

Aus der Universitätsklinik für  
Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie,  
Hämatologie und Onkologie)

**Evaluation des Hemmeffektes klinisch relevanter  
Glucocorticoide auf die Aufnahme von  
[<sup>3</sup>H]Noradrenalin/[<sup>3</sup>H]Dopamin über den organischen  
Kationentransporter 3 und den Noradrenalintransporter**

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

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

**vorgelegt von**

**Glaesmann, Kira Katharina**

**2017**

Dekan: Professor Dr. I.B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Wendel

Tag der Disputation: 20.10.2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	<b>Einführung in die Thematik der Arbeit</b> .....	1
1.2	<b>Das Neuroblastom</b> .....	2
1.2.1	Definition, Ätiologie und Genetik.....	2
1.2.2	Pathologie und Tumorklassifikationen .....	3
1.2.3	Diagnostik.....	4
1.2.3.1	MIBG-Szintigraphie .....	4
1.2.4	Symptome, Therapie und Prognose .....	6
1.2.5	Besonderheiten der Neuroblastomzellen.....	7
1.3	<b>Der Noradrenalintransporter (NAT) und die nicht neuronalen Monoamintransporter (Organische Kationentransporter, OCT)</b> .....	8
1.3.1	Der Noradrenalintransporter (NAT).....	8
1.3.2	Die nicht neuronalen Monoamintransporter (Organische Kationentransporter, OCT).....	8
1.4	<b>Glucocorticoide</b> .....	10
1.4.1	Wirkung und Regulation im menschlichen Organismus.....	10
1.4.2	Synthetische Glucocorticoide .....	11
1.4.3	Glucocorticoidrezeptoren.....	13
1.5	<b>Fragestellung der Arbeit</b> .....	14

<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	15
2.1	<b>Materialien</b>	15
2.1.1	Messapparaturen/ Geräte	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Zellkulturmedien	16
2.1.4	Chemikalien	17
2.1.5	Chemische Struktur der Katecholamine und Glucocorticoide	18
2.1.6	Zelllinien	19
2.2	<b>Methoden</b>	22
2.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen	22
2.2.1.1	Auftauen von Zellen	23
2.2.1.2	Kultivierung von Zellen	23
2.2.1.3	Passagieren von Zellen	24
2.2.1.4	Konservierung von Zellen	25
2.2.2	Versuchsdurchführung	25
2.2.2.1	Übersicht	25
2.2.2.2	Auszählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer	26
2.2.2.3	Herstellung des Inkubationspuffers	27
2.2.2.4	Herstellung der radioaktiven Katecholaminlösung	28
2.2.2.5	Herstellung der Glucocorticoid-Verdünnungsreihen	28
2.2.2.6	Vorbereitung der Zentrifugenröhrchen	29
2.2.2.7	Versuchsprotokoll	30
2.2.2.8	Bestimmung des 100%-Wertes	31
2.2.3	Auswertung und graphische Darstellung der Screening- und Hauptversuche	32

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	36
3.1	Allgemeine Erläuterungen	36
3.2	Vergleich verschiedener Lösungsformen der Glucocorticoide	38
3.3	Screeningversuche	39
3.3.1	Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA oder [ <sup>3</sup> H]NA in die extraneuronale OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide	40
3.3.2	Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA oder [ <sup>3</sup> H]NA in die neuronale SK-N-SH-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide	43
3.3.3	Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA oder [ <sup>3</sup> H]NA in die neuronale Kelly-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide	45
3.3.4	Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA oder [ <sup>3</sup> H]NA in die neuronale IMR-32-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide	47
3.3.5	Vergleichende Darstellung der Wirkung von Hydrocortison auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA oder [ <sup>3</sup> H]NA in die verschiedenen Zelllinien	49
3.3.6	Vergleichende Darstellung der Wirkung von Prednisolon auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA oder [ <sup>3</sup> H]NA in die verschiedenen Zelllinien	51
3.3.7	Vergleichende Darstellung der Wirkung von Dexamethason auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA oder [ <sup>3</sup> H]NA in die verschiedenen Zelllinien	54
3.4	Hauptversuche	56
3.4.1	Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen unter Einfluss von $1 \times 10^{-4}$ mol/l Hydrocortison und Prednisolon in die OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie	57
3.4.2	Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen unter Einfluss von $1 \times 10^{-4}$ mol/l Hydrocortison und Prednisolon in die neuronale SK-N-SH-Zelllinie	59
3.4.3	Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen unter Einfluss von $1 \times 10^{-4}$ mol/l Hydrocortison und Prednisolon in die neuronale Kelly-Zelllinie	61

3.4.4	Vergleich der Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]DA und [ <sup>3</sup> H]NA in die verschiedenen Zelllinien unter Einfluss von 1x10 <sup>-4</sup> mol/l Hydrocortison und Prednisolon.....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Versuchsbedingungen .....</b>	<b>68</b>
4.1.1	Kontamination von Zellkulturen.....	68
4.1.2	Einsatz von radioaktiv markierten Katecholaminen als [ <sup>123</sup> I]mIBG- und 6-[ <sup>18</sup> F]FDA-Analoga .....	70
4.1.3	Inkubationspuffer und Inkubationszeit .....	72
4.1.4	Glucocorticoide .....	73
<b>4.2</b>	<b>Auswertung der Screeningversuche.....</b>	<b>77</b>
<b>4.3</b>	<b>Auswertung der Hauptversuche.....</b>	<b>79</b>
<b>4.4</b>	<b>Bedeutung der Versuchsergebnisse in Bezug auf die Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>108</b>
7.1	Erklärung zum Eigenanteil .....	108
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	109
7.3	Tabellenverzeichnis .....	110
7.4	Danksagung .....	111

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AVP</b>	Arginin-Vasopressin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlorid
<b>CRH</b>	Corticotrophin-releasing Hormon
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>DA</b>	Dopamin
<b>DAT</b>	Dopamintransporter
<b>f.c.</b>	final concentration
<b>FDA</b>	Fluordopamin
<b>FDG</b>	Fluordesoxyglukose
<b>GC</b>	Glucocorticoid
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>GR</b>	Glucocorticoidrezeptor
<b>HEK</b>	Human Embryonic Kidney
<b>HVA</b>	Homovanillinsäure
<b>5-HTT</b>	Serotonin-Transporter
<b>INSS</b>	International neuroblastoma staging system
<b>INRG</b>	International Neuroblastoma Risk Group
<b>INRGSS</b>	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>mIBG</b>	Metajodbenzylguanidin
<b>min</b>	Minuten
<b>MR</b>	Mineralcorticoidrezeptor
<b>MRT</b>	Magnet-Resonanz-Tomographie
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>NAT</b>	Noradrenalintransporter
<b>NNM</b>	Nebennierenmark
<b>NNR</b>	Nebennierenrinde
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>NSE</b>	Neuronenspezifische Enolase
<b>NW</b>	Nebenwirkung
<b>OCT</b>	organische Kationentransporter
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>pNTs</b>	periphere neuroblastische Tumore
<b>POMC</b>	Proopiomelanocortin
<b>SLC</b>	Solute Carrier Transporter
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>SPECT</b>	single photon emission computed tomography
<b>h</b>	Stunden
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>vs.</b>	versus
<b>VIP</b>	vasoactive intestinal peptide
<b>VMA</b>	Vanillinmandelsäure
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik der Arbeit

In der szintigraphischen Diagnostik und der Therapie von Neuroblastomen wird radioaktiv markiertes Metaiodbenzylguanidin (mIBG) genutzt, welches ähnlich wie Noradrenalin (NA) über den Noradrenalintransporter (NAT) in die Tumorzellen transportiert wird (1, 2). Eine weitere nuklearmedizinische Methode, die sich noch nicht im klinischen Alltag der Diagnostik des Neuroblastoms etabliert hat, jedoch sehr vielversprechend erscheint, ist die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Das hierbei verwendete [<sup>18</sup>F]Fluordopamin ([<sup>18</sup>F]FDA) zeigt eine Aufnahme entsprechend dem Dopamin (DA) (3). Die Inkorporation erfolgt hauptsächlich über den NAT und den Dopamintransporter (DAT). Allerdings werden die genannten Substanzen auch in extratumorales Gewebe, v.a. über organische Kationentransporter (OCT), aufgenommen (4-7).

Bayer et al. zeigten in Zellkulturversuchen, dass das Glucocorticoid (GC) Corticosteron den OCT hemmt und somit in Kombination mit [<sup>123</sup>I]mIBG oder 6-[<sup>18</sup>F]FDA genutzt werden könnte, um die Aufnahme der radioaktiven Tracer in die Tumorzellen zu verbessern (7). Von besonderer Bedeutung hierbei ist der OCT3, der im Vergleich zu OCT1 und OCT2 am stärksten auf die inhibitorische Wirkung von Corticosteron anspricht (8-11).

Da Corticosteron nicht im klinischen Alltag verwendet wird, ist es Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob andere GC, welche zur therapeutischen Verwendung zugelassen sind, eine ähnliche hemmende Wirkung auf die Aufnahme des OCT3 haben.

Aus diesem Grund wurden Versuchsreihen bezüglich der Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen in neuronale als auch extraneuronale Zellen unter Einfluss von verschiedenen GC durchgeführt. Hierzu wurden Neuroblastomzelllinien und eine OCT3-exprimierende Zelllinie verwendet. Als „Ersatzsubstrate“ für [<sup>123</sup>I]mIBG bzw. 6-[<sup>18</sup>F]FDA dienten Tritium markiertes NA

und DA ( $[^3\text{H}]$ NA,  $[^3\text{H}]$ DA). Als Glucocorticoide mit möglicher inhibitorischer Wirkung auf die Aufnahme der Katecholamine wurden Hydrocortison, Prednisolon und Dexamethason getestet. Diese Substanzen finden eine breite Verwendung im klinischen Alltag.

Würde sich die Annahme bestätigen, dass die verwendeten GC ähnlich wie Corticosteron eine hemmende Wirkung auf die extraneuronalen Transportsysteme haben, dann könnte in der Diagnostik des Neuroblastoms dieser Effekt genutzt werden, um den radioaktiven Uptake in Richtung des tumorösen Gewebes zu verschieben. Es könnten sich weniger radioaktive Substanzen über den OCT im gesunden, körpereigenen Gewebe anreichern und die Detektion des Tumors könnte durch eine präzisere Bildgebung verbessert werden.

Um einen Einblick in die Thematik dieser Arbeit zu erhalten, wird im Folgenden kurz auf die theoretischen Grundlagen des Neuroblastoms, die Transportsysteme der Katecholamine sowie die GC eingegangen.

## **1.2 Das Neuroblastom**

### **1.2.1 Definition, Ätiologie und Genetik**

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor im Kindesalter, wobei die Inzidenz mit dem Lebensalter sinkt und das Erkrankungsmaximum vor dem ersten Lebensjahr liegt (12, 13). Der Tumor leitet sich von pluripotenten Zellen der Neuralleiste ab und hat seinen Ursprung im sympathischen Nervengewebe (14). Hierdurch besitzen die meisten Neuroblastomzellen die Fähigkeit sowohl NA zu synthetisieren, als auch den entsprechenden NAT zu exprimieren (15).

Die Ätiologie ist weitgehend unbekannt. In seltenen Fällen wurde ein familiär gehäuftes Auftreten beobachtet (16). Des Weiteren gibt es Hinweise auf Assoziationen des Tumors mit anderen Erkrankungen, welche mit einer globalen Störung der Zellen aus der Neuralleiste einhergehen. Hierbei sind u.a.

die Neurofibromatose 1, die Aganglionose, das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom und das 45/X-Syndrom zu nennen (17-21).

Im Zusammenhang mit dem Tumor stehen komplexe genetische Veränderungen. Bei einer Großzahl der Tumorzellen können polyploide Modifikationen im Karyogramm nachgewiesen werden (22). Weiterhin kommt es in 25% der Fälle zu einer Amplifikation des Protoonkogens N-Myc, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht (23, 24). Diese genetische Variation ist immer mit einer Deletion des kurzen Arms auf Chromosom 1 (1p) oder einer Verlängerung des langen Arms von Chromosom 17 (17q) assoziiert (25-28).

### **1.2.2 Pathologie und Tumorklassifikationen**

Das Neuroblastom zählt zu den peripheren neuroblastischen Tumoren (pNTs) (29). PNTs verhalten sich heterogen, so dass es zu spontanen Regressionen sowie zu plötzlichen aggressiven Progressionen kommen kann (15, 30). Für eine prognostische Auswertung wurde die „International Neuroblastoma Pathology Classification“ entwickelt, welche u.a. neuroblastische Tumore, gemessen am Anteil des Schwannzell-Stromas, klassifiziert (29). Die Neuroblastome werden weiterhin in differenzierte, wenig differenzierte und undifferenzierte Subtypen unterteilt. Für eine weltweite, einheitliche Stadieneinteilung des Neuroblastoms wurde das „International neuroblastoma staging system“ (INSS) entwickelt. Hierbei wird zwischen insgesamt 6 Tumorstadien unterschieden, welche abhängig von der Lokalisation, der Metastasierung und der Resektabilität des Tumors sind (31, 32). Eine Sonderstellung nimmt das Stadium IVS ein, welches nur im ersten Lebensjahr beobachtet wird. Es geht mit Metastasen u.a. in der Haut, der Leber sowie des Knochenmarks einher und hat trotz des fulminanten Verlaufs eine gute Prognose (33-36). Da das INSS nur postoperative Aspekte berücksichtigt, etablierte sich im Jahr 2009, im Hinblick auf eine prätherapeutische Risikostratifizierung, das „International Neuroblastoma Risk Group Classification System“ (INRG) und das „International Neuroblastoma Risk Group Staging System“ (INRGSS) (37-39). Der Unterschied besteht u.a. in der

Berücksichtigung bildgebender Diagnostik vor einem chirurgischen Eingriff.

### **1.2.3 Diagnostik**

Da der Großteil der Neuroblastome Katecholamine synthetisiert, kann der Anteil an Katecholaminmetaboliten im Urin wegweisend für die Diagnose des Tumors sein und auch als Screeningmethode eingesetzt werden. Bestimmt werden Homovanillinsäure (HVA), Vanillinmandelsäure (VMA) und DA (40-42). Allerdings kommt es durch das Screening nicht zur Reduktion der Gesamtmortalität, weshalb die Methode zur Früherkennung fragwürdig ist und nicht mehr angewendet wird (43). Hingegen sind bei Verdacht auf ein Neuroblastom u.a. der Quotient aus VMA/HVA sowie eine Erhöhung des Serumferritins und der neuronenspezifischen Enolase (NSE) eine Hilfestellung bei der prognostischen Einschätzung der Erkrankung (31, 44, 45).

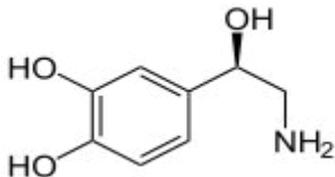
Zur Darstellung von Neuroblastomen wird die Ultraschalldiagnostik, die Computertomographie (CT) und die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) genutzt (46-49). Der definitive Nachweis des Tumors sollte allerdings durch eine histologische Sicherung erfolgen (50, 51).

Weiterhin wird routinemäßig die Szintigraphie mit [<sup>131</sup>I]mIBG und [<sup>123</sup>I]mIBG eingesetzt (1, 52, 53). Da dieses Diagnoseverfahren bedeutend für die vorliegende Arbeit ist, wird im Folgenden nochmals gesondert hierauf eingegangen.

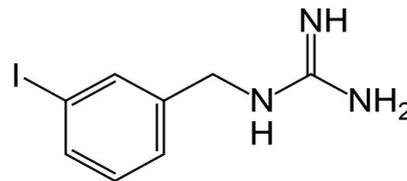
#### **1.2.3.1 MIBG-Szintigraphie**

Mit der mIBG-Szintigraphie können Primärtumore und sekundäre Neuroblastomherde mit einer Spezifität von nahezu 100% und einer Sensitivität von ca. 90 % dargestellt werden (5, 52, 54-56). Diese nuklearmedizinische Untersuchung dient als Standardverfahren zur Detektion und dem anschließenden Staging von Tumoren des neuroektodermalen Systems (Neuroblastom, Phäochromozytom, Paragangliom) (1, 57-59).

MIBG wird hierbei mit den Iod-Isotopen  $^{131}\text{I}$  oder  $^{123}\text{I}$  markiert.  $^{123}\text{I}$  hat sich ohne einen Anteil an  $\beta$ -Strahlung und mit einer kürzeren Halbwertszeit (HWZ) in der Diagnostik durchgesetzt (60). Hingegen wird  $^{131}\text{I}$  therapeutisch v.a. bei nicht operablen und bereits metastasierten Neuroblastomen genutzt (61-63). Strukturell zeigt mIBG gewisse Ähnlichkeiten zu NA, weshalb eine Aufnahme ebenfalls aktiv über den NAT erfolgt.



Noradrenalin



mIBG

Allerdings kommt es durch eine Inkorporation über den OCT auch zur Anreicherung von mIBG in nicht-tumoralen, gesunden Körperzellen der Lunge, der Leber, des Darms, des Myokards und der Harnblase (5-7). Hierdurch werden die diagnostischen Bedingungen deutlich erschwert.

Die Radionuklide sammeln sich in 90%-95% der Fälle im Primärtumor, Knochen, Knochenmark und Lymphknoten an, wobei die Darstellung von Metastasen im ZNS geringer ist (64, 65). Sie zerfallen zu einem stabileren Nuklid und geben Energie frei, welche dann als radioaktive Strahlung detektiert werden kann. Zur Aufzeichnung werden Kameras zum planaren Scannen sowie die SPECT (engl.: single photon emission computed tomography) genutzt. Letztere Methode ermöglicht eine bessere Ortsauflösung, so dass Läsionen sensitiver detektiert werden können (66). 40-55% des verabreichten mIBG wird innerhalb von 24h nach Applikation über den Urin ausgeschieden (67).

In Zukunft könnten weitere Trägersubstanzen wie 2- $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglukose (2- $^{18}\text{F}$ FDG) oder 6- $^{18}\text{F}$ FDA mittels PET eingesetzt werden, wobei die Aufnahme von 2- $^{18}\text{F}$ FDG über den Glucosetransporter erfolgt und nicht Neuroblastom-spezifisch ist. Allerdings liegen bisher wenige klinische Daten bezüglich der Nutzung dieser Radiopharmaka zur Diagnostik des Neuroblastoms vor (68-71). In der Vergangenheit spielte 6-FDA u.a. in der Detektion von neuroendokrinen Neoplasien wie dem Phäochromozytom eine

Rolle (72, 73). Die Substanz ist DA strukturell ähnlich, sodass die Aufnahme von 6-FDA hauptsächlich über den NAT und den DAT erfolgt (3, 8, 74, 75). Allerdings wurde ähnlich dem mIBG eine Inkorporation von DA in die OCT-exprimierenden Körperzellen registriert (8, 76). Weiterhin wies Bayer eine kompetitive Hemmung der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme durch 6-FDA in OCT3-exprimierende Zellen nach. Somit konnte indirekt eine Aufnahme von 6-FDA über die extraneuronalen Transporter nachgewiesen werden (8).

#### **1.2.4 Symptome, Therapie und Prognose**

Das Neuroblastom manifestiert sich am häufigsten im Abdomen, hier v.a. im Nebennierenmark (NNM), und zeigt ein invasives Wachstum (49). Weiterhin finden sich die Primärtumore zervikal, thorakal und abdominal entlang des Grenzstrangs (77). Generell ist das Erscheinungsbild der Erkrankung sehr variabel. Patienten im lokalisierten Stadium sind oft asymptomatisch. Neben unspezifischen Allgemeinsymptomen können auch Beschwerden auftreten die durch Metastasen bzw. den Primärtumor hervorgerufen werden. Metastasen treten v.a. in Leber, Knochen, Knochenmark und Lymphknoten auf (49, 77). Durch lokale Verdrängung kann es zur Beeinträchtigung von Organen kommen. So ist das Stadium IVs durch eine massive Infiltration der Leber gekennzeichnet (78, 79). Bei einer zervikalen Tumorausbreitung kommt es z.T. zum Auftreten eines Horner-Syndroms (80, 81). In Zusammenhang mit dem Tumor stehen auch paraneoplastische Syndrome wie das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom oder eine übermäßige Ausschüttung von VIP (vasoactive intestinal peptide), welche zu schwerer Diarrhoe führen kann (82-84).

Die Therapie des Neuroblastoms sollte möglichst stratifiziert ausgerichtet sein und beinhaltet multimodale Behandlungsansätze. Diese Risikostratifizierung, entwickelt nach der „Children's Oncology Group“, ist u.a. abhängig von Faktoren wie Alter, INSS-Stadium, Histopathologie, DNA-Index und N-Myc-Amplifikation (85-87). Da es z.T. auch zu spontanen Regressionen kommt, wird oftmals eine alleinige, engmaschige Beobachtung empfohlen. Weiterhin reicht die Therapie von einer chirurgischen Entfernung bis hin zur

Strahlen- oder Chemotherapie sowie der autologen Stammzelltransplantation (88-93) . Die Patienten werden unter Berücksichtigung der genannten Faktoren drei unterschiedlichen Risikogruppen zugeteilt. Hierzu zählen eine Niedrigrisikogruppe, eine Gruppe mit mittlerem Risiko und eine Hochrisikogruppe (94).

Die prognostische Einschätzung des Neuroblastoms muss individuell abgeschätzt werden. Die Einbeziehung einer großen Anzahl von Prognosefaktoren, zu denen klinische, histologische, laborchemische und molekulargenetische Parameter gehören, ist hierbei von Bedeutung (95). Zu den wichtigsten Prognosefaktoren zählen u.a. das Alter, die Resektabilität, die Lokalisation, das INSS-Stadium, das Vorhandensein einer N-Myc-Amplifikation bzw. 1p-Deletion sowie eine Erhöhung des Ferritins, der LDH und der NSE (31, 44, 45, 96).

### **1.2.5 Besonderheiten der Neuroblastomzellen**

Zuletzt wird auf die Besonderheiten der Neuroblastomzellen eingegangen, da dies von Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse ist.

Neuroblastomzellen scheinen aus arretierten Progenitorzellen der Neuralleiste hervorzugehen. Sie besitzen wie ihre Vorläuferzellen die Eigenschaft einer großen Plastizität sowie der Möglichkeit zur Transdifferenzierung (97). Es gibt verschiedene Phänotypen von Neuroblastomzellen. Hierzu gehören der neuroblastische N-Typ, der Substrat-adhärenz S-Typ und der I-Typ, welcher eine intermediäre Stellung zwischen den beiden genannten Zelltypen einnimmt (98, 99). Der vorwiegende Teil der Tumore besteht aus den neuronalen N-Typ-Zellen und zeigt eine Expression des NAT sowie eine Katcholaminsynthese (40). Im Gegensatz zu S-Typ-Zellen zeichnen sich N-Typ-Zellen durch ein hohes Tumorstadium aus (97, 100). Lediglich 5-12% der Neuroblastome werden aus S-Typ-Zellen gebildet und zeigen diese Eigenschaften nicht. Allerdings können die Zelltypen ineinander übergehen, so dass die Differenzierung bidirektional und reversibel ist (97).

### **1.3 Der Noradrenalintransporter (NAT) und die nicht neuronalen Monoamintransporter (Organische Kationentransporter, OCT)**

#### **1.3.1 Der Noradrenalintransporter (NAT)**

Der NAT bildet gemeinsam mit dem DAT und dem 5-HTT (Serotonin-Transporter) das sogenannte Uptake1-System und zählt zur Gruppe der „Solute Carrier Transporter“ (SLC) (101-103). Er wird in sympathischen Neuronen exprimiert, wo er zum Großteil in den präsynaptischen Membranen sowie intrazellulär in den Membranen der Speichervesikel lokalisiert ist (104). Der ATP-abhängige Transporter transportiert nicht nur NA, sondern auch DA (105, 106). In der Literatur wird eine höhere Affinität des NAT gegenüber DA beschrieben (106). Des Weiteren können Benzylguanidine, wie das in der Neuroblastomdiagnostik verwendete mIBG und Dopaminanaloga wie 6-FDA, durch den NAT inkorporiert werden. Der Genabschnitt für den Transporter ist auf Chromosom 16 lokalisiert (107). Der NAT verfügt über 12 bis 13 hydrophobe Transmembrandomänen und setzt sich aus 617 Aminosäuren zusammen (108). Weiterhin handelt es sich um einen Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Transporter (109, 110). Mit der Strukturaufklärung konnten verschiedene Pharmaka entwickelt werden, welche sowohl therapeutisch genutzt, aber auch als „Drogen“ missbraucht werden. Als Hemmstoffe lassen sich an dieser Stelle Kokain und Amphetamine nennen (111). Es sind allerdings auch spezifische Inhibitoren wie Nisoxetin, Desipramin und andere trizyklische Antidepressiva bekannt (112).

#### **1.3.2 Die nicht neuronalen Monoamintransporter (Organische Kationentransporter, OCT)**

Die extraneuronalen Monoamintransporter, die auch als organische Kationentransporter (OCT) bezeichnet werden, zählen ebenfalls zu der SLC-Familie, sind genetisch auf Chromosom 6 lokalisiert und ähneln sich

strukturell (113-115). Die OCT gehören zu dem sogenannten Uptake2-System und können ähnlich wie der NAT und der DAT Katecholamine transportieren. Sie umfassen den OCT1, den OCT2 und den OCT3. In dieser Arbeit wurde das Verhalten des OCT3, welcher auf HEK293-Zellen exprimiert wird, untersucht. Dieser Transporter weist die höchste Transporteffizienz gegenüber Katecholaminen auf, während der OCT1 und der OCT2 hierbei eine eher untergeordnete Rolle spielen (116-119). Die verschiedenen Transporter bevorzugen Katecholamine in unterschiedlicher Weise. Der OCT3 ist der einzige Transporter dieser Gruppe der eine stärkere Affinität zu NA als zu DA aufweist (9). Neben den Katecholaminen können die extraneuronalen Monoamintransporter noch weitere Substrate inkorporieren. Allerdings ist das Aufnahmespektrum der Transporter verschieden (117). Die Verteilung der Transporter im Organismus ist unterschiedlich und sie werden im Vergleich zum Uptake1-System durch andere Inhibitoren beeinflusst. Gegenüber dem OCT1 und dem OCT2 wird der OCT3 am stärksten durch den Inhibitor Corticosteron beeinflusst. Somit ist der OCT3 von besonderer Bedeutung für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit (8-11).

**Tab. 1:** Eigenschaften des NAT und des OCT3 im Vergleich (modifizierte Tabelle nach Bayer und Sauer (8, 76))

<b>Transporter</b>	<b>Substratspezifität</b>	<b>Verteilung im Organismus</b>	<b>Inhibitoren</b>
<b>NAT</b>	DA > NA > Adrenalin	Leber NNM Plazenta sympath. Gewebe	Desipramin Kokain Nisoxetin trizyklische Antidepressiva
<b>OCT3</b>	Adrenalin >> NA > DA	Darm Gefäße Herz Leber Lunge Niere Plazenta Retina ZNS	Corticosteron Isocyanine O-methylisoprenaline

## 1.4 Glucocorticoide

### 1.4.1 Wirkung und Regulation im menschlichen Organismus

Die Entdeckung der Hormone der Nebennierenrinde (NNR), zu welchen auch die GC gehören, gelang zwischen 1936 und 1953 unabhängig voneinander durch Kendall, Wintersteiner und Reichstein (120).

GC zählen zu den Corticosteroiden und werden hauptsächlich in der Zona fasciculata der NNR synthetisiert. Die Ausgangssubstanz stellt das Cholesteroldar, aus welchem alle Steroidhormone aufgebaut werden (121, 122). Das Grundgerüst besteht aus drei hexagonalen sowie einem pentagonalen Kohlenstoffring. Endogene GC, zu welchen Hydrocortison (95%) sowie Corticosteron (5%) gehören, modulieren die Expression von 10% der menschlichen Gene (123). Es sind essentielle Stoffe des menschlichen Körpers, die u.a. wichtig für die Homöostase sind und als Reaktion auf physischen und psychischen Stress ausgeschüttet werden (124, 125). So beeinflussen GC zahlreiche Körperfunktionen (123). Sie haben eine katabole Wirkung auf den Energiestoffwechsel, sind proapoptotisch und regulieren den Wasser- und Elektrolythaushalt, das Immunsystem, das Zellwachstum sowie die Knochendichte. Außerdem modellieren sie zentrale Funktionen wie das Essverhalten, die Körpertemperatur, die Schmerzwahrnehmung und das Verhalten des Menschen (126-132). GC werden u.a. bei Erkrankungen neurologischer und rheumatologischer Art eingesetzt. Weiterhin finden sie ihre Verwendung in der Therapie des Asthmas und akuten Notfällen wie dem Status asthmaticus und dem anaphylaktischen Schock (133-137). Hier spielt v.a. ihre immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung eine besondere Rolle (138, 139).

Auf molekularer Ebene erhöhen sie die Transkription von Genen, welche für antiinflammatorische Proteine codieren (140). Ist das GC-Level im Körper über längere Zeit erhöht, kommt es zu unerwünschten Effekten (141). Diese können entweder durch eine Hypersekretion bzw. durch eine erhöhte externe Zufuhr hervorgerufen werden. Die Nebenwirkungen (NW) sind vielfältig, weshalb unter

medikamentöser Therapie eine adäquate Dosierung von Bedeutung ist. Es können beispielsweise Komplikationen wie Osteoporose, die Entwicklung eines Diabetes mellitus oder psychiatrische Auffälligkeiten auftreten (134, 142-147). Des Weiteren erhöhen GC den Blutdruck indirekt durch eine Steigerung der Sensitivität des Gewebes gegenüber Katecholaminen und durch ihre mineralcorticoide Wirkung (148-150). Beim Hypercortisolismus (Cushing-Syndrom) kommt es zum typischen Erscheinungsbild mit „Stiernacken“, „Vollmondgesicht“, Striae rubrae und Stammfettsucht (151, 152). Die beschriebenen Pathologien stellen nur einen kleinen Teil der möglichen Auswirkungen eines erhöhten GC-Spiegels dar. Umgekehrt kommt es bei einer Hyposekretion der GC wie beispielsweise bei der primären Nebenniereninsuffizienz (M. Addison) u.a. zu Hypotonie, Gewichtsverlust, Hyperpigmentation, abdominalen Beschwerden, Elektrolytentgleisungen, hypoglykämischen Stoffwechsellagen und Schwäche (153, 154).

Die Biosynthese der GC wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse reguliert. Das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) bildet hierbei den Ausgangspunkt der Stimulation. CRH wird in einem zirkadianen Rhythmus ausgeschüttet und nimmt eine zentrale Rolle bei der Reaktion des Körpers auf Stress ein (155-157). Das Hormon aus dem Hypothalamus führt gemeinsam mit Arginin-Vasopressin (AVP) zur Ausschüttung von Adrenocorticotropin (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen (158). ACTH wird aus der Vorstufe Proopiomelanocortin (POMC) gebildet und stimuliert wiederum die Freisetzung von Cortisol/Corticosteron aus der Nebennierenrinde (159, 160). Diese Kaskade wird letztendlich über einen negativen Feedbackmechanismus gesteuert (123, 161).

#### **1.4.2 Synthetische Glucocorticoide**

GC entfalten ihre Wirkung hauptsächlich über die Bindung an Glucocorticoidrezeptoren (GR). Daneben wirken sie auch an Mineralocorticoidrezeptoren (MR). Durch eine mineralcorticoide Wirkung kommt

es zu einer gesteigerten Natriumretention und Kaliumausscheidung. Hierdurch können ebenfalls unerwünschte NW entstehen (metabolische Alkalose, Hypertonie/ Ödembildung durch Wasserretention, Hypokaliämie) (162, 163).

Von Bedeutung ist somit u.a. die unterschiedliche glucocorticoide bzw. mineralcorticoide Potenz der verschiedenen GC. Die Forschung hat sich in der Vergangenheit intensiv mit der Frage beschäftigt, wie NW reduziert werden können, ohne dass sich die erwünschte, antiinflammatorische Wirkung der GC verringert. NW entstehen häufig aufgrund von hohen GC-Dosen. Deshalb wurden GC synthetisch hergestellt, welche eine hohe glucocorticoide Potenz aufweisen, somit in geringeren Dosen appliziert werden können und trotzdem eine ähnliche klinische Effizienz zeigen (164, 165).

Die am häufigsten klinisch genutzten, synthetischen GC sind Prednisolon und Dexamethason. Insgesamt zählen sie wie auch Hydrocortison zu den GC mit schwacher Potenz (166). Dennoch unterscheiden sich die GC innerhalb dieser Gruppe in ihren Eigenschaften. Prednisolon hat beispielsweise im Vergleich zu Hydrocortison eine Doppelbindung im Ring A des Steroidgerüsts mehr (2.1.5). Dieser Strukturunterschied führt zu einer stärkeren glucocorticoiden und einer schwächeren mineralcorticoiden Wirkung. Das endogene Hydrocortison weist demnach eine nur schwache glucocorticoide Potenz auf, besitzt allerdings gegenüber Dexamethason und Prednisolon die stärkste mineralcorticoide Wirkung (162, 167, 168). Dexamethason hingegen besitzt keine mineralcorticoide, dafür eine stärkere glucocorticoide Wirkung (169).

Weiterhin unterscheiden sich GC auch in ihrer Wirkdauer bzw. dem Wirkungsbeginn (170). Hydrocortison und Prednisolon haben im Gegensatz zu Dexamethason eine kurze HWZ (171, 172). Durch eine unterschiedliche Pharmakokinetik und -dynamik differiert auch die Behandlungseffizienz von Erkrankungen. Im Vergleich zu Prednisolon zeigt Dexamethason beispielsweise eine höhere Zytotoxizität und Wirksamkeit in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) (173, 174).

**Tab. 2:** Glucocorticoide/ mineralcorticoide Potenz und biologische HWZ verschiedener Corticosteroide

Potenz	Hydrocortison (=Cortisol)	Prednisolon	Dexamethason
Relative glucocorticoide Potenz (Hydrocortison = 1)	=	>	>>
Relative mineralcorticoide Potenz (Hydrocortison = 1)	=	<	<<
Biologische HWZ	sehr kurz	kurz	lang

### 1.4.3 Glucocorticoidrezeptoren

GC sind im menschlichen Organismus u.a. an der Regulation von Wachstums-/Verhaltens- und Stoffwechselprozessen sowie der Apoptose beteiligt. Die Steuerung diese Effekte wird größtenteils über Interaktionen mit dem Glucocorticoidrezeptor (GR) gesteuert. Die Vielfalt der Prozesse, welche durch GC ausgelöst werden, wird durch eine große Variation der GR ermöglicht. Durch alternatives RNA-Spleißen und posttranslationale Modifikationen entstehen viele verschiedene Isoformen des Rezeptors (175). GR sind ubiquitär im Organismus lokalisiert. Heute wird zwischen zwei verschiedenen Rezeptortypen unterschieden: einem zytoplasmatischen und einem membranständigen GR (176, 177). Prinzipiell gibt es drei verschiedene Wirkmechanismen.

