

Urologische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ. -Prof. Dr. med. J. E. Gschwend)

**Funktionelle Charakterisierung des Transportes von [Methyl-<sup>3</sup>H]-  
Cholin in humanen Harnblasenkarzinomzellen und Modulation des  
Uptakes durch Chemotherapeutika**

Edlira Duraj

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend  
2. apl. Prof. Dr. Margitta Retz

Die Dissertation wurde am 08.12.2016 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.08.2017 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	4
1.1	Harnblasenkarzinom: Epidemiologie, Klassifikation und Diagnostik .....	4
1.2	Therapie des Harnblasenkarzinoms .....	8
1.3	Diagnostik des Urothelkarzinoms mittels PET/CT .....	11
1.3.1	Einführung .....	11
1.3.2	Diagnostische Effizienz des PET/CT beim Urothelkarzinom .....	13
1.4	Modulation des Cholin-Uptakes durch Chemotherapeutika .....	15
2	Zielsetzung .....	16
3	Material und Methoden .....	17
3.1	Material .....	17
3.1.1	Zellen .....	17
3.1.2	Chemikalien .....	17
3.1.3	Selbst zubereitete Lösungen und Medien .....	19
3.1.4	Geräte .....	19
3.1.5	Gebrauchsmaterial .....	20
3.1.6	Software .....	20
3.2	Methoden .....	21
3.2.1	Zellkultivierung .....	21
3.2.2	Vorbereitung der Zellen für die Uptake-Versuche mit FDG und Cholin... ..	22
3.2.3	Durchführung der Uptakeversuche mit Cholin in den Zelllinien EJ 28 und RT112 .....	22
3.2.3.1	Untersuchung des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Zeit .....	23
3.2.3.2	Untersuchung des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	24
3.2.3.3	Modulation des Cholin-Uptakes in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitoren .....	24
3.2.4	Bestimmung der Kinetik des Cholin-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112 .....	25
3.2.5	Bestimmung des <sup>18</sup> F-FDG-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112... ..	27
3.2.6	Erstellung von Dose-Response Kurven der Chemotherapeutika in Zelllinien EJ28 und RT112.....	27
3.2.7	Modulation des Cholin-Uptakes nach Exposition der Tumorzellen mit Chemotherapeutika .....	28
4	Ergebnisse .....	30

4.1	Untersuchung des <sup>18</sup> F-FDG-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112 .....	30
4.2	Untersuchung des <sup>3</sup> H-Cholin-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112 .....	31
4.2.1	<sup>3</sup> H-Cholin-Uptake in Abhängigkeit von der Zeit und dem Einfluss von Natrium-Ionen .....	31
4.2.2	Cholin-Uptake in Abhängigkeit vom pH Wert .....	32
4.2.3	Untersuchung der Kinetik des Cholin-Transportes .....	33
4.2.4	Cholin-Uptake in Abhängigkeit von verschiedenen Inhibitoren .....	35
4.3	Modulation des Cholin-Uptakes durch Zytostatika .....	36
4.3.1	Bestimmung der IC50-Werte nach Exposition mit Chemotherapeutika...	36
4.3.2	Modulation des Cholin-Uptakes nach Exposition der Tumorzellen mit Chemotherapeutika .....	44
4.3.2.1	Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Konzentration der Chemotherapeutika .....	44
4.3.2.2	Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Chemotherapeutika .....	46
5	Diskussion .....	49
5.1	Charakterisierung des Cholin-Transportes .....	49
5.2	Modulation des Cholin-Uptakes nach Exposition mit Zytostatika .....	52
6	Zusammenfassung .....	56
7	Literaturverzeichnis.....	57
8	Anhang .....	72
8.1	Abkürzungen-Glossar .....	72
8.2	Tabellenverzeichnis .....	73
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	74
9	Danksagung.....	76

# 1 Einleitung

## 1.1 Harnblasenkarzinom: Epidemiologie, Klassifikation und Diagnostik

Bei etwa 2-3 % aller humanen, malignen Erkrankungen handelt es sich um ein Harnblasenkarzinom. In den USA sind jährlich mehr als 50.000 Menschen betroffen, bei fast 10.000 Todesfällen pro Jahr. Daten der Cancer Statistic des National Cancer Institutes belegen, dass die Inzidenz in den USA im Jahr 2010 bei 70.530 Menschen lag. Hochrechnungen sagen voraus, dass 14.680 Patienten daran sterben werden, wovon 10410 Männer und 4270 Frauen sind (Jemal et al., 2010). Nach Angaben der World Health Organisation (WHO) sind Blasenkarzinome die 11. häufigste maligne Erkrankung, bezogen auf die Neuerkrankungsrate pro Jahr. Damit handelt es sich beim Blasentumor nach dem Prostatakarzinom um den zweithäufigsten urologischen Tumor.

Die Inzidenz des Blasentumors ist abhängig von ethnisch-geographischen Variablen, dem Alter und dem Geschlecht. Bei weißhäutigen Männern in den USA liegt sie bei 27/100.000 Einwohner, bei schwarzhäutigen dagegen niedriger bei 10/100.000 Einwohner. Für Frauen sind keine ethnischen Unterschiede beschrieben; die Inzidenz wird mit 9/100.000 angegeben und liegt damit deutlich unter der der Männer. Blasenkarzinome treten in den USA und in Europa wesentlich häufiger auf als in asiatischen Ländern. Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 15970 Menschen an einer bösartigen Neubildung der Harnblase (Robert Koch-Institut, 2010). Die absolute Zahl der jährlichen Neuerkrankungen hat sich nach den Daten des Robert Koch-Instituts seit 1980 bei beiden Geschlechtern etwa verdoppelt.

Die krankheitsspezifische Mortalität variiert zwischen 2,4/100.000 Einwohner in Japan und 8,8/100.000 in Südafrika. Nach Erhebungen der WHO ist die Gesamtmortalität des Harnblasenkarzinoms in den letzten 30 Jahren annähernd gleich geblieben. In Deutschland sterben jedes Jahr 5.000 Menschen an einem Blasenkarzinom. Die Mortalität für Frauen liegt bei 4,8/100.000, für Männer 8,5/100.000.

Das Blasenkarzinom ist eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters. Die Tumorzinzidenz steigt ab dem 40. Lebensjahr und erreicht ein Maximum zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Nur 5 % der Patienten sind jünger als 45 Jahre. In der Literatur wird das mittlere Alter der Patienten mit Harnblasenkarzinom bei Männern auf 70 Jahre und bei Frauen auf 73 Jahre angegeben (Jocham und Miller, 2007). Der



Blasentumor ist eine Erkrankung mit einem sehr variablen Erscheinungsbild. Histologischer Klassifizierungstyp, Malignitätsgrad und Wachstumsverhalten bestimmen die Prognose der Erkrankung. Die aktuelle TNM (Tumor-Nodes-Metastases) Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (UICC-Union for International Cancer Control 2010) ist in der Tabelle 1 zusammengefasst.

T- Primärtumor	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Ta	nichtinvasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert äußere Muskulatur
T3	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch
T4	Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina oder Becken oder Bauchwand
T4a	Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Becken oder Bauchwand
N - Regionäre Lymphknoten	
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	kein Befall regionärer Lymphknoten
N1	solitär; größte Ausdehnung befallener Lymphknoten $\leq 2$ cm
N2	multipel, größte Ausdehnung: $>2$ cm, aber $\leq 5$ cm
N3	solitär/multipel; größte Ausdehnung $> 5$ cm
M - Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

Histologisch sind mehr als 90 % aller Blasentumoren Urothelkarzinome, die vom Übergangsepithel ausgehen.

Nach der WHO-Klassifikation von 1973 wurden drei Tumorgrade unterschieden: G1 (gut differenziert), G2 (moderat differenziert) und G3 (schlecht differenziert). 2004 wurde diese Klassifikation nochmals überarbeitet (Lopez-Beltran, 2004).

Nichtinvasive Neoplasien
Hyperplasie <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flache Hyperplasie</li> <li>• Papilläre Hyperplasie</li> </ul>
Flache Läsionen mit Atypien <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaktive (entzündliche) Atypie</li> <li>• Atypie mit unklarer Bedeutung</li> <li>• Urotheliale Dysplasie (intraurotheliale Low-Grade-Neoplasie)</li> <li>• Carcinoma in situ (intraurotheliale High-grade-Neoplasie)</li> </ul>
Papilläre Läsionen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Papillom</li> <li>• Invertiertes Papillom</li> <li>• Papilläre urotheliale Neoplasie of low malignant potential (PUNLMP)</li> <li>• Papilläres urotheliales Low-grade-Karzinom</li> <li>• Papilläres urotheliales High-grade-Karzinom</li> </ul>
Invasive Neoplasien Invasion der Lamina propria Invasion der Muscularis propria (M. detrusor vesicae)

Tab. 2: WHO-Klassifikation von 2004

Bei der Erstdiagnose wird bei etwa 75 % der Patienten ein nicht-muskelinvasives Karzinom, bei 20 % ein invasives und bei 5 % ein bereits metastasiertes Harnblasenkarzinom festgestellt.

Der Goldstandard zur Diagnostik des Urothelkarzinoms ist die Zystoskopie. Verschiedene Studien belegen den Vorteil der Fluoreszenz-Zystoskopie mit Hexaminolävulinsäure gegenüber der konventionellen Weißlicht-Zystoskopie (Fradet et al., 2007). Die Detektionsraten von Urothelkarzinomen liegen bei 96 % für die Fluoreszenz-Zystoskopie, verglichen mit 77 % für die Weißlicht-Zystoskopie (Jocham et al., 2005). Die Zystoskopie dient der Diagnosesicherung und erlaubt die

Dokumentation von Lage, Größe und Anzahl von Tumoren. Der Tumor wird zunächst transurethral reseziert. Bei der Resektion gilt es zu beachten, dass die Tumorbasis in jedem Fall auch Muskulatur der Blasenwand enthält. Nur so kann pathologisch eindeutig zwischen einem oberflächlichen (pTis, pTa, pT1) und einem muskelinvasivem Tumor differenziert werden.

Eine Urinzytologie kann aus dem Spontanurin oder aus einer Blasenpflung als sog. Spülzytologie entnommen werden. Bei der exfoliativ-zytologischen Untersuchung des Urins werden die mit dem Urin ausgeschiedenen Zellen nach zytologischen Kriterien (Anisonukleose, Polymorphie, Hyperchromasie, Anisozytose, erhöhte Mitosezahl und vermehrter Nukleolengehalt) beurteilt. Die Untersuchungsergebnisse gehen als Malignitätskriterien das Grading ein (Rubben et al., 1979).

Die Gewinnung von Zellen durch eine Spülzytologie wird bevorzugt. Sie besitzt eine hohe Sensitivität bis zu 90 % zur Detektion schlecht differenzierter Tumoren. Bei gut differenzierten Tumoren zeigt die Zytologie eine geringe Sensitivität von 12 % (4-31 %) für G1 Tumoren und 26 % (17-37 %) für G2-Tumoren (Lotan & Roehrborn, 2003).

Ausscheidungsurogramm und Sonographie dienen dem Ausschluss von Harnstauungsniere und Tumoren der oberen Harnwege, die etwa 3 % der Fälle beinhalten (Rübben, 2001).

Der Einsatz von Urin basierten Markersystemen (Blasentumorantigen (BTA), Nuclear-Matrix-Protein (NMP)-22, multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Survivin, Telomerase) ist nicht in Guidelines empfohlen (Shariat et al., 2008). Aufgrund ihrer eingeschränkten Sensitivität verbietet sich ihr Einsatz zum Screening. Im Bereich der Nachsorge von Harnblasentumoren ersetzen Urinmarkersysteme nicht die Urethrozystoskopie. Keiner der bislang bekannten Marker erfüllt die Kriterien eines diagnostisch zufriedenstellenden Tumormarkers.

Nach Durchführung der Basisdiagnostik lassen sich mit einer Treffsicherheit von etwa 95 % oberflächliche von lokal-fortgeschrittenen Tumoren differenzieren. Die Diagnostik zur Detektion oberflächlicher Blasentumoren ist damit abgeschlossen.

Bei circa 5 % der Patienten mit einem Urothelkarzinom der Harnblase werden Metastasen diagnostiziert. Bei einem muskelinvasiven und metastasierten Blasentumor sind bildgebende Verfahren diagnostisch bedeutsam, um das Ausmaß der lokalen Infiltration, den Lymphknotenstatus und die Fernmetastasierung zu bestimmen. Eine genaue Stadieneinteilung ist entscheidend für die Planung der weiteren Therapie. Die Drei-Phasen-Computertomographie (CT) von Thorax, Abdomen und Becken oder die Magnetresonanztomographie (MRT) sind geeignete Methoden, um die lokale Tumorausdehnung zu erfassen. Bei der Lymphknotenbeurteilung betragen Sensitivität und Spezifität beider Verfahren 48-87 % (Kim et al., 1994; Nurmi et al., 1988; Paik et al., 2000).

Mittels Ferumoxtran verstärkter MRT können auch Metastasen mit einem Durchmesser von weniger als 10 Millimeter detektiert werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Einlagerung von intravenös applizierten Eisen-/Nanomolekülen in die Lymphknoten des Körpers. Die Tumorbesiedlung von Lymphknoten führt zur inhomogenen Aufnahme der Eisenmoleküle, die dann in der MRT sichtbar wird (Montie, 2005).

Die Durchführung einer Knochenszintigraphie ist im Falle von Knochenschmerzen oder einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase indiziert.

## **1.2 Therapie des Harnblasenkarzinoms**

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms ist abhängig von verschiedenen Faktoren: TNM-Stadium, Lokalisation und Differenzierungsgrad des Tumors sowie Anzahl der Tumoren. Bei der Therapieplanung sind immer sowohl das Alter des Patienten, sein Allgemeinzustand, eventuelle Nebenerkrankungen, als auch seine Compliance zu berücksichtigen.

### *Therapie des nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinoms*

Das Ziel der Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist ein tumorfreies Überleben unter Erhalt der funktionsfähigen Blase. Die transurethrale Resektion der Harnblase (TURB) sichert die Diagnose und dient bei nicht-muskelinvasiven Tumoren zur Stadieneinteilung und zur Therapie.

Für die Prognose nicht-invasiver Harnblasenkarzinome dient der von der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) entwickelte „Bladder Calculator“. Tumoren werden in diesem System gemäß ihres Risikoprofils hinsichtlich Rezidiv und Progression in drei Risikogruppen (niedriges, intermediäres und hohes Risiko) eingeteilt (Sylvester et al., 2006).

Bei unifokalen low-risk-Tumoren (pTa, G1; kleiner als 3 cm) ist die Prognose aufgrund des geringen Risikos einer Progression oder einer Metastasierung bei vollständiger Resektion durch eine TUR-B sehr gut. Durch das Auftreten eines Rezidivs wird die Prognose nicht verschlechtert, so dass die Indikation zu einer längerdauernden, adjuvanten Chemotherapie als Rezidivprophylaxe nicht gestellt wird. Gemäß den Therapierichtlinien der European Association of Urology (EAU) zur Behandlung nicht-invasiver Blasentumoren gilt die TUR-B zusammen mit einer adjuvanten intravesikalen Chemotherapie innerhalb der ersten sechs Stunden nach Resektion (Frühinstillation) als Standard. Als mögliche Chemotherapeutika stehen dabei Mitomycin C, Epirubicin oder Doxorubicin zur Verfügung.

Bei intermediate-risk-Tumoren (pT1, G1-2, multifokale Tumoren oder Tumoren >3 cm) gilt als Standardtherapie ebenfalls die TUR-B mit initialer Frühinstillation eines Chemotherapeutikums. In der Regel erfolgt in dieser Gruppe nach vier bis sechs Wochen eine erneute TUR-B als Nachresektion. Eine adjuvante intravesikale Chemotherapie wird über maximal sechs bis zwölf Monate durchgeführt (Babjuk et al., 2008). Aufgrund seiner geringen Nebenwirkungen ist Mitomycin C das Chemotherapeutikum der ersten Wahl. Die Rezidivrate kann unter Instillationstherapie um ca. 6 % gesenkt werden (Pawinski et al., 1996). Die potentielle alternative Therapie mit Bacille Calmette-Guerin (BCG) ist mit mehr Nebenwirkungen verbunden.

Zur Standardtherapie von high-risk-Tumoren (pTa- pT1, G3 mit oder ohne Cis oder bei solitärem Cis) gehören TUR-B sowie Nachresektion nach vier bis sechs Wochen und Beginn einer intravesikalen Immuntherapie mit BCG als Induktionstherapie und Fortführung als Erhaltungstherapie für mindestens ein Jahr. Sollte sich unter dieser Therapie keine komplette Remission zeigen, ist eine radikale Zystektomie indiziert.

#### *Therapie des muskelinvasivem Urothelkarzinoms*

Die radikale Zystektomie ist Therapie der Wahl bei muskelinvasiven, nicht-metastasierten Harnblasenkarzinomen sowie bei nicht-muskelinvasiven high-risk

Tumoren, die auf die BCG-Therapie nicht ansprechen. Die Zystektomie kann auch als Palliativmaßnahme durchgeführt werden, z.B. beim Vorliegen von lokal weit fortgeschrittenen Tumorstadien mit persistierender Makrohämaturie.

Der Lymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Diagnose eines muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase ist ein äußerst wichtiger Prognosefaktor. Die fünf-jährige Zehnjahresüberlebensrate beträgt 78 % bzw. 56 % für Patienten ohne befallene Lymphknoten und 31 % bzw. 23 % für Patienten mit befallenen Lymphknoten (Bassi et al., 1999, Stein et al., 2001, Mills et al., 2001).

Etwa 50 % der Patienten mit einem Urothelkarzinom entwickeln nach radikaler Zystektomie abhängig von der histologisch gesicherten Tumorausdehnung lokale Rezidive und/oder Fernmetastasen. Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen werden zum Zeitpunkt der Diagnose in Abhängigkeit der Invasionstiefe bei bis zu 40% der Patienten festgestellt. Die häufigsten Lokalisationen der Metastasen sind die Lunge, Leber und die Knochen. Die systemische Chemotherapie kommt beim lokoregionär fortgeschrittenen (pT3a/pT3b/pT4) und beim metastasierten Blasenkarzinom mit unterschiedlicher Zielsetzung zum Einsatz. Entsprechend der klinischen Situation kann die Chemotherapie als neoadjuvanter oder adjuvanter Therapieansatz eingesetzt werden. (Sherif et al., 2002; Winquist et al. 2004, Grossmann et al. 2003,). Im neoadjuvanen Konzept sollte jedoch die zeitliche Verzögerung der operativen Maßnahme berücksichtigt werden.

#### *Therapie des metastasiertem Urothelkarzinoms*

Die Langzeitüberlebensrate von Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen gilt als äußerst gering. Trotz des Einsatzes von Polychemotherapien beträgt diese etwa 14 Monate. Bis Ende der 1990er-Jahre galt das MVAC-(Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) Schema als Goldstandard in der Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms. Nun besteht die aktuelle Standardtherapie aus der Kombination von Gemcitabin und Cisplatin, welche weniger Nebenwirkungen aufweist (von der Maase et al., 2005; Bellmunt et al., 2009). Bei einem Ansprechen auf die Chemotherapie werden in 10-50 % der Fälle komplette Remissionen beobachtet. Es kommen zumeist vier bis sechs Zyklen mit anschließender Reevaluation zur Anwendung. Bei einem Progress der Tumorerkrankung stehen verschiedene Zweitlinien Chemotherapien z.B. Vinflunin, Gemcitabin/Paclitaxel oder Docetaxel zur Verfügung (Bellmunt et al., 2009, Pestasides et al., 2002; Dumez et al., 2007). Im

individuellen Fall kann eine Metastasenresektion vor oder nach der Chemotherapie sinnvoll sein.

### **1.3 Diagnostik des Urothelkarzinoms mittels PET/CT**

#### **1.3.1 Einführung**

Neben CT und MRT hat in den letzten Jahren die molekulare bildgebende Diagnostik mittels PET (Positronenemissionstomographie)/CT oder PET/MRT an Bedeutung zugenommen. CT und MRT sind rein morphologisch orientierte Verfahren und können nicht immer die Dignität des Gewebes klären. Die PET stellt in Kombination mit der CT heute ein wichtiges funktionelles bildgebendes Verfahren in der Onkologie dar. Ergänzend zur Abbildung der Morphologie mittels CT, hat die PET den Vorteil, verschiedene biochemische Prozesse darstellen zu können, und dann durch die Lokalisationsdiagnostik des CT eine anatomische Zuordnung zu ermöglichen.

Das Prinzip der PET ist die Visualisierung von verschiedenen verabreichten Radiopharmaka (Tracern), die im tumorösen Gewebe angereicht werden. Die von den Nukliden ausgesandte Strahlung wird von einem Szintillationsdetektor registriert. Als Radiopharmaka werden radioaktiv markierte bioaktive Substanzen bezeichnet, die sich je nach biochemischen sowie pharmakokinetischen Eigenschaften in unterschiedlichen Geweben verschieden stark anreichern. Zu den Radiopharmaka gehören Glukose, Aminosäuren, Cholin, die mit verschiedenen Positronenstrahlern ( $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$ ) markiert werden. Im Vergleich zur Verwendung von Biomarkern ohne einen bildgebenden Kontext liefert eine PET-CT-Untersuchung durch den unmittelbaren Vergleich mit der radiologischen Diagnostik weitere aussagekräftige Informationen.

Fluorine-18-Fluordeoxyglukose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) ist bislang der am häufigsten verwendete Tracer in der Onkologie.  $^{18}\text{F}$ -FDG wird über die gleichen Transportwege in die Zelle aufgenommen wie Glukose und durch das Enzym „Hexokinase“ in  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-Phosphat umgewandelt. Im Gegensatz zur weiteren Verstoffwechslung von Glukose-6-Phosphat, ist der Abbau von  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-Phosphat gehemmt. Nur die Rückreaktion ist möglich. Da viele maligne Zellen eine vermehrte Aufnahme von Glukose aufweisen, lassen sich viele Tumoren mittels  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET gut detektieren.

Aus der Literatur der letzten Jahre ist zu entnehmen, dass die Mehrheit der humanen malignen Tumoren erhöhte Aufnahmeraten für  $^{18}\text{F}$ -FDG zeigt. Besonders erfolgreich ist die Anwendung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET beim Nachweis und beim Staging von Kopf-Hals-Tumoren, Bronchialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, malignen Melanomen und Lymphomen (Patil et al., 2009).  $^{18}\text{F}$ -FDG wird auch von Urothelkarzinomzellen aufgenommen. Die Ausscheidung erfolgt durch den Harntrakt.

