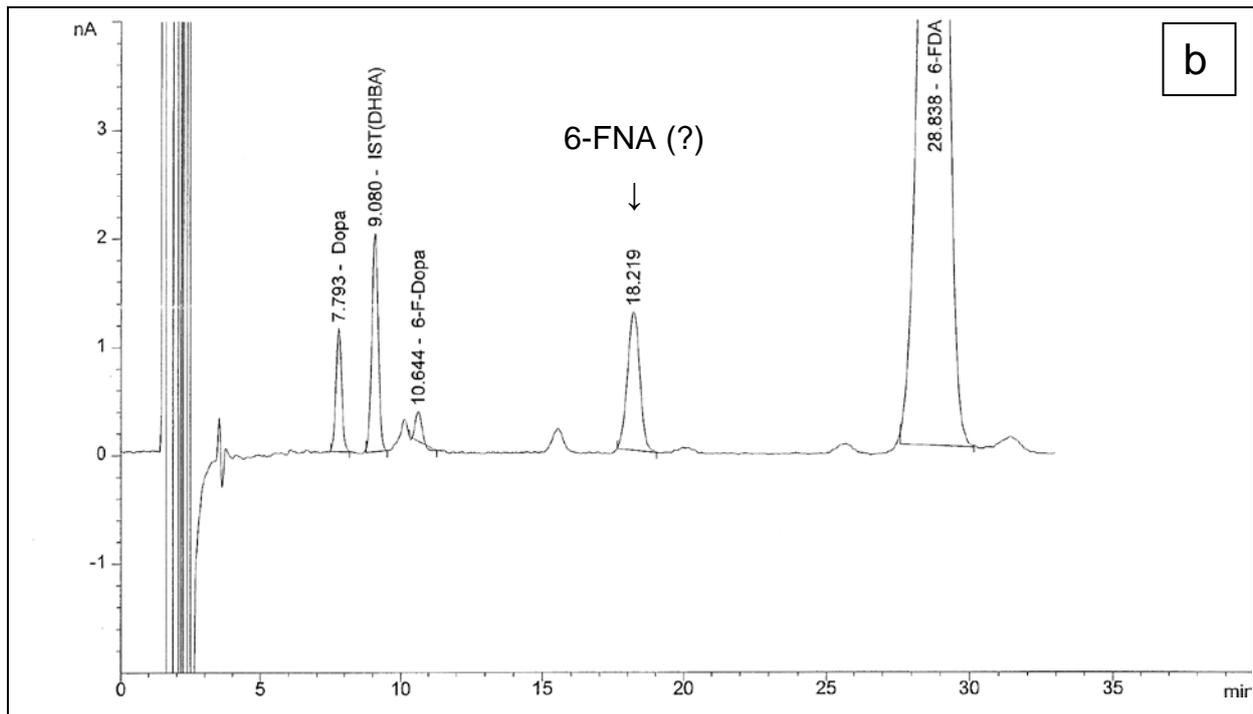
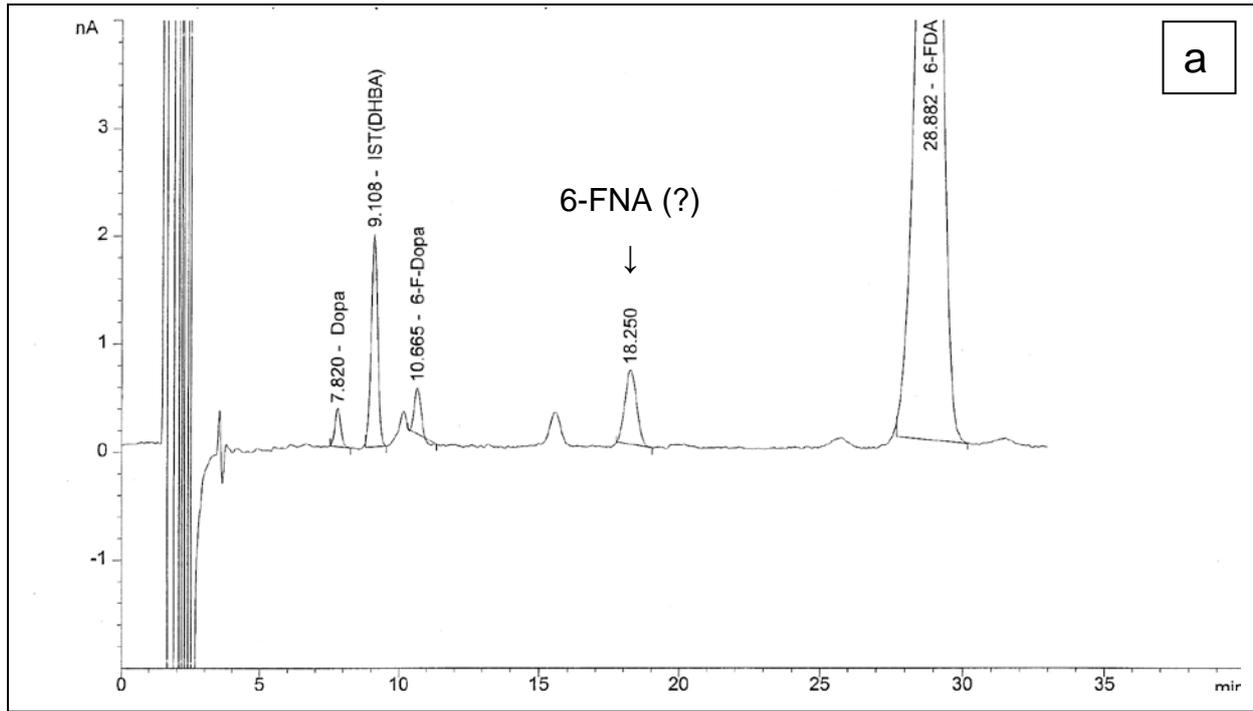


Abbildung 10a und b: Chromatogramm nach 5 minütiger (a) und nach 30 minütiger (b) Inkubation von SK-N-SH Zellen mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M). Extrakt aus ca.  $0,2 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

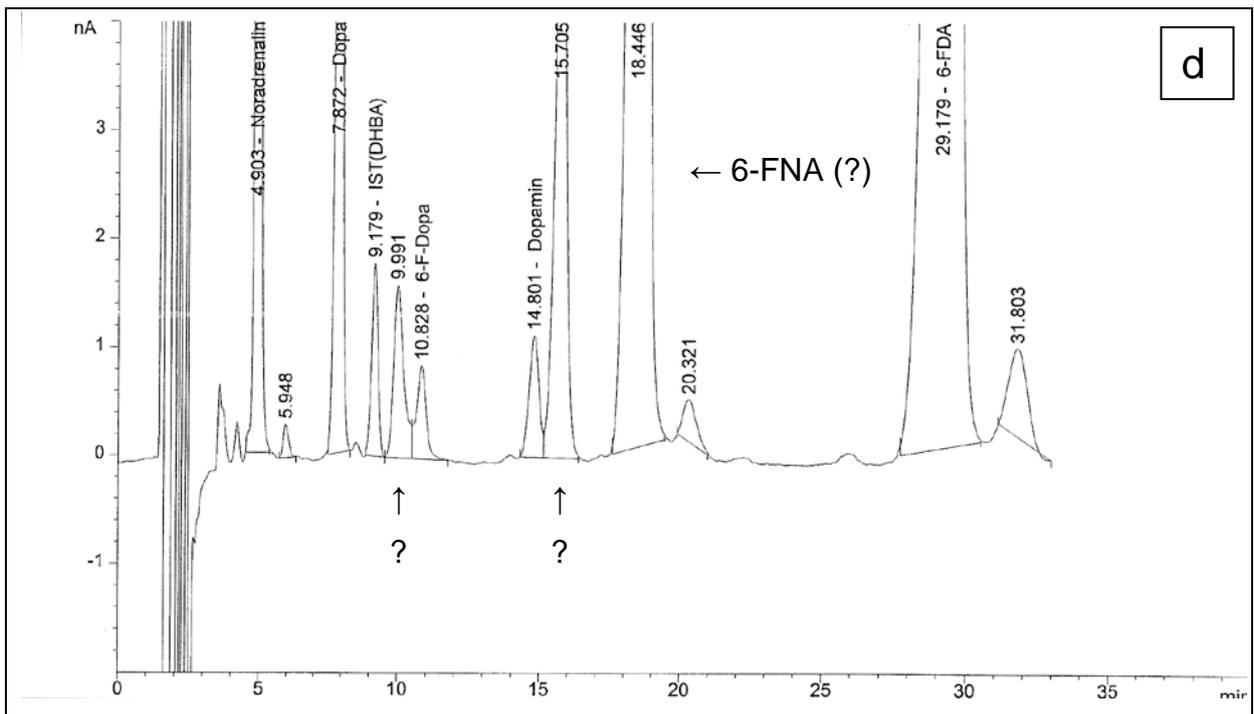
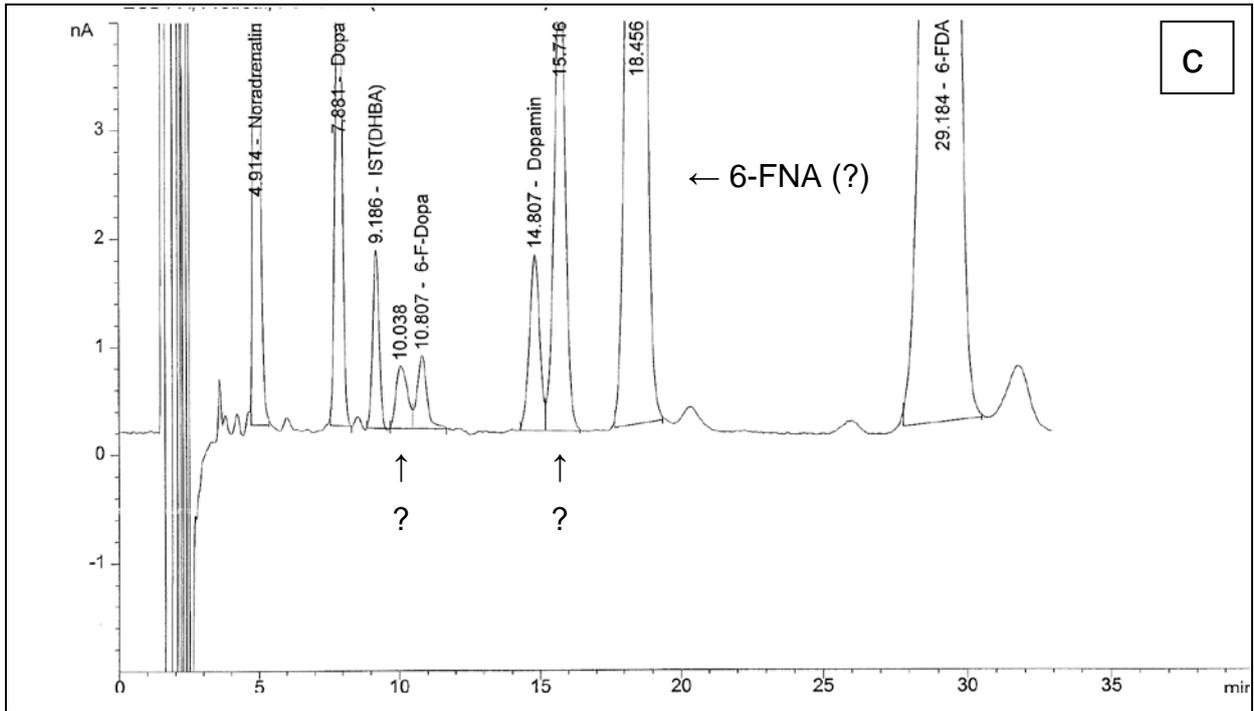


Abbildung 10c und d: Chromatogramm nach 5 minütiger (c) und nach 30 minütiger (d) Inkubation von Kelly Zellen mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M). Extrakt aus ca.  $1,0 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

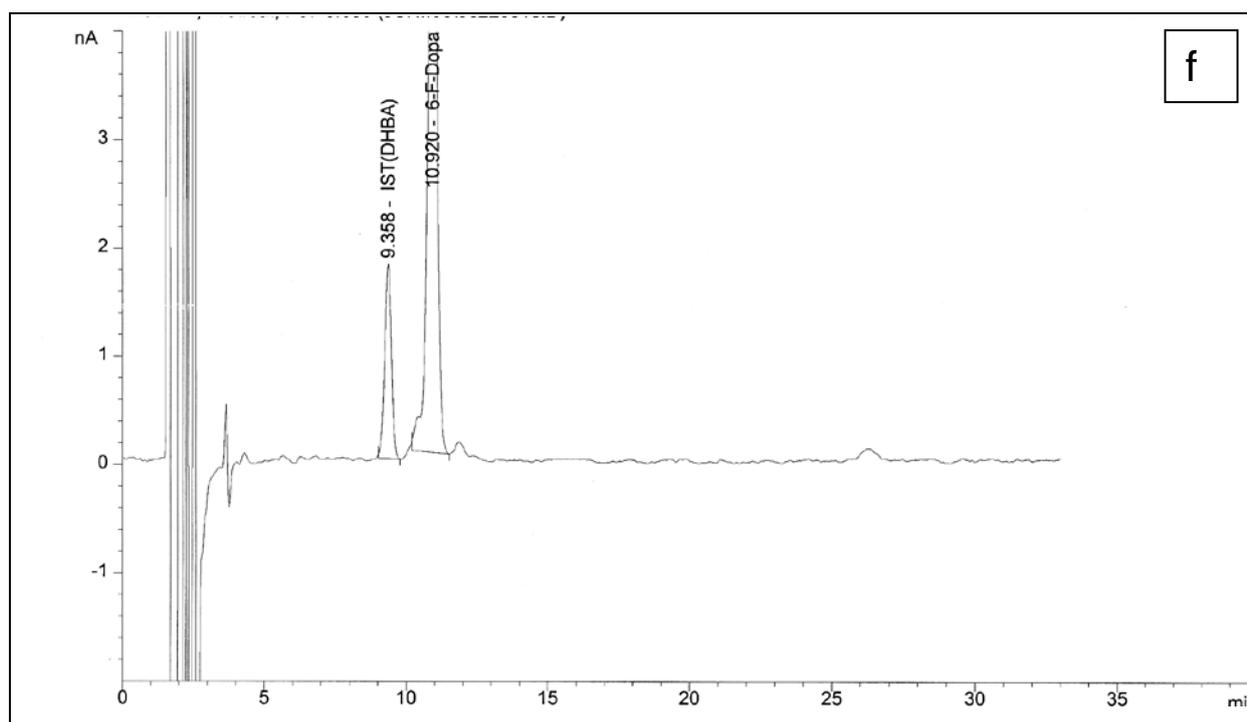
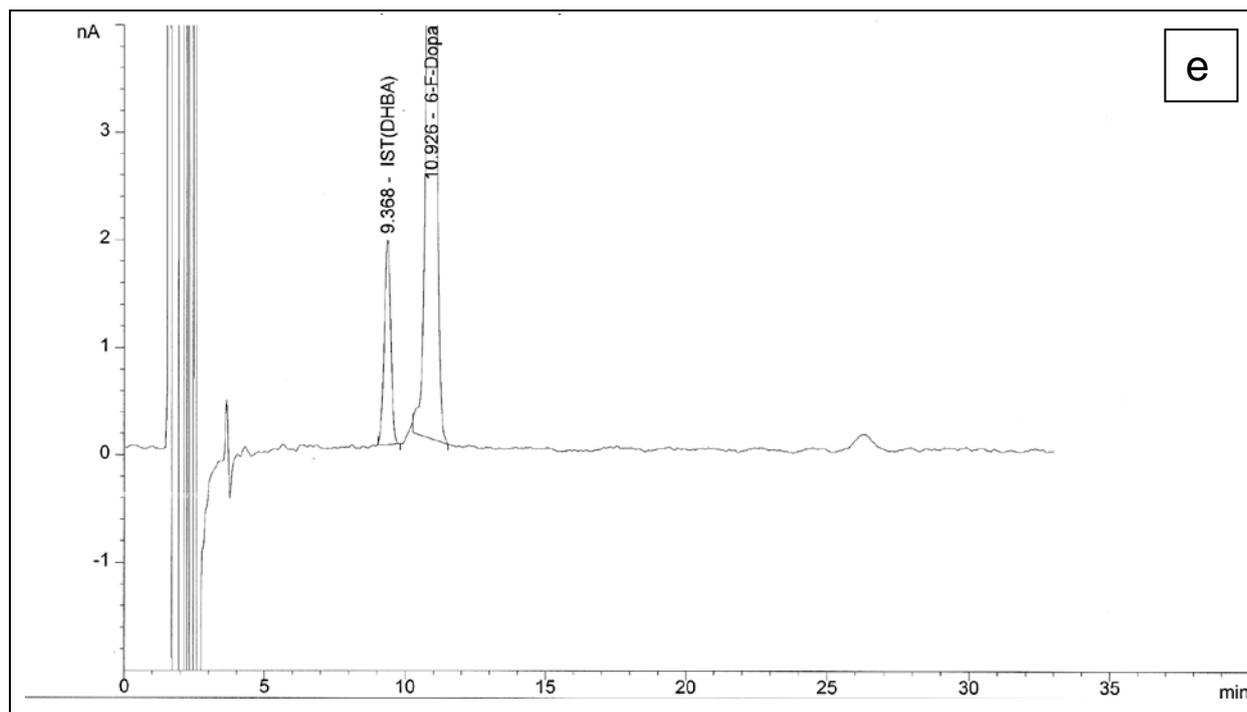


Abbildung 10e und f: Chromatogramm nach 5 minütiger (e) und nach 30 minütiger (f) Inkubation von Caki-1 Zellen mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M). Extrakt aus ca.  $0,07 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

Die Abbildung 11a bis 11d zeigen vergleichend anhand von Balkendiagrammen exemplarisch die Aufnahme und den weiteren Metabolismus zu 6-FDA nach Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M) bei den sechs verwendeten Zelllinien (SK-N-SH, Kelly, Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293).

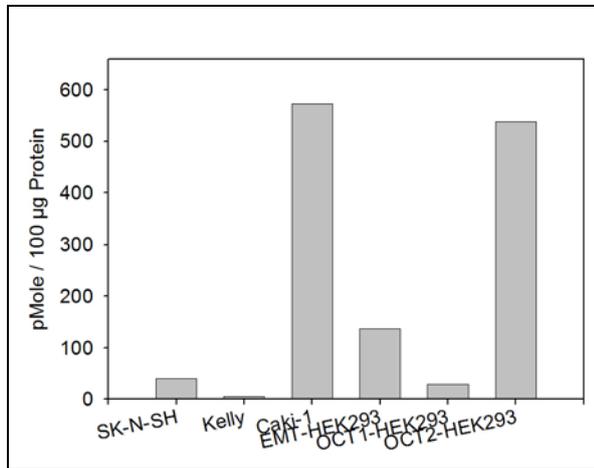


Abb. 11a: Exemplarische Beispiele des 6-FDOPA Gehalts in pMole pro 100  $\mu$ g Protein nach 5 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M)

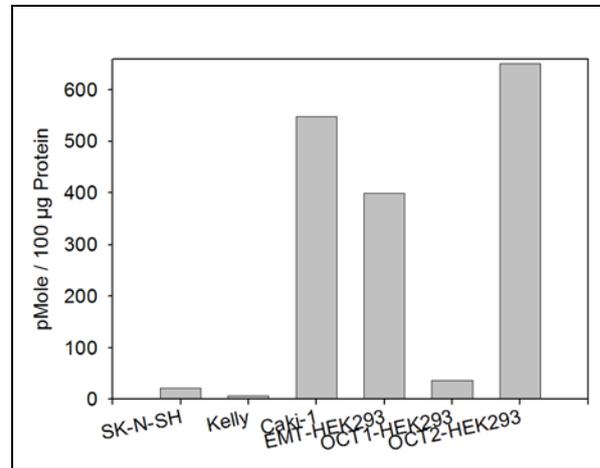


Abb. 11b: Exemplarische Beispiele des 6-FDOPA Gehalts in pMole pro 100  $\mu$ g Protein nach 30 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M)

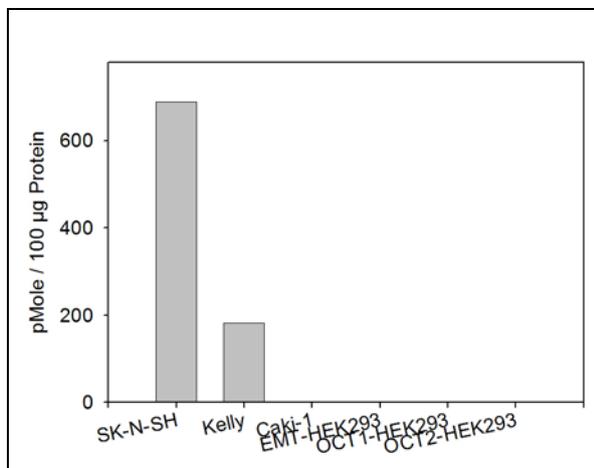


Abb. 11c: Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100  $\mu$ g Protein nach 5 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M)

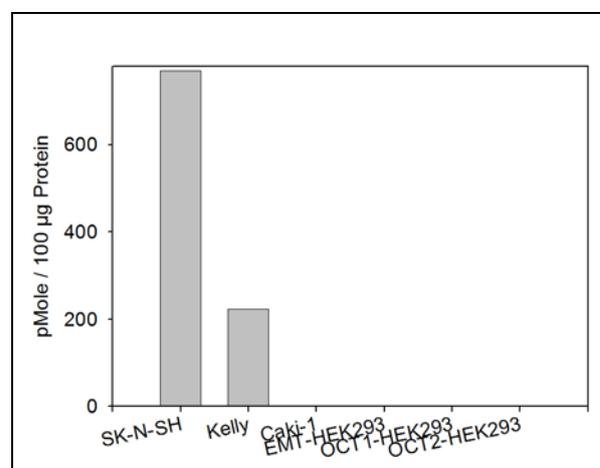


Abb. 11d: Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100  $\mu$ g Protein nach 30 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M)

Wie in den beiden Abbildungen 11a und 11b zu sehen ist, zeigten sich hohe Konzentrationen von 6-FDOPA in den Zellen der Zelllinien Caki-1, EMT-HEK 293 und OCT2-HEK 293. Bei den Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly war nach 5 Minuten ein geringer Gehalt dieser Substanz nachweisbar. Nach 30 Minuten war die Konzentration von 6-FDOPA im Gegensatz zu den Zelllinien Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 nicht weiter gestiegen, sondern auf minimale Werte abgesunken.

Betrachtet man in den Abbildungen 11c und 11d die gemessenen 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) Werte bei den beiden Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly nach Inkubation mit 6-FDOPA, erkennt man, dass diese schon nach 5 Minuten stark angestiegen waren. Diese beiden Neuroblastom-Zelllinien verfügen über eine DOPA-Decarboxylase und können somit 6-FDOPA weiter umsetzen (Bozzi et al., 2004; Träger et al., 2008). Bei der SK-N-SH Zelllinie wurde ein Gehalt von etwa 700 pMole 6-FDA pro 100 µg Protein gemessen, bei der Kelly Zelllinie ein Gehalt von ungefähr 200 pMole 6-FDA pro 100 µg Protein. Auch nach 30 Minuten befanden sich die 6-FDA Konzentrationen der beiden Zelllinien auf ähnlich hohem Niveau. Gleichzeitig sank bei den beiden Zelllinien der 6-FDOPA Gehalt auf kleine Werte ab.

Bei den OCT-exprimierenden Zelllinien kann kein 6-FDA nachgewiesen werden, da diese Zellen über keine DOPA-Decarboxylase Aktivität verfügen.

Bei den Chromatogrammen der beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly in Abbildung 10a bis 10d sieht man - wie bereits erwähnt - weiter einen im zeitlichen Verlauf anwachsenden Peak zwischen 18,2 und 18,4 Minuten, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um den intrazellulären 6-Fluoro-Noradrenalin (6-FNA) Gehalt handelt. Mangels zuvoriger Kalibrierung der HPLC-Anlage für diese Substanz ist retrospektiv eine eindeutige Konzentrationsangabe leider nicht mehr möglich.

Zusammenfassend werden die Resultate der Messungen nach Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M) nachfolgend in tabellarischer Form für 6-FDOPA (Tabelle 12a) und 6-FDA (Tabelle 12b) dargestellt. Meistens wurden diese anhand von 3 unabhängigen Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel in pMole pro 100  $\mu$ g Protein jeweils mit Standardabweichung angegeben:

*Tabelle 12a: Zellulärer 6-FDOPA Gehalt nach Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M)*

|                     | 5 Minuten                |         | 30 Minuten                |         |
|---------------------|--------------------------|---------|---------------------------|---------|
| <b>SK-N-SH</b>      | <b>83,0</b> $\pm$ 95,2   | (n = 3) | <b>18,5</b> $\pm$ 12,5    | (n = 3) |
| <b>Kelly</b>        | <b>8,2</b> $\pm$ 9,9     | (n = 3) | <b>2,3</b> $\pm$ 3,5      | (n = 3) |
| <b>Caki-1</b>       | <b>698,0</b> $\pm$ 144,4 | (n = 3) | <b>507,8</b> $\pm$ 63,9   | (n = 3) |
| <b>EMT-HEK 293</b>  | <b>2,4</b> $\pm$ 4,2     | (n = 3) | <b>132,9</b> $\pm$ 230,2  | (n = 3) |
| <b>OCT1-HEK 293</b> | <b>244,1</b> $\pm$ 398,4 | (n = 3) | <b>600,0</b> $\pm$ 1007,9 | (n = 3) |
| <b>OCT2-HEK 293</b> | <b>717,2</b> $\pm$ 253,2 | (n = 2) | <b>1060,5</b> $\pm$ 578,1 | (n = 2) |

*Legende: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung in pMole / 100  $\mu$ g Protein;  
n = Stichprobenumfang*

*Tabelle 12b: Zellulärer 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) Gehalt nach Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M)*

|                     | 5 Minuten                |         | 30 Minuten              |         |
|---------------------|--------------------------|---------|-------------------------|---------|
| <b>SK-N-SH</b>      | <b>853,2</b> $\pm$ 773,5 | (n = 3) | <b>739,6</b> $\pm$ 26,5 | (n = 3) |
| <b>Kelly</b>        | <b>217,0</b> $\pm$ 126,1 | (n = 3) | <b>233,2</b> $\pm$ 73,8 | (n = 3) |
| <b>Caki-1</b>       | <b>ND</b> $\pm$ 0        | (n = 3) | <b>ND</b> $\pm$ 0       | (n = 3) |
| <b>EMT-HEK 293</b>  | <b>ND</b> $\pm$ 0        | (n = 3) | <b>ND</b> $\pm$ 0       | (n = 3) |
| <b>OCT1-HEK 293</b> | <b>ND</b> $\pm$ 0        | (n = 3) | <b>ND</b> $\pm$ 0       | (n = 3) |
| <b>OCT2-HEK 293</b> | <b>ND</b> $\pm$ 0        | (n = 3) | <b>ND</b> $\pm$ 0       | (n = 3) |

*Legende: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung in pMole / 100  $\mu$ g Protein;  
n = Stichprobenumfang; ND = nicht nachweisbar (engl. Non-Detectable)*

### **3.1.2.4 Aufnahme und Metabolismus von 6-Fluoro-Dopamin**

Wie für 6-FDOPA wurde unter denselben Voraussetzungen bei allen sechs Zelllinien (SK-N-SH, Kelly, Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293) auch die Aufnahme und der Stoffwechsel des Dopamin-Analogons 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) (f.c.: 100  $\mu$ M) untersucht und ebenfalls Messungen nach 5 (Abbildung 12a) und nach 30 Minuten (Abbildung 12b) durchgeführt.