1. Einen genomischen Mechanismus, welcher intrazellulär über den zytoplasmatischen Rezeptor die Transkription GC-abhängiger Gene beeinflusst. Diese Wirkung tritt meist erst nach Stunden ein (178).
2. Einem nicht-genomischen Mechanismus, welcher über verschiedene second-messenger-Systeme zu einer raschen Wirkung der GC innerhalb von Minuten führt. Diese Signaltransduktion wird mit dem membranständigen GR in Verbindung gebracht (179, 180).

3. Einem unspezifischen Mechanismus, der durch eine physiko-chemische Wirkung der GC gekennzeichnet ist und dessen Effekt nach Sekunden eintritt (181).

Der GR wird interessanterweise auch in Neuroblastomzellen nachgewiesen (97, 182, 183). In der Literatur wird beschrieben, dass der Rezeptor, welcher intrazellulär in den Neuroblastomzellen lokalisiert ist, mit hoher Affinität und Kapazität Dexamethason bindet. In Versuchen, in welchen SK-N-SH-Zellen mit Dexamethason behandelt wurden, zeigte sich ein inhibitorischer Effekt auf die Chemotaxis der Zellen. Dieser wurde durch Modifikationen im Zytoskelett hervorgerufen. Durch die Zugabe des GR-Antagonisten RU486 wurde diese Wirkung vollständig aufgehoben (182). Weiterhin beschrieb Ross et al. ein signifikantes Ansteigen der Produktion von N-Myc-mRNA nach Behandlung von N-Typ Neuroblastomzellen mit Dexamethason. Vermutet wurde hierbei eine direkte Aktivierung des N-Myc-Promotors durch den GR. Der Effekt konnte ebenfalls durch die Zugabe von RU486 blockiert werden (183). Des Weiteren wurde eine Steigerung der mRNA und der Proteine des NAT nach längerer Exposition von Neuroblastomzellen mit GC nachgewiesen. Hierbei wurde ebenfalls ein durch den GR vermittelter Effekt angenommen (184, 185).

### **1.5 Fragestellung der Arbeit**

Nach einem Einblick in die Thematik, werden nun nochmals die Fragestellungen dieser Arbeit formuliert.

1. Besitzen klinisch relevante GC genau wie Corticosteron eine hemmende Wirkung auf den OCT3?
2. Welche der eingesetzten GC eignen sich als beste Inhibitoren?
3. Wie wirken sich diese GC auf die Katecholaminaufnahme in die NAT-exprimierenden Neuroblastomzelllinien aus?
4. Welche Bedeutung könnte eine Hemmung der OCT3-Zellen durch die GC für die Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms haben?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Messapparaturen/ Geräte

Messapparatur/ Gerät:	Firma:
Brutschrank (Hera cell/ CO2 Auto Zero)	Heraeus
β-Counter	Canberra-Package
Dispender (5 ml)	Brand
Mikroskop (Cx 40)	Olympus
Milli-Q	Millipore
Neubauer Zählkammer	Assistant
Phasenkontrastmikroskop	Will
Repipettierhilfe	Eppendorf
Sterile Werkbank	Heraeus
Vortex	Heidolph
Waage	Sartorius
Wasserbad	Köttermann, Memmert
Zentrifuge - Rotixa 50 Rs - Varifuge 3.2 Rs	- Hettich - Hereaus

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material:</b>	<b>Firma:</b>
Combitips (0,5 ml/ 12,5 ml/ 50 ml)	Eppendorf
Eppendorfcups (2 ml)	Eppendorf
Einmalspritzen (2 ml/ 5 ml/ 20ml)	Braun
Gewebezellkulturflaschen 750 ml	Costar, Greiner
Glaspipetten (1 ml/ 2 ml/ 5 ml/ 10 ml/ 25 ml)	Costar
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner
Pasteurpipetten 230 mm	WU
Pipettenspitzen 200 µl/ 1000 µl	Eppendorf, Sarsted
Sterilfilter NML (0,2 µm Porengröße)	Sartorius
Szintillationsfläschchen 20ml	PerkinElmer
Zentrifugenröhrchen 15 ml/ 50 ml	Greiner, Falcon
Sonstige Materialien: Waage, Handschuhe, Zentrifugenständer, Spatel, Zeituhr, Zähluhr	

### 2.1.3 Zellkulturmedien

<b>Kulturmedium:</b>	<b>Firma:</b>
RPMI 1640 Medium 500ml (w 2.0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w/o L-Glutamin)	Biochrom
D-MEM Medium 500ml (+1000 mg/l Glucose, L-Glutamin, Pyruvat)	GIBCO

## 2.1.4 Chemikalien

Substanz:	Firma:
Ascorbinsäure	Sigma
Dexamethason „klinische Substanz“	Merck
Dexamethason „Reinsubstanz“	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dopamin (DA)	Sigma
Ecolume	ICN
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom
D(+)-Glucose	Sigma
L-Glutamin	Biochrom
Hydrocortison „klinische Substanz“	Merck
Hydrocortison „Reinsubstanz“	Sigma
Noradrenalin (NA)	Sigma
Penicillin/ Streptomycin (P/S)	Biochrom
Phosphate Buffered Salt Solution (mit $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ (PBS <sup>++</sup> ); ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ (PBS))	Gibco
Prednisolon „klinische Substanz“	Merck
TritonX-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin/ EDTA	Biochrom
7,8- <sup>3</sup> H] Dopamin (in 250µl: 250µCi; $6,1 \times 10^{-9}$ Mole [ <sup>3</sup> H]DA; spez. Aktivität: 41 Ci/mmol (=1520 GBq/mmol))	Amersham
7,8- <sup>3</sup> H] Noradrenalin (in 250µl: 250µCi; $2,1 \times 10^{-8}$ Mole [ <sup>3</sup> H]NA; spez. Aktivität: 12 Ci/mmol (=444 GBq/mmol))	Amersham

## 2.1.5 Chemische Struktur der Katecholamine und Glucocorticoide

### Katecholamine

#### Dopamin (DA)

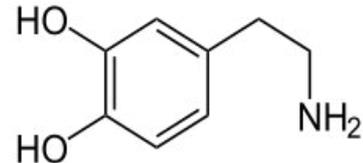
IUPAC: 4-(2-Aminoethyl)-benzene-1,2-diol

Summenformel:  $C_8H_{11}NO_2$

Molekulargewicht: 153,18 g/mol

Bemerkungen:

- Synthese aus Tyrosin/DOPA
- Vorstufe in der Biosynthese von NA und Adrenalin
- Wirkung als Neurotransmitter im ZNS und im vegetativen Nervensystem



#### Noradrenalin (NA)

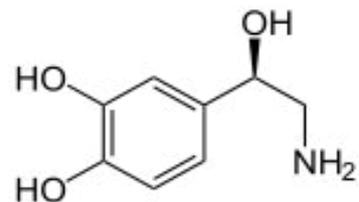
IUPAC: 4-(2-Amino-1-hydroxyethyl)-benzene-1,2-diol

Summenformel:  $C_8H_{11}NO_3$

Molekulargewicht: 169,18 g/mol

Bemerkung:

- Synthese aus Dopamin
- Wirkung als Hormon an Adrenorezeptoren → Vasokonstriktion/Steigerung des Blutdrucks
- Wirkung als Neurotransmitter im ZNS und im sympathischen Nervensystem



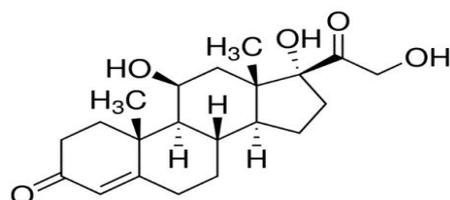
### Glucocorticoide (GC)

#### Hydrocortison

IUPAC: 11β,17α,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion

Summenformel:  $C_{21}H_{30}O_5$

Molekulargewicht: 362,45 g/mol



Bemerkungen:

- *Synthese in der NNR*
- *glucocorticoide Wirkung ~ mineralcorticoide Wirkung*
- *wichtigster Vertreter der menschlichen, endogenen GC*
- *sehr kurze HWZ*

### **Prednisolon**

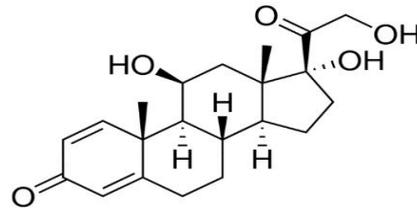
IUPAC: *11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion*

Summenformel:  $C_{21}H_{28}O_5$

Molekulargewicht: *360,44 g/ mol*

Bemerkungen:

- *synthetisches GC*
- *mineralcorticoide Restwirkung*
- *kurze HWZ*



### **Dexamethason**

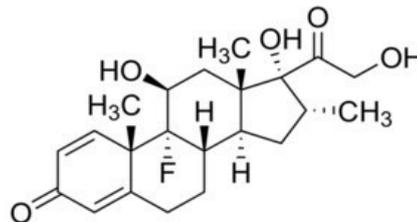
IUPAC: *9 $\alpha$ -Fluor-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-16 $\alpha$ -methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion*

Summenformel:  $C_{22}H_{29}FO_5$

Molekulargewicht: *392,47 g/ mol*

Bemerkungen:

- *synthetisches GC*
- *keine mineralcorticoide Wirkung*
- *stärkere glucocorticoide Wirkung als Hydrocortison/ Prednisolon*
- *lange HWZ*



### **2.1.6 Zelllinien**

Für die Messreihen wurden SK-N-SH-/Kelly- und IMR-32-Zellen als Neuroblastomzelllinien verwendet. Der Grund hierfür liegt in der Heterogenität des Tumors. Die Zelllinien exprimieren in unterschiedlicher Weise den NAT. SK-N-SH-Zellen besitzen die höchste Anzahl des Transporters, gefolgt von der

Kelly- und zuletzt der IMR-32-Zelllinie (NAT-Expression: SK-N-SH > Kelly > IMR-32). Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen eines Tumors je nach Ursprung auf Stammzellebene unterschiedlich entwickeln. Deshalb ist es sinnvoll Zellvariationen zu berücksichtigen, um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten.

### **SK-N-SH-Zellen**

#### **Biologische Quelle:**

neural (Knochenmarksmetastasen des Menschen)

#### **Eigenschaften:**

Adhärentes Wachstum; epitheliale Morphologie; NAT (+++); DAT (+)

#### **Kulturmedium:**

RPMI 1640 Medium; 2mM Glutamin; 10% fötales Kälberserum (FKS); Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 IU/ml

#### **Beschreibung:**

Die SK-N-SH-Zelllinie wurde von einer Knochenmarksmetastase eines 4 Jahre alten kaukasischen Mädchen isoliert, welches an einem Neuroblastom erkrankt war und wird seither für die Erforschung des Tumors genutzt (186). Die Neuroblastomzellen exprimieren auf der Zelloberfläche in großer Anzahl den NAT, wobei eine Expression des DAT nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Hierüber existieren unterschiedliche Ergebnisse. Bayer berichtete in Ihrer Dissertation von fluoreszenzmikroskopischen Signalen, welche nach Suppressionsversuchen mit Zytostatika auf SK-N-SH-Zellen detektiert wurden (unveröffentlichte Ergebnisse von D. Ballweg, (8)).

### **Kelly-Zellen**

#### **Biologische Quelle:**

menschliches Gehirn

#### **Eigenschaften:**

Adhärentes Wachstum; epitheliale Morphologie; NAT (+ → ++)

**Kulturmedium:**

RPMI 1640 Medium; 2mM Glutamin; 10% fötales Kälberserum (FKS); Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 IU/ml

**Beschreibung:**

Kelly-Zellen sind hauptsächlich neuroblastisch. In den Neuroblastomzellen kann eine DOPA-, DA- und NA-Produktion nachgewiesen werden. An Transportsystemen konnte bisher eine geringe Expression des NAT aufgezeigt werden. Quantitativ wird im Vergleich zu den beschriebenen SK-N-SH-Zellen nur 1/5 der NAT-Produktion erreicht (187). Durch eine hohe N-Myc-Amplifikation sind sie ein repräsentatives Modell für einen rasch fortschreitenden Tumor (188, 189).

**IMR-32-Zellen****Biologische Quelle:**

Metastasiertes Gewebe im menschlichen Abdomen, Gehirn

**Eigenschaften:**

Adhärentes Wachstum; Neuroblast/Fibroblast; NAT (+)

**Kulturmedium:**

RPMI 1640 Medium; 2mM Glutamin; 10% fötales Kälberserum (FKS); Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 IU/ml

**Beschreibung:**

Die IMR-32-Zelllinie ist abdomineller Herkunft und wurde aus einem, an einem Neuroblastom erkrankten, 13 Monate alten kaukasischen Jungen isoliert. Die Kultur ist eine Mischung aus zwei eigenständigen morphologischen Zelltypen. Zum einen kleine neuroblastenähnliche Zellen und zum anderen große hyaline Fibroblasten. Die Zelllinie gehört ebenfalls zu den Katecholamin-produzierenden Neuroblastomzelllinien und weist eine Synthese von DA, NA sowie von Serotonin auf (190). Die NAT-Expression ist im Vergleich zu den Kelly- und v.a. den SK-N-SH-Zellen deutlich geringer. IMR-32-Zellen sind teilweise resistent gegen Typ 3 Polioviren und hochresistent gegen ECHO-2-Viren. Weiterhin sind sie für Coxsackie B3 Viren empfänglich (191).

## **OCT3-exprimierende HEK293-Zellen**

### **Biologische Quelle:**

monoklonale, embryonale Nierenzellen (human); HEK = Human Embryonic Kidney

### **Eigenschaften:**

adhärentes Wachstum, leicht vom Kulturflaschenboden lösbar; OCT3 (+++)

### **Kulturmedium:**

D-MEM Medium; 10% fötales Kälberserum (FKS); Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 IU/ml

### **Beschreibung:**

Die OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie exprimiert ausschließlich den extraneuronalen Monoamintransporter (=OCT3). Um eine Zelllinie herzustellen, welche nur den OCT3 trägt, wurde die DNA des Transporters aus der Caki-1-Zelllinie isoliert und auf die HEK293-Zelllinie übertragen. Hierdurch repräsentiert diese Zelllinie besonders gut die Eigenschaften des Transporters, da eintretende Effekte direkt auf den OCT3 zurückgeführt werden können (keine Beeinflussung durch andere Transportsysteme) (9).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen**

Für das Arbeiten mit Zellkulturen gilt die konsequente Beachtung von Hygiene, da Zellen äußerst anfällig für einen Befall mit Pilzen und Bakterien sind. Da die Kulturflaschen innerhalb des Schrankes für einen besseren Gasaustausch belüftet werden, sind sie den in der Luft vorkommenden Keimen ausgesetzt. Um das Kontaminationsrisiko zu senken, muss unter der Sterilbank gearbeitet werden. Diese wird nach Benutzung mit destilliertem Wasser und 70%igen Ethanol gereinigt. Weiterhin muss auf den Gebrauch von Einmalhandschuhen und sterilen Materialien geachtet werden.

### **2.2.1.1 Auftauen von Zellen**

Zur Kultivierung werden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen in der Hand aufgetaut. Die Zellsuspension im Kryotube sollte gerade flüssig sein und dann in ein mit 10 ml Kulturmedium befülltes Zentrifugenröhrchen gegeben werden, da das im Einfriermedium befindliche Dimethylsulfoxid (DMSO) im aufgetauten Zustand zytotoxisch wirkt. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert, um danach die DMSO-haltige Flüssigkeit vom Zellpellet zu trennen. Hiernach erfolgt die Resuspension der Zellen mit frischem Kulturmedium. Diese können nun gleichmäßig auf eine oder mehrere Kulturflaschen verteilt werden.

### **2.2.1.2 Kultivierung von Zellen**

Zur Kultivierung wird jede Kulturflasche (750ml) mit Kulturmedium auf ein Volumen von 32-37ml aufgefüllt und in einem Brutschrank aufbewahrt. Optimale Wachstumsbedingungen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erreicht. Die Zellen sollten nach dem Einsäen für mindestens 24h im Schrank gelagert werden, damit sie am Boden der Kulturflasche adhären. Anschließend wird in regelmäßigen Abständen kontrolliert, ob der Flaschenboden schon komplett mit Zellen besiedelt ist bzw. ob ein Farbumschlag des Mediums stattgefunden hat. Mit der Zeit wird Glucose zu Lactat umgesetzt, was mit einem Absinken des pH-Wertes verbunden ist. Hierdurch verfärbt sich das Medium durch den darin enthaltenen pH-Indikator Phenolrot von Rot (pH 7,4) zu Orange/Gelb (pH 6,5-7). Dies ist ein Zeichen für ein gutes Wachstum der Zellen, da der Farbumschlag eine stattgefundene Stoffwechselleistung anzeigt. Bei noch nicht vollständig bewachsenen Flaschen muss das Kulturmedium bei einem Farbumschlag nach Orange/Gelb ausgewechselt werden, um so die Grundlage für eine weitere Kultivierung sicherzustellen. Die Ausbreitung der Zellen bzw. mögliche Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen können unter dem Phasenmikroskop beurteilt werden. Je nach Zelllinie muss die

Wachstumsgeschwindigkeit und das Aussehen berücksichtigt werden. So wachsen die extraneuronalen OCT3-Zellen schneller als die neuronalen Zelllinien und tendieren beim Ablösen vom Boden dazu, in kugeligen Zellverbänden zu adhären (eigene Beobachtung während der Kultivierung).

### **2.2.1.3 Passagieren von Zellen**

Die Verteilung (Passage) der Zellen auf mehrere neue Kulturflaschen wird bei vollständig bewachsenen Flaschenboden durchgeführt. Die Zellen werden abgelöst, mit neuem Medium substituiert und in frische Kulturflaschen verteilt. Bei Belassen der Kultur in einer voll bewachsenen Flasche oder einem „verbrauchten“ Medium werden die Zellen inadhärent und es kommt zur Apoptose. Das Aufteilen der Zellen wird durch eine um eins höhere Passagezahl dokumentiert. Zuerst wird das Wachstumsmedium mittels Vakuumpumpe abgesaugt (Trennung avitale, abgelöste Zellen von adhären, vitalen Zellen). Damit es zu keiner Durchmischung der Zellen verschiedener Kulturflaschen kommt, muss auf ein regelmäßiges Austauschen der Pasteurpipettenaufsätze geachtet werden. Zum Ablösen der vitalen Zellen wird die Kultur mit Trypsin-EDTA-Lösung (4ml) versetzt. Abhängig von der Adhärenz der jeweiligen Zelllinie darf die Einwirkzeit 2-5min betragen. Hierbei muss beachtet werden, dass diese Zeit nicht überschritten werden soll, sonst kann es zu zellwandschädigenden Effekten kommen. Das Ablösen der Zellen wird schließlich durch Beklopfen der Kulturflaschen erreicht. Die Zellen können daraufhin bei schräg gehaltener Flasche gesammelt werden. Bei der verwendeten OCT3-Zelllinie lösen sich die Zellen ohne Vorbehandlung mit Trypsin durch alleiniges Beklopfen der Flaschen. Nun werden 8ml Medium hinzugeben, um das Trypsin zu neutralisieren und die Zellsuspension wird mehrmals resuspendiert. Abschließend werden die Zellen auf schon vorbereitete Kulturflaschen (mit jeweils ~35ml Wachstumsmedium) verteilt. Beispiel: Passage von  $\frac{1}{4}$  bei insgesamt 12ml Zellsuspension (4ml Trypsin+ 8ml Medium) → Verteilung von jeweils 3ml Zellsuspension auf 4 Kulturflaschen.

### 2.2.1.4 Konservierung von Zellen

Damit auch zu späteren Zeitpunkten die verschiedenen Zelllinien wieder kultiviert werden können, müssen sie zur Konservierung regelmäßig eingefroren werden. Um die Zellen für die Kryokonservierung vorzubereiten, werden diese initial, wie beim Passagieren beschrieben (2.2.1.3), gelöst. Nun erfolgt die Trennung der Zellen vom restlichen Medium mittels Zentrifugation (380G 5min), sodass der Überstand verworfen werden kann. Danach werden dem verbliebenen Zellpellet 1-3ml Einfriermedium hinzugegeben und schließlich jeweils 1ml auf je ein Kryotube verteilt. Das Medium besteht aus 80% des jeweiligen Wachstumsmediums sowie 10% inaktiviertem FKS (Inaktivierung durch 30min Inkubation im 56°C erhitzten Wasserbad) und 10% DMSO. Das DMSO dient als „Frostschutz“ gegen Eiskristallbildung. Allerdings ist DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch, weshalb die Zellen zügig bei -80°C eingefroren werden müssen. Nach einiger Zeit können sie im flüssigen Stickstoff (-196°C) aufbewahrt werden. Die stufenweise Temperaturerniedrigung wirkt ebenfalls der Kristallbildung entgegen.

## 2.2.2 Versuchsdurchführung

### 2.2.2.1 Übersicht

1. Auftauen der Zellen (2.2.1.1)
2. Kultivierung der Zellen im Brutschrank (2.2.1.2)
3. Passagieren und weitere Kultivierung der Zellen (2.2.1.3)
4. Auszählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer und ggf. weitere Kultivierung bei nicht ausreichender Zellzahl (2.2.2.2)
5. Vorbereitung und Durchführung des Versuchstages bei ausreichender Zellzahl (2.2.2.3 - 2.2.2.7):
  - ➔ Herstellung Inkubationspuffer (PBS<sup>+Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup></sup>+Glucose+Ascorbat) zum Aufbewahren der Zellen nach dem Sammeln aus den Gewebekulturflaschen (2.2.2.3)

- Abwiegen der GC (Inhibitoren) und der Katecholamine (unmarkiertes NA/DA)
- Herstellung der radioaktiven Katecholaminlösung (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) (2.2.2.4)
- Herstellung der Verdünnungsreihen mit den jeweiligen GC (Inhibitoren) (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l bis  $1 \times 10^{-3}$  mol/l) (2.2.2.5)
- Zellen sammeln, zentrifugieren und mit Inkubationspuffer suspendieren
- Erneutes Auszählen der Zellen in Neubauerkammer und ggf. zusätzlich Inkubationspuffer suspendieren, um die gewünschte Zellzahl zu erlangen
- Zellen auf die jeweiligen Zentrifugenröhrchen verteilen und in 37°C warmes Wasserbad stellen
- Zellen mit jeweiligem Inhibitor (bzw. ohne Inhibitor als Kontrolle) und der radioaktiven Katecholaminlösung ( $[^3\text{H}]$ DA- bzw.  $[^3\text{H}]$ NA-Lösung) versetzen
- nach Einhalten der Inkubationszeit (15min): Versuch mit eiskaltem PBS<sup>(ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)</sup> abstoppen
- Zellen zentrifugieren und Überstand abkippen
- Wiederholung: abstoppen, zentrifugieren, abkippen des Überstandes
- Zellsuspension mit TritonX-100 versetzen und vortexen
- Pipettieren der Zellen von Zentrifugenröhrchen in zugeordnetes Szintillationsfläschchen und dieses mit Ecolume Szintillationsflüssigkeit versetzen
- Messung der aufgenommenen Radioaktivität im  $\beta$ -Counter

### 2.2.2.2 Auszählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer

Für die Versuche war eine Einstellung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer notwendig. Dazu wurden die Zellen aus den Kulturflaschen gelöst, in einem großen Zentrifugenröhrchen gesammelt und gut resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden mittels Eppendorfpipette

100µl entnommen. Da bei stark besiedelten Kulturflaschen von einer hohen Zelldichte ausgegangen werden konnte, wurde die Suspension mittels Medium um den Faktor 3 bis 6 vorverdünnt, um später das genaue Zählen zu erleichtern. Nun wurden 50µl Trypanblau zu 50µl der Suspension hinzugegeben, was wiederum einem Verdünnungsfaktor von 2 entsprach. Hiernach konnten die Zählkammern befüllt werden. Durch die vorherrschende Kapillarkraft wurde die Suspension gleichmäßig zwischen den Kammern und dem aufgesetzten Deckglas verteilt. Beim Auszählen durften avitale Zellen nicht berücksichtigt werden, um keine falsch hohe Zellzahl zu erfassen. Avitale Zellen ließen sich anhand einer dunkleren Färbung erkennen (Verlust der Stabilität der Zellmembran → stärkere Färbung). Nachdem alle 4 äußeren Gruppenquadrate der Zählkammer erfasst waren, wurde hieraus der Mittelwert (MW) gebildet und dieser mit dem jeweiligen Vorverdünnungs- und Verdünnungsfaktor sowie mit  $10^4$  multipliziert, um die Zellzahl/ml Suspension zu errechnen.

### **2.2.2.3 Herstellung des Inkubationspuffers**

Um die Zellen während des Versuches aufzubewahren, wurde zuvor ein Inkubationspuffer aus 98% PBS<sup>++</sup>, 1% Glucose sowie 1% Ascorbinsäure hergestellt.

Hierzu wurde 1g Glucose zu 10ml PBS<sup>++</sup> hinzugefügt, steril filtriert und schließlich jeweils 5ml auf 500ml Flaschen PBS<sup>++</sup> verteilt. Somit ergab sich für die Glucoselösung eine f.c. von 1g/l  $\cong$  ~5,5mmol/l (Molare Masse von Glucose: 180g/mol). Diese Konzentration stimmt ungefähr mit der Glucosekonzentration im Blutplasma überein.

Die Herstellung der Ascorbinsäurelösung erfolgte separat, indem 29,2mg freie Ascorbinsäure in 36ml Aqua bidest pipettiert wurden. Dies entspricht 0,81mg Ascorbinsäure/ml Aqua bidest. Die Lösung wurde auf Eppendorfcups (~2ml) verteilt und eingefroren. Zur endgültigen Herstellung des Inkubationspuffers wurde 1ml der eingefrorenen Ascorbinsäurelösung (f.c.~0,81mg/ml) zu 99ml PBS<sup>++</sup>-Glucose-Lösung zugefügt. Dementsprechend ergibt sich bei einem

Molekulargewicht von  $\sim 176$  g/mol Ascorbinsäure eine Stoffmengenkonzentration von  $\sim 50\mu\text{mol/l}$  (entspricht etwa der physiologischen Ascorbinsäurekonzentration im Blutplasma).

#### **2.2.2.4 Herstellung der radioaktiven Katecholaminlösung**

Die eingesetzte Endkonzentration der radioaktiv markierten Katecholaminlösung im Reaktionsansatz ( $1 \times 10^6$  Zellen/500 $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer) sollte  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l betragen. Hierfür wurde initial eine Katecholamingrundlösung mit unmarkiertem DA bzw. NA hergestellt. Es wurden jeweils 10 $\mu\text{l}$  Aliquote in 500 $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer hinzugefügt. Unter Berücksichtigung der hierbei vorgenommenen Verdünnung von 1:50, ergab sich eine Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  mol/l für die unmarkierte DA-/NA-Lösung.

1ml dieser unmarkierten Katecholaminlösung wurde schließlich mit jeweils 10 $\mu\text{l}$  ( $\cong 10\mu\text{Ci}$ ) der radioaktiven [ $^3\text{H}$ ]NA- bzw. [ $^3\text{H}$ ]DA-Ausgangslösung versetzt. Aufgrund der geringen Molarität der radioaktiven Ausgangslösung (2.1.4) änderte sich die Gesamtmolarität der nun hergestellten radioaktiven Stammlösung praktisch nicht und konnte deshalb für die Berechnung vernachlässigt werden. Die radioaktive Stammlösung enthielt somit 0,1 $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]DA bzw. [ $^3\text{H}$ ]NA.

#### **2.2.2.5 Herstellung der Glucocorticoid-Verdünnungsreihen**

Um geeignete Versuchsbedingungen für die Messungen zu finden, wurden die GC in einer wasserlöslichen Form, wie sie „im klinischen Alltag“ zur Herstellung von Infusionslösungen verwendet wird, getestet. Hierzu wurde NaCl (0,9%) als Lösungsmittel genutzt. Des Weiteren wurde eine Ethanol-lösliche Form der GC verwendet. Die initiale Lösung wurde mit 100% Ethanol erreicht. Die weiteren Verdünnungsschritte wurden ebenfalls mittels NaCl (0,9%) vorgenommen. Die Anleitung zur Herstellung der Verdünnungsreihen wird im Folgenden aufgeführt (Tab. 3 und 4).

**Tab. 3:** Verdünnungsreihen mit NaCl (0,9%) (f.c.~ $1 \times 10^{-3}$  mol/l) als Lösungsmittel

wasserlösliche Form	$1 \times 10^{-3}$ mol/l (A)	$1 \times 10^{-4}$ mol/l (B)	$1 \times 10^{-5}$ mol/l (C)	$1 \times 10^{-6}$ mol/l (D)	$1 \times 10^{-7}$ mol/l (E)
<b>Hydrocortison</b>	10mg in 541 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l A+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l B+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l C+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l D+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)
<b>Prednisolon</b>	10mg in 426 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l A+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l B+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l C+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l D+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)
<b>Dexamethason</b> (A=f.c.~ $1,5 \times 10^{-4}$ mol/l)	8mg in 293 $\mu$ l NaCl (0,9%) *	100 $\mu$ l A+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l B+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l C+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l D+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)

\*Dexamethason-Stammmlösung mit f.c.~ $1,5 \times 10^{-4}$  mol/l lag in bereits gelöster Form vor

**Tab. 4:** Verdünnungsreihen mit 100% Ethanol (f.c.~ $1 \times 10^{-3}$  mol/l) als Lösungsmittel

Ethanol-lösliche Form	$1 \times 10^{-3}$ mol/l (A)	$1 \times 10^{-4}$ mol/l (B)	$1 \times 10^{-5}$ mol/l (C)	$1 \times 10^{-6}$ mol/l (D)	$1 \times 10^{-7}$ mol/l (E)
<b>Hydrocortison</b>	10mg in 541 $\mu$ l 100%igem Ethanol	100 $\mu$ l A+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l B+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l C+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l D+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)
<b>Prednisolon</b>	10mg in 544 $\mu$ l 100%igem Ethanol	100 $\mu$ l A+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l B+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l C+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l D+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)
<b>Dexamethason</b>	10mg in 500 $\mu$ l 100%igem Ethanol	100 $\mu$ l A+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l B+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l C+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)	100 $\mu$ l D+ 900 $\mu$ l NaCl (0,9%)

### 2.2.2.6 Vorbereitung der Zentrifugenröhrchen

Nach dem Auszählen (2.2.2.2) wurde die Zellsuspension bei 18°C und 380G 5min zentrifugiert. Hiernach wurde das überschüssige Medium entfernt. Zu den Zellen wurde nun der Inkubationspuffer (2.2.2.3) abhängig von der

gewünschten Zelldichte/500µl Suspension hinzugeben.

Da pro Röhrchen ein Volumen von 500µl vorgesehen war, wurde beispielsweise für 50 Versuchsröhrchen 25ml Inkubationspuffer benötigt. Die Zellzahl wurde durch Zugabe des Puffers auf  $1 \times 10^6$  Zellen/500µl eingestellt.

### **2.2.2.7 Versuchsprotokoll**

Die Versuche dienten der Untersuchung des inhibitorischen Einflusses verschiedener GC auf die Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen in OCT3-exprimierende HEK293-Zellen sowie NAT-exprimierende SK-N-SH-/Kelly- und IMR-32-Zellen. Eine Auflistung aller Arbeitsschritte der Aufnahmeversuche ist in Tab.5 dargestellt.

Zu den zuvor bearbeiteten Zellen wurde schließlich TritonX-100 hinzugegeben. Dieses nicht-ionische Tensid erhöht die Zellpermeabilität und führt zu einer Lyse. Das Zelllysat wurde mit der Szintillationsflüssigkeit versetzt und zur Erfassung des  $\beta$ -Zerfalls des Tritiums/min (=cpm) im  $\beta$ -Counter in das Isotopenlabor gesendet.

**Tab. 5:** Versuchsprotokoll: Arbeitsschritte der radioaktiven Aufnahmeversuche (modifizierte Tabelle nach Bayer (8))

1	Vorbereitung der Zellen für die Aufnahmeversuche (siehe 2.2.2.2 bis 2.2.2.6)
2	Inkubation der Versuchsröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad
3	Versetzen des vorher beschrifteten Versuchsröhrchens mit 10µl des jeweiligen GC der entsprechenden Konzentration ( $1 \times 10^{-7}$ bis $1 \times 10^{-3}$ mol/l) (2.2.2.5)
4	Im direkten Anschluss jedes Versuchsröhrchen mit 10µl der radioaktiven Katecholaminlösung (f.c. $\sim 1 \times 10^{-7}$ mol/l) versetzen (2.2.2.4)
5	Kurzes Schwenken der Versuchsröhrchen (zur Durchmischung der Katecholamine und GC mit den Zellen)
6	15min Einwirkzeit der Substanzen bei 37°C
7	Abstoppen der Reaktion durch 10ml eiskaltes PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )
8	Zentrifugieren der Versuchsröhrchen (5min, 8°C, 488G)
9	Abschütten des Überstandes
10	Wiederholung Schritt 7 bis 9
11	Abpipettieren der über dem Zellpellet verbliebenen Lösung
12	Zugabe von jeweils 500µl TritonX-100/Versuchsröhrchen
13	Gründliches Vortexen (zur Lyse der Zellen und Freisetzung der aufgenommenen radioaktiven Substanz)
14	Abpipettieren von 450µl der in TritonX-100 gelösten Zellsuspension des jeweiligen Versuchsröhrchens und Verteilung in nummerierte Szintillationsfläschchen
15	Zugabe von jeweils 6ml Szintillationsflüssigkeit (Ecolume) zu den Fläschchen und kurzes Vortexen zur Durchmischung
16	Am folgenden Tag: Einschicken der Szintillationsfläschchen in das Isotopenlabor zur quantitativen Erfassung der Radioaktivität im $\beta$ -Counter
17	Entsorgung der radioaktiven Abfälle

### 2.2.2.8 Bestimmung des 100%-Wertes

Zusätzlich zu den in Tab. 5 angegebenen Arbeitsschritten wurde bei jedem Versuch eine Dreifachmessung der eingesetzten radioaktiven Katecholaminlösungen vorgenommen. Hieraus wurde schließlich der Mittelwert

bestimmt. Es wurden jeweils 10µl der [<sup>3</sup>H]DA- bzw. [<sup>3</sup>H]NA-Lösung zu 500µl TritonX-100 hinzugefügt. Die weiteren Arbeitsschritte entsprachen den Schritten 14-17 in Tab. 5. Die Messungen der angebotenen Radioaktivität/500µl TritonX-100 dienten der Festlegung eines 100%-Wertes. Mit dem 100%-Wert konnte eine Quantifizierung der radioaktiven Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien vorgenommen werden. Die radioaktive Aufnahme in die Zelllinien wurde mittels Dreisatz bestimmt und prozentual angegeben (Rechenweg unter 2.2.3). Hiermit konnte die Gesamtaufnahmen der Zelllinien untereinander verglichen werden.