Das lipotrope Cholin ist das Salz einer quartären Ammoniumbase, das durch Methylierung aus 2-Aminoethanol entsteht. Nach Auffassung des Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine der USA besitzt Cholin einen Vitaminstatus. Es legte die adäquate Einnahmedosis auf 550 mg pro Tag für Männer und 425 mg pro Tag für Frauen fest. Nur geringe Mengen von Cholin werden in den Neuronen synthetisiert, die Hauptmenge wird mit der Nahrung aufgenommen (Zeisel, 1981).

Cholin dient als Vorstufe für viele Biomoleküle und ist wichtig für die normale Funktion des Organismus. Es wird durch die Cholinase zu Phosphorylcholin phosphoryliert (siehe Abb.1), welches wiederum Bestandteil polarer Lipide (z.B. Phosphatidylcholin) ist. Diese Lipide fungieren als Strukturlipide in der Zellmembran. Als Komponente von Lipoproteinen ist Cholin an Transportvorgängen innerhalb des Organismus beteiligt. Durch Verknüpfung eines Acetylrestes und Cholin mit Hilfe des Enzyms Cholin-Acetyltransferase entsteht der Neurotransmitter Acetylcholin, der für die Signalweiterleitung im synaptischen Spalt zwischen den motorischen Endplatten verantwortlich ist. Über eine mehrstufige Oxidation wird Cholin zu Betain umgewandelt, das als Methylgruppendonator eine wichtige Rolle spielt. Die Konzentration von Cholin im Blut ist mit 10-50  $\mu\text{M}$  niedrig (Roivainen et al., 2000).

Ein typisches Zeichen der Karzinogenese ist die vermehrte Zellproliferation. Schnell proliferierende Zellen besitzen hohe Mengen an Phospholipiden, im Besonderen Phosphatidylcholin. Aufgrund des vermehrten Uptakes durch Tumorzellen eignet sich Cholin als Tracer für die PET.



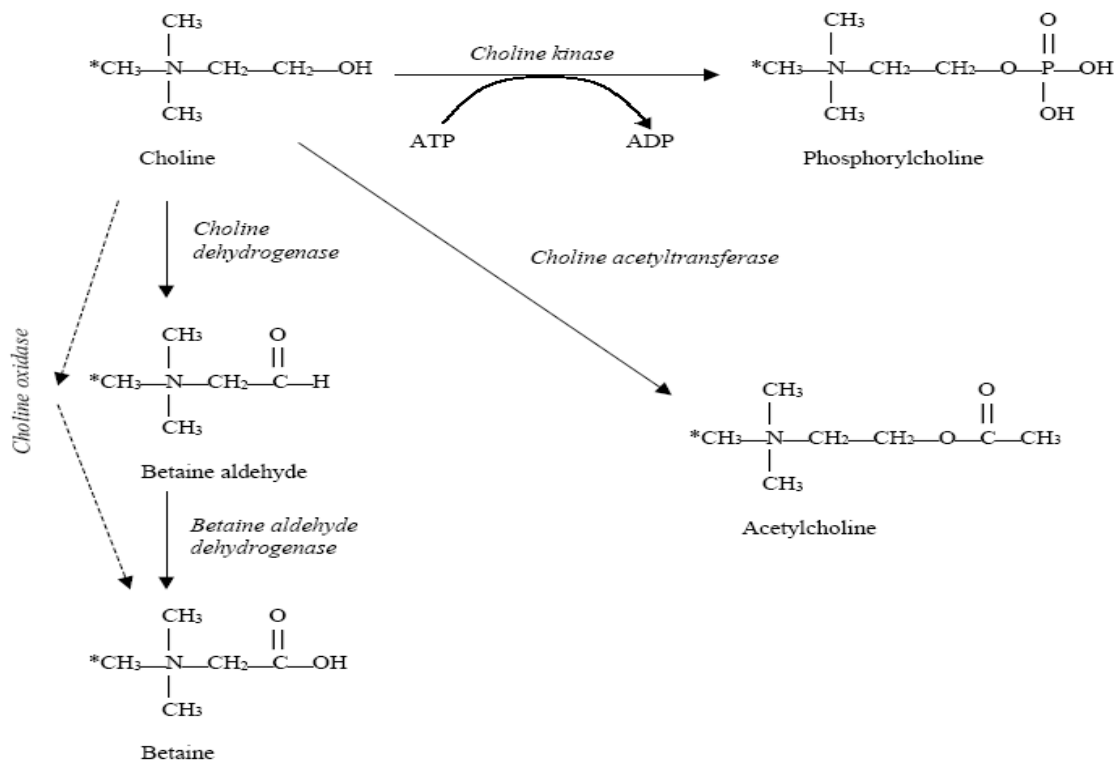


Abb. 1: Cholin-Metabolismus (Roivainen et al., 2000)

Cholin kann mit verschiedenen Nukliden markiert werden, wie z.B. mit  $^3\text{H}$ , oder  $^{18}\text{F}$  (Henriksen et al. 2004). De Jong et al. (2002) publizierten die ersten Ergebnisse zur Diagnose und Staging des Harnblasenkarzinoms mit Hilfe einer Cholin-PET. 2006 wurde von vier weiteren Studien berichtet (Yoshida et al. 2006). Trotz vielversprechender Ergebnisse dieser Fallstudien führte dies jedoch nicht zur Etablierung dieser Methode im klinischen Alltag.

### 1.3.2 Diagnostische Effizienz des PET/CT beim Urothelkarzinom

Bei Vorliegen eines muskelinvasiven Blasentumors, ist der nächste Schritt vor Planung der Therapie die Durchführung eines Staging-Verfahrens. Die bildgebende Diagnostik dient zur Beurteilung des Lokalbefundes, Lymphknotenstatus sowie der Fernmetastasierung.

Die lokale Tumorausdehnung kann mittels CT nur eingeschränkt beurteilt werden (Voges et al., 1989, Shariat et al., 2012). Insbesondere wird die Interpretierung nach der transurethralen Resektion des Tumors erschwert.

Die Sensitivität der CT für die Detektion von Lymphknoten-Metastasen liegt bei 48-87 % (Jager et al., 1996). Leissner et al. zeigten, dass 12,6 % der Patienten im Stadium pT2a einen positiven Lymphknotenstatus aufweisen. Dieser Wert erhöht

sich auf 32 % bei Patienten im Stadium pT2b und auf 49 % beim Stadium pT3. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus (pN0) 78 % und bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen 23% (Leissner et al., 2000). Allerdings ist die CT weiterhin in den Leitlinien der EAU (European Association of Urology) als Standardbildgebung empfohlen (Stenzl et al., 2010). Alternativ kann als Bildgebung ein MRT angefertigt werden. Daneshmand und Mitarbeiter beschrieben eine Sensitivität, Spezifität und diagnostische Treffsicherheit bezüglich der lokalen Ausdehnung des Tumors von 87,5 %, 47,5 % und 74 % (Daneshmand et al., 2012). Bezüglich des Lymphknotenstatus wurden hinsichtlich dieser Parameter, Werte von 40,7 %, 91,5 %, und 80,3 % genannt. Verglichen mit der CT könnte eine MRT mehr Informationen liefern. Der Einsatz von supraparamagnetischen Eisennanopartikeln stellt eine Erweiterung der MRT in der Detektion von Lymphknotenmetastasen dar. Im Falle einer metastatischen Infiltration von Lymphknoten bleibt ein Signalabfall der entsprechenden Lymphknoten aus, welche in der MRT dann als suspekt klassifiziert werden. Diese Methode befindet sich jedoch noch in der klinischen Prüfung (Montie, 2005).

Bei vielen Tumorerkrankungen wie Kolonkarzinomen und Lymphomen hat sich die PET-Diagnostik in den letzten Jahren als Standard etabliert (Beets et al., 1994). In der Vergangenheit wurde <sup>11</sup>C-Cholin-PET/CT beim Prostatakarzinom angewendet (Kotzerke et al., 2000, Kwee et al., 2005, Müller et al., 2009). Aktuell werden jedoch bei dieser Tumorentität PSMA (Prostata-spezifisches-Membran-Antigen)-Liganden sehr erfolgversprechend in klinischen Studien untersucht.

Die PET wird meist mit einer diagnostischen CT als PET/CT kombiniert. Bei Blasenkarzinompatienten wurde hauptsächlich <sup>18</sup>FDG als Tracer der PET/CT verwendet (Ahlstrom et al., 1996, Bachor et al., 1999, Kibel et al., 2009). Drieskens und Mitarbeiter konnten eine Korrelation zwischen PET-positiven Befunden und der Prognose belegen (Drieskens et al., 2005). Liu und Mitarbeiter ermittelten in ihrer Studie eine Sensitivität von 77 % und eine Spezifität von 97 % (Liu et al., 2003). Jadvar konnte in seiner Arbeit einen diagnostischen Vorteil der FDG-PET/CT gegenüber der CT bezüglich Lymphknotenstatus des Blasenkarzinoms zeigen. In der Studie von Swinnen erwies sich die FDG-PET/CT der konventionellen CT nicht als überlegen (Swinnen et al., 2010). Durch die renale Ausscheidung von FDG und eine konsekutiv akkumulierte Aktivität in der Harnblase erschwert sich die Interpretation der FDG-PET im kleinen Becken (Kosuda et al., 1997, Jana et al., 2006). Deswegen

stellt  $^{18}\text{F}$ FDG keinen perfekten Tracer für die Diagnose von Tumoren im urogenitalen System dar. Picchio und Mitarbeiter zeigten in einer präliminären Studie mit 27 Patienten dass die PET dem CT hinsichtlich der Detektion lymphogener Metastasierung überlegen ist (Picchio et al., 2006). Die diagnostische Effizienz des PET/CT bezüglich des Lymphknoten-Stagings mit den Tracern  $^{11}\text{C}$ -Cholin und  $^{18}\text{F}$ -FDG wurde von Maurer et al. 2012 in einer tabellarischen Zusammenfassung verglichen. Insgesamt wurden mit  $^{11}\text{C}$ -Cholin in vier Studien 93 Patienten und mit  $^{18}\text{F}$ -FDG in 6 Studien 249 Patienten untersucht. Die Parameter Sensitivität, Spezifität, der positive prädiktive Wert, der negative prädiktive Wert und die Genauigkeit betragen im Median bei  $^{11}\text{C}$ -Cholin 65 %, 100 %, 100 %, 90 % und 92 %, während diese für  $^{18}\text{F}$ -FDG mit 60 %, 94 %, 78 %, 83 % und 80 % ermittelt wurden. Daraus ergab sich ein leicht geringer diagnostischer Vorteil für  $^{11}\text{C}$ -Cholin als Tracer für die PET/CT Diagnostik. Aljabery konnte in seiner Arbeit eine ähnliche Sensitivität von FDG-PET/CT und konventioneller CT mit 41% (Aljabery et al., 2015). Golan zeigte in seiner Studie eine Gleichwertigkeit von Cholin und FDG als Tracer für das Staging des Urothelkarzinoms (Golan et al., 2011). Nachteil des  $^{11}\text{C}$ -Cholins ist seine kurze Halbwertszeit von 20 Minuten. Eine relevante Einschränkung dieser Studien war das kleine Patientenkollektiv.

#### **1.4 Modulation des Cholin-Uptakes durch Chemotherapeutika**

Mit Hilfe der PET/CT werden je nach eingesetztem Tracer verschiedene Prozesse des Zellmetabolismus visualisiert. Eine Chemotherapie bedeutet für jede Zelle einen komplexen Eingriff in ihrem Metabolismus. Daher ist es möglich, dass Chemotherapien die Aufnahme des Tracers beeinflussen. So wurde in einer Studie gezeigt, dass Etoposid die Glukose-Aufnahme in Hodgkin Lymphom Zellen reduziert (Banning, 2006). Bei Lungenkarzinom korreliert die Aufnahme von FDG mit der Zelldifferenzierung (Guo et al, 2004). Für das Urothelkarzinom ist bislang nicht bekannt, ob Chemotherapeutika wie Cisplatin, Gemcitabin und Docetaxel die Aufnahme von Cholin in die Tumorzellen verändern.

## 2 Zielsetzung

Seit Jahren wird die FDG-PET bei vielen Tumorentitäten zum metabolischen Tumornachweis verwendet. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass Tumoren in Abhängigkeit ihres Malignitätsgrades im Vergleich zu gesundem Gewebe höhere Glykolyseraten und damit einen erhöhten Glukoseverbrauch aufweisen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich auch Cholin als Tracer für PET-Untersuchungen zur Diagnose und zum Staging von Harnblasenkarzinomen eignet. Bislang existieren keine vergleichende Untersuchungen zum Uptake von Cholin und FDG in Blasenkarzinomzellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Cholin-Uptake in Blasenkarzinomzellen näher zu charakterisieren und es mit dem FDG-Uptake zu vergleichen.

Im Rahmen der Charakterisierung des Cholin-Transportes an den Urothelkarzinomzelllinien EJ28 und RT112 in vitro wurden folgende Parameter untersucht:

- Bestimmung des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von Natrium-Ionen und pH
- Potenzielle Hemmung des Cholin-Transportes durch Tetraethylammonium (TEA), Ouabain, Cholin und Hemicholin-3
- Ermittlung der kinetischer Parameter (Michaelis-Menten Kinetik) des Cholin-Uptakes
- Überprüfung des Cholin-Transportes nach Applikation von drei, in der Therapie des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms klinisch eingesetzten Chemotherapeutika (Gemcitabin, Cisplatin, Docetaxel). Die Untersuchung mit verschiedenen Zytostatika soll erste Hinweise über die Wertigkeit des Einsatzes von Cholin-PET/CT bei chemotherapierten Patienten geben.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Die benutzten Chemikalien, Geräte, Gebrauchsmaterialien und Software werden unter Angabe der Bezugsfirma aufgelistet.

##### 3.1.1 Zellen

Es wurden die Blasenkarzinomzelllinien RT112 und EJ28 verwendet. Beide Zelllinien wachsen als adhärenente monozelluläre Kulturen. Sie unterscheiden sich durch den Grad ihrer Differenzierung: Während RT112 dem Malignitätsgrad G1-G2 zuzuordnen ist, gehört EJ28 in die Gruppe G3-G4.

##### 3.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller
[Methyl- <sup>3</sup> H]-Cholinchlorid (spez. Aktivität 3,03 TBq/mmol, Halbwertszeit 12,35 Jahre)	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin-BSA- Proteinstandard	Bio-Rad, München, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Casy@ton, (NaCl 0,9%)	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Cholinchlorid	Sigma, Steinheim, Deutschland
D-Glukose (Dextrose)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO-Freeze- Medium)	Bio Veris Corporation, Gaithersburg, USA

Substanz	Hersteller
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 % in PBS, ohne Ca&Mg <sup>18</sup> F- FDG	Neustadt/W., Deutschland Cyklotron, Nuklearmedizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Guanidiniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hemicholin-3	Sigma, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 3M	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
NEAS (Nicht-essentielle Aminosäuren)	Biochrom, AG, Berlin, Deutschland
N-Methyl-D-glucamin (NMDG)	
Ouabain	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Phosphat-buffered saline PBS (Dulbecco [1x] ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10000 U/ml, 10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Medium	
Salzsäure (HCl), 37%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Szintillationscocktail (LUMASAFE PLUS)	Bio-Rad, München, Deutschland LUMAC LSC B.V., Groningen, Niederlande
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethylaminomethan), Trizma®base,	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02% in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gemcitabin	Lilly Pharma GmbH, Bad Homburg Deutschland
Docetaxel	
Cisplatin	Sigma, Steinheim, Deutschland

XTT	TEVA, Radebeul, Deutschland Sigma, Steinheim, Deutschland
-----	--

### 3.1.3 Selbst zubereitete Lösungen und Medien

#### Versuchsmedium

NaCl 140 mM

Glukose 5 mM

KCl 5,4 mM

MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM

TRIS 25 mM

CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1,8 mM

Gelöst in destilliertem Wasser, pH-Wert auf 7,4 eingestellt

Für Versuche in NaCl-freiem Medium wurde NaCl durch NMDG 140 mM ersetzt.

### 3.1.4 Geräte

Absaugpumpe Eppendorf 4151	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Analysewaage, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Beta-Counter Liquid Scintillation, counter 1414	Wallac, Turku, Finnland
Zellkulturschrank Typ 6000	Heraeus, Berlin, Deutschland
Casy-1-Zellzählgerät	Schärfe, Reutlingen, Deutschland
Gamma-Counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac, Turku, Finnland
Laminar Flow HB 2472	Heraeus, Berlin, Deutschland
Mikroskop, Aktiovert 10	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	MD-Kova, Madaus Diagnostika, Köln, Deutschland
pH-Meter, pH 522	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetus <sup>®</sup> -akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

Stickstoffbehälter ARPEGE	Deutsche Air Liquid Anlagebau GmbH, Wiesbaden, Deutschland
UV/VIS Spektrometer Uvikon 931 Plus	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Vortex-Genie	Bender & Hobei AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1,0 R	Heraeus, Berlin, Deutschland

### 3.1.5 Gebrauchsmaterial

96-Wellplatte	Greiner, Solingen, Deutschland
Casy-Probenröhrchen	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Cryo Tubes 1,8 ml	Nunc, Inter Med, Dänemark
Einmalküvetten halbmikro (1,5 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf-Safe-Lock-Reaktionsgefäß -Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kulturgefäße mit Filter (75, 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Solingen, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polyvials Messpipetten (5, 10, 25 ml)	Becton, Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA
Zentrifugenröhrchen	Bodenheim, Deutschland

### 3.1.6 Software

GraphPad Prism 3	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA
Microsoft Office 2003	Microsoft, Deutschland
Softmax Pro 4.8	Softmax Software, Kalifornien, USA



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultivierung

Zellen der Linien EJ28 und RT112 Zellen wurden in Zellkulturgefäßen kultiviert. Als Kulturmedium wurde 25 ml RPMI 1640 verwendet, versetzt mit fetalem Kälberserum FKS 10 % (bzw. 5 %), 1 % NEAS und 1 % P/S um mögliches bakterielles Wachstum zu verhindern. In den mit Zytostatika exponierten Zellen wurde kein P/S hinzugefügt, um mögliche Kreuzreaktionen zu vermeiden. Beide Zelllinien wuchsen adhärent, konfluierend und bildeten eine monozelluläre Schicht in den Gefäßen aus.

Die Zellkulturgefäßen wurden im Zellkulturschrank bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Begasung und 100 % Wasserdampfsättigung kultiviert.

Bei Verfärbung des Mediums wurde ein Mediumwechsel bei den Zellen durchgeführt, wobei das alte Medium vorsichtig mit einer Aspirationspipette abgesaugt und 25 ml neues Kulturmedium zugegeben wurde. Die Zellen wurden jeden dritten bzw. sechsten Tag passagiert. Zunächst wurde das verbrauchte Medium mit einer sterilen Aspirationspipette aus dem Kulturgefäß abgesaugt.

Die adhärennten Zellen wurden mit 10 ml PBS gespült, um eventuell vorhandene tote Zellen und Detritus zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst. Dazu wurden 7 ml dieser Lösung in das Kulturgefäß pipettiert. Anschließend wurde es für 10 min im Zellkulturschrank inkubiert, um die ablösende Wirkung des EDTA zu beschleunigen.

Der Ablöseprozess der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch Zugabe von 15 ml Medium gestoppt. Um Zellklumpen ab- und aufzulösen, wurde die Zellsuspension mehrfach in eine Pipette aufgesogen und wieder abgelassen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Das Pelletieren erfolgte für 3 min bei 1.300 U/min bei 25 °C. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und auf neue Gefäße verteilt. Nach etwa 24 Stunden adhärten ein Großteil der Zellen am Boden des Kulturgefäßes.

Um die Zellen einzufrieren wurde das Zellpellet in DMSO-Einfrier-Medium resuspendiert und auf 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden dann für 12-24 Stunden bei -70 °C eingefroren und anschließend in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt. Zur Langzeitaufbewahrung lagerten die Zellen in flüssigem Stickstoff in 1,8 ml Kryoröhrchen. Sie wurden zum Auftauen ins Wasserbad (37 °C)

gestellt. Nach dem Auftauen wurde der Inhalt in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, in dem 15 ml Kulturmedium vorlagen. Hiernach wurden die Zellen für 3 Minuten mit 1300 U/min bei 25°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein Kulturgefäß mit 25 ml Kulturmedium pipettiert.

### **3.2.2 Vorbereitung der Zellen für die Uptake-Versuche mit FDG und Cholin**

Zu Beginn wurde das Medium aus dem Gefäß mit einer Aspirationspipette abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um tote Zellen oder das Zytostatikum zu entfernen. Bei den Aufnahmeversuchen mit den exponierten Zellen wurde der Waschvorgang mit PBS zweimal wiederholt. Danach erfolgte das Ablösen von Zellen in 7 ml PBS/EDTA und 10 Minuten Inkubation im Zellkulturschrank. Die Zellsuspension wurde mit 15 ml Kulturmedium gemischt, und mit 1300 U/min, 3 Minuten bei 25 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet im Versuchsmedium resuspendiert.

In Vorversuchen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen als optimale Zellzahl für die Durchführung der Versuche bestimmt. Dies wurde mit Hilfe eines Casy-1-Zellzählgeräts bestimmt. Dazu wurden 10 ml Casy<sup>®</sup>ton Lösung und 50 ml Zellsuspension in ein Casy-Probenröhrchen pipettiert. Die Messung erfolgte automatisch durch ein Kapillarsystem. Am Ende ist es möglich, nicht nur die Zellzahl pro Milliliter, sondern auch das Zellvolumen und den Zelldurchmesser zu bestimmen. Die Zellzahlbestimmung wurde für jede Probe durchgeführt. Aus den Parallelmessungen wurde dann ein Mittelwert gebildet.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit Versuchspuffer verdünnt, um die gewünschte Zellzahl im Versuchsgefäß zu erhalten.

### **3.2.3 Durchführung der Uptakeversuche mit Cholin in den Zelllinien EJ 28 und RT112**

Um die Cholin-Aufnahme bei beiden Blasenkarzinomzelllinien funktionell zu charakterisieren, wurden verschiedene Versuchsparameter variiert. Untersucht wurde die Abhängigkeit des Cholin-Uptakes von der Na<sup>+</sup>-Ionenkonzentration, der Zeit und dem pH-Wert. Darüber hinaus wurden die kinetischen Parameter des Cholin-

Uptakes bei verschiedenen CholinKonzentrationen ermittelt. Ferner wurde der Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf den Cholin-Uptake analysiert.