Zur Verdeutlichung der Aufnahme von 6-FDA nach 5 und nach 30 minütiger Inkubation und dessen wahrscheinliche Umsetzung durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase zu 6-FNA (Peak zwischen 18,2 und 18,4 Minuten) in den beiden Neuroblastom-Zelllinien folgen sechs Chromatogramme (Abbildung 12a bis 12f). Auch hier finden sich - wie nach der Inkubation mit 6-FDOPA - bei den SK-N-SH und bei den Kelly Zelllinien wieder zusätzliche Peaks bei ca. 10 und 15,7 Minuten, die jedoch keiner Substanz zugeordnet werden können. Stellvertretend für die OCT-exprimierenden Zellen werden zwei Chromatogramme der Caki-1 Zellen (Abbildung 12e und 12f) gezeigt. Hier - im Gegensatz zu den SK-N-SH und den Kelly Zellen - fehlt der Peak zwischen 18,2 und 18,4 Minuten (6-FNA).

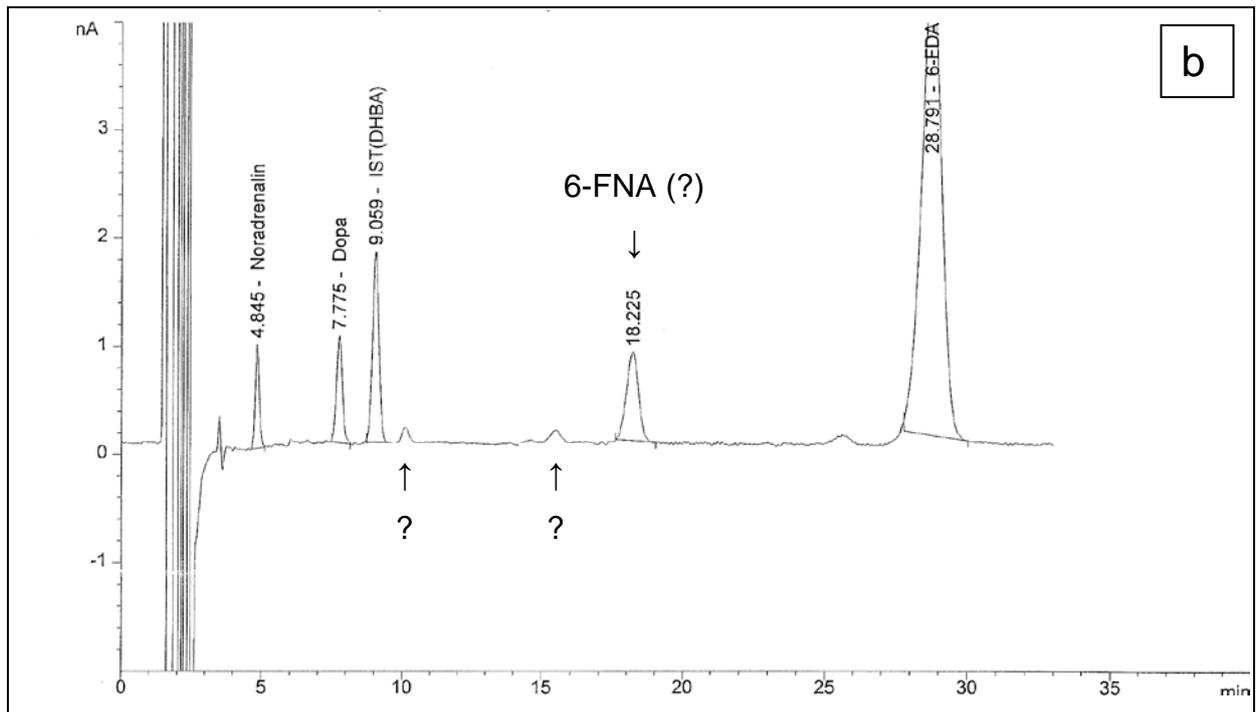
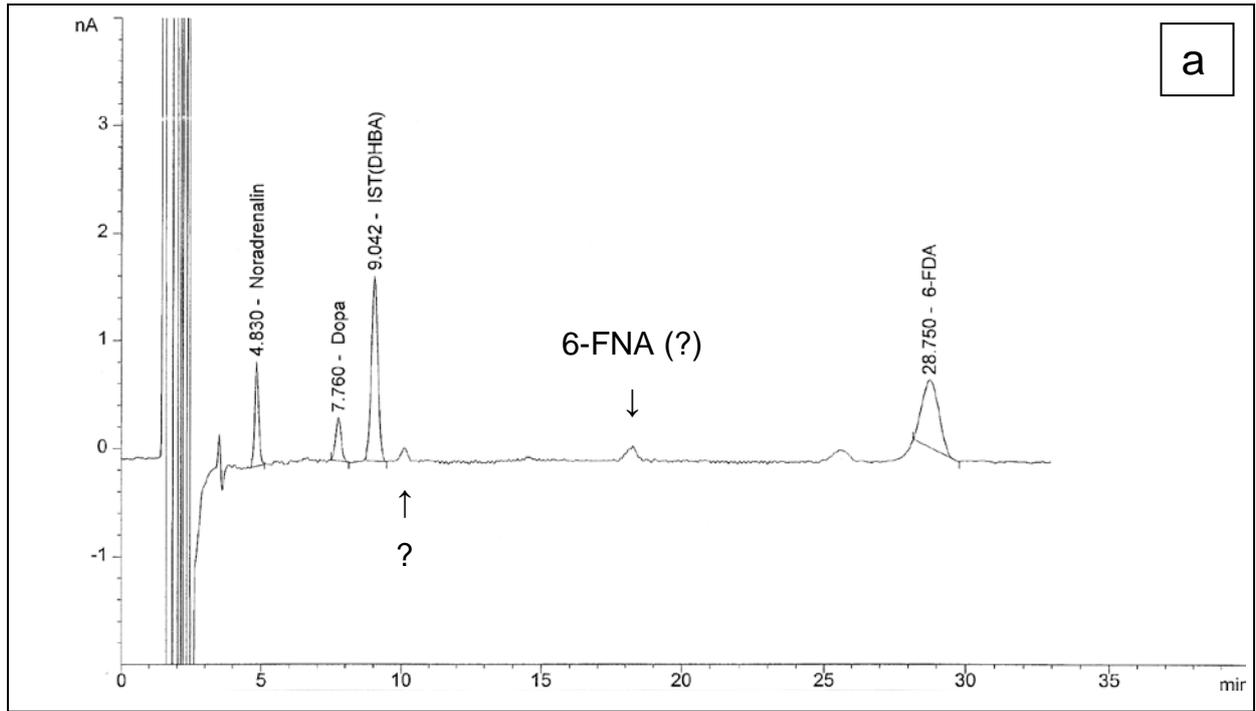


Abbildung 12a und b: Chromatogramm nach 5 minütiger (a) und nach 30 minütiger (b) Inkubation von SK-N-SH Zellen mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M).  
Extrakt aus ca.  $2,1 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

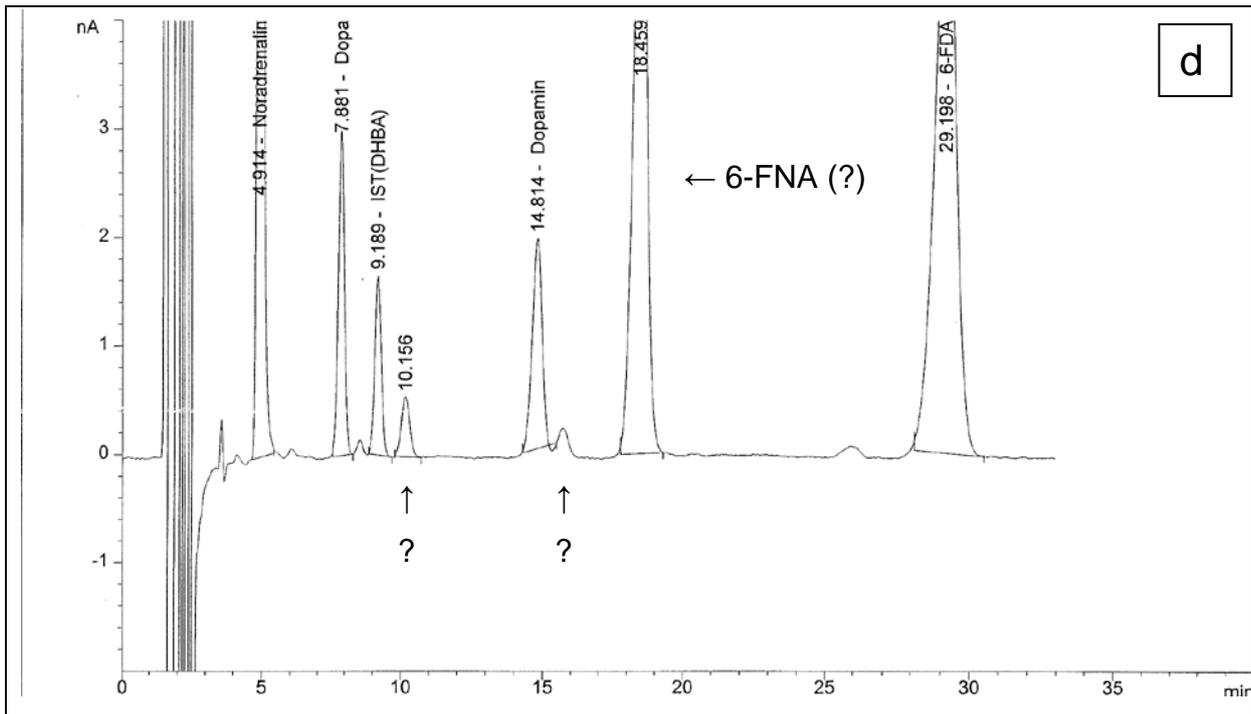
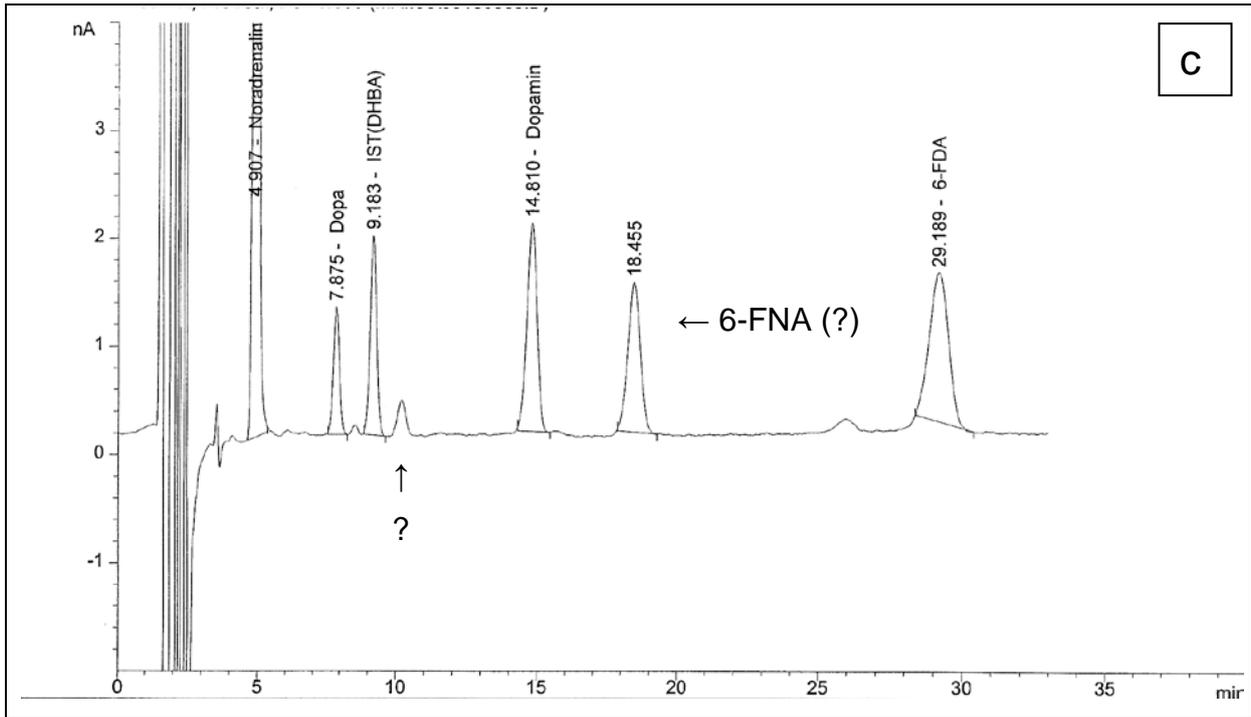


Abbildung 12c und d: Chromatogramm nach 5 minütiger (c) und nach 30 minütiger (d) Inkubation von Kelly Zellen mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M).  
Extrakt aus ca.  $1,0 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

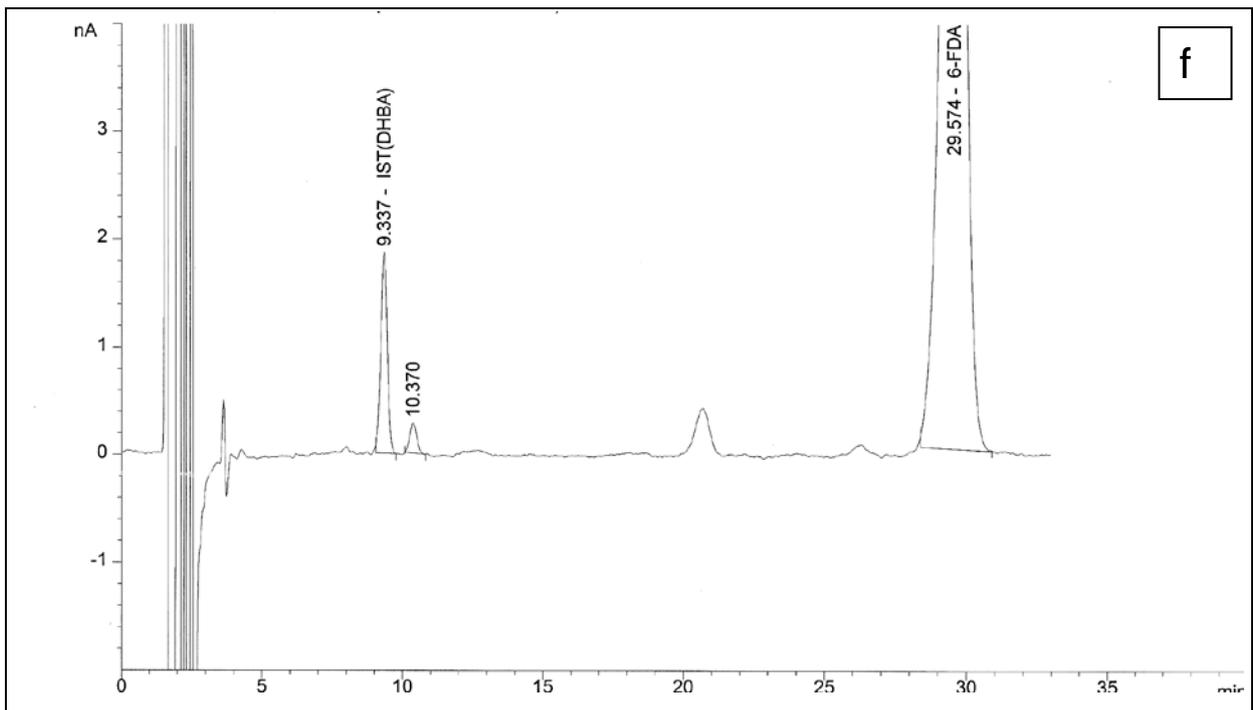
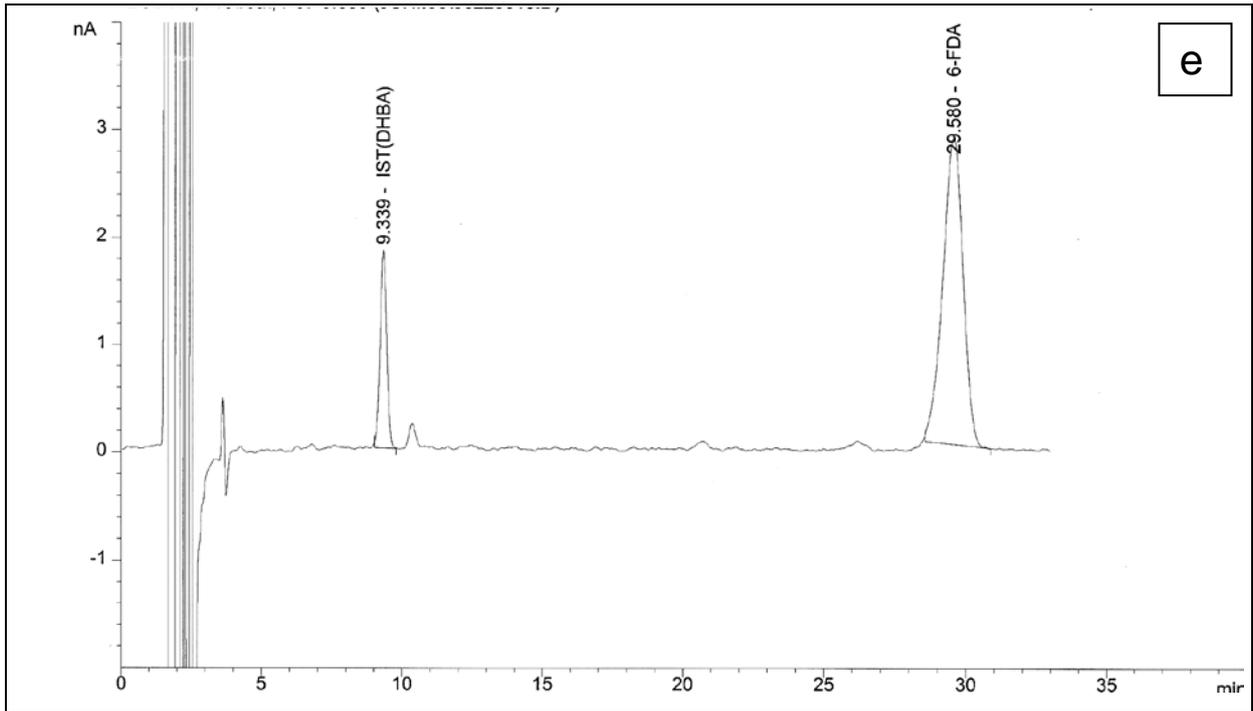


Abbildung 12e und f: Chromatogramm nach 5 minütiger (e) und nach 30 minütiger (f) Inkubation von Caki-1 Zellen mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M). Extrakt aus ca.  $0,07 \times 10^6$  Zellen / 50  $\mu$ l

Die Abbildung 13a und 13b zeigen anhand von Balkendiagrammen exemplarisch die Aufnahme nach Inkubation mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M) bei den sechs verwendeten Zelllinien (SK-N-SH, Kelly, Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293).

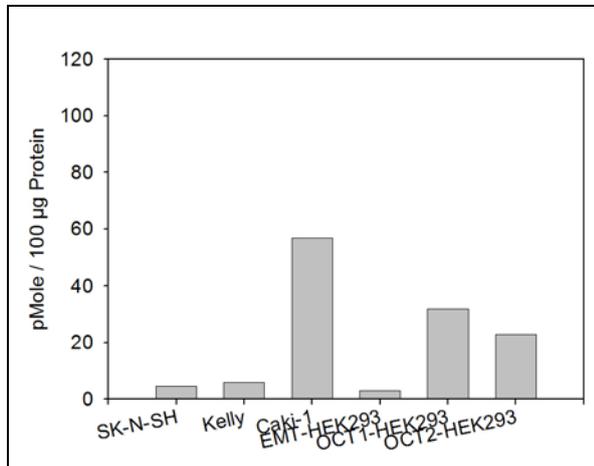


Abb. 13a: Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100  $\mu$ g Protein nach 5 min Inkubation mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M)

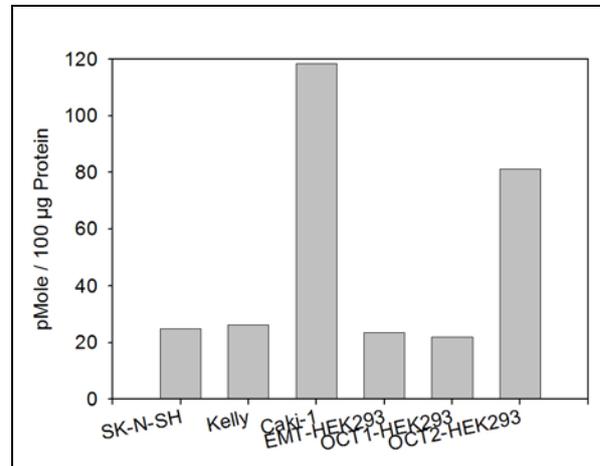


Abb. 13b: Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100  $\mu$ g Protein nach 30 min Inkubation mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M)

Alle Zellen nahmen das zu den Ansätzen gegebene 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M) auf (siehe Abbildung 13a und 13b). Die über DAT und NAT detektierbare Menge an 6-FDA war bei den Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly am geringsten. Höher war der 6-FDA Gehalt bei den OCT-exprimierenden Zelllinien. Auffallend hohe Werte zeigten sich bei der Nierenkarzinom-Zelllinie Caki-1, an der erstmals die extraneuronalen Monoamintransporter (OCT3) entdeckt wurden (Schömig & Schönfeld, 1990; Schömig et al., 1990). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich bei fast allen Zelllinien eine Zunahme der 6-FDA Konzentration nach 30 Minuten im Vergleich zu den Messungen nach 5 Minuten.

In Tabelle 13 sind zusammenfassend die Messergebnisse für 6-FDA aus mehreren Messungen wiedergegeben:

*Tabelle 13: Zellulärer 6-FDA Gehalt nach Inkubation mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M)*

|                     | 5 Minuten   |            |         | 30 Minuten   |            |         |
|---------------------|-------------|------------|---------|--------------|------------|---------|
| <b>SK-N-SH</b>      | <b>2,5</b>  | $\pm 2,0$  | (n = 3) | <b>12,7</b>  | $\pm 11,2$ | (n = 3) |
| <b>Kelly</b>        | <b>4,2</b>  | $\pm 3,6$  | (n = 3) | <b>18,8</b>  | $\pm 8,9$  | (n = 3) |
| <b>Caki-1</b>       | <b>53,8</b> | $\pm 4,4$  | (n = 2) | <b>200,3</b> | $\pm 81,8$ | (n = 3) |
| <b>EMT-HEK 293</b>  | <b>7,5</b>  | $\pm 10,4$ | (n = 3) | <b>11,8</b>  | $\pm 16,6$ | (n = 2) |
| <b>OCT1-HEK 293</b> | <b>22,4</b> | $\pm 19,5$ | (n = 3) | <b>8,1</b>   | $\pm 12,1$ | (n = 3) |
| <b>OCT2-HEK 293</b> | <b>7,6</b>  | $\pm 13,2$ | (n = 3) | <b>27,1</b>  | $\pm 46,9$ | (n = 3) |

*Legende: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung in pMole / 100  $\mu$ g Protein;  
n = Stichprobenumfang*

### 3.1.2.5 Zusammenfassung der zellulären Aufnahme von 6-FDOPA und 6-Fluoro-Dopamin

Die Ergebnisse der Aufnahme von 6-FDOPA und 6-FDA zeigen bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly niedrige Konzentrationen für 6-FDOPA. Dieses Ergebnis kann auf die rasche enzymatische Umwandlung zu 6-FDA zurückgeführt werden, wobei bereits nach 5 min ein großer Teil des Substrates umgesetzt wurde. Ein weiterer Peak bei ca. 18,3 Minuten stellt höchstwahrscheinlich 6-Fluoro-Noradrenalin (6-FNA) dar. Bei Caki-1 und den transformierten HEK 293 Zellen lassen sich für die 6-FDOPA Aufnahme höhere Werte messen. Eine Umwandlung in 6-FDA und 6-FNA findet nicht statt.

Die organische Kationentransporter exprimierenden EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293, OCT2-HEK 293 und besonders Caki-1 zeigen nach Inkubation mit 6-FDA etwas höhere 6-FDA Konzentrationen als SK-N-SH und Kelly Zellen. Bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly kam es wieder zusätzlich zu einem deutlichen Peak bei ca. 18,3 Minuten (6-FNA).

## **3.2 Aufnahmeversuche mit radioaktiv markierten Substanzen**

Zu Beginn soll hier ein Überblick über die durchgeführten Versuche gegeben werden.

Bei den in Abschnitt 3.2.1 durchgeführten Untersuchungen wurden die beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly verwendet. Dabei wurde vergleichend die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (Modellsubstanz für [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA) und [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin (Modellsubstanz für [ $^{18}\text{F}$ ]-6-Fluoro-Dopamin ([ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA)) gemessen. Da für spätere PET Untersuchungen [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA aus [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA hergestellt werden soll, wurde hier in analoger Weise [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin aus [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA durch enzymatische Decarboxylierung hergestellt. Dadurch konnte durch den 100%-igen Umsatz die gleichen Konzentrationen mit gleicher spezifischer Aktivität von Dopamin und DOPA eingesetzt werden, was einen direkten Vergleich beider Komponenten möglich machte.

Im zweiten Versuchsblock (Kapitel 3.2.2) wurde die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA und [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin in NAT exprimierenden Kelly Zellen im Vergleich zu Zellen, die organische Kationentransporter zur Aufnahme der Katecholamine verwenden, gemessen.

### ***3.2.1 Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA und [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin in SK-N-SH und Kelly Zellen nach dessen Umwandlung aus [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA***

Um die später bei PET Untersuchungen von [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA zu [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA vorgesehene Umwandlung zu simulieren, wurde für die vorliegenden Aufnahmeversuche [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA enzymatisch zu [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin umgewandelt. Da, wie aus vorausgegangenen Analysen erarbeitet wurde, bei den gewählten Bedingungen die Umsetzung praktisch zu 100% gelingt (Z. Kuçi, unveröffentliche

Ergebnisse), kann auf diese Weise auch ein direkter Vergleich zur Aufnahme von unmarkiertem DOPA und Dopamin gezogen werden. Beide Substanzen verhalten sich gleich wie ihre entsprechenden fluoriierten Verbindungen. Abbildung 14 zeigt die Kinetik der Umwandlung von DOPA zu Dopamin im Vergleich zu 6-FDOPA zu 6-FDA.