Die Messungen im β-Counter erfolgten in „counts per minute“= cpm. Dies entspricht dem β-Zerfall pro Minute. Ein Messwert von angenommen 222.000cpm kann folgendermaßen nachvollzogen werden:

- 0,1µCi  $\cong$  3700Bq (dies ergibt sich aus den Angaben der radioaktiven Ausgangslösung 2.1.4 → 41 Ci = 1520 Gbq/ mmol)
- 1Bq  $\cong$  1 Zerfall (count)/sek → 60 Zerfälle/min („counts per minute“)
- somit ergibt sich: 3700Bq x 60 = 222.000 cpm

Durch u.a. Pipettierungenauigkeiten kann dieser Wert nur ungefähr erreicht werden.

### **2.2.3 Auswertung und graphische Darstellung der Screening- und Hauptversuche**

Die Screeningversuche dienten der Testung eines möglichen inhibitorischen Einfluss verschiedener GC auf die Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen über den NAT und den OCT3. Durchgeführt wurden die Versuche mit 4 unterschiedlichen Zelllinien: OCT3-exprimierende HEK293-Zellen sowie NAT-exprimierende SK-N-SH-/ Kelly- und IMR-32-Zellen. Die Zellzahl pro 500µl Versuchsansatz betrug jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen. Als mögliche Inhibitoren wurden die GC Hydrocortison, Prednisolon und Dexamethason verwendet. Für alle Versuche, einschließlich der Hauptversuche, wurden die mit Tritium markierten Katecholamine DA und NA ([<sup>3</sup>H]DA/ [<sup>3</sup>H]NA) verwendet. Die final concentration (f.c.) betrug pro

Reaktionsansatz  $1 \times 10^{-7}$  mol/l (2.2.2.4).

Initial wurde eine Messreihe mit den genannten GC in verschiedenen Lösungsformen durchgeführt. Zum einen wurden Substanzformen der GC verwendet, wie sie „im klinischen Alltag“ zur Herstellung von Infusionslösungen genutzt werden. Als Lösungsmittel wurde hierzu NaCl (0,9%) verwendet. Zum anderen wurden GC verwendet, welche sich initial in 100%igem Ethanol lösen ließen und schließlich mit NaCl (0,9%) weiter verdünnt wurden. Somit konnte das Lösungsverhalten der GC beobachtet werden, um herauszufinden, welche sich für die spätere praktische Anwendung eignen. Hierbei lagen die „im klinischen Alltag genutzten“ Formen von Hydrocortison und Prednisolon als Pulver vor, während Dexamethason bereits in einer Ampulle gelöst war (Lösungsmittel: Wasser für Injektionszwecke). Dies musste bei der Herstellung der Verdünnungsreihen (2.2.2.5) beachtet werden, da bei der „klinischen Form“ von Dexamethason nur eine Maximalkonzentration von  $1,5 \times 10^{-4}$  mol/l erreicht werden konnte (im Vergleich zur f.c.  $\sim 1 \times 10^{-3}$  mol/l von Hydrocortison und Prednisolon). Die in Ethanol-löslichen Formen lagen alle als Pulver vor.

Die Screeningversuche wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der GC von  $1 \times 10^{-7}$  bis  $1 \times 10^{-3}$  mol/l durchgeführt. Die GC wurden unmittelbar vor der Applikation der radioaktiv markierten Katecholaminlösungen den vorbereiteten Zellen verabreicht. Somit sollte gezeigt werden, ob eine Inhibition der Katecholaminaufnahme unter Einfluss der verschiedenen GC stattfindet und mit welcher Konzentration ein optimaler Hemmeffekt erzielt wird.

Für die Messungen verschiedener Konzentrationen der GC wurde eine hohe Zellzahl für die Screeningversuche benötigt. Aufgrund dessen wurden die Ergebnisse aus einmaligen Doppelmessungen gewonnen. Eine statistische Quantifizierung war somit nicht möglich.

Der Einfluss der verschiedenen Inhibitoren wurde in Bezug zur Aufnahme der radioaktiven Katecholamine ohne Zugabe des jeweiligen Inhibitors gesetzt. Dieser Wert ohne Inhibitor diente als Kontrollwert. Zur Bestimmung des Kontrollwertes wurden ausschließlich  $10 \mu\text{l}$  der radioaktiven Katecholaminlösung (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) dem Reaktionsansatz zugefügt. Anhand dessen konnte mittels Dreisatz die Menge an Radioaktivität, welche unter Einfluss eines Inhibitors

aufgenommen wurde, errechnet werden. Anschließend wurde dieser Aufnahmewert von 100% subtrahiert, um letztlich den eigentlichen Hemmeffekt in Prozent zu erhalten. Die Prozentangaben dienen der besseren Vergleichbarkeit der Screeningversuche an unterschiedlichen Versuchstagen. Die Daten wurden schließlich mittels Microsoft Office Excel 2013 ausgewertet und graphisch als Punktdiagramme dargestellt.

Weiterhin wurde die von den verschiedenen Zellen aufgenommene Radioaktivität ohne Inhibitor, in Prozent gemessen am 100%-Wert (2.2.2.8), bestimmt. Die Stoffmenge (Mole) an aufgenommener Radioaktivität lässt sich ebenfalls mittels Dreisatz anhand des 100%-Wertes sowie des Kontrollwertes errechnen.

Hierzu wird im Folgenden exemplarisch der Rechengang der OCT3-Messreihe unter Zugabe von 10µl [<sup>3</sup>H]NA-Stammlösung aufgeführt:

1. 100%-Wert: 210.553cpm

→  $0,1\mu\text{Ci} \triangleq 210.553\text{cpm} \triangleq 1 \times 10^{-12}$  Mole

*(f.c. der [<sup>3</sup>H]NA-Stammlösung im Inkubationsansatz:*

*$\sim 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l} \rightarrow 1 \times 10^{-10} \text{ mol/ml} \rightarrow 1 \times 10^{-12} \text{ mol}/10\mu\text{l};$*

*10µl der Stammlösung enthalten 0,1µCi [<sup>3</sup>H]DA (2.2.2.4))*

2. Kontrollwert ohne Inhibitor (= [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in  $1 \times 10^6$  Zellen ohne Zugabe eines GC): 1555cpm

Daraus folgt:

$$1555\text{cpm} = 210.553\text{cpm} / 1 \times 10^{-12} \text{ Mole}$$

$$= 1555\text{cpm} \times 1 \times 10^{-12} \text{ Mole} / 210.553\text{cpm}$$

$$= 7,39 \times 10^{-15} \text{ Mole} \triangleq \sim 0,74\%$$

Es ergibt sich eine Aufnahme von  $7,39 \times 10^{-15}$  Molen [<sup>3</sup>H]NA bzw. eine Aufnahmerate von  $\sim 0,74\%$  (der insgesamt angebotenen Radioaktivität) nach 15min Inkubationszeit in  $1 \times 10^6$  OCT3-Zellen.

Unter Berücksichtigung der Screeningversuche wurden die Hauptversuche unter zuvor ausgewählten Versuchsbedingungen durchgeführt. Es wurden Messwerte von 3 unabhängigen Versuchsreihen, welche an 3 unterschiedlichen

Tagen durchgeführt wurden, gewonnen. Um die Ergebnisse besser quantifizieren zu können, wurden die Passagezahlen der verschiedenen Zelllinien ebenfalls variiert. Es handelte sich in den Einzelversuchen nicht mehr um Doppelmessungen, sondern um Dreifachmessungen, sodass letztendlich 9 Messwerte jeder verwendeten Zelllinie auf Signifikanz getestet werden konnten. Der p-Wert wurde mit dem gepaarten t-Test berechnet. Der t-Test untersucht, ob sich die Mittelwerte zweier Gruppen systematisch unterscheiden. Diese statistische Methode kann verwendet werden, um das Ergebnis einer Monotherapie auszuwerten. In der vorliegenden Arbeit bedeutet dies konkret, die Aufnahme der Katecholamine in die verschiedenen Zelllinien vor und nach einer gezielten Intervention (Applikation des GC) zu verdeutlichen. Wichtig hierbei ist eine Normalverteilung des Behandlungseffektes in der zu untersuchenden Population, hier der Zellkultur. Für den p-Wert (Signifikanzwert) als Kennzahl für die Auswertung des statistischen Tests galt: signifikant  $p < 0,05$ ; hochsignifikant  $p < 0,01$  und nicht signifikant  $p > 0,05$ . Die statistischen Versuche wurden mittels GraphPadPrism5 (GraphPadSoftware, Inc.) ausgewertet und graphisch als Säulendiagramme dargestellt. Die angegebenen Werte entsprachen hierbei der Aufnahme in Prozent gemessen am 100%-Wert (2.2.2.8). Weiterhin wurden die aufgenommenen Mole Radioaktivität bestimmt. Die Rechnungen entsprechen hierbei dem oben aufgeführten Beispiel.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeine Erläuterungen

In dieser Arbeit wurde eine Evaluation bezüglich des Hemmeffekts von klinisch bedeutsamen GC auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA bzw. [<sup>3</sup>H]NA in Neuroblastomzellen und extraneuronale OCT3-exprimierende Zellen durchgeführt.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden auf einem Poster mit dem Titel „Effects of different corticosteroids on neuroblastoma imaging and therapy“ auf der „Advances in Neuroblastoma Research 2012“ in Toronto vorgestellt (216). In einigen Abbildungen wurden Werte aus den Screeningversuchen integriert. Des Weiteren beinhaltet das Poster die Hauptversuche dieser Arbeit.

Im ersten Teil der Ergebnisse werden die Screeningversuche dargestellt, welche zur Feststellung dienten, ob und wie stark die jeweiligen GC (Hydrocortison/ Prednisolon/ Dexamethason) die Aufnahme von radioaktiv markierten DA bzw. NA in die verschiedenen Zelllinien hemmen. Dazu wurde einerseits die Inkorporation ohne Inhibitor (=Kontrollwert) und andererseits mit Inhibitor getestet. Die Konzentrationen der GC wurden bei den Screeningversuchen von  $1 \times 10^{-7}$  bis  $1 \times 10^{-3}$  mol/l variiert (2.2.2.5).

Weiterhin wurden initial Vorversuche mit den genannten GC in unterschiedlichen Lösungsformen durchgeführt. Hierbei wurden zum einen wasserlösliche GC, welche direkt in NaCl (0,9%) löslich sind, verwendet. Diese werden „im klinischen Alltag“ zur Herstellung von Infusionslösungen genutzt. Zum anderen wurden die GC in einer Ethanol-löslichen Form verwendet. Somit sollte die praktische Anwendung verschiedener Lösungsformen getestet werden, um schließlich einen ungehinderten Versuchsablauf zu gewährleisten. Die Vor- bzw. Nachteile der jeweiligen Substanzen werden in einem gesonderten Kapitel (3.2) dargestellt.

Der zweite Teil, welcher in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. M. Bayer durchgeführt wurde, stellt die Ergebnisse der Hauptversuche dar. Hierzu wurden die Inhibitoren ausgewählt, welche sich durch die Vorversuche als geeignet erwiesen hatten. Weiterhin wurde im Vergleich zu den Screeningversuchen nur eine Konzentration des jeweiligen GC verwendet. Für die Auswahl der Versuchsparameter war ein guter Hemmeffekt auf die OCT3-exprimierende Zelllinie bei geringem Einfluss auf die NAT-exprimierenden Neuroblastomzelllinien von Bedeutung.

Für alle Versuche (Screening-/Hauptversuche) wurden die mit Tritium markierten Katecholamine DA und NA ( $[^3\text{H}]\text{DA}$ /  $[^3\text{H}]\text{NA}$ ) verwendet. Die final concentration (f.c.) betrug pro Reaktionsansatz  $1 \times 10^{-7}$  mol/l (2.2.2.4). Als Zelllinien wurden die NAT-exprimierenden SK-N-SH-/ Kelly- und IMR-32-Zelllinien sowie die OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie verwendet. Die Zellzahl pro 500  $\mu\text{l}$  Versuchsansatz betrug jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen.

Die Screeningversuche wurden mit doppelten Versuchsansätzen durchgeführt, so dass aus den beiden Messwerten ein Mittelwert errechnet werden konnte. Diese Werte wurden ohne Standardabweichung graphisch mittels Microsoft Office Excel 2013 in Punktdiagrammen dargestellt. Ausnahmen, bei denen nur einer der Werte verwendet wurde, wurden in der Arbeit gekennzeichnet (Markierung mittels runder Umkreisung in den Punktdiagrammen). Einzelwerte wurden nur dann genutzt, wenn einer der Werte der Doppelmessung deutlich aus den Messungen der Konzentrationsreihe abwich. Dies ließ sich häufig aufgrund eines vermerkten, arbeitstechnischen Fehlers nachvollziehen. Weiterhin kann eine Abweichung einzelner Messwerte mit einer möglichen Ungleichverteilung der Zellzahl begründet werden. Der Hemmeffekt der verschiedenen Inhibitoren wurde schließlich anhand des Kontrollwertes (=Aufnahmewert ohne Inhibitor) ermittelt und in Prozent dargestellt. Die absolute prozentuale radioaktive Aufnahme der verschiedenen Zelllinien gemessen am 100%-Wert wurde ebenfalls bestimmt (2.2.3) und wird in den einzelnen Kapiteln aufgeführt.

Die Hauptversuche wurden an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Hierbei wurden jeweils dreifache Versuchsansätze verwendet. Somit ergaben sich

schließlich 9 Messwerte für jede Versuchsvariation. Aus diesen wurde wiederum der Mittelwert bestimmt. Weiterhin wurde in den Hauptversuchen die Standardabweichung berechnet. Für den Signifikanztest wurde der gepaarte t-Test verwendet.

Bei der Bewertung aller Ergebnisse muss die Heterogenität des Tumors berücksichtigt werden, da hierdurch Auswirkungen auf die radioaktive Aufnahme in die verschiedenen Zellen nicht ausgeschlossen werden können (97, 192, 193). Durch mögliche Unterschiede innerhalb einer Zelllinie kann die Anzahl an Transportern auf der Zelloberfläche variieren.

### **3.2 Vergleich verschiedener Lösungsformen der Glucocorticoide**

Im Rahmen der Screeningversuche wurde die praktische Anwendung verschiedener Lösungsformen der GC Hydrocortison, Prednisolon und Dexamethason getestet. Zum einen wurden die GC in einer wasserlöslichen Form verwendet. Diese Form wird zur Herstellung von Infusionslösungen im „klinischen Alltag“ genutzt. Zum anderen wurden die verschiedenen GC in einer primär Ethanol-löslichen Form verwendet.

Die wasserlöslichen, „klinisch verwendeten“ GC Hydrocortison und Prednisolon lagen als Festsubstanz vor. Das „klinisch verwendete“ Dexamethason war bereits in einer Ampulle gelöst (Lösungsmittel: Wasser für Injektionszwecke).

Die Ethanol-löslichen GC lagen alle in einer pulverisierten Form vor.

Die Versuche wurden schließlich, wie unter 2.2.2 beschrieben, durchgeführt.

Die genauen Verdünnungsschritte sind dem Abschnitt 2.2.2.5 zu entnehmen.

Zum Lösen und zum Verdünnen des „in der Klinik verwendeten“, wasserlöslichen Hydrocortisons und Prednisolons wurde NaCl (0,9%) gewählt.

Für die weitere Verdünnung des bereits gelösten, „im klinischen Alltag“ eingesetzten Dexamethasons wurde ebenfalls NaCl (0,9%) verwendet.

Die Ethanol-löslichen GC wurden initial in 100%igem Ethanol gelöst (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-3}$  mol/l). Die weiteren Verdünnungsschritte wurden ebenfalls mit NaCl (0,9%) vorgenommen.

Nach ca. 20 min wurde ein Ausflocken der Ethanol-löslichen GC beobachtet, so dass eine erneute Vermischung notwendig war. Im Zeitraum zwischen Herstellung der Verdünnungsreihen und Beginn der radioaktiven Aufnahmeversuche (ca. 1,5h) war demnach ein mehrfaches Vortexen notwendig um die Löslichkeit zu erhalten. Dies führte zu einem wesentlich erhöhten Arbeitsaufwand und zu Zeitverzögerungen im Versuchsablauf.

Nach Auswertung der Screeningversuche zeigten sich deutliche Unterschiede innerhalb der Messreihen der verschiedenen gelösten GC. So konnte beispielsweise bei der in Ethanol-gelösten Form des Dexamethasons bei keiner der gewählten Konzentrationen ( $1 \times 10^{-7}$  bis  $1 \times 10^{-3}$  mol/l) eine Hemmung der [ $^3$ H]NA-Aufnahme über den OCT3 registriert werden. Hingegen zeigte die wasserlösliche Form des Dexamethasons schon ab einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l eine Inhibition der [ $^3$ H]NA-Aufnahme von 46% (3.3.1). Hierbei sind fehlerhafte Ergebnisse aufgrund der schlechten Löslichkeit der Ethanol-löslichen GC nicht auszuschließen.

Letztendlich verhinderte das Arbeiten mit den Ethanol-löslichen GC aufgrund der erschwerten Handhabung einen zügigen, präzisen Versuchsablauf, weshalb für die repräsentativen Screeningversuche ausschließlich die „klinisch verwendeten“, in NaCl (0,9%)-löslichen GC genutzt wurden und im Folgenden einzig diese Messreihen graphisch dargestellt werden.

### **3.3 Screeningversuche**

Die Screeningversuche dienten primär der Quantifizierung eines möglichen Hemmeffektes auf die OCT3-exprimierenden Zellen durch die verschiedenen GC. Bei Bestätigung dieser Hypothese sollte schließlich eine geeignete Konzentration der jeweiligen GC gefunden werden, welche einen optimalen Hemmeffekt erzielt. Dies bedeutet eine möglichst starke Hemmung der Katecholaminaufnahme in die OCT3-exprimierende Zelllinie, bei geringem Einfluss auf die Neuroblastomzelllinien. Die im Folgenden aufgeführten Versuche stellen ausschließlich Messungen der in NaCl (0,9%) gelösten GC

dar (3.2).

Für diese Vorversuche wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit 500  $\mu$ l Inkubationspuffer gegeben. Diese wurden schließlich bei 37°C 15min lang mit der [ $^3$ H]DA- bzw. [ $^3$ H]NA-Lösung (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) sowie dem jeweiligen Inhibitor bzw. in dessen Abwesenheit (Kontrollwert) inkubiert. Die einzelnen Arbeitsschritte sind ausführlich im Versuchsprotokoll (2.2.2.7) aufgeführt. Hierbei lag die stärkste Konzentration für Hydrocortison und Prednisolon bei  $1 \times 10^{-3}$  mol/l. Dexamethason hingegen erreichte eine Maximalkonzentration von  $1,5 \times 10^{-4}$  mol/l, da die Substanz schon in dieser Konzentration als bereits gelöste Stammlösung vorlag. Die weiteren Verdünnungsschritte sind unter 2.2.2.5 zu finden.

Die Ergebnisse der Screeningversuche sind in Punktdiagrammen graphisch dargestellt. Auf der Ordinate ist der prozentuale Hemmeffekt der GC aufgetragen (0%= kein Hemmeffekt; 100%= max. Hemmeffekt der Katecholaminaufnahme  $\rightarrow$  bezugnehmend auf den Kontrollwert ohne Inhibitor). Die verschiedenen Konzentrationen der GC sind logarithmisch auf der Abszisse dargestellt. Um die Messungen der Screeningversuche übersichtlicher zu gestalten, ist in einem ersten Abschnitt (3.3.1-3.3.4) der Einfluss aller verwendeten GC auf jeweils eine Zelllinie dargestellt. Somit kann die Wirkung der verschiedenen GC untereinander verglichen werden. Die Darstellung der Neuroblastomzelllinien erfolgt hierbei in absteigender Reihenfolge in Bezug auf die Expression des NAT (Expression des NAT: SK-N-SH-  $\gg$  Kelly-  $>$  IMR-32-Zellen). In einem zweiten Abschnitt (3.3.5-3.3.7) ist der Einfluss nur eines GC auf alle verwendeten Zelllinien in Punktdiagrammen veranschaulicht. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der verschiedenen Zelllinien untereinander.

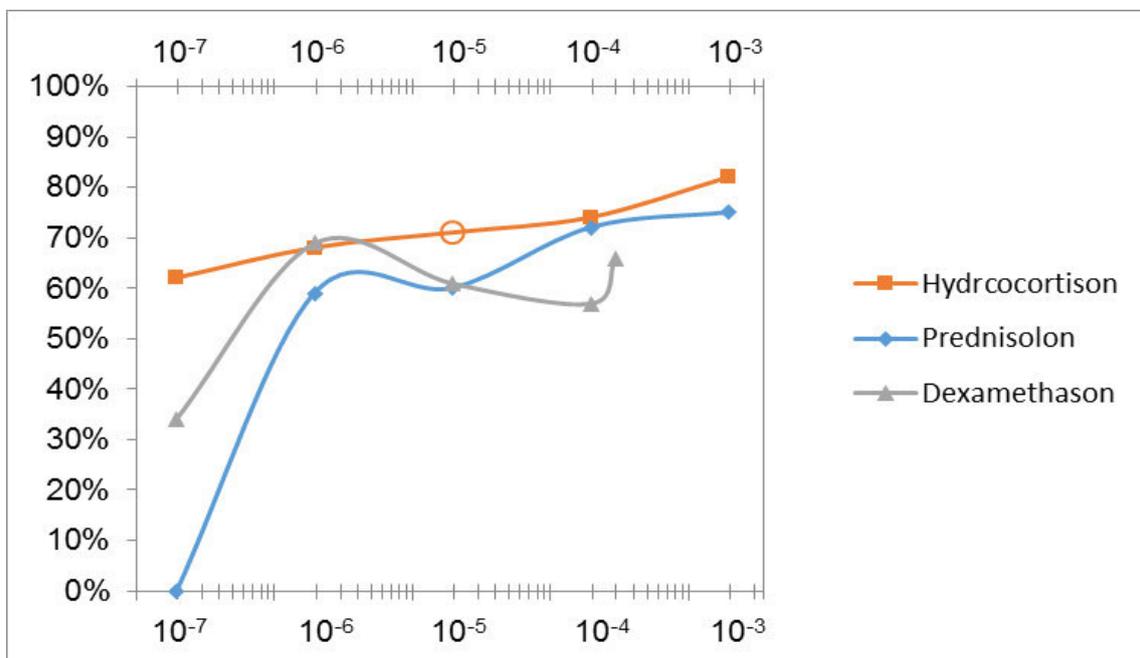
### **3.3.1 Aufnahme von [ $^3$ H]DA oder [ $^3$ H]NA in die extraneuronale OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide**

In den folgenden Graphen wird die Wirkung der verschiedenen GC auf die

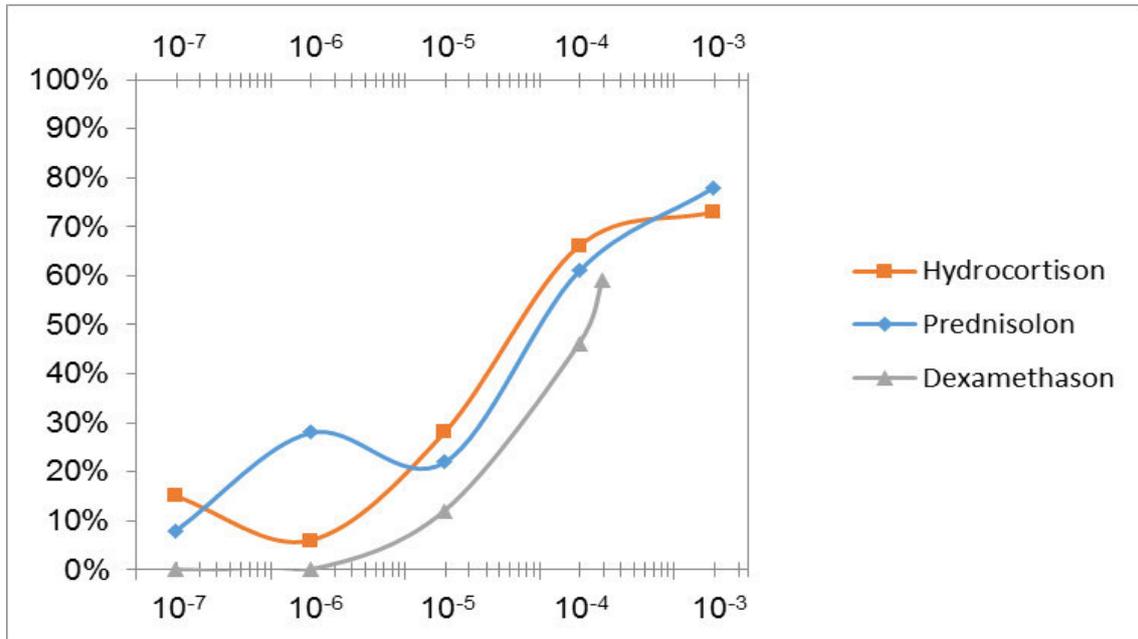
extraneuronale OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie dargestellt.

Die Punktdiagramme veranschaulichen den Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]DA- und die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die Zellen. Diese Zelllinie exprimiert auf ihrer Zelloberfläche nur den OCT3 (siehe Materialien 2.1.5), weshalb anhand der Ergebnisse die Eigenschaften des Transporters besonders gut untersucht werden können.

Insgesamt wurden ohne Einfluss eines Inhibitors 0,44% der insgesamt angebotenen radioaktiven Dopaminlösung sowie 0,74% der angebotenen [<sup>3</sup>H]NA-Stammlösung von der OCT3-exprimierenden Zelllinie aufgenommen.



**Abb. 1:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in OCT3-exprimierende HEK293-Zellen



**Abb. 2:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **OCT3**-exprimierende HEK293-Zellen

Die Punktdiagramme in den Abb. 1 und 2 zeigen eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmwirkung der GC auf die [<sup>3</sup>H]DA- und [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die OCT3-Zellen.

Prednisolon war die einzige Substanz, welche bei einer Konzentration von 1x10<sup>-7</sup>mol/l keinen Einfluss auf die Dopaminaufnahme (Abb.1) zu haben schien. Die anderen Inhibitoren zeigten schon in diesem Bereich eine Hemmwirkung von 34% bis max. 62%. Bei der Maximalkonzentration von 1x10<sup>-3</sup>mol/l (bzw. 1,5x10<sup>-4</sup>mol/l bei Dexamethason) lag die Inhibition unter Einfluss der verwendeten GC zwischen 66% und 82%, wobei Dexamethason die geringste hemmende Wirkung zeigte.

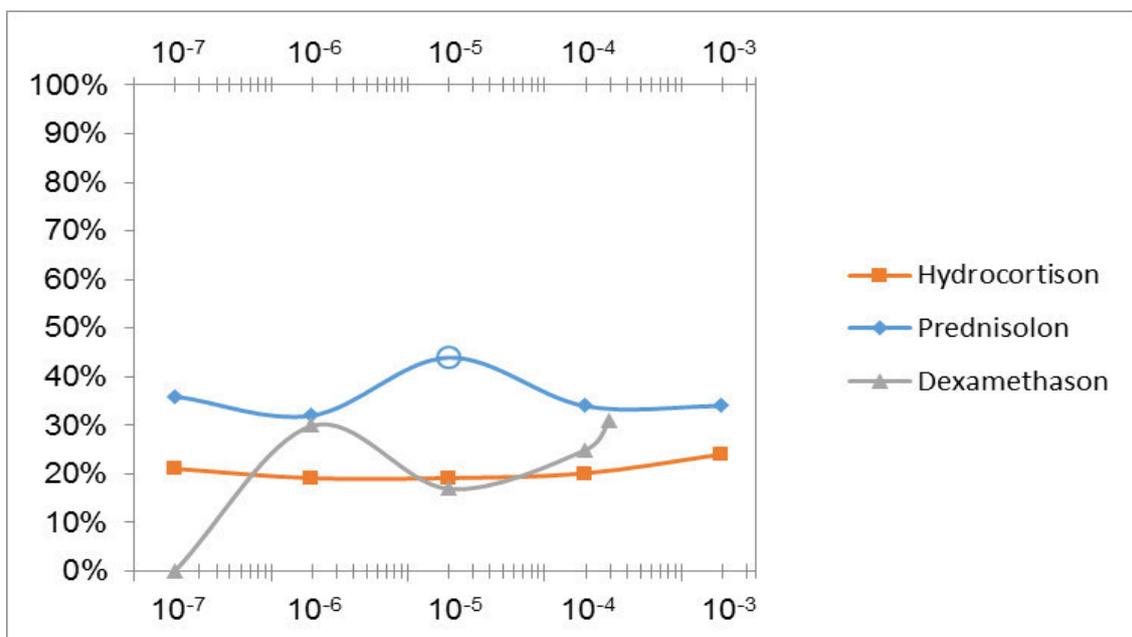
Auch bei der Noradrenalinaufnahme (Abb. 2) ließ sich ein deutlicher Einfluss der Substanzen erkennen. So zeigte sich bei Prednisolon ein Hemmeffekt von 78% bei der Höchstkonzentration (1x10<sup>-3</sup>mol/l). Auch unter Einfluss von Hydrocortison wurde bei dieser Konzentration eine Inhibition von 73% erreicht. Dexamethason zeigte bei allen verwendeten Konzentrationen insgesamt die schwächste Wirkung. Bei der Maximalkonzentration konnte hier eine Hemmung

von 59% registriert werden. Verglichen mit der Dopaminaufnahme waren die inhibitorischen Effekte der GC bei der geringsten Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$  mol/l deutlich schwächer ausgeprägt. Hier lagen die Messwerte zwischen 0% und 15%.

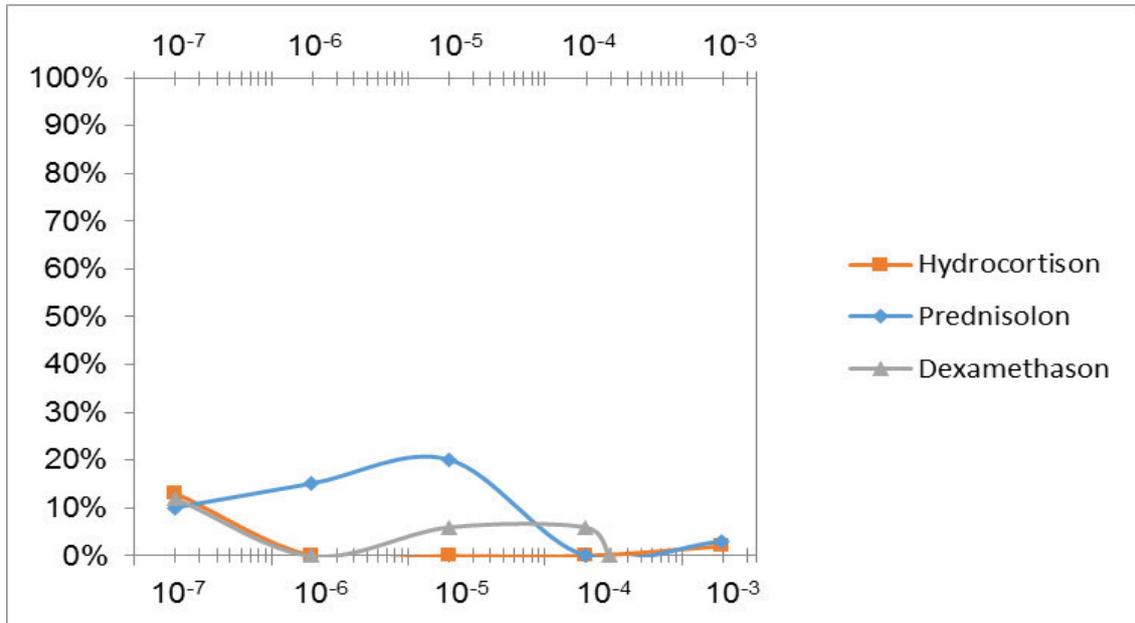
### 3.3.2 Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{DA}$ oder $[^3\text{H}]\text{NA}$ in die neuronale SK-N-SH-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Aufnahmeversuchen der neuronalen Zelllinie SK-N-SH veranschaulicht.

Diese Zellen exprimieren im Vergleich zu den anderen, in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzelllinien die höchste Anzahl an NAT. Dies wird indirekt bei Betrachtung der radioaktiven Gesamtaufnahme ersichtlich. Die SK-N-SH-Zellen haben insgesamt 4,9% der angebotenen  $[^3\text{H}]\text{NA}$ - und 7,1% der  $[^3\text{H}]\text{DA}$ -Stammlösung aufgenommen (Kontrollwert bezugnehmend auf den 100%-Wert). Somit repräsentieren die Zellen gut den möglichen Effekt der verschiedenen GC auf den Transporter.



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



**Abb. 4:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) in **SK-N-SH**-Zellen

Verglichen mit den zuvor dargestellten Ergebnissen der OCT3-Messreihen (3.3.1), zeigt sich in den Abb. 3 und 4 ein deutlich geringerer Einfluss der GC auf die Katecholaminaufnahme.

Unter Zugabe von Hydrocortison wurden Werte zwischen 19% und 24% Hemmung auf die Dopaminaufnahme (Abb. 3) registriert. Allerdings zeigte sich kein wesentlicher Kurvenanstieg, je höher die Konzentration gewählt wurde. Auch unter Prednisolon konnte keine stärkere Inhibition bei der Höchstkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l registriert werden. Hier schwankten die Messwerte um einen Mittelwert von 36%. Lediglich Dexamethason nahm bei der niedrigsten Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$  mol/l keinen inhibitorischen Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme und zeigte erst bei der Maximalkonzentration eine Hemmung von 31%.