Es wurde Methyl-<sup>3</sup>H-Cholinchlorid für alle Versuche verwendet, welches im Vergleich zu <sup>11</sup>C-Cholin eine längere Halbwertszeit besitzt (12,32 Jahre für Methyl-<sup>3</sup>H-Cholinchlorid bzw. 20 Minuten für <sup>11</sup>C-Cholin. Das Methyl-<sup>3</sup>H-Cholinchlorid (spezifische Aktivität = 3,03 TBq/mmol) in 96 % Ethanol wurde bei -20°C aufbewahrt. Für die Versuche wurde es mit Versuchsmedium verdünnt. Bei allen Versuchen wurden gleiche Mengen an Aktivität eingesetzt, diese betrug 0.05 µCi (1850 Bq). Durch die Verdünnung mit Versuchsmedium wurde sichergestellt, dass das Ethanol keine schädliche Wirkung auf die Zellen ausübt. Alle Versuchslösungen wurden bis zu ihrer Verwendung bei 37 °C im Zellkulturschrank aufbewahrt, um möglichst physiologische Bedingungen für die Experimente zu erreichen. Der Cholin-Uptake wurde in allen Versuchen durch Zugabe von 1.000 µl eiskaltem PBS gestoppt. Mit Ausnahme der Zeitabhängigkeitsversuche (siehe unten) wurde der Cholin-Uptake nach 10 Minuten gestoppt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da sich nach 10 Minuten der Uptake mit Sicherheit noch linear zeigte. Durch die exakte Messung nach 10 Minuten lassen sich die Daten miteinander vergleichen. Mit Ausnahme der Versuche zur pH- und Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit wurden alle Versuche in Versuchsmedien mit Na<sup>+</sup>-Ionen und bei einem pH 7,4 durchgeführt.

### **3.2.3.1 Untersuchung des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Zeit**

Für diese Versuchsreihe wurden zwei isomolare Versuchsmedien verwendet, diese waren Na<sup>+</sup>-haltiges (140 mM) und Na<sup>+</sup>-freies Versuchsmedium. Somit kann gleichzeitig der Uptake in Abhängigkeit von der Zeit sowie die Abhängigkeit des Uptakes von Natrium bestimmt werden. Das natriumfreie Medium enthielt als Na<sup>+</sup>-Ersatz MMDG 140 mM. Der Cholin-Uptake wurde in beiden Versuchsmedien nach 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 240 Minuten gemessen.

Die Eppendorf-Cups, die mit 0,05 µCi Methyl-<sup>3</sup>H-Cholinchlorid in 100 µl Versuchsmedium (siehe oben) befüllt worden waren, wurden im Zellkulturschrank temperiert und mit 100 µl Zellsuspension EJ28 bzw. RT112 (2x10<sup>5</sup> Zellen) vermischt. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1000 µl eiskaltem PBS beendet. Anschließend wurden die Proben für einige Minuten ins Eis gestellt und für die Messung vorbereitet.

### **3.2.3.2 Untersuchung des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit vom pH-Wert**

Der extrazelluläre pH-Wert kann die Cholin-Aufnahme beeinflussen. Um diesen Einfluss bei beiden Blasenkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten hergestellt. Für die Herstellung saurer Versuchslösungen wurde das Versuchsmedium mit 37 % HCl-Lösung titriert, für die Herstellung basischer Versuchslösungen wurde 3M NaOH verwendet. Die Abhängigkeit des Cholin-Uptakes vom pH-Wert wurde für folgende pH-Werte untersucht: 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5.

Zu den im Zellkulturschrank temperierten 100 µl Versuchslösungen (mit verschiedenen pH-Werten) mit 0,05 µCi Methyl-<sup>3</sup>H-Cholinchlorid, wurden die in 100 µl der jeweiligen pH-Lösung resuspendierten Zellen hinzugefügt und für 10 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. In jedem Gefäß sind  $2 \times 10^5$  Zellen enthalten. Nach 10 Minuten Inkubation wurde der Uptake mit 1.000 µl eiskaltem PBS gestoppt. Anschließend erfolgte die Vorbereitung zur Messung im Beta-Counter.

### **3.2.3.3 Modulation des Cholin-Uptakes in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitoren**

Cholin ist ein organisches Kation, dessen Transport durch die Zytoplasmamembran mittels eines spezifischen Cholintransporters und/oder Kationen-spezifischer Transporter erfolgen kann. Um die Aufnahme von Cholin in die Blasenkarzinomzelllinien zu charakterisieren, wurde der Cholin-Uptake unter Anwesenheit verschiedener Transporter-spezifischer Hemmsubstanzen analysiert. Folgende Stoffe wurden ausgewählt:

- Tetraethylammonium (TEA): Dies ist ein organisches Kation mit hoher Affinität für die Transporter der OCT (Organic cation transporters)-Familie. Die Versuche mit TEA sollen Aufschluss darüber geben, ob OCT-Transporter bei den untersuchten Zellen vorhanden sind.
- Hemicholin-3: Dabei handelt es sich um ein Strukturanalogon des Cholins. Es wirkt als kompetitiver Inhibitor des Cholin-Uptakes durch CHT1 (choline transporter-1).
- Guanidin: Dieser Hemmstoff wurde aufgrund seiner Hemmwirkung auf Cholintransportsysteme in einer Größenordnung zwischen den anderen Inhibitoren gewählt.

- Nicht radioaktiv markiertes Cholin: Es stellt einen Konkurrenten des [Methyl-<sup>3</sup>H]-Cholins an der Bindungsstelle des Cholintransporters dar.
- Ouabain (Strophanthin): Dieser Hemmstoff inhibiert die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Es ist bekannt, dass die für den Cholin-Uptake durch den CHT1 notwendige Energie durch den Na<sup>+</sup>-Gradienten über der Zellmembran geliefert wird. Dieser Gradient wird durch Ouabain verringert.

Literaturdaten belegen, dass bei einer Hemmstoffkonzentration von 1 mM eine potente Hemmung der jeweiligen Transporter erzielt werden kann (Müller et al. 2009). Die eingesetzte Hemmstoffkonzentration liegt damit um mehrere Größenordnungen über der des radioaktiv markierten Liganden (0,05 µCi Methyl-<sup>3</sup>H-Cholin entspricht 0,0006 nmol/200 µl = 3nM Methyl-<sup>3</sup>H-Cholin).

Die Stammlösungen enthielten den jeweiligen Hemmstoff in einer Konzentration von 2 mM. Durch den Einsatz von 100 µl der Stammlösung bei einem Endvolumen von 200 µl wurde eine Versuchskonzentration von 1 mM erzielt.

Für die Versuche wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 4x10<sup>6</sup>/ml in das Versuchsmedium aufgenommen (siehe 3.2.2.1). Jeweils 50 µl Zellsuspension (entspricht 2x10<sup>5</sup> Zellen), wurden in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 100 µl der in der Stammlösung enthaltenen Hemmsubstanzen vermischt. Danach erfolgte die Inkubation für 10 Minuten im Zellkulturschrank. Anschließend wurde 50 µl Versuchsmedium pro Eppendorfgefäß mit 0,05 µCi Methyl-<sup>3</sup>H-Cholin hinzugefügt. Nach weiteren 10 Minuten wurde der Cholin-Uptake mit 1.000 µl eiskaltem PBS gestoppt. Hiernach erfolgte die Vorbereitung zur Messung im Beta-Counter.

### **3.2.4 Bestimmung der Kinetik des Cholin-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112**

Zur Ermittlung der Kinetik der Cholinaufnahme wurden Verdünnungsreihen mit kaltem Cholin angelegt. Alle Versuchsansätze enthielten zusätzlich 0,05 µCi Methyl-<sup>3</sup>H-Cholin. Die Konzentrationsänderung durch die Zugabe des radioaktiv-markierten Cholins wurde bei der Berechnung vernachlässigt. In das Versuchsmedium wurden 100 µl Zellsuspension mit 2x10<sup>5</sup> Zellen mit unterschiedlichen Cholin-Konzentrationen hinzugegeben. Die Cholin-Aufnahme wurde 10 Minuten später durch eiskaltes PBS gestoppt. Nach drei Waschschritten mit eiskaltem PBS und vollständiger Entfernung des Überstands wurden die Proben auf die Messung im Beta-Counter vorbereitet.

Verschiedene Zellen besitzen verschiedene Zellgrößen mit einem unterschiedlichen Proteingehalt. Daher wurde der Cholin-Uptake pro mg Zellprotein bestimmt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford ist die Messung der Extinktion der Proben bei einer bestimmten Wellenlänge mittels eines Photometers, welche über einen gewissen Konzentrationsbereich linear von der Proteinkonzentration abhängt. Bei jedem Versuch (außer bei der Wirkung von verschiedenen Hemmsubstanzen), wurden parallel zu den Versuchsansätzen Kontrollansätze ohne Methyl-<sup>3</sup>H-Cholin durchgeführt. Alle Proben, sowohl mit als auch ohne Aktivität wurden bei gleichen Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Lyse der Zellen die nicht mit Methyl-<sup>3</sup>H-Cholin exponiert wurden in 200 µl NaOH Lösung. Nach einer Einwirkdauer von einer Stunde und der sorgfältigen Durchmischung auf einem Gefäßmischer (VORTEX) war von einer kompletten Auflösung des Zellpellets auszugehen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Standard-Protein-Messreihe erstellt (siehe Tab. 3). Als Standardprotein wurde Bovines Serum Albumin (BSA) gewählt. Nach gutem Durchmischen und einer Inkubationszeit von 5 bis 60 Minuten erfolgte die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595 \text{ nm}$ . Die Auftragung der gemessenen Werte gegen die BSA-Konzentration ergibt eine lineare Beziehung. Durch den Vergleich der Messergebnisse der Proben mit dieser Eichgerade ist eine Proteinbestimmung in den Proben möglich.

	Referenz	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
BSA (µg)	0	1	2	4	8	12
BSA Standard	0	5	10	20	40	60
PBS (µl)	700	700	700	700	700	700
H <sub>2</sub> O:PBS=1:10	100	95	90	80	70	60
Bio-Rad (µl)	200	200	200	200	200	200

Tab.3: Standard-Protein-Messreihe zur Zellprotein-Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Für die Proteinbestimmung der Proben wurden 20 µl des Zell-Lysates (siehe oben) entnommen und mit 700 µl PBS, 80 µl H<sub>2</sub>O : PBS = 9:1 und 200 µl Farbstoff versehen. Auch hier erfolgte nach einer Inkubationszeit von 5 bis 60 Minuten die Messung.

### **3.2.5 Bestimmung des <sup>18</sup>F-FDG-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112**

Für diesen Versuch wurden die Zellen nach Ablösung auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$  eingestellt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten im Zellkulturschrank wurden  $100 \mu\text{l}$  Zellsuspension mit  $100 \mu\text{l}$  Versuchsmedium, das  $4 \mu\text{Ci } ^{18}\text{F-FDG}$  enthielt in einem Eppendorfgefäß gemischt.

Die Inkubation wurde nach 20, 30, 60, 90, 180 oder 240 Minuten durch Zugabe von  $1000 \mu\text{l}$  eiskaltem PBS gestoppt. Bis zur Zentrifugation ( $4300 \text{ rpm}/5 \text{ min}/4^\circ\text{C}$ ) wurden die Proben auf Eis aufbewahrt. Nach drei Waschschrritten mit eiskaltem PBS wurde der letzte Überstand komplett abgesaugt und die Proben direkt im  $\gamma$ -Counter gemessen. Die Messung im  $\gamma$ -Counter erforderte keine Vorbereitung der Probe. Die gemessenen CPM (Counts per minute) Werte wurden in Bezug auf die Proteinbestimmung ausgewertet.

### **3.2.6 Erstellung von Dose-Response Kurven der Chemotherapeutika in Zelllinien EJ28 und RT112**

Gemcitabin, Docetaxel, Cisplatin sind Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, die in verschiedenen Chemotherapie-Schemata Anwendung beim fortgeschrittenen Urothelkarzinom finden. Um den Einfluss dieser Substanzen auf den Cholin-Uptake zu analysieren, wurden zunächst die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>-Werte) der Substanzen für die Zellen der Linien RT112 und EJ28 bestimmt. Bei dem IC<sub>50</sub> Wert handelt es sich um die Konzentration eines Chemotherapeutikums, bei der 50 % der Zellen überleben. Zunächst wurden die Zellen nach dem Ablösen und Zentrifugieren gezählt und in einer Dichte von 1000 Zellen pro Vertiefung in eine 96-Well Platte gegeben. In Vorversuchen des urologischen Forschungslabors des Klinikums rechts der Isar konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen bei dieser Ausgangszellzahl auch nach sechs Tagen in Kultur noch in der Proliferationsphase befanden. Die FKS-Konzentration im RPMI Medium wurde bei diesen Versuchen auf 5 % reduziert, um das Wachstum der Zellen zu verlangsamen. Nach 24 Stunden Inkubation im Zellkulturschrank wurden die verschiedenen Chemotherapeutika in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Die Chemotherapeutika wurden in Gefäße bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt und für jeden Versuch frisch aufgetaut und mit Medium gemischt.

### **3.2.7 Modulation des Cholin-Uptakes nach Exposition der Tumorzellen mit Chemotherapeutika**

Die Zugabe der Chemotherapeutika erfolgte unter sterilen Bedingungen im Dunkeln. Die 96-Well Platten wurden für weitere fünf Tage im Zellkulturschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ein XTT (sodium 3'-[1-phenyl-aminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulphonic acid) Proliferationstest durchgeführt, um den Anteil der überlebenden Zellen zu bestimmen. Dieser Zytotoxizitätstest misst die intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität in Zellen, die mit XTT inkubiert werden. In lebenden Zellen wird durch die aktiven intramitochondrialen Dehydrogenasen das Tetrazolium-Salz XTT in ein orangefarbenes lösliches Formazan umgewandelt. Nach einer vierstündigen Inkubation im Zellkulturschrank erfolgte die Messung im ELISA-Reader. Mittels einer speziellen Software wurde die Abhängigkeit des Anteils der überlebenden Zellen von der Konzentration des eingesetzten Zytostatikums in Kurvenform dargestellt und der IC50-Wert berechnet.

Voraussetzung für die Durchführung der Versuche ist eine hohe Zahl an lebenden Zellen (mindestens 80 %). Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 100 µl Trypanblau-Lösung mit 100 µl Zellsuspension vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Volumen von 10 µl des Gemisches wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet. Bei toten Zellen kann der Farbstoff in die Zellen einströmen, lebende Zellen dagegen nehmen keinen Farbstoff auf.

Die Zelllinien wurden in zwei verschiedenen Ansätzen mit den Zytostatika inkubiert und die ausgewählte Zytostatika-Konzentration entsprach in einem Ansatz den IC-50 Werten. In einem Ansatz wurden die Tumorzellen einmalig in drei Konzentrationsstufen der Chemotherapeutika (0,5; 1xIC-50; 10xIC-50) über 24 Stunden exponiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Tumorzelllinien mit IC-50 Konzentration exponiert um den Uptake nach 2, 3, 7, 8 und 12 Tagen zu untersuchen. Dadurch sollten sowohl frühe, als auch späte Effekte der Testsubstanzen auf die Cholin-Aufnahme detektiert werden.

Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. In weiteren Schritten wurden die Zellen in neue Kulturgefäße überführt und im Zellkulturschrank inkubiert. Der Cholin-Uptake wurde nach 120 Stunden gemessen. Weiterhin wurde der Cholin-Uptake bei Kontrollzellen ohne Exposition mit Chemotherapeutika nach 24, 48 und 120 Stunden gemessen.



Nach Spülen mit eiskaltem PBS wurde der Überstand vorsichtig, möglichst vollständig, abgenommen. Danach wurden die Zellen mit 500 µl SDS-Lösung (2 %) für einige Stunden lysiert. Die Lysate wurden anschließend aus den Eppendorf-Cups in Szintillationsröhrchen pipettiert. Die verbleibenden Rückstände wurden mit 500 µl PBS gewaschen und den entsprechenden Röhrchen zugefügt. Nach Zugabe von 2 ml des Szintillationscocktails erfolgte die Messung im Beta-Counter.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung des $^{18}\text{F}$ -FDG-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112

In Tabelle 4 ist der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Uptake beider Zelllinien zusammengefasst und in Abb. 2 grafisch dargestellt. Der maximale Uptake betrug nach 240 Minuten in der Zelllinie RT112 17,85 fmol/mg Zellprotein, während dieser in der Linie EJ28 zu diesem Zeitpunkt nur bei 4,67 fmol/mg Zellprotein lag. Somit war der maximal gemessene Uptake in der Linie RT112 zu diesem Zeitpunkt um den Faktor 3,8 höher als in der Linie EJ28. In der Zelllinie RT112 stellte sich der Kurvenverlauf des Uptakes bis 240 Min. linear dar, während in der Linie EJ28 sich nach 90 Minuten keine weitere Zunahme des Uptakes fand (Erreichen der Plateauphase).

Zeit (Min)	EJ28		RT112	
	MW	95% KI	MW	95% KI
5	0,64	0,60-0,69	2,20	2,14-2,26
10	1,13	1,10-1,15	3,96	3,93-4,00
20	2,17	2,11-2,24	6,93	6,53-7,32
30	2,65	2,46-2,83	8,12	7,59-8,65
60	3,65	3,45-3,86	11,64	9,91-13,38
90	4,28	3,95-4,6	13,89	11,54-16,23
120	4,59	4,53-4,65	14,08	13,44-14,72
240	4,67	4,64-4,70	17,85	15,81-19,89

Tab. 4:  $^{18}\text{F}$ -FDG-Uptake (fmol/mg Zellprotein) in den Blasenkarzinomzelllinien EJ28 und RT112 in Abhängigkeit von der Zeit. (MW: Mittelwert; KI:Konfidenzintervall)

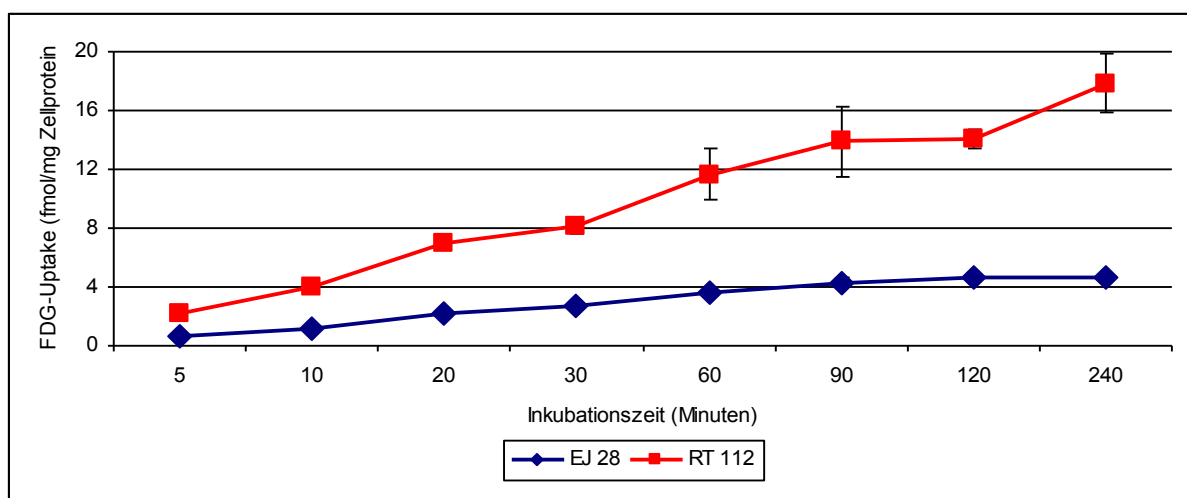


Abb.2:  $^{18}\text{F}$ -FDG-Uptake in den Blasenkarzinomzelllinien EJ28 und RT112 in Abhängigkeit von der Zeit

## 4.2 Untersuchung des $^3\text{H}$ -Cholin-Uptakes in den Zelllinien EJ28 und RT112

### 4.2.1 $^3\text{H}$ -Cholin-Uptake in Abhängigkeit von der Zeit und dem Einfluss von Natrium-Ionen

In Tabelle 5 ist der Cholin-Uptake beider Zelllinien in Abhängigkeit von der Zeit und dem Einfluss von  $\text{Na}^+$ -Ionen zusammengefasst und in den Abbildungen 3 und 4 grafisch dargestellt. In den Zellen der Linie EJ28 fand sich ein stetiger Anstieg des Uptakes, während in den Zellen der Linie RT112 ab einer Expositionszeit von 120 Minuten kein weiterer signifikanter Anstieg des Uptakes beobachtet wurde (Erreichen der Plateauphase). Der maximale Uptake nach 240 Minuten war in  $\text{Na}^+$ -haltigem Medium in der Linie RT112 signifikant höher als in der Linie EJ28. Der Cholin-Uptake (pmol/mg Zellprotein) war in beiden Zelllinien signifikant höher als der FDG-Uptake (fmol/mg Zellprotein). In Abhängigkeit von der Expositionszeit war der Cholin-Uptake in beiden Zelllinien in  $\text{Na}^+$ -haltigem Medium etwas höher als in  $\text{Na}^+$ -freiem Medium.