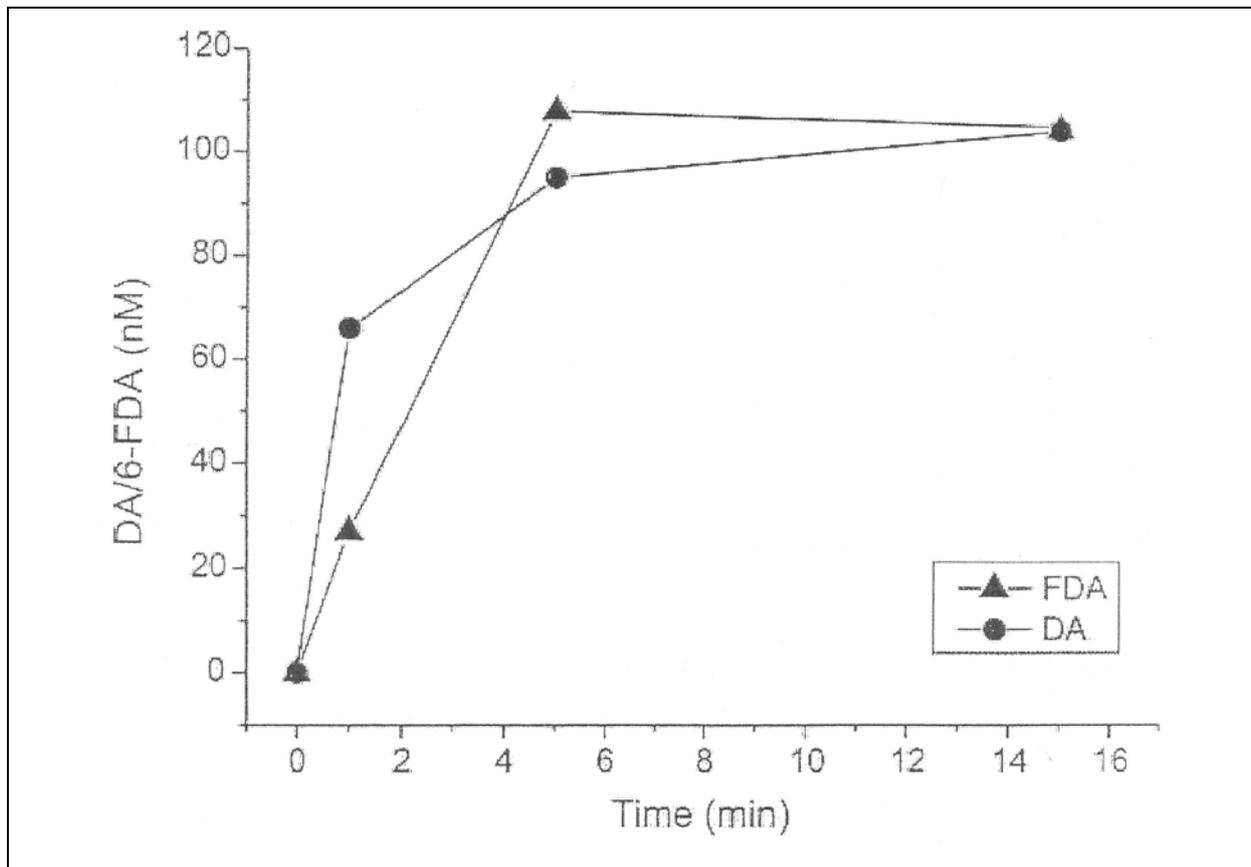


Abbildung 14: Kinetik der Umwandlung von DOPA zu Dopamin im Vergleich zu 6-FDOPA zu 6-FDA durch DOPA-Decarboxylase enthaltende Extrakte aus Kelly Zellen (aus Z. Kuçi et al., unveröffentlichte Ergebnisse)

### 3.2.1.1 Enzymatische Umwandlung von [<sup>14</sup>C]-DOPA zu [<sup>14</sup>C]-Dopamin

Bevor die Aufnahmeversuche mit [<sup>14</sup>C]-Dopamin bei den SK-N-SH und Kelly Zellen durchgeführt werden konnten, musste [<sup>14</sup>C]-Dopamin zuerst durch enzymatische Decarboxylierung hergestellt werden (durchgeführt von Frau Dr. Zyrafete Kuçi):

Dabei wurden 50 µl [<sup>14</sup>C]-DOPA (50 µCi / 1000 µl; 54 mCi / mMol) zu 1000 µl PBS<sup>++</sup> (+ 5,5 mM Glucose; + Ascorbat (f.c.: 100 µM)) gegeben. Daraus ergibt sich, dass in 1 ml PBS<sup>++</sup> ca. 0,046 µMole [<sup>14</sup>C]-DOPA gelöst sind, was einer [<sup>14</sup>C]-DOPA Lösung mit einer Konzentration von 46 µM entspricht.

Von diesen 1050 µl [<sup>14</sup>C]-DOPA Lösung wurden 150 µl entnommen. Diese 150 µl [<sup>14</sup>C]-DOPA Lösung wurde später für die Aufnahmeversuche mit [<sup>14</sup>C]-DOPA verwendet.

Zu den restlichen 900 µl [<sup>14</sup>C]-DOPA Lösung wurde dann 90 µl Kelly-Enzymlysate (aus ca.  $3 \times 10^6$  Zellen) + 5 µl Pyridoxal-Phosphat (f.c.: 1 µM) gegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert, anschließend auf 5000 D-Ultrafiltriersysteme (Millipore) verteilt und 10 + 5 min bei 10.000 rpm (mit einer Eppendorffzentrifuge;  $\approx 10.000 \times g$ ) ultrafiltriert. Dieses Ultrafiltrat enthält das praktisch zu 100 % umgesetzte [<sup>14</sup>C]-Dopamin aus [<sup>14</sup>C]-DOPA und weist daher ebenfalls eine Konzentration von ca. 46 µM auf.

### 3.2.1.2 Vergleich der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA mit [<sup>14</sup>C]-Dopamin

Das neu synthetisierte [<sup>14</sup>C]-Dopamin wurde bei 3 Versuchsreihen mit SK-N-SH Zellen und bei einer mit Kelly Zellen eingesetzt. Dabei wurden jeweils Doppelmessungen sowohl für den alleinigen Einsatz des Ultrafiltrates als auch für die Messungen der [<sup>14</sup>C]-Dopaminaufnahme mit potentiellen Inhibitoren durchgeführt.

Folgendes Pipettierschema wurde für die 5 Versuchsansätze verwendet:

- |     |  |                    |
|-----|--|--------------------|
| 1.: | 10 µl Ultrafiltrat (ca. 46 µM [ <sup>14</sup> C]-Dopamin) in 500 µl Zellsuspension,<br>+ 10 µl PBS                 | → f.c.: ca. 1 µM   |
| 2.: | + 10 µl 6-FDOPA  | → f.c.: ca. 100 µM |
| 3.: | + 10 µl 6-FDA  | → f.c.: ca. 100 µM |
| 4.: | + 10 µl Desipramin   | → f.c.: ca. 10 µM  |
| 5.: | 10 µl [ <sup>14</sup> C]-DOPA vor der enzymatischen Umsetzung (ca. 46 µM) in 500 µl Zellsuspension,<br>+ 10 µl PBS | → f.c.: ca. 1 µM   |

Als Referenzgröße wurden jeweils 100%-Werte (≈ 10 µl Ultrafiltrat [<sup>14</sup>C]-Dopamin bzw. 10 µl [<sup>14</sup>C]-DOPA Lösung) verwendet und diese als Dreiermessung durchgeführt. Für die ersten Versuche ergaben sich folgende 100%-Werte:

|                                       |  |       |
|---------------------------------------|--|-------|
| 100%-Wert [ <sup>14</sup> C]-DOPA:    | <b>40.310 cpm</b> ± 3441 (≈ 460 pMole) | n = 3 |
| 100%-Wert [ <sup>14</sup> C]-Dopamin: | <b>36.454 cpm</b> ± 5100 (≈ 460 pMole) | n = 2 |

Ansätze mit ca.  $2 \times 10^6$  SK-N-SH Zellen wurden 15 min mit den radioaktiven Substanzen [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin ([ $^{14}\text{C}$ ]-DA) bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA inkubiert. Die Werte der Messungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf  $1 \times 10^6$  Zellen umgerechnet. Bei der Inkubation mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin wurden zusätzlich die potentiellen Inhibitoren 6-FDOPA, 6-FDA und das Trizyklikum Desipramin mit in die Suspension pipettiert. Nach 15 minütiger Inkubation zeigten sich folgende Ergebnisse:

*Tabelle 14a: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin ([ $^{14}\text{C}$ ]-DA) in SK-N-SH Zellen mit und ohne Inhibitoren und Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA nach 15 minütiger Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen*

|  | <b>Aufnahme<br/>pMole / 15 min /<br/><math>10^6</math> Zellen</b> | <b>% des<br/>100%-Wertes<br/>(<math>\approx 460</math> pMole)</b> | <b>% durch Inhibition</b>           |
|--|---|---|-------------------------------------|
| <b>[<math>^{14}\text{C}</math>]-DA</b>   | <b>16,0 <math>\pm</math> 2,1 (n = 3)</b>                          | 3,5 %   | <b>100 %</b>                        |
| <b>+ 6-FDOPA</b>                         | <b>13,1 <math>\pm</math> 1,0 (n = 3)</b>                          | 2,8 %   | <b>81,8 % <math>\pm</math> 13,3</b> |
| <b>+ 6-FDA</b>                           | <b>8,7 <math>\pm</math> 0,3 (n = 3)</b>                           | 1,9 %   | <b>54,1 % <math>\pm</math> 7,3</b>  |
| <b>+ Desipramin</b>                      | <b>2,3 <math>\pm</math> 0,2 (n = 3)</b>                           | 0,5 %   | <b>14,3 % <math>\pm</math> 0,6</b>  |
| <b>[<math>^{14}\text{C}</math>]-DOPA</b> | <b>18,8 <math>\pm</math> 2,2 (n = 3)</b>                          | 4,1 %   |                                     |

*Legende: Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition durch die Substanzen 6-FDOPA (f.c.:  $100 \mu\text{M}$ ), 6-FDA (f.c.:  $100 \mu\text{M}$ ) u. Desipramin (f.c.:  $10 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DA.*

*n = Stichprobenumfang; pMole =  $1 \times 10^{-12}$  Mole*

Eine Überprüfung auf statistische Signifikanz ( $\alpha = 5\%$ ; zweiseitige Testung) ergab eine bedeutsame Hemmung der Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DA durch die Substanzen 6-FDA ( $t(2) = 6,083$ ;  $p = 0,026$ ) und Desipramin ( $t(2) = 12,605$ ;  $p = 0,006$ ). Bei gleichzeitiger Zugabe von 6-FDOPA kam es erwartungsgemäß zu keiner signifikanten Hemmung ( $t(2) = 2,202$ ;  $p = 0,159$ ).

Nach demselben Schema wurden auch mit Kelly Zellen die Aufnahme von radioaktiv markiertem DOPA und Dopamin nach 15 minütiger Inkubation bestimmt. Im Unterschied zu der Versuchsreihe mit der SK-N-SH Zelllinie war der Stichprobenumfang bei den Doppelmessungen  $n = 1$ :

*Tabelle 14b: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Dopamin ([<sup>14</sup>C]-DA) in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren und Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA nach 15 minütiger Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen*

|                              | <b>Aufnahme<br/>pMole / 15 min /<br/>10<sup>6</sup> Zellen</b> | <b>% des<br/>100%-Wertes<br/>(<math>\approx 460</math> pMole)</b> | <b>% durch Inhibition</b> |
|------------------------------|--|---|---------------------------|
| <b>[<sup>14</sup>C]-DA</b>   | <b>7,6</b> (n = 1)   | 1,7 %   | <b>100 %</b>              |
| <b>+ 6-FDOPA</b>             | <b>7,8</b> (n = 1)   | 1,7 %   | <b>102,4 %</b>            |
| <b>+ 6-FDA</b>               | <b>6,6</b> (n = 1)   | 1,4 %   | <b>86,7 %</b>             |
| <b>+ Desipramin</b>          | <b>4,2</b> (n = 1)   | 0,9 %   | <b>55,2 %</b>             |
| <b>[<sup>14</sup>C]-DOPA</b> | <b>38,5</b> (n = 1)  | 8,4 %   |                           |

*Legende: Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition durch die Substanzen 6-FDOPA (f.c.: 100  $\mu$ M), 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M) u. Desipramin (f.c.: 10  $\mu$ M) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DA. n = Stichprobenumfang*

Die in den Tabellen 14a und 14b dargelegten Daten sind in Abbildung 15, 16a und 16b auch graphisch dargestellt und werden näher erläutert. Dabei wird zuerst die Aufnahme der beiden Substanzen [<sup>14</sup>C]-DOPA und [<sup>14</sup>C]-Dopamin in die SK-N-SH Zellen und in die Kelly Zellen miteinander verglichen (Abbildung 15). Im darauffolgenden Abschnitt wird auf die Aufnahmemehmung von [<sup>14</sup>C]-Dopamin durch die Substanzen 6-FDOPA, 6-FDA und Desipramin bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien dargestellt.

## Vergleich der Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA und [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin in SK-N-SH und Kelly Zellen

In der Abbildung 15 wird die ungehemmte Aufnahme der beiden potentiellen Radiopharmakon-Analoga in die Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly gegenüber gestellt.

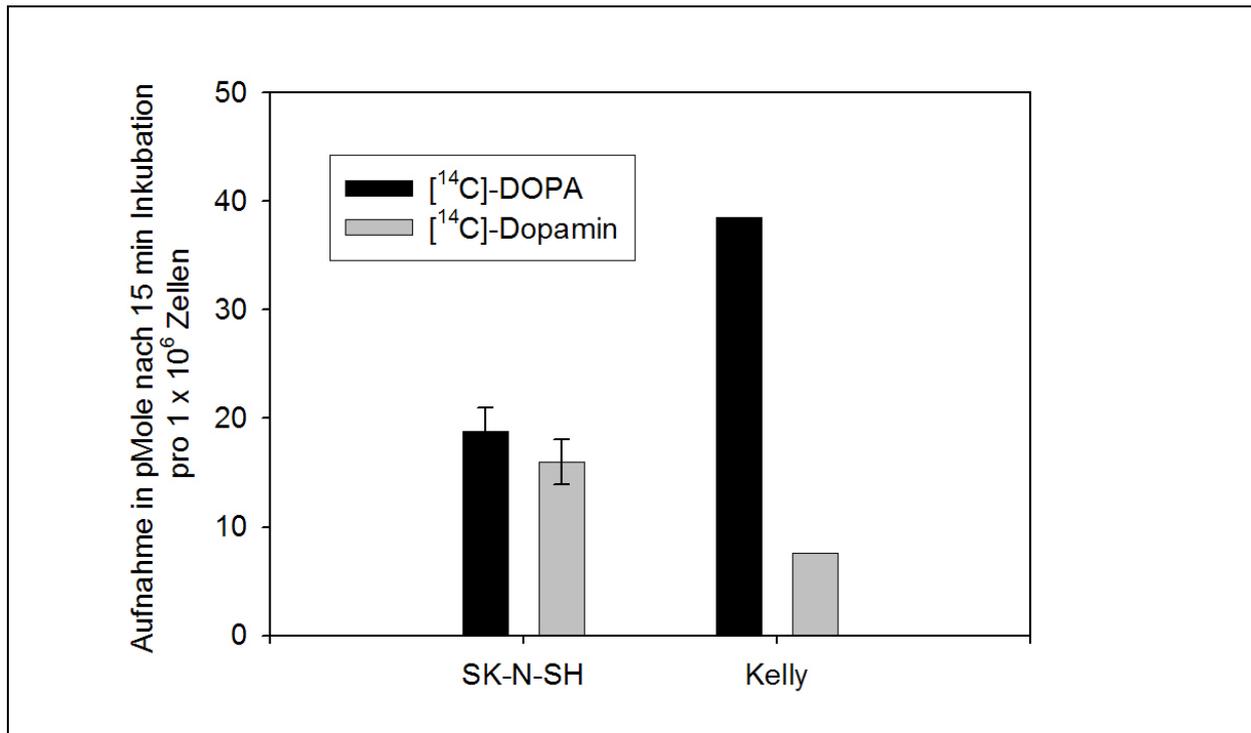


Abbildung 15: Aufnahme der beiden Substanzen [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (f.c.: 1  $\mu\text{M}$ ) und [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin (f.c.: 1  $\mu\text{M}$ ) in SK-N-SH ( $n = 3$ ) und Kelly ( $n = 1$ ) Zellen. Angaben in Mittelwert mit Standardabweichung in pMole nach 15 min Inkubation bei 37°C pro  $1 \times 10^6$  Zellen

In Abbildung 15 erkennt man deutlich,

- dass [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin in SK-N-SH Zellen besser als in Kelly Zellen eingebaut wird,
- dass bei den SK-N-SH Zellen [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin und [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (f.c.: je 1  $\mu\text{M}$ ) in etwa gleichem Ausmaß eingebaut wird und
- dass in Kelly Zellen deutlich mehr [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA als [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin (f.c.: je 1  $\mu\text{M}$ ) eingebaut wird (etwa 4 mal so viel).

## Hemmung der Aufnahme des enzymatisch aus [ $^{14}$ C]-DOPA gebildeten [ $^{14}$ C]-Dopamins

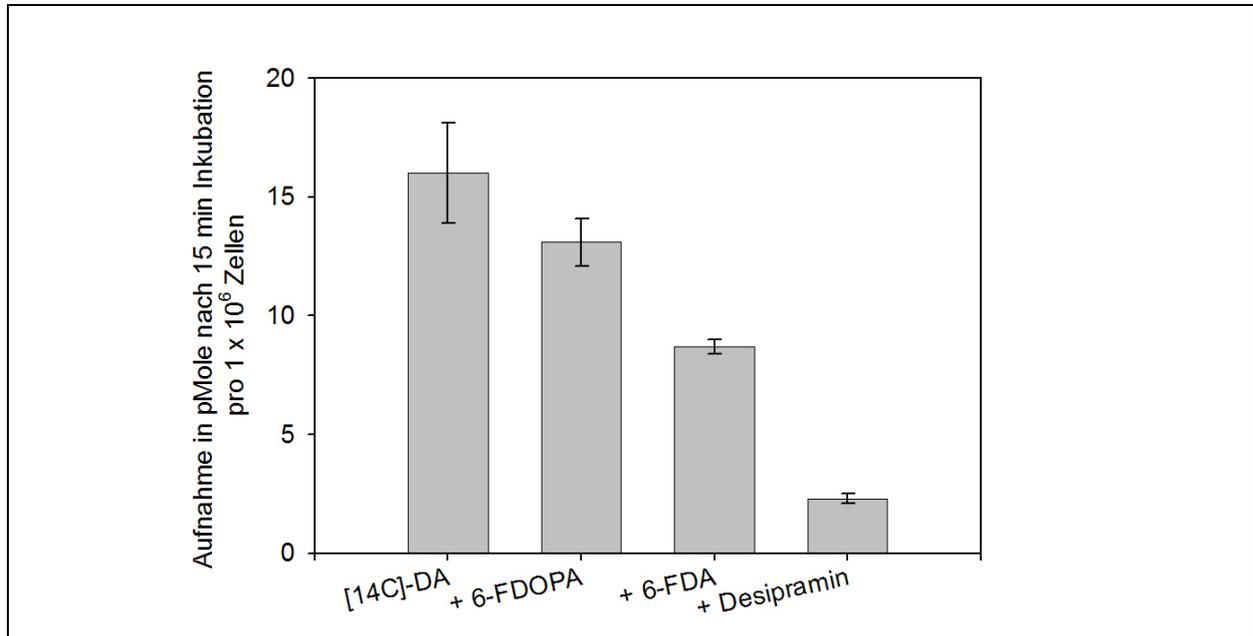


Abbildung 16a: Aufnahme von [ $^{14}$ C]-Dopamin ([ $^{14}$ C]-DA) (f.c.:  $1 \mu\text{M}$ ) in SK-N-SH Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Verwendete Konzentrationen: 6-FDOPA:  $100 \mu\text{M}$ ; 6-FDA:  $100 \mu\text{M}$ ; Desipramin:  $10 \mu\text{M}$

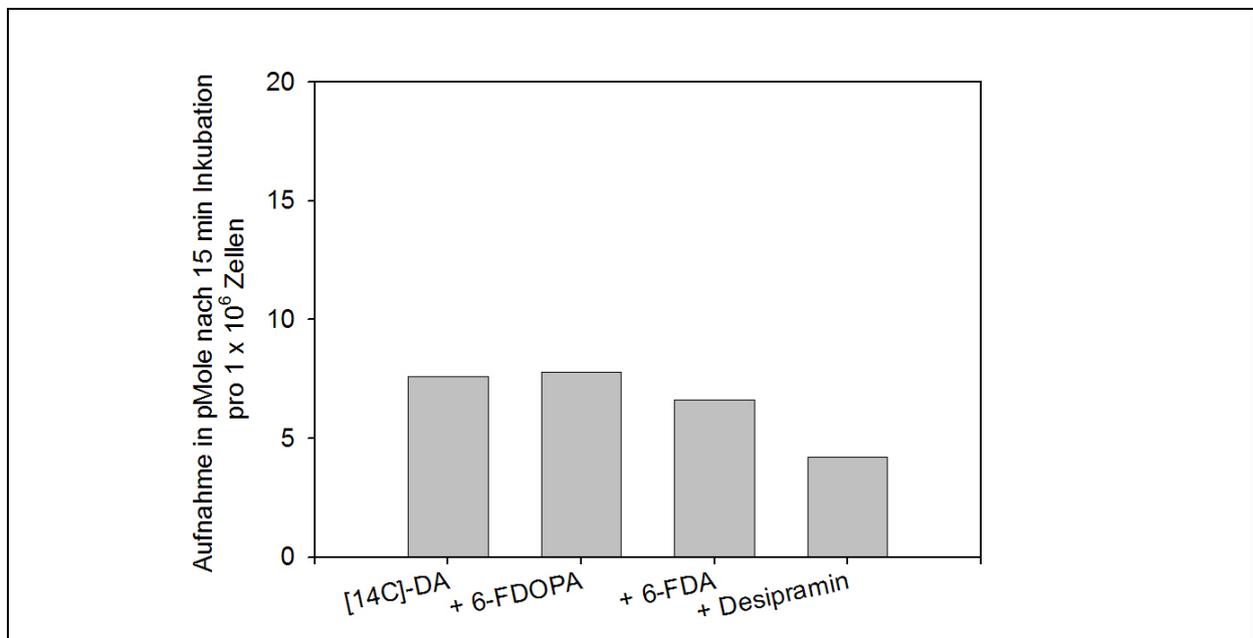


Abbildung 16b: Aufnahme von [ $^{14}$ C]-Dopamin ([ $^{14}$ C]-DA) (f.c.:  $1 \mu\text{M}$ ) in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen ( $n = 1$ ). Verwendete Konzentrationen: 6-FDOPA:  $100 \mu\text{M}$ ; 6-FDA:  $100 \mu\text{M}$ ; Desipramin:  $10 \mu\text{M}$

Man erkennt bei den SK-N-SH Zellen (Abbildung 16a):

- a) eine deutliche Hemmung durch Desipramin (durch die Hemmung des Noradrenalintransporters)
- b) eine kompetitive Hemmung durch 6-FDA (in 100-facher Konzentration)
- c) eine leichte Hemmung durch 6-FDOPA (evtl. durch intrazelluläre Umsetzung zu 6-FDA und potentieller Freisetzung)

Bei den Kelly Zellen (Abbildung 16b) sieht man im Prinzip den gleichen Effekt. Dieser ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei den SK-N-SH Zellen.

### Hemmung der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA

In einem weiteren Ansatz wurde die mögliche Hemmung der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA (f.c.: 1 µM) durch 6-FDA, Tyrosin und Desipramin an SK-N-SH Zellen gemessen.

Folgendes Pipettierschema wurde für die 4 Versuchsansätze verwendet:

|     |  |                    |
|-----|--|--------------------|
| 1.: | [ <sup>14</sup> C]-DOPA (ca. 46 µM) in 500 µl Zellsuspension,<br>+ 10 µl PBS | → f.c.: ca. 1 µM   |
| 2.: | + 10 µl 6-FDA  | → f.c.: ca. 100 µM |
| 3.: | + 10 µl Tyrosin  | → f.c.: ca. 100 µM |
| 4.: | + 10 µl Desipramin   | → f.c.: ca. 10 µM  |

Die Werte der [<sup>14</sup>C]-DOPA Aufnahme in SK-N-SH Zellen ohne und mit potentieller Inhibitoren werden in Tabelle 15 angegeben und in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

Tabelle 15: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA in SK-N-SH Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen

|                          | Aufnahme<br>pMole / 15 min /<br>$10^6$ Zellen | % des<br>100%-Wertes<br>( $\approx 460$ pMole) | % durch Inhibition |
|--------------------------|---|--|--------------------|
| [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA | 24,3 $\pm$ 1,4 (n = 3)                        | 5,2 %  | 100 %              |
| + 6-FDA                  | 33,1 $\pm$ 1,8 (n = 3)                        | 7,2 %  | 136,6 % $\pm$ 13,8 |
| + Tyrosin                | 29,5 $\pm$ 10,5 (n = 3)                       | 6,4 %  | 121,6 % $\pm$ 47,1 |
| + Desipramin             | 22,2 $\pm$ 2,3 (n = 3)                        | 4,8 %  | 91,6 % $\pm$ 15,2  |

Legende: Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition durch die Substanzen 6-FDA (f.c.: 100  $\mu\text{M}$ ), Tyrosin (f.c.: 100  $\mu\text{M}$ ) und Desipramin (f.c.: 10  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA. n = Stichprobenumfang

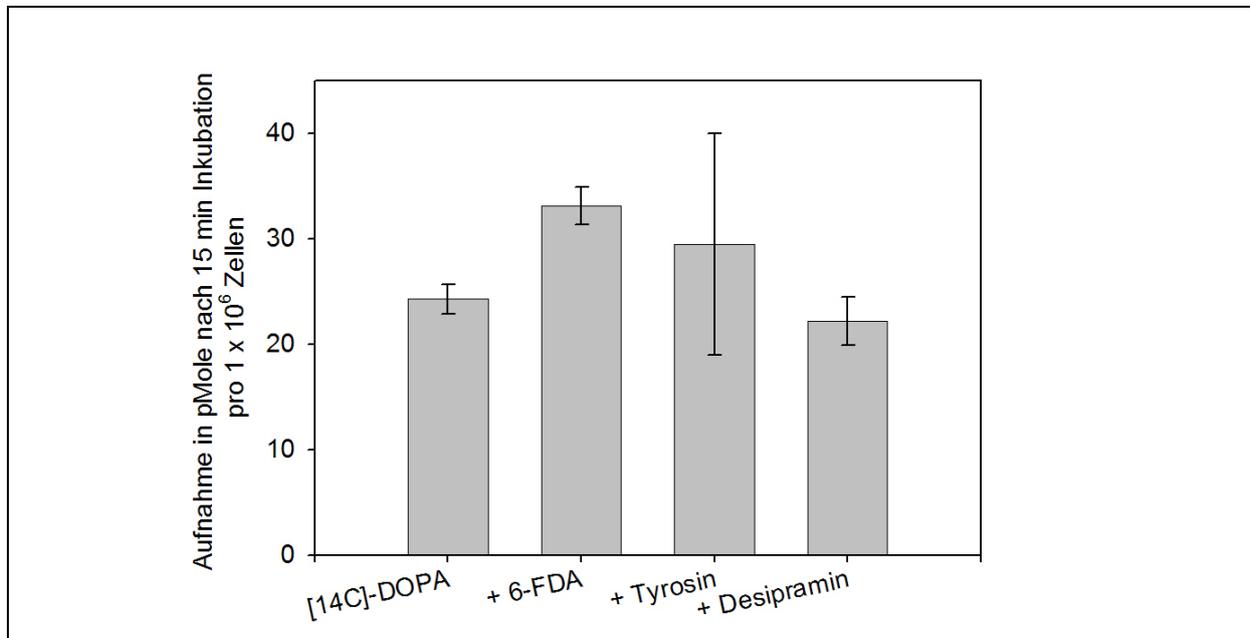


Abbildung 17: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (f.c.: 1  $\mu\text{M}$ ) in SK-N-SH in Abwesenheit und Gegenwart von 6-FDA (f.c.: 100  $\mu\text{M}$ ), Tyrosin (f.c.: 100  $\mu\text{M}$ ) und Desipramin (f.c.: 10  $\mu\text{M}$ ). Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (n = 3)

Abbildung 17 zeigt,

- dass Desipramin die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA nicht hemmt und
- dass 6-FDA den Einbau sogar leicht steigert.
- Aufgrund der hohen Standardabweichung ist eine Beurteilung des Tyrosineffektes nur schwer möglich.