Die Noradrenalinaufnahme (Abb. 4) wurde im Vergleich zur Dopaminaufnahme noch geringer beeinflusst. Die Hemmwirkung betrug bei der Minimalkonzentration von  $1 \times 10^{-7}$  mol/l unter Einfluss aller getesteten GC ausschließlich 10-13%. Prednisolon erreichte einmalig eine Inhibition von 20% ( $1 \times 10^{-5}$  mol/l), welche schließlich wieder auf 0% Hemmung sank. Auch unter

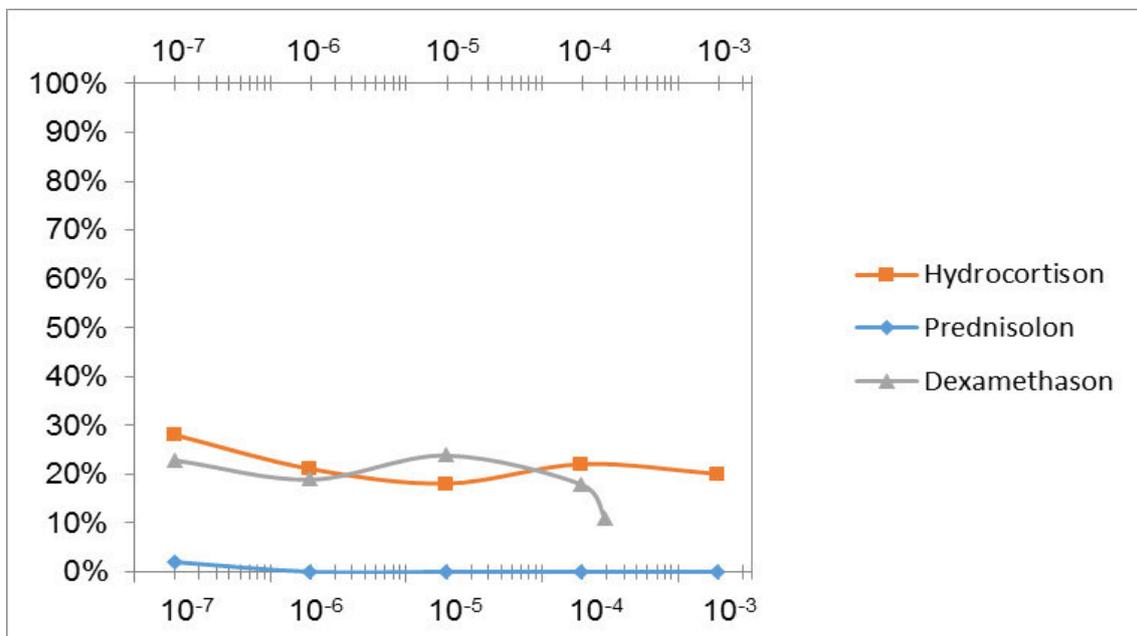
Zugabe von Hydrocortison und Dexamethason lagen alle Messwerte unter 10% Hemmwirkung.

### 3.3.3 Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{DA}$ oder $[^3\text{H}]\text{NA}$ in die neuronale Kelly-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide

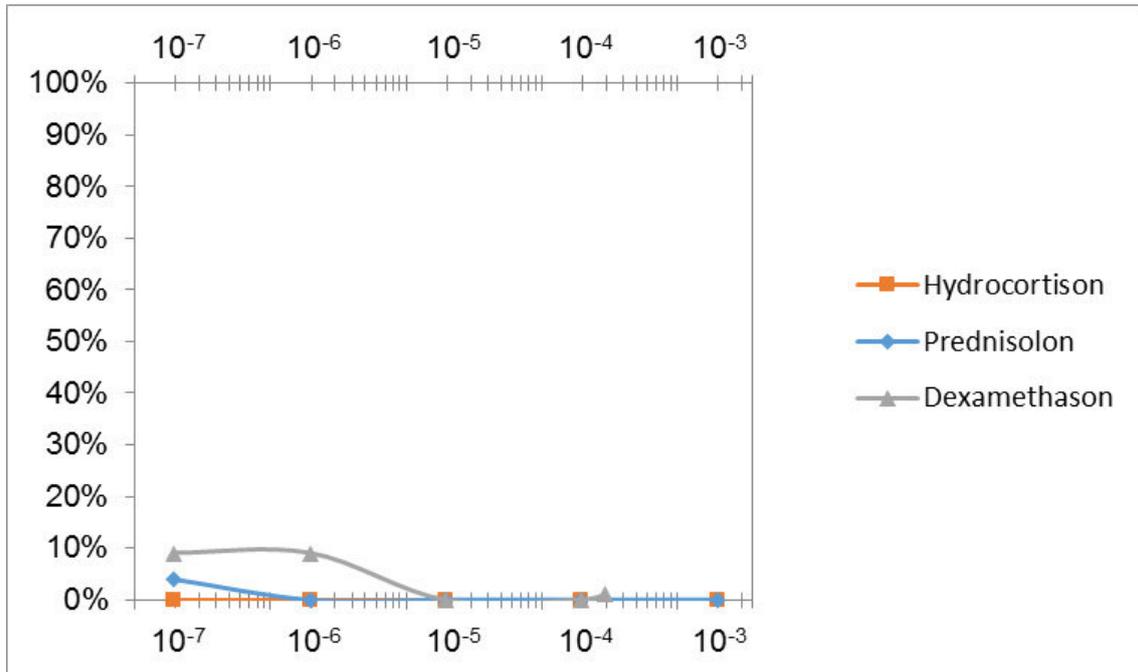
Die folgenden Diagramme (Abb. 5 und 6) zeigen die Wirkung der verwendeten GC auf die Aufnahme von radioaktiv markiertem DA und NA in Kelly-Zellen.

Aus den folgenden Abbildungen wird ersichtlich, dass die Reduktion der Katecholaminaufnahme und somit die inhibitorische Wirkung der GC auf die Neuroblastomzellen im Vergleich zu den OCT3-Zellen deutlich geringer war. Dies entspricht den zuvor dargestellten Ergebnissen der SK-N-SH-Zelllinie (3.3.2).

Die Gesamtaufnahme der Katecholamine in Prozent lag für  $[^3\text{H}]\text{DA}$  bei 0,92% und für  $[^3\text{H}]\text{NA}$  bei 0,66%. Dies weist indirekt auf eine deutlich geringere NAT-Expression der Kelly-Zelllinie verglichen mit der SK-N-SH-Zelllinien hin.



**Abb. 5:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die  $[^3\text{H}]\text{DA}$ -Aufnahme (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) in Kelly-Zellen



**Abb. 6:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die **[<sup>3</sup>H]NA**-Aufnahme (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) in **Kelly**-Zellen

Unter Einfluss von Hydrocortison wurde die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA (Abb. 5) in die Kelly-Zellen zwischen 20% und 28% inhibiert. Die Werte unter Einfluss von Dexamethason lagen zwischen 11% und 23%. Prednisolon zeigte hingegen bei keiner der gewählten Konzentrationen eine Hemmwirkung.

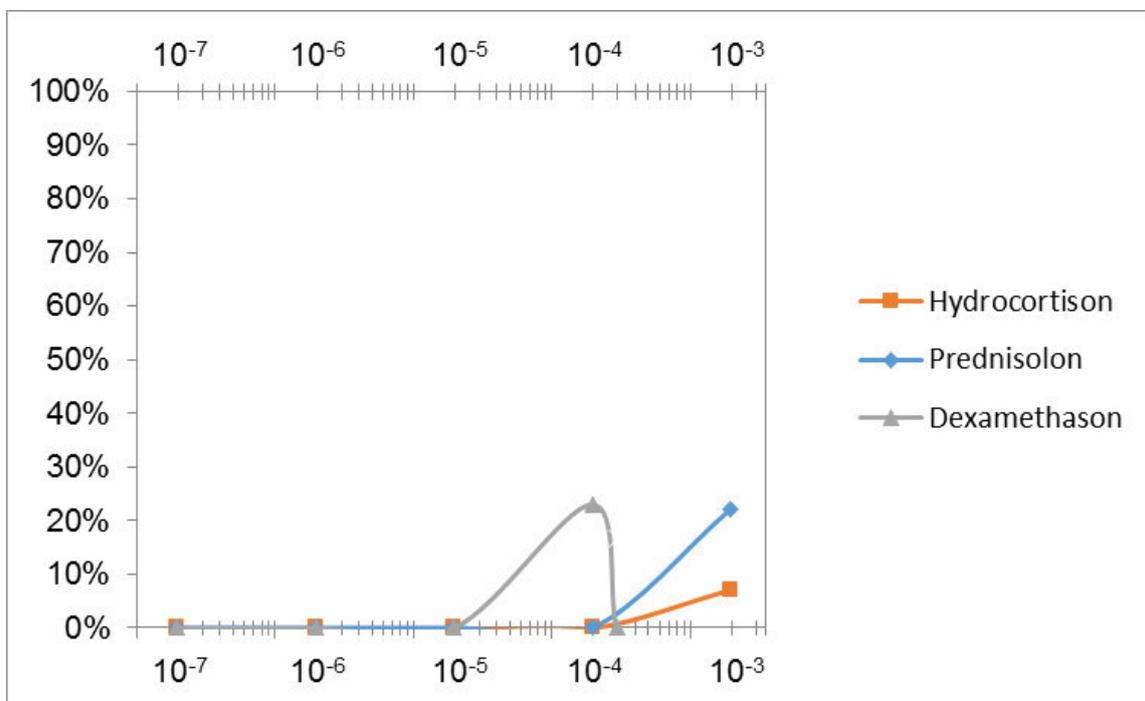
Der Einfluss der Inhibitoren auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (Abb. 6) war im Vergleich noch geringer. Ausschließlich unter Zugabe von Dexamethason wurde eine Hemmung von 9% bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$  und  $1 \times 10^{-6}$  mol/l erreicht. Allerdings konnte bei höheren Konzentrationen kein inhibitorischer Effekt registriert werden. Unter Prednisolon und Hydrocortison zeigte sich kein Einfluss.

Insgesamt ergab sich unter Zugabe der verschiedenen GC auch bei den Kelly-Zellen wie schon bei den SK-N-SH-Zellen ein etwas deutlicherer Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme im Vergleich zur [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme.

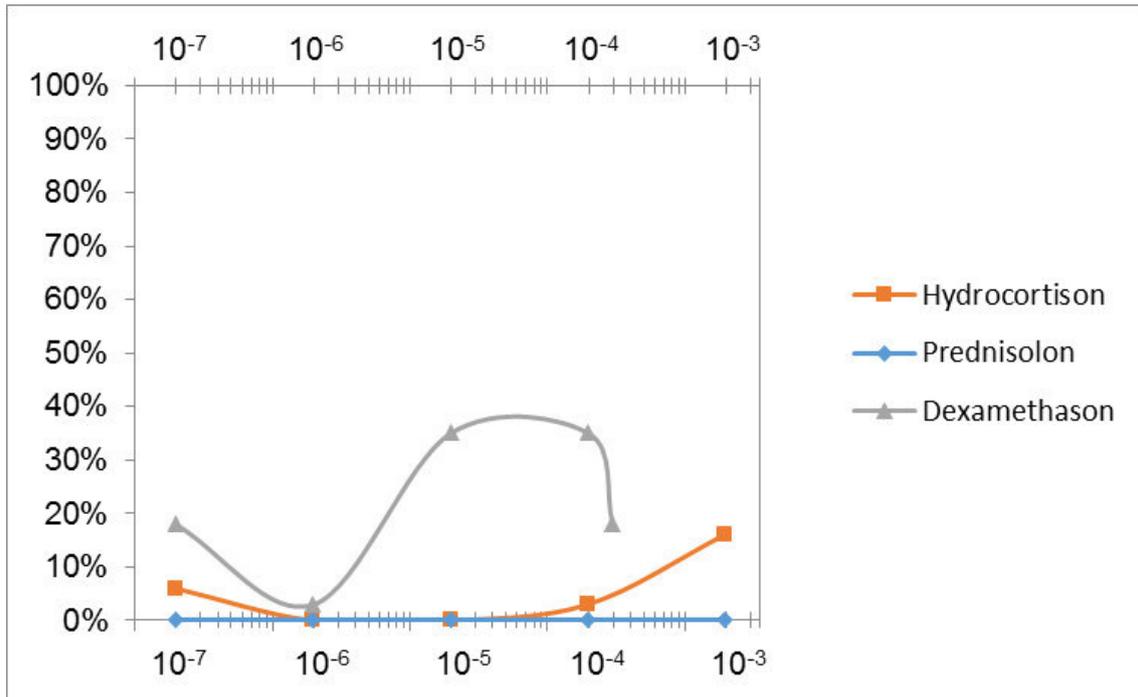
### 3.3.4 Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{DA}$ oder $[^3\text{H}]\text{NA}$ in die neuronale IMR-32-Zelllinie unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der GC auf die neuronale IMR-32-Zelllinie graphisch dargestellt.

Die IMR-32-Zelllinie exprimiert im Vergleich zu den anderen verwendeten Neuroblastomzelllinien die geringste Anzahl des NAT. Dies wird indirekt aus der radioaktiven Gesamtaufnahme ersichtlich. Diese lag bei 0,4% für die  $[^3\text{H}]\text{DA}$ -Aufnahme und bei 0,31% für die  $[^3\text{H}]\text{NA}$ -Aufnahme (Kontrollwert gemessen am 100%-Wert). Insgesamt zeigte sich ebenfalls ein deutlich geringerer Hemmeffekt der GC auf die IMR-32-Zellen im Vergleich zu den OCT3-exprimierenden Zellen (3.3.1). Dies stimmt mit den vorher dargestellten Messreihen der NAT-exprimierenden SK-N-SH- und Kelly-Zellen überein (3.3.2/ 3.3.3).



**Abb. 7:** Hemmwirkung (in %) verschiedener GC unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die  $[^3\text{H}]\text{DA}$ -Aufnahme (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) in IMR-32-Zellen



**Abb. 8:** Hemmwirkung (in %) verschiedener GC unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) in **IMR-32**-Zellen

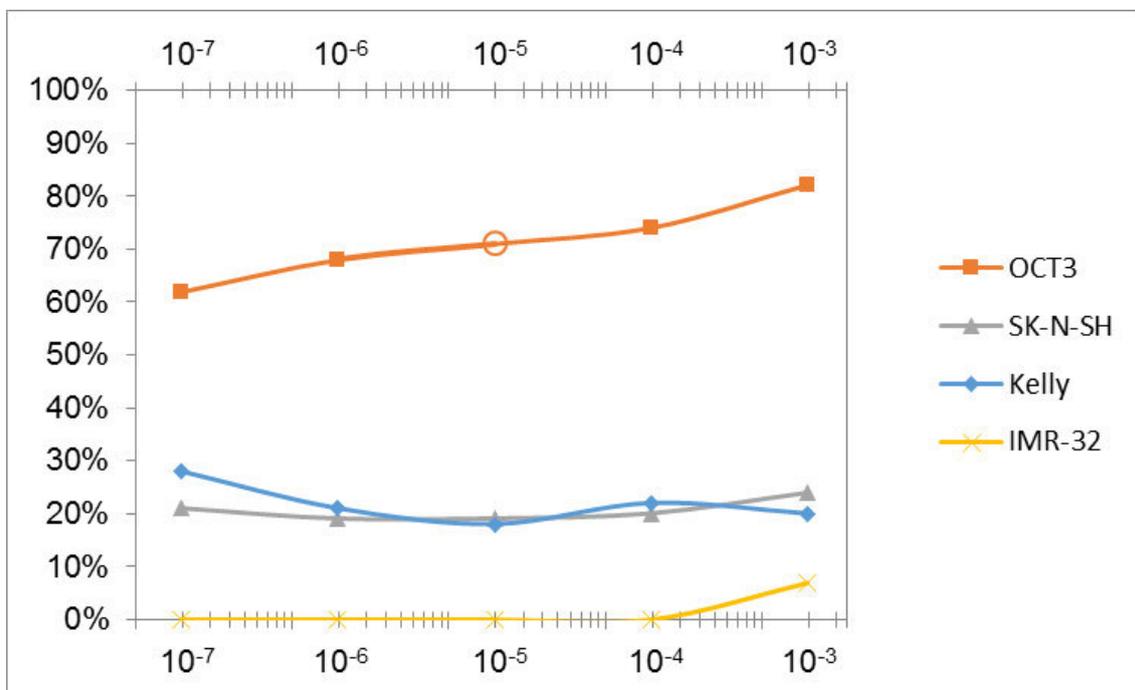
Die verwendeten GC zeigten bis zu einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  mol/l keinen Einfluss auf die Dopaminaufnahme (Abb. 7). Ab dieser Konzentration stieg dann die Hemmung unter Zugabe von Dexamethason auf einmalig 23% und sank bei der Maximalkonzentration wieder gegen 0%. Unter Zugabe von Hydrocortison sowie Prednisolon war erst bei  $1 \times 10^{-3}$  mol/l eine geringe Hemmwirkung zu erkennen (Prednisolon: 22%; Hydrocortison: 7%).

Die Noradrenalinaufnahme (Abb. 8) wurde durch Hydrocortison bei der Maximalkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l um 16% gehemmt. Unter Zugabe von Prednisolon konnte hingegen kein inhibitorischer Effekt erzielt werden. Im Vergleich hierzu nahm Dexamethason einen stärkeren Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme und erreichte Hemmwerte von bis zu 35 %.

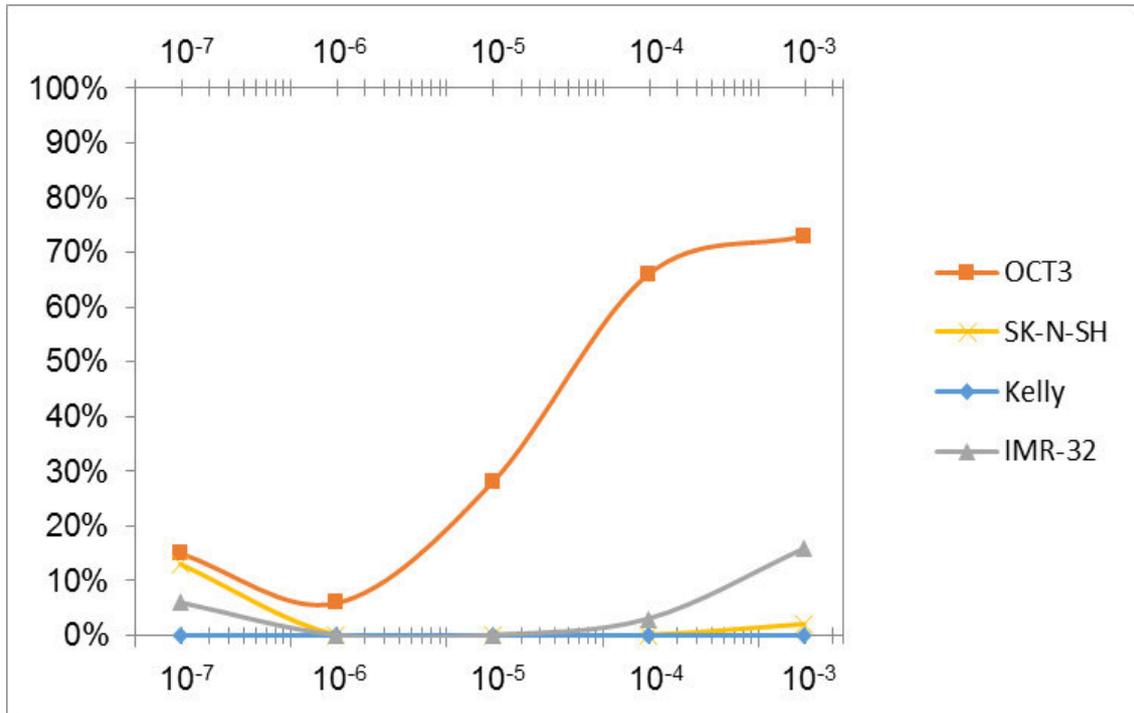
### 3.3.5 Vergleichende Darstellung der Wirkung von Hydrocortison auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA oder [<sup>3</sup>H]NA in die verschiedenen Zelllinien

In den Abschnitten 3.3.5-3.3.7 liegt der Fokus der graphischen Darstellung auf jeweils einem einzelnen Hemmstoff und seiner Wirkung auf alle verwendeten Zelllinien. Die Werte aus den folgenden Messreihen entsprechen den Messwerten aus 3.3.1-3.3.4. Allerdings wurden Diagramme erstellt, durch welche ein direkter Vergleich der verschiedenen Zelllinien untereinander möglich ist. Durch diese Darstellung zeigt sich deutlicher, welche Zelllinie von dem jeweiligen GC gut gehemmt bzw. nur gering beeinflusst wurde. Des Weiteren werden die Ergebnisse zur Übersicht nochmals nach der Stärke des Hemmeffekts sortiert. Hierbei bedeutet „>>“, „>“ und „~“, dass ein sehr starker, ein starker bzw. ein etwa gleicher inhibitorischer Einfluss vorlag.

In den Abb. 9 und 10 wird der Einfluss von Hydrocortison auf die verschiedenen Zellen dargestellt.



**Abb. 9:** Hemmwirkung (in %) von Hydrocortison unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in verschiedene Zelllinien



**Abb. 10:** Hemmwirkung (in %) von **Hydrocortison** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-7}$  mol/l) in verschiedene Zelllinien

Wie aus den Abb. 9 und 10 ersichtlich, fand unter Einfluss von **Hydrocortison** eine deutliche Reduktion sowohl der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme als auch der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die OCT3-Zelllinie statt. Die Dopaminaufnahme (Abb. 9) wurde schon bei geringen Konzentrationen des Inhibitors deutlich gehemmt. Bei der Minimalkonzentration von  $1 \times 10^{-7}$  mol/l zeigte sich eine Inhibition von 62%. Die maximale Hemmung von 82% wurde bei der Höchstkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l erreicht. Hingegen wirkte sich die Zugabe von Hydrocortison deutlich geringer auf die SK-N-SH- und Kelly-Zellen aus (Hemmeffekt SK-N-SH-Zellen: 19%-24%; Hemmeffekt Kelly-Zellen: 19%-28%). Somit lag ein ca. 3-4fach stärkerer Einfluss von Hydrocortison auf die extraneuronalen OCT3-Zellen vor. Bei der IMR-32-Zelllinie ließ sich keine relevante Reduktion der Dopaminaufnahme beobachten. Es zeigte sich eine geringe Hemmung von nur 7% bei der Maximalkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l. Nach Auswertung der Hemmwirkung von Hydrocortison auf die Dopaminaufnahme ergibt sich somit folgende Anordnung:

Hemmung der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien nach Applikation von **Hydrocortison**:

**OCT3 >> SK-N-SH ~ Kelly > IMR-32**

Die Noradrenalinaufnahme (Abb. 10) wurde in ähnlicher Weise beeinflusst. Allerdings zeigte sich bei den niedrigen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-3}$ - $1 \times 10^{-4}$  mol/l) ein geringerer Einfluss (Hemmwirkung 6%-15%) auf die OCT3-Zellen. Bei der verwendeten Maximalkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l ergab sich hingegen eine Reduktion der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme um 73%.

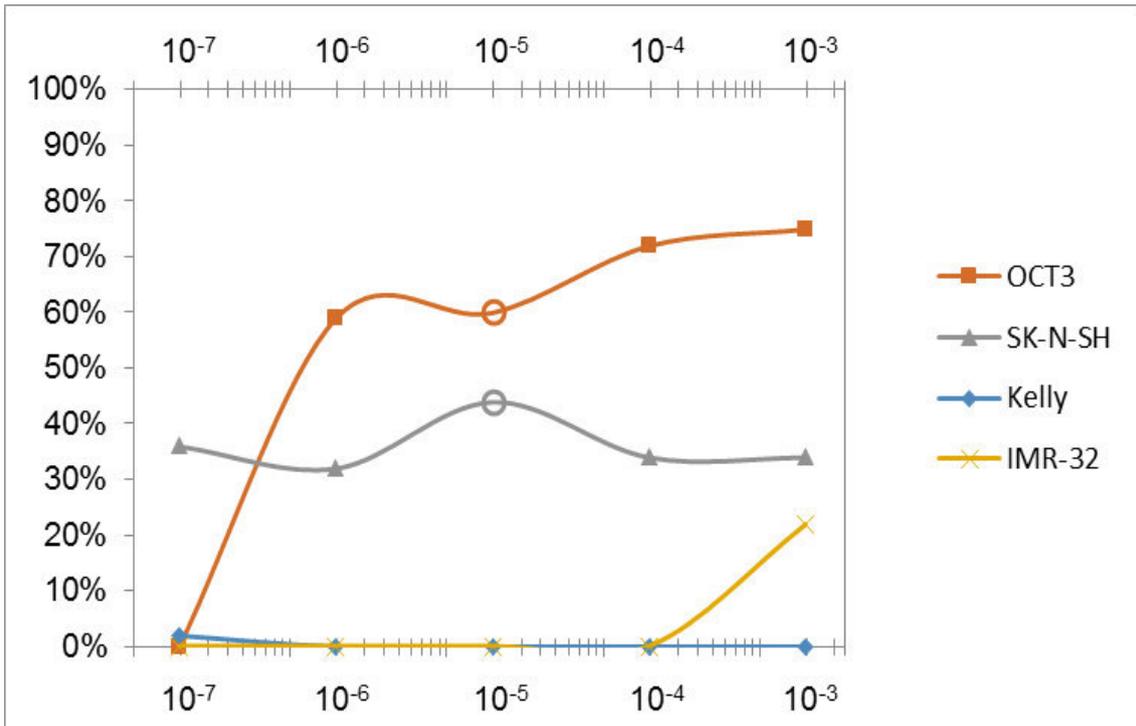
Die NAT-exprimierenden Neuroblastomzelllinien wurden im Vergleich zu den OCT3-Zellen kaum beeinflusst. Lediglich bei den IMR-32-Zellen konnte einmalig eine Hemmung von 16% bei der Höchstkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l registriert werden. Somit zeigt sich folgende Anordnung der Zelllinien bezogen auf den Einfluss des Hydrocortisons auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme:

Hemmung der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien nach Applikation von **Hydrocortison**:

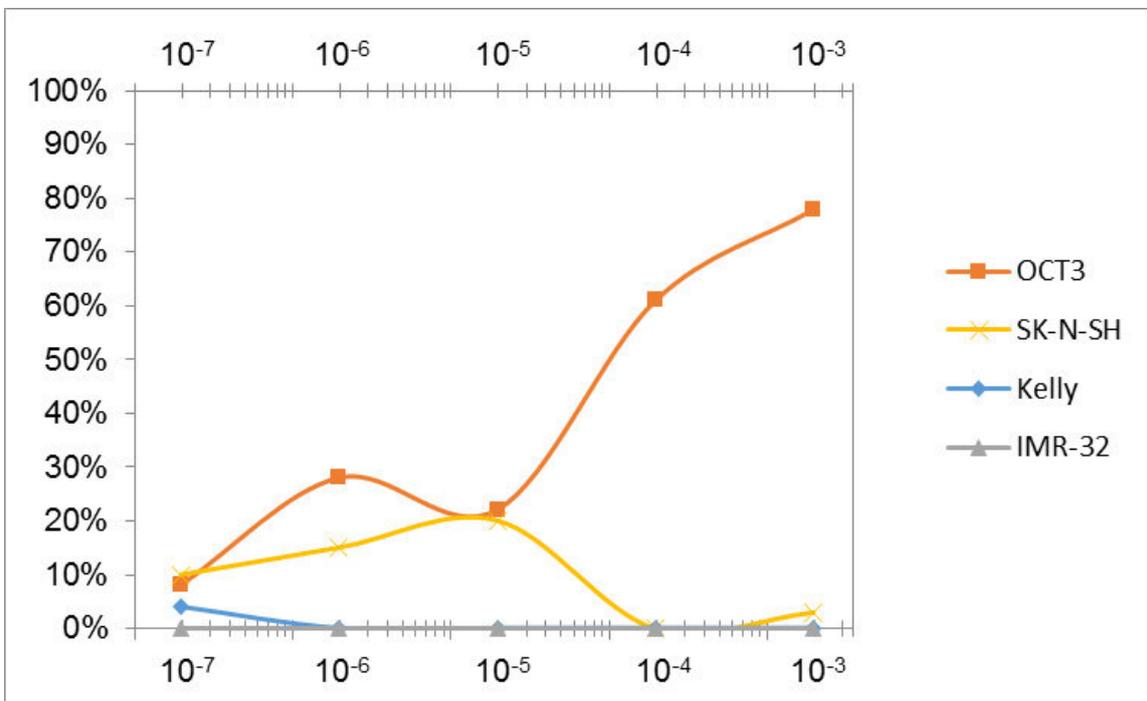
**OCT3 >> SK-N-SH ~ Kelly ~ IMR-32**

### **3.3.6 Vergleichende Darstellung der Wirkung von Prednisolon auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA oder [<sup>3</sup>H]NA in die verschiedenen Zelllinien**

In den folgenden Diagrammen (Abb. 11 und 12) wird die Auswirkung von Prednisolon auf die extraneuronalen OCT3-Zellen und die verschiedenen Neuroblastomzelllinien veranschaulicht.



**Abb. 11:** Hemmwirkung (in %) von Prednisolon unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c. ~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in verschiedene Zelllinien



**Abb. 12:** Hemmwirkung (in %) von Prednisolon unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c. ~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in verschiedene Zelllinien

Wie aus den Abb. 11 und 12 ersichtlich, zeigte sich der stärkste Einfluss von **Prednisolon** auf die Katecholaminaufnahme bei der OCT3-Zelllinie. Es ergab sich sowohl bei der [<sup>3</sup>H]DA- als auch bei der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme ein mit zunehmender Konzentration ansteigender Hemmeffekt. Hingegen wurden die Neuroblastomzelllinien nur gering beeinflusst.

Bei der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (Abb. 11) in die OCT3-Zellen ließ sich schon ab einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$  mol/l eine Hemmung von 59% im Vergleich zum Kontrollwert ohne Inhibitor erkennen. Bei der höchsten Konzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l wurde ein Hemmeffekt von 75% erreicht. Der stärkste Einfluss auf die Neuroblastomzelllinien konnte bei den SK-N-SH-Zellen registriert werden. Hier bewegten sich die Messwerte zwischen 32% ( $1 \times 10^{-6}$  mol/l) bis 44% ( $1 \times 10^{-5}$  mol/l). Hingegen zeigte sich bei den Kelly-Zellen kein Einfluss durch Prednisolon. Bei den IMR-32-Zellen konnte bei  $1 \times 10^{-3}$  mol/l eine Inhibition von 22% nachgewiesen werden.

Hemmung der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien nach Applikation von **Prednisolon**:

**OCT3 >> SK-N-SH > Kelly ~ IMR-32**

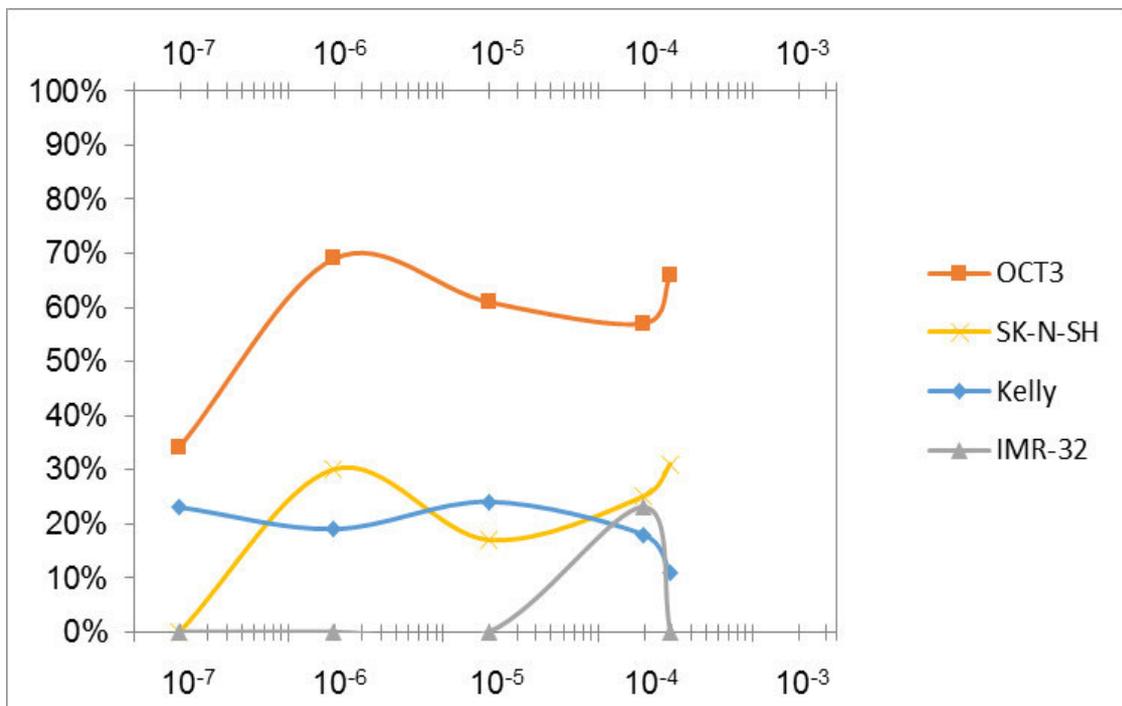
In den [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahmeversuchen zeigte sich ebenfalls eine deutlich stärkere Hemmwirkung von Prednisolon auf die OCT3-Zellen im Vergleich zu den Neuroblastomzelllinien (Abb. 12). Bei der extraneuronalen Zelllinie konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Aufnahme um bis zu 78% ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) nachgewiesen werden. Hingegen ergab sich bei den SK-N-SH-Zellen eine maximale Hemmung von 20% bei einer Konzentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Bei den Kelly- sowie den IMR-32-Zellen zeigte sich kein wesentlicher inhibitorischer Effekt.