Zeit (Min.)	EJ 28				RT 112			
	mit Na		ohne Na		mit Na		ohne Na	
	MW	95%-KI	MW	95%-KI	MW	95%-KI	MW	95%-KI
1	0,06	0,05-0,07	0,08	0,07-0,09	0,11	0,09-0,12	0,10	0,09-0,11
3	0,10	0,09-0,11	0,11	0,09-1,12	0,20	0,17-0,22	0,17	0,15-0,20
5	0,13	0,13-0,15	0,13	0,11-0,14	0,29	0,26-0,33	0,25	0,22-0,27
10	0,22	0,20-0,25	0,19	0,18-0,20	0,55	0,50-0,60	0,42	0,39-0,45
15	0,29	0,26-0,35	0,26	0,24-0,29	0,73	0,68-0,78	0,60	0,56-0,65
20	0,5	0,4-0,6	0,4	0,39-0,43	1,2	1,0-1,5	0,8	0,7-1,0
30	0,7	0,6-0,8	0,6	0,55-0,64	1,7	1,5-1,9	1,2	1,0-1,4
60	1,3	1,2-1,5	1,2	1,2-1,3	2,7	2,-2,9	2,0	1,9-2,1
90	1,8	1,6-2,0	1,6	1,5-1,6	3,3	3,1-3,6	2,8	2,6-2,9
120	2,1	1,9-2,5	1,9	1,8-2,0	4,1	3,7-4,6	3,4	3,2-3,7
180	2,7	2,3-3,0	2,2	2,1-2,4	4,9	4,6-5,2	4,2	4,0-4,4
240	3,7	3,4-4,0	2,9	2,5-3,2	5,4	5,2-5,6	5,2	5,0-5,4

Tab. 5:  $^3\text{H}$ -Cholin-Uptake (pmol/mg Zellprotein) in Abhängigkeit von der Zeit und Einfluß von  $\text{Na}^+$ -Ionen (MW: Mittelwert;KI: Konfidenzintervall)

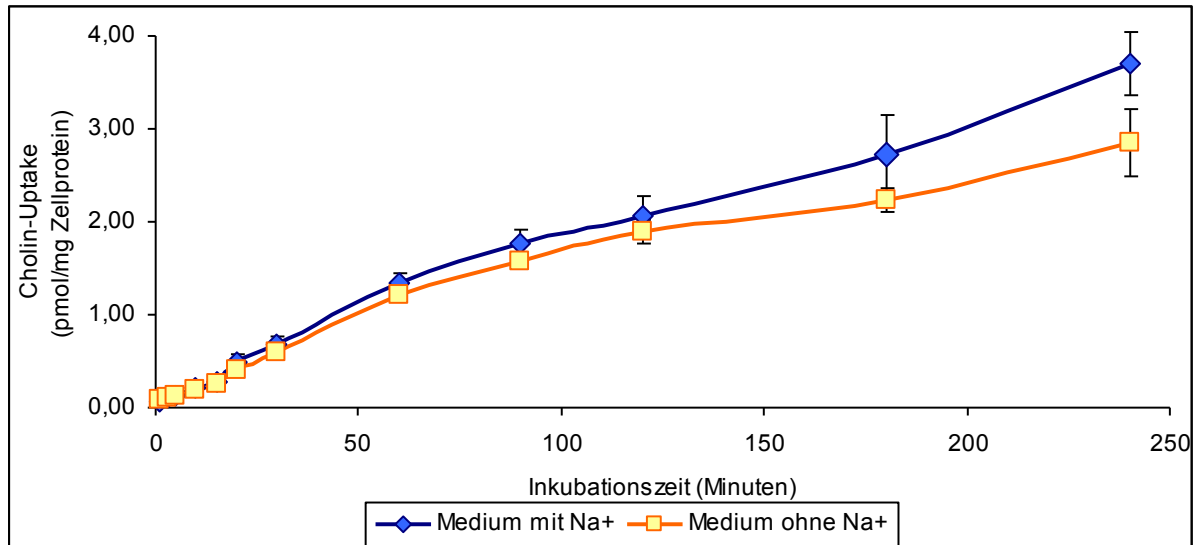


Abb. 3: <sup>3</sup>H-Cholin-Uptake in der Linie EJ28 in Abhängigkeit von der Zeit und dem Einfluss von Na<sup>+</sup>-Ionen

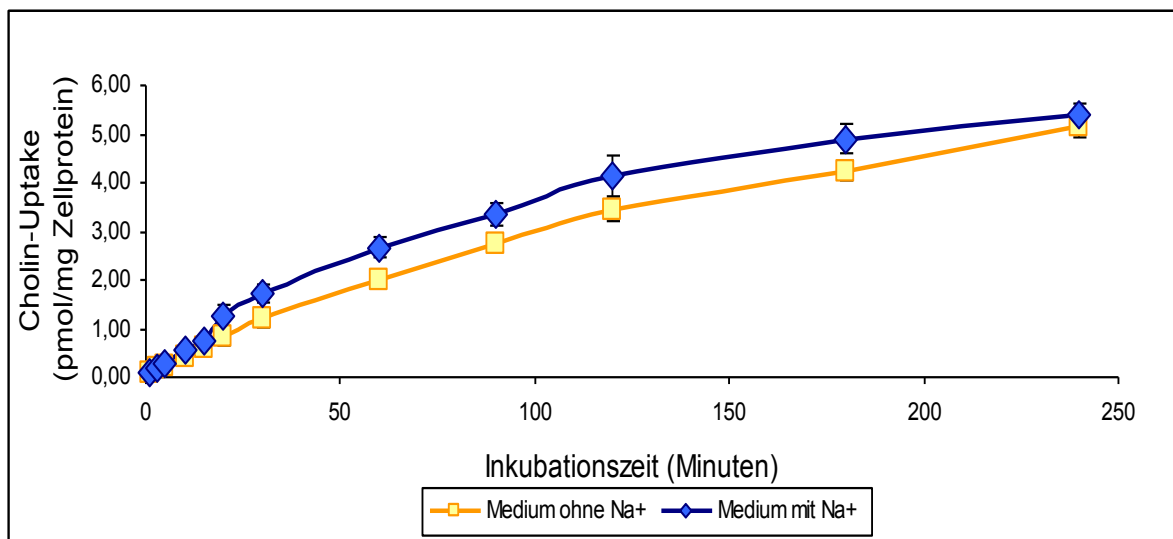


Abb.4: <sup>3</sup>H-Cholin-Uptake in der Linie RT112 in Abhängigkeit von der Zeit und dem Einfluss von Na<sup>+</sup>-Ionen

#### 4.2.2 Cholin-Uptake in Abhängigkeit vom pH Wert

Die Ergebnisse zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Cholinaufnahme sind in der Tabelle 6 zusammengefasst und in Abb. 5 grafisch dargestellt. Dabei zeigte sich, dass in beiden Zelllinien der Cholin-Uptake mit steigendem pH-Wert zunahm. Ab einem pH-Wert von 8,5 wurde der maximale Uptake erreicht, welcher sich bei pH 9,5 nicht signifikant veränderte.

pH	EJ28		RT 112	
	MW	95%-KI	MW	95 %-KI
5,5	0,099	0,093-0,104	0,153	0,144-0,162
6,5	0,143	0,137-0,148	0,248	0,235-0,62
7,5	0,208	0,192-0,225	0,266	0,246-0,286
8,5	0,346	0,320-0,371	0,405	0,381-0,429
9,5	0,340	0,320-0,361	0,404	0,384-0,424

Tab. 6: <sup>3</sup>H-Cholin-Uptake in den Zelllinien EJ28 und RT112 in Abhängigkeit vom pH  
(MW: Mittelwert; KI: Konfidenzintervall)

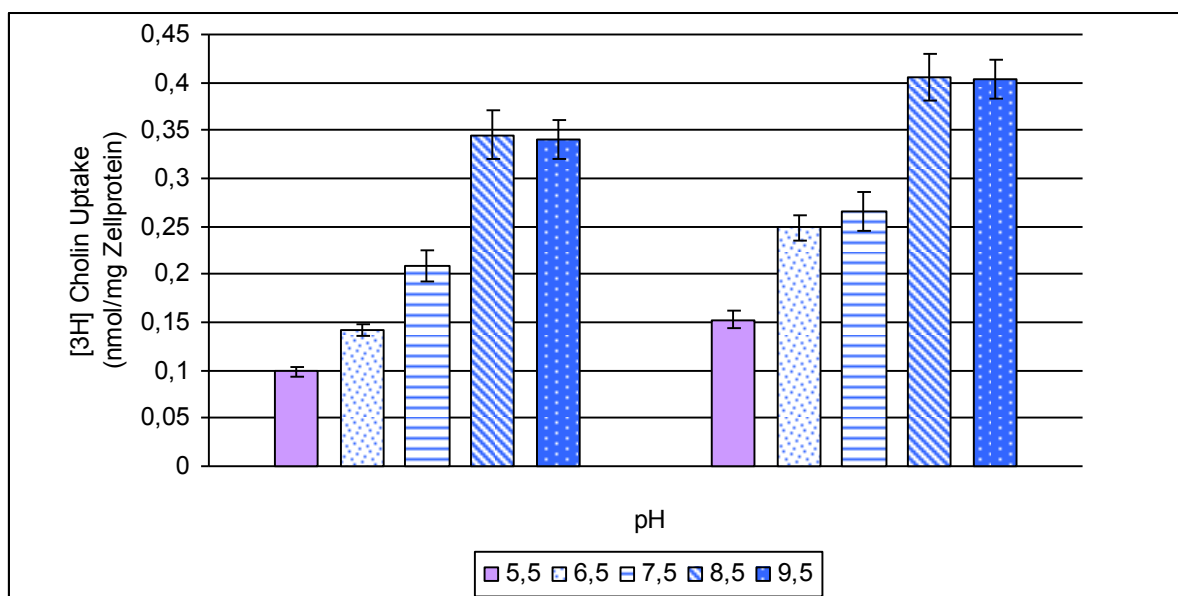


Abb. 5: <sup>3</sup>H-Cholin-Uptake in den Zelllinien EJ28 und RT112 in Abhängigkeit vom pH

#### 4.2.3 Untersuchung der Kinetik des Cholin-Transportes

Zur weiteren Charakterisierung des Cholin-Uptakes in den beiden Zelllinien erfolgte die Erstellung von den jeweiligen Michaelis-Menten Kinetiken. Dazu erfolgte die Exposition der Zellen mit steigender Konzentration des nicht-radioaktiv markierten Cholins mit einer definierten Menge an radioaktiv markiertem Cholin.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst und in den Abbildungen 6 und 7 grafisch dargestellt.

Cholin ( $\mu\text{M}$ )	Geschwindigkeit des $^3\text{H}$ -Cholin-Uptakes (pmol/ mg Zellprotein x 10 Min.)			
	EJ28		RT112	
	MW	95%-KI	MW	95%-KI
1	0,06	0,05-0,07	0,15	0,14-0,17
5	0,28	0,2-0,34	0,44	0,41-0,48
10	0,34	0,33-0,35	0,61	0,55-0,67
20	0,46	0,44-0,49	0,72	0,61-0,84
50	0,71	0,67-0,75	1,02	0,90-1,37
100	0,84	0,77-0,91	1,16	0,96-1,37
200	1,08	0,92-1,24	1,31	1,03-1,59
500	1,53	1,44-1,62	1,11	0,91-1,31

Tab. 7: Geschwindigkeit des  $^3\text{H}$ -Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Cholinkonzentration (MW: Mittelwert; KI: Konfidenzintervall)

Zur Ermittlung der Michaelis-Konstante  $K_M$  wurde die Cholinkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) bestimmt, bei der die halbmaximale Uptake-Geschwindigkeit ( $v_{\text{max}}/2$ ) vorlag. Die Ergebnisse sind in der Tab. 8 zusammengefasst.

Zelllinie	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$v_{\text{max}}$
RT112	11,09	1,264
EJ28	51,47	1,487

Tab. 8: Vergleich von  $K_M$  und  $v_{\text{max}}$  für den Cholin-Uptake in den Blasenkarzinomzelllinien EJ28 und RT112

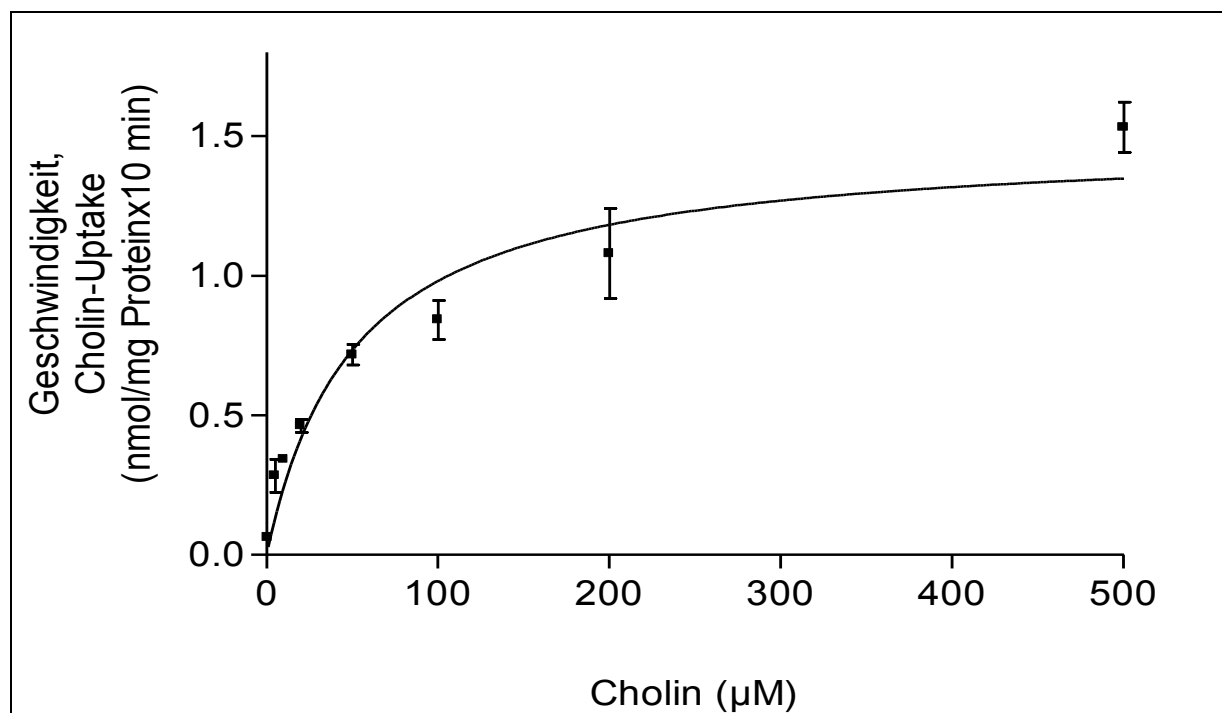


Abb. 6: Michaelis-Menten Kinetik für den Cholin-Uptake in EJ28 Zellen

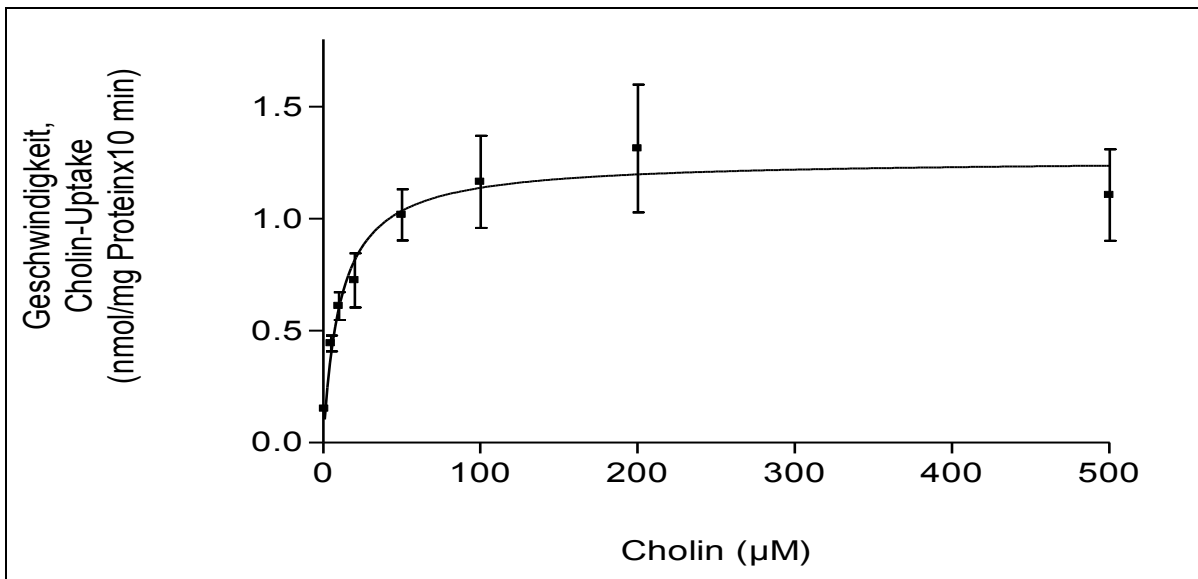


Abb. 7: Michaelis-Menten Kinetik für den Cholin-Uptake in RT112 Zellen

Der Cholin-Uptake ist zellinspezifisch unterschiedlich. Trotz geringerem Malignitätsgrad der Zellen der Linie RT112 ist der KM-Wert deutlich geringer (11,09 µM) als bei der Zellen der Linie EJ28 (51,5 µM). Dies bedeutet, dass die Zellen in RT112 eine wesentlich niedrigere Cholinkonzentration benötigen, um die halbmaximale Uptakegeschwindigkeit zu erreichen. In Zellen der Linie EJ28 ist die maximale Uptake-Geschwindigkeit mit 1,5 nmol/mg Protein nur gering höher als in Zellen der RT112 (1,3 nmol/mg Protein). Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

#### 4.2.4 Cholin-Uptake in Abhängigkeit von verschiedenen Inhibitoren

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Inhibition des Cholin-Uptakes sind in Tabelle 9 zusammengefasst und in Abb. 8 grafisch dargestellt.

Wie erwartet, zeigte sich kaltes Cholin als stärkster Hemmstoff. Durch die Zugabe von kaltem Cholin konnte die Aufnahme des radioaktiv markierten Cholins in beiden Zelllinien um etwa 80 % verringert werden. Als ähnlich potent erwies sich Hemicholin-3, welcher die Cholin-Aufnahme auf etwa 23-25 % senkte. Die anderen Hemmstoffe konnten die Cholin-Aufnahme weniger stark inhibieren.

	EJ 28		RT112	
	MW%	95%-KI	MW%	95%-KI
<b>Kontrolle (%)</b>	100	99,8-100,2	100	99,6-100,4
<b>Ouabain</b>	80,2	74,53-85,86	85,5	82,07-82,90
<b>TEA</b>	80,4	76,3-84,57	83,9	80,72-87,08
<b>Guanidin</b>	70,8	66,30-75,26	52,2	48,72-55,69
<b>Hemicholin-3</b>	24,7	18,70-30,76	23,0	20,30-25,73
<b>Cholin</b>	21,2	17,27-25,11	16,6	14,93-18,36

Tab. 9: Wirkung von verschiedenen Inhibitoren auf den Cholin-Uptake in Zellen der Linien EJ28 und RT112(MW-Mittelwert, KI= Konfidenzintervall)

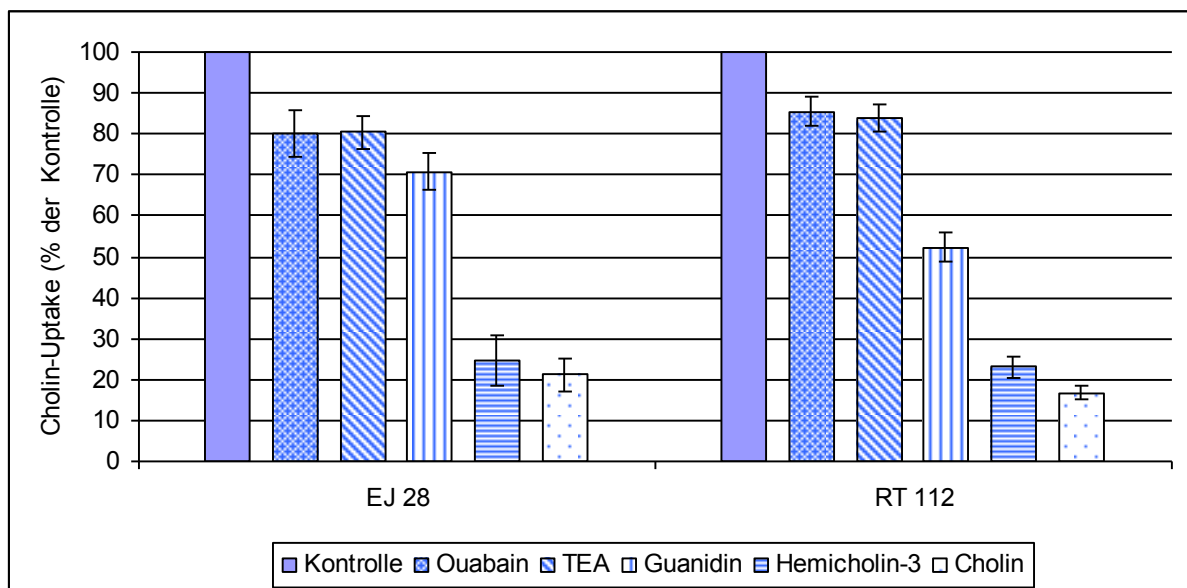


Abb.8: Wirkung der verschiedenen Inhibitoren auf den Cholin-Uptake in Zellen der Linien EJ28 und RT112

Die Inhibitoren Ouabain und TEA waren in beiden Zelllinien ähnlich und nur gering aktiv (Inhibition des Uptakes um 16-20 %). Der Inhibitor Guanidin zeigte eine zelllinien-spezifisch unterschiedliche Inhibition des Uptakes. In RT112 lag der Uptake nur noch bei 52 % während dieser in EJ28 71% betrug.

### 4.3 Modulation des Cholin-Uptakes durch Zytostatika

#### 4.3.1 Bestimmung der IC50-Werte nach Exposition mit Chemotherapeutika

Zur Bestimmung der IC50-Werte für die Chemotherapeutika wurden Dose-Response



Kurven erstellt. Die Ergebnisse dazu sind in den Tabellen 10-15 zusammengefasst und in den Abbildungen 9-14 grafisch dargestellt. Die Abbildungen 15-18 zeigen Zellen beider Zelllinien ohne und mit Exposition von Chemotherapeutika.