### 3.2.2 Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA und [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen im Vergleich zu Kelly Zellen

Im Unterschied zu Kapitel 3.2.1, in dem [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin aus [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA synthetisiert wurde, wurde in diesem Versuchsblock kommerziell erhältliches [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin (f.c.: 1  $\mu\text{M}$ ) und [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (f.c.: 1  $\mu\text{M}$ ) verwendet.

Die zelluläre Aufnahme dieser Substanzen wurde mit OCT1-HEK 293 Zellen im Vergleich zu Kelly Zellen durchgeführt. Die Aufnahmen von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA und [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin wurden ohne und mit den potentiellen Inhibitoren 6-FDA, Tyrosin und Desipramin durchgeführt. Diese Ansätze wurden ebenfalls 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Folgendes Pipettierschema wurde dabei verwendet:

|     |   |                               |
|-----|---|-------------------------------|
| 1.: | [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (ca. 46 $\mu\text{M}$ ) in 500 $\mu\text{l}$ Zellsuspension,<br>+ 10 $\mu\text{l}$ PBS | → f.c.: ca. 1 $\mu\text{M}$   |
|     | <b>oder</b>   |                               |
|     | [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin (ca. 51 $\mu\text{M}$ ) in 500 $\mu\text{l}$ Zellsuspension,<br>+ 10 $\mu\text{l}$ PBS | → f.c.: ca. 1 $\mu\text{M}$   |
| 2.: | + 10 $\mu\text{l}$ 6-FDA  | → f.c.: ca. 100 $\mu\text{M}$ |
| 3.: | + 10 $\mu\text{l}$ Tyrosin  | → f.c.: ca. 100 $\mu\text{M}$ |
| 4.: | + 10 $\mu\text{l}$ Desipramin   | → f.c.: ca. 10 $\mu\text{M}$  |

### 3.2.2.1 Einbau von [<sup>14</sup>C]-DOPA in OCT1-HEK 293 Zellen im Vergleich zu Kelly Zellen

Für die Versuche mit [<sup>14</sup>C]-DOPA wurde als 100 %-Wert aus drei Doppelmessungen eine Aktivität von 44.479 cpm ± 548 (≈ 460 pMole), n = 3 bestimmt:

Die folgenden zwei Tabellen 16a und 16b zeigen die Messergebnisse der Aufnahme nach 15 minütiger Inkubation pro eine Million Zellen. Zwei Doppelmessungen wurden für die Zelllinie Kelly, eine für die Zelllinie OCT1-HEK 293 durchgeführt.

Tabelle 16a: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen

|                              | <b>Aufnahme<br/>pMole / 15 min /<br/>10<sup>6</sup> Zellen</b> | <b>% des<br/>100%-Wertes<br/>(≈ 460 pMole)</b> | <b>% durch Inhibition</b> |
|------------------------------|--|--|---------------------------|
| <b>[<sup>14</sup>C]-DOPA</b> | <b>22,1 ± 0,9 (n = 2)</b>                                      | 4,8 %  | <b>100 %</b>              |
| <b>+ 6-FDA</b>               | <b>26,6 ± 0,9 (n = 2)</b>                                      | 5,8 %  | <b>120,5 % ± 0,9</b>      |
| <b>+ Tyrosin</b>             | <b>19,2 ± 0,7 (n = 2)</b>                                      | 4,2 %  | <b>86,8 % ± 6,9</b>       |
| <b>+ Desipramin</b>          | <b>22,9 ± 0,6 (n = 2)</b>                                      | 5,0 %  | <b>103,5 % ± 7,1</b>      |

Legende: Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition durch die Substanzen 6-FDA (f.c.: 100 µM), Tyrosin (f.c.: 100 µM) und Desipramin (f.c.: 10 µM) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA. n = Stichprobenumfang

Tabelle 16b: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen

|                              | <b>Aufnahme<br/>pMole / 15 min /<br/>10<sup>6</sup> Zellen</b> | <b>% des<br/>100%-Wertes<br/>(≈ 460 pMole)</b> | <b>% durch Inhibition</b> |
|------------------------------|--|--|---------------------------|
| <b>[<sup>14</sup>C]-DOPA</b> | <b>46,8</b> (n = 1)  | 10,2 %   | <b>100 %</b>              |
| <b>+ 6-FDA</b>               | <b>36,2</b> (n = 1)  | 7,9 %  | <b>77,3 %</b>             |
| <b>+ Tyrosin</b>             | <b>34,8</b> (n = 1)  | 7,6 %  | <b>74,5 %</b>             |
| <b>+ Desipramin</b>          | <b>51,3</b> (n = 1)  | 11,2 %   | <b>109,7 %</b>            |

Legende: Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition durch die Substanzen 6-FDA (f.c.: 100 µM), Tyrosin (f.c.: 100 µM) und Desipramin (f.c.: 10 µM) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA. n = Stichprobenumfang

### 3.2.2.2 Einbau von [<sup>3</sup>H]-Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen im Vergleich zu Kelly Zellen

Wie für [<sup>14</sup>C]-DOPA wurden auch für [<sup>3</sup>H]-Dopamin die Aufnahme und die mögliche Hemmung in einem weiteren Versuchsblock mit der Zelllinie OCT1-HEK 293 im Vergleich zu Kelly Zellen untersucht. Nach dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Pipettierschema wurden die Ansätze für die Versuche vorbereitet.

|                                      |   |       |
|--------------------------------------|---|-------|
| 100%-Wert [ <sup>3</sup> H]-Dopamin: | <b>131.910 cpm ± 7815 (≈ 510 pMole)</b> | n = 3 |
|--------------------------------------|---|-------|

Die angeführten Tabellen 17a und 17b beinhalten die Messwerte aus den Aufnahmeversuchen von [<sup>14</sup>C]-Dopamin in die Kelly und in die OCT1-HEK 293 Zellen. Auch hier wurden als potentielle Inhibitoren wieder das Dopamin-Analogon 6-FDA, die Aminosäure Tyrosin und das Trizyklikum Desipramin eingesetzt.

Tabelle 17a: Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen

|                                | <b>Aufnahme<br/>pMole / 15 min /<br/>10<sup>6</sup> Zellen</b> | <b>% des<br/>100%-Wertes<br/>(≈ 510 pMole)</b> | <b>% durch Inhibition</b> |
|--------------------------------|--|--|---------------------------|
| <b>[<sup>3</sup>H]-Dopamin</b> | <b>2,6 ± 0,2 (n = 2)</b>                                       | <b>0,5 %</b>                                   | <b>100 %</b>              |
| <b>+ 6-FDA</b>                 | <b>1,0 ± 0,1 (n = 2)</b>                                       | <b>0,2 %</b>                                   | <b>40,7 % ± 1,1</b>       |
| <b>+ Tyrosin</b>               | <b>2,6 ± 0,1 (n = 2)</b>                                       | <b>0,5 %</b>                                   | <b>102,5 % ± 9,8</b>      |
| <b>+ Desipramin</b>            | <b>0,9 ± 0,1 (n = 2)</b>                                       | <b>0,2 %</b>                                   | <b>33,9 % ± 4,5</b>       |

Legende: Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition durch die Substanzen 6-FDA (f.c.: 100 µM), Tyrosin (f.c.: 100 µM) und Desipramin (f.c.: 10 µM) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin. n = Stichprobenumfang

Eine statistisch relevante Hemmung zeigt sich für die Substanzen 6-FDA ( $t(1) = 27,545$ ;  $p = 0,012$ ; einseitig getestet) und Desipramin ( $t(1) = 10,563$ ;  $p = 0,030$ ; einseitig). Durch die Aminosäure Tyrosin kam es zu keiner signifikanten Hemmung ( $t(1) = -0,412$ ;  $p = 0,751$ ; zweiseitig getestet).

Tabelle 17b: Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen

|                                | <b>Aufnahme<br/>pMole / 15 min /<br/>10<sup>6</sup> Zellen</b> | <b>% des<br/>100%-Wertes<br/>(≈ 510 pMole)</b> | <b>% durch Inhibition</b> |
|--------------------------------|--|--|---------------------------|
| <b>[<sup>3</sup>H]-Dopamin</b> | <b>7,1 (n = 1)</b>   | <b>1,4 %</b>                                   | <b>100 %</b>              |
| <b>+ 6-FDA</b>                 | <b>3,6 (n = 1)</b>   | <b>0,7 %</b>                                   | <b>51,6 %</b>             |
| <b>+ Tyrosin</b>               | <b>5,7 (n = 1)</b>   | <b>1,1 %</b>                                   | <b>81,0 %</b>             |
| <b>+ Desipramin</b>            | <b>4,6 (n = 1)</b>   | <b>0,9 %</b>                                   | <b>65,1 %</b>             |

Legende: Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition durch die Substanzen 6-FDA (f.c.: 100 µM), Tyrosin (f.c.: 100 µM) und Desipramin (f.c.: 10 µM) im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin. n = Stichprobenumfang

### **3.2.2.3 Zusammenfassende Beurteilung der Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2**

Die Abbildungen 18a und 18b zeigen graphisch in Balkendiagrammen die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA in eine Million Kelly und eine Million OCT1-HEK 293 Zellen ohne und mit Inhibition durch 6-FDA, Tyrosin und Desipramin. In den Abbildungen 19a und 19b werden bei denselben Zelllinien die Aufnahmeeigenschaft und die mögliche Hemmung der Transportsysteme für das Substrat [<sup>3</sup>H]-Dopamin im gleichen Maßstab wie für die DOPA-Aufnahme vergleichend dargestellt.

In den Abbildungen 18a und 18b erkennt man, dass [<sup>14</sup>C]-DOPA von beiden Zelllinien in hohen Konzentrationen aufgenommen wird (OCT1-HEK 293 > Kelly). Eine mäßige Hemmung findet sich lediglich bei gleichzeitiger Zugabe der Aminosäure Tyrosin, die ebenfalls über die LAT in die Zellen gelangt und die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA kompetitiv hemmt.

[<sup>3</sup>H]-Dopamin gelangt bei den Neuroblastomzellen über die NAT - in geringen Mengen eventuell auch über die DAT - in die Zellen. Bei den OCT1-HEK 293 findet dieser Transport über die organischen Kationentransporter statt. Bei beiden Zelllinien ist die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin wesentlich geringer als die von [<sup>14</sup>C]-DOPA. Die von den OCT1-HEK 293 aufgenommenen Konzentrationen sind höher als die der Neuroblastomzelle Kelly. Bei beiden Zelllinien sorgt 6-FDA für eine kompetitive Hemmung der Aufnahme. Da Desipramin spezifisch die NAT hemmt zeigt sich auch nur bei Kelly Zellen eine Hemmung, bei den OCT1-HEK 293 zeigt die Zugabe dieses Trizyklikums keinen (bzw. einen sehr geringen) Hemmeffekt.

Wie schon in Abbildung 15 gezeigt ist bei den Kelly Zellen die Aufnahmekapazität für DOPA-Analoga etwa viermal höher als für Katecholamin-Analoga. Hätte man anstatt der Kelly Zelllinie an dieser Stelle die SK-N-SH Zelllinie verwendet, wären die Aufnahmeunterschiede sicherlich geringer gewesen. Grund hierfür sind die unterschiedlichen Konzentrationen der Transportsysteme bei den beiden Zelllinien.

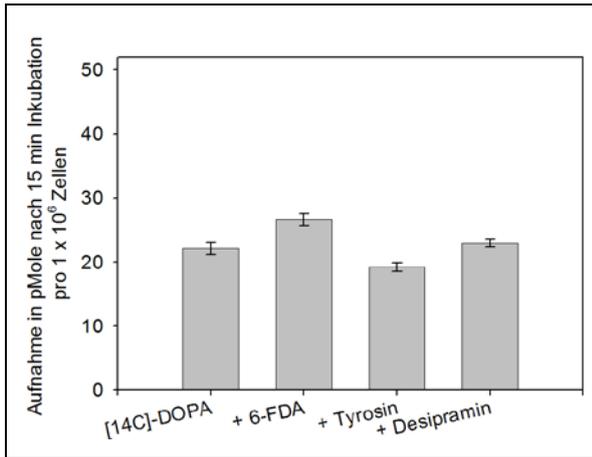


Abb. 18a: Mittelwert mit Standardabweichung der Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ -DOPA in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen.  $n = 2$

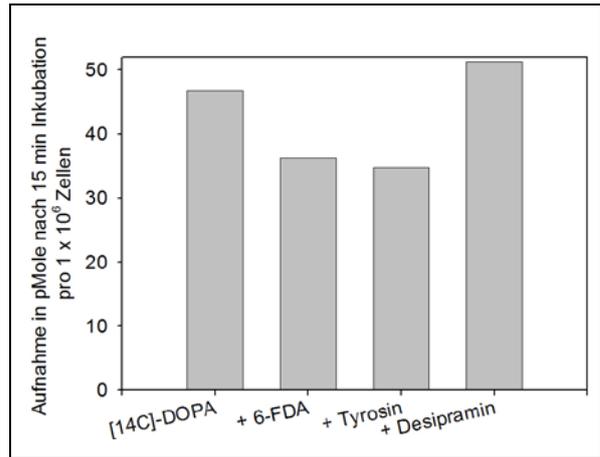


Abb. 18b: Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ -DOPA in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen.  $n = 1$

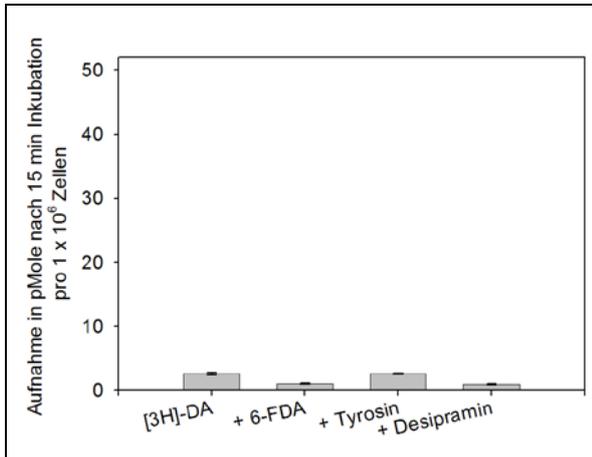


Abb. 19a: Mittelwert mit Standardabweichung der Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Dopamin in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen.  $n = 2$

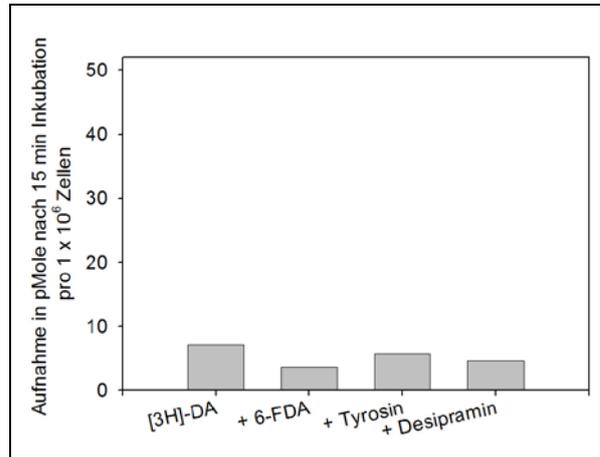


Abb. 19b: Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen.  $n = 1$

### **3.2.3 Einfluss von Desipramin auf die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA und [<sup>3</sup>H]-Dopamin in SK-N-SH Zellen und Zellen mit organischen Kationentransportern (OCT Zellen)**

Das Trizyklikum Desipramin hemmt wie in Kapitel 1.2.4.2.2 (Seite 28 f) beschrieben den Noradrenalintransporter (NAT) (Torres et al., 2003). In dieser Versuchsreihe wurde die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA und [<sup>3</sup>H]-Dopamin in die Neuroblastomzellen SK-N-SH, welche mehr NATs besitzen als Kelly Zellen, und in Zellen mit organischen Kationentransportern gemessen. Diese Versuche wurden in Abwesenheit und Gegenwart von Desipramin durchgeführt. Als Zellen mit organischen Kationentransportern wurden die Zelllinien Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 eingesetzt.

Um die Aufnahme der Substanzen pro  $1 \times 10^6$  Zellen miteinander vergleichen zu können, wurde auch hier wieder für [<sup>14</sup>C]-DOPA und [<sup>3</sup>H]-Dopamin in Dreifachmessung jeweils ein 100%-Wert bestimmt:

|                                    |  |       |
|------------------------------------|--|-------|
| 100%-Wert [ <sup>14</sup> C]-DOPA: | <b>92.129 cpm</b> ± 5436 (≈ 460 pMole) | n = 3 |
|------------------------------------|--|-------|

|                                      |   |       |
|--------------------------------------|---|-------|
| 100%-Wert [ <sup>3</sup> H]-Dopamin: | <b>497.231 cpm</b> ± 3821 (≈ 510 pMole) | n = 3 |
|--------------------------------------|---|-------|

Die Messungen wurden bei dieser Versuchsreihe ebenfalls nach 15 minütiger Inkubation durchgeführt und die Auswertung der Messungen in pMole Substrat pro  $1 \times 10^6$  Zellen angegeben und so die Hemmung in % miteinander verglichen.

Tabelle 18a: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (f.c.: 1  $\mu\text{M}$ ) nach 15 min Inkubation pro  $1 \times 10^6$  SK-N-SH Zellen und OCT-exprimierenden Zellen und dessen potentielle Hemmung durch Desipramin

|                                    | <b>Aufnahme</b><br><b>pMole / 15 min / <math>10^6</math> Zellen</b> | <b>% des</b><br><b>100%-Wertes</b><br>( $\approx 460$ pMole) | <b>% durch</b><br><b>Inhibition</b> |
|------------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| <b>SK-N-SH</b><br>(Kontrolle)      | <b>15,7</b><br>n = 1 (Dreifachmessung)                              | 3,4 %  |                                     |
| + Desipramin                       | 11,7<br>n = 1 (Dreifachmessung)                                     | 2,5 %  | <b>74,2 %</b>                       |
| <b>Caki-1</b> (Kontrolle)          | <b>55,5</b><br>n = 1 (Sechsfachmessung)                             | 12,1 %   |                                     |
| + Desipramin                       | 56,0<br>n = 1 (Dreifachmessung)                                     | 12,2 %   | <b>101,0 %</b>                      |
| <b>EMT-HEK 293</b><br>(Kontrolle)  | <b>13,1</b><br>n = 1 (Sechsfachmessung)                             | 2,9 %  |                                     |
| + Desipramin                       | 14,2<br>n = 1 (Sechsfachmessung)                                    | 3,1 %  | <b>108,1 %</b>                      |
| <b>OCT1-HEK 293</b><br>(Kontrolle) | <b>11,4</b><br>n = 1 (Dreifachmessung)                              | 2,5 %  |                                     |
| + Desipramin                       | 10,1<br>n = 1 (Vierfachmessung)                                     | 2,2 %  | <b>89,3 %</b>                       |
| <b>OCT2-HEK 293</b><br>(Kontrolle) | <b>9,1</b><br>n = 1 (Vierfachmessung)                               | 2,0 %  |                                     |
| + Desipramin                       | 9,6<br>n = 1 (Zweifachmessung)                                      | 2,1 %  | <b>106,0 %</b>                      |

Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA. Desipramin f.c.: 10  $\mu\text{M}$

Tabelle 18b: Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin (f.c.: 1 μM) nach 15 min Inkubation pro 1 x 10<sup>6</sup> SK-N-SH Zellen und OCT-exprimierenden Zellen und dessen potentielle Hemmung durch Desipramin

|                                    | <b>Aufnahme</b><br><b>pMole / 15 min / 10<sup>6</sup> Zellen</b> | <b>% des</b><br><b>100%-Wertes</b><br>(≈ 510 pMole) | <b>% durch</b><br><b>Inhibition</b> |
|------------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| <b>SK-N-SH</b><br>(Kontrolle)      | <b>9,1</b><br>n = 1 (Dreifachmessung)                            | 9,6 %   |                                     |
| + Desipramin                       | 0,6<br>n = 1 (Dreifachmessung)                                   | 0,7 %   | <b>7,0 %</b>                        |
| <b>Caki-1</b><br>(Kontrolle)       | <b>2,1</b><br>n = 1 (Sechsfachmessung)                           | 2,3 %   |                                     |
| + Desipramin                       | 2,0<br>n = 1 (Sechsfachmessung)                                  | 2,1 %   | <b>94,1 %</b>                       |
| <b>EMT-HEK 293</b><br>(Kontrolle)  | <b>8,9</b><br>n = 1 (Sechsfachmessung)                           | 9,5 %   |                                     |
| + Desipramin                       | 8,2<br>n = 1 (Fünffachmessung)                                   | 8,7 %   | <b>91,7 %</b>                       |
| <b>OCT1-HEK 293</b><br>(Kontrolle) | <b>3,5</b><br>n = 1 (Vierfachmessung)                            | 3,7 %   |                                     |
| + Desipramin                       | 2,2<br>n = 1 (Vierfachmessung)                                   | 2,3 %   | <b>63,6 %</b>                       |
| <b>OCT2-HEK 293</b><br>(Kontrolle) | <b>9,1</b><br>n = 1 (Dreifachmessung)                            | 9,7 %   |                                     |
| + Desipramin                       | 2,9<br>n = 1 (Vierfachmessung)                                   | 3,1 %   | <b>31,8 %</b>                       |

Prozentangaben der aufgenommenen Menge im Vergleich zum 100%-Wert und Prozentangaben der Inhibition im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin. Desipramin f.c.: 10 μM

Die Versuche mit [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA ohne und mit Hemmung durch Desipramin ergaben folgende Resultate:

Die Messungen zeigten, dass die Caki-1 Zellen mehr [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA aufnehmen als die anderen Zelllinien, bei denen sich die Aufnahmen von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA zwischen 2,0 und 3,4 % im Vergleich zum 100%-Wert bewegte. Desipramin hemmte die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA im größeren Umfang von über 25 % lediglich bei den SK-N-SH Zellen. Bei den OCT1-HEK 293 hemmte Desipramin die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA um gut 10 %, bei allen anderen Zelllinien sorgte Desipramin für eine leicht gesteigerte Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA (siehe Tabelle 18a und Abbildung 20a).

In einem zweiten Versuchsblock zur potentiellen Hemmung von Desipramin wurde das Dopamin-Analogon [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten folgendes Bild:

Die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin lag bei den Zelllinien SK-N-SH, EMT-HEK 293 und OCT2-HEK 293 bei knapp 10 % des 100%-Wertes. Bei den Zelllinien Caki-1 und OCT1-HEK 293 lag diese Aufnahme jedoch deutlich niedriger. Die Zugabe von Desipramin hemmte bei allen fünf Zelllinien die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin. Während bei den Zelllinien Caki-1 und EMT-HEK 293 die Inhibition unter 10 % lag, sank die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin bei der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH gravierend auf lediglich 7 % (siehe Tabelle 18b und Abbildung 20b).

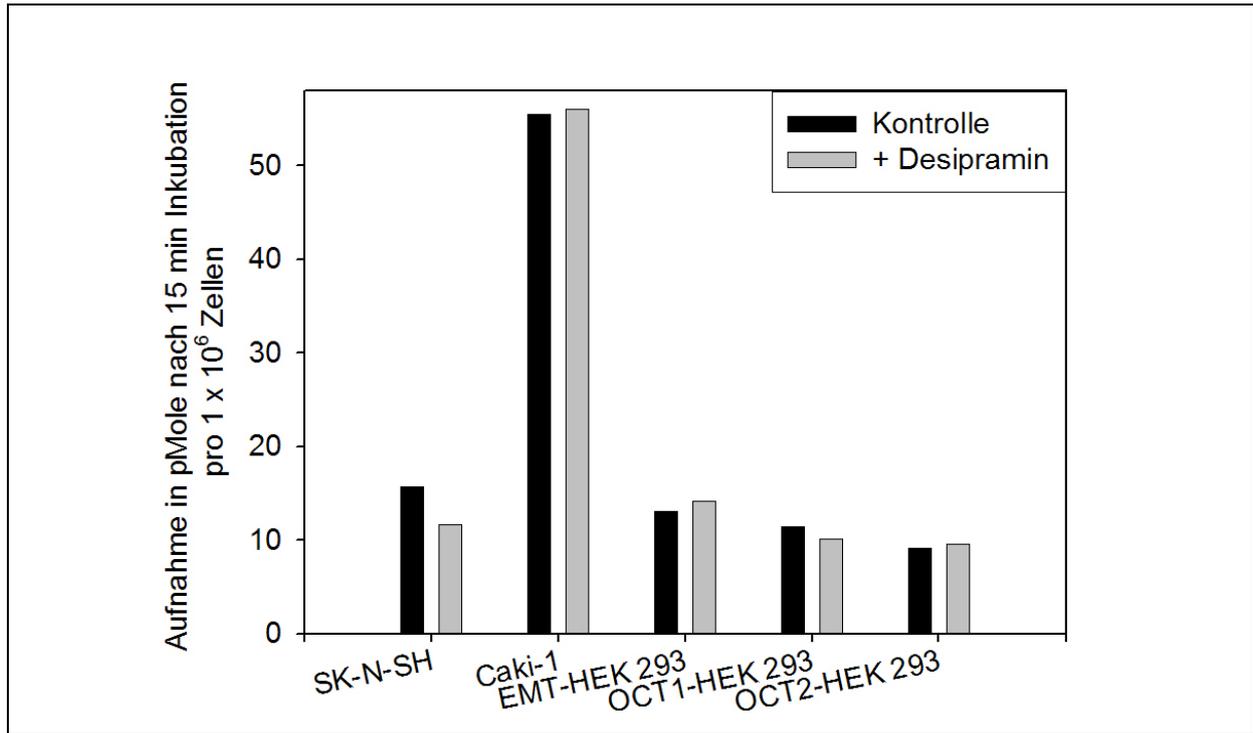


Abbildung 20a: Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]\text{-DOPA}$  (f.c.:  $1 \mu\text{M}$ ) ohne (Kontrolle) und in Gegenwart von Desipramin. Angaben nach 15 minütiger Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen. Desipramin f.c.:  $10 \mu\text{M}$

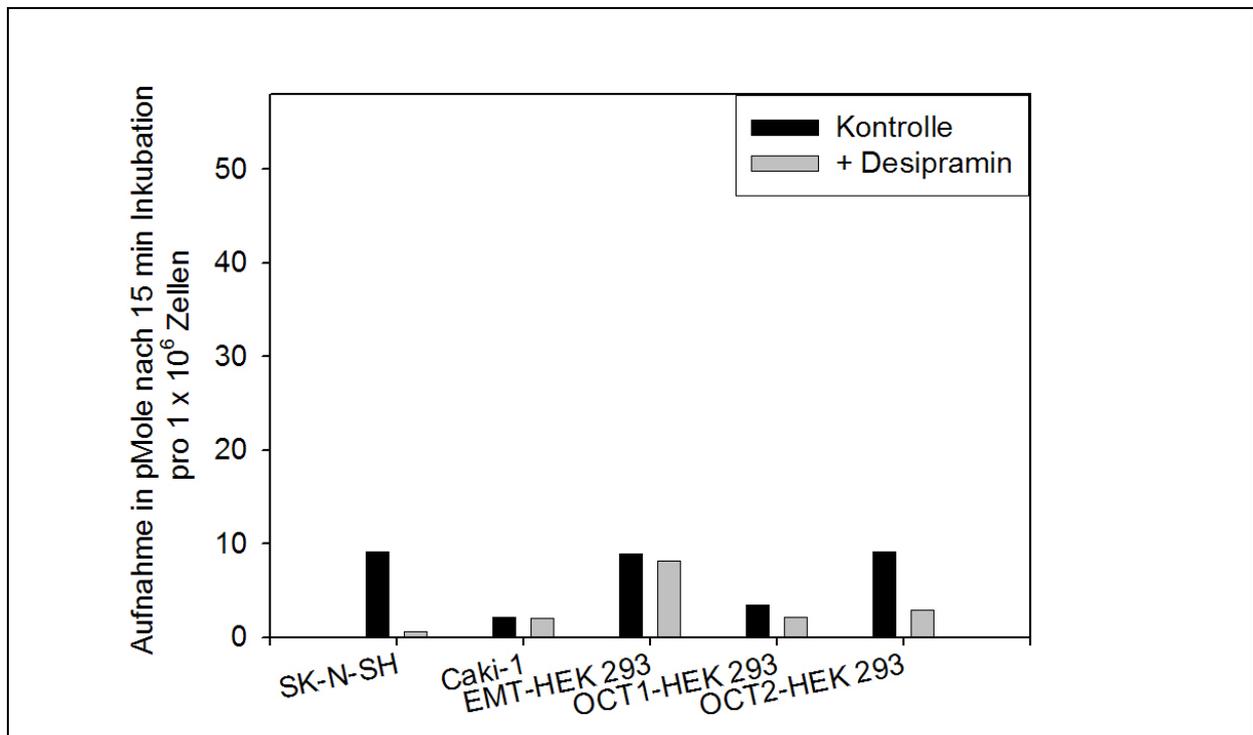


Abbildung 20b: Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{-Dopamin}$  (f.c.:  $1 \mu\text{M}$ ) ohne (Kontrolle) und in Gegenwart von Desipramin. Angaben nach 15 minütiger Inkubation pro  $1 \times 10^6$  Zellen. Desipramin f.c.:  $10 \mu\text{M}$

## 4 *Diskussion*

Für die Diagnostik des Neuroblastoms, eines embryonalen Tumors des Kindesalters, und dessen Verlaufskontrolle stehen einige bildgebende Verfahren zur Verfügung. Neben dem Ultraschall, dem Röntgen, der Computertomografie und der Kernspintomografie werden vor allen Dingen auch szintigrafische Verfahren eingesetzt. Seit ersten Untersuchungen in den 80-er Jahren hat sich das mit Jod radioaktiv markierte Metajodobenzylguanidin (mIBG) [<sup>123</sup>I]-mIBG als gut geeigneter Tracer zur Diagnostik dieser Entität etabliert (Kimming et al., 1984; Treuner et al., 1984). In verschiedenen Studien konnte für diese Substanz gezeigt werden - besonders auch in Kombination mit der Einzelphotonen-Emissions-Tomografie, kurz SPECT, und evtl. der Computertomografie -, dass [<sup>123</sup>I]-mIBG eine hohe Sensitivität von ca. 90 % bei einer Spezifität von knapp 100 % aufweist (Boubaker & Bischof Delaloye, 2008; Franzius et al., 2006; Rozovsky et al. 2008; Rufini et al., 1995; Vik et al., 2009). Das Noradrenalin-Analogon mIBG gelangt energieabhängig über den Noradrenalintransporter (NAT) in die Neuroblastomzellen, wo es im Zytoplasma gespeichert wird und so das maligne Gewebe markiert (Bayer et al., 2009; Carlin et al., 2003; Lode et al., 1995; Mairs et al., 1994; Shulkin et al., 1986; Shulkin & Shapiro, 1998; Vaidyanathan et al., 2008). Zunehmend gewinnt auch beim Neuroblastom - wie bei einer großen Anzahl weiterer onkologischer Erkrankungen - der radioaktiv markierte Zucker [<sup>18</sup>F]-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose ([<sup>18</sup>F]-FDG) als Tracer beim PET an Bedeutung, das dem [<sup>123</sup>I]-mIBG sogar bei einigen Fragestellungen leicht überlegen zu sein scheint, wie aus den wenigen bisher durchgeführten Studien hervorgeht (Sharp et al., 2009). Der erhöhte Glukosestoffwechsel stellt nämlich eine allgemeine Eigenschaft von Tumorzellen dar, während die Aufnahme von gewissen Katecholamin-Analoga stets von der Expression der dafür notwendigen Transporter abhängt.