Hemmung der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien nach Applikation von **Prednisolon**:

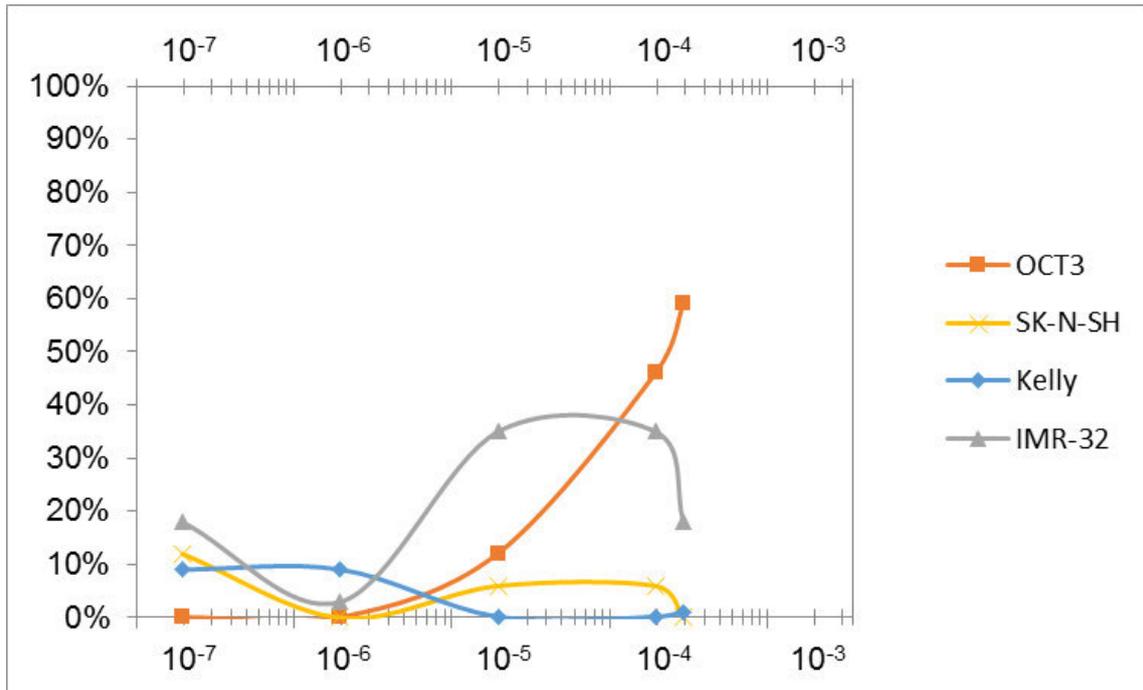
**OCT3 >> SK-N-SH > Kelly ~ IMR-32**

### 3.3.7 Vergleichende Darstellung der Wirkung von Dexamethason auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA oder [<sup>3</sup>H]NA in die verschiedenen Zelllinien

Dieser Abschnitt veranschaulicht den Einfluss von Dexamethason auf die extraneuronale OCT3-Zelllinie und die verschiedenen Neuroblastomzelllinien.



**Abb. 13:** Hemmwirkung (in %) von Dexamethason unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c. ~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in verschiedene Zelllinien



**Abb. 14:** Hemmwirkung (in %) von **Dexamethason** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c. ~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in verschiedene Zelllinien

**Dexamethason** zeigte ebenfalls eine deutliche Hemmung der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (Abb. 13) in die OCT3-Zellen. Bei der Maximalkonzentration von 1,5x10<sup>-4</sup>mol/l wurde eine Reduktion der Aufnahme von 66% gemessen werden. Die Neuroblastomzelllinien wurden in einem geringeren Umfang beeinflusst. Bei den SK-N-SH-Zellen wurde ein maximaler Hemmeffekt von 31% registriert. Die Messwerte der Kelly-Zellen lagen zwischen 24% und 11%. Somit ließ sich ein 2-3fach stärkerer Effekt auf die extraneuronalen Zellen dokumentieren. Auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die IMR-32-Zelllinie nahm Dexamethason kaum Einfluss. Hier konnte einmalig eine Hemmung von 23% bei einer Konzentration von 1x10<sup>-4</sup>mol/l verzeichnet werden. Die sonstigen Werte lagen bei 0% Hemmung.

Hemmung der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien nach Applikation von **Dexamethason**:

**OCT3 >> SK-N-SH ~ Kelly > IMR-32**

Auch bei der Noradrenalinaufnahme (Abb. 14) zeigte sich unter Zugabe von Dexamethason der deutlichste Effekt bei den OCT3-Zellen. Es kam hierbei zu einer konzentrationsabhängigen Hemmwirkung bis zu 59% ( $1,5 \times 10^{-4}$  mol/l). Die Neuroblastomzelllinien wurden wesentlich geringer beeinflusst. Die stärkste Hemmwirkung zeigte sich bei der IMR-32-Zelllinie. Es ließ sich eine Inhibition von bis zu 35% ( $1 \times 10^{-5}$  mol/l und  $1 \times 10^{-4}$  mol/l) registrieren. Der Einfluss auf die SK-N-SH- und die Kelly-Zellen war deutlich geringer (Hemmeffekt <10%).

Hemmung der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien nach Applikation von **Dexamethason**:

**OCT3 >> IMR-32 > SK-N-SH ~ Kelly**

### 3.4 Hauptversuche

Der konzentrationsabhängige Einfluss der verschiedenen GC auf die Aufnahme von Tritium markierten Katecholaminen wurde in den Screeningversuchen dargestellt. Diese Ergebnisse sollten in den Hauptversuchen bestätigt und statistisch ausgewertet werden.

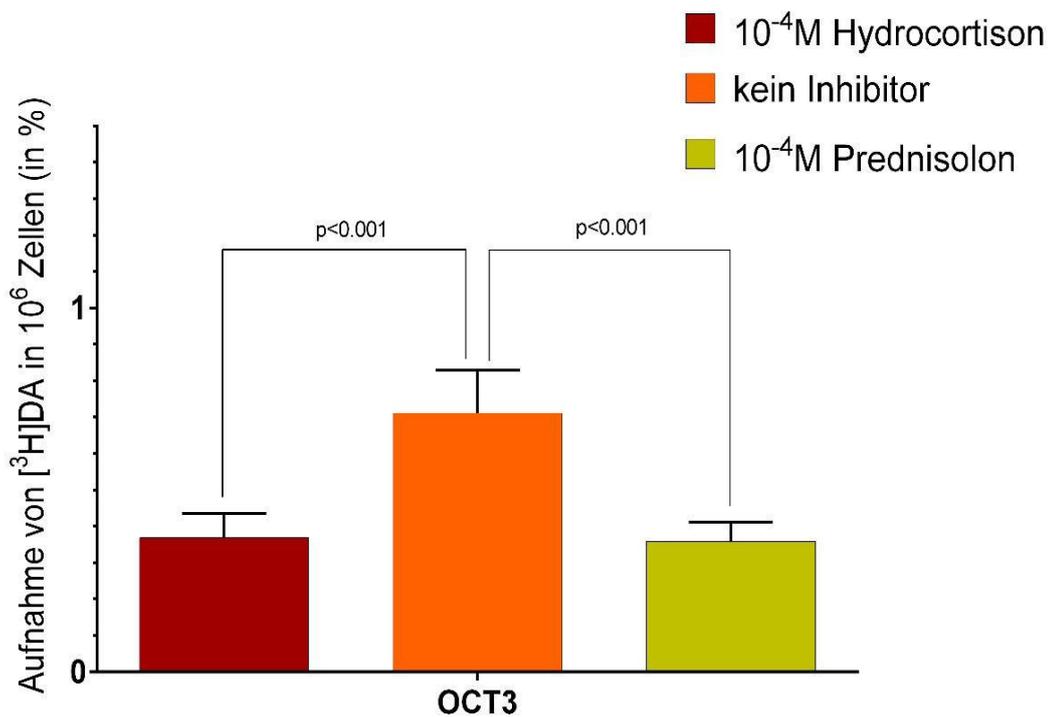
Anhand der Screeningversuche konnte ein guter Effekt der GC bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l ermittelt werden. In diesem Bereich zeigte sich ein geringer Einfluss auf die Neuroblastomzelllinien, während eine deutliche Reduktion der Aufnahme in die OCT3-Zellen registriert werden konnte. Somit wurde in den Hauptversuchen ausschließlich eine GC-Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l genutzt. Als geeignete Inhibitoren für einen optimalen Hemmeffekt haben sich Hydrocortison und Prednisolon erwiesen. Diese GC zeigten im Vergleich zu Dexamethason eine insgesamt stärkere Hemmwirkung auf die OCT3-exprimierenden Zellen. Des Weiteren wurden für die Hauptversuche OCT3-, SK-N-SH- und Kelly-Zellen verwendet. Die IMR-32-Zelllinie wurde aufgrund der geringeren NAT-Expression vernachlässigt (NAT-Expression: SK-N-SH > Kelly > IMR-32; 3.3.2-3.3.4). Die Versuchsdurchführung entsprach weitestgehend den Screeningversuchen (2.2.2). Allerdings wurden 3 unterschiedliche Passagezahlen der jeweiligen Zelllinien an 3 verschiedenen

Tagen verwendet. Weiterhin wurden im Gegensatz zu den Doppelmessungen der Screenigversuche 3 Werte pro Zelllinie und Versuchstag bestimmt. Somit standen insgesamt 9 Messwerte pro Zelllinie für die Mittelwertberechnung zur Verfügung. Die getesteten Zellen wurden ebenfalls in Zentrifugenröhrchen gesammelt und im Wasserbad (37°C) mit den Inhibitoren sowie [<sup>3</sup>H]DA bzw. [<sup>3</sup>H]NA (f.c. ~1x10<sup>-7</sup> mol/l) für 15min inkubiert.

In den folgenden Graphiken ist auf der Ordinate die radioaktive Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien in Prozent aufgetragen. Die Aufnahmewerte wurden in Bezug zum 100%-Wert gesetzt und errechnet (2.2.3). Der 100%-Wert entspricht dem ermittelten cpm-Wert des jeweils insgesamt angebotenen [<sup>3</sup>H]DA bzw. [<sup>3</sup>H]NA in 500µl TritonX-100 (2.2.2.8). Für die statistische Auswertung wurde die Standardabweichung berechnet und ein zweiseitiger, gepaarter t-Test durchgeführt. Mittels p-Wert ließ sich eine Aussage über die statistische Signifikanz bezüglich des Hemmeffektes treffen. Zur graphischen Darstellung diente das Programm GraphPad Prism 5 (Graphpad Software, Inc.).

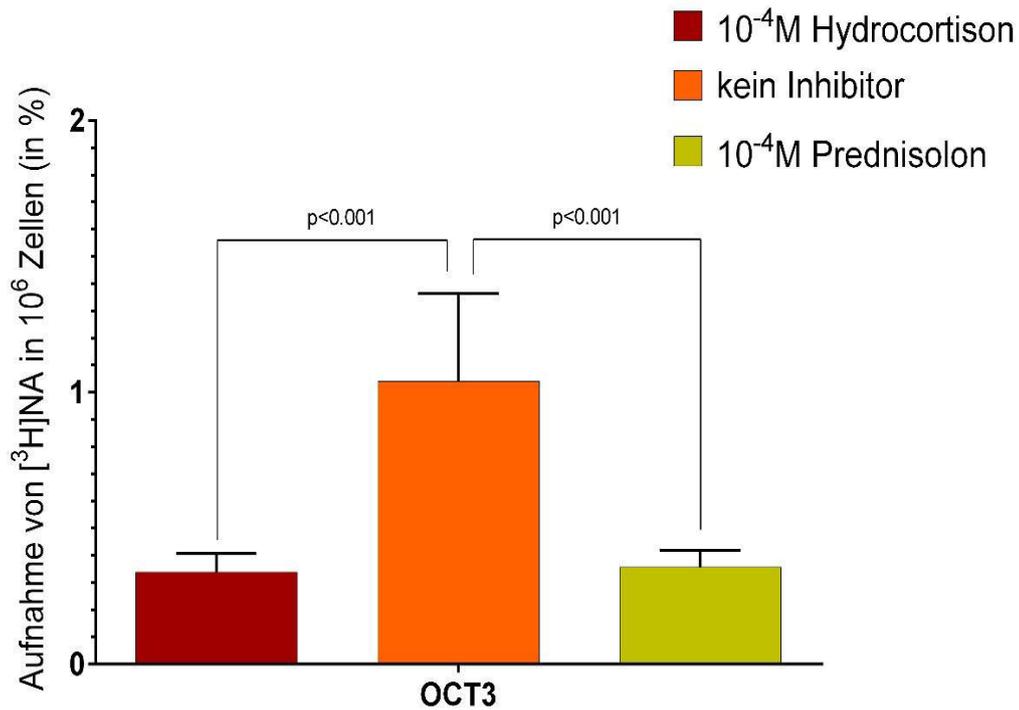
### **3.4.1 Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen unter Einfluss von 1x10<sup>-4</sup> mol/l Hydrocortison und Prednisolon in die OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie**

Die folgenden Graphiken (Abb. 15+16) zeigen die Inkorporation von [<sup>3</sup>H]DA bzw. [<sup>3</sup>H]NA in die extraneuronale **OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie**. Die radioaktive Aufnahme ist hierbei prozentual zu der insgesamt angebotenen Radioaktivität (100%-Wert) angegeben. In jeweils 3 Messungen an 3 verschiedenen Versuchstagen wurde der Einfluss von 1x10<sup>-4</sup> mol/l Hydrocortison sowie Prednisolon getestet und in Säulendiagrammen im Vergleich zu den Messungen ohne Inhibitor dargestellt. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz der Messungen an. Dabei gilt: p > 0,05 = nicht signifikant (n.s.); p < 0,05 = signifikant und p < 0,001 = hochsignifikant.



**Abb. 15:** [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **OCT3-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

Ohne Inhibitor lag die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (Abb. 15) in die OCT3-Zellen bei 0,71% ± 0,12%. Unter Einfluss von 1x10<sup>-4</sup>mol/l Hydrocortison sank die Inkorporation statistisch hochsignifikant auf 0,37% ± 0,07%. Ebenso reduzierte sich der Wert durch die Zugabe von Prednisolon statistisch hochsignifikant auf 0,36% ± 0,06.

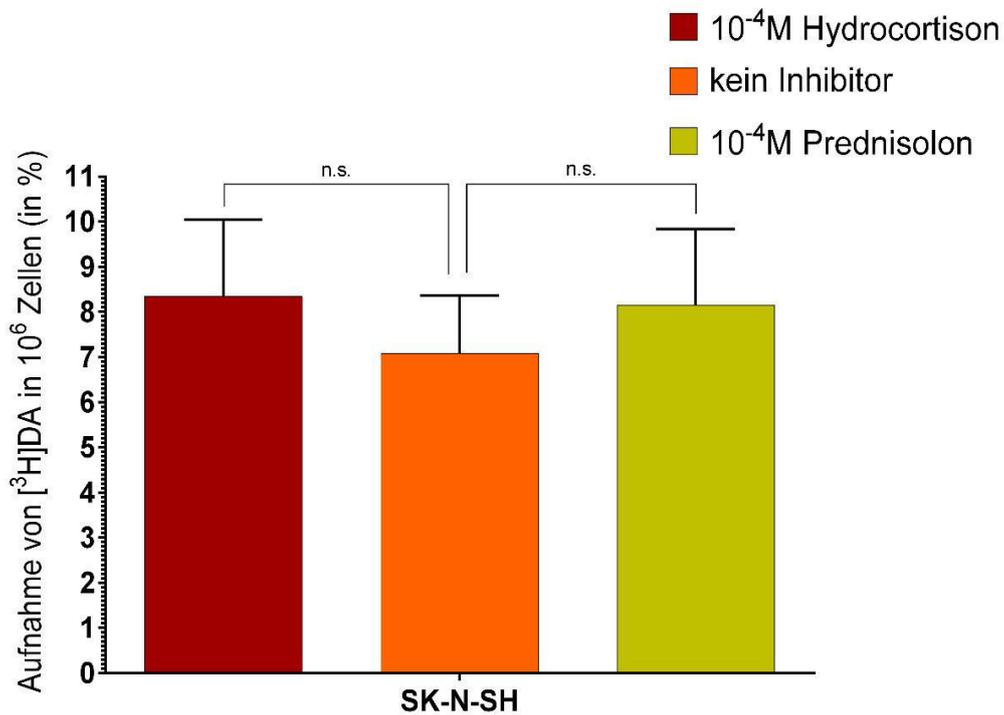


**Abb. 16:** [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **OCT3-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup> mol/l)

Auch die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (Abb. 16) in die OCT3-Zellen wurde durch die Applikation der GC statistisch hochsignifikant gesenkt. So lag diese ohne Inhibitor bei 1,04% ± 0,32. Unter Einfluss von Hydrocortison sank sie auf 0,34% ± 0,07 bzw. auf 0,36% ± 0,06 nach Zugabe von Prednisolon.

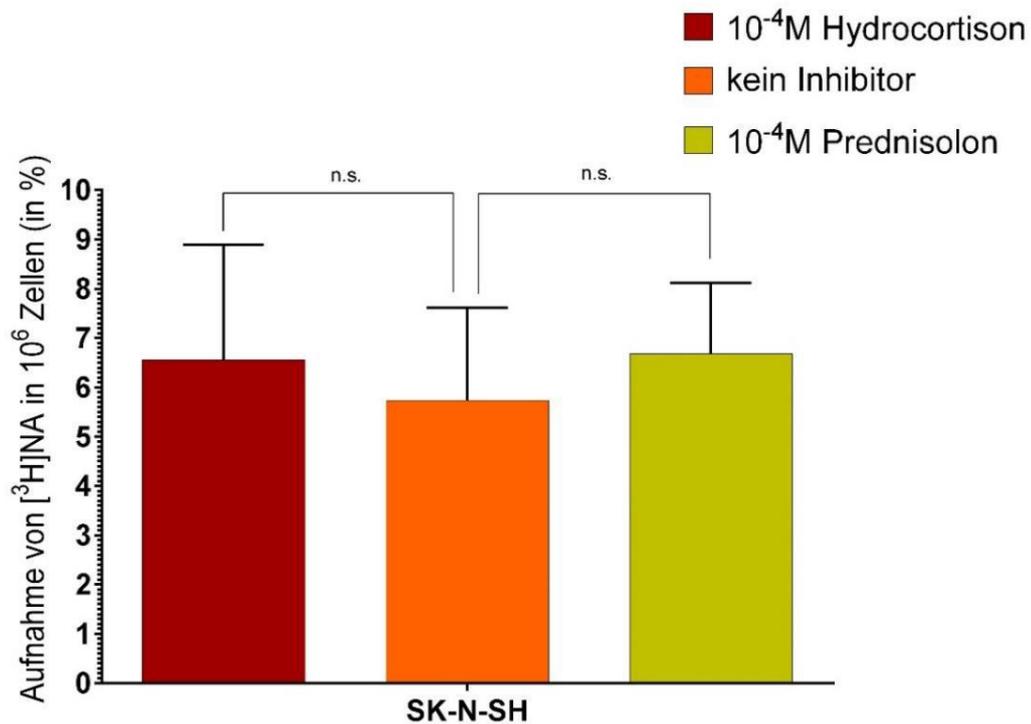
### 3.4.2 Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen unter Einfluss von 1x10<sup>-4</sup> mol/l Hydrocortison und Prednisolon in die neuronale SK-N-SH-Zelllinie

In den Abb. 17+18 ist der Einfluss der GC auf die Katecholaminaufnahme in die NAT-exprimierende SK-N-SH-Zelllinie dargestellt. Diese Zelllinie exprimiert im Vergleich zu den ebenfalls getesteten Kelly-Zellen eine höhere Anzahl des NAT.



**Abb. 17:** [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **SK-N-SH-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup> mol/l)

Abb. 17 stellt die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die SK-N-SH-Zellen dar. Ohne Inhibitor wurde ein Wert von 7,08% ± 1,3 erreicht. Die Ergebnisse unter Einfluss der GC zeigten keine signifikante Hemmung der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme. So lagen die Werte mit 8,34% ± 1,7 unter Zugabe von Hydrocortison und 8,16% ± 1,68 unter Zugabe Prednisolon sogar über der ursprünglichen Messung ohne Inhibitor.

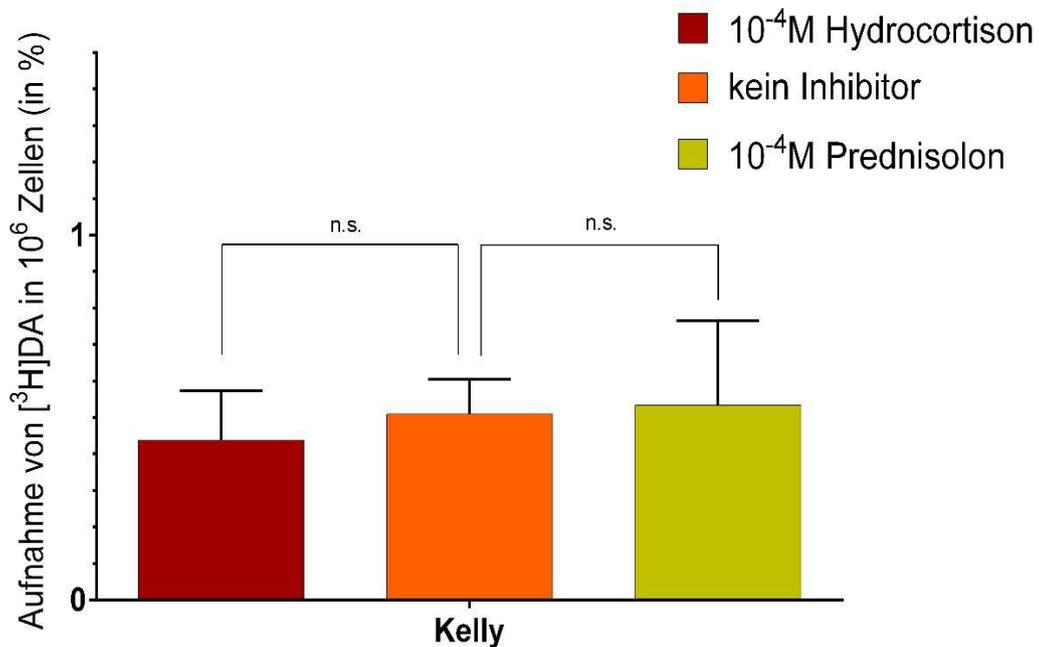


**Abb. 18:** [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **SK-N-SH-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

Ähnlich wie bei der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme zeigte sich bei der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme keine signifikante Hemmung der radioaktiven Inkorporation unter GC-Einfluss. Stattdessen konnten Messwerte registriert werden, welche über dem ursprünglichen Wert ohne Inhibitor lagen. Es ergab sich unter Zugabe von Hydrocortison eine Aufnahme von 6,55% ± 2,33 und unter Prednisolon-Einfluss ein Wert von 6,68% ± 1,44. Der Wert ohne Inhibitor betrug 5,74% ± 1,88.

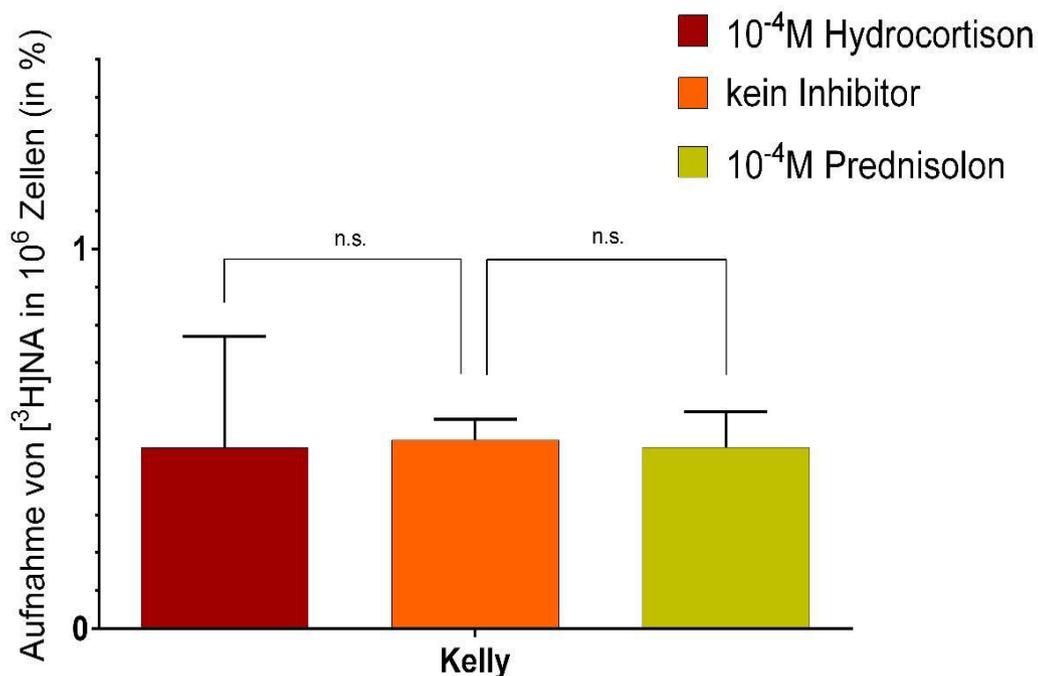
### 3.4.3 Aufnahme von radioaktiv markierten Katecholaminen unter Einfluss von 1x10<sup>-4</sup>mol/l Hydrocortison und Prednisolon in die neuronale Kelly-Zelllinie

Im Folgenden sind die Ergebnisse der NAT-exprimierenden Kelly-Zellen unter Zugabe von 1x10<sup>-4</sup>mol/l Hydrocortison bzw. Prednisolon dargestellt.



**Abb. 19:** [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in % (f.c. ~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup> mol/l)

Wie aus Abb. 19 ersichtlich, kam es zu keiner signifikanten Reduktion der **[<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme** in die Kelly-Zelllinie unter Zugabe der GC. Der Wert ohne Inhibitor lag bei 0,51% ± 0,09. Unter Einfluss von Hydrocortison wurde ein Wert von 0,44% ± 0,14 ermittelt. Die Messungen nach der Zugabe von Prednisolon ergaben eine [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme von 0,53% ± 0,23.



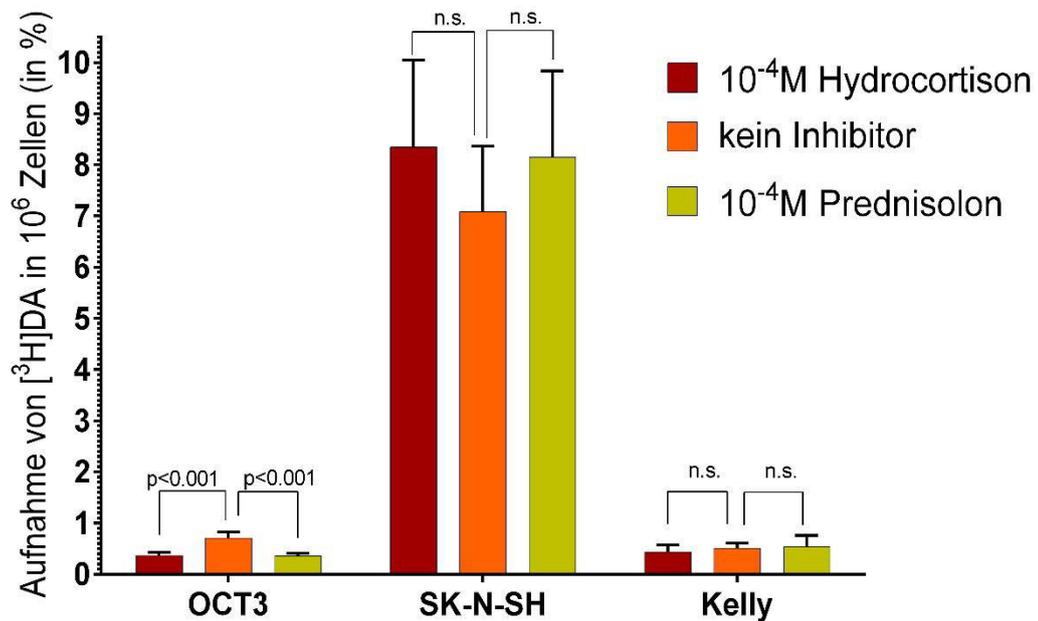
**Abb. 20:** [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup> mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup> mol/l)

Auch die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (Abb. 20) in die Kelly-Zellen wurde unter Einfluss der GC nicht signifikant reduziert. Ohne Inhibitor konnte eine Inkorporation von 0,5% ± 0,06 ermittelt werden. Die Werte unter Einfluss der GC lagen bei 0,48% ± 0,06 für Hydrocortison sowie bei 0,48% ± 0,09 für Prednisolon.

### 3.4.4 Vergleich der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA und [<sup>3</sup>H]NA in die verschiedenen Zelllinien unter Einfluss von 1x10<sup>-4</sup> mol/l Hydrocortison und Prednisolon

Zusammenfassend werden nun die zuvor beschriebenen Ergebnisse der [<sup>3</sup>H]DA- und [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die verschiedenen Zelllinien unter Einfluss von Hydrocortison und Prednisolon im direkten Vergleich zueinander dargestellt. Weiterhin werden die verschiedenen Zelllinien bezüglich der radioaktiven Gesamtaufnahme miteinander verglichen. Somit kann u.a. eine indirekte

Aussage über die NAT-Expression der verwendeten Neuroblastomzelllinien gegeben werden.



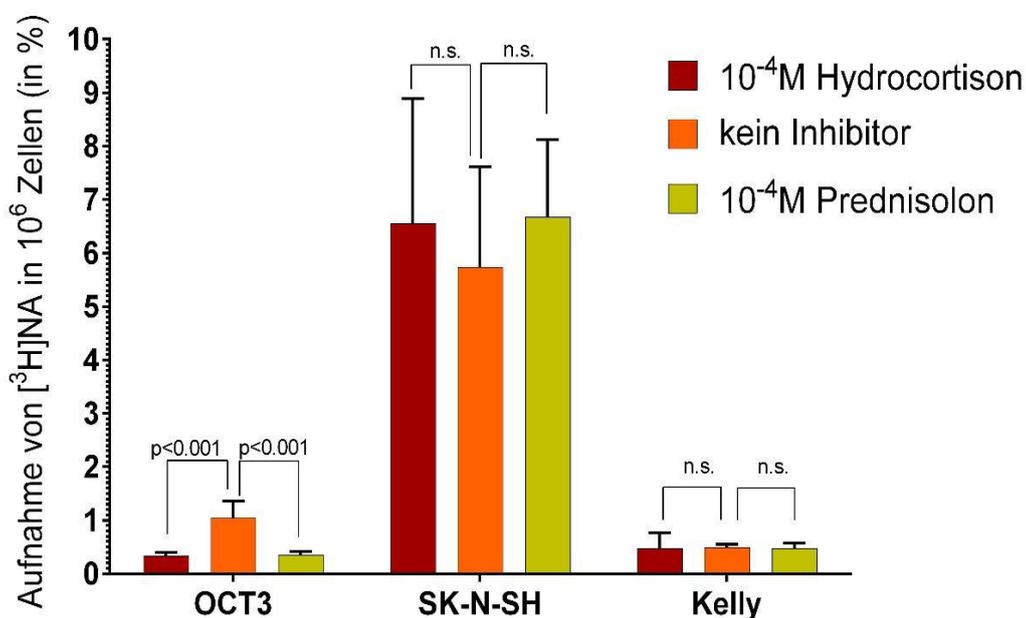
**Abb. 21:** Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA in  $1 \times 10^6$  **OCT3-**, **SK-N-SH-** oder **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l)

Ohne Inhibitor wurden  $0,71\% \pm 0,12$  des insgesamt angebotenen [<sup>3</sup>H]DA in die OCT3-Zellen aufgenommen (Abb. 21). Für die SK-N-SH-Zellen wurde ein Wert von  $7,08\% \pm 1,3$  ermittelt. Die Kelly-Zellen inkorporierten  $0,51\% \pm 0,09$  des angebotenen [<sup>3</sup>H]DA. Somit ergab sich für die SK-N-SH-Zellen eine ~10-fach höhere [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme im Vergleich zu den OCT3-Zellen. Verglichen mit den Kelly-Zellen zeigte sich eine ~14-fach höhere radioaktive Aufnahme in die SK-N-SH-Zellen. Hieraus ergibt sich folgende Reihenfolge für die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme:

Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]DA ohne Einfluss eines Inhibitors:

**SK-N-SH >> OCT3 > Kelly**

Nach Zugabe der GC verringerte sich die radioaktive Dopaminaufnahme in die OCT3-Zellen statistisch hoch signifikant. Unter Einfluss von Hydrocortison wurde ein Aufnahmewert auf  $0,37\% \pm 0,12$  ermittelt. Dies bedeutet eine effektive Reduktion der  $[^3\text{H}]$ DA-Aufnahme um ca. die Hälfte. Nach Applikation von Prednisolon sank der Wert auf  $0,36\% \pm 0,05$ . Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den Neuroblastomzelllinien unter GC-Einfluss keine statistisch signifikante Hemmung.



**Abb. 22:** Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ NA in  $1 \times 10^6$  **OCT3**-, **SK-N-SH**- oder **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l)

Die  $[^3\text{H}]$ NA-Aufnahme in die OCT3-Zelllinie lag ohne Inhibitor bei  $1,04\% \pm 0,32$  (Abb. 22). Folglich zeigte sich im Vergleich zu der  $[^3\text{H}]$ DA-Aufnahme ( $0,71\% \pm 0,12$ ; Abb. 21) eine 1,5-fach stärkere Inkorporation von  $[^3\text{H}]$ NA in die OCT3-Zelllinie. Unter Einfluss von Hydrocortison sank die Aufnahme statistisch hochsignifikant auf  $0,34\% \pm 0,07$  bzw. auf  $0,36\% \pm 0,06$  nach Zugabe von Prednisolon. Somit ergab sich ein deutlicherer Hemmeffekt auf die

[<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme verglichen mit der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (Reduktion der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme um ~2/3 vs. Reduktion der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme um ~1/2).

Die SK-N-SH-Zellen nahmen ohne Inhibitor 5,74% ± 1,9 des ursprünglich angebotenen [<sup>3</sup>H]NA auf, während die Kelly-Zellen eine Inkorporation von 0,5% ± 0,06 zeigten. Es ergibt sich somit folgende Reihenfolge hinsichtlich der [<sup>3</sup>H]NA-Gesamtaufnahme in die verschiedenen Zelllinien:

Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]NA ohne Einfluss eines Inhibitors:

**SK-N-SH >> OCT3 > Kelly**

Abschließend wird nochmals gesondert auf das Aufnahmeverhalten der verschiedenen Zelllinien gegenüber [<sup>3</sup>H]DA und [<sup>3</sup>H]NA eingegangen (Tab. 6). Hierdurch kann indirekt auf die Affinität der Transporter gegenüber den verschiedenen Katecholaminen rückgeschlossen werden.