Gemcitabin (nM)	0	0,004	0,04	0,4	1	2	2,4	2,6	3	4	8
Überleben (%)	100	98,9	91,9	89,6	68,1	57,9	37	7,7	4,3	3,2	1,4
95% - KI	91,2-108,8	90,7-107,1	84,5-99,3	83,3-95,9	62,8-73,4	48,3-67,5	9,5-44,5	4,7-10,7	2,5-6,1	2,3-4,1	1-1,8

Tab. 10: Dose-Response Werten der Zelllinie EJ28 nach Exposition mit Gemcitabin

Gemcitabin (nM)	0	0,0004	0,004	0,04	0,4	2	4	12	20	40	80
Überleben (%)	100	96,2	94,5	94,6	94,8	91,1	79	24,5	4,6	3,5	2,9
95%-KI	91-109	87,6-104,8	86,7-10,3	86-103,2	86,5-103,1	84,4-97,8	66,2-91,8	13,1-35,9	0-9,2	1,3-5,7	1,3-4,5

Tab. 11: Dose-Response Werten der Zelllinie RT112 nach Exposition mit Gemcitabin

Docetaxel (nM)	0	0,001	0,01	0,1	0,5	0,7	0,8	0,9	1	2	5
Überleben (%)	100	101,7	98,5	96,9	96,8	80,8	77,1	73	67	22,4	5,4
95%-KI	94,7-105,3	96,3-107,1	91,9-105,1	91,3-102,5	90,7-102,9	73,9-87,7	71,4-82,8	66,8-79,2	61,7-72,3	17,7-27,1	4,6-6,2

Tab. 12: Dose-Response Werte in der Zelllinie EJ28 nach Exposition mit Docetaxel

Docetaxel (nM)	0	0,01	0,05	0,1	0,25	0,5	0,6	0,8	1	2	10
Überleben (%)	100	99,7	100	98,8	97,8	85,8	75,7	49,5	35,5	12,8	2,6
95%-KI	96,5-103,5	96,7-102,7	96-104	95,2-10,4	94-101,6	80,4-91,2	69,5-81,9	44,3-54,7	33,5-37,5	11,8-13,8	2,1-3,1

Tab.13: Dose-Response Werte in der Zelllinie RT112 nach Exposition mit Docetaxel

Cisplatin (µM)	0	0,01	0,1	1	5	10	20	30	40	50	100
Überleben (%)	100	106,6	102,8	104,1	64,7	32,2	8,9	5,8	4,2	3,9	2,9
95%-KI	91,2-108,8	98-115,2	93,8-111,8	95,8-112,4	57,2-72,2	28,3-36,1	7,5-10,3	5,2-6,4	3,8-4,6	3,4-4,4	2,6-3,2

Tab.14: Dose-Response Werte in der Zelllinie EJ28 nach Exposition mit Cisplatin

Cisplatin (µM)	0	0,001	0,01	0,1	0,5	1	2	3	4	10	100
Überleben (%)	100	100,3	101	96,3	86,8	77	61,8	49,9	41,9	24,9	1,6
95%-KI	94,4-105,6	96,3-104,3	96,1-105,9	89,7-10,9	79,9-93,7	71,9-82,1	56,6-67	46,1-5,7	37,9-45,9	23,2-26,6	1,3-1,9

Tab.15: Dose-Response Werte in der Zelllinie RT112 nach Exposition mit Cisplatin

In der Tabelle 16 sind die berechneten IC50-Werte für beide Zelllinien zusammengefasst.

	EJ28		RT112	
	IC50	95%-KI	IC50	95%-KI
Gemcitabin (nM)	2,3	2,1-2,5	5,5	4,7-6,3
Cisplatin (µM)	6,8	6,1-7,5	3,1	2,5-3,7
Docetaxel (µM)	1,3	1,2-1,4	0,8	0,7-0,9

Tab. 16: IC50-Werte der Chemotherapeutika in den Zelllinien EJ28 und RT112

(KI: Konfidenzintervall)

Die Zelllinien zeigen gegenüber den Chemotherapeutika unterschiedliche Sensibilitäten bezüglich des Ansprechens.

Die höher differenzierte Linie RT112 weist unter Applikation von Gemcitabin eine signifikant niedrigere Sensitivität auf als Zellen der Linie EJ28 (IC50 5,5 µM versus 2,3 µM). Umgekehrt weist die selbe Linie (RT112) unter den Chemotherapeutika Cisplatin und Docetaxel eine signifikant höhere Sensitivität auf als Zellen der Linie EJ28 (IC50 für Cisplatin 3,1 µM versus 6,8 µM; IC50 für Docetaxel 0,8 µM versus 1,3 µM).

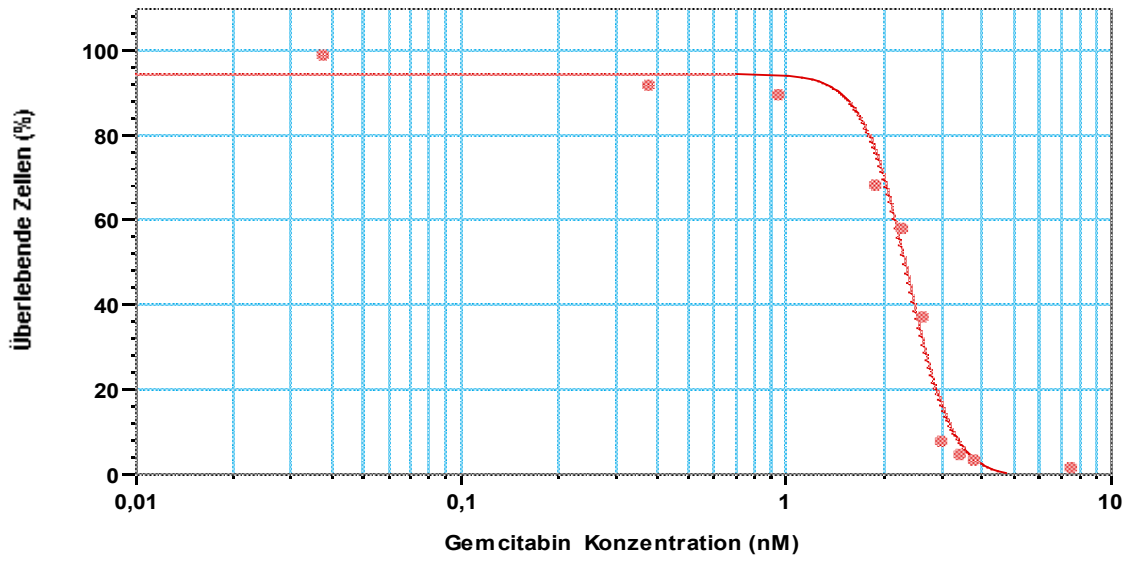


Abb.9: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie EJ28 mit Gemcitabin

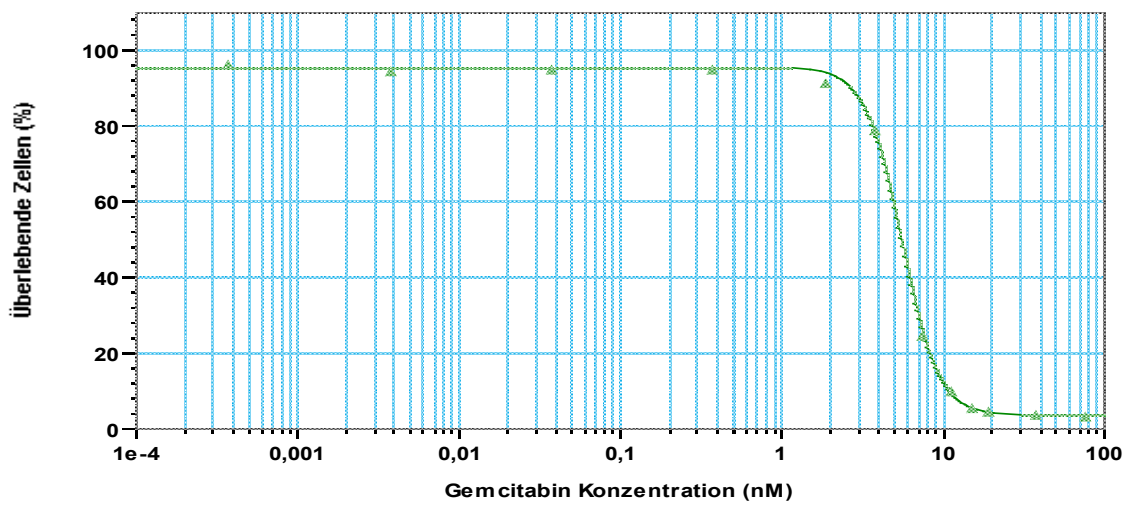


Abb.10: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie RT112 mit Gemcitabin

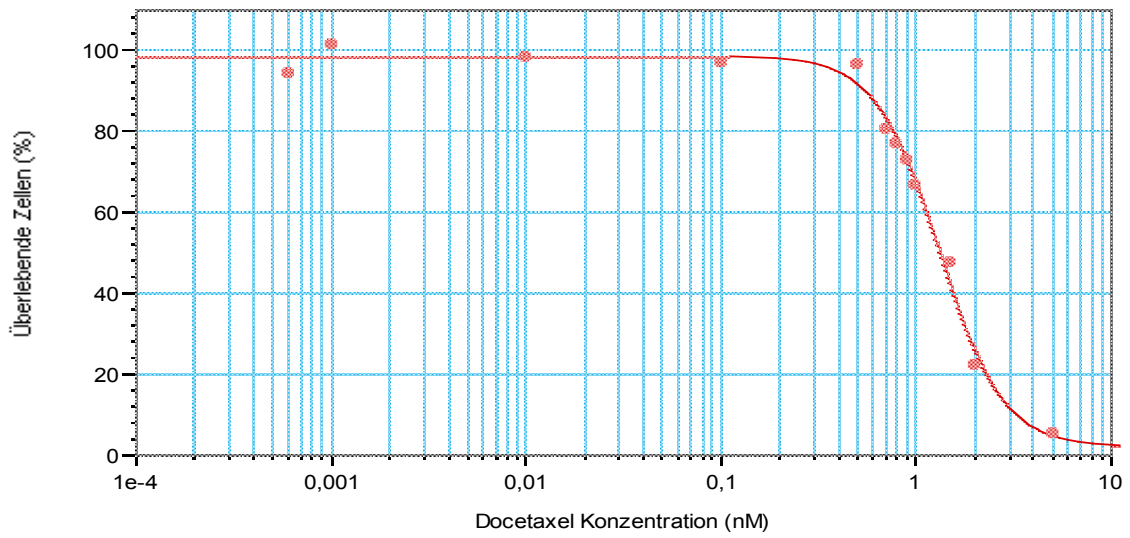


Abb.11: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie EJ28 mit Docetaxel

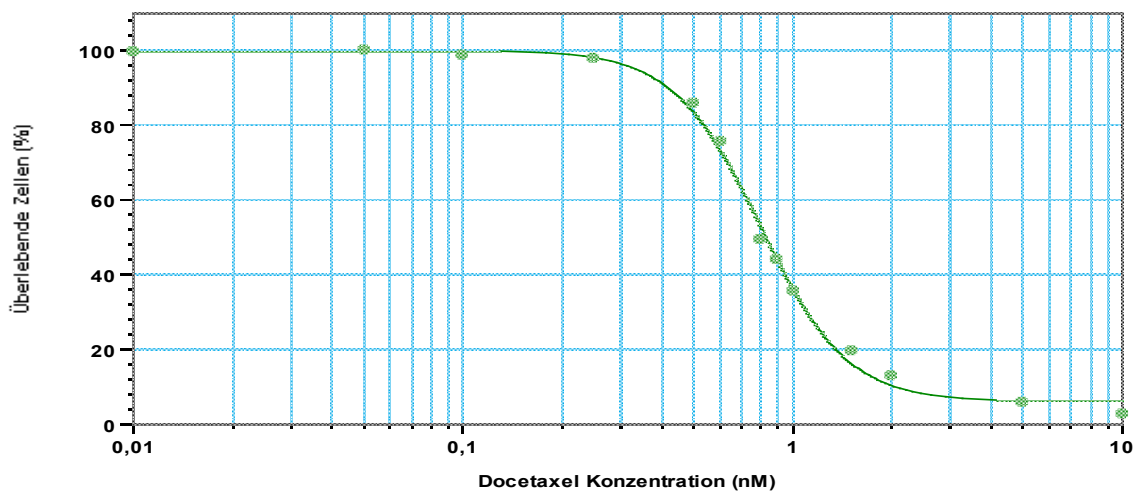


Abb. 12: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie RT112 mit Docetaxel

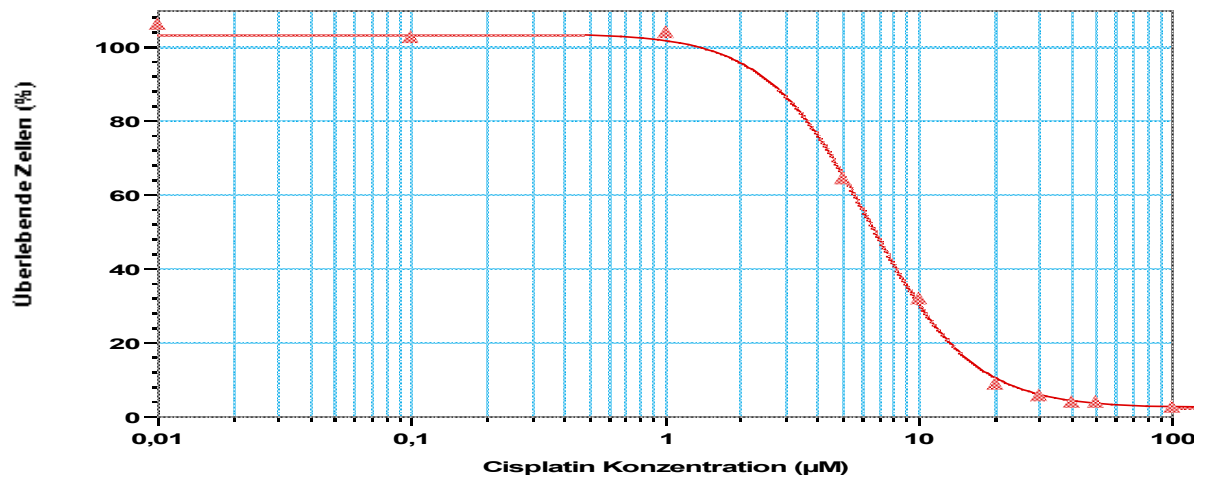


Abb. 13: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie EJ28 mit Cisplatin

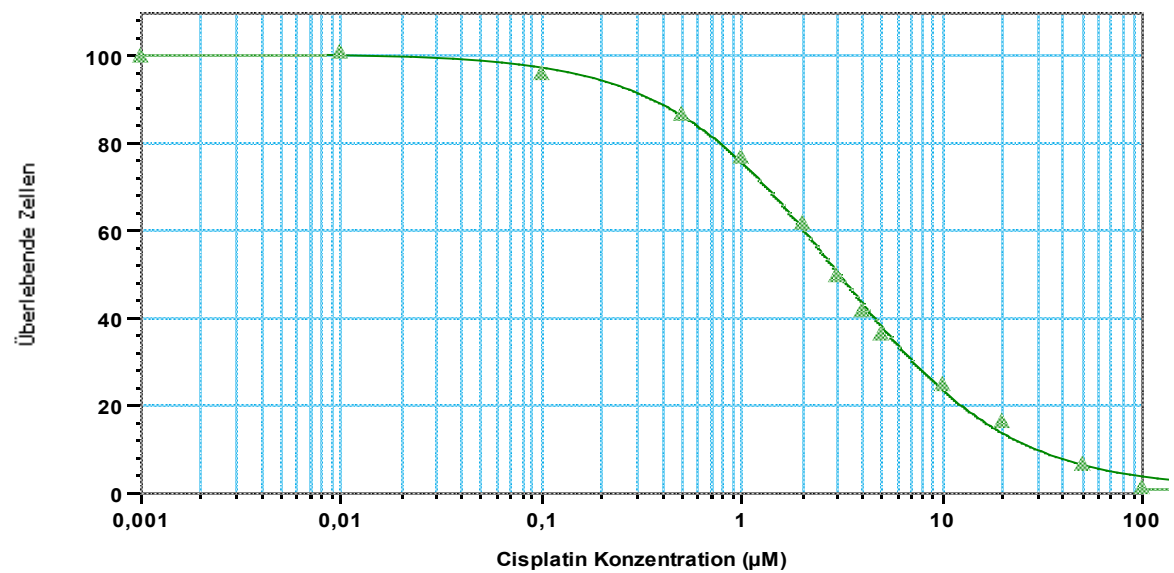


Abb.14: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie RT112 mit Cisplatin