Neuere Radiopharmaka wie das DOPA-Analogon [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA und das Dopamin-Analogon [<sup>18</sup>F]-6-FDA weisen als Tracer beim PET/CT bei einigen Krankheitsbildern vielversprechende Ergebnisse auf. Für den Einsatz von [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA bei der

Parkinsonfrühdiagnostik und bei der Diagnostik neuroendokriner Tumoren wie Karzinoiden, Inselzelltumoren des Pankreas, Phäochromozytomen, Paragangliomen, medullären Schilddrüsenkarzinomen, dem Hyperinsulinismus, kleinzelligen Lungenkarzinomen und beim Melanom liegen erste vielversprechende Studien vor (Fiebrich et al., 2009; Jager et al., 2008; Timmers et al., 2009). Ebenfalls finden sich hoffnungsvolle Untersuchungen zum Einsatz von [<sup>18</sup>F]-6-FDA bei der Kardiodiagnostik, bei der Diagnostik neuroendokriner Tumoren wie dem Phäochromozytom und dem medullären Schilddrüsenkarzinom (Gourgiotis et al., 2003; Ilias et al., 2003; Timmers et al., 2009). Dabei gelangt [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA über den von allen Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen und Konstellationen exprimierten L-Typ Aminosäuretransporter (LAT1-4) in die Zellen. Um den gesteigerten Substratbedarf zu decken, exprimiert insbesondere maligne entartetes Gewebe verstärkt die LAT1 und LAT3 (Babu et al., 2003; Oda et al., 2010; Yanagida et al., 2001). Wie mIBG gelangt auch das Dopamin-Analogon [<sup>18</sup>F]-6-FDA über den NAT, daneben aber auch über den Dopamintransporter (DAT), in die neuronalen Tumorzellen. Daher könnte diese Substanz aufgrund der bisherigen positiven Erfahrungen mit mIBG auch erfolgreich beim Neuroblastom eingesetzt werden und evtl. in Zukunft an die Stelle von [<sup>123</sup>I]-mIBG treten.

Bisher wird routinemäßig in PET-Zentren [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA synthetisiert, nicht jedoch [<sup>18</sup>F]-6-FDA. Daraus ergibt sich die Schwierigkeit, dass [<sup>18</sup>F]-6-FDA für die Untersuchungen des Neuroblastoms im klinischen Alltag gar nicht zur Verfügung steht. Hinzu kommt, dass das Isotop <sup>18</sup>F lediglich eine Halbwertszeit von 109 Minuten aufweist und diese kurze Zeit die Handhabung dieses Tracers erschwert. Wegbereitend für den möglichen routinemäßigen Einsatz von [<sup>18</sup>F]-6-FDA war die Weiterentwicklung einer neuen Methode von Z. Kuçi (unpublizierte Ergebnisse) zur Synthese dieser Substanz. Mit Enzymextrakten aus Kelly Zellen gelang ihr so eine fast vollständige enzymatische Umsetzung von [<sup>18</sup>F]-6-FDOPA zu [<sup>18</sup>F]-6-FDA innerhalb von nur 10 Minuten. Diese rasche Synthese könnte für den praktikablen Einsatz von [<sup>18</sup>F]-6-FDA bedeutsam werden.

Neben der bisher schlechten Verfügbarkeit von [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA ergibt sich für den möglichen Einsatz von [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA und [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA noch ein weiteres Problem: Eine große Anzahl verschiedener Gewebe weist die L-Typ Aminosäuretransporter (LAT) auf, über die mit den anderen Aminosäuren auch das DOPA-Analogon [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA in die Zellen gelangen (siehe Kapitel 1.2.4.1; Seite 22 ff). Dopamin und die analoge radioaktive Substanz gelangen nicht nur über die DAT und NAT in die Zellen, sondern werden außerdem von OCT-exprimierenden Zellen aufgenommen (Bayer et al., 2009). In dieser Arbeit wurden daher Versuche zur Aufnahme und zum Metabolismus von DOPA- und Dopamin-Analoga durchgeführt. Neben den beiden NAT-exprimierenden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly (Ballweg, 2007) wurden auch die Nicht-Neuroblastom-, OCT-exprimierenden Zelllinien Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 eingesetzt.

Die Ergebnisse dieser Versuche aus Kapitel 3 sollen in dieser Diskussion im Folgenden vergleichend und unter Berücksichtigung der aktuellen Literaturlage besprochen und erörtert werden. Nach der Diskussion der zellulären Aufnahme dieser Substanzen folgen zwei weitere Kapitel zum Metabolismus von DOPA- und Dopamin-Analoga.

#### **4.1 Vergleich der Aufnahme von DOPA und Dopamin in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen**

Ein zentraler Aspekt der Arbeit war es, die Aufnahme von DOPA- und Dopamin-Analoga in Neuroblastomzellen für den späteren möglichen klinischen Einsatz von [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA und [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA beim PET zu untersuchen. Die Kinetik dieser Tracer verhält sich wie die der unfluorierten Substanzen, wie Z. Kuçi und Kollegen (unpublizierte Ergebnisse) (siehe Abbildung 14, Seite 94) bei ihren Untersuchungen zeigen konnten. Daher wurden anstatt [ $^{18}\text{F}$ ]-FDOPA unmarkiertes 6-FDOPA und radioaktives [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA, und anstatt [ $^{18}\text{F}$ ]-FDA unmarkiertes 6-FDA bzw. radioaktives [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin und [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin verwendet. Das [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin wurde

dabei nach einer von Z. Kuçi und Mitarbeitern (unpublizierte Ergebnisse) neu entwickelten Methode enzymatisch aus [<sup>14</sup>C]-DOPA synthetisiert.

Die aromatische Aminosäure 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA) und Dopamin sind beides hydrophile Substanzen und können nicht ohne weiteres die lipophile Zellmembran der Neuroblastomzellen überwinden. Daher benötigen diese Substanzen für ihre Aufnahme spezielle, energieabhängige Transportsysteme wie die L-Typ Aminosäuretransporter (LAT1 und LAT2) für die Aufnahme von DOPA und die Dopamin- und Noradrenalintransporter (DAT und NAT) für die Aufnahme von Dopamin. Organische Kationentransporter (OCT) - auch nicht-neuronale Monoamintransporter genannt - sind ebenfalls in der Lage Katecholamine und ihnen verwandte Substanzen zu transportieren. Physiologischerweise eliminieren sie Katecholamine aus der Blutbahn, die nicht über die neuronalen Monoamintransporter (DAT, NAT) in die Zellen transportiert wurden.

Lediglich ein geringer Anteil der radioaktiv markierten Substanzen gelangt auch durch transmembranäre Diffusion passiv in die Zelle. Dieser Anteil nimmt keinen relevanten Stellenwert bei den durchgeführten Versuchen ein, soll aber der Vollständigkeit halber trotzdem hier erwähnt werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse kann jedoch dieser Sachverhalt nicht vollständig außer Acht gelassen werden.

In einer früheren Arbeit des Labors (Ballweg, 2007) konnte gezeigt werden, dass ein Anteil von etwa 5 % der Radioaktivität von [<sup>3</sup>H]-Dopamin und [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin trotz einer Hemmung der neuronalen Monoamintransporter bei den SK-N-SH und Kelly Zellen die Zellmembran überwinden kann. Ansätze mit Neuroblastomzellen wurden mit den beiden Substanzen inkubiert und dann auf Eis gekühlt, um so die Transportleistung der energieabhängigen DAT und NAT aufzuheben. Dies führte zu einer ca. 95 %-igen Reduzierung der Aufnahme der Katecholamine.

Auch für die HEK 293 Zellen gilt, dass Katecholamine auch ohne OCT in diese Zellen gelangen können. Gründemann und Mitarbeiter (1997) zeigten für das [<sup>14</sup>C]-

Tetraethylammonium, dass nicht mit OCT2 transformierte HEK 293 Zellen trotzdem in der Lage sind ca. 3 % dieser Substanz im Vergleich zu den Zellen aufzunehmen, die zuvor mit OCT2 transformiert wurden.

Die Aufnahme der aromatischen Aminosäure DOPA und analoger Substanzen wie auch die Aufnahme anderer Aminosäuren erfolgt über die L-Typ Aminosäuretransporter (LAT), die sich in einer Vielzahl von Geweben präsentieren. Für eine Reihe Tyrosin-basierter Tracer wie [<sup>11</sup>C]-Tyrosin, [<sup>18</sup>F]-Ethyltyrosin, [<sup>123</sup>I]-Methyltyrosin und [<sup>18</sup>F]-DOPA konnte der Beweis erbracht werden, dass diese Substanzen über die LAT aufgenommen werden (Heiss et al., 1999; Jager et al., 2000, 2001, Lahoutte et al., 2004).

Auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastom- und OCT-exprimierenden Nierentumorzellen kommen diese L-Typ Aminosäuretransporter Analogieschlüssen zu Folge in großer Anzahl vor: Für die Neuroblastomzelllinie „Mouse Neuro-2a“ konnte in einer Reihe von Hemmversuchen des LAT1 und des LAT2 die zelluläre Aufnahme von L-DOPA nachgewiesen werden. Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels HPLC mit elektrochemischer Detektion (Sampaio-Maia B et al., 2001; Sampaio-Maia B & Soares-da-Silva P, 2000). Auch für Nierengewebe konnte der Nachweis für das Vorkommen von LAT durch Aufnahmeversuche mit [<sup>14</sup>C]-DOPA erbracht werden (Quiñones et al., 2004; Soares-da-Silva & Serrão, 2004, 2005). Darüber hinaus exprimieren die meisten Tumore verstärkt die L-Typ Aminosäuretransporter - besonders LAT1 und LAT3 - um den gesteigerten Energieverbrauch decken zu können (Babu et al., 2003; Oda et al., 2010; Yanagida et al., 2001). Aufgrund dieses Sachverhaltes ist davon auszugehen, dass auch die beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly sowie die beiden Nierenkarzinom-Zelllinien Caki-1 und HEK 293 verstärkt diese Transporter exprimieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zur Aufnahme von 6-FDOPA und [<sup>14</sup>C]-DOPA bei den Zelllinien SK-N-SH, Kelly, Caki-1, EMT-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 spiegeln diesen Sachverhalt wider: Bei den

HPLC-Messungen von 6-FDOPA nach 5 und nach 30 minütiger Inkubation konnte die Aufnahme dieser Substanz in allen Zelllinien nachgewiesen werden (Kapitel 3.1). Jedoch war der Gehalt in den beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly auffallend niedrig (siehe Abbildung 11a und b; Seite 84). Aufgrund des bereits im Ergebnisteil angesprochenen Verdachts und in den Kapiteln 4.2 und 4.3 der Diskussion besprochenen These einer enzymatischen Umwandlung zu 6-FDA und 6-FNA sind die Ergebnisse dieser Versuche zur Diskussion des Ausmaßes der Aufnahme von DOPA in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen nur eingeschränkt verwendbar. Hingegen sind die Ergebnisse der zellulären Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA aussagekräftiger (Kapitel 3.2). Die Radioaktivität ist nämlich auch nach einer (potentiellen) intrazellulären Umwandlung zu [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin in gleicher Höhe nachweisbar und somit eindeutig dem [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA und der Aufnahmekapazität der LAT zuordenbar. Nach 15 minütiger Inkubation mit 460 pMole [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA wurden ca. 20 pMole von einer Million SK-N-SH Zellen aufgenommen, interessanterweise ähnlich viele wie nach Inkubation der gleichen Zelllinien mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin. Wesentlich höher war die Aufnahme dieser Substanz bei den Kelly Zellen. Hier betrug die Menge nach 15 minütiger Inkubation knapp 40 pMole pro eine Million Zellen (siehe Abbildung 14b; Seite 98). Dieser Gehalt war etwa viermal so hoch wie nach Inkubation mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin. Ähnliche Aufnahmewerte wie bei den SK-N-SH Zellen gab es auch für die OCT-exprimierenden Zellen. Besonders hoch war die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA bei den Caki-1 Zellen, die 55,5 pMole nach 15 minütiger Inkubation pro eine Million Zellen betrug.

Eine auffallend hohe Aufnahme an DOPA fand sich bei den Kelly und bei den Caki-1 Zellen (siehe Abbildungen 15 und 20a), die beide ein Modell für einen aggressiven Tumor darstellen. Die Kelly Zelllinie weist eine hohe DNA N-MYC Amplifikation (Schwab et al., 1983), eine geringe Differenzierung und ein rasches Wachstum (Preis et al., 1988) auf und dient somit als Modell eines rasch fortschreitenden Tumors. Bei den Caki-1 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus Zellen eines schlecht differenzierten G3-Tumors (Korhonen et al., 1994). Das rasche Wachstum und die schlechte Differenzierung beider Zelllinien und die gleichzeitige hohe Aufnahme des eingesetzten [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPAs stützen die These, dass aggressive und

schnell fortschreitende Tumoren verstärkt LAT1 exprimieren (Yanagida et al., 2001). Eine hohe LAT1 Expression findet sich somit verstärkt in Tumorzellen mit einem stark gesteigerten Stoffwechsel, um diese ausreichend mit Aminosäuren versorgen zu können. Kaira und Mitarbeiter (2008) konnten in einer ersten klinischen Studie einen Zusammenhang zwischen einer starken LAT1 Expression und einem schlechten klinischen Outcome und einer geringen 5-Jahres-Überlebensrate beim kleinzelligen Lungenkarzinom nachweisen.

Oben beschriebener Zusammenhang zwischen einer erhöhten LAT Expression und einer erhöhten Aufnahme von DOPA bei gleichzeitiger schlechterer Differenzierung könnte auch für die PET Bildgebung mit [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA beim Neuroblastom von Bedeutung sein. Dies würde bedeuten, dass sich rasch fortschreitende Tumoren wegen ihrer gesteigerten Traceraufnahme besser darstellen ließen. Ein klarer Zusammenhang zwischen der [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA Aufnahme und der entsprechenden Histopathologie wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Widersprüchlich dazu ist eine Hypothese von Jakob und Mitarbeitern (2003) beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, die vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA Aufnahme und einer besseren Differenzierung bestünde.

Ob und in welcher Form ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von DOPA und deren Analoga und der Tumordifferenzierung besteht, wird in weiteren Studien zu klären sein.

Weiter wurden einige Hemmversuche der [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA Aufnahme mit den Substanzen 6-FDOPA, 6-FDA, Tyrosin und Desipramin durchgeführt:

Abbildung 20a zeigt, dass Desipramin, ein Hemmstoff des NAT (DAT?), keinen nennenswerten Einfluss auf die Hemmung der Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA hat. In Kapitel 3.2.2.1, in dem der Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA in OCT1-HEK 293 Zellen und Kelly Zellen untersucht wurde, wird für Desipramin derselbe Effekt beobachtet. Sowohl bei Versuchen mit Kelly Zellen als auch bei Versuchen mit den OCT-exprimierenden Zellen OCT1-HEK 293 wird aber eine Hemmung der Aufnahme bei

gleichzeitiger Inkubation mit Tyrosin (100 x > DOPA) beobachtet. Eine eindeutige Tendenz bei gleichzeitiger Zugabe von 6-FDA ist nicht auszumachen.

Die nichtessentielle Aminosäure Tyrosin, die die Ausgangssubstanz des Katecholaminstoffwechsels bildet, wird ebenfalls wie auch die aromatische Aminosäure DOPA hauptsächlich über LAT1 in die Zellen aufgenommen (Kanai et al., 1998; Kanai & Endou, 2001; Yanagida et al., 2001). Daher ist es nicht verwunderlich, dass es nach Inkubation der verwendeten Zelllinien in Gegenwart von Tyrosin zu einer verminderten Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA kommt. Beide Substanzen konkurrieren um denselben Transporter, sodass es zu einer kompetitiven Hemmung und zu einer reduzierten Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA kommt.

Als einziger spezifischer Inhibitor der LAT findet sich in der Literatur lediglich die 2-Aminobicyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylsäure (BCH) (Segawa et al., 1999). Außerdem ist die Transportleistung der LAT2 abhängig vom extrazellulären pH Wert (Prasad et al., 1999).

Die zelluläre Aufnahme des biogenen Amins Dopamin und seiner analogen Substanzen erfolgt im neuronalen Gewebe über die neuronalen Monoamintransporter DAT und NAT und im nicht-neuronalen Gewebe über die nicht-neuronalen Monoamintransporter OCT1-3.

Die beiden Neuroblastom-Zelllinien Kelly und SK-N-SH, die neuronalem Gewebe entstammen, verfügen über NAT. Entgegen einer früheren Studie (Lode et al., 1995), bei der mittels RT-PCR für den DAT keine Genexpression bei sechs untersuchten Neuroblastomzelllinien - u.a. auch SK-N-SH und Kelly - gefunden werden konnte, kann aber wahrscheinlich doch von einer geringen Expression der DAT ausgegangen werden (Z. Kuçi, persönliche Mitteilung). Auf alle Fälle erfolgt der größte Teil der Dopaminaufnahme über den NAT, der für Dopamin eine hohe Transportleistung aufweist. In derselben Studie zeigten Lode und Kollegen (1995), dass die beiden Neuroblastom-Zelllinien diesen neuronalen Monoamintransporter exprimieren: Die SK-N-SH Zellen synthetisierten wesentlich mehr solcher

Transporter als die gleiche Anzahl an Kelly Zellen. Schon zuvor wurde der Nachweis des NAT in SK-N-SH Zellen erbracht (Glowniak et al., 1993), welcher überhaupt erstmals von Pacholczyk und Mitarbeitern (1991) bei dieser Zelllinie geklont werden konnte. Im Gegensatz zu den Kelly Zellen, die nur eine moderate Expression der NAT aufweisen (Lode et al., 1995; Seitz et al., 2000), findet in den SK-N-SH Zellen eine hohe Expression dieser Transporter statt (Carlin et al., 2003; Kuçi et al., 2002; Mairs et al., 1994).

Die anderen verwendeten Zelllinien sind ebenfalls in der Lage, Katecholamine über spezielle Transportsysteme aufzunehmen. Als nicht-neuronales Gewebe besitzen die beiden Nierenkarzinom-Zelllinien organische Kationentransporter (OCT). Bei der einen Nierenkarzinom-Zelllinie Caki-1 konnte dieser Transporter erstmals als extraneuronaler Monoamintransporter geklont und durch Hemmversuche die Aufnahme von radioaktivem Noradrenalin durch diesen Transporter nachgewiesen werden (Schömig & Schönfeld, 1990; Schömig et al., 1990). Die Caki-1 Zelle exprimiert Genprodukte aller drei organischen Kationentransporter OCT1-3 in unterschiedlichen Konzentrationen: Der OCT3 (= EMT) liegt bei dieser Zelllinie in höchster Konzentration vor, gefolgt von OCT1. Der Gehalt an OCT2 ist hingegen eher gering (Hayer-Zillgen et al., 2002).

Weiter wurden die transformierten embryonalen Nieren-Zelllinien OCT1-HEK 293, OCT2-HEK 293 und OCT3-HEK 293 (= EMT) in dieser Arbeit eingesetzt. Auf die HEK 293 Zelllinie wurden zur selektiven Untersuchung der einzelnen organischen Kationentransporter die entsprechenden DNA-Sequenzen übertragen: Der OCT3 (= EMT) entstammt der Caki-1 Zelllinie und weist in der HEK 293 Zelllinie dieselbe Aufnahmekapazität für MPP<sup>+</sup> auf wie der OCT3 bei den Caki-1 Zellen für Noradrenalin (Gründemann et al., 1998b). Auch die OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293 wurden auf ähnliche Weise transformiert (Gorboulev et al., 1997; Gründemann et al., 1994, 1997; Okuda et al., 1996). Der Substratfluss für Dopamin ist bei den OCT1-HEK 293 Zellen größer als bei den OCT2-HEK 293 Zellen (Braidert et al., 1998; Gründemann et al., 1998a).

Die Durchführung der verschiedenen Versuche konnte bestätigen, dass alle sechs verwendeten Zelllinien SK-N-SH, Kelly, Caki-1, OCT1-HEK 293, OCT2-HEK 293 und OCT3-HEK 293 (= EMT) Dopamin und 6-FDA entweder über die neuronalen (SK-N-SH und Kelly) oder über die nicht-neuronalen (OCT) Katecholamintransporter in die Zellen aufnehmen.

Bei den Aufnahme- und Metabolismusversuchen mit 6-FDA (f.c.: 100  $\mu$ M) (siehe Abbildungen 12a bis f; Seite 88 ff) lassen sich mittels HPLC-Messungen besonders hohe Mengen an 6-FDA bei den Versuchen mit der Caki-1 Zelllinie nachweisen (siehe Abbildung 13a und b; Seite 91), die nach 5 Minuten ca. 60 pMole / 100  $\mu$ g Protein und nach 30 Minuten knapp 120 pMole / 100  $\mu$ g Protein aufgenommen haben. Bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien liegen die Werte niedriger (SK-N-SH: ca. 5 pMole / 100  $\mu$ g Protein nach 5 min; ca. 25 pMole / 100  $\mu$ g Protein nach 30 min. Kelly: ca. 7 pMole / 100  $\mu$ g Protein nach 5 min; ca. 27 pMole / 100  $\mu$ g Protein nach 30 min). Dabei ist die Aufnahme von 6-FDA in die Kelly Zellen etwas höher als in die SK-N-SH Zellen, was scheinbar im Widerspruch zu früheren Arbeiten steht. Diese konnten mittels RT-PCR eine höhere Genexpression des NAT bei den SK-N-SH als bei den Kelly Zellen nachweisen (Lode et al., 1995). Da sich bei beiden Zelllinien ein zusätzlicher Peak zwischen 18,0 und 18,5 Minuten zeigt, der wahrscheinlich 6-FNA entspricht, handelt es sich bei den Messungen von 6-FDA um Werte, die nicht die wahre Aufnahmeleistung dieser Substanz über die NAT in die Neuroblastomzellen widerspiegeln. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass rasch ein gewisser Anteil des Substrates umgesetzt wird (siehe Kapitel 4.3). Führt man sich vor Augen, dass die SK-N-SH Zellen im Vergleich zu vielen anderen Neuroblastom-Zelllinien eine hohe Expression der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase aufweisen (Ross et al., 1981), wird auch klar, dass diese Messergebnisse nicht im Widerspruch zu der Veröffentlichung von Lode und Kollege (1995) stehen. Vielmehr haben die SK-N-SH Zellen wahrscheinlich mehr und schneller das 6-FDA hydroxyliert als die Kelly Zellen, sodass entsprechend die Messwerte von 6-FDA bei den SK-N-SH Zellen niedriger ausfallen als bei den Kelly Zellen. Bei den OCT-exprimierenden Zellen (incl. der Caki-1 Zellen) fehlt die Synthese eines solchen Enzyms. Entsprechend lassen sich

auf den Chromatogrammen keine zusätzlichen Peaks zwischen 18,0 und 18,5 Minuten auffinden (siehe Abbildung 12 e und f; Seite 90).

Für die OCT-exprimierenden Zellen zeigt sich etwa eine doppelt so hohe Aufnahmeleistung der OCT2-HEK 293 als bei den OCT1-HEK 293, was sich der Größenordnung nach mit Werten aus früheren Arbeiten deckt (siehe Seite 122) (Breidert et al., 1998; Gründemann et al., 1998a).