Die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme ohne Inhibitor lag für die SK-N-SH-Zelllinie um ~1,5% höher als die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (7,1% ± 1,3 [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme vs. 5,74% ± 1,9 [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme). Die Kelly-Zellen nahmen im Vergleich etwa gleich viel radioaktiv markiertes DA wie NA auf (0,51% ± 0,1 [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme vs. 0,5% ± 0,06 [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme). Die OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie zeigte hingegen eine stärkere Noradrenalin Aufnahme verglichen mit der Dopaminaufnahme (1,04% ± 0,32 [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme vs. 0,71% ± 0,12 [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme). Somit ergibt sich indirekt eine höhere Affinität des NAT gegenüber Dopamin sowie des OCT3 gegenüber Noradrenalin

**Tab. 6:** Vergleich der Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]DA und [<sup>3</sup>H]NA in die verschiedenen Zelllinien

Zelllinien	[ <sup>3</sup> H]DA-Aufnahme vs. [ <sup>3</sup> H]NA-Aufnahme
OCT3	<
SK-N-SH	>
Kelly	≈

## 4 Diskussion

In der Neuroblastomdiagnostik und –therapie wird radioaktiv markiertes mIBG zur Darstellung ( $[^{123}\text{I}]\text{mIBG}$ ) und Therapie ( $[^{131}\text{I}]\text{mIBG}$ ) des Tumors eingesetzt. Als neuere Substanz wird 6- $[^{18}\text{F}]\text{FDA}$  diskutiert, welches u.a. in der Phäochromozytomdarstellung zur Anwendung kommt und daher auch zukünftig nützlich in der Diagnostik des Neuroblastoms sein könnte (72, 194). Allerdings liegen bezüglich des Neuroblastoms bisher noch wenige klinische Daten vor (68-71). 6-FDA kann über den NAT und den DAT in Zellen des sympathischen Nervensystems aufgenommen werden, da es DA strukturell ähnelt. Der Transport von mIBG hingegen geschieht ähnlich dem NA primär über den NAT. Als störender Nebeneffekt der mIBG-Applikation erweist sich allerdings die zusätzliche Aufnahme der Substanz in tumorfremdes Gewebe (4-6, 62, 195). In nicht tumorösen Gewebe werden die Substanzen zum Großteil über organische Kationentransporter (OCT1, OCT2, OCT3) aufgenommen. Diese Aufnahme wurde u.a. in verschiedenen Versuchen im Rahmen der Dissertationen von Bayer und von Sauer nachgewiesen (8, 76). In geringem Maß spielt auch eine passive, transmembranäre Diffusion eine Rolle. Da dieser Anteil der Aufnahme allerdings sehr gering ist und die Diffusionsrate aufgrund des vergleichbaren Aufbaus der Zellmembranen verschiedener Zelllinien ähnlich sein wird, konnte diese Tatsache zur Interpretation der Ergebnisse außer Acht gelassen werden (10, 74).

Weiterhin zeigte Bayer et al. in Aufnahmeversuchen, dass der Transport von Katecholaminen und Katecholamin-ähnlichen Substanzen wie mIBG in OCT-exprimierende Zellen durch das Corticosteroid Corticosteron reduziert werden kann. Im Gegensatz hierzu war der Hemmeffekt auf NAT-exprimierende Zelllinien deutlich geringer (7). Da der OCT und der NAT um das gleiche Substrat konkurrieren, bedeutet eine Inhibition der Aufnahme über den OCT im Rückschluss eine relative Steigerung der Inkorporation zugunsten der Tumorzellen. Dieser Effekt könnte somit genutzt werden, um eine bessere

Bildgebung zu erhalten, was die Diagnostik des Neuroblastoms verbessern würde.

Um den Gedanken auszuweiten, wurde in dieser Arbeit die Wirkung weiterer, klinisch zugelassener GC auf die [<sup>3</sup>H]NA- und [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in OCT3- und NAT-exprimierende Neuroblastomzelllinien evaluiert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der verwendeten Katecholaminen gegenüber mIBG und 6-FDA, eigneten sich diese Substanzen gut, um Zellkulturversuche als Grundlage für spätere Tierversuche durchzuführen. Bei den verwendeten GC wurden 3 Substanzen dieser Wirkstoffgruppe ausgewählt, welche jeweils eine unterschiedliche HWZ und Wirkstärke besitzen (Hydrocortison < Prednisolon < Dexamethason) (172). Diese GC kommen in der Pädiatrie bei vielen Erkrankungen u.a. wegen ihren immunsuppressiven Eigenschaften zum Einsatz.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Aufnahmeversuche analysiert und in Bezug zu bereits vorhandener Literatur gesetzt. Zuvor wird jedoch auf die Versuchsbedingungen eingegangen, da diese von großer Bedeutung für die Beurteilung der Ergebnisse sind. Das Ziel von in-vitro Versuchen ist es, die Bedingungen so zu gestalten, dass sie möglichst realistisch den Voraussetzungen im Organismus entsprechen. Dennoch muss bei der Betrachtung der Versuche immer berücksichtigt werden, dass eine identische Überführung von Zellkulturversuchen auf in-vivo Versuche nicht möglich ist. So kann es beispielsweise bei in-vivo Messungen durch die Verteilung der Substanzen im Körper zu einem Verdünnungseffekt kommen, welcher eine erneute Konzentrationsbestimmung erfordert (8).

## **4.1 Versuchsbedingungen**

### **4.1.1 Kontamination von Zellkulturen**

Bei der Arbeit mit Zellkulturen ist besonders auf ein steriles und sauberes Arbeiten zu achten. Im Rahmen der Screeningversuche kam es über einen

längeren Zeitraum immer wieder zu einem Pilzbefall.

Die Kontamination führte letztendlich dazu, dass ein erheblicher Teil, der für die Versuche kultivierten Zellen, für die Identifizierung und Beseitigung dieser Störeffekte aufgewendet werden musste.

Erstmals trat der Befall bei der OCT3-exprimierenden HEK293-Zelllinie auf. Die kontaminierten Flaschen wurden sofort entsorgt und der Brutschrank desinfiziert. Nach erneutem Auftauen von eingefrorenen Zellen war die Kultur nach einer Latenz von einigen Tagen wieder befallen. Aufgrund der leicht geöffneten Flaschendeckel konnten sich die Sporen im Schrank möglicherweise auf die anderen hierin befindlichen Kulturen ausbreiten. Trotz regelmäßiger Reinigung und Desinfektion des Brutschrankes und der Sterilbank trat das Problem immer wieder auf. Letztendlich wurde die Kontaminationsquelle nicht gefunden.

Der Ursprung einer Kontamination kann vielfältig bedingt sein. So kann es u.a. durch den Menschen selbst sowie durch verwendete Medien und Verbrauchsmaterialien wie beispielsweise Kulturflaschen oder Zentrifugenröhrchen zu Verunreinigungen kommen.

Die Zellkulturen wurden schließlich mit einem Antimykotikum behandelt, welches den Pilzbefall aufhielt. Hieran ließ sich erkennen, wie schwierig es ist wieder sterile Arbeitsbedingungen bei einer einmal kontaminierten Umgebung herzustellen.

Neben den Pilzen gibt es verschiedene andere Möglichkeiten der Kontamination. Hierzu gehören ein breites Spektrum an viralen Erregern, Bakterien einschließlich Mykobakterien und anderen Zelllinien (196).

Generell sind Bakterien die häufigsten Kontaminanten. Die Generationszeit liegt oft unter einer Stunde. Hinweise auf eine mögliche Kontamination geben eine Trübung des Mediums sowie das mikroskopische Bild. Durch einen antibiotischen Zusatz im Kulturmedium wie Penicillin-Streptomycin wird das Wachstum meist verhindert. Eine Sonderform der bakteriellen Kontamination nehmen die Mykoplasmen ein. Mykoplasmen besitzen keine Zellwand und können nicht mikroskopisch identifiziert werden. Weiterhin zeigt sich keine Trübung des Mediums, weshalb eine Kontamination lange unerkannt bleibt. Die

Bakterien führen allerdings im Verlauf zu einer Beeinträchtigung der Zellproliferation. Es wird davon ausgegangen, dass bei 15-35% aller Zelllinien eine Kontamination mit Mykoplasmen vorliegt, weshalb dies regelmäßig getestet werden sollte (197). Eine gängige Nachweismethode ist hierbei die PCR (198, 199).

#### **4.1.2 Einsatz von radioaktiv markierten Katecholaminen als [<sup>123</sup>I]mIBG- und 6-[<sup>18</sup>F]FDA-Analoga**

Die Versuche wurden mit den radioaktiv markierten Katecholaminen [<sup>3</sup>H]NA bzw. [<sup>3</sup>H]DA durchgeführt, da mIBG und 6-FDA nicht verfügbar waren. In PET-Zentren wird bisher nur 6-[<sup>18</sup>F]FDOPA eingesetzt. Durch enzymatische Decarboxylierung entsteht aus dieser Substanz 6-[<sup>18</sup>F]FDA (200). Allerdings hat sich eine routinemäßige Herstellung des Pharmakons noch nicht etabliert. Dies liegt u.a. an der kurzen HWZ von <sup>18</sup>F (~109 min). Somit ist das Isotop im Vergleich zu beispielsweise <sup>123</sup>I (13 h) und <sup>131</sup>I (8,2 Tage) sehr instabil (60). Z. Kuçi konnte allerdings in einer Versuchsreihe mit Kelly-Zellen eine schnelle Synthese innerhalb von 10 min von 6-[<sup>18</sup>F]FDOPA zu 6-[<sup>18</sup>F]FDA etablieren. Unter diesen Bedingungen könnte eine künftige Herstellung von 6-[<sup>18</sup>F]FDA möglich sein (unveröffentlichte Ergebnisse von Kuçi). Auch das in der Neuroblastomdiagnostik und Therapie genutzte mIBG war für die in vitro Aufnahmeversuche nicht praktikabel, u.a. bedingt durch die geringe HWZ (s.o.). [<sup>3</sup>H]NA bzw. [<sup>3</sup>H]DA stellen aufgrund der beschriebenen strukturellen Ähnlichkeit zu mIBG und FDA eine gute Alternative als „Ersatzsubstrate“ dar. Für die Versuche wurde durchgehend eine Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$  mol/l für [<sup>3</sup>H]NA und [<sup>3</sup>H]DA gewählt, da sich diese in der Dissertation von Bayer, welche eine ähnliche Fragestellung behandelte, als geeignet erwiesen hat (7, 8).

Im direkten Vergleich der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]NA und [<sup>3</sup>H]DA in die verschiedenen getesteten Zelllinien konnten wesentliche Unterschiede bezüglich der Substrataffinität quantifiziert werden. So nahm in den statistisch ausgewerteten Hauptversuchen v.a. die NAT-exprimierende SK-N-SH-Zelllinie deutlich mehr DA im Vergleich zu NA auf (3.4.2). In der Literatur wird ebenfalls

eine etwas höhere Affinität des NAT gegenüber DA beschrieben (106, 170). Weiterhin kann diesbezüglich die mögliche Expression des DAT auf dieser Neuroblastomzelllinie in Betracht gezogen werden. In unveröffentlichten Studien von Ballweg und Kuçi gelang es, ein schwaches Signal des DAT auf den SK-N-SH-Zellen zu registrieren (unveröffentlichte Ergebnisse von Ballweg et al.). Da der DAT substratspezifisch für DA ist, könnte eine mögliche Expression des Transporters zusätzlich zu einer vermehrten [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die SK-N-SH-Zelllinie führen. Allerdings konnte eine Genexpression des DAT in anderen Studien bisher nicht nachgewiesen werden (201). Somit gibt es keine eindeutigen Beweise dafür, dass der DAT auf den Neuroblastomzellen exprimiert wird.

Bei den OCT3-Zellen wurde im Gegensatz zu den Neuroblastomzelllinien eine vermehrte [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme registriert (3.4.1). Diese höhere Affinität des OCT3 gegenüber NA wird ebenfalls in der Literatur beschrieben (9, 113).

Um die Bedeutung der Ergebnisse in Bezug zur Neuroblastomdiagnostik zu setzen, müssen diese auf die Anwendung von mIBG bzw. 6-FDA transferiert werden. Das bisher szintigraphisch genutzte mIBG zeichnet sich durch eine Aufnahme ähnlich dem NA über den NAT aus. Der Transport über den DAT und den 5-HTT ist hingegen weniger wahrscheinlich (202). 6-FDA wird genau wie sein Analogon DA über den NAT und den DAT inkorporiert (3, 74, 75, 201). Die Affinität des NAT gegenüber DA ist im Vergleich zu NA größer. Somit müsste im Umkehrschluss der Einsatz von 6-[<sup>18</sup>F]FDA verglichen mit der Verwendung von mIBG zu einer stärkeren Aufnahme des Tracers in die Neuroblastomzellen führen. Weiterhin würde sich der beschriebene Aspekt einer möglichen DAT-Expression auf den Neuroblastomzellen ebenfalls zu Gunsten einer vermehrten 6-FDA-Inkorporation auswirken. In Bezug auf die OCT3-Zellen, welche eine höhere Affinität gegenüber NA aufweisen, würde ein Einsatz von 6-[<sup>18</sup>F]FDA somit eine geringe Aufnahme im Vergleich zu dem routinemäßig genutzten [<sup>123</sup>I]mIBG bedeuten. Da die Tracer-Aufnahme über den OCT3 einen unerwünschten Nebeneffekt darstellt, könnte auch diesbezüglich 6-FDA gegenüber mIBG überlegen sein. Diese Annahme setzt jedoch voraus, dass die in Kombination getesteten GC die Aufnahme von

[<sup>3</sup>H]DA und [<sup>3</sup>H]NA bzw. von mIBG und 6-FDA in die OCT3-Zellen gleichermaßen reduzieren. Allerdings zeigten Hydrocortison und Prednisolon einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme im Vergleich zu der [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme. Wie in 3.4.1 aufgeführt, wird die Inkorporation von [<sup>3</sup>H]NA in die OCT3-Zellen unter GC-Einfluss auf fast 1/3 des Ausgangswertes reduziert, während sich die Messwerte von [<sup>3</sup>H]DA nur halbieren. Die Applikation von Hydrocortison bzw. Prednisolon führt letztendlich, trotz initial stärkerer [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme ohne Inhibitor, zu einem ähnlichen Resultat bezüglich der Gesamtaufnahmen beider Katecholamine in die OCT3-Zellen. Somit relativiert sich unter Einfluss von GC die oben beschriebene Hypothese. Zusammenfassend lässt sich jedoch unter GC-Zugabe eine stärkere [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die SK-N-SH-Zellen, bei gleichwertigem Resultat der [<sup>3</sup>H]DA- bzw. [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die OCT3-Zellen, festhalten. Dies unterstützt die Annahme, dass das DA-Analogon 6-FDA eine Alternative zu mIBG sein könnte.

#### **4.1.3 Inkubationspuffer und Inkubationszeit**

Der pH-Wert des Inkubationspuffers sollte als Annäherung an die physiologischen Bedingungen bei ca. 7,4 liegen. Da Wasser in Kontakt zu CO<sub>2</sub> Protonen bildet ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ), die zu einem Absinken des pH-Wertes führen, war es wichtig, dass die Versuche möglichst rasch (15 min Inkubationszeit) und unter Raumluft durchgeführt wurden. Demnach wirkte eine Konzentration von 0,03% CO<sub>2</sub> bei Raumluft, statt eine mit 0,5% CO<sub>2</sub> angereicherte Luft aus dem Brutschrank, auf den Puffer ein. Hierdurch durfte davon ausgegangen werden, dass es unter diesen Bedingungen kaum zu einem Einfluss auf den pH-Wert kam.

Die gewählte Inkubationszeit in den Aufnahmeversuchen lag bei 15 min. Dieser Parameter wurde aufgrund von vorherigen Studien gewählt. Bayer zeigte in zeitabhängigen [<sup>3</sup>H]NA- und [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahmeversuchen, dass es zu einem stetigen Anstieg der Aufnahme innerhalb von 30 min in die SK-N-SH- und OCT3-Zellen kommt (8). Allerdings ist es, wie Bayer schon in ihrer Arbeit

beschrieb, unklar, ob sich eine Sättigung auch bei anderen Zelllinien erst nach dieser Zeit einstellt. Damit eine ausreichende Aufnahme gewährleistet wurde, wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Bayer ebenfalls eine Inkubationszeit von 15 min gewählt.

#### **4.1.4 Glucocorticoide**

In dieser Arbeit wurde mittels verschiedener GC der inhibitorische Effekt auf die Katecholaminaufnahme in neuronale und extraneuronale Zelllinien getestet. Im Verlauf der molekulargenetischen Erforschung des OCT1+2 sowie des OCT3 wurden verschiedene Hemmstoffe dieser extraneuronalen Transportsysteme aufgedeckt, zu welchen auch Corticosteron gehört (10, 11, 113, 119). Dies bestätigte Bayer in ihren Aufnahmeversuchen (8). Der Einfluss des GC zeigte eine deutliche Reduktion der Katecholaminaufnahme in die extraneuronale OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie, während die NAT-exprimierenden Neuroblastomzellen weitgehend unbeeinflusst blieben. Hieraus ergab sich die Annahme, dass eine gleichzeitige Applikation von GC in Kombination mit mIBG bzw. 6-FDA von Vorteil für die szintigraphische Neuroblastomdiagnostik sein könnte. Durch die Hemmung der Tracer-Aufnahme in OCT-exprimierende Körperzellen könnte es zu einer relativen Steigerung des radioaktiven Uptake in die Neuroblastomzellen kommen.

Corticosteron wird in geringem Maß endogen synthetisiert (203). Es ist jedoch kein klinisch zugelassenes Pharmakon, welches direkt vor einer mIBG-Szintigraphie bzw. -Therapie appliziert werden darf. Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit GC ausgewählt, welche im klinischen Alltag weitverbreitet und zugelassen sind.

Allgemein werden GC u.a. vielfältig bei neurologischen und rheumatologischen Erkrankungen sowie bei Asthma eingesetzt (133-137). Eine besondere Rolle spielt dabei die immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung von GC (138, 139). In der Wirkungsweise wird u.a. zwischen einer stärkeren glucocorticoiden bzw. mineralcorticoiden Potenz unterschieden. Das von Bayer verwendete Corticosteron ist ein Zwischenprodukt des Mineralcorticoids

Aldosteron und hat ähnlich dem Hydrocortison eine schwache mineralcorticoide sowie glucocorticoide Wirkung (204-206).

Je nach Wirkungsweise unterscheiden sich die GC auch in ihren Nebenwirkungen. GC mit starker glucocorticoider Wirkung können bei dauerhaftem Einsatz u.a. Stammfettsucht, Diabetes mellitus und Osteoporose hervorrufen (145, 152, 207). Hingegen führt eine vermehrte mineralcorticoide Wirkung v.a. zu Hypertension und Hypokaliämie (208, 209).

Hieraus ergab sich die Annahme, dass sich GC mit schwacher mineral- und glucocorticoider Potenz eignen würden, um mögliche Nebenwirkungen (NW) nachfolgender in vivo Studien gering zu halten. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass NW meist erst nach Langzeitapplikation von GC auftreten. Folglich hätte diese theoretische Überlegung v.a. Relevanz bei einem Versuchsaufbau mit vorheriger Langzeitapplikation der GC. Dennoch sind Hydrocortison und Prednisolon im Vergleich zu dem deutlich potenteren Dexamethason nebenwirkungsärmer und zeigten zusätzlich in den Screeningversuchen einen besseren Hemmeffekt auf die OCT3-Zellen (173, 210). Hinzu kommt die deutlich längere HWZ von Dexamethason (172). Somit schienen Hydrocortison und Prednisolon für die Hauptversuche als geeignet.

Neben der klinischen Verwendbarkeit ist ein weiterer Vorteil der hier eingesetzten GC gegenüber Corticosteron, dass zum Lösen der Substanzen nicht das zytotoxische DMSO (Dimethylsulfoxid) benötigt wurde. Deshalb musste eine mögliche toxische Wirkung, welche die Katecholaminaufnahme beeinflussen könnte, nicht berücksichtigt werden. Zwar konnte in der Vergangenheit kein Einfluss von DMSO auf die Katecholaminaufnahme festgestellt werden, allerdings ist dies durch die potentielle Wirkung der Substanz nicht gänzlich auszuschließen (8).

Im Rahmen der Vorversuche wurde eine Messreihe mit wasserlöslichen GC, wie sie im „klinischen Alltag“ zur Herstellung von Infusionslösungen genutzt werden, und mit Ethanol-löslichen GC durchgeführt (3.2). Die wasserlöslichen GC wurden ausschließlich in NaCl (0,9%) gelöst. Für die Ethanol-löslichen GC wurde initial 100%iges Ethanol genutzt um eine f.c. von  $\sim 1 \times 10^{-3}$  mol/l herzustellen. Für jeden weiteren Verdünnungsschritt wurde NaCl (0,9%) als

Lösungsmittel eingesetzt (2.2.2.5). Hierbei zeigte sich nach einiger Zeit ein deutliches „Ausflocken“ der in Ethanol löslichen GC. Dies erschwerte ein zügiges Arbeiten, da die Löslichkeit mehrfach durch erneutes Vortexen wiederhergestellt werden musste. Weiterhin muss die initiale Lösung in 100% Ethanol kritisch betrachtet werden. Obwohl die Stammlösungen (f.c.  $\sim 1 \times 10^{-3}$  mol/l) zur Herstellung der verschiedenen Konzentrationen mehrmals mit NaCl (0,9%) verdünnt wurden, ist letztendlich unklar, wie sich das Ethanol auf die Zellen auswirkt. Eine zytotoxische Wirkung von Ethanol wird mehrfach in der Literatur beschrieben und könnte somit die Ergebnisse beeinflussen (211-214). Weiterhin stellte sich eine Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l der „im klinischen Alltag genutzten“ GC als geeignet zur Durchführung der Hauptversuche heraus. Bei dieser Konzentration lag lediglich eine Verdünnung von 1:10 der Ethanol-haltigen Stammlösung vor. Des Weiteren zeigte die in Ethanol gelöste Form des Dexamethasons bei allen verwendeten Konzentrationen ( $1 \times 10^{-3}$ - $1 \times 10^{-7}$  mol/l) keinen inhibitorischen Effekt auf die OCT3-Zellen. Dies lässt vermuten, dass die Hemmwirkung des Dexamethasons durch die schlechte Löslichkeit und somit durch das „Ausflocken“ der Substanz aufgehoben wurde. Zusammenfassend erwiesen sich die wasserlöslichen Formen der GC als vorteilhaft gegenüber den in Ethanol gelösten Formen der GC. Somit wurden für die endgültigen und in dieser Arbeit dargestellten Messreihen ausschließlich die wasserlöslichen GC verwendet. Allerdings wurde

ein möglicher, alleiniger Effekt der jeweiligen Lösungsmittel (Lösungsmittel ohne GC) auf die verschiedenen Zelllinien nicht evaluiert. Durch weitere Messreihen könnte u.a. die oben genannte Hypothese einer möglichen zellschädigenden Wirkung des 100%igen Ethanols quantifiziert werden. Die Konzentration von NaCl (0,9%) als isotonisches Lösungsmittel entspricht dem osmotischen Druck des Blutplasmas. Somit darf angenommen werden, dass die Verwendung von NaCl (0,9%) das Aufnahmeverhalten der verschiedenen Zellen nicht wesentlich beeinflusst. Ferner handelt es sich bei dem NAT um einen  $\text{Na}^+$ -/ $\text{Cl}^-$ -abhängigen Transporter (109, 110). Somit könnte NaCl (0,9%) als Lösungsmittel den Transport der Katecholamine in die Neuroblastomzellen

sogar fördern.

Für alle Versuchsreihen wurde als extraneuronale Zelllinie die OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie ausgewählt. Um Zellen herzustellen, welche selektiv den OCT3 exprimieren, wurden die dem Transporter zugeordneten DNA-Sequenzen von Caki-1-Zellen isoliert und auf die HEK293-Zelllinie übertragen (215). Die Auswahl dieser Zelllinie wurde getroffen, da der OCT3 im Vergleich zu dem OCT1 und OCT2 am stärksten auf die inhibitorische Wirkung von Corticosteron anspricht (8-11). Weiterhin ist die Affinität des Transporters gegenüber Katecholaminen wesentlich höher (116). Somit nimmt der OCT3 wahrscheinlich die wichtigste Rolle in der extraneuronalen Aufnahme von Katecholaminen ein und den höchsten Stellenwert bezüglich der Fragestellung dieser Arbeit.

Wie beschrieben, zeigten die GC im Rahmen der durchgeführten Kurzzeitversuche keinen relevanten inhibitorischen Effekt auf die Neuroblastomzellen. Allerdings wurden in der Literatur Auswirkungen nach längerem GC-Einfluss beschrieben. Interessant diesbezüglich ist das Auftreten eines genomischen Effektes nach GC-Applikation. Hierbei kam es nach Verwendung von Dexamethason u.a. zu Modifikationen im Zytoskelett von N-Typ-Neuroblastomzellen und zu einem signifikanten Ansteigen der N-Myc-mRNA (182, 183). Vermittelt wurden diese Effekte durch den GR, welcher u.a. über Immunoblot Assays in den Zellen nachgewiesen werden konnte (97). Weiterhin zeigte sich eine Aufhebung der GC-Wirkung nach Zugabe des GR-Antagonisten RU486 (182, 183). Sun et al. führten Versuche mit der Neuroblastomzelllinie SK-N-BE(2)C durch. Die Zellen wurden 14 bis 21 Tage mit Corticosteron exponiert. Hier konnte eine Steigerung der mRNA und der Proteine des NAT sowie ein gleichzeitiger Anstieg der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme beobachtet werden (184). Auch Zha et. al bestätigten in Versuchen mit Dexamethason diese Hochregulation der NAT-Expression, hervorgerufen durch einen nicht-konventionellen Transkriptionsmechanismus, welcher durch den GR vermittelt wird (185). Somit ergibt sich die Frage, ob die genomischen Effekte, welche durch eine Langzeitapplikation der GC hervorgerufen werden, nützlich für die szintigraphische Neuroblastomdarstellung sein könnten.

Da eine N-Myc-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht, muss dieser Effekt als Nachteil bewertet werden (23, 24). Hingegen könnte eine Hochregulation des NAT nach längerer Exposition zu einer vermehrten Traceraufnahme in die Tumorzellen führen. Im Rückschluss würden so deutlichere Signale in der Szintigraphie generiert werden, was eine zusätzliche Verbesserung der Diagnostik bedeuten würde. Demnach könnte eine Langzeitapplikation von GC vor der Bildgebung sogar von Vorteil sein. Allerdings sind diesbezüglich auch Messreihen von Bayer et al. bedeutsam, welche die Langzeitwirkung von GC auf die OCT3-Zellen darstellen (216). In Versuchen nach Vorbehandlung der Neuroblastomzellen mit GC über 1 bis 21 Tage zeigte sich ebenfalls eine Steigerung der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme. Allerdings nahm der inhibitorische Effekt der GC auf die OCT3-Zellen ab. Jedoch zeigte sich ohne Einfluss der GC ebenso eine Reduktion des radioaktiven Uptake in die extraneuronale Zelllinie (216). Ob eine längere Vorbehandlung mit GC vor der szintigraphischen Diagnostik von Vorteil wäre, lässt sich somit nicht eindeutig evaluieren. Schlussfolgernd aus den bisher erhobenen Ergebnisse und der vorhandenen Literatur sollte dies jedoch kritisch beurteilt werden. Im Folgenden soll sowohl auf die Screeningversuche, als auch auf die statistisch repräsentativen Hauptversuche eingegangen werden.

#### **4.2 Auswertung der Screeningversuche**

In den Screeningsversuchen zeigte sich eine deutliche inhibitorische Wirkung der GC auf die Katecholaminaufnahme in die OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie\_(3.3.1). Die Dopaminaufnahme konnte schon bei geringen Konzentrationen der GC reduziert werden. Nur Prednisolon zeigte erst bei höheren Konzentrationen einen Hemmeffekt. Im Gegensatz hierzu kam es bei der niedrigsten Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$  mol/l durch keines der verwendeten GC zu einem wesentlichen Einfluss auf die Noradrenalinaufnahme. Bei der Maximalkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l konnten hingegen ebenfalls Messwerte zwischen 59% bis 78% Hemmung registriert werden. Insgesamt fällt somit, v.a.

bei niedrigeren Konzentrationen ( $1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-5}$  mol/l), eine deutlichere Inhibition der [ $^3$ H]DA-Inkorporation in die OCT3-Zellen im Vergleich zu der [ $^3$ H]NA-Aufnahme auf. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bayer, in denen eine stärkere Hemmung der NA-Aufnahme unter Einfluss von Corticosteron stattfand (Bayer, 2010). Zur Erklärung wurde hierbei berücksichtigt, dass insgesamt mehr NA als DA über den OCT3 aufgenommen wird und dies somit auch zu einer intensiveren Reduktion der [ $^3$ H]NA-Aufnahme führen müsste (9, 170). Weshalb es letztendlich zu einer stärkeren Inhibition der [ $^3$ H]DA-Aufnahme unter GC-Einfluss kam, bleibt unklar und müsste in weiteren Messreihen reevaluiert werden.

Bezüglich der gewählten GC-Maximalkonzentration von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l stimmen die Messwerte mit den Ergebnissen von Bayer überein. Bayer beschrieb unter Einfluss von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l Corticosteron eine Reduktion der Katecholaminaufnahme von ca. 70% in die OCT3-Zellen (8). Die im Rahmen der Screeningversuche bestimmten Messwerte der [ $^3$ H]DA-Aufnahme in die OCT3-Zellen lagen bei  $1 \times 10^{-3}$  mol/l zwischen 66% und 82% (Hemmeffekt: Hydrocortison > Prednisolon > Dexamethason). Für die [ $^3$ H]NA-Aufnahme ergaben sich ähnliche Werte von 59% bis 78% (Hemmeffekt: Prednisolon > Hydrocortison > Dexamethason). Im Vergleich hierzu wurden in der Literatur schon stärkere Effekte (ca. 90% Hemmung) bei einer Konzentration von  $3 \times 10^{-6}$  mol/l Corticosteron beschrieben (9). Diese Ergebnisse stammten allerdings aus Messungen mit [ $^3$ H]MPP+ als Substrat, welches intensiver über den OCT3 inkorporiert wird als die hier verwendeten Katecholamine. Schlussfolgernd wird die Aufnahme von [ $^3$ H]MPP+ unter Einfluss von Corticosteron wirksamer gehemmt.

Für die Betrachtung der Screeningversuche ist die Substratspezifität des NAT, welcher von den Neuroblastomzellen exprimiert wird, ebenfalls von Bedeutung. In der Literatur wird eine größere Affinität des NAT gegenüber DA im Vergleich zu NA beschrieben (106, 170). Insgesamt beeinflussten die GC das Aufnahmeverhalten in die Neuroblastomzelllinien nur geringfügig. Dennoch zeigte sich eine etwas stärkere hemmende Wirkung auf die [ $^3$ H]DA-Aufnahme verglichen mit der [ $^3$ H]NA-Aufnahme. Dies lässt sich mit der beschriebenen,

stärkeren Affinität des NAT gegenüber DA vereinbaren. Wenn davon ausgegangen wird, dass DA vermehrt über den Transporter ins Zellinnere gelangt, kommt es im Umkehrschluss zu einer deutlicheren Reduktion der Inkorporation unter Einfluss der GC. Somit zeigt sich indirekt eine höhere Substratspezifität des NAT gegenüber DA.

Weiterhin fällt auf, dass die verschiedenen Neuroblastomzelllinien unterschiedlich stark durch die GC beeinflusst wurden. Die Dopaminaufnahme in die SK-N-SH-Zellen wurde, gefolgt von der Aufnahme in die Kelly-Zellen, durchschnittlich am deutlichsten gehemmt. Die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahmeversuche zeigten hingegen weniger Unterschiede zwischen den einzelnen Neuroblastomzelllinien nach GC-Applikation. Die stärkere Inhibition der Katecholaminaufnahme in die SK-N-SH-Zellen kann nachvollzogen werden, wenn die NAT-Expression der einzelnen Zelllinien betrachtet wird. So weist die SK-N-SH-Zelllinie von den verwendeten Neuroblastomzelllinien die höchste Expression des NAT auf. Dies wird aus der Gesamtaufnahme der Katecholamine in Prozent ohne Einfluss eines Inhibitors (Kontrollwert beziehend auf den 100%-Wert) ersichtlich (3.3.2). In der Reihenfolge schließt sich die Kelly-Zelllinie mit einer wesentlich geringeren NAT-Expression an (3.3.3). Die IMR-32-Zelllinie exprimiert die geringste Anzahl an Transportern (3.3.4).

Abschließend lässt sich festhalten, dass der GC-Einfluss auf die Katecholaminaufnahme bei allen verwendeten Neuroblastomzelllinien deutlich geringer im Vergleich zu der extraneuronalen OCT3-Zelllinie ausfiel.

### **4.3 Auswertung der Hauptversuche**

Für die statistische Auswertung wurde unter Berücksichtigung der Vorversuche eine Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l für die GC Hydrocortison und Prednisolon gewählt. Diese Konzentration zeigte eine deutliche Suppression der [<sup>3</sup>H]DA- sowie der [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in die extraneuronalen OCT3-Zellen. Gewünscht war hierbei, dass gleichzeitig die Wirkung auf die

Katecholaminaufnahme in die Neuroblastomzelllinien möglichst gering gehalten wird. Unterstützt wurde die Wahl dieser GC-Konzentration durch die Corticosteron-Hemmversuche von Bayer. Sie nutzte ebenfalls eine Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l des GC und erzielte dabei aussagekräftige Messwerte (Bayer, 2010).