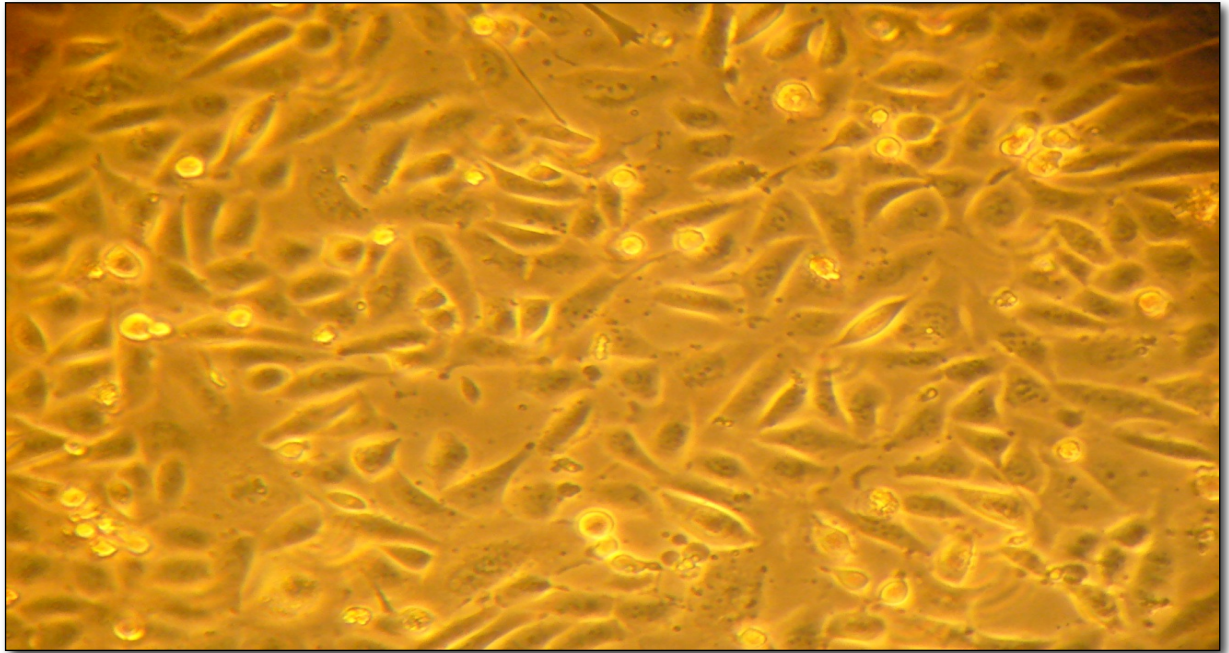


Abb. 15: EJ28 Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase

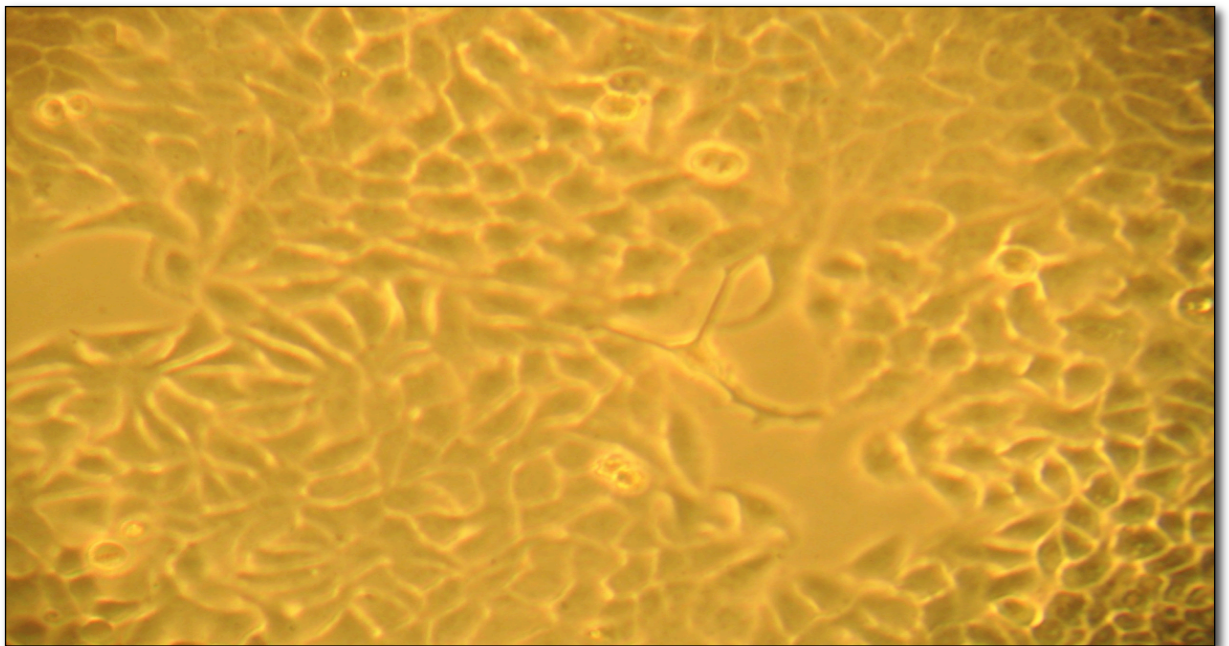


Abb. 16: RT112 Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase



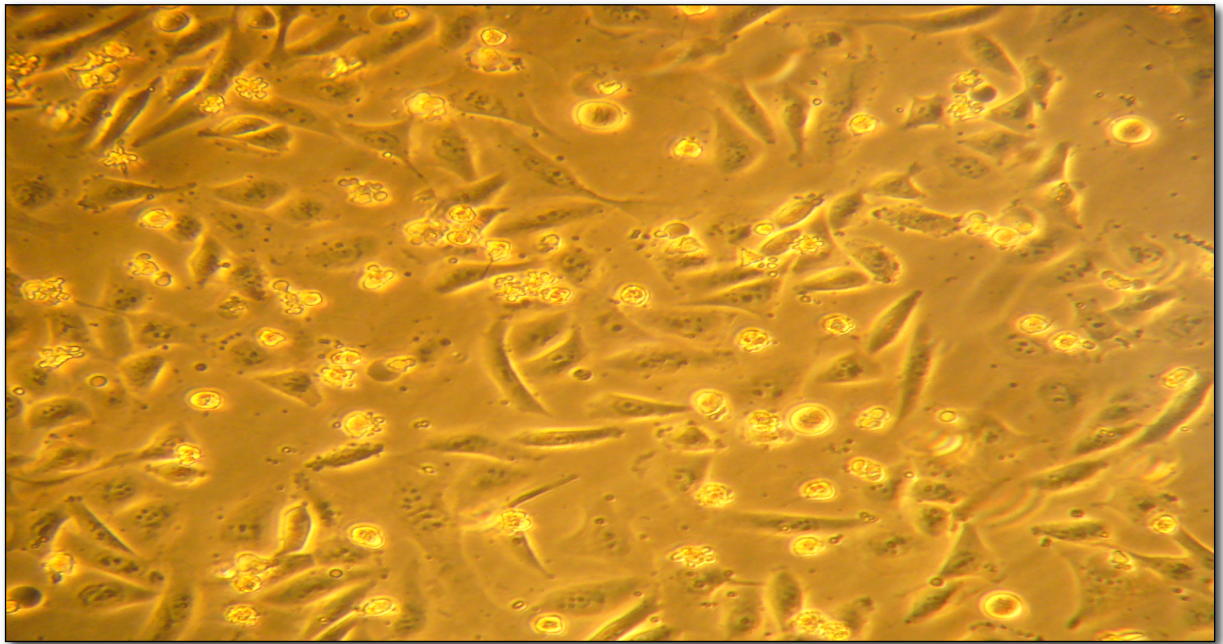


Abb. 17: EJ28 Zellen nach Exposition mit Docetaxel

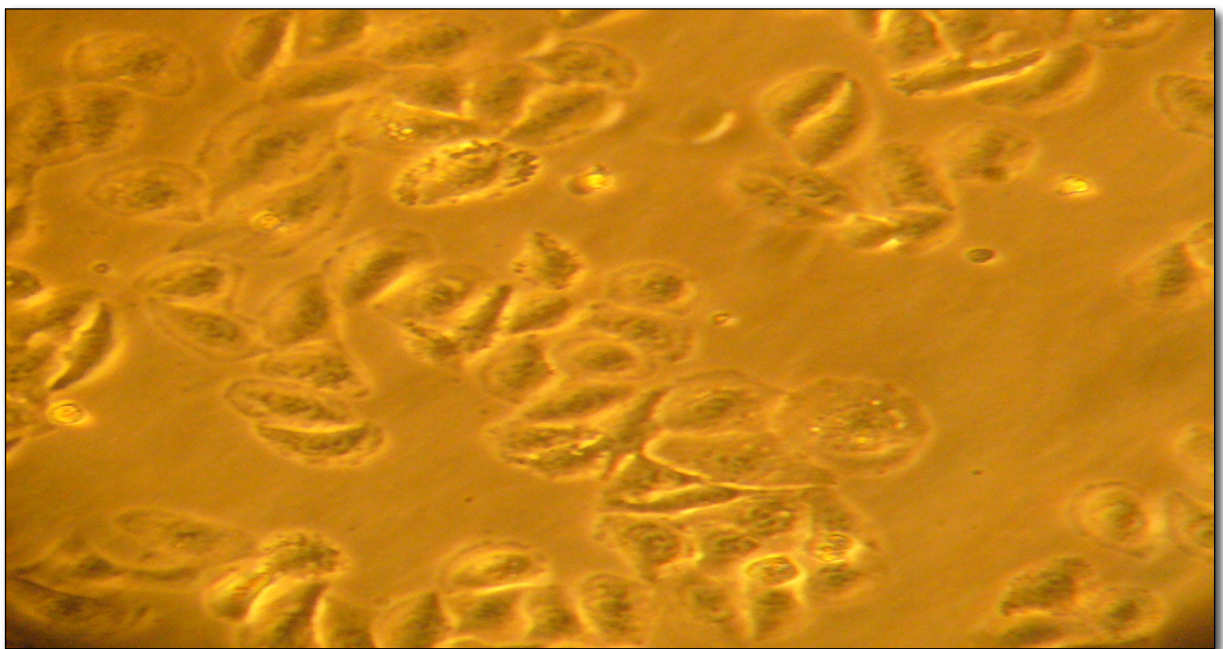


Abb. 18: RT112 Zellen nach Exposition mit Cisplatin

## 4.3.2 Modulation des Cholin-Uptakes nach Exposition der Tumorzellen mit Chemotherapeutika

### 4.3.2.1 Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Konzentration der Chemotherapeutika

Zunächst erfolgten Untersuchungen zur Modulation des Uptakes in Abhängigkeit von der Konzentration der Chemotherapeutika. Dazu wurden die Tumorzellen einmalig in 3 Konzentrationsstufen der Chemotherapeutika von 0,5x IC50, 1x IC50 und 10x IC50 über 24 Stunden exponiert und der Cholin-Uptake gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 17 zusammengefasst und in den Abb. 19-21 grafisch dargestellt.

Zelllinie	Konzentration	3H-Cholin-Uptake (pmol/mg Protein)					
		Gemcitabin		Docetaxel		Cisplatin	
EJ28		MW	95%-KI	MW	95%-KI	MW	95%-KI
	Kontrolle	0,40	0,37-0,43	0,40	0,37-0,43	0,40	0,37-0,43
	0,5x IC50	0,36	0,34-0,39	0,34	0,30-0,39	0,31	0,29-0,34
	1x IC50	0,40	0,38-0,43	0,38	0,36-0,41	0,30	0,27-0,33
	10x IC50	0,31	0,28-0,34	0,29	0,26-0,33	0,24	0,24-0,25
RT112	Kontrolle	0,64	0,60-0,68	0,64	0,60-0,68	0,64	0,60-0,68
	0,5x IC50	0,67	0,61-0,73	0,63	0,59-0,67	0,46	0,42-0,50
	1x IC50	0,60	0,57-0,63	0,61	0,51-0,71	0,45	0,42-0,48
	10x IC50	0,53	0,49-0,57	0,51	0,46-0,56	0,42	0,39-0,45

Tab. 17: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Konzentration der Chemotherapeutika in den Linien EJ28 und RT112 (MW: Mittelwert; KI: Konfidenzintervall)



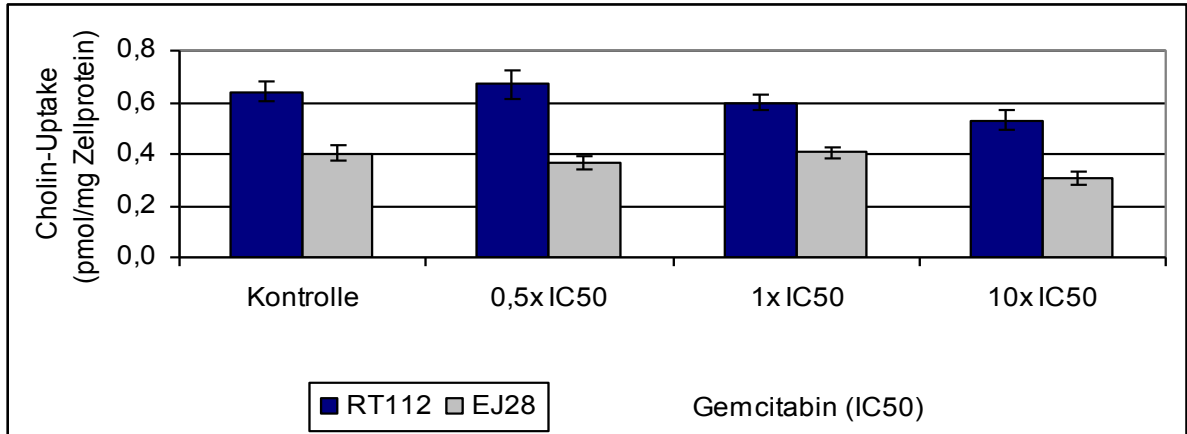


Abb. 19: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von Gemcitabin in den Linien EJ28 und RT112

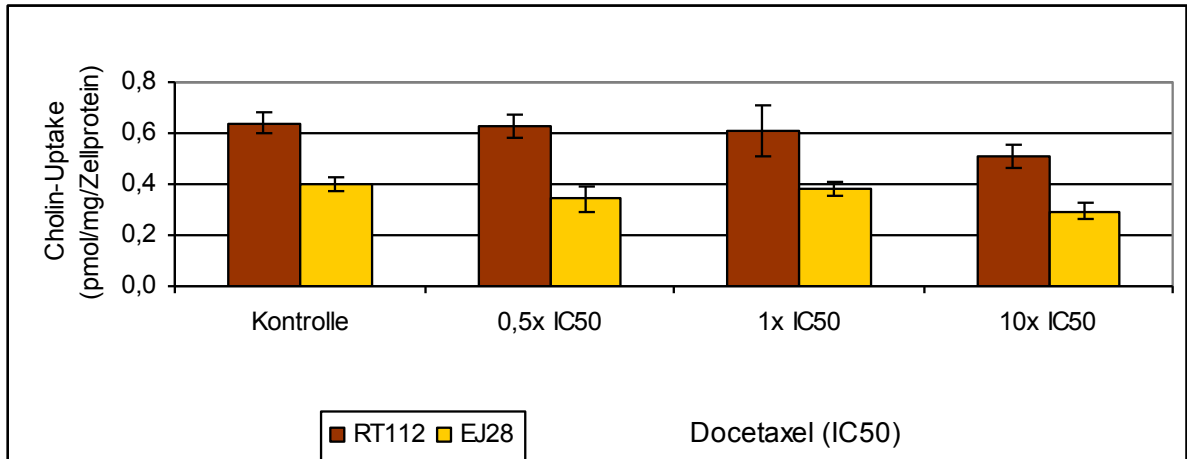


Abb. 20: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von Docetaxel in den Linien EJ28 und RT112

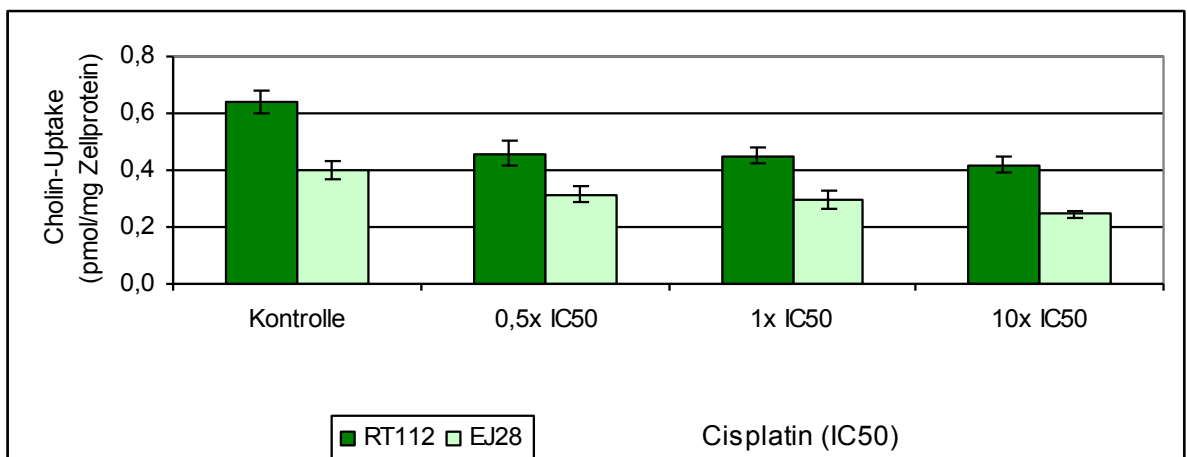


Abb. 21: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von Cisplatin in den Linien EJ28 und RT112

Wie in den Vorversuchen fand sich in der Linie RT112 ein insgesamt höherer Cholin-Uptake als in der Linie EJ28. Obwohl die Expositionszeit mit 24 Stunden relativ kurz war, fand sich bei der höchsten Konzentration (10x IC50) in beiden Zelllinien und bei allen Chemotherapeutika die größte Inhibition des Uptakes. Bei den niedrigeren Konzentrationen (0,5x IC50 bzw. 1x IC50) war im Vergleich zu den Kontrollen bei Gemcitabin und Docetaxel in beiden Zelllinien keine signifikante Hemmung des Cholin-Uptakes nachweisbar. Hingegen zeigten beide Zelllinien unter Cisplatin bei diesen Konzentrationen bereits eine signifikante Inhibition des Cholin-Uptakes.

#### 4.3.2.2 Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Chemotherapeutika

Zur Untersuchung des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer wurden die Chemotherapeutika mit der IC50-Konzentration einmalig appliziert und die Modulation des Uptakes zu 5 nachfolgenden Zeitpunkten (2,3,7,8 und 12 Tage) bis maximal 12 Tage (288 Stunden) beobachtet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 18 zusammengefasst und in den Abbildungen 22-23 grafisch dargestellt.

Zelllinie	Dauer Tage	Choline-Uptake (pmol/mg Zellprotein)							
		Kontrolle		Gemcitabin		Docetaxel		Cisplatin	
		MW	95%-KW	MW	95%-KW	MW	95%-KW	MW	95%-KW
EJ28	2	0,47	0,02	0,43	0,02	0,39	0,02	0,41	0,01
	3	0,42	0,02	0,43	0,02	0,47	0,03	0,39	0,02
	7	0,47	0,05	0,43	0,08	0,45	0,05	0,4	0,01
	8	0,4	0,02	0,39	0,01	0,4	0,02	0,32	0,01
	12	0,37	0,02	0,37	0,01	0,38	0,01	0,31	0,02
RT112	2	0,79	0,12	0,89	0,15	0,81	0,19	0,65	0,22
	3	0,56	0,07	0,57	0,06	0,63	0,05	0,51	0,17
	7	0,63	0,03	0,77	0,1	0,66	0,11	0,48	0,05
	8	0,66	0,08	0,65	0,11	0,65	0,1	0,43	0,07
	12	0,73	0,08	0,7	0,06	0,57	0,04	0,53	0,03

Tab.18: Modulation des 3H-Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika in den Linien EJ28 und RT112 (MW: Mittelwert; KW: Konfidenzwert)

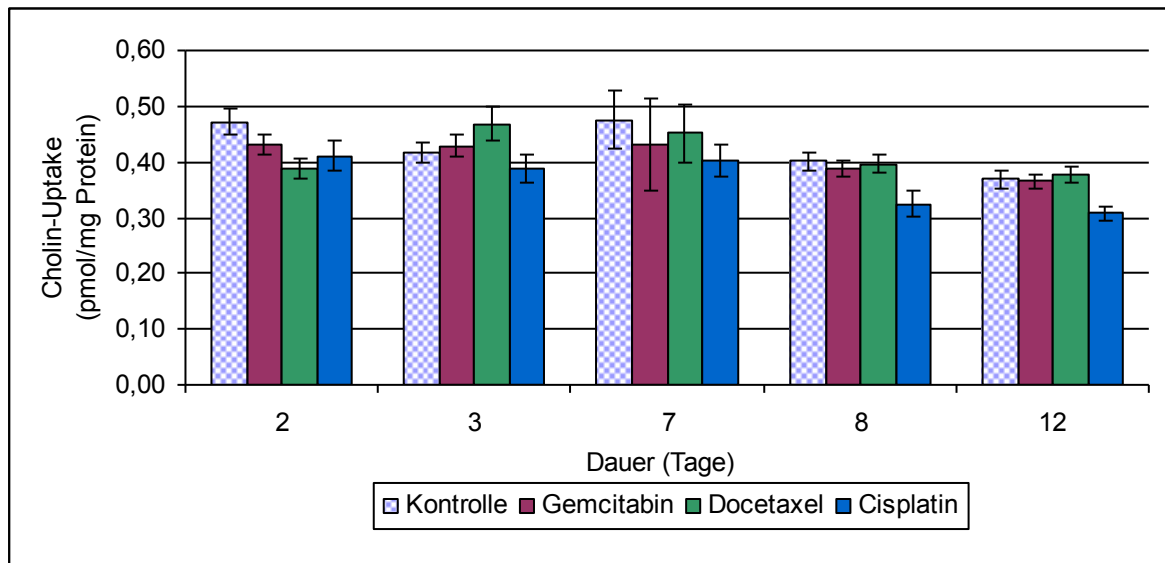


Abb. 22: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika in der Linie EJ28

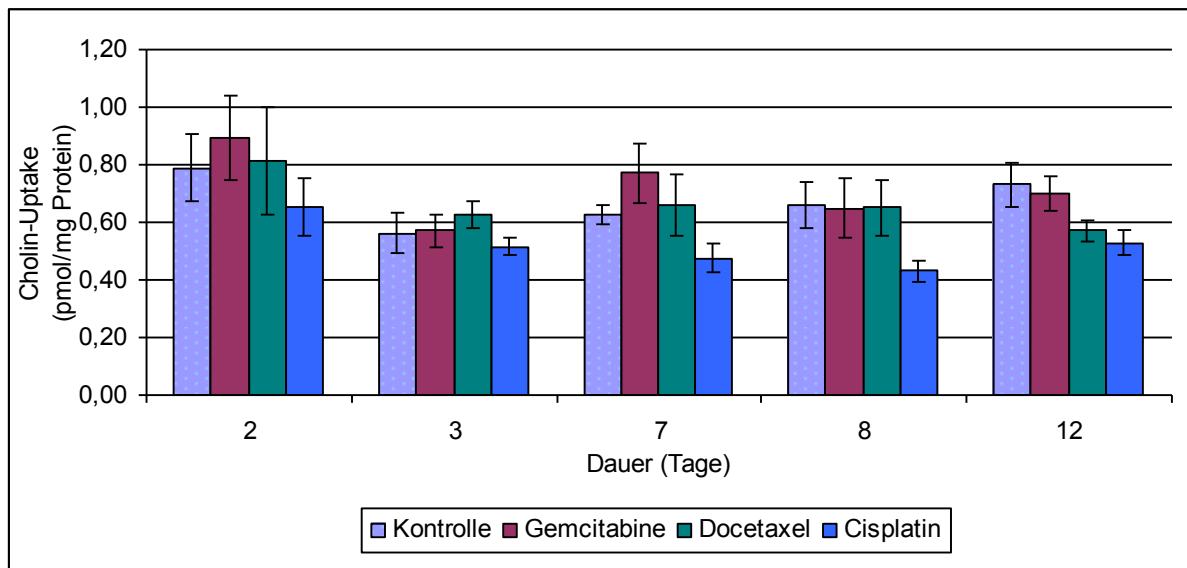


Abb. 23: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika in der Linie RT112

Die Ergebnisse der Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika sind in der Tabelle 19 zusammengefasst.

Zelllinie	3H-Cholin-Uptake (pmol/mg Zellprotein)		
	Gemcitabin	Docetaxel	Cisplatin
<b>EJ28</b>	Keine Änderung	Keine Änderung Ausnahme: Tag 2: Abnahme	Abnahme Ausnahme: Tag 3: kein Unterschied
<b>RT112</b>	Keine Änderung Ausnahme: Tag 7 Zunahme	Keine Änderung	Abnahme Ausnahme: Tag 3: kein Unterschied

Tab. 19: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit der Expositionsdauer der Zytostatika in den Linien EJ28 und RT112

Die Modulation des Cholin-Uptakes war substanz- und zelllinien-spezifisch unterschiedlich. Es fand sich in beiden Linien für Docetaxel und Gemcitabin im Wesentlichen keine Änderung des Uptakes während unter Cisplatin bis auf den Tag 3 in beiden Linien eine signifikante Abnahme des Uptakes zu beobachten war.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung des Cholin-Transportes

Erhöhte intrazelluläre Phosphocholin- und Gesamtcholin-Konzentrationen sind etablierte Eigenschaften von malignen Zellen. Verschiedene Studien belegen, dass diverse molekulare Alterationen Änderungen im Cholin-Metabolismus verursachen. Möglicherweise eignen sich daher die Metabolite des Cholin-Stoffwechsels für die Diagnose von unterschiedlichen Malignitäten. Cholinerge Neuronen spielen eine wesentliche Rolle im peripheren sowie zentralen Nervensystem, insbesondere bei den kognitiven Funktionen, Aufmerksamkeit, Gedächtnis und Schlafen. Neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer betreffen solche Neuronen. Damit gewinnt die Forschung an diesen Krankheiten eine zusätzliche Bedeutung und hilft möglicherweise die Prozesse des Cholin-Uptakes in Neuronen zu verstehen. Acetylcholin wird im Zellzytoplasma cholinergischer Neuronen aus den Vorstufen Cholin und Acetyl-Coenzym-A synthetisiert. Dafür ist das Enzym Cholin-Acetyltransferase erforderlich. Nach Depolarisation der Neuronen wird Acetylcholin in den synaptischen Spalt sezerniert und bindet an einen postsynaptischen Nikotinrezeptor. Acetylcholin wird rasch von der Acetylcholinesterase hydrolysiert. Drei Cholin-Transportsysteme sind bis jetzt bekannt:

#### 1. *Natrium-unabhängige Cholin-Transporter mit niedriger Affinität*

Dazu gehören OCT1, 2 und 3. Die Michaelis-Konstanten ( $K_M$ ) dieser Transporter liegen üblicherweise bei 30-100  $\mu\text{M}$ . Zu finden sind diese Transporter in verschiedenen Geweben (Grassl et al., 1994, Kekuda et al., 1998, Fujii et al., 2003). Durch die Aufnahme von Cholin wird die Synthese von Phosphatidylcholin sowie von sämtlichen Phospholipiden der Zellmembran möglich. Ursprünglich wurde vermutet, dass diese Form des Transportes eine einfache Diffusion darstellt und Natrium-unabhängig ist (Cooper et al., 1996). Allerdings haben Studien gezeigt, dass auch dieser Transport aktiv ist (Fergusson et al., 1991).

#### 2. *Natrium-abhängige Cholin-Transporter mit hoher Affinität*

In diese Gruppe gehört der Transporter CHT-1 (Okuda et al., 2000). Die Transporter werden in neuronalen Geweben exprimiert (Vickroy et al., 1985, Misawa et al., 2001). Zudem wurden diese hochaffinen Transporter auch in anderen Geweben identifiziert (Haberberger et al., 2002, Lips et al., 2003, Pfeil et al., 2003). Die Affinität der

Transportsysteme zum Substrat Cholin in den Neuronen besitzt einen  $K_M \leq 10 \mu\text{M}$  (Lockman und Allen, 2002).

### 3. Natrium-unabhängige Transporter mit mittlerer Affinität

Das Cholin-transporter like protein (CTL1) wird in verschiedenen Zellen exprimiert. Es spielt eine wichtige Rolle für die Synthese von Phosphatidylcholin, aber nicht für die Synthese von Acetylcholin (Michel et al., 2006, Fullerton et al., 2006, Traiffort et al., 2005, Taguchi et al., 2014).

Während CHT1 und CTL1 durch Hemicholin-3 inhibiert werden können, gelingt dies bei OCT nicht. Das humane Urothel besitzt ein nicht neuronales cholinerges System, welches sich von dem der Neuronen fundamental unterscheidet. Das Urothel exprimiert OCT1 und OCT3 (Lips et al., 2007). Andere Autoren fanden heraus, dass die Transporter der OCT-Familie (1,2,3) in der humanen Niere exprimiert werden (Motohashi et al., 2002). Von diesen Transportern sind nur OCT1 und OCT2 in den Cholin-Transport involviert.

Der CTL1 aus *Torpedo marmorata* (Zitterrochen) wurde in NRK-52 Zellen (Zellen der Nierentubuli von Ratten) exprimiert. Kinetikstudien zeigten, dass es sich bei CTL1 um ein saturables Transportsystem mit einem  $K_M$  von  $16,5 \mu\text{M}$  handelt. Der Transport über CTL1 wird von Hemicholin-3 inhibiert, ist aber unabhängig von TEA (Yabuki et al., 2009).

In einer Zelle können gleichzeitig mehrere verschiedene Cholin-Transporter exprimiert werden (Haeflner, 1975). In der vorliegenden Arbeit wurde keine molekulare Identifizierung der Cholin-Transporter durchgeführt. Deshalb war nur eine indirekte Identifizierung der Cholin-Transporter möglich.