Die Versuche mit radioaktiv markiertem Dopamin sind deshalb die geeignetere Methode zur Bestimmung ihrer Aufnahme weil nach Aufnahme der Substanz die Radioaktivität trotz einer möglichen weiteren Verstoffwechslung unverändert bleibt. So kann die Akkumulation eines markierten Katecholamins - bzw. dessen Radioaktivität - auch nach einer Inkubation von mehreren Minuten exakt gemessen werden. Daher spiegeln diese Ergebnisse recht präzise die Studie von Lode und Mitarbeitern (1995) wider: Der Aufnahmegehalt von [<sup>14</sup>C]-Dopamin, das zuvor enzymatisch aus [<sup>14</sup>C]-DOPA synthetisiert wurde (Z. Kuçi, unpublizierte Ergebnisse), betrug nach 15 minütiger Inkubation mit [<sup>14</sup>C]-Dopamin (f.c.: 1 µM) bei den SK-N-SH Zellen 16 pMole pro eine Million Zellen, bei den Kelly Zellen knapp 8 pMole pro eine Million Zellen.

Diesen Versuchen angeschlossen wurden auch wieder Versuche zur potentiellen Hemmung der Dopamin-Aufnahme. Dabei wurden dieselben Substanzen eingesetzt wie zur Aufnahmehemmung von [<sup>14</sup>C]-DOPA, nämlich 6-FDOPA, 6-FDA, Tyrosin und Desipramin. Bei 6-FDOPA und Tyrosin handelt es sich um aromatische Aminosäuren, die über die LAT in die Zelle gelangen, 6-FDA ist ein fluoriertes Dopamin-Analogon und das Trizyklikum Desipramin stellt einen potenten Hemmstoff der NAT dar.

Bei den Hemmversuchen der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DA (f.c.: 1 µM) bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly zeigte sich folgendes Bild: 6-FDOPA (f.c.: 100 µM) sorgt für keine bzw. für eine geringe Hemmung der Aufnahme, 6-FDA (f.c.: 100 µM) für eine mäßige und Desipramin (f.c.: 10 µM) für eine starke Hemmung

der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DA. Zu einer stärkeren Hemmung kommt es dabei bei den SK-N-SH Zellen im Vergleich zu den Kelly Zellen.

Wie beschrieben gelangt 6-FDOPA über einen anderen Transporter in die Zelle, sodass die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DA eigentlich ungestört ablaufen müsste.

[<sup>14</sup>C]-DA und 6-FDA werden beide zum größten Teil aufgrund der fehlenden bzw. geringen DAT Expression bei Neuroblastomzellen über die NAT in die Zellen aufgenommen. Durch eine Inkubation mit ausreichend hohen Konzentrationen an 6-FDA (100-facher molarer Überschuss) kam es bei diesen Versuchen zu einer kompetitiven Hemmung der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DA durch 6-FDA. In einer Arbeit von Glowniak und Mitarbeitern (1993) konnte bei Versuchen mit Metajodobenzylguanidin (mIBG), das ebenso wie Dopamin über den NAT aufgenommen wird, diese kompetitive Aufnahmehemmung gezeigt werden. Durch Einsatz eines 10- bis 100-fachen molaren Überschusses an mIBG konnte die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-DA bei den SK-N-SH und den Kelly Zellen fast vollständig durch kompetitive Hemmung der Transporter inhibiert werden (Ballweg et al., 2007). In ähnlicher Weise konnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DA durch gleichzeitige Inkubation mit einem 100-fachen molaren Überschuss an 6-FDA reduziert werden.

Die Ergebnisse zur Aufnahmehemmung von [<sup>14</sup>C]-Dopamin durch Desipramin befinden sich im Einklang mit einer Reihe von früheren Aufnahmeversuchen mit NAT-exprimierenden Zelllinien (Ballweg, 2007; Pacholczyk et al., 1991): In dieser Arbeit führte Desipramin (f.c.: 10 µM) bei den SK-N-SH Zellen zu einer Reduzierung der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DA auf 14,3 % und auf 55,2 % bei den Kelly Zellen jeweils im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Seite 97 f; Tabelle 14a und b).

Bayer und Kollegen (2009) zeigten bei den beiden NAT-exprimierenden Zelllinien SK-N-SH und PC-12 (Phäochromozytom-Zelllinie) eine Hemmung der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-DA nach 15 minütiger Inkubation bei unterschiedlichen Desipraminkonzentrationen von  $2 \times 10^{-8}$  M bis  $2 \times 10^{-4}$  M. Bereits ab Konzentrationen

von  $10^{-6}$  M stellte sich ein maximaler Hemmeffekt ein, sodass auch höhere Konzentrationen des trizyklischen Antidepressivums keinen weiteren Effekt brachten. Bei den SK-N-SH Zellen kam es zu einer ca. 95 %-igen Hemmung, was den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen entspricht. Bei den PC-12 Zellen, die im Gegensatz zu den SK-N-SH Zellen vermehrt auch DAT exprimieren (Alyea et al., 2008), fällt dieser Effekt etwas geringer aus; die Hemmung beträgt dort knapp 90 %. Ähnlich verhält es sich auch bei den Versuchen mit den Kelly Zellen, bei denen ebenfalls der Hemmeffekt geringer ausfiel als bei den SK-N-SH Zellen.

Bei den OCT-exprimierenden Zellen zeigt sich hingegen nur ein geringer Inhibitionseffekt, da Desipramin kein Hemmstoff der OCT ist (Breidert et al., 1998).

Abschließend ist noch erwähnenswert, dass Zavosh und Mitarbeiter (1999) und Zhu und Mitarbeiter (2002) zeigen konnten, dass neben der Hemmung der Aufnahmeleistung der NAT eine Langzeitinkubation von Neuroblastomzellen mit Desipramin über mehrere Tage für eine Halbierung der Expression dieser Transporter sorgt.

In den nächsten beiden Kapiteln wird der Metabolismus von 6-FDOPA und 6-FDA in den Neuroblastom-Zelllinien und in den OCT-exprimierenden Zellen besprochen.

## **4.2 Zeitabhängige Umsetzung von 6-Fluoro-DOPA nach Aufnahme in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen**

Die Aufnahme von 6-FDOPA wurde an den beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly sowie an den Caki-1 und an den OCT1-3 transformierten HEK 293 Zellen über 5 und 30 Minuten verfolgt. Dabei zeigten sich charakteristische Unterschiede:

Da Nierentumorgewebe bekanntlich keine Katecholamine synthetisiert, finden sich bei diesen eingesetzten Zelllinien auch keine für die Synthese von Katecholaminen

notwendigen Enzyme. Eine Literaturrecherche mit den Stichworten „Caki-1“ oder „HEK 293“ und den Enzymen der Katecholaminsynthese fiel entsprechend negativ aus.

Die Ergebnisse des Kapitels 3.1.2.3 unterstreicht diesen Sachverhalt: Während nach 5 und 30 Minuten unterschiedliche Konzentrationen an 6-FDOPA in den HPLC-Chromatogrammen der einzelnen Zelllinien messbar waren, ließ sich kein 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) nachweisen.

Anders verhält es sich für die beiden Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly:

Allgemein synthetisieren etwa 90 % der Neuroblastome endogen Katecholamine. Auch die beiden Neuroblastomzelllinien SH-N-SH und Kelly gehören zu den synthetisierenden Zelllinien (siehe Abbildung 9a und b; Seite 79) und verfügen somit über die für die Synthese von DOPA, Dopamin und Noradrenalin notwendigen Enzyme wie die Tyrosinhydroxylase, die DOPA-Decarboxylase und die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase. Auch wenn sich in einer früheren Arbeit (Ballweg, 2007) mittels RT-PCR für die Zelllinie SK-N-SH im Gegensatz zur Zelllinie Kelly keine Tyrosinhydroxylase nachweisen ließ, so müssen jedoch aufgrund ihres Katecholaminprofils beide Zelllinien über ein solches Enzym verfügen.

Die Ergebnisse, die in Kapitel 3.1.2 vorgestellt wurden, für die beiden Neuroblastom-Zelllinien im Vergleich zu den Nicht-Neuroblastom-Zelllinien zeigen folgendes Bild: Ihr Gehalt an 6-FDOPA ist im Vergleich zu den vier Nicht-Neuroblastom-Zelllinien wesentlich geringer. Dies zeigt sich bereits nach einer kurzen Inkubationszeit von 5 Minuten und wird nach 30 minütiger Inkubation noch eindeutiger. Auffällig bei diesen Beobachtungen ist, dass zeitgleich auf den Chromatogrammen der 6-FDA Peak eine starke Progression erfährt, wie die Abbildungen 10a und b (Seite 81) für die SK-N-SH Zellen und die Abbildungen 10c und d (Seite 82) für die Kelly Zellen verdeutlichen. Diese Substratverschiebung bei den Messungen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zeigt eine enzymatische Decarboxylierung von 6-FDOPA zu 6-FDA. Wirft man noch einmal einen Blick auf die Chromatogramme der beiden

Zelllinien, entdeckt man zwischen 18 und 18,5 Minuten einen weiteren eindeutigen Peak, der sich aber keiner kalibrierten Substanz zuordnen lässt. Aufgrund der fehlenden Kalibrierung lässt sich nur schwer beurteilen, ob dieser Peak eine Zunahme erfährt oder nicht. Rekapituliert man den Katecholaminmetabolismus, liegt die Vermutung nahe, dass durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase höchstwahrscheinlich 6-Fluoro-Noradrenalin (6-FNA) synthetisiert worden ist. Möglich wäre evtl. auch ein enzymatischer Abbau über die COMT oder die MAO zu 6-Fluoro-3-Methoxytyramin und zu 6-Fluoro-3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und letztlich zu 6-Fluoro-Homovanillinsäure, wie von Cumming und Mitarbeitern (1994) bei Untersuchungen des Striatums von Ratten nach intravenöser Injektion von [ $^{18}$ ]-6-FDOPA dargestellt werden konnte. Weitere Studien zu dieser Fragestellung folgten (Endres et al., 2004). Die dabei entstehenden Substanzen ließen sich jedoch nicht mit der bei den HPLC-Messungen verwendeten Säule darstellen. Wesentlich wahrscheinlicher ist daher die Hydroxylierung des entstandenen 6-FDA zu 6-FNA.

Die Beobachtung der enzymatischen Decarboxylierung stützt sich auf einige vorliegende Studien: Bozzi und Mitarbeiter (2004) untersuchten neben klinischen Proben auch fünf Neuroblastomzelllinien, darunter auch die in dieser Arbeit eingesetzte SK-N-SH Zelllinie. Mittels RT-PCR wurde bei allen fünf Neuroblastom-Zelllinien mRNA der DOPA-Decarboxylase und der Tyrosinhydroxylase gefunden. Ebenso ließen sich bei 10 aller 10 untersuchten primären Neuroblastomen diese beiden Enzyme nachweisen.

In einer weiteren Studie untersuchten Träger und Kollegen (2008) sowohl Blut- und Knochenmarksproben als auch acht Neuroblastom-Zelllinien - darunter ebenfalls die SK-N-SH Zelllinie - auf die Gegenwart der beiden Enzyme DOPA-Decarboxylase und Tyrosinhydroxylase. Der Nachweis hoher Enzymkonzentrationen in Blutproben bei Diagnosestellung sprechen demnach für ein fortgeschrittenes metastasiertes Stadium mit schlechtem Outcome. Mittels RT-PCR wurde außerdem die Anzahl der mRNA u.a. der beiden Enzyme DOPA-Decarboxylase und Tyrosinhydroxylase untersucht und miteinander verglichen. Die SK-N-SH Zelllinie weist im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine hohe Anzahl an DOPA-Decarboxylase-mRNA bei

gleichzeitiger niedriger Tyrosinhydroxylase-mRNA auf. Bei dieser Zelllinie lag die Anzahl der Transkripte für die DOPA-Decarboxylase bei 14,1 pro Zelle, für die Tyrosinhydroxylase hingegen nur bei 0,12 pro Zelle. Dieses Ergebnis lässt sich gut sowohl mit den Ergebnissen von Ballweg (2007), die keine bzw. nur eine geringe Konzentration der Tyrosinhydroxylase in SK-N-SH Zellen nachweisen konnte, als auch mit den eigenen in Einklang bringen. Die rasche Umsetzung eines großen Teils des 6-FDOPA bereits nach der kurzen Zeit von 5 Minuten unterstreicht die hohe Anzahl an Transkripten der zellulären DOPA-Decarboxylase, die in der erwähnten Studie gefunden wurde (Träger et al., 2008).

Nach Besprechung der SK-N-SH Zelllinie soll nun auf die DOPA-Decarboxylase der Kelly Zellen eingegangen werden. In zwei früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass in Neuroblastomzelllinien ein hoher Gehalt der DOPA-Decarboxylase vorliegt (Ikeda et al., 1994; Kuçi et al., 2002). Daraufhin entwickelte Z. Kuçi (unpublizierte Ergebnisse) eine Methode zur enzymatischen Umwandlung von 6-FDOPA zu 6-FDA aus Zellextrakten aus Kelly Zellen. Innerhalb einer Minute wurde auf diese Weise ein Großteil des 6-FDOPA zu 6-FDA decarboxyliert, nach 5 Minuten war die Substanz fast vollständig metabolisiert. Gerade auch diese Ergebnisse unterstreichen die hohe Aktivität der DOPA-Decarboxylase in Neuroblastomzellen, wie sie auch in dieser Arbeit für die Kelly Zellen in entsprechender Weise im Ergebnisteil dargestellt wurde.

Vor dem Hintergrund dieser bereits bekannten Resultate ist die enzymatische Umwandlung von 6-FDOPA zu 6-FDA nicht verwunderlich. Erstaunlich ist hingegen die Geschwindigkeit, in der diese Decarboxylierung vonstatten geht.

Wie schon angedeutet zeigt sich in den Chromatogrammen (siehe Abbildung 10a bis d; Seite 81f) bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien ein weiterer nichtkalibrierter Peak zwischen 18 und 18,5 Minuten, bei dem es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um 6-FNA handelt. Da es aus biochemischer Sicht keinen Unterschied macht, ob das aus 6-FDOPA synthetisierte 6-FDA weiter verstoffwechselt wird oder ob das in

die Ansätze pipettierte 6-FDA metabolisiert wird, soll diese gemeinsame Wegstrecke der Katecholaminsynthese im folgenden Kapitel 4.3 besprochen werden.

### **4.3 Zeitabhängige Umsetzung von 6-Fluoro-Dopamin nach Aufnahme in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen**

Die HPLC-Messungen hatten gezeigt, dass das zu den Ansätzen pipettierte Dopamin-Analogon 6-FDA (f.c.: 100  $\mu\text{M}$ ) von allen Zellen aufgenommen wurde, jedoch in niedrigeren Konzentrationen als das 6-FDOPA. Mit 2,5 und 4,2 pMole / 100  $\mu\text{g}$  Protein nach fünfminütiger Inkubation der SK-N-SH und der Kelly Zellen fiel die Aufnahme im Vergleich zu den OCT-exprimierenden Zellen eher gering aus. Nach 30-minütiger Inkubation stieg der 6-FDA Gehalt auf 12,7 und 18,8 pMole / 100  $\mu\text{g}$  Protein bei den beiden eingesetzten Neuroblastom-Zelllinien. Besonders hohe Konzentrationen an 6-FDA fanden sich bei der Nierenkarzinom-Zelllinie Caki-1, die über einen hohen Gehalt an extraneuronalen Monoamintransportern verfügt (Schömig & Schönfeld, 1990; Schömig et al., 1990). Allen Zelllinien gemeinsam ist der zeitliche Zuwachs des 6-FDA Gehaltes nach einer längeren Inkubation von 30 Minuten.

Da die Aufnahmecharakteristika der sechs eingesetzten Zelllinien für Dopamin und dessen analoge Verbindungen bereits im Kapitel 4.1 besprochen wurden, soll in diesem Abschnitt dieser Aspekt nicht mehr wiederholend beleuchtet werden. Wie auch schon bei den Untersuchungen des 6-FDOPA Metabolismus zeigte sich auch für die Versuche mit 6-FDA ein weiterer Peak zwischen 18 und 18,5 Minuten bei den beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly nach 5 bzw. 30 minütiger Inkubation, der während der Inkubationszeit anstieg. Bei den Nicht-Neuroblastomzellen fehlte dieser Peak.

Wie bereits erwähnt wurde sehr wahrscheinlich das 6-FDA durch Hydroxylierung in das 6-FNA umgesetzt. Mangels zuvoriger Kalibrierung der HPLC-Anlage auf 6-FNA

können die Ergebnisse der Messungen nicht quantitativ, sondern lediglich deskriptiv wiedergegeben werden.

In sympathisch innerviertem Gewebe, das ebenfalls eine Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase enthält, gelang beispielsweise Chang und Kollege (1990) nach intravenöser Bolusinjektion von [ $^3\text{H}$ ]-6-FDA bereits nach kurzer Zeit der Nachweis von [ $^3\text{H}$ ]-6-FNA.

Bei den Nicht-Neuroblastomzellen Caki-1 und HEK 293 findet sich in den Chromatogrammen ein solcher Peak zwischen 18 und 18,5 Minuten (6-FNA) nicht. Wie auch für die DOPA-Decarboxylase finden sich in der Literatur keinerlei Hinweise auf das Vorkommen einer Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase bei Nierenkarzinomzellen.

Anders sieht es hingegen für die beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly aus: Bereits 1981 veröffentlichten Ross und Mitarbeiter (Ross et al., 1981) eine Arbeit, in der 14 Neuroblastom-Zelllinien auf ihre zur Synthese von Neurotransmittern notwendigen Enzyme untersucht wurden. Unter den adrenergen Zelllinien befand sich bei dieser Studie auch die SK-N-SH Zelllinie. Diese weist eine Syntheseleistung für die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase von  $14,7 \pm 0,4$  nMole Noradrenalin pro Stunde pro mg Protein auf. Niedriger sind die Werte für die Tyrosinhydroxylase und die DOPA-Decarboxylase, von denen nur  $0,017 \pm 0,002$  nMole DOPA bzw.  $5,7 \pm 0,5$  nMole Dopamin pro Stunde pro mg Protein hergestellt wurden. Dass die SK-N-SH Zellen eine hohe Konzentration der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase im Vergleich zu den anderen Enzymen aufweist, zeigten neben den Versuchen mit 6-FDOPA und 6-FDA auch die zuvor durchgeführten Untersuchungen des endogenen Katecholaminmusters, deren Chromatogramme einen deutlichen Noradrenalin Peak aufweisen (siehe Abbildung 9a, Seite 79).

Einer ähnlichen Fragestellung folgend konnten Kuçi und Mitarbeiter (2002) mittels RT-PCR hohe Konzentrationen der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase mRNA in SK-N-SH Zellen nachweisen. In den Kelly Zellen lag die Genexpression aber nur ungefähr bei 70 % im Vergleich zu den SK-N-SH Zellen.

Die Untersuchungen zur Aufnahme und zum Metabolismus von 6-FDOPA und 6-FDA haben gezeigt, dass die Umsetzungen dieser beiden Verbindungen im Neuroblastom in derselben Weise vonstatten gehen wie der Metabolismus von DOPA und Dopamin.

#### **4.4 Fazit**

Ob [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA oder [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA für den klinischen Einsatz zur Darstellung des Neuroblastoms mittels PET geeigneter ist, kann nicht abschließend beantwortet werden. Die Arbeit liefert aber eine detaillierte Beschreibung und Charakterisierung der Aufnahme und des weiteren Metabolismus dieser Substanzen in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen.

Bezüglich des möglichen Einsatzes von [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA lässt sich sagen, dass diese Substanz über die LAT in eine große Anzahl an Geweben gelangt. Katecholamine synthetisierende Zellen benötigen für die Synthese dieser Stoffe im Vergleich zu anderen Zellen mehr DOPA und weisen daher eine höhere LAT Expression auf. In der Zellmembran von Tumorzellen finden sich ebenfalls für ihre gesteigerte Substratzufuhr an Aminosäuren vermehrt LAT. Beide Eigenschaften treffen für den embryonalen Tumor Neuroblastom zu und diese Tracer scheinen daher prädestiniert für den Einsatz bei dieser Entität.

[ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA gelangt wie das Noradrenalin-Analogon Metajodobenzylguanidin (mIBG) ebenfalls über die NAT in die Neuroblastomzellen und über die OCT in die OCT-exprimierenden Zellen. Die Anzahl der [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA aufnehmenden Zellen ist daher im Vergleich zu der weit verbreiteten LAT-Expression begrenzt. Aufgrund des bisher erfolgreichen Einsatzes von [ $^{123}\text{I}$ ]-mIBG und der dazu umfassenden Studienlage wäre eine Verwendung von [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA als Tracer beim Neuroblastom sicherlich auch sehr vielversprechend.

Nach den in vitro Versuchen an Zelllinien müssen für die weitere Klärung des möglichen Einsatzes dieser beiden Substanzen Untersuchungen am Kleintier-PET mit Neuroblastom-tragenden Mäusen folgen. Diese weiteren Untersuchungen auf Grundlage dieser und weiterer Arbeiten sollen neue Erkenntnisse bringen, welche der beiden Substanzen für den Einsatz im klinischen Alltag geeigneter ist und welcher Tracer bei dieser Entität eine höhere Sensitivität und Spezifität erzielt.

## 5 Zusammenfassung

Das PET/CT ist ein bildgebendes Verfahren, das metabolische und morphologische Qualitäten vereint. Tracer wie [ $^{18}\text{F}$ ]-6-Fluoro-DOPA ([ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA) zur Darstellung des präsynaptischen Dopamin-Pools finden bislang ihren Einsatz als funktionelles bildgebendes Verfahren beim Parkinson-Syndrom und bei der Diagnostik neuroendokriner Tumoren wie dem Phäochromozytom und den Karzinoiden. [ $^{18}\text{F}$ ]-6-Fluoro-Dopamin ([ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA) kann bei der Darstellung der sympathischen Innervation des Herzens und ebenfalls bei neuroendokrinen Neoplasien wie dem Phäochromozytom und dem medullären Schilddrüsenkarzinom eingesetzt werden. Da auch das Neuroblastom neuronalem Gewebe entstammt, über entsprechende Transportsysteme und Speichervesikel verfügt, besteht die Vermutung, dass diese beiden Tracer auch Einsatz bei dieser pädiatrischen Entität finden könnten.

Aus praktischen Gründen wurde in dieser Dissertation bei den Versuchen anstatt [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDOPA und [ $^{18}\text{F}$ ]-6-FDA die analogen Substanzen 6-FDOPA, [ $^{14}\text{C}$ ]-DOPA, 6-FDA, [ $^{14}\text{C}$ ]-Dopamin und [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin eingesetzt. Dabei wurde die zelluläre Aufnahme und der weitere Metabolismus in Neuroblastom-Zelllinien und OCT-exprimierenden Zelllinien untersucht und miteinander verglichen.

Bei den Untersuchungen wurden die beiden Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und Kelly und an den OCT-exprimierenden Zelllinien Caki-1 sowie den transformierten HEK 293 (EMT (= OCT3)-HEK 293, OCT1-HEK 293 und OCT2-HEK 293) verwendet. Nach unterschiedlich langer Inkubation der Zelllinien mit fluoriertem DOPA und Dopamin wurden die Aufnahme und der Metabolismus dieser Substanzen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht. Neben den endogenen Katecholaminen dieser Zellen wurde das Messsystem auch auf 6-Fluoro-DOPA (6-FDOPA) und 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) kalibriert. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden Proteinbestimmungen der Zellpellets durchgeführt und die gemessenen Werte auf gleiche Proteinkonzentrationen umgerechnet. In einem zweiten Versuchsblock wurden radioaktiv markiertes DOPA

und Dopamin verwendet und die Aufnahme dieser Substanzen in die einzelnen Zelllinien mittels  $\beta$ -Counter bestimmt. Eine Zellzahlbestimmung wurde durchgeführt, um die Zerfälle pro Minute (cpm) bei gleicher Zellzahl miteinander vergleichen zu können.

Das Neuroblastom, der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters, exprimiert Noradrenalintransporter und in geringen Konzentrationen auch Dopamintransporter, über die die Katecholamine und ihnen analoge Substanzen aufgenommen werden, wie viele Studien mit Metajodobenzylguanidin bereits zeigten. Ein weiteres biochemisches Merkmal des Neuroblastoms neben der Expression von neuronalen Monoamintransportern ist die Synthese von Katecholaminen. Aber auch nichtneuronale Zellen können über organische Kationentransporter (OCT1-3) Dopamin aufnehmen. Die aromatische Aminosäure DOPA und deren Analoga werden über L-Typ Aminosäuretransporter (LAT1-4) in die Zelle aufgenommen, die von einer großen Anzahl verschiedener Gewebe exprimiert wird. Besonders hohe Konzentrationen finden sich bei Katecholamine synthetisierenden und bei maligne entarteten Geweben, um genug Substrat für die Synthese von Katecholaminen und zur Proteinsynthese bereitzustellen.

Die Versuche zeigten, dass die Neuroblastomzellen und die OCT-exprimierenden Nicht-Neuroblastomzellen sowohl die verwendeten DOPA- als auch die Dopamin-Analoga aufnahmen. Bei der SK-N-SH Zelllinie wurden die beiden Substanzen in äquivalenten Konzentrationen aufgenommen. Rasch wachsende Zelllinien wie die Kelly und die Caki-1 nahmen über die LAT mehr DOPA auf als die anderen eingesetzten Zelllinien. Bei den Neuroblastomzellen wurde Dopamin über die NAT aufgenommen, die Aufnahmemenge der SK-H-SH Zelllinie war etwa viermal so hoch wie die der Kelly Zellen. Vergleicht man die Neuroblastomzellen mit den OCT-exprimierenden Zellen so wurde Dopamin besonders stark von den Caki-1 Zellen aufgenommen, die hohe Konzentrationen der organischen Kationentransporter (OCT1-3) aufwiesen. Hemmversuche zeigten, dass bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit zwei verschiedenen DOPA- oder Dopamin-Analoga der Gehalt der aufgenommenen radioaktiven Substanz im Vergleich zur Kontrolle aufgrund eines

kompetitiven Hemmvorganges sank. Bei gleichzeitigem Einsatz von DOPA und Dopamin, die über unterschiedliche Transporter aufgenommen werden, konnte man lediglich einen geringen Hemmeffekt beobachten. Despramin - ein spezifischer Inhibitor des NAT - hemmt bei den SK-N-SH die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin um 93 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei den OCT-exprimierenden Zellen war die Hemmung wesentlich geringer.

Die Neuroblastomzellen verfügen über Enzyme zur Synthese von Katecholaminen, deren Metabolismus ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurde. Bei Versuchen mit unmarkiertem 6-FDOPA wurde diese Substanz rasch zu 6-FDA und wahrscheinlich auch zu 6-Fluoro-Noradrenalin (6-FNA) weiter verstoffwechselt. Auch nach Inkubation der Neuroblastomzellen mit 6-FDA kam es bereits nach kurzer Zeit zu einer enzymatischen Umsetzung zu 6-FNA. Überraschend war, dass innerhalb von weniger als 5 Minuten ein Großteil der eingesetzten Analoga weiter metabolisiert wurde. Bei den OCT-exprimierenden Zelllinien, die nicht über eine DOPA-Decarboxylase und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase verfügen, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide potentiellen Tracer von den Neuroblastom-Zelllinien und den OCT-exprimierenden Zelllinien aufgenommen werden. Welcher der beiden Substanzen jedoch im klinischen Einsatz vorteilhafter ist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Diese Arbeit liefert aber Erkenntnisse über die Aufnahme und den weiteren Metabolismus von DOPA- und Dopamin-Analoga bei den verwendeten Zelllinien. Bezüglich des möglichen klinischen Einsatzes der beiden Substanzen müssen zur weiteren Klärung der Fragestellung Versuche am Kleintier-PET mit Neuroblastom-tragenden Mäusen folgen.