Weiterhin wurden für die Hauptversuche Hydrocortison und Prednisolon ausgewählt. Im Vergleich zu Dexamethason zeigte sich hier ein stärkerer Hemmeffekt auf die OCT3-Zellen. Der Einfluss auf die Neuroblastomzellen fiel bei allen getesteten GC ungefähr gleich aus. In der Literatur gibt es bisher wenige Studien, welche die Wirkung der hier verwendeten, klinisch relevanten GC auf den OCT beschreiben. Hill et al. haben Messungen in den zerebellären Körnerzellen von Ratten durchgeführt. Hierzu haben sie die Wirkung von Corticosteron, Hydrocortison, Prednisolon und Dexamethason auf die Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{MPP}$  in die Zellen getestet.  $[^3\text{H}]\text{MPP}$  wird ebenfalls über den OCT inkorporiert. Somit können die hier gewonnenen Ergebnisse gut mit den Messungen von Hill et al. verglichen werden. Der deutlichste Hemmeffekt auf die  $[^3\text{H}]\text{MPP}$ -Aufnahme wurde unter Zugabe von Corticosteron registriert. Hydrocortison und Prednisolon zeigten jedoch ebenfalls sehr gute Effekte. Dexamethason hatte die geringste inhibitorische Wirkung auf den Rezeptor (217). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Screeningversuche überein.

Des Weiteren wurden in den Hauptversuchen nur zwei Neuroblastomzelllinien verwendet. Die IMR-32-Zelllinie wurde hierbei aufgrund der geringen NAT-Expression außer Acht gelassen.

Insgesamt bestätigten die Hauptversuche die Ergebnisse der Screeningversuche. So kam es unter Einfluss der GC ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) zu einer signifikanten Reduktion der Katecholaminaufnahme in die OCT3-exprimierenden HEK293-Zellen, während die Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und Kelly weitgehend unbeeinflusst blieben.

Entsprechend den Auswertungen der Screeningsversuche (3.3.1), zeigte sich, ohne Einfluss eines Inhibitors, eine um ca. 30% stärkere Gesamtaufnahme von  $[^3\text{H}]\text{NA}$  in die OCT3-Zellen (3.4.1). Auch der Hemmeffekt unter Zugabe von Hydrocortison und Prednisolon fiel in den  $[^3\text{H}]\text{NA}$ -Aufnahmeversuchen stärker

aus. Dieses Ergebnis entspricht den OCT3-Messungen von Bayer unter Zugabe von Corticosteron ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) (8). Eine mögliche Erklärung für den stärkeren Einfluss der GC auf die [ $^3$ H]NA-Aufnahme wäre, dass bei einer vermehrten Affinität des OCT3 gegenüber NA auch der Hemmeffekt unter Inhibition größer sein könnte (9, 170). Im Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse der Screeningversuche, in denen eine durchschnittlich stärkere Inhibition der [ $^3$ H]DA-Inkorporation unter GC-Zugabe registriert wurde. Dennoch sollten die Hauptversuche vorrangig in der Bewertung berücksichtigt werden, da sie mit schon bestehenden Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmen (8). Des Weiteren stammen die Werte aus den Screeningversuchen nur aus Doppelmessungen ( $n=2$ ), während in den Hauptversuchen  $3 \times 3$  Messungen ( $n=9$ ) an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Dies ermöglichte aufgrund der höheren Anzahl an Messdaten eine zusätzliche statistische Auswertung der Ergebnisse.

Die SK-N-SH-Zellen zeigten im Vergleich zur [ $^3$ H]NA-Inkorporation eine höhere [ $^3$ H]DA-Gesamtaufnahme von  $>1\%$ . Dies entspricht den Ergebnissen der Screeningsversuche (3.3.2) und stimmt mit den Angaben aus der Literatur bezüglich der höheren Affinität des NAT gegenüber DA überein (106). Weiterhin kann eine mögliche DAT-Expression diskutiert werden, welche zusätzlich zu einer Steigerung der [ $^3$ H]DA-Aufnahme führen könnte (unveröffentlichte Ergebnisse von Ballweg et al.).

Im Gegensatz zu den SK-N-SH-Zellen ergaben sich bei der NAT-exprimierenden Kelly-Zelllinie kaum Unterschiede bezüglich der Affinität gegenüber [ $^3$ H]DA bzw. [ $^3$ H]NA. Hier zeigte sich eine annähernd gleich starke Aufnahme von [ $^3$ H]DA und [ $^3$ H]NA. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Kelly-Zelllinie verglichen mit der SK-N-SH-Zelllinie deutlich weniger Transporter besitzt. Eine mögliche Erklärung wäre somit, dass eine stärkere Aufnahme der Katecholamine durch die vermehrte Expression des NAT, wie sie bei den SK-N-SH-Zellen vorliegt, auch deutlicher die Unterschiede in der Affinität des Transporters hervorhebt. Ferner wurde in der Literatur bisher noch keine DAT-Expression auf den Kelly-Zellen beschrieben, so dass eine mögliche zusätzliche [ $^3$ H]DA-Aufnahme diesbezüglich ebenfalls wegfällt.

Weiterhin war die Gesamtaufnahme der Katecholamine in die SK-N-SH-Zelllinie um ein Vielfaches höher als in die neuronale Kelly-Zelllinie und die extraneuronale OCT3-exprimierende HEK293-Zelllinie. Dies bestätigt ebenfalls die Messwerte der Screeningversuche und entspricht den Ergebnissen von Bayer. Auch hier wurde eine, um den Faktor 15 höhere [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in die SK-N-SH-Zellen im Vergleich zu den OCT3-Zellen festgestellt (8).

Die Messungen der Hauptversuche entsprachen Kurzzeitmessungen (Inkubation der Katecholamine für 15min). Bayer führte schließlich zusätzliche Messungen mit [<sup>123</sup>I]mIBG durch. Die Versuchsbedingungen entsprachen den hier beschriebenen Bedingungen für die Hauptversuche. Somit konnten die Messdaten schließlich gut mit den Ergebnissen aus den [<sup>3</sup>H]DA- und [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahmeversuchen dieser Arbeit verglichen werden. Die mIBG-Messungen zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion der Traceraufnahme in die OCT3-Zellen unter GC-Einfluss (218). Hierbei zeigte sich ein etwas stärkerer Hemmeffekt durch die Zugabe von Prednisolon. Weshalb Prednisolon bei den Messungen von Bayer eine vermehrte inhibitorische Wirkung im Vergleich zu Hydrocortison aufwies, ist unklar. Im Gegensatz hierzu konnte in den Hauptversuchen dieser Arbeit kein Unterschied zwischen den beiden gewählten GC nachgewiesen werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von mIBG und [<sup>3</sup>H]NA sowie der identischen Substrataufnahme über den NAT, dürfte von einem vergleichbaren Aufnahmeverhalten ausgegangen werden. Interessant wäre somit durch weitere Messreihen zu evaluieren, ob Prednisolon tatsächlich einen dauerhaft stärkeren Einfluss auf die mIBG-Aufnahme hat.

Zusammenfassend wird aus den Messergebnissen der Hauptversuche, in Zusammenschau mit den Screeningversuchen, deutlich, dass sowohl Hydrocortison als auch Prednisolon gute Inhibitoren des OCT3 sind, ohne dass ein deutlicher Einfluss auf den NAT nachgewiesen werden kann. Somit scheinen sie für weitere in vivo Studien geeignet.

#### **4.4 Bedeutung der Versuchsergebnisse in Bezug auf die Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms**

In der Literatur wird für die [<sup>123</sup>I]mIBG-Szintigraphie zur Darstellung von Primärtumoren und sekundären Neuroblastomherden eine Spezifität von fast 100% angegeben, wobei auch Werte von nur 94% beschrieben wurden. Die Sensitivität liegt bei ca. 90 %, aber auch hier unterscheiden sich die Angaben je nach Studie, sodass ebenfalls niedrigere Werte vorliegen und zwischen der Detektion eines Primärtumors sowie der Erfassung von Lymphknoten und Lebermetastasen unterschieden wird (5, 54-56). Bei der PET-CT zeigten sich sogar noch bessere Ergebnisse im Vergleich zur Szintigraphie (219-221). Allerdings liegen hierzu noch sehr wenige Studien in der Literatur vor.

Die Spezifität ist als die Wahrscheinlichkeit definiert, dass gesunde Probanden auch in der Diagnostik als gesund erkannt werden, während die Sensitivität angibt, wie gut erkrankte Personen als tatsächlich krank herausgefiltert werden. Wichtig für die Detektion von Neuroblastomzellen ist, dass bei der Befundung die zusätzlichen Signale, welche durch die Inkorporation des Tracers in gesunde Körperzellen entstehen, miteinbezogen werden. Nur so kann ein solch hoher Wert für die Spezifität und Sensitivität erzielt werden. Demzufolge ist eine radioaktive Aufnahme in Zellen nicht zwangsläufig pathologisch. Hierzu sind das Aufnahmemuster und die Lokalisation der Signale von Bedeutung. Bezüglich der etwas niedrigeren Sensitivität wird in der Literatur vermutet, dass durch die beschriebenen Signalüberlagerungen nicht alle erkrankten Zellen identifiziert werden können (222). Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es auch Neuroblastome gibt, welche keinen NAT besitzen und somit auch keine Tracer aufnehmen (40). In der Konsequenz können diese Tumore auch nicht mittels [<sup>123</sup>I]mIBG detektiert werden. Dennoch würde eine Inhibition der OCT-Transporter mittels GC die Tracerinkorporation bei einem Großteil der Neuroblastome verbessern. Würde sich dies auch in Zukunft in weiteren klinischen Versuchen bestätigen, könnte durch die Zugabe von GC eine erhöhte Spezifität und Sensitivität erreicht werden.

Weiterhin wäre ein zusätzlicher Einsatz von 2-[<sup>18</sup>F]FDG denkbar um die Sensitivität und Spezifität der Diagnostik zu verbessern, da mit dieser Substanz auch Neuroblastome detektiert werden können, welche den NAT nicht exprimieren. Da malignes Tumorgewebe meist metabolisch aktiver als gesundes Körpergewebe ist, führt der verstärkte Glucosestoffwechsel im Umkehrschluss zu einer höheren Aufnahme von 2-[<sup>18</sup>F]FDG in das Neuroblastom. Somit wäre ein größerer Anteil der heterogenen Tumore diagnostisch abgedeckt (71, 219, 223).

Eine interessante Überlegung in diesem Zusammenhang wäre die Kombination von 2-[<sup>18</sup>F]FDG und 6-[<sup>18</sup>F]FDA. In beiden Fällen wird [<sup>18</sup>F] zur radioaktiven Markierung eingesetzt. Das Isotop besitzt eine geringe HWZ, so dass die Substanzen in engen Zeitintervallen mittels PET-CT kombiniert werden könnten. Die Schwierigkeit bei einem Einsatz von [<sup>123</sup>I]mIBG und 2-[<sup>18</sup>F]FDG wäre hingegen, dass unterschiedliche Geräte zur Bildgebung erforderlich wären (8). Dies würde die praktische Handhabung deutlich komplizierter gestalten.

Nachdem die Bedeutung einer Zugabe von GC im Rahmen der szintigraphischen Neuroblastomdiagnostik besprochen wurde, wird nun eine mögliche Reduktion der Nebenwirkungen von mIBG unter GC-Einfluss diskutiert.

Da mIBG physiologisch u.a. in die Lunge, das Myokard, die Leber, den Gastrointestinaltrakt, die Blase und die Speicheldrüsen aufgenommen wird, kann es im Rahmen der Diagnostik bzw. Therapie zu Nebenwirkungen kommen (4-6).

mIBG hat neben der toxischen Radioaktivität auch eine zellschädigende Wirkung, welche somit zur Zerstörung der Tumorzellen beiträgt (224). Daraus lässt sich ableiten, dass die Substanz bei der Aufnahme in gesunde Körperzellen ebenfalls eine Schädigung hervorrufen könnte.

Durch eine Hemmung der mIBG-Aufnahme über den OCT3 bzw. in geringerem Ausmaß über den OCT1+2 könnten diese Nebenwirkungen wahrscheinlich reduziert werden (8, 10, 11, 119).

Als typische Nebenwirkung von mIBG wird in der Literatur u.a. ein frühes Auftreten von Übelkeit und Erbrechen erwähnt (225). Eine noch zu

erforschende Hypothese wäre hierbei eine direkte Korrelation der genannten Nebenwirkung mit der Inkorporation der Substanz in den Gastrointestinaltrakt. Weiterhin werden Sialadenitis, orale Mukositis und Mundtrockenheit beschrieben (226-228), was auf die mIBG-Aufnahme in den Speicheldrüsen zurückgeführt werden könnte. Auch eine Steigerung des Blutdrucks in den ersten 48 h nach Applikation des Pharmakons wurde beobachtet (229, 230). Theoretisch können Nebenwirkungen in allen OCT-exprimierenden Körperzellen entstehen (4, 5). Hierbei muss v.a. zwischen der Verabreichung von [<sup>123</sup>I]mIBG im Rahmen der Diagnostik und der Therapie mit [<sup>131</sup>I]mIBG unterschieden werden. Der Unterschied besteht in den verschiedenen HWZ der beiden Substanzen. [<sup>131</sup>I]mIBG hat mit 8,2 Tagen eine erheblich längere HWZ im Vergleich zu der nur 13 h andauernden HWZ von [<sup>123</sup>I]mIBG (60). Somit kommt es zu unterschiedlichen Interaktionszeiträumen mit den gesunden Körperzellen. Schlussfolgernd kann es bei der [<sup>131</sup>I]mIBG-Therapie zu vermehrten Nebenwirkungen kommen. Diesbezüglich wurde eine Verschiebung des Blutbilds mit einer Abnahme der Leukozyten und der Thrombozyten nach jeder [<sup>131</sup>I]mIBG-Dosis beobachtet (59, 227, 231). Es wurde eine Inkorporation des Tracers über den SERT in Megakaryozyten als Vorläuferzellen der Thrombozyten nachgewiesen (232). Somit wäre es interessant herauszufinden, ob die Zellen der Thrombopoese möglicherweise auch den OCT exprimieren. Ferner wurde in einer Studie von Garaventa et al. das Auftreten einer interstitiellen Pneumonie sowie einer akuten myeloischen Leukämie nach der Behandlung mit [<sup>131</sup>I]mIBG beobachtet (231). Eine Schädigung der Schilddrüse wurde ebenfalls nachgewiesen (231, 233). Des Weiteren beschrieben Garaventa et al. ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung sekundärer Malignome nach einer [<sup>131</sup>I]mIBG-Therapie. In einer Studie traten im Zeitraum von 1984 bis 2001 bei 5 der 119 mit [<sup>131</sup>I]mIBG behandelten Probanden sekundäre Malignome auf. Hierunter befanden sich ein malignes Schwannom, ein Rhabdomyosarkom, ein angiomatoides fibröses Histiozytom und zwei Fälle einer myeloischen Leukämie (234). Obwohl bisher keine Schädigung gesunder Zellen durch den radioaktiven Tracer nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass eine Korrelation zwischen

der Therapie und dem Auftreten der Zweittumore besteht. Somit könnte der inhibitorische Effekt der GC auf die radioaktive Aufnahme von [<sup>131</sup>I]mIBG das Risiko für sekundäre Malignome vermindern. Allerdings fehlen zur Unterstützung dieser Annahmen noch weitreichende Untersuchungen. Hierzu wären u.a. Langzeitbeobachtungsstudien am Menschen notwendig. Des Weiteren ist, wie Bayer beschrieb, bisher nicht bekannt, ob diese Nebenwirkungen auch durch eine Aufnahme von mIBG über den OCT verursacht werden (8).

Neben einer möglichen Reduktion von mIBG-induzierten Nebenwirkungen durch den Einsatz von GC, könnten auch Nebenwirkungen, welche durch andere OCT-spezifische Substrate entstehen, vermindert werden. In der Literatur wird eine Aufnahme von Cisplatin über den OCT2 beschrieben. Cisplatin wird in der Chemotherapie des Neuroblastoms eingesetzt und hat eine nephrotoxische Wirkung (235). In Studien wurde eine Hemmung des OCT2 durch Corticosteron und Cimetidin nachgewiesen, was im Rückschluss die tubulotoxische Wirkung des Cisplatins reduzieren könnte (236, 237). Obwohl in dieser Arbeit keine Zelllinie verwendet wurde die den OCT2 exprimiert, können die oben beschriebenen Studienergebnisse höchstwahrscheinlich auch auf die Applikation der hier getesteten, klinisch relevanten GC übertragen werden. Neben einer deutlichen Inhibition des OCT3 durch Corticosteron wurde auch eine Hemmung des OCT1 und des OCT2 mehrfach beschrieben (7, 9-11, 119). Die im Rahmen der Versuche verwendeten GC zeigten genau wie Corticosteron einen starken Hemmeffekt auf den OCT3. Somit kann von einem Corticosteron-äquivalenten inhibitorischen Verhalten der getesteten GC auf den OCT1 und den OCT2 ausgegangen werden. Bezogen auf die oben beschriebene Nebenwirkung von Cisplatin würde dies bedeuten, dass auch die klinisch verwendeten GC einer Nephrotoxizität entgegenwirken könnten. Diese Hypothese müsste im Rahmen weiterer Versuche verifiziert werden.

Letztendlich ist bezüglich der Betrachtung der Ergebnisse wichtig, dass in vitro Versuche in vivo Versuchen nicht gleichgesetzt werden dürfen. Neben einem Verdünnungseffekt im Organismus, gibt es viele weitere zu berücksichtigende Parameter (4.1). Bayer führte aufbauend auf den Ergebnissen der vorliegenden

Arbeit weitere in vitro und in vivo Versuche durch. In vivo wurden [<sup>123</sup>I]mIBG-Aufnahmeversuche mit bzw. ohne Inhibitor an Mäusen durchgeführt. Die gewählte Konzentration lag ebenfalls bei  $1 \times 10^{-4}$  mol/l für Hydrocortison bzw. Prednisolon. Die Radioaktivität einzelner Organe wurde schließlich nach 24 h in einem  $\gamma$ -Counter gemessen (218). Die Messungen ergaben v.a. eine reduzierte Tracer-Aufnahme in den Dünndarm und die Niere. Im Gegensatz hierzu stehen Ergebnisse, welche ebenfalls aus in vivo Versuchen mit Mäusen stammen und mittels Kleintier-SPECT gewonnen wurden (216). Die Konzentration und die eingesetzten Substanzen entsprachen den oben beschriebenen Bedingungen. Allerdings wurden die Messungen 3 h nach Applikation der GC durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine relevante Reduktion der [<sup>123</sup>I]mIBG-Aufnahme in das OCT3-tragende Gewebe der Mäuse. Ob dies letztendlich an einem zu kurzen zeitlichen Abstand zwischen Injektion und Bildgebung oder an Unterschieden im humanen-/Maus-OCT3 lag, ist unklar. Obwohl der humane- und der Maus-OCT3 Ähnlichkeiten im Transport aufweisen, gibt es spezifische Eigenschaften und Unterschiede im strukturellen Aufbau (238-240). Somit müssten für eine bessere Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen Mäuse gezüchtet werden, welche als genetische Variation nur den humanen OCT3 exprimieren (218). Letztendlich lassen sich Ergebnisse von Zellkulturversuchen nicht direkt auf Tierversuche übertragen. Infolgedessen können auch Tierversuche nicht auf klinische Versuche am Menschen übertragen werden. Zusammenfassend sprechen die Resultate dieser Arbeit jedoch für einen möglichen Einsatz von Hydrocortison oder Prednisolon vor der Neuroblastomdiagnostik/-therapie. Zur Validierung der diskutierten Schlussfolgerungen sind somit weitere Untersuchung auf diesem Gebiet vielversprechend.

## 5 Zusammenfassung

In der Diagnostik und Therapie des Neuroblastoms wird radioaktiv markiertes mIBG eingesetzt. [<sup>123</sup>I]mIBG dient der szintigraphischen Darstellung des Tumors (60). [<sup>131</sup>I]mIBG wird in der Therapie des Neuroblastoms genutzt (61-63). Durch strukturelle Ähnlichkeit zu NA wird die Substanz ebenfalls aktiv über den NAT aufgenommen, welcher von den meisten Neuroblastomen exprimiert wird (15). Allerdings kommt es durch eine Inkorporation über den OCT zusätzlich zur Anreicherung von mIBG in nicht-tumoralen Körperzellen, wodurch die diagnostischen Bedingungen deutlich erschwert werden (5-7). Bayer et al. zeigte in Messungen mit radioaktiv markierten Katecholaminen, dass das GC Corticosteron die Aufnahme in den OCT hemmt, während Neuroblastomzellen kaum beeinflusst werden (7, 8). Schlussfolgernd wird weniger mIBG in nicht-maligne Zellen inkorporiert und es kann zu einer Verlagerung des radioaktiven Uptake in die Tumorzellen kommen. Da Corticosteron nicht im klinischen Alltag verwendet wird, war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob auch andere klinisch relevante GC diesen Einfluss auf den OCT haben, während die Neuroblastomzellen weitgehend unbeeinflusst bleiben.

Im Rahmen von Screening- und Hauptversuchen wurden eine OCT3-exprimierende Zelllinie sowie NAT-exprimierende Neuroblastomzelllinien mit verschiedenen GC sowie [<sup>3</sup>H]DA bzw. [<sup>3</sup>H]NA versetzt, um schließlich die radioaktive Aufnahme im  $\beta$ -Counter zu quantifizieren.

Es bestätigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der Katecholaminaufnahme in die OCT3-Zellen unter Einfluss der verwendeten GC. Hingegen konnten bei den Neuroblastomzelllinien unter gleichen Versuchsbedingungen keine signifikanten Veränderungen registriert werden.

Um einen Überblick über die wesentlichen Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit zu geben, werden diese im Folgenden zusammengefasst:

1. Eine GC-abhängige Hemmung der mIBG-Aufnahme in die extraneuronalen OCT3-exprimierenden Zellen, welche sich indirekt aus den Ergebnissen dieser Arbeit erschließen lässt, könnte die Sensitivität und Spezifität der Neuroblastom-Szintigraphie steigern (4.4).
2. Prednisolon und Hydrocortison zeigten die beste inhibitorische Wirkung auf die OCT3-Zellen.
3. Nebenwirkungen, welche möglicherweise im Zusammenhang mit einer mIBG-Aufnahme in gesunde Körperzellen stehen (225-231), könnten durch eine spezifische Hemmung des OCT3 reduziert werden (4.4).
4. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass radioaktiv markiertes 6-[<sup>18</sup>F]FDA in Zukunft als mögliche Alternative zu mIBG in der Neuroblastomdiagnostik genutzt werden könnte (4.1.2).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für einen möglichen Einsatz der klinisch verwendeten GC Prednisolon und Hydrocortison vor der Neuroblastomdiagnostik/-therapie mit radioaktiv markiertem mIBG. Dennoch lassen sich in vitro Versuche nur bedingt auf in vivo Versuche übertragen (4.4). Zur Validierung der hier aufgestellten Schlussfolgerungen sind somit weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kimmig B, Brandeis WE, Eisenhut M, Bubeck B, Hermann HJ, zum Winkel K. Scintigraphy of a neuroblastoma with I-131 meta-iodobenzylguanidine. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine.* 1984;25(7):773-5.
2. Glowniak JV, Kilty JE, Amara SG, Hoffman BJ, Turner FE. Evaluation of metaiodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine and serotonin transporters. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 1993;34(7):1140-6.
3. Endres CJ, Swaminathan S, DeJesus OT, Sievert M, Ruoho AE, Murali D, et al. Affinities of dopamine analogs for monoamine granular and plasma membrane transporters: implications for PET dopamine studies. *Life sciences.* 1997;60(26):2399-406.
4. Bonnin F, Lumbroso J, Tenenbaum F, Hartmann O, Parmentier C. Refining interpretation of MIBG scans in children. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 1994;35(5):803-10.
5. Gelfand MJ. Meta-iodobenzylguanidine in children. *Seminars in nuclear medicine.* 1993;23(3):231-42.
6. Paltiel HJ, Gelfand MJ, Elgazzar AH, Washburn LC, Harris RE, Masters PR, et al. Neural crest tumors: I-123 MIBG imaging in children. *Radiology.* 1994;190(1):117-21.
7. Bayer M, Kuci Z, Schomig E, Grundemann D, Dittmann H, Handgretinger R, et al. 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. *Nuclear medicine and biology.* 2009;36(3):287-94.
8. Bayer M. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aufnahme von Katecholaminen und mIBG in neuronale und extraneuronale Monoamintransporter exprimierende Zellen. *Medizinische Dissertationsschrift unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt; Eberhard-Karls-Universität Tübingen.* 2010.
9. Grundemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schomig E. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nature neuroscience.* 1998;1(5):349-51.
10. Grundemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Ordning N, Schmidt A, Schomig E. Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(16):10408-13.
11. Hayer-Zillgen M, Bruss M, Bonisch H. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *British journal of pharmacology.* 2002;136(6):829-36.

12. Stiller CA, Parkin DM. International variations in the incidence of neuroblastoma. *International journal of cancer*. 1992;52(4):538-43.
13. Young JL, Jr., Miller RW. Incidence of malignant tumors in U. S. children. *The Journal of pediatrics*. 1975;86(2):254-8.
14. Castleberry RP. Neuroblastoma. *European journal of cancer*. 1997;33(9):1430-7; discussion 7-8.
15. Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Current opinion in oncology*. 1998;10(1):43-51.
16. Kushner BH, Gilbert F, Helson L. Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer*. 1986;57(9):1887-93.
17. Satge D, Sasco AJ, Carlsen NL, Stiller CA, Rubie H, Hero B, et al. A lack of neuroblastoma in Down syndrome: a study from 11 European countries. *Cancer research*. 1998;58(3):448-52.
18. Satge D, Moore SW, Stiller CA, Niggli FK, Pritchard-Jones K, Bown N, et al. Abnormal constitutional karyotypes in patients with neuroblastoma: a report of four new cases and review of 47 others in the literature. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2003;147(2):89-98.
19. Blatt J, Olshan AF, Lee PA, Ross JL. Neuroblastoma and related tumors in Turner's syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1997;131(5):666-70.
20. Verloes A, Elmer C, Lacombe D, Heinrichs C, Rebuffat E, Demarquez JL, et al. Ondine-Hirschsprung syndrome (Haddad syndrome). Further delineation in two cases and review of the literature. *European journal of pediatrics*. 1993;152(1):75-7.
21. Maris JM, Chatten J, Meadows AT, Biegel JA, Brodeur GM. Familial neuroblastoma: a three-generation pedigree and a further association with Hirschsprung disease. *Medical and pediatric oncology*. 1997;28(1):1-5.
22. Kaneko Y, Knudson AG. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2000;29(2):89-95.
23. Tonini GP, Boni L, Pession A, Rogers D, Iolascon A, Basso G, et al. MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(1):85-93.
24. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013;3(10):a014415.
25. Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer*. 1977;40(5):2256-63.
26. Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, et al. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer research*. 1984;44(11):5444-9.

27. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Fukuba I, Matsuura Y, et al. Biological characteristics of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1. *Medical and pediatric oncology*. 2001;36(1):67-74.
28. Lastowska M, Roberts P, Pearson AD, Lewis I, Wolstenholme J, Bown N. Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas. *Genes, chromosomes & cancer*. 1997;19(3):143-9.
29. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999;86(2):364-72.
30. Hero B, Simon T, Spitz R, Ernestus K, Gnekow AK, Scheel-Walter HG, et al. Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(9):1504-10.
31. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(8):1466-77.
32. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. *Children's cancer study group A. Cancer*. 1971;27(2):374-8.
33. Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, et al. Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(3):477-86.
34. van Noesel MM, Hahlen K, Hakvoort-Cammel FG, Egeler RM. Neuroblastoma 4S: a heterogeneous disease with variable risk factors and treatment strategies. *Cancer*. 1997;80(5):834-43.
35. Nguyen TQ, Fisher GB, Jr., Tabbarrah SO, Greer KE, Cooper PH. Stage IV-S metastatic neuroblastoma presenting as skin nodules at birth. *International Journal of Dermatology*. 1988;27(10):712-3.
36. DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, Brodeur GM, Seeger RC, Atkinson JB, et al. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 1999;21(3):181-9.
37. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(2):298-303.
38. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(2):289-97.

39. Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, Krug KB, Wootton-Gorges SL, Kanegawa K, et al. Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology*. 2011;261(1):243-57.
40. Candito M, Thyss A, Albertini M, Deville A, Politano S, Mariani R, et al. Methylated catecholamine metabolites for diagnosis of neuroblastoma. *Medical and pediatric oncology*. 1992;20(3):215-20.
41. Strenger V, Kerbl R, Dornbusch HJ, Ladenstein R, Ambros PF, Ambros IM, et al. Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatric blood & cancer*. 2007;48(5):504-9.
42. Hachitanda Y, Ishimoto K, Hata J, Shimada H. One hundred neuroblastomas detected through a mass screening system in Japan. *Cancer*. 1994;74(12):3223-6.
43. Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *The New England journal of medicine*. 2002;346(14):1047-53.
44. Hann HW, Evans AE, Siegel SE, Wong KY, Sather H, Dalton A, et al. Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer research*. 1985;45(6):2843-8.
45. Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, Schneider SL. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer*. 1986;57(6):1230-4.
46. Siegel MJ, Ishwaran H, Fletcher BD, Meyer JS, Hoffer FA, Jaramillo D, et al. Staging of neuroblastoma at imaging: report of the radiology diagnostic oncology group. *Radiology*. 2002;223(1):168-75.
47. Sofka CM, Semelka RC, Kelekis NL, Worawattanakul S, Chung CJ, Gold S, et al. Magnetic resonance imaging of neuroblastoma using current techniques. *Magnetic resonance imaging*. 1999;17(2):193-8.
48. Hugosson C, Nyman R, Jorulf H, McDonald P, Rifai A, Kofide A, et al. Imaging of abdominal neuroblastoma in children. *Acta radiologica*. 1999;40(5):534-42.
49. Kushner BH. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2004;45(7):1172-88.
50. Gupta A, Kumar A, Walters S, Chait P, Irwin MS, Gerstle JT. Analysis of needle versus open biopsy for the diagnosis of advanced stage pediatric neuroblastoma. *Pediatric blood & cancer*. 2006;47(7):875-9.
51. Mullassery D, Sharma V, Salim A, Jawaid WB, Pizer BL, Abernethy LJ, et al. Open versus needle biopsy in diagnosing neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery*. 2014;49(10):1505-7.

52. Boubaker A, Bischof Delaloye A. MIBG scintigraphy for the diagnosis and follow-up of children with neuroblastoma. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine.* 2008;52(4):388-402.
53. Treuner J, Feine U, Niethammer D, Muller-Schaumburg W, Meinke J, Eibach E, et al. Scintigraphic imaging of neuroblastoma with [<sup>131</sup>I]iodobenzylguanidine. *Lancet.* 1984;1(8372):333-4.
54. Suc A, Lumbroso J, Rubie H, Hattchouel JM, Boneu A, Rodary C, et al. Metastatic neuroblastoma in children older than one year: prognostic significance of the initial metaiodobenzylguanidine scan and proposal for a scoring system. *Cancer.* 1996;77(4):805-11.
55. Lumbroso J, Guermazi F, Hartmann O, Coornaert S, Rabarison Y, Lemerle J, et al. Sensitivity and specificity of meta-iodobenzylguanidine (mIBG) scintigraphy in the evaluation of neuroblastoma: analysis of 115 cases. *Bulletin du cancer.* 1988;75(1):97-106.
56. Troncone L, Rufini V, Montemaggi P, Danza FM, Lasorella A, Mastrangelo R. The diagnostic and therapeutic utility of radioiodinated metaiodobenzylguanidine (MIBG). 5 years of experience. *European journal of nuclear medicine.* 1990;16(4-6):325-35.
57. Coutris G, Talbot JN, Kabla G, Calmettes C, Milhaud G. Uptake of <sup>131</sup>I-MIBG by medullary carcinoma of thyroid in familial cases. *European journal of nuclear medicine.* 1986;12(2):77-9.
58. Sisson JC, Yanik GA. Theranostics: evolution of the radiopharmaceutical meta-iodobenzylguanidine in endocrine tumors. *Seminars in nuclear medicine.* 2012;42(3):171-84.
59. Sisson JC, Hutchinson RJ, Carey JE, Shapiro B, Johnson JW, Mallette SA, et al. Toxicity from treatment of neuroblastoma with <sup>131</sup>I-meta-iodobenzylguanidine. *European journal of nuclear medicine.* 1988;14(7-8):337-40.
60. Ilias I, Divgi C, Pacak K. Current role of metaiodobenzylguanidine in the diagnosis of pheochromocytoma and medullary thyroid cancer. *Seminars in nuclear medicine.* 2011;41(5):364-8.
61. Shapiro B, Gross MD. Radiochemistry, biochemistry, and kinetics of <sup>131</sup>I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) and <sup>123</sup>I-MIBG: clinical implications of the use of <sup>123</sup>I-MIBG. *Medical and pediatric oncology.* 1987;15(4):170-7.
62. Treuner J, Klingebiel T, Feine U, Buck J, Bruchelt G, Dopfer R, et al. Clinical experiences in the treatment of neuroblastoma with <sup>131</sup>I-metaiodobenzylguanidine. *Pediatric hematology and oncology.* 1986;3(3):205-16.
63. Mastrangelo S, Tornesello A, Diociaiuti L, Riccardi R, Rufini V, Troncone L. Treatment with meta-[<sup>131</sup>I]iodobenzylguanidine and cisplatin in stage IV neuroblastoma. *The quarterly journal of nuclear medicine: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine.* 1995;39(4 Suppl 1):69-71.

64. Feine U, Muller-Schauenburg W, Treuner J, Klingebiel T. Metaiodobenzylguanidine (MIBG) labeled with  $^{123}\text{I}/^{131}\text{I}$  in neuroblastoma diagnosis and follow-up treatment with a review of the diagnostic results of the International Workshop of Pediatric Oncology held in Rome, September 1986. *Medical and pediatric oncology*. 1987;15(4):181-7.
65. Matthay KK, Brisse H, Couanet D, Couturier J, Benard J, Mosseri V, et al. Central nervous system metastases in neuroblastoma: radiologic, clinical, and biologic features in 23 patients. *Cancer*. 2003;98(1):155-65.
66. Rufini V, Giordano A, Di Giuda D, Petrone A, Deb G, De Sio L, et al. [ $^{123}\text{I}$ ]MIBG scintigraphy in neuroblastoma: a comparison between planar and SPECT imaging. *The quarterly journal of nuclear medicine: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine*. 1995;39(4 Suppl 1):25-8.
67. Mangner TJ, Tobes MC, Wieland DW, Sisson JC, Shapiro B. Metabolism of iodine-131 metaiodobenzylguanidine in patients with metastatic pheochromocytoma. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1986;27(1):37-44.
68. Shulkin BL, Hutchinson RJ, Castle VP, Yanik GA, Shapiro B, Sisson JC. Neuroblastoma: positron emission tomography with 2-[fluorine-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose compared with metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Radiology*. 1996;199(3):743-50.
69. Shulkin BL, Mitchell DS, Ungar DR, Prakash D, Dole MG, Castle VP, et al. Neoplasms in a pediatric population: 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose PET studies. *Radiology*. 1995;194(2):495-500.
70. Shulkin BL, Wieland DM, Baro ME, Ungar DR, Mitchell DS, Dole MG, et al. PET hydroxyephedrine imaging of neuroblastoma. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1996;37(1):16-21.
71. Kushner BH, Yeung HW, Larson SM, Kramer K, Cheung NK. 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. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(14):3397-405.
72. Ilias I, Yu J, Carrasquillo JA, Chen CC, Eisenhofer G, Whatley M, et al. Superiority of 6-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodopamine positron emission tomography versus [ $^{131}\text{I}$ ]-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in the localization of metastatic pheochromocytoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(9):4083-7.
73. Ilias I, Chen CC, Carrasquillo JA, Whatley M, Ling A, Lazurova I, et al. Comparison of 6- $^{18}\text{F}$ -fluorodopamine PET with  $^{123}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine and  $^{111}\text{In}$ -pentetate scintigraphy in localization of nonmetastatic and metastatic pheochromocytoma. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2008;49(10):1613-9.