In Zusammenschau der im Rahmen der vorgelegten Untersuchungen und dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der Cholin-Transport in den untersuchten Blasenkarzinomzellen am ehesten durch Transporter mit einer mittleren Aktivität (CTL) geschieht.

Die vorliegende Untersuchung belegt, dass die Zellen der Linie RT112, trotz ihres niedrigeren Malignitätsgrades, mehr Cholin aufnehmen als die Zellen der Linie EJ28. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Sutinen und Mitarbeiter. Sie zeigten, dass der Cholin-Uptake in Prostatakarzinomzellen nicht mit dem Malignitätsgrad korrelierte (Sutinen et al., 2004).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Cholin-Transportes in humanen Blasenkarzinomzellen. Dabei zeigte sich, dass die Blasenkarzinomzelllinien deutlich

mehr Cholin als FDG aufnehmen. Dieses Ergebnis belegt, dass die Tumorzellen Cholin nicht unspezifisch, sondern gezielt durch einen Cholintransporter aufnehmen. Im Unterschied zu Neuronen exprimieren urotheliale Zellen OCT3. Dieser Transporter spielt vermutlich eine Rolle beim Release von Acetylcholin aus nicht-neuronalen Zellen (Hanna-Mitschel et al. 2007). Cholin-Transport und eine vermehrte Expression von Cholin Transportern wurde ebenfalls in Mammakarzinomzellen nachgewiesen (Eliyahu et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine etwas höhere Cholin-Aufnahme in Anwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen. Der Uptake in  $\text{Na}^+$ -haltigem Medium in den untersuchten Blasenkarzinomzellen war in der Linie RT112 signifikant höher als in der Linie EJ28. Es bestand allerdings weitgehend kein signifikanter Unterschied in der Cholin-Aufnahme zwischen  $\text{Na}^+$ -haltigem und  $\text{Na}^+$ -freiem Medium. Einen ebenfalls natrium-unabhängigen Cholin-Transport beschrieben Fujita et al. (2006) in Neuronen des cerebralen Kortex sowie Taguchi et al. (2014) in Neuroblastom-Zellen. Andererseits nahmen Blasenkarzinomzellen auch in Medium ohne  $\text{NaCl}$  Cholin auf, so dass der Cholintransport von verschiedenen Komponenten abhängig scheint. Hoffmann et al. (2002) beschrieben bei Keratinozyten einen teilweise  $\text{Na}^+$ -abhängigen Cholintransport. In RBE4-Zellen der Blut-Hirn-Schranke von Ratten war sogar im Natriumfreien Medium eine Steigerung des Cholin-Uptakes zu sehen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Inazu et al. (2013) bei Lungenkarzinom Zelllinien.

Der pH-Wert des Mediums spielt eine weitere Rolle im Cholin-Transport bei den untersuchten Blasenkarzinomzellen. Dies konnten Taguchi und Mitarbeiter auch bei Glioblastom-Zellen bestätigen (Taguchi et al., 2014). In zwei Glioblastom Zelllinien nahm der Cholin-Uptake mit dem steigenden pH-Wert zu. Der maximale Uptake wurde bei einem pH-Wert von 9,5 erreicht. Ähnliche Resultate konnten von Hoffmann et al. (2002) sowie Müller et al. (2005) beobachtet werden.

Durch selektive Hemmung des Cholin-Transports mit verschiedenen Hemmstoffen sollte eine Identifizierung des in den untersuchten Urothelkarzinomzellen vorherrschenden Transportsystems ermöglicht werden. Der kompetitive Effekt des kalten Cholins auf den Cholin-Uptake beweist, dass sowohl kaltes Cholin als auch  $^3\text{H}$ -Cholin vom gleichen Transportsystem aufgenommen werden. Die starke Hemmung des Cholin-Uptakes durch Hemicholin-3 zeigt, dass die Cholin-Aufnahme durch einen spezifischen Cholin-Transporter vermittelt wird. Der Einsatz von TEA

und Guanidin führten zu keiner signifikanten Hemmung des Cholin-Transportes, so dass ein alleiniger Transport durch OCT ausgeschlossen werden konnte. Eine ähnlich niedrige Hemmung des Cholintransports durch TEA wurde bei RBE4-Zellen Der Blut-Hirn-Schranke von Ratten (Friedrich et al., 2001) beobachtet. Ouabain als Inhibitor der Na/K ATPase konnte die Cholin-Aufnahme ebenfalls nur eingeschränkt hemmen. Dieses Ergebnis spricht für das gleichzeitige Vorliegen eines Na<sup>+</sup>-unabhängigem Cholin-Transport. Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen an Keratinozyten (Hoffmann et al., 2002) und an BeWo-Plazenta Zellen (Eaton et al., 1998).

Cholintransport ist der Cholinmetabolismus der Zelle von wesentlicher Bedeutung. Das Enzym Cholinase katalysiert die Synthese von Phosphorylcholin aus Cholin (siehe Abb.1). Von den zwei bekannten Isoformen der Cholinase spielt die Cholinase eine wesentliche Rolle für die Karzinogenese bei kolorektalen Karzinomen (Nakagami, 1999). In fünf Urothelkarzinom-Zelllinien sowie bei in-vivo Tierversuchen zeigte sich eine erhöhte Aktivität der Cholinase (Hernando et al., 2009). Dieses Enzym fördert nicht nur die initiale Transformation der Zellen sondern unterstützt auch die Tumorprogression, indem es die Zellproliferation steigert. Unter der Exposition mit Kinase-Inhibitoren (z.B. MN58b) kommt es zu einer massiven Zellapoptose (Hernando, 2009). Damit stellen Cholinase-Inhibitoren potentiell eine neue Therapieoption für verschiedene Tumorentitäten, einschließlich dem Urothelkarzinom, dar (Gallego-Ortega, 2009, Ramirez de Molina et al., 2007).

## **5.2 Modulation des Cholin-Uptakes nach Exposition mit Zytostatika**

In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Modulation des Cholin-Uptakes nach der Exposition mit Gemcitabin, Cisplatin und Docetaxel untersucht. Bei beiden Zelllinien war eine signifikante Abnahme des Cholin-Uptakes nach Exposition mit Cisplatin zu erkennen, insbesondere bei Exposition mit hohen Konzentrationen. Die Abnahme des Cholin-Uptakes nach Applikation von Gemcitabin und Docetaxel zeigte sich lediglich nur bei sehr hohen Konzentrationen signifikant.

Antitumortheraeutika wie z.B. Chemotherapeutika oder Thyrosinkinaseinhibitoren (TKI) können in vitro den Cholin-Uptake in unterschiedlicher Weise modulieren. Eine Abnahme des Cholin-Uptakes in vitro wurde bislang in Glioblastomzellen (unter Cisplatin), in Mamma- und Urothelkarzinomzellen (unter Carboplatin und Gefitinib) und in Alveolarzellen der Lunge (unter Gefitinib) gefunden (Taguchi 2014, Luo 2016,



Ishiguro 2008). In einer in vitro-Untersuchung fanden Oprea-Lager (2014) eine Korrelation des Uptakes von  $^{18}\text{F}$ -Cholin mit der Zellzahl lebenden Prostatakarzinomzellen nach Exposition mit Docetaxel und Cabazitaxel. Der Tracer  $^{18}\text{F}$ -FDG führte zu einer numerischen Überschätzung der überlebenden Tumorzellen nach Zytostatika-Exposition. Als Ursache hierfür wurde eine Zunahme des Zellvolumens zu das 2 bis 3-fache nach Exposition mit beiden Taxanen angesehen. Die vorgelegte Arbeit sollte Erkenntnisse erbringen, welche für weitere präklinische Untersuchungen und klinische Studien am Patienten von Nutzen sein können.

Als Beispiel für die translationale Entwicklung eines Untersuchungsverfahrens vom Labor bis hin zu einer klinischen Studie sollen hier exemplarisch die Ergebnisse unserer „PET-Arbeitsgruppe“ am Klinikum rechts der Isar der TU München zum Einsatz des Tracers  $^{11}\text{C}$ -Cholin beim Prostatakarzinom dargestellt werden.

Zunächst wiesen Müller et al. (2009) in 2 Zelllinien des Prostatakarzinoms (PC) (LnCaP und PC3) in vitro nach Applikation von Bicalutamid und Docetaxel eine Zunahme des absoluten  $^{11}\text{C}$ -Cholin-Uptakes auf 300-355% bzw. auf 127-210% im Vergleich zu den Kontrollen nach. Hierbei waren jedoch keine Veränderungen der kinetischen Parameter des  $^{11}\text{C}$ -Cholin-Uptakes (bezüglich  $K_M$  und  $v_{max}$ ) zu beobachten.

Im in vivo Xenograft-Maus-Modell mit Zellen der Linie PC3 erfolgte als nächster Schritt die Evaluierung des Tumor-Ansprechens mittels  $^{11}\text{C}$ -Cholin-PET/CT nach Applikation von Docetaxel (Krause, 2010). Hierbei fand sich zu allen Meßzeitpunkten (1-3 Wochen nach Chemotherapie) eine Abnahme des Cholin-Uptakes, wobei bereits zum ersten Meßzeitpunkt (1 Woche nach Chemotherapie) eine Abnahme der T/M Ratio von 50% meßbar war. Die Autoren werteten dies als einen ersten Hinweis auf einen frühen Einsatz des PET/CT im Rahmen des Therapiemonitorings beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom.

Auf der Suche nach einem besseren Tracer bei dieser Tumorentität führten Schwarzenböck et al. in vivo Untersuchungen im Xenograft-Maus-Modell mit Zellen der Linie PC3 durch (Schwarzenböck et al. 2014, 2015). In  $^{18}\text{F}$ -Bombesin fanden sie einen, im Vergleich zu  $^{11}\text{C}$ -Cholin und  $^{11}\text{C}$ - $\beta$ -methyl-Cholin, einen besseren geeigneten Tracer.  $^{18}\text{F}$ -Bombesin zeigte einen höheren Uptake, ein besseres T/M Ratio und einen niedrigeren Uptake in Leber und Nieren.

Die nachfolgende klinische Studie untersuchte die Wertigkeit des Einsatzes des  $^{11}\text{C}$ -Cholin-PET/CT zur Evaluierung des therapeutischen Ansprechens bei n=32 Patienten mit fortgeschrittenem, hormonrefraktärem Prostatakarzinom, welche eine Chemotherapie mit Docetaxel erhalten hatten (Schwarzenböck et al., 2016). Hierbei wurde ein PET/CT vor Therapie sowie nach dem ersten und letzten Zyklus der Chemotherapie (max. 10 Zyklen pro Patient) durchgeführt. Hierbei konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen Veränderung des Cholin-Uptakes und des klinisch eingesetzten Responseparametern gefunden werden. Allerdings fand sich bei der läsionbasierten Auswertung von Knochenmetastasen insgesamt eine Abnahme des  $^{11}\text{C}$ -Cholin-Uptakes. Diese Abnahme war bei der frühen Responseevaluierung (nach einem Zyklus Chemotherapie) bei progredienten Knochenmetastasen stärker ausgeprägt, während diese bei der später Responseevaluierung in nicht-progredienten Knochenmetastasen stärker ausgeprägt war.

Für das Prostatakarzinom wurde zwischenzeitlich mit radiomarkiertem PSMA ein Tracer gefunden, der einen vielseitigen Einsatz in Diagnostik und Therapie bei dieser Tumorentität verspricht (Maurer 2016, Düwel 2016). Auch bei Einsatz von PSMA erbrachten in vitro Arbeiten mit Applikation von Abirateronacetat (AA) wichtige Hinweise zur Modulation der PSMA-Expression (Meller et al., 2015). Die Autoren fanden nach Applikation von AA in hormonresistenten Prostatakarzinomzelllinien eine Zunahme der PSMA-Expression auf das Doppelte, während sich in hormonsensitiven Prostatakarzinomzelllinien eine Zehnte der PSMA-Expression nun das 8-fache fand. Diese Interaktionen müssen weiter untersucht werden, um die Ergebnisse der funktionellen Bildgebung im Rahmen der Diagnostik sowie beim Einsatz PSMA-basierter Therapieverfahren besser beurteilen zu können.

Für das Urothelkarzinom steht zunächst die Suche nach einem geeignetem Tracer im Vordergrund. Dieser muss für die Bildgebung bei Diagnostik und zur Therapieevaluierung nicht unbedingt identisch sein.

Präklinische Untersuchungen fanden u.a. mit dem Apoptose-Marker Annexin V, welcher mit  $^{124}\text{J}$  und  $^{125}\text{J}$  (Collingridge et al., 2003) oder  $^{18}\text{F}$  (Wang 2013) markiert wurde, eine interessante Substanz für das in vivo Monitoring der Apoptose mittels PET.

In bislang zwei klinischen Studien zur Evaluierung des therapeutischen Ansprechens mittels PET/CT nach Chemotherapie des metastasiertes Urothelkarzinoms wurde der

Tracer  $^{18}\text{F}$ -FDG eingesetzt. Bei 32 Patienten fanden Giannatempo et al. (2014) nach 2 Zyklen MVAC, dass ein Ansprechen im PET im Vergleich zum CT mit einem längeren progressionsfreiem Überleben und längerem Gesamtüberleben assoziiert war.

Ein Fallbericht von der Chemotherapie mit Gemcitabin/Cisplatin bei einem Patienten mit einer penilen Metastase eines Urothelkarzinoms ergab im  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT eine Abnahme des maximalen Traceruptakes ( $\text{SUV}_{\text{max}}$ ) von etwa 30% (Öztürk, 2015).

Zur Verbesserung der molekularen Bildgebung beim Urothelkarzinom mittels PET bzw. PET/CT und PET/MRT sind weitere präklinische Untersuchungen und klinische Studien dringend erforderlich. Ein Schwerpunkt stellt hierbei die Suche nach einem geeigneten Tracer dar. Insbesondere präklinische Untersuchungen sind wichtig, um potentielle Modulationen des Traceruptakes durch klinisch relevante Therapieverfahren (Chemotherapie bzw. Strahlentherapie) darzustellen und diese Effekte im Rahmen der funktionellen Bildgebung zur Prognoseevaluierung am Patienten beurteilen zu können.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, hierzu einen geeigneten Beitrag geleistet zu haben.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus des Cholintransportes in zwei humanen Urothelkarzinomzelllinien (RT112 und EJ28) *in vitro* untersucht.

Es erfolgte eine funktionelle Charakterisierung des methyl-<sup>3</sup>H-Cholin Transportsystems mit unterschiedlichen Parametern. Ferner wurde die Modulation des Tracer-Uptakes nach Applikation der Chemotherapeutika Gemcitabin, Cisplatin und Docetaxel untersucht.

Die funktionelle Charakterisierung des Cholin-Transportsystems ergab das Vorliegen eines zeitabhängigen, saturablen weitgehend Na<sup>+</sup>-unabhängigen Transportsystems, wobei der Cholin-Uptake wesentlich höher war, als der Uptake von <sup>18</sup>F-FDG. Der Cholin-Uptake war invers zum Malignitätsgrad der Tumorzellen korreliert. Die Zellen der Linie RT112 mit niedrigeren Malignitätsgrad (G1-2) wiesen einen höheren Cholinuptake auf, als die Zellen der höhermalignen Linie EJ28 (G3-4). Ferner nahm der Cholinuptake mit steigendem pH-Werten zu.

Die indirekte Charakterisierung der Cholin-Transporter der Tumorzellen durch die Exposition mit verschiedenen Inhibitoren gab Hinweise darauf, dass die untersuchten Zelllinien über mehr high-affinity Cholin-transporter verfügen.

Die Exposition der Tumorzellen mit den Chemotherapeutika Gemcitabin, Cisplatin und Docetaxel führte in beiden Zelllinien nur unter Cisplatin zu einer Abnahme des Cholin-Uptakes. Die Exposition mit Gemcitabin und Docetaxel erbrachte keine relevante Veränderung des Tracer-Uptakes.

Präklinische Untersuchungen zur potentiellen Modulation des Traceruptakes unter klinisch eingesetzten Therapieverfahren wie z.B. Chemotherapie oder Strahlentherapie sind von entscheidender Bedeutung, um Therapieeffekte im Rahmen der Responseevaluierung mittels PET/CT bzw. PET/MRT besser beurteilen zu können.

Die weitere Charakterisierung des Cholin-Transportsystems sowie insbesondere die Suche nach spezifischeren Tracern, welche sowohl in der Diagnostik als auch zur Entwicklung neuer Therapieansätze dienen können, sind für das Urothelkarzinom weiterhin unbedingt erforderlich.

## 7 Literaturverzeichnis

Ahlstrom, H., Malmstrom, P.U., Letocha, H., Andersson, J., Langsrom, B., Nilsson S. (1996). "Positron emission tomography in the diagnosis and staging of urinary bladder cancer." *Acta Radiol* 37(2): 180-5.

Aljabery, F., Lindblom G., Skoog G., Shabo I., Olsson H., Rosell J., Jahanson, S. (2015). "PET/CT versus conventional CT for detection of lymph node metastases in patients with locally advanced bladder cancer." *BMC Urol* 15: 87.

Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinen E., Böhle A., Palou-Redorta J. (2009) "EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder". *Eur Urol* 54 (2); 303-314.

Bachor, R., Kotzerke J., Reske, S.N., Hautmann, R. (1999). "[Lymph node staging of bladder neck carcinoma with positron emission tomography]." *Urologe A* 38(1): 46-50.

Banning, U., Barthel H., Mauz-Korholz, C., Kluge, R., Korholz, R., Sabri, O. (2006). "Effect of drug-induced cytotoxicity on glucose uptake in Hodgkin's lymphoma cells." *Eur J Haematol* 77(2): 102-108.

Bassi, P., Ferrante G.D., Piazza, N., Spinadin, R., Carando, R., Pappagallo, G., Pagano, F. (1999). "Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort." *J Urol* 161(5): 1494-7.

Bellmunt, J., Albiol S., Suarez, C., Albanell, J. (2009). "Optimizing therapeutic strategies in advanced bladder cancer: update on chemotherapy and the role of targeted agents." *Crit Rev Oncol Hematol* 69(3): 211-22.

Beets, G., Pennincx F., Schiepers, C., Filez, L., Mortelmans, L., Kerremans, R., Aerts, R., De Roo, M. (1994). "Clinical value of whole-body positron emission

tomography with [18F]fluorodeoxyglucose in recurrent colorectal cancer." *Br J Surg* 81(11): 1666-70.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.

Collingridge, D. R., Glaser M., Osman, S., Barthel, H., Hutchinson, O.C., Luthra, S.K., Brady, F., Bouchier-Hayes, L., Martin, S.J., Workman, P., Price, P., Aboagye, E.O. (2003). "In vitro selectivity, in vivo biodistribution and tumour uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope." *Br J Cancer* 89(7): 1327-33.

Cooper, J. C., Gutbrod, O., Witzemann, V., Methfessel, C. (1996). "Pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor from fetal rat muscle expressed in *Xenopus* oocytes." *Eur J Pharmacol* 309(3): 287-98.

Daneshmand, S., Ahmadi, H., Huynh. L.N., Dobos, N. (2012). "Preoperative staging of invasive bladder cancer with dynamic gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging: results from a prospective study." *Urology* 80(6): 1313-8.

De Jong, I. J., Pruim, J., Elsinga, P.H., Jongen, M.M. Mensink, H.J., Vallburg, W. (2002). "Visualisation of bladder cancer using (11)C-choline PET: first clinical experience." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29(10): 1283-8.

Drieskens, O., Oyen, R., Van Poppel, H., Vankan, Y., Flamen, P., Mortelmans, L. (2005). "FDG-PET for preoperative staging of bladder cancer." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32(12): 1412-7.

Dumez, H., Martens, M., Selleslach, J., Guetens, G., De Boeck, G., Aerts, R., De Bruijn, E.A., Maes, R.A., van Oosterom, A.T.(2007). "Docetaxel and gemcitabine combination therapy in advanced transitional cell carcinoma of the urothelium: results of a phase II and pharmacologic study." *Anticancer Drugs* 18(2): 211-8.

Düwel, C., Eiber M., Maurer T. (2016). "Will 68Ga-PSMA PET become the New Imaging Standard for Prostate Cancer?" *Akt Urol* 47: 378-382.

Eaton, B. M. and S. R. Sooranna (1998). "Regulation of the choline transport system in superfused microcarrier cultures of BeWo cells." *Placenta* 19(8): 663-9.

Eliyahu, G., Kreizman, T., Degani, H. (2007). "Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies." *Int J Cancer* 120(8): 1721-30.

Ferguson, S. S., Diksic, M., Collier, B. (1991). "Stereospecificity of high- and low-affinity transport of choline analogues into rat cortical synaptosomes." *J Neurochem* 57(3): 915-21.

Fradet, Y., Grossman, H.B., Gomella, L., Lerner, S., Cookson, M., Albala, D., Droller, M.J. (2007). "A comparison of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy and white light cystoscopy for the detection of carcinoma in situ in patients with bladder cancer: a phase III, multicenter study." *J Urol* 178(1): 68-73; discussion 73.

Friedrich, A., George, R.L., Bridges, C.C., Prasad, P.D., Ganapathy, V. (2001). "Transport of choline and its relationship to the expression of the organic cation transporters in a rat brain microvessel endothelial cell line (RBE4)." *Biochim Biophys Acta* 1512(2): 299-307.

Fujii, T., Okuda, T., Haga, T., Kawashima, K. (2003). "Detection of the high-affinity choline transporter in the MOLT-3 human leukemic T-cell line." *Life Sci* 72(18-19): 2131-4.

Fujita, T., Shimada, A., Okada, N., Yamamoto, A. (2006). "Functional characterization of Na<sup>+</sup>-independent choline transport in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex." *Neurosci Lett* 393(2-3): 216-21.

Fullerton, M. D., Wagner, L., Yuan, Z., Bakovic, M. (2006). "Impaired trafficking of choline transporter-like protein-1 at plasma membrane and inhibition of choline

transport in THP-1 monocyte-derived macrophages." *Am J Physiol Cell Physiol* 290(4): C1230-8.

Gallego-Ortega, D., Ramirez de Molina, A., Ramos, M.A., Valdes-Mora, F., Barderas, M.G., Sarmentero-Estrada, J., Lacal, J.C. (2009). "Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment." *PLoS One* 4(11): e7819.