---

# Abbildungsverzeichnis

|         |   |       |
|---------|---|-------|
| Abb. 1  | Synthese und Speicherung von Katecholaminen in dopaminergen und noradrenergen Neuronen. (Forth et al., 1987)  | S. 3  |
| Abb. 2  | Stoffwechsel der Katecholamine und Metanephrine (aus einer Firmenschrift von Chromsystems: Arbeitsvorschrift für HPLC-Bestimmung Katecholamine im Plasma)   | S. 5  |
| Abb. 3  | Analyse des ereignisfreien Überlebens nach Risikostratifikation (Park et al., 2008; aus London et al., Children's Oncology Group Statistical Office)  | S. 21 |
| Abb. 4  | Prinzip der elektrochemischen Detektion von Katecholaminen (aus einer Firmenschrift von Chromsystems: Arbeitsvorschrift für HPLC-Bestimmung Katecholamine im Plasma)  | S. 60 |
| Abb. 5  | Zusammenhang zwischen Arbeitspotential und Detektorsignal (aus einer Firmenschrift von Chromsystems: Arbeitsvorschrift für HPLC-Bestimmung Katecholamine im Plasma)   | S. 60 |
| Abb. 6a | Der typische Aufbau einer HPLC-Apparatur ( <a href="http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:HPLC.gif&amp;filetimestamp=20060105161715">http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:HPLC.gif&amp;filetimestamp=20060105161715</a> ) Autor: Cornelius Schumacher, Berlin, D, 2003 | S. 61 |
| Abb. 6b | Verwendete HPLC-Apparatur der Firma Hewlett-Packard GmbH, vertrieben von der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH  | S. 62 |
| Abb. 7  | Proteineichkurve unter Verwendung von Albumin   | S. 76 |
| Abb. 8  | Beispielchromatogramm einer Kalibrierung (Einspritzmenge: 50 µl). Nähere Informationen zu Konzentrationen und Absolutmengen siehe Tabelle 11  | S. 77 |
| Abb. 9a | Endogenes Katecholaminmuster von SK-N-SH Zellen. Extrakt aus ca. $2,1 \times 10^6$ Zellen / 50 µl   | S. 79 |
| Abb. 9b | Endogenes Katecholaminmuster von Kelly Zellen. Extrakt aus ca. $2,1 \times 10^6$ Zellen / 50 µl   | S. 79 |

---

|               |   |       |
|---------------|---|-------|
| Abb. 10a u. b | Chromatogramm nach 5 minütiger (a) und nach 30 minütiger (b) Inkubation von SK-N-SH Zellen mit 6-FDOPA (f.c.: 100 $\mu$ M). Extrakt aus ca. $0,2 \times 10^6$ Zellen / 50 $\mu$ l | S. 81 |
| Abb. 10c u. d | Chromatogramm nach 5 minütiger (c) und nach 30 minütiger (d) Inkubation von Kelly Zellen mit 6-FDOPA (f.c.: 100 $\mu$ M). Extrakt aus ca. $1,0 \times 10^6$ Zellen / 50 $\mu$ l   | S. 82 |
| Abb. 10e u. f | Chromatogramm nach 5 minütiger (e) und nach 30 minütiger (f) Inkubation von Caki-1 Zellen mit 6-FDOPA (f.c.: 100 $\mu$ M). Extrakt aus ca. $0,07 \times 10^6$ Zellen / 50 $\mu$ l | S. 83 |
| Abb. 11a      | Exemplarische Beispiele des 6-FDOPA Gehalts in pMole pro 100 $\mu$ g Protein nach 5 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100 $\mu$ M)  | S. 84 |
| Abb. 11b      | Exemplarische Beispiele des 6-FDOPA Gehalts in pMole pro 100 $\mu$ g Protein nach 30 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100 $\mu$ M)   | S. 84 |
| Abb. 11c      | Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100 $\mu$ g Protein nach 5 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100 $\mu$ M)  | S. 84 |
| Abb. 11d      | Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100 $\mu$ g Protein nach 30 min Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100 $\mu$ M)   | S. 84 |
| Abb. 12a u. b | Chromatogramm nach 5 minütiger (a) und nach 30 minütiger (b) Inkubation von SK-N-SH Zellen mit 6-FDA (f.c.: 100 $\mu$ M). Extrakt aus ca. $2,1 \times 10^6$ Zellen / 50 $\mu$ l   | S. 88 |
| Abb. 12c u. d | Chromatogramm nach 5 minütiger (c) und nach 30 minütiger (d) Inkubation von Kelly Zellen mit 6-FDA (f.c.: 100 $\mu$ M). Extrakt aus ca. $1,0 \times 10^6$ Zellen / 50 $\mu$ l     | S. 89 |
| Abb. 12e u. f | Chromatogramm nach 5 minütiger (e) und nach 30 minütiger (f) Inkubation von Caki-1 Zellen mit 6-FDA (f.c.: 100 $\mu$ M). Extrakt aus ca. $0,07 \times 10^6$ Zellen / 50 $\mu$ l   | S. 90 |
| Abb. 13a      | Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100 $\mu$ g Protein nach 5 min Inkubation mit 6-FDA (f.c.: 100 $\mu$ M)  | S. 91 |
| Abb. 13b      | Exemplarische Beispiele des 6-FDA Gehalts in pMole pro 100 $\mu$ g Protein nach 30 min Inkubation mit 6-FDA (f.c.: 100 $\mu$ M)   | S. 91 |

---

---

|          |   |        |
|----------|---|--------|
| Abb. 14  | Kinetik der Umwandlung von DOPA zu Dopamin im Vergleich zu 6-FDOPA zu 6-FDA durch DOPA-Decarboxylase enthaltende Extrakte aus Kelly Zellen (aus Z. Kuçi et al., unveröffentlichte Ergebnisse)   | S. 94  |
| Abb. 15  | Aufnahme der beiden Substanzen [ <sup>14</sup> C]-DOPA (f.c.: 1 µM) und [ <sup>14</sup> C]-Dopamin (f.c.: 1 µM) in SK-N-SH (n = 3) und Kelly (n = 1) Zellen. Angaben in Mittelwert mit Standardabweichung in pMole nach 15 min Inkubation bei 37°C pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen                     | S. 99  |
| Abb. 16a | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-Dopamin ([ <sup>14</sup> C]-DA) (f.c.: 1 µM) in SK-N-SH Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen. Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3). Verwendete Konzentrationen: 6-FDOPA: 100 µM; 6-FDA: 100 µM; Desipramin: 10 µM | S. 100 |
| Abb. 16b | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-Dopamin ([ <sup>14</sup> C]-DA) (f.c.: 1 µM) in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen (n = 1). Verwendete Konzentrationen: 6-FDOPA: 100 µM; 6-FDA: 100 µM; Desipramin: 10 µM                                    | S. 100 |
| Abb. 17  | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA (f.c.: 1 µM) in SK-N-SH in Abwesenheit und Gegenwart von 6-FDA (f.c.: 100 µM), Tyrosin (f.c.: 100 µM) und Desipramin (f.c.: 10 µM). Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3)  | S. 102 |
| Abb. 18a | Mittelwert mit Standardabweichung der Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen. n = 2  | S. 108 |
| Abb. 18b | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen. n = 1   | S. 108 |
| Abb. 19a | Mittelwert mit Standardabweichung der Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Dopamin in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen. n = 2  | S. 108 |
| Abb. 19b | Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen. n = 1   | S. 108 |

---

- Abb. 20a Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-DOPA (f.c.: 1 μM) ohne (Kontrolle) S. 113  
und in Gegenwart von Desipramin. Angaben nach 15  
minütiger Inkubation pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen.  
Desipramin f.c.: 10 μM
- Abb. 20b Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin (f.c.: 1 μM) ohne (Kontrolle) S. 113  
und in Gegenwart von Desipramin. Angaben nach 15  
minütiger Inkubation pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen.  
Desipramin f.c.: 10 μM

---

# Tabellenverzeichnis

|          |  |       |
|----------|--|-------|
| Tab. 1   | International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Brodeur et al., 1993)   | S. 8  |
| Tab. 2   | International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) (Monclair et al., 2009)   | S. 9  |
| Tab. 3   | Korrelation zwischen der N-MYC Amplifikation und dem Stadium bei 3000 Neuroblastomen (Brodeur et al., 1997)  | S. 10 |
| Tab. 4   | Patienteneinordnung in Risikogruppen anhand klinischer und biologischer Merkmale (Brodeur, 2003)   | S. 18 |
| Tab. 5   | Neuronale und nicht-neuronale Katecholamintransporter, Spezifitäten für endogene Katecholamine und Inhibitoren (modifiziert nach Bayer, 2009 und Eisenhofer, 2001) | S. 29 |
| Tab. 6   | Auswahl an Isotopen mit Halbwertszeit und deren Einsatz als Radiopharmakon   | S. 32 |
| Tab. 7   | Verwendete Zelllinien mit Beschreibung, Herkunft und Literaturangaben  | S. 42 |
| Tab. 8   | Verwendete Medien und Erntebedingungen der einzelnen Zelllinien  | S. 52 |
| Tab. 9   | Pipettierschema zur Erstellung einer Eichkurve   | S. 67 |
| Tab. 10  | Pipettierschema zur Erstellung der Eichkurve samt photometrisch bestimmter Messwerte   | S. 75 |
| Tab. 11  | Bei der Kalibrierung verwendete Konzentrationen, Absolutmengen und Ausschläge der Peaks in nA  | S. 78 |
| Tab. 12a | Zellulärer 6-FDOPA Gehalt nach Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100 µM)   | S. 86 |
| Tab. 12b | Zellulärer 6-Fluoro-Dopamin (6-FDA) Gehalt nach Inkubation mit 6-FDOPA (f.c.: 100 µM)  | S. 86 |
| Tab. 13  | Zellulärer 6-FDA Gehalt nach Inkubation mit 6-FDA (f.c.: 100 µM)   | S. 92 |

|          |   |        |
|----------|---|--------|
| Tab. 14a | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-Dopamin ([ <sup>14</sup> C]-DA) in SK-N-SH Zellen mit und ohne Inhibitoren und Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA nach 15 minütiger Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen | S. 97  |
| Tab. 14b | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-Dopamin ([ <sup>14</sup> C]-DA) in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren und Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA nach 15 minütiger Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen   | S. 98  |
| Tab. 15  | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA in SK-N-SH Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen   | S. 102 |
| Tab. 16a | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen   | S. 104 |
| Tab. 16b | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen  | S. 105 |
| Tab. 17a | Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Dopamin in Kelly Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen   | S. 106 |
| Tab. 17b | Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Dopamin in OCT1-HEK 293 Zellen mit und ohne Inhibitoren nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen  | S. 106 |
| Tab. 18a | Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-DOPA (f.c.: 1 µM) nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> SK-N-SH Zellen und OCT-exprimierenden Zellen und dessen potentielle Hemmung durch Desipramin                   | S. 110 |
| Tab. 18b | Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-Dopamin (f.c.: 1 µM) nach 15 min Inkubation pro 1 x 10 <sup>6</sup> SK-N-SH Zellen und OCT-exprimierenden Zellen und dessen potentielle Hemmung durch Desipramin                 | S. 111 |

## **Literaturverzeichnis**

Abramowsky CR, Taylor SR, Anton AH, Berk AI, Roederer M, Murphy RF (1989) Flow cytometry DNA ploidy analysis and catecholamine secretion profiles in neuroblastoma. *Cancer* **63**:1752-1756.

Adkins ES, Sawin R, Gerbing RB, London WB, Matthay KK, Haase GM (2004) Efficacy of complete resection for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study. *J Pediatr Surg* **39**:931-693.

Alvarado CS, London WB, Look AT, Brodeur GM, Altmiller DH, Thorner PS, Joshi VV, Rowe ST, Nash MB, Smith EI, Castleberry RP, Cohn SL (2000) Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol* **22**:197-205.

Armstrong MD, McMillan A, Shaw KN (1957) 3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. *Biochim Biophys Acta* **25**:422-423.

Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM; Children's Oncology Group (2005) Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* **353**:2243-2253.

Axelrod J, Kopin IJ, Mann JD (1959) 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol sulphate, a new metabolite of epinephrine and norepinephrine. *Biochim Biophys Acta* **36**:576-577.

Alyea RA, Laurence SE, Kim SH, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Watson CS (2008) The roles of membrane estrogen receptor subtypes in modulating dopamine transporters in PC-12 cells. *J Neurochem* **106**:1525-1533.

Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Iribe Y, Tangtrongsup S, Jutabha P, Li Y, Ahmed N, Sakamoto S, Anzai N, Nagamori S, Endou H (2003) Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J Biol Chem* **278**:43838-43845.

Bayer M, Kuçi Z, Schömig E, Gründemann D, Dittmann H, Handgretinger R, Bruchelt G (2009) 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. *Nucl Med Biol* **36**:287-294.

Beiske K, Burchill SA, Cheung IY, Hiyama E, Seeger RC, Cohn SL, Pearson AD, Matthay KK (2009) Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by

immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. *Br J Cancer* **100**:1627-1637.

Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Hermann J, Klingebiel T, Kremens B, Schilling FH, Schrappe M, Simon T, Hero B (2005) Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* **6**:649-658.

Berthold F, Hunneman DH, Harms D, Käser H, Zieschang J (1992) Serum vanillylmandelic acid/homovanillic acid contributes to prognosis estimation in patients with localised but not with metastatic neuroblastoma. *Eur J Cancer* **28**:1950-1954.

Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacin M, Murer H (1992) Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5601-5605.

Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* **33**:2643-2652.

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* **38**:3751-3757.

Bodoy S, Martín L, Zorzano A, Palacín M, Estévez R, Bertran J (2005) Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J Biol Chem* **280**:12002-12011.

Boubaker A, Bischof Delaloye A (2008) MIBG scintigraphy for the diagnosis and follow-up of children with neuroblastoma. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **52**:388-402

Bourdet DL, Pritchard JB, Thakker DR (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.

Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR, 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.

Bozzi F, Luksch R, Collini P, Gambirasio F, Barzanò E, Polastri D, Podda M, Brando B, Fossati-Bellani F (2004) Molecular detection of dopamine decarboxylase expression by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction in bone

marrow and peripheral blood: utility as a tumor marker for neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol* **13**:135-143.

Bradfield SM, Douglas JG, Hawkins DS, Sanders JE, Park JR (2004) Fractionated low-dose radiotherapy after myeloablative stem cell transplantation for local control in patients with high-risk neuroblastoma. *Cancer* **100**:1268-75.

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.

Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**:203-216.

Brodeur GM, Ambros PF, Favrot MC (1998) Biological aspects of neuroblastoma screening. *Med Pediatr Oncol* **31**: 394–400.

Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS (1997) Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* **19**:93-101.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* **11**:1466-1477.

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**:1121-1124.

Candito M, Soler C, Deville A, Bekri S, Chambon P, Thyss A (1996) Urinary excretion of methylated catecholamine metabolites in a child with neuroblastoma maturing into ganglioneuroma. *Med Pediatr Oncol* **26**:57-60.

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.

Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G (1990) Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* **55**:1067-1070.

Carlin S, Mairs RJ, McCluskey AG, Tweddle DA, Sprigg A, Estlin C, Board J, George RE, Ellershaw C, Pearson AD, Lunec J, Montaldo PG, Ponzoni M, van Eck-Smit BL, Hoefnagel CA, van den Brug MD, Tytgat GA, Caron HN (2003) Development of a real-time polymerase chain reaction assay for prediction of the uptake of meta-[(131)I]iodobenzylguanidine by neuroblastoma tumors. *Clin Cancer Res* **9**:3338-3344.

Casaccia-Bonnofil P, Gu C, Chao MV (1999) Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv Exp Med Biol* **468**:275-282.

Chang PC, Szemeredi K, Grossman E, Kopin IJ, Goldstein DS (1990) Fate of tritiated 6-fluorodopamine in rats: a false neurotransmitter for positron emission tomographic imaging of sympathetic innervation and function. *J Pharmacol Exp Ther* **255**:809-817.

Chrostowski MK, McGonnigal BG, Stabila JP, Padbury JF (2009) LAT-1 expression in pre- and post-implantation embryos and placenta. *Placenta* **30**:270-276.

Cleary S, Brouwers FM, Eisenhofer G, Pacak K, Christie DL, Lipski J, McNeil AR, Phillips JK (2005) Expression of the noradrenaline transporter and phenylethanolamine N-methyltransferase in normal human adrenal gland and pheochromocytoma. *Cell Tissue Res* **322**:443-453.

Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* **27**:289-297.

Corvi R, Savelyeva L, Breit S, Wenzel A, Handgretinger R, Barak J, Oren M, Amler L, Schwab M (1995) Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene* **10**:1081-1086.

Cornford EM, Young D, Paxton JW, Finlay GJ, Wilson WR, Pardridge WM (1992) Melphalan penetration of the blood-brain barrier via the neutral amino acid transporter in tumor-bearing brain. *Cancer Res* **52**:138-143.

Coulter DW, Blatt J, D'Ercole AJ, Moats-Staats BM (2008) IGF-I receptor inhibition combined with rapamycin or temsirolimus inhibits neuroblastoma cell growth. *Anticancer Res* **28**:1509-1516.

Crowe RR, Vieland V (1998) Chromosome 5 workshop. *Psychiatr Genet* **8**:73-78.

Cumming P, Kuwabara H, Gjedde A (1994) A kinetic analysis of 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-dihydroxyphenylalanine metabolism in the rat. *J Neurochem* **63**:1675-1682.

Ding YS, Lin KS, Logan J (2006) PET imaging of norepinephrine transporters. *Curr Pharm Des* **12**:3831-3845.

DuBois SG, Matthay KK (2008) Radiolabeled metaiodobenzylguanidine for the treatment of neuroblastoma. *Nucl Med Biol* **35**:S35-48.

Duelli R, Enerson BE, Gerhart DZ, Drewes LR (2000) Expression of large amino acid transporter LAT1 in rat brain endothelium. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**:1557-1562.

Eisenhofer G (2001) The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* **91**:35-62.

Eisenhofer G, Anaman A, Friberg P, Hooper D, Fandriks L, Lonroth H, Hunyady B, Mezey E (1997) Substantial production of dopamin in the human gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab* **82**:3864-3871.

Eisenhofer G, Aneman A, Hooper D, Holmes C, Goldstein DS, Friberg P (1995) Production and metabolism of dopamine and norepinephrine in mesenteric organs and liver of swine. *Am J Physiol* **268**:G641-G649.

Eisenhofer G, Aneman A, Hooper D, Rundqvist B, Friberg P (1996) Mesenteric organ production, hepatic metabolism, and renal elimination of norepinephrine and its metabolites in humans. *J Neurochem* **66**:1565-1573.

Elchisak MA, Polinsky RJ, Ebert MH, Kopin IJ (1982) Kinetics of homovanillic acid and determination of its production rate in humans. *J Neurochem* **38**:380-385.

Endres CJ, DeJesus OT, Uno H, Doudet DJ, Nickles JR, Holden JE (2004) Time profile of cerebral [18F]6-fluoro-L-DOPA metabolites in nonhuman primate: implications for the kinetics of therapeutic L-DOPA. *Front Biosci* **9**:505-512.

Engelhardt A, Greeff K, Holtz P, von Luecken R (1954) Zur Frage der Methylierung des Nor-Adrenalins im Organismus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* **221**:506-516.

Fiebrich HB, Brouwers AH, Kerstens MN, Pijl ME, Kema IP, de Jong JR, Jager PL, Elsinga PH, Dierckx RA, van der Wal JE, Sluiter WJ, de Vries EG, Links TP (2009) 6-[F-18]Fluoro-L-dihydroxyphenylalanine positron emission tomography is superior to conventional imaging with (123)I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy, computer tomography, and magnetic resonance imaging in localizing tumors causing catecholamine excess. *J Clin Endocrinol Metab* **94**:3922-3930.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**:221-226.

Forth W, Henschler D, Rummel W (1987) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 5. Auflage; Bl. Wissenschaftsverlag: Mannheim, Wien, Zürich.

Fox E, Maris JM, Widemann BC, Goodspeed W, Goodwin A, Kromplewski M, Fouts ME, Medina D, Cohn SL, Krivoshik A, Hagey AE, Adamson PC, Balis FM (2008) A phase I study of ABT-751, an orally bioavailable tubulin inhibitor, administered daily for 21 days every 28 days in pediatric patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **14**:1111-1115.

Fraga S, Sampaio-Maia B, Serrão MP, Soares-da-Silva P (2002a) Regulation of apical transporter of L-DOPA in human intestinal Caco-2 cells. *Acta Physiol Scand* **175**:103-111.

Fraga S, Serrão MP, Soares-da-Silva P (2002b) The L-3,4-dihydroxyphenylalanine transporter in human and rat epithelial intestinal cells is a type 2 hetero amino acid exchanger. *Eur J Pharmacol* **441**:127-135.

Franzius C, Hermann K, Weckesser M, Kopka K, Juergens KU, Vormoor J, Schober O (2006) Whole-body PET/CT with <sup>11</sup>C-meta-hydroxyephedrine in tumors of the sympathetic nervous system: feasibility study and comparison with <sup>123</sup>I-MIBG SPECT/CT. *J Nucl Med* **47**:1635-1642.

Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* **283**:397-401.

Gelernter J, Kruger S, Pakstis AJ, Pacholczyk T, Sparkes RS, Kidd KK, Amara S (1993) Assignment of the norepinephrine transporter protein (NET1) locus to chromosome 16. *Genomics* **18**:690-692.

George RE, Li S, Medeiros-Nancarrow C, Neuberg D, Marcus K, Shamberger RC, Pulsipher M, Grupp SA, Diller L (2006) High-risk neuroblastoma treated with tandem autologous peripheral-blood stem cell-supported transplantation: long-term survival update. *J Clin Oncol* **24**:2891-2896.

Giros B, el Mestikawy S, Bertrand L, Caron MG (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett* **295**:149-154.

Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, Caron MG (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* **42**:383-390.

Glowniak JV, Kilty JE, Amara SG, Hoffman BJ, Turner FE (1993) Evaluation of metaiodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine and serotonin transporters. *J Nucl Med* **34**:1140-1146.

Gomes P, Soares-da-Silva P (1999) Interaction between L-DOPA and 3-O-methyl-L-DOPA for transport in immortalised rat capillary cerebral endothelial cells. *Neuropharmacology* **38**:1371-1380.

Gomes P, Soares-da-Silva P (2002) Na<sup>+</sup>-independent transporters, LAT-2 and b<sup>0</sup>,+, exchange L-DOPA with neutral and basic amino acids in two clonal renal cell lines. *J Membr Biol* **186**:63-80.

Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997) Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* **16**:871-881.

Gourgiotis L, Sarlis NJ, Reynolds JC, VanWaes C, Merino MJ, Pacak K (2003) Localization of medullary thyroid carcinoma metastasis in a multiple endocrine neoplasia type 2A patient by 6-[<sup>18</sup>F]-fluorodopamine positron emission tomography. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:637-641.

Graefe KH, Henseling M (1983) Neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. *Gen Pharmacol* **14**:27-33.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.

Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Ordning 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.

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.

Gründemann D, Köster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, Obermüller N, Schömig E (1998a) Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem* **273**:30915-30920.

Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, Köster S, Schömig E (1999) Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* **56**:1-10.

Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E (1998b) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* **1**:349-351.

Gu H, Wall SC, Rudnick G (1994) Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* **269**:7124-7130.

Gudziol H, Katenkamp D, Küttner K, Beleites E (1986) Olfactory neuroblastoma. 3 case reports as a contribution to the clinical aspects, morphology and prognosis. *Laryngol Rhinol Otol* **65**:666-670.

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.

Hamada Y, Ikebukuro K, Sato M, Tanano A, Kato Y, Takada K, Hioki K (1999) Prenatally diagnosed cystic neuroblastoma. *Pediatr Surg Int* **15**:71-74.

Handgretinger R, Lang P, Ihm K, Schumm M, Geiselhart A, Koscielniak E, Hero B, Klingebiel T, Niethammer D (2002) Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34(+) progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* **29**:731-736.

Hann HW, Evans AE, Siegel SE, Wong KY, Sather H, Dalton A, Hammond D, Seeger RC (1986) Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res* **45**:2843-2848.

Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* **136**:829-836.

Heck JE, Ritz B, Hung RJ, Hashibe M, Boffetta P (2009) The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol* **23**:125-143.

Heiss P, Mayer S, Herz M, Wester HJ, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R (1999) Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo. *J Nucl Med* **40**:1367-1373.

Hero B, Berthold F, Engert J, Graf N, Klingebiel T, Kremens B, Rube C, Simon T, Tröger J, Wehrich A, Willich N (1997/2008) AWMF-Leitlinie Neuroblastom. <http://www.leitlinien.net/>.

Hero B, Simon T, Spitz R, Ernestus K, Gnekow AK, Scheel-Walter HG, Schwabe D, Schilling FH, Benz-Bohm G, Berthold F (2008) Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97. *J Clin Oncol* **26**:1504-1510.

Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J (2007) Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos* **35**:1333-1340.

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.

Hiyama E, Iehara T, Sugimoto T, Fukuzawa M, Hayashi Y, Sasaki F, Sugiyama M, Kondo S, Yoneda A, Yamaoka H, Tajiri T, Akazawa K, Ohtaki M (2008) Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* **371**:1142-1143.

Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, Camoratto AM, Evans AE, Brodeur GM (2002) Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* **62**:6462-6466.

Holtz P, Heise R, Lüdtke K (1938) Fermentativer Abbau von l-Dioxyphenylalanin (Dopa) durch Niere. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* **191**:87-118.

Howman-Giles R, Shaw PJ, Uren RF, Chung DK (2007) Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors. *Semin Nucl Med* **37**:286-302.

Hugosson C, Nyman R, Jorulf H, McDonald P, Rifai A, Kofide A, Jacobsson B (1999) Imaging of abdominal neuroblastoma in children. *Acta Radiol* **40**:534-542.

Ikeda H, Matsuyama S, Suzuki N, Takahashi A, Kuroiwa M (1995) 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) decarboxylase deficiency and resultant high levels of plasma DOPA and dopamine in unfavorable neuroblastoma. *Hypertens Res* **18**:S209-210.

Ikeda H, Pastuszko A, Ikegaki N, Kennett RH, Wilson DF (1994) 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) metabolism and retinoic acid induced differentiation in human neuroblastoma. *Neurochem Res* **19**:1487-1494.

Ikeda H, Suzuki N, Takahashi A, Kuroiwa M, Matsuyama S (1996) 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) metabolism in screening-detected and non-screening-detected neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol* **13**:21-32.

Iolascon A, Giordani L, Moretti A, Tonini GP, Lo Cunsolo C, Mastropietro S, Borriello A, Ragione FD (1998) Structural and functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in neuroblastoma. *Pediatr Res* **43**:139-144.

Iversen LL (1971) Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. *Br J Pharmacol* **41**:571-591.

Jacobsson H, Hellström PM, Kogner P, Larsson SA (2007) Different concentrations of I-123 MIBG and In-111 pentetretotide in the two main liver lobes in children: persisting regional functional differences after birth? *Clin Nucl Med* **32**:24-28.

Jager PL, Chirakal R, Marriott CJ, Brouwers AH, Koopmans KP, Gulenchyn KY (2008) 6-L-18F-fluorodihydroxyphenylalanine PET in neuroendocrine tumors: basic aspects and emerging clinical applications. *J Nucl Med* **49**:573-586.

Jager PL, Meijer WG, Kema IP, Willemsse PH, Piers DA, de Vries EG (2000) L-3-[123I]iodo-alpha-methyltyrosine scintigraphy in carcinoid tumors: correlation with biochemical activity and comparison with [111In-DTPA-D-Phe1]-octreotide imaging. *J Nucl Med* **41**:1793-1800.

Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, de Vries EG, Langen KJ, Piers DA (2001) Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med* **42**:432-445.

Johnson RA, Eshleman AJ, Meyers T, Neve KA, Janowsky A (1998) [3H]substrate- and cell-specific effects of uptake inhibitors on human dopamine and serotonin transporter-mediated efflux. *Synapse* **30**:97-106.