74. Seitz G. Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung von Neuroblastomzelllinien und klinischen Tumorproben - Catecholaminstoffwechsel, oxidativer Streß und Zelltod. Biologische Dissertationschrift unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt; Eberhard-Karls-Universität Tübingen. 2000.
75. Seitz G, Bruchelt G, Kuci Z, Roginsky VA, Wolburg H, Stegmann HB, et al. 6-fluorodopamine selectively destroys neuroblastoma cells expressing the noradrenaline transporter. *Medical and pediatric oncology*. 2000;35(6):612-5.
76. Sauer JM. Aufnahme und Metabolismus von 6-Fluoro-DOPA und 6-Fluoro-Dopamin in Neuroblastomzellen und OCT-exprimierenden Zellen. Medizinische Dissertationsschrift unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt; Eberhard-Karls-Universität Tübingen. 2010.
77. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007;369(9579):2106-20.
78. Claviez A, Hero B, Schneppenheim R, Berthold F. Hepatopathy in patients with stage 4S neuroblastoma. *Klinische Padiatrie*. 1996;208(4):221-8.
79. Roberts S, Creamer K, Shoupe B, Flores Y, Robie D. Unique management of stage 4S neuroblastoma complicated by massive hepatomegaly: case report and review of the literature. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2002;24(2):142-4.
80. Musarella MA, Chan HS, DeBoer G, Gallie BL. Ocular involvement in neuroblastoma: prognostic implications. *Ophthalmology*. 1984;91(8):936-40.
81. Mahoney NR, Liu GT, Menacker SJ, Wilson MC, Hogarty MD, Maris JM. Pediatric horner syndrome: etiologies and roles of imaging and urine studies to detect neuroblastoma and other responsible mass lesions. *American journal of ophthalmology*. 2006;142(4):651-9.
82. Matthay KK, Blaes F, Hero B, Plantaz D, De Alarcon P, Mitchell WG, et al. Opsoclonus myoclonus syndrome in neuroblastoma a report from a workshop on the dancing eyes syndrome at the advances in neuroblastoma meeting in Genoa, Italy, 2004. *Cancer letters*. 2005;228(1-2):275-82.
83. Cooper R, Khakoo Y, Matthay KK, Lukens JN, Seeger RC, Stram DO, et al. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: histopathologic features-a report from the Children's Cancer Group. *Medical and pediatric oncology*. 2001;36(6):623-9.
84. Kaplan SJ, Holbrook CT, McDaniel HG, Buntain WL, Crist WM. Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood. *American journal of diseases of children*. 1980;134(1):21-4.
85. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Jr., Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1984;73(2):405-16.

86. Evans AE, Albo V, D'Angio GJ, Finklestein JZ, Leiken S, Santulli T, et al. Factors influencing survival of children with nonmetastatic neuroblastoma. *Cancer*. 1976;38(2):661-6.
87. Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA, et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *European journal of cancer*. 2000;36(7):901-8.
88. Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Hermann J, et al. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2005;6(9):649-58.
89. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Children's Cancer Group. The New England journal of medicine*. 1999;341(16):1165-73.
90. George RE, Li S, Medeiros-Nancarrow C, Neuberg D, Marcus K, Shamberger RC, et al. High-risk neuroblastoma treated with tandem autologous peripheral-blood stem cell-supported transplantation: long-term survival update. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(18):2891-6.
91. Matthay KK, Sather HN, Seeger RC, Haase GM, Hammond GD. Excellent outcome of stage II neuroblastoma is independent of residual disease and radiation therapy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989;7(2):236-44.
92. Evans AE, Silber JH, Shpilsky A, D'Angio GJ. Successful management of low-stage neuroblastoma without adjuvant therapies: a comparison of two decades, 1972 through 1981 and 1982 through 1992, in a single institution. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(9):2504-10.
93. Yamamoto K, Hanada R, Kikuchi A, Ichikawa M, Aihara T, Oguma E, et al. Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(4):1265-9.
94. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviewa Cancer*. 2003;3(3):203-16.
95. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatric clinics of North America*. 2008;55(1):97-120.
96. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;224(4653):1121-4.

97. Glick RD, Medary I, Aronson DC, Scotto KW, Swendeman SL, La Quaglia MP. The effects of serum depletion and dexamethasone on growth and differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Journal of pediatric surgery*. 2000;35(3):465-72.
98. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983;71(4):741-7.
99. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer research*. 1989;49(1):219-25.
100. Biedler JL, Spengler BA, Chang TD, Ross RA. Transdifferentiation of human neuroblastoma cells results in coordinate loss of neuronal and malignant properties. *Progress in clinical and biological research*. 1988;271:265-76.
101. Sreedharan S, Stephansson O, Schiøth HB, Fredriksson R. Long evolutionary conservation and considerable tissue specificity of several atypical solute carrier transporters. *Gene*. 2011;478(1-2):11-8.
102. Broer S. The SLC6 orphans are forming a family of amino acid transporters. *Neurochemistry international*. 2006;48(6-7):559-67.
103. Rahman Z, Ring RH, Young K, Platt B, Lin Q, Schechter LE, et al. Inhibition of uptake 2 (or extraneuronal monoamine transporter) by normetanephrine potentiates the neurochemical effects of venlafaxine. *Brain research*. 2008;1203:68-78.
104. Kippenberger AG, Palmer DJ, Comer AM, Lipski J, Burton LD, Christie DL. Localization of the noradrenaline transporter in rat adrenal medulla and PC12 cells: evidence for its association with secretory granules in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 1999;73(3):1024-32.
105. Moron JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT. Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(2):389-95.
106. Ramamoorthy S, Prasad PD, Kulanthaivel P, Leibach FH, Blakely RD, Ganapathy V. Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast. *Biochemistry*. 1993;32(5):1346-53.
107. Gelernter J, Kruger S, Pakstis AJ, Pacholczyk T, Sparkes RS, Kidd KK, et al. Assignment of the norepinephrine transporter protein (NET1) locus to chromosome 16. *Genomics*. 1993;18(3):690-2.
108. Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG. Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature*. 1991;350(6316):350-4.
109. Gu H, Wall SC, Rudnick G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(10):7124-30.

110. Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(1):13-25.
111. Zhu MY, Shamburger S, Li J, Ordway GA. Regulation of the human norepinephrine transporter by cocaine and amphetamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000;295(3):951-9.
112. Zhou J. Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. *Drugs future*. 2004;29(12):1235-1244.
113. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2004;308(1):2-9.
114. Koehler MR, Wissinger B, Gorboulev V, Koepsell H, Schmid M. The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenetics and cell genetics*. 1997;79(3-4):198-200.
115. Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R. 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*. 1999;55(2):209-18.
116. Schomig E, Lazar A, Grundemann D. Extraneuronal monoamine transporter and organic cation transporters 1 and 2: a review of transport efficiency. *Handbook of experimental pharmacology*. 2006(175):151-80.
117. Grundemann D, Liebich G, Kiefer N, Koster S, Schomig E. Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Molecular pharmacology*. 1999;56(1):1-10.
118. Breidert T, Spitzenberger F, Grundemann D, Schomig E. Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *British journal of pharmacology*. 1998;125(1):218-24.
119. Grundemann D, Koster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, et al. Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(47):30915-20.
120. Kaiser H. KHK. *Cortisontherapie - Corticoide in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag. 2002; 11. Auflage:4.
121. Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1791(7):646-58.
122. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;379(1-2):62-73.
123. Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British journal of pharmacology*. 2006;147 Suppl 1:258-68.

124. Munck A, Guyre PM. Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress. *Advances in experimental medicine and biology*. 1986;196:81-96.
125. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*. 2000;21(1):55-89.
126. Alexander JK, DeVries AC, Kigerl KA, Dahlman JM, Popovich PG. Stress exacerbates neuropathic pain via glucocorticoid and NMDA receptor activation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2009;23(6):851-60.
127. Wang S, Lim G, Zeng Q, Sung B, Ai Y, Guo G, et al. Expression of central glucocorticoid receptors after peripheral nerve injury contributes to neuropathic pain behaviors in rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(39):8595-605.
128. Liu XY, Shi JH, Du WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011;2(5):977-84.
129. Deavers DR, Musacchia XJ. The function of glucocorticoids in thermogenesis. *Federation proceedings*. 1979;38(8):2177-81.
130. Haller J, Halasz J, Makara GB, Kruk MR. Acute effects of glucocorticoids: behavioral and pharmacological perspectives. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1998;23(2):337-44.
131. Udden J, Bjorntorp P, Arner P, Barkeling B, Meurling L, Rossner S. Effects of glucocorticoids on leptin levels and eating behaviour in women. *Journal of Internal Medicine*. 2003;253(2):225-31.
132. Haller J, Halasz J, Mikics E, Kruk MR. Chronic glucocorticoid deficiency-induced abnormal aggression, autonomic hypoarousal, and social deficit in rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 2004;16(6):550-7.
133. Finsterer J, Frank M. Glucocorticoids in neurology: mechanism of action, applications and side effects. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 2014;82(6):311-22.
134. Swartz SL, Dluhy RG. Corticosteroids: clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*. 1978;16(3):238-55.
135. Dunlap NE, Fulmer JD. Corticosteroid therapy in asthma. *Clinics in chest medicine*. 1984;5(4):669-83.
136. Bijlsma JW, Jacobs JW. Glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis: still used after 65 years. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1318(1):27-31.
137. Alangari AA. Corticosteroids in the treatment of acute asthma. *Annals of Thoracic Medicine*. 2014;9(4):187-92.

138. Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, Goldstein G. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cellular Immunology*. 1993;149(1):39-49.
139. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995;270(5234):286-90.
140. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*. 1998;94(6):557-72.
141. Buchman AL. Side effects of corticosteroid therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2001;33(4):289-94.
142. Gold PW, Drevets WC, Charney DS. New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biological psychiatry*. 2002;52(5):381-5.
143. Adler RA, Rosen CJ. Glucocorticoids and osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1994;23(3):641-54.
144. Kershner P, Wang-Cheng R. Psychiatric side effects of steroid therapy. *Psychosomatics*. 1989;30(2):135-9.
145. Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis - mechanisms and management. *European journal of endocrinology/ European Federation of Endocrine Societies*. 1997;137(3):209-17.
146. Olefsky JM, Kimmerling G. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1976;271(2):202-10.
147. Mazziotti G, Gazzaruso C, Giustina A. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011;22(12):499-506.
148. Goodwin JE, Geller DS. Glucocorticoid-induced hypertension. *Pediatric nephrology*. 2012;27(7):1059-66.
149. Yang S, Zhang L. Glucocorticoids and vascular reactivity. *Current Vascular Pharmacology*. 2004;2(1):1-12.
150. Boyer A, Chadda K, Salah A, Annane D. Glucocorticoid treatment in patients with septic shock: effects on vasopressor use and mortality. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2006;44(7):309-18.
151. Hur KY, Kim JH, Kim BJ, Kim MS, Lee EJ, Kim SW. Clinical Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Cushing's Disease in Korea. *Endocrinology and Metabolism (Seoul)*. 2015;30(1):7-18.
152. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006;367(9522):1605-17.

153. Burk CJ, Ciocca G, Heath CR, Duarte A, Dohil M, Connelly EA. Addison's disease, diffuse skin, and mucosal hyperpigmentation with subtle "flu-like" symptoms-a report of two cases. *Pediatric Dermatology*. 2008;25(2):215-8.
154. Soule S. Addison's disease in Africa - a teaching hospital experience. *Clinical endocrinology*. 1999;50(1):115-20.
155. Claes SJ. Corticotropin-releasing hormone (CRH) in psychiatry: from stress to psychopathology. *Annals of Medicine*. 2004;36(1):50-61.
156. de Kloet ER. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*. 2003;37(2):51-68.
157. Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *Journal of Neuroendocrinology*. 2008;20(6):880-4.
158. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Rebuffat P, Tortorella C, Nussdorfer GG. Arginine-vasopressin stimulates CRH and ACTH release by rat adrenal medulla, acting via the V1 receptor subtype and a protein kinase C-dependent pathway. *Peptides*. 1997;18(2):191-5.
159. Stevens A, White A. ACTH: cellular peptide hormone synthesis and secretory pathways. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2010;50:63-84.
160. Dempsher DP, Gann DS, Phair RD. A mechanistic model of ACTH-stimulated cortisol secretion. *American Journal of Physiology*. 1984;246(4 Pt 2):R587-96.
161. Golden SH, Wand GS, Malhotra S, Kamel I, Horton K. Reliability of hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment methods for use in population-based studies. *European Journal of Epidemiology*. 2011;26(7):511-25.
162. Behrend EN, Kemppainen RJ. Glucocorticoid therapy. Pharmacology, indications, and complications. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 1997;27(2):187-213.
163. Harvey BJ, Alzamora R, Healy V, Renard C, Doolan CM. Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. A homage to Hans Ussing. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1566(1-2):116-28.
164. He Y, Yi W, Suino-Powell K, Zhou XE, Tolbert WD, Tang X, et al. Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids. *Cell Research*. 2014;24(6):713-26.
165. Daley-Yates PT. Inhaled corticosteroids: potency, dose equivalence and therapeutic index. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2015;80(3):372-80.
166. Cevc G, Blume G. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1663(1-2):61-73.
167. Frey FJ, Odermatt A, Frey BM. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004;13(4):451-8.

168. Aden P, Goverud I, Liestol K, Loberg EM, Paulsen RE, Maehlen J, et al. Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum. *Brain research*. 2008;1236:39-48.
169. Weichhart T, Brandt O, Lassnig C, Muller M, Horl WH, Stingl G, et al. The anti-inflammatory potency of dexamethasone is determined by the route of application in vivo. *Immunology Letters*. 2010;129(1):50-2.
170. Goodman, Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill: New York. 2006; eleventh
171. Ajish TP, Praveen VP, Nisha B, Kumar H. Comparison of different glucocorticoid regimens in the management of classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2014;18(6):815-20.
172. Meikle AW, Tyler FH. Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. *American Journal of Medicine*. 1977;63(2):200-7.
173. Bindreither D, Ecker S, Gschirr B, Kofler A, Kofler R, Rainer J. The synthetic glucocorticoids prednisolone and dexamethasone regulate the same genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *BMC Genomics*. 2014;15:662.
174. Ito C, Evans WE, McNinch L, Coustan-Smith E, Mahmoud H, Pui CH, et al. Comparative cytotoxicity of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(8):2370-6.
175. Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*. 2005;70(5-7):407-17.
176. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(1):70-80.
177. Watson CS, Gametchu B. Proteins of multiple classes may participate in nongenomic steroid actions. *Experimental biology and medicine*. 2003;228(11):1272-81.
178. Mitre-Aguilar IB, Cabrera-Quintero AJ, Zentella-Dehesa A. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(1):1-10.
179. Watson CS, Gametchu B. Membrane estrogen and glucocorticoid receptors - implications for hormonal control of immune function and autoimmunity. *International immunopharmacology*. 2001;1(6):1049-63.

180. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):513-56.
181. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. 2002;67(6):529-34.
182. Casulari LA, Dondi D, Maggi R, Demissie M, Piccoella M, Piva F. Dexamethasone blocks the migration of the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39(9):1233-40.
183. Ross RA, Hein AM, Braca JA, 3rd, Spengler BA, Biedler JL, Scammell JG. Glucocorticoids induce neuroendocrine cell differentiation and increase expression of N-myc in N-type human neuroblastoma cells. *Oncology Research*. 2002;13(2):87-94.
184. Sun Z, Fan Y, Zha Q, Zhu MY. Corticosterone up-regulates expression and function of norepinephrine transporter in SK-N-BE(2)C cells. *Journal of neurochemistry*. 2010;113(1):105-16.
185. Zha Q, Wang Y, Fan Y, Zhu MY. Dexamethasone-induced up-regulation of the human norepinephrine transporter involves the glucocorticoid receptor and increased binding of C/EBP-beta to the proximal promoter of norepinephrine transporter. *Journal of neurochemistry*. 2011;119(3):654-63.
186. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research*. 1973;33(11):2643-52.
187. Kuci Z, Bruchelt G, Seitz G, Karov Y, Or R, Handgretinger R, et al. Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. *Anticancer research*. 2002;22(6C):4325-9.
188. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983;305(5931):245-8.
189. Preis PN, Saya H, Nadasdi L, Hochhaus G, Levin V, Sadee W. Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer research*. 1988;48(22):6530-4.
190. Gupta M, Notter MF, Felten S, Gash DM. Differentiation characteristics of human neuroblastoma cells in the presence of growth modulators and antimitotic drugs. *Brain research*. 1985;351(1):21-9.
191. Koutsilieris E, Kornhuber J, Degen HJ, Lesch KP, Sopper S, ter Meulen V, et al. U-373 MG glioblastoma and IMR-32 neuroblastoma cell lines express the dopamine and vesicular monoamine transporters. *Journal of neuroscience research*. 1996;45(3):269-75.
192. Pietras A. Cancer stem cells in tumor heterogeneity. *Advances in Cancer Research*. 2011;112:255-81.

193. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*. 2004;6(6):838-45.
194. Pacak K, Eisenhofer G, Carrasquillo JA, Chen CC, Li ST, Goldstein DS. 6-[<sup>18</sup>F]fluorodopamine positron emission tomographic (PET) scanning for diagnostic localization of pheochromocytoma. *Hypertension*. 2001;38(1):6-8.
195. Treuner J, Klingebiel T, Bruchelt G, Feine U, Niethammer D. Treatment of neuroblastoma with metaiodobenzylguanidine: results and side effects. *Medical and pediatric oncology*. 1987;15(4):199-202.
196. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals*. 2005;33(2):81-5.
197. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2002;38(2):79-85.
198. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, et al. PCR-based detection of Mycoplasma species. *Journal of Microbiology*. 2006;44(1):42-9.
199. Grau O, Kovacic R, Griffais R, Launay V, Montagnier L. Development of PCR-based assays for the detection of two human mollicute species, *Mycoplasma penetrans* and *M. hominis*. *Molecular and Cellular Probes*. 1994;8(2):139-47.
200. Endres CJ, DeJesus OT, Uno H, Doudet DJ, Nickles JR, Holden JE. Time profile of cerebral [<sup>18</sup>F]6-fluoro-L-DOPA metabolites in nonhuman primate: implications for the kinetics of therapeutic L-DOPA. *Frontiers in Bioscience*. 2004;9:505-12.
201. Lode HN, Bruchelt G, Seitz G, Gebhardt S, Gekeler V, Niethammer D, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastoma cell lines: correlations to meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression. *European journal of cancer*. 1995;31A(4):586-90.
202. Bombardieri E, Giammarile F, Aktolun C, Baum RP, Bischof Delaloye A, Maffioli L, et al. <sup>131</sup>I/<sup>123</sup>I-metaiodobenzylguanidine (mIBG) scintigraphy: procedure guidelines for tumour imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010;37(12):2436-46.
203. Wynne-Edwards KE, Edwards HE, Hancock TM. The human fetus preferentially secretes corticosterone, rather than cortisol, in response to intra-partum stressors. *PLoS one*. 2013;8(6):e63684.
204. Brickner RC, Jankowski B, Raff H. The conversion of corticosterone to aldosterone is the site of the oxygen sensitivity of the bovine adrenal zona glomerulosa. *Endocrinology*. 1992;130(1):88-92.
205. Yanagibashi K, Shackleton CH, Hall PF. Conversion of 11-deoxycorticosterone and corticosterone to aldosterone by cytochrome P-450 11 beta-/18-hydroxylase from porcine adrenal. *Journal of steroid biochemistry*. 1988;29(6):665-75.

206. Stewart PM, Mason JI. Cortisol to cortisone: glucocorticoid to mineralocorticoid. *Steroids*. 1995;60(1):143-6.
207. Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. 2011;60(11):1500-10.
208. Young WF. Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clinical endocrinology*. 2007;66(5):607-18.
209. Khosla N, Hogan D. Mineralocorticoid hypertension and hypokalemia. *Seminars in Nephrology*. 2006;26(6):434-40.
210. Bostrom BC, Sensel MR, Sather HN, Gaynon PS, La MK, Johnston K, et al. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood*. 2003;101(10):3809-17.
211. Castaneda F, Kinne RK. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2000;126(9):503-10.
212. Verdegaal SH, Corver WE, Hogendoorn PC, Taminiau AH. The cytotoxic effect of phenol and ethanol on the chondrosarcoma-derived cell line OUMS-27: an in vitro experiment. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2008;90(11):1528-32.
213. Tateno M, Saito T. Biological studies on alcohol-induced neuronal damage. *Psychiatry Investigation*. 2008;5(1):21-7.
214. Clave S, Joya X, Salat-Batlle J, Garcia-Algar O, Vall O. Ethanol cytotoxic effect on trophoblast cells. *Toxicology Letters*. 2014;225(2):216-21.
215. Schomig E, Babin-Ebell J, Schonfeld CL, Russ H, Trendelenburg U. Human Caki-1 cells are the first model for extraneuronal transport of noradrenaline (uptake<sub>2</sub>) which is based on a clonal cell line. *Journal of Neural Transmission*. 1990;32:437-40.
216. Bayer M, Schmitt J, Glaesmann K, Pichler B, Handgretinger R, Bruchelt G. Effects of different corticosteroids on neuroblastoma imaging and therapy. Präsentation auf der "Advances in Neuroblastoma Research 2012" in Toronto (18.06.-21.06.2012). Abstract: page 159.
217. Hill JE, Makky K, Shrestha L, Hillard CJ, Gasser PJ. Natural and synthetic corticosteroids inhibit uptake 2-mediated transport in CNS neurons. *Physiology & Behavior*. 2011;104(2):306-11.
218. Bayer M, Schmitt J, Dittmann H, Handgretinger R, Bruchelt G, Sauter AW. Improved selectivity of mIBG uptake into neuroblastoma cells in vitro and in vivo by inhibition of organic cation transporter 3 uptake using clinically approved corticosteroids. *Nuclear medicine and biology*. 2016;43(9):543-51.

219. Melzer HI, Coppentrath E, Schmid I, Albert MH, von Schweinitz D, Tudball C, et al.  $^{123}\text{I}$ -MIBG scintigraphy/SPECT versus  $^{18}\text{F}$ -FDG PET in paediatric neuroblastoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011;38(9):1648-58.
220. Piccardo A1 LE, Conte M, Garaventa A, Foppiani L, Altrinetti V, Nanni C, Bianchi P, Cistaro A, Sorrentino S, Cabria M, Pession A, Puntoni M, Villavecchia G, Fanti S. Comparison of  $^{18}\text{F}$ -dopa PET/CT and  $^{123}\text{I}$ -MIBG scintigraphy in stage 3 and 4 neuroblastoma: a pilot study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012 Jan;39(1):57-71.
221. Lopci E, Piccardo A, Nanni C, Altrinetti V, Garaventa A, Pession A, et al.  $^{18}\text{F}$ -DOPA PET/CT in neuroblastoma: comparison of conventional imaging with CT/MR. *Clinical nuclear medicine*. 2012;37(4):e73-8.
222. Lumbroso JD, Guerhazi F, Hartmann O, Coornaert S, Rabarison Y, Leclere JG, et al. Meta-iodobenzylguanidine (mIBG) scans in neuroblastoma: sensitivity and specificity, a review of 115 scans. *Progress in clinical and biological research*. 1988;271:689-705.
223. Sharp SE, Shulkin BL, Gelfand MJ, Salisbury S, Furman WL.  $^{123}\text{I}$ -MIBG scintigraphy and  $^{18}\text{F}$ -FDG PET in neuroblastoma. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2009;50(8):1237-43.
224. Loesberg C, Van Rooij H, Nooijen WJ, Meijer AJ, Smets LA. Impaired mitochondrial respiration and stimulated glycolysis by m-iodobenzylguanidine (MIBG). *International journal of cancer*. 1990;46(2):276-81.
225. Hutchinson RJ, Sisson JC, Shapiro B, Miser JS, Normole D, Shulkin BL, et al.  $^{131}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine treatment in patients with refractory advanced neuroblastoma. *American journal of clinical oncology*. 1992;15(3):226-32.
226. Matthay KK, DeSantes K, Hasegawa B, Huberty J, Hattner RS, Ablin A, et al. Phase I dose escalation of  $^{131}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine with autologous bone marrow support in refractory neuroblastoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(1):229-36.
227. Garaventa A, Guerra P, Arrighini A, Bertolazzi L, Bestagno M, De Bernardi B, et al. Treatment of advanced neuroblastoma with  $^{131}\text{I}$ -meta-iodobenzylguanidine. *Cancer*. 1991;67(4):922-8.
228. Dahllof G, Borgstrom P, Lundell G, Jacobsson H, Kogner P. Severe oral mucositis after therapeutic administration of [ $^{131}\text{I}$ ]MIBG in a child with neuroblastoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2001;92(4):420-3.
229. Wong T, Matthay KK, Boscardin WJ, Hawkins RA, Brakeman PR, DuBois SG. Acute changes in blood pressure in patients with neuroblastoma treated with  $^{131}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine (MIBG). *Pediatric blood & cancer*. 2013;60(9):1424-30.
230. Kosmin MA, Bomanji JB, Cork NJ, Shankar A, Gaze MN. Hypertension complicating  $^{131}\text{I}$ -meta-iodobenzylguanidine therapy for neuroblastoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012;39(4):597-601.
231. Garaventa A, Bellagamba O, Lo Piccolo MS, Milanaccio C, Lanino E, Bertolazzi L, et al.  $^{131}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine ( $^{131}\text{I}$ -MIBG) therapy for residual neuroblastoma: a mono-institutional experience with 43 patients. *British journal of cancer*. 1999;81(8):1378-84.

232. Tytgat GA, van den Brug MD, Voute PA, Smets LA, Rutgers M. Human megakaryocytes cultured in vitro accumulate serotonin but not meta-iodobenzylguanidine whereas platelets concentrate both. *Experimental Hematology*. 2002;30(6):555-63.
233. van Santen HM, de Kraker J, van Eck BL, de Vijlder JJ, Vulsma T. Improved radiation protection of the thyroid gland with thyroxine, methimazole, and potassium iodide during diagnostic and therapeutic use of radiolabeled metaiodobenzylguanidine in children with neuroblastoma. *Cancer*. 2003;98(2):389-96.
234. Garaventa A, Gambini C, Villavecchia G, Di Cataldo A, Bertolazzi L, Pizzitola MR, et al. Second malignancies in children with neuroblastoma after combined treatment with <sup>131</sup>I-metaiodobenzylguanidine. *Cancer*. 2003;97(5):1332-8.
235. Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, Kramer K, Gollamudi S, Heller G, et al. N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age. *Medical and pediatric oncology*. 2001;36(1):227-30.
236. Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K. Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 2007;74(3):477-87.
237. Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K. Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 2005;70(12):1823-31.
238. Rutgers M, Buitenhuis CK, Hoefnagel CA, Voute PA, Smets LA. Targeting of meta-iodobenzylguanidine to SK-N-SH human neuroblastoma xenografts: tissue distribution, metabolism and therapeutic efficacy. *International journal of cancer*. 2000;87(3):412-22.
239. Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic acids research*. 1992;20(17):4613-20.
240. Kolby L, Bernhardt P, Levin-Jakobsen AM, Johanson V, Wangberg B, Ahlman H, et al. Uptake of meta-iodobenzylguanidine in neuroendocrine tumours is mediated by vesicular monoamine transporters. *British journal of cancer*. 2003;89(7):1383-8.

# 7 Anhang

## 7.1 Erklärung zum Eigenanteil

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift sind Ergebnisse aus eigenständiger Arbeit sowie aus Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. M. Bayer dargestellt.

Zur Differenzierung werden im Folgenden der Eigenanteil und der gemeinschaftliche Anteil genau deklariert.

Die Studie wurde von Frau Dr. med. M. Bayer konzipiert. Sie hat als Betreuerin eine detaillierte Anleitung der Versuche aufgestellt.

Das wissenschaftliche Arbeiten im Umgang mit Zellen (Kultivieren, Passagieren, Einfrieren, Arbeiten an der Sterilbank) sowie das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen wurde vor Versuchsbeginn unter Anleitung von Frau Dr. med. M. Bayer erlernt (2.2.1).

Die Testungen zur Löslichkeit und praktischen Anwendung verschiedener Lösungsformen der GC wurde eigenständig durchgeführt (3.2).

Weiterhin wurden auch die Screeningversuche durch eigenständiges, wissenschaftliches Arbeiten durchgeführt (3.3).

Aufgrund einer erheblichen Zeitverzögerung, im Rahmen einer immer wiederkehrenden mykotischen Besiedlung der Zellen (4.1.1), wurden die Hauptversuche in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. M. Bayer durchgeführt (3.4).

An dieser Stelle möchte ich darauf verweisen, dass die ermittelten Ergebnisse z.T. im Rahmen einer Posterpräsentation mit dem Titel „Effects of different corticosteroids on neuroblastoma imaging and therapy.“ auf der „Advances in Neuroblastoma Research 2012 “ in Toronto vom 18.06.-21.06.2012 vorgestellt wurden. Die Präsentation erfolgte durch Frau Dr. med. M. Bayer. Das Poster beinhaltet Werte aus den Screeningversuchen sowie aus den Hauptversuchen. Die Abbildungen der Hauptversuche der vorliegenden Arbeit ähneln in der Darstellung den Abbildungen des Posters, wurden jedoch nicht identisch in der vorliegenden Arbeit übernommen. Die Auswertungen und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde eigenständig durch mich durchgeführt. Das Poster wird der Dissertation beigelegt.

Köln, den 11.04.2017

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **OCT3**-exprimierende HEK293-Zellen

**Abb. 2:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **OCT3**-exprimierende HEK293-Zellen

**Abb. 3:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **SK-N-SH**-Zellen

**Abb. 4:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **SK-N-SH**-Zellen

**Abb. 5:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **Kelly**-Zellen

**Abb. 6:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **Kelly**-Zellen

**Abb. 7:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **IMR-32**-Zellen

**Abb. 8:** Hemmwirkung (in %) **verschiedener GC** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in **IMR-32**-Zellen

**Abb. 9:** Hemmwirkung (in %) von **Hydrocortison** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in verschiedene Zelllinien

**Abb. 10:** Hemmwirkung (in %) von **Hydrocortison** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in verschiedene Zelllinien

**Abb. 11:** Hemmwirkung (in %) von **Prednisolon** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in verschiedene Zelllinien

**Abb. 12:** Hemmwirkung (in %) von **Prednisolon** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in verschiedene Zelllinien

**Abb. 13:** Hemmwirkung (in %) von **Dexamethason** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in verschiedene Zelllinien

**Abb. 14:** Hemmwirkung (in %) von **Dexamethason** unterschiedlicher Konzentrationen (mol/l) auf die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in verschiedene Zelllinien

**Abb. 15:** [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **OCT3-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

**Abb. 16:** [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **OCT3-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

**Abb. 17:** [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **SK-N-SH-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

**Abb. 18:** [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **SK-N-SH-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

**Abb. 19:** [<sup>3</sup>H]DA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

**Abb. 20:** [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme in % (f.c.~1x10<sup>-7</sup>mol/l) in 1x10<sup>6</sup> **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

**Abb. 21:** Aufnahme von [<sup>3</sup>H]DA in 1x10<sup>6</sup> **OCT3-**, **SK-N-SH-** oder **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

**Abb. 22:** Aufnahme von [<sup>3</sup>H]NA in 1x10<sup>6</sup> **OCT3-**, **SK-N-SH-** oder **Kelly-Zellen** ohne Inhibitor und nach Applikation von Hydrocortison/Prednisolon (1x10<sup>-4</sup>mol/l)

### 7.3 Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** Eigenschaften des NAT und des OCT3 im Vergleich (modifizierte Tabelle nach Bayer und Sauer (8, 76))

**Tab. 2:** Glucocorticoide/mineralcorticoide Potenz und biologische HWZ verschiedener Corticosteroide

**Tab. 3:** Verdünnungsreihen mit NaCl (0,9%) (f.c.~1x10<sup>-3</sup>mol/l) als Lösungsmittel

**Tab. 4:** Verdünnungsreihen mit 100% Ethanol (f.c.~1x10<sup>-3</sup>mol/l) als Lösungsmittel

**Tab. 5:** Versuchsprotokoll: Arbeitsschritte der radioaktiven Aufnahmeversuche

**Tab. 6:** Vergleich der Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]DA und [<sup>3</sup>H]NA in die verschiedenen Zelllinien

## 7.4 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Bruchelt. Er ist mir stets mit großer Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit begegnet. Danke für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und das offene Ohr für meine Anliegen. Es war eine spannende, lehrreiche Zeit für mich, die ich in guter Erinnerung behalte.

Ebenso danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. M. Bayer für das interessante Thema meiner Dissertation, Ihre gute und kompetente Einarbeitung im Labor sowie die Unterstützung während der Versuchsdurchführungen.

An dieser Stelle natürlich auch ein herzlicher Dank an das gesamte Laborteam.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger bedanken, dass ich die Gelegenheit hatte in seiner Abteilung zu promovieren.

Ein Dankeschön gilt ebenfalls meinem Zweitgutachter.

Danke an alle meine Lieben, welche mir während der gesamten Zeit stets beiseite standen. Vor allem möchte ich mich bei dieser Gelegenheit bei meinen Eltern bedanken. Ihr habt mich in allen Höhen und Tiefen motiviert und mir dieses Studium ermöglicht. Rückblickend kann ich sagen, dass dies der absolut richtige Weg für mich war.