Kageyama T, Nakamura M, Matsuo A, Yamasaki Y, Takakura Y, Hashida M, Kanai Y, Naito M, Tsuruo T, Minato N, Shimohama S (2000) The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res* **879**:115-121.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Tanaka S, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Mori M (2008) Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer* **98**:742-748.

Kanai Y, Endou H (2001) Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab* 2001 **2**:339-354.

Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* **273**:23629-23632.

Kaneko Y, Knudson AG (2000) Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **29**:89-95.

Kawarai T, Kawakami H, Yamamura Y, Nakamura S (1997) Structure and organization of the gene encoding human dopamine transporter. *Gene* **195**:11-18.

Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, 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.

Keller R, Oke A, Mefford I, Adams RN (1976) Liquid chromatographic analysis of catecholamines routine assay for regional brain mapping. *Life Sci* **19**:995-1003.

Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, Triche TJ, Reynolds CP (2001) Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* **61**:6185-6193.

Kesrouani A, Duchatel F, Seilanian M, Muray JM (1999) Prenatal diagnosis of adrenal neuroblastoma by ultrasound: a report of two cases and review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol* **13**:446-449.

Kido Y, Tamai I, Uchino H, Suzuki F, Sai Y, Tsuji A (2001) Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporters LAT1 and LAT2 and their pharmacological relevance at the blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol* **53**:497-503.

Kilty JE, Lorang D, Amara SG (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* **254**:578-579.

Kim CS, Cho SH, Chun HS, Lee SY, Endou H, Kanai Y, Kim do K (2008) BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. *Biol Pharm Bull* **31**:1096-1100.

Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H (2001) Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1565**:112-121.

Kim DK, Kim IJ, Hwang S, Kook JH, Lee MC, Shin BA, Bae CS, Yoon JH, Ahn SG, Kim SA, Kanai Y, Endou H, Kim JK (2004) System L-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells. *Neurosci Res* **50**:437-446.

Kimmig B, Brandeis WE, Eisenhut M, Bubeck B, Hermann HJ, zum Winkel K (1984) Scintigraphy of a neuroblastoma with I-131 meta-iodobenzylguanidine. *J Nucl Med* **25**:773-775.

Kippenberger AG, Palmer DJ, Comer AM, Lipski J, Burton LD, Christie DL (1999) Localization of the noradrenaline transporter in rat adrenal medulla and PC12 cells: evidence for its association with secretory granules in PC12 cells. *J Neurochem* **73**:1024-1032.

Knudson AG Jr, Strong LC (1972) Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet* **24**:514-532.

Kobayashi H, Ishii Y, Takayama T (2005) Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* **90**:233-238.

Koehler MR, Wissinger B, Gorboulev V, Koepsell H, Schmid M (1997) The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Cell Genet* **79**:198-200.

Kopin IJ (1985) Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* **37**:333-364.

Korhonen M, Sariola H, Gould VE, Kangas L, Virtanen I (1994) Integrins and laminins in human renal carcinoma cells and tumors grown in nude mice. *Cancer Res* **54**:4532-4538.

Kuçi Z, Bruchelt G, Seitz G, Karov Y, Or R, Handgretinger R, Niethammer D, Hahn T (2002) Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. *Anticancer Res* **22**:4325-4329.

Kushner BH (2004) Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med* **45**:1172-1188.

Kushner BH, Wolden S, LaQuaglia MP, Kramer K, Verbel D, Heller G, Cheung NK (2001) Hyperfractionated low-dose radiotherapy for high-risk neuroblastoma after intensive chemotherapy and surgery. *J Clin Oncol* **19**:2821-2828.

Kushner BH, Yeung HW, Larson SM, Kramer K, Cheung NK (2001) Extending positron emission tomography scan utility to high-risk neuroblastoma: fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography as sole imaging modality in follow-up of patients. *J Clin Oncol* **19**:3397-3405.

Laasonen-Balk T, Kuikka J, Viinamäki H, Husso-Saastamoinen M, Lehtonen J, Tiihonen J (1999) Striatal dopamine transporter density in major depression. *Psychopharmacology* **144**:282-285.

Lahoutte T, Caveliers V, Camargo SM, Franca R, Ramadan T, Veljkovic E, Mertens J, Bossuyt A, Verrey F (2004) SPECT and PET amino acid tracer influx via system L (h4F2hc-hLAT1) and its transstimulation. *J Nucl Med* **45**:1591-1596.

Lamki LM (1996) Positron emission tomography in oncology. General acceptance of its role is overdue. *Cancer* **78**:2039-2042.

Łastowska M, Cotterill S, Bown N, Cullinane C, Variend S, Lunec J, Strachan T, Pearson AD, Jackson MS (2002) Breakpoint position on 17q identifies the most aggressive neuroblastoma tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **34**:428-436.

Lee WK, Wolff NA, Thévenod F (2009) Organic cation transporters: physiology, toxicology and special focus on ethidium as a novel substrate. *Curr Drug Metab* **10**:617-631.

Levin EY, Levenberg B, Kaufman S (1960) The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J Biol Chem* **235**:2080-2086.

Levine M, Morita K, Heldman E, Pollard HB (1985) Ascorbic acid regulation of norepinephrine biosynthesis in isolated chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem* **260**:15598-15603.

Lode HN, 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.

Longo L, Panza E, Schena F, Seri M, Devoto M, Romeo G, Bini C, Pappalardo G, Tonini GP, Perri P (2007) Genetic predisposition to familial neuroblastoma: identification of two novel genomic regions at 2p and 12p. *Hum Hered* **63**:205-211.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.

Mahoney NR, Liu GT, Menacker SJ, Wilson MC, Hogarty MD, Maris JM (2006) Pediatric horner syndrome: etiologies and roles of imaging and urine studies to detect neuroblastoma and other responsible mass lesions. *Am J Ophthalmol* **142**:651-659.

Marimpietri D, Brignole C, Nico B, Pastorino F, Pezzolo A, Piccardi F, Cilli M, Di Paolo D, Pagnan G, Longo L, Perri P, Ribatti D, Ponzoni M (2007) Combined therapeutic effects of vinblastine and rapamycin on human neuroblastoma growth, apoptosis, and angiogenesis. *Clin Cancer Res* **13**:3977-3988.

Maris JM, Guo C, Blake D, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Rajalingam V, Gerbing R, Stram DO, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM (2001) Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* **36**:32-36.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* **369**:2106-2120.

Maris JM, Matthay KK (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* **17**:2264-2279.

Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, Mirensky T, Brodeur GM, Rebbeck TR, Urbanek M, Shusterman S (2002) Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res* **62**:6651-6658.

Mairs RJ, Livingstone A, Gaze MN, Wheldon TE, Barrett A (1994) Prediction of accumulation of <sup>131</sup>I-labelled meta-iodobenzylguanidine in neuroblastoma cell lines by means of reverse transcription and polymerase chain reaction. *Br J Cancer* **70**:97-101.

Martel F, Ribeiro L, Calhau C, Azevedo I (1999) Comparison between uptake2 and rOCT1: effects of catecholamines, metanephrines and corticosterone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**:303-309.

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.

Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F (1998) Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* **395**:288-291.

Matthay KK, Tan JC, Villablanca JG, Yanik GA, Veatch J, Franc B, Twomey E, Horn B, Reynolds CP, Groshen S, Seeger RC, Maris JM (2006) Phase I dose escalation of iodine-131-metaiodobenzylguanidine with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in refractory neuroblastoma: a new approaches to Neuroblastoma Therapy Consortium Study. *J Clin Oncol* **24**:500-506.

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* **341**:1165-1173.

Modak S, Cheung NK (2007) Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest* **25**:67-77.

Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* **27**:298-303.

Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* **22**:389-395.

Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* **239**:2910-2917.

Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM (1993) Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* **328**:847-854.

Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM (1994) Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* **14**:759-767.

Nakanishi K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H, Hiroi S, Tominaga S, Mukai M, Ikeda E, Ozeki Y, Aida S, Kawai T (2006) LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch* **448**:142-150.

Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, Atkinson JB, Selch M, Gerbing RB, Stram DO, Lukens J (2000) Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* **18**:477-486.

Oda K, Hosoda N, Endo H, Saito K, Tsujihara K, Yamamura M, Sakata T, Anzai N, Wempe MF, Kanai Y, Endou H (2010) L-Type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* **101**: 173-179.

Ohkame H, Masuda H, Ishii Y, Kanai Y (2001) Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol* **78**:265-271.

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.

Olshan AF, Smith JC, Bondy ML, Neglia JP, Pollock BH (2002) Maternal vitamin use and reduced risk of neuroblastoma. *Epidemiology* **13**:575-580.

Otto M, Barfield RC, Martin WJ, Iyengar R, Leung W, Leimig T, Chaleff S, Gillies SD, Handgretinger R (2005) Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **11**:8486-8491.

Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* **350**:350-354.

Park JR, Eggert A, Caron H (2008) Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am* **55**:97-120.

Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* **11**:272-280.

Peng H, Sohara Y, Moats RA, Nelson MD Jr, Groshen SG, Ye W, Reynolds CP, DeClerck YA (2007) The activity of zoledronic Acid on neuroblastoma bone metastasis involves inhibition of osteoclasts and tumor cell survival and proliferation. *Cancer Res* **67**:9346-9355.

Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, Seeger RC, Shimada H, Haase GM, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN (2000) Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol* **18**:18-26.

Pettersson HM, Karlsson J, Pietras A, Øra I, Pålman S (2007) Arsenic trioxide and neuroblastoma cytotoxicity. *J Bioenerg Biomembr* **39**:35-41.

Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F (1998) Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* **439**:157-162.

Pifl C, Agneter E, Drobny H, Reither H, Singer EA (1997) Induction by low Na<sup>+</sup> or Cl<sup>-</sup> of cocaine sensitive carrier-mediated efflux of amines from cells transfected with the cloned human catecholamine transporters. *Br J Pharmacol* **121**:205-212.

Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, Lastowska M, Bown N, Combaret V, Favrot MC, Delattre O, Michon J, Bénard J, Hartmann O, Nicholson JC, Ross FM, Brinkschmidt C, Laureys G, Caron H, Matthay KK, Feuerstein BG, Speleman F (2001) Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma

reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer* **91**:680-686.

Pörzgen P, Bönisch H, Brüss M (1995) Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* **215**:1145-1150.

Powell JE, Estève J, Mann JR, Parker L, Frappaz D, Michaelis J, Kerbl R, Mutz ID, Stiller CA (1998) Neuroblastoma in Europe: differences in the pattern of disease in the UK. *Lancet* **352**:682-687.

Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, Ganapathy V (1999) Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* **255**:283-288.

Preis PN, Saya H, Nádasdi L, Hochhaus G, Levin V, Sadée W (1988) Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res* **48**:6530-6534.

Pritchard J, Cotterill SJ, Germond SM, Imeson J, de Kraker J, Jones DR (2005) High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer* **44**:348-357.

Quiñones H, Collazo R, Moe OW (2004) The dopamine precursor L-dihydroxyphenylalanine is transported by the amino acid transporters rBAT and LAT2 in renal cortex. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**:F74-80.

Rajan PD, Kekuda R, Chancy CD, Huang W, Ganapathy V, Smith SB (2000) Expression of the extraneuronal monoamine transporter in RPE and neural retina. *Curr Eye Res* **20**:195-204.

Richter D (1937) Adrenaline and amine oxidase. *Biochem J* **31**:2022-2028.

Ritchie JW, Peter GJ, Shi YB, Taylor PM (1999) Thyroid hormone transport by 4F2hc-IU12 heterodimers expressed in *Xenopus* oocytes. *J Endocrinol* **163**:R5-9.

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**:1219-1223.

Ross RA, Biedler JL, Spengler BA, Reis DJ (1981) Neurotransmitter-synthesizing enzymes in 14 human neuroblastoma cell lines. *Cell Mol Neurobiol* **1**:301-311.

Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kühn LC (1999) LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* **274**:34948-34954.

- Rozovsky K, Koplewitz BZ, Krausz Y, Revel-Vilk S, Weintraub M, Chisin R, Klein M (2008) Added value of SPECT/CT for correlation of MIBG scintigraphy and diagnostic CT in neuroblastoma and pheochromocytoma. *AJR Am J Roentgenol* **190**:1085-1090.
- Rufini V, Fisher GA, Shulkin BL, Sisson JC, Shapiro B (1996) Iodine-123-MIBG imaging of neuroblastoma: utility of SPECT and delayed imaging. *J Nucl Med* **37**:1464-1468.
- Rufini V, Giordano A, Di Giuda D, Petrone A, Deb G, De Sio L, Donfrancesco A, Troncone L (1995) [123I]MIBG scintigraphy in neuroblastoma: a comparison between planar and SPECT imaging. *Q J Nucl Med* **39**:25-28.
- Russ H, Engel W, Schömig E (1993) Isocyanines and pseudoisocyanines as a novel class of potent noradrenaline transport inhibitors: synthesis, detection, and biological activity. *J Med Chem* **36**:4208-4213.
- Rydén M, Sehgal R, Dominici C, Schilling FH, Ibáñez CF, Kogner P (1996) Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. *Br J Cancer* **74**:773-779.
- Sakata T, Ferdous G, Tsuruta T, Satoh T, Baba S, Muto T, Ueno A, Kanai Y, Endou H, Okayasu I. (2009) L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol Int* **59**:7-18.
- Sampaio-Maia B, Serrão MP, Soares-da-Silva P (2001) Regulatory pathways and uptake of L-DOPA by capillary cerebral endothelial cells, astrocytes, and neuronal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C333-342.
- Sampaio-Maia B, Soares-da-Silva P (2000) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin mediated pathways regulate the uptake of L-DOPA in mouse neuroblastoma neuro 2A cells. *Life Sci* **67**:3209-3220.
- Sandoval V, Riddle EL, Ugarte YV, Hanson GR, Fleckenstein AE (2001) Methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporter function: an in vitro model. *J Neurosci* **21**:1413-1419.
- Saulnier Sholler GL, Kalkunte S, Greenlaw C, McCarten K, Forman E (2006) Antitumor activity of nifurtimox observed in a patient with neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* **28**:693-695.
- Sauvat F, Sarnacki S, Brisse H, Medioni J, Rubie H, Aigrain Y, Gauthier F, Audry G, Helardot P, Landais P, Michon J, Hartmann O, Nihoul-Fékété C (2002) Outcome of suprarenal localized masses diagnosed during the perinatal period: a retrospective multicenter study. *Cancer* **94**:2474-2480.
- Schilling FH, 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**:1047-53.

Schmidt ML, Lal A, Seeger RC, Maris JM, Shimada H, O'Leary M, Gerbing RB, Matthay KK (2005) Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* **23**:6474-6480.

Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, Stram DO, Perez C, Haase GM, Matthay KK (2000) Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* **18**:1260-1268.

Schömig E, Schönfeld CL (1990) Extraneuronal noradrenaline transport (uptake<sub>2</sub>) in a human cell line (Caki-1 cells). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **341**:404-410.

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, 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.

Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G, Trent J (1984) Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* **308**:288-291.

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* **313**:1111-1116.

Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* **274**:19745-19751.

Seitz G, Gebhardt S, Beck JF, Böhm W, Lode HN, Niethammer D, Bruchelt G (1998) Ascorbic acid stimulates DOPA synthesis and tyrosine hydroxylase gene expression in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Neurosci Lett* **244**:33-36.

Seitz G, Stegmann HB, Jäger HH, Schlude HM, Wolburg H, Roginsky VA, Niethammer D, Bruchelt G (2000) Neuroblastoma cells expressing the noradrenaline transporter are destroyed more selectively by 6-fluorodopamine than by 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* **75**:511-520.

Sharp SE, Shulkin BL, Gelfand MJ, Salisbury S, Furman WL (2009) 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG PET in neuroblastoma. *J Nucl Med* **50**:1237-1243.

Shennan DB, Thomson J, Barber MC, Travers MT (2003) Functional and molecular characteristics of system L in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1611**:81-90.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999) Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* **86**:349-363.

Shimada S, Kitayama S, Lin CL, 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.

Shulkin BL, Hutchinson RJ, Castle VP, Yanik GA, Shapiro B, Sisson JC (1996) Neuroblastoma: positron emission tomography with 2-[fluorine-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose compared with metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Radiology* **199**:743-750.

Shulkin BL, Mitchell DS, Ungar DR, Prakash D, Dole MG, Castle VP, Hernandez RJ, Koeppe RA, Hutchinson RJ (1995) Neoplasms in a pediatric population: 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose PET studies. *Radiology* **194**:495-500.

Shulkin BL, Shapiro B (1998) Current concepts on the diagnostic use of MIBG in children. *J Nucl Med* **39**:689-688.

Shulkin BL, Shapiro B, Francis IR, Dorr R, Shen SW, Sisson JC (1986) Primary extra-adrenal pheochromocytoma: positive I-123 MIBG imaging with negative I-131 MIBG imaging. *Clin Nucl Med* **11**:851-854.

Siegel MJ, Ishwaran H, Fletcher BD, Meyer JS, Hoffer FA, Jaramillo D, Hernandez RJ, Roubal SE, Siegel BA, Caudry DJ, McNeil BJ (2002) Staging of neuroblastoma at imaging: report of the radiology diagnostic oncology group. *Radiology* **223**:168-175.

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.

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.

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.

Slovis TL, Meza MP, Cushing B, Elkowitz SS, Leonidas JC, Festa R, Kogutt MS, Fletcher BD (1997) Thoracic neuroblastoma: what is the best imaging modality for evaluating extent of disease? *Pediatr Radiol* **27**:273-275.

Soares-da-Silva P, Serrão MP (2004) High- and low-affinity transport of L-leucine and L-DOPA by the hetero amino acid exchangers LAT1 and LAT2 in LLC-PK1 renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**:F252-261.

Soares-da-Silva P, Serrão MP (2005) Apical and basolateral 4F2hc and the amino acid exchange of L-DOPA in renal LLC-PK1 cells. *Amino Acids* **29**:213-219.

Sofka CM, Semelka RC, Kelekis NL, Worawattanakul S, Chung CJ, Gold S, Fordham LA (1999) Magnetic resonance imaging of neuroblastoma using current techniques. *Magn Reson Imaging* **17**:193-198.

Strenger V, Kerbl R, Dornbusch HJ, Ladenstein R, Ambros PF, Ambros IM, Urban C (2007) Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatr Blood Cancer* **48**:504-509.

Suc A, Lumbroso J, Rubie H, Hattchouel JM, Boneu A, Rodary C, Robert A, Hartmann O (1996) Metastatic neuroblastoma in children older than one year: prognostic significance of the initial metaiodobenzylguanidine scan and proposal for a scoring system. *Cancer* **77**:805-811.

Tanaka T, Slamon DJ, Shimoda H, Waki C, Kawaguchi Y, Tanaka Y, Ida N (1988) Expression of Ha-ras oncogene products in human neuroblastomas and the significant correlation with a patient's prognosis. *Cancer Res* **48**:1030-1034.

Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matise TC, White PS (2001) Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* **36**:28-31.

Timmers HJ, Chen CC, Carrasquillo JA, Whatley M, Ling A, Havekes B, Eisenhofer G, Martiniova L, Adams KT, Pacak K (2009) Comparison of 18F-Fluoro-L-DOPA, 18F-Fluoro-Deoxyglucose, and 18F-Fluorodopamine PET and 123I-MIBG Scintigraphy in the Localization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* **94**:4757-4767.

Tomà P, Lucigrai G, Marzoli A, Lituania M (1994) Prenatal diagnosis of metastatic adrenal neuroblastoma with sonography and MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* **162**:1183-1184.

Torrents D, Estévez R, Pineda M, Fernández E, Lloberas J, Shi YB, Zorzano A, Palacín M (1998) Identification and characterization of a membrane protein ( $\gamma$ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity  $\gamma$ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* **273**:32437-32445.

Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* **4**:13-25.

Träger C, Vernby A, Kullman A, Ora I, Kogner P, Kågedal B (2008) mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer* **123**:2849-2855.

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 [<sup>131</sup>I]iodobenzylguanidine. *Lancet* **1(8372)**:333-334.

Tuchman M, Auray-Blais C, Ramnaraine ML, Neglia J, Krivit W, Lemieux B (1987) Determination of urinary homovanillic and vanillylmandelic acids from dried filter paper samples: Assessment of potential methods for neuroblastoma screening. *Clin Biochem* **20**:173-177.

Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J (2001) Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res* **61**:8-13.

Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H (2002) Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* **61**:729-737.

Ueno S (2003) Genetic polymorphisms of serotonin and dopamine transporters in mental disorders. *J Med Invest* **50**:25-31.

Ueno S, Nakamura M, Mikami M, Kondoh K, Ishiguro H, Arinami T, Komiyama T, Mitsushio H, Sano A, Tanabe H (1999) Identification of a novel polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene and the significant association with alcoholism. *Mol Psychiatry* **4**:552-557.

Udin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:11168-11171.

Vaidyanathan (2008) Meta-iodobenzylguanidine and analogues: chemistry and biology. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **52**:351-368.

Valteau-Couanet D, Michon J, Boneu A, Rodary C, Perel Y, Bergeron C, Rubie H, Coze C, Plantaz D, Bernard F, Chastagner P, Bouzy J, Hartmann O (2005) Results of induction chemotherapy in children older than 1 year with a stage 4 neuroblastoma treated with the NB 97 French Society of Pediatric Oncology (SFOP) protocol. *J Clin Oncol* **23**:532-540.

Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR (1992) Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics* **14**:1104-1106.

Van Roy N, Forus A, Myklebost O, Cheng NC, Versteeg R, Speleman F (1995) Identification of two distinct chromosome 12-derived amplification units in neuroblastoma cell line NGP. *Cancer Genet Cytogenet* **82**:151-154.

Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R (1999) Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* **55**:209-218.

Vik TA, Pfluger T, Kadota R, Castel V, Tulchinsky M, Farto JC, Heiba S, Serafini A, Tumeh S, Khutoryansky N, Jacobson AF (2009) (123)I-mIBG scintigraphy in patients with known or suspected neuroblastoma: Results from a prospective multicenter trial. *Pediatr Blood Cancer* **52**:784-790.

Wagner CA, Lang F, Bröer S (2001) Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**:C1077-1093.

Wahl RL, Hutchins GD, Buchsbaum DJ, Liebert M, Grossman HB, Fisher S (1991) 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose uptake into human tumor xenografts. Feasibility studies for cancer imaging with positron-emission tomography. *Cancer* **67**:1544-1550.

Wall SC, Gu H, Rudnick G (1995) Biogenic amine flux mediated by cloned transporters stably expressed in cultured cell lines: amphetamine specificity for inhibition and efflux. *Mol Pharmacol* **47**:544-550.

Watson E (1981) Liquid chromatography with electrochemical detection for plasma norepinephrine and epinephrine. *Life Sci* **28**:493-497.

Wilson PE, Oleszek JL, Clayton GH (2007) Pediatric spinal cord tumors and masses. *J Spinal Cord Med* **30**:15-20.

Winkler K (1976) Paraneoplastic symptoms of neuroblastoma. *Monatsschr Kinderheilkd* **124**:527-532.

Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Weitzman S, Bunin G, Levy I, Brossard J, Dougherty G, Tuchman M, Lemieux B (2002) Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* **346**:1041-1046.

Wu X, Huang W, Ganapathy ME, Wang H, Kekuda R, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V (2000) Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**:F449-458.

Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, 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.

Yamamoto BK, Novotney S (1998) Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter. *J Neurochem* **71**:274-280.

Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1514**:291-302.

Yoon JH, Kim YB, Kim MS, Park JC, Kook JK, Jung HM, Kim SG, Yoo H, Ko YM, Lee SH, Kim BY, Chun HS, Kanai Y, Endou H, Kim DK (2004) Expression and functional characterization of the system L amino acid transporter in KB human oral epidermoid carcinoma cells. *Cancer Lett* **205**:215-226.

Young JL Jr, Miller RW (1975) Incidence of malignant tumors in U. S. children. *J Pediatr* **86**:254-258.

Zavosh A, Schaefer J, Ferrel A, Figlewicz DP (1999) Desipramine treatment decreases 3H-nisoxetine binding and norepinephrine transporter mRNA in SK-N-SHSY5Y cells. *Brain Res Bull* **49**:291-295.

Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, Schneider SL (1986) Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer* **57**:1230-1234.

Zhu MY, Kim CH, Hwang DY, Baldessarini RJ, Kim KS (2002) Effects of desipramine treatment on norepinephrine transporter gene expression in the cultured SK-N-BE(2)M17 cells and rat brain tissue. *J Neurochem* **82**:146-153.

# ***Danksagung***

Diese Arbeit wurde im Labor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen durchgeführt, dessen ärztlichem Direktor der Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie Professor Dr. med. R. Handgretinger mein Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit gilt.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Professor Dr. rer. nat. G. Bruchelt aussprechen, der als Doktorvater und Betreuer die Arbeit vorschlug und mich dabei anleitete und begleitete. Geduldig unterstützte er mich bei der Durchführung und Ausarbeitung der Experimente und hatte stets Zeit für meine Belange. Sein Engagement und seine Begeisterung für dieses Thema riefen auch in mir rasch das Interesse dafür wach. Durch einen stets sehr guten Dialog und Diskussion trug er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Herzlichen Dank!

Für die freundliche Bereiterklärung als Zweitgutachter meiner Dissertation gilt mein Dank Privatdozent Dr. rer. nat. G. Reischl.

Als wichtige und sehr kompetente Ansprechpartnerin bei der Durchführung der HPLC-Messungen arbeitete mich Dr. med. Zyrafete Kuçi gut in diese Methode ein, und sie führte einige Messungen auch in uneigennütziger Weise für mich durch. Mit Rat und wertvollen Tipps stand sie mir während dieser Zeit zur Seite.

Aber auch dem ganzen Labor-Team möchte ich herzlich für die gute gemeinsame Zeit und die kollegiale Arbeitsweise danken. Besonders sollen hervorgehoben werden Gisela Merkel, Nadine Kemmler, Beate Deubzer, Rifka Niewisch und Sandra Pajarola.

Meinen Eltern Dr. med. Bernd M. und Ulrike Sauer gilt ein besonderer Dank, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich besonders auch in arbeitsreichen Phasen

dieser Promotion entlastet und unterstützt haben. Zahlreiche Leseproben dieser Arbeit wurden von ihnen korrigiert.

Für sehr viel Geduld während meiner Laborarbeit, aber auch während der Schreibphasen bedanke ich mich von Herzen bei meiner Freundin Judith Ganzhorn, die mir stets eine große Unterstützung war.

Abschließend gilt mein Dank meinem Bruder cand. med. Christof Sauer für die graphische Aufarbeitung der Abbildungen, Dipl.-Psych. Uta Ganzhorn als Ansprechpartnerin bei statistischen Fragen und meinem Freund Matthias Schaff für die Erstellung der Eichkurve.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name: Jörg Martin Sauer  
Geburtsdatum: 10. Dezember 1982  
Geburtsort: Offenburg  
Familienstand: ledig  
Eltern: Dr. med. Bernd M. Sauer und Ulrike Sauer

## **Werdegang**

1989 - 1993 Grundschule Tuningen  
1993 - 2002 Gymnasium Trossingen,  
Abschluss: Abitur (2,0)  
2002 - 2003 Zivildienst am Schwarzwald-Baar-  
Klinikum im Bereich der Pflege  
2003 - 2008 Studium der Humanmedizin an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
2008 - 2009 Praktisches Jahr im Akademischen  
Lehrkrankenhaus Marienhospital  
Stuttgart, Wahlfach: Gynäkologie  
19. 5. 2009 Staatsexamen, Note: gut (2,5)  
seit 1. 1. 2010 Assistenzarzt in der Klinik für Innere  
Medizin I im Marienhospital Stuttgart