Giannatempo, P., Alessi, A., Miceli, R., Raggi, D., Fare, E., Nicolai, N., Serafini, G., Padovano, B., Piva, L., Biasoni, D., Torelli, T., Catanzaro, M., Stagni, S., Maffezzini, M., Mariani, L., Gianni, A.M., Sonpavde, G., Salvioni, R., Necchi, A., Crippa, F. (2014). "Interim fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography for early metabolic assessment of therapeutic response to chemotherapy for metastatic transitional cell carcinoma." *Clin Genitourin Cancer* 12(6): 433-9.

Golan, S., Sopov, V., Baniel, J., Groshar, D. (2011) Comparison of <sup>11</sup>C-choline with <sup>18</sup>F-FDG in positron emission tomography/computerized tomography for staging urothelial carcinoma: a prospective study." *J Urol* 186(2): 436-41.

Grassl, S. M. (1994). "Choline transport in human placental brush-border membrane vesicles." *Biochim Biophys Acta* 1194(1): 203-13.

Grossman, H.B., Natale, R.B., Tangen, C.M., Speights, V.O., Vogelzang, N.J., Trump, D.L., de Vere White, R.W., Sarosdy, M.F., Wood, D.P. Jr., Crawford, E.D. (2003). "Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer." *N Engl J Med* 349(9): 859-66.

Guo, J., Higashi, K., Yokota, H., Nagao, Y., Ueda, Y., Kodama, Y., Oguchi, M., Tonami, H., Yamamoto, I. (2004). "In vitro proton magnetic resonance spectroscopic lactate and choline measurements, <sup>18</sup>F-FDG uptake, and prognosis in patients with lung adenocarcinoma." *J Nucl Med* 45(8): 1334-9.



Haberberger, R. V., Pfeil, U., Lips, K.S., Kummer, W.(2002). "Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin." *J Invest Dermatol* 119(4): 943-8.

Haeffner, E. W. (1975). "Studies on choline permeation through the plasma membrane and its incorporation into phosphatidyl choline of Ehrlich-Lettre-ascites tumor cells in vitro." *Eur J Biochem* 51(1): 219-28.

Hanna-Mitchell, A. T., Beckel, J.M., Barbadora, S., Kanai, A.J., de Groat, W.C., Birder, L.A. (2007). "Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium." *Life Sci* 80(24-25): 2298-302.

Henriksen, G., Herz, M., Hauser, A., Schwaiger, M., Wester, H.J. (2004). "Synthesis and preclinical evaluation of the choline transport tracer deshydroxy-[<sup>18</sup>F]fluorocholine ([<sup>18</sup>F]dOC)." *Nucl Med Biol* 31(7): 851-8.

Hernando, E., Sarmentero-Estrada, J., Koppie, T., Belda-Iniesta, C., Ramirez de Molina, V., Cejas, P., Ozu, C., Le, C., Sanchez, J.J., Gonzalez-Baron, M., Koutcher, J., Cordon-Cardo, C., Bochner, B.H., Lacal, J.C., Ramirez de Molina, A.(2009). "A critical role for choline kinase-alpha in the aggressiveness of bladder carcinomas." *Oncogene* 28(26): 2425-35.

Hoffmann, K., Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R.H., Brandsch, M.(2002). "Functional characterization of a high-affinity choline transport system in human keratinocytes." *J Invest Dermatol* 119(1): 118-21.

Inazu, M., Takeda, H., Matsumiya, T.(2005). "Molecular and functional characterization of an Na<sup>+</sup>-independent choline transporter in rat astrocytes." *J Neurochem* 94(5): 1427-37.

Inazu, M. (2014). "Choline transporter-like proteins CTLs/SLC44 family as a novel molecular target for cancer therapy." *Biopharm Drug Dispos* 35(8): 431-49.

Ishiguro, N., Oyabu, M., Sato, T., Maeda, T., Minami, H., Tamai, I. (2008). "Decreased biosynthesis of lung surfactant constituent phosphatidylcholine due to inhibition of choline transporter by gefitinib in lung alveolar cells." *Pharm Res* 25(2): 417-27.

Jadvar, H., Quan, V., Henderson, R.W., Conti, P.S. (2008). "[F-18]-Fluorodeoxyglucose PET and PET-CT in diagnostic imaging evaluation of locally recurrent and metastatic bladder transitional cell carcinoma." *Int J Clin Oncol* 13(1): 42-7.

Jager, G. J., Barentsz, J.O., Oosterhof, G.O., Witjes, J.A., Ruijs, S.J. (1996). "Pelvic adenopathy in prostatic and urinary bladder carcinoma: MR imaging with a three-dimensional T1-weighted magnetization-prepared-rapid gradient-echo sequence." *AJR Am J Roentgenol* 167(6): 1503-7.

Jana, S. and M. D. Blafox (2006). "Nuclear medicine studies of the prostate, testes, and bladder." *Semin Nucl Med* 36(1): 51-72.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010). "Cancer statistics" *CA Cancer J Clin* 60(5): 277-300.

Jocham D, Witjes F, Wagner S, Zeylemaker, B., van Moorselaar, J., Grimm, M.O., Muschter, R., Popken, G., König, F., Knuchel, R, Kurth, K.H. (2005). Improved detection and treatment of bladder cancer using hexaminolevulinate imaging: a prospective, phase III multicenter study. *J Urol* 174: 862-866.

Jocham D., Miller K. *Praxis der Urologie*, Band 2, 2007, 63.

Kekuda, R., Prasad, P.D., Wu, X., Wang, H., Fei, Y.J., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1998). "Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta." *J Biol Chem* 273(26): 15971-9.

Kibel, A.S., Dehdashti, F., Katz, M.D., Klim, A.P., Grubb, R.L., Humphrey, P.A., Siegel, C., Cao, D., Gao, F., Siegel, B.A. (2009). "Prospective study of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for staging of muscle-invasive bladder carcinoma." *J Clin Oncol* 27(26): 4314-20.

Kim, B., Semelka, R.C., Ascher, S.M., Chalpin, D.B., Carroll, P.R., Hricak, H. (1994). "Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1- and T2-weighted MR imaging, dynamic gadolinium-enhanced imaging, and late gadolinium-enhanced imaging." *Radiology* 193(1): 239-45.

Kosuda, S., Kison, P.V., Greenough, R., Grossman, H.B., Wahl, R.L. (1997). "Preliminary assessment of fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with bladder cancer." *Eur J Nucl Med* 24(6): 615-20.

Kotzerke, J., Prang, J., Neumaier, B., Volkmer, B., Guhlmann, A., Kleinschmidt, K., Hautmann, R., Reske, S.N. (2000). "Experience with carbon-11 choline positron emission tomography in prostate carcinoma." *Eur J Nucl Med* 27(9): 1415-9.

Krause, B. J., Souvatzoglou, M., Herrmann, K., Weber, A.W., Schuster T., Buck, A.K., Nawroth, R., Weirich, G., Treiber, U., Wester, H.J., Ziegler, S.I., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M. (2010). "[11C]Choline as pharmacodynamic marker for therapy response assessment in a prostate cancer xenograft model." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(10): 1861-8.

Kwee, S. A., Coel, M.N., Lim, J., Ko, J.P. (2005). "Prostate cancer localization with 18fluorine fluorocholeline positron emission tomography." *J Urol* 173(1): 252-5.

Leissner, J., Hohenfellner, R., Thüroff, J.W., Wolf, H.K. (2000). "Lymphadenectomy in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder; significance for staging and prognosis." *BJU Int* 85(7): 817-23.

Letocha, H., Ahlstrom, H., Malstrom, P.U., Westlin, J.E., Fasth, K.J., Nilsson, S. (1994). "Positron emission tomography with L-methyl-11C-methionine in the

monitoring of therapy response in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder." *Br J Urol* 74(6): 767-74.

Lips, K. S., Wunsch, J., Zarghooni, S., Bschleipfer, T., Schukowski, K., Weidner, W., Wessler, I., Schwantes, U., Koepsell, H., Kummer, W.(2007). "Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium." *Eur Urol* 51(4): 1042-53.

Lips, K. S., Pfeil, U., Reiners, K., Rimasch, C., Kuchelmeister, K., Braun-Dullaeus, R.C., Haberberger, R.V., Schmidt, R., Kummer, W. (2003). "Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries." *J Histochem Cytochem* 51(12): 1645-54.

Liu, I.J., Segall, G.M., Nino-Murcia, M., Terris, M.K.(2003). "Fluorodeoxyglucose positron emission tomography studies in the diagnosis and staging of transitional cell carcinoma." *Adv Exp Med Biol* 539(Pt A): 129-42.

Lockman, P. R. and D. D. Allen (2002). "The transport of choline." *Drug Dev Ind Pharm* 28(7): 749-71.

Lopez-Beltran, A. and R. Montironi (2004). "Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification." *Eur Urol* 46(2): 170-6.

Lotan, Y. and C. G. Roehrborn (2003). "Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses." *Urology* 61(1): 109-18.

Luo, Z., Samadzadeh K.M., Nitin, N. (2016). "Rapid assessment of drug resistance of cancer cells to gefitinib and carboplatin using optical imaging." *Anal Biochem* 504: 50-58.

Maurer, T., M. Souvatzoglou, M., Kübler, H., Opercan, K., Schmidt, S., Herrmann, K., Stollfuss, J., Weirich G., Gschwend, J.E., Schwaiger, M., Krause B., Treiber, U. (2012). "Diagnostic efficacy of [11C]choline positron emission tomography/computed

tomography compared with conventional computed tomography in lymph node staging of patients with bladder cancer prior to radical cystectomy." *Eur Urol* 61(5): 1031-8.

Maurer, T., Eiber, M., Schwaiger, M., Gschwend, J.E. (2016). "Current use of PSMA-PET in prostate cancer management." *Nat Rev Urol* 13(4): 226-35.

Meller, B., Bremmer, F., Sahlmann, C.O., Hijazi, S., Bouter, C., Trojan, L., Thelen, P. (2015). "Alterations in androgen deprivation enhanced prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer cells as a target for diagnostics and therapy." *EJNMMI Research* 5(66) (1-16).

Michel, V., Yuan, Z., Ramsubir, S., Bakovic, M. (2006). "Choline transport for phospholipid synthesis." *Exp Biol Med (Maywood)* 231(5): 490-504.

Mills, R.D., Turner, W.H., Fleischmann, A., Markwalder, R., Thalmann, G.N., Studer, U.E. (2001). "Pelvic lymph node metastases from bladder cancer: outcome in 83 patients after radical cystectomy and pelvic lymphadenectomy." *J Urol* 166(1): 19-23.

Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Nagao, M., Okuda, T., Haga, T. (2001). "Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat." *Neuroscience* 105(1): 87-98.

Montie, J. E. (2005). "Urinary bladder cancer: preoperative nodal staging with ferumoxtran-10-enhanced MR imaging." *J Urol* 174(3): 870-1.

Motohashi, H., Sakurai, Y., Saito, H., Masuda, S., Goto, M., Fukatsu, A., Ogawa, O., Inui, K. (2002). "Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney." *J Am Soc Nephrol* 13(4): 866-74.

Müller, S.A., Holzapfel, K., Seidl, C., Treiber, U., Krause, B.J., Senekowitsch-Schmidtke, R. (2009). "Characterization of choline uptake in prostate cancer cells following bicalutamide and docetaxel treatment." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36(9): 1434-42.

Nakagami, K., Uchida, T., Ohwada, S., Koibuchi, Y., Morishita Y. (1999). "Increased choline kinase activity in 1,2dimethylhydrazine-induced rat colon cancer." *Jpn J Cancer Res* 90(11): 1212-7.

Nurmi, M., Katevuo, K., Puntala, P. (1988). "Reliability of CT in preoperative evaluation of bladder carcinoma." *Scand J Urol Nephrol* 22(2): 125-8.

Oprea-Lager, D.E., van Kantén, M.P., van Moorselaar, R.J., van den Eertwegh, A.J., van de Ven, P.M., Bijnsdorp, I.V., Hoekstra, O.S., Geldof, A.A. (2014). "[F]Fluoromethylcholine as a Chemotherapy Response Read-Out in Prostate Cancer Cells." *Mol Imaging Biol.* 17 (3): 319-27.

Öztürk, H. (2015). "Evaluation of the response chemotherapy for penile metastasis of bladder cancer using 18F-fluorodeoxyglucose-PET/CT." *Int J Surg Case Rep* 11: 33-6.

Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., Katsura, I. (2000). "Identification and characterization of the high-affinity choline transporter." *Nat Neurosci* 3(2): 120-5.

Paik, M. L., Scolieri, Brown, S.L., Spimak, J.P., Resnick, M.I. (2000). "Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy." *J Urol* 163(6): 1693-6.

Patil, V.V., Wang, Z.J., Sollitto, R.A., Chuang, K.W., Konety, B.R., Hawkins, R.A., Coakley, F.V. (2009). "18F-FDG PET/CT of transitional cell carcinoma." *AJR Am J Roentgenol* 193(6): W497-504.

Pawinski, A., Sylvester, R., Kurth, K.H., Bouffieux, C., van der Meijden, A., Parmar, M.K., Bijns, L. (1996). "A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer

Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer." J Urol 156(6): 1934-40.

Pectasides, D., Glotsos, J., Boutnoroglou, N., Kouloubinis, A., Mitakidis, N., Karvounis, N., Ziras, N., Athanassiou, A. (2002). "Weekly chemotherapy with docetaxel, gemcitabine and cisplatin in advanced transitional cell urothelial cancer: a phase II trial." Ann Oncol 13(2): 243-50.

Pfeil, U., Lips, K.S., Eperling, L., Grau, V., Haberberger, R.V., Kummer, W. (2003). "Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea." Am J Respir Cell Mol Biol 28(4): 473-7.

Picchio, M., Treiber, U., Beer, A.J., Metz, S., Bossner, P., van Randenborgh, H., Paul, R., Weirich, G., Souvatzoglou, M., Hartung, R., Schwaiger, M., Piert, M. (2006). "Value of 11C-choline PET and contrast-enhanced CT for staging of bladder cancer: correlation with histopathologic findings." J Nucl Med 47(6): 938-44.

Ramirez de Molina, A., Sarmentero-Estrada, J., Belda-Iniesta, C., Taron, M., Ramirez de Molina, V., Cejas, P., Skrzypski, M., Gallego-Ortega, D., de Castro, J., Casado, E., Garcia-Cabezas, M.A., Sanchez, J.J., Nistal, M., Rosell, R., Gonzalez-Baron, M., Lacal, J.C. (2007). "Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study." Lancet Oncol 8(10): 889-97.

Resorlu, B., Beduk, Y., Baltaci, S., Ergun, G., Talas, H. (2009). "The prognostic significance of advanced age in patients with bladder cancer treated with radical cystectomy." BJU Int 103(4): 480-3.

Robert Koch-Institut. [www.rki.de](http://www.rki.de)

Roivainen, A., Forsback, S., Gronroos, Leihikoinen, P., Kahkonen, M., Sutinen, E., Minn, H. (2000). "Blood metabolism of [methyl 11C]choline; implications for in vivo imaging with positron emission tomography." Eur J Nucl Med 27(1): 25-32.

Rübben H, Otto T: Uroonkologie, Rübben (Hrsg), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2001, 3. Auflage 85-158.

Rubben, H., Bubenzer, J., Bokenkamp, K., Lutzeyer, W., Rathert, P. (1979). "Grading of transitional cell tumours of the urinary tract by urinary cytology." *Urol Res* 7(2): 83-91.

Schwarzenböck, S.M., Eiber, M., Kundt, G., Retz, M., Sakretz, M., Kurth, J., Treiber, U., Nawroth, R., Rummeny, E.J., Gschwend, J.E., Schwaiger, M., Thalgot, M., Krause, B.J. (2016). "Prospective evaluation of [11C]Choline PET/CT in therapy response assessment of standardized docetaxel first-line chemotherapy in patients with advanced castration refractory prostate cancer." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 43(12): 2105-2113.

Schwarzenböck, S.M., Gertz, J., Souvatzoglou, M., Kurth, J., Sachs, D., Nawroth, R., Treiber, U., Schuster, T., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Ziegler, S.I., Henriksen, G., Wester, H.J., Krause, B.J. 2014). "Comparison of [(1)(1)C]choline ([11C]CHO) and S(+)-beta-methyl-[11C]choline ([11C]SMC) as imaging probes for prostate cancer in a PC-3 prostate cancer xenograft model." *Mol Imaging Biol* 17(2): 248-56.

Schwarzenböck, S.M., Schmeja, P., Kurth, J, Souvatzoglou, M., Nawroth, R., Treiber, U., Kundt, G., Graham, K., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Ziegler, S.I., Dinkelborg, L., Wester, H.J., Krause, B.J. (2015). "Comparison of [(11)C]Choline ([11C]CHO) and [(18)F]Bombesin (BAY 86-4367) as Imaging Probes for Prostate Cancer in a PC-3 Prostate Cancer Xenograft Model." *Mol Imaging Biol* 18(3): 393-401.

Shariat, S.F., Karam, J.A., Lotan, Y., Karakiewicz, P.I. (2008). "Critical evaluation of urinary markers for bladder cancer detection and monitoring." *Rev Urol* 10(2): 120-35.

Shariat,S.F., Ehdaie, B., Rink, M., Cha, E.K., Svatek, R.S., Chromecki, T.F., Fajkovic, H., Novara, G., David, S.G., Daneshmand, S., Fradet, Y., Lotan, Y.,



Segaleowsky, A.I., Clozel, T., Bastian, P.J., Kassouf, W., Fritsche, H.M., Burger, M., Izawa, J.I., Tilki, D., Abdollah, F., Chun, F.K., Sonpavde, G., Karakiewicz, P.I., Scherr, D.S., Gonen, M. (2012)."Clinical nodal staging scores for bladder cancer: a proposal for preoperative risk assessment." *Eur Urol*61(2): 237-42.

Sherif,A.,Rintala, E., Mestad, O., Nilsson, J., Holmberg, L., Nilsson, S., Malmstrom, P.U.(2002). "Neoadjuvant cisplatin-methotrexate chemotherapy for invasive bladder cancer -- Nordic cystectomy trial 2." *Scand J Urol Nephrol* 36(6): 419-25.

Stein, J.P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A.C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D., Skinner, D.G. (2001). "Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients." *J Clin Oncol* 19(3): 666-75.

Stenzl, A., Cowan, N.C., De Santis, M., Jakse, G., Kuczyk, M.A., Merseburger, A.S., Ribal, M.J., Sherif, M.J., Witjes, J.A. (2010). "[Update of the Clinical Guidelines of the European Association of Urology on muscle-invasive and metastatic bladder carcinoma]." *Actas Urol Esp* 34(1): 51-62.

Sutinen, E., Nurmi, M., Roivainen, A., Varpula, M., Tolvanen, T., Lehtikainen, P. (2004). "Kinetics of [(11)C]choline uptake in prostate cancer: a PET study." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31(3): 317-24.

Swinnen, G., Maes, A., Pottel, H., Vanneste, A., Billiet, I., Lesage, K., Werbrugghe, P. (2010)."FDG-PET/CT for the preoperative lymph node staging of invasive bladder cancer." *Eur Urol* 57(4): 641-7.

Sylvester R.J., van der Meijden A.P., Oosterlinck W., Witjes A., Bouffieux C., Denis L., Newling D.W., Kurth K. (2006)."Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta, T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials." *Eur Urol* 49 (3) 466-477.

Taguchi, C., Inazu, M., Saiki, I., Yara, M., Hara, N., Yamanaka, T., Uchino, H. (2014). "Functional analysis of [methyl-(3)H]choline uptake in glioblastoma cells: Influence of anti-cancer and central nervous system drugs." *Biochem Pharmacol* 88(3): 303-12.

Traiffort, E., Ruat, M., O'Regan, S., Meunier, F.M. (2005). "Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants." *J Neurochem* 92(5): 1116-25.

Vickroy, T.W., Roeske, W.R., Gehlert, D.R., Wamsley, J.K., Yamamura, H.I. (1985). "Quantitative light microscopic autoradiography of [3H]hemicholinium-3 binding sites in the rat central nervous system: a novel biochemical marker for mapping the distribution of cholinergic nerve terminals." *Brain Res* 329(1-2): 368-73.

von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J.T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M.J., Zimmermann, A., Arning, M. (2005). "Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer." *J Clin Oncol* 23(21): 4602-8.

Voges, G.E., Tauschke, E., Stockle, M., Alken, P., Hohenfellner, R. (1989). "Computerized tomography: an unreliable method for accurate staging of bladder tumors in patients who are candidates for radical cystectomy." *J Urol* 142(4): 972-4.

Wang, M.W., Wang, F., Zheng, Y.J., Zhang, Y.J., Zhang, Y.P., Zhao, Q, Shen, C.K., Wang, Y., Sun, S.H. (2013). "An in vivo molecular imaging probe (18)F-Annexin B1 for apoptosis detection by PET/CT: preparation and preliminary evaluation." *Apoptosis* 18(2): 238-47.

Winqvist, E., Kirchner, T.S., Segal, R., Chin, J., Lukka, H. (2004). "Neoadjuvant chemotherapy for transitional cell carcinoma of the bladder: a systematic review and meta-analysis." *J Urol* 171(2 Pt 1): 561-9.

Yabuki, M., Inazu, M., Yamada, T., Tajima, H., Matsumija, T.(2009). "Molecular and functional characterization of choline transporter in rat renal tubule epithelial NRK-52E cells." Arch Biochem Biophys 485(1): 88-96.

Yoshida, S., Nakagomi, K., Goto, S., Futatsubashi, M., Torizuka, T. (2006). "C-choline positron emission tomography in bladder cancer: report of four cases." Int J Urol 13(6): 829-31.

Zeisel, S.H. (1981). "Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology." Annu Rev Nutr 1: 95-121.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen-Glossar

AA	Abirateronacetat
BCG	Bacille Calmette-Guerin
BSA	Bovines Serumalbumin
BTA	Blasentumorantigen
CT	Computertomographie
CHT1	high affinity choline transporter
CTL1	Choline Transporter-Like Protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxide
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
<sup>18</sup> F-FDG	Fluorine-18-Fluorodeoxyglukose
FKS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
MRT	Magnetresonanztomographie
MVAC	Methotrexat, Vincristin, Adriamycin, Cisplatin
Na <sup>+</sup>	Natriumkation
NMDG	N-Methyl-D-glucamine
NEAS	Nicht-essentielle Aminosäure
NMP-22	Nuclear-Matrix-Protein-22
OCT	Organic cation transporter
PBS	Phosphate-buffered saline
P/S	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronenemmissionstomographie
PSMA	Prostata-spezifisches-Membran-Antigen
SDS-	Sodium Dodecyl Sulfate
SUV	Standardised Uptake Value
TEA-	Tetraethylammonium
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-amonimethan

TURB	Transurethrale Resektion der Harnblase
UICC	Union for international cancer control
$V_{\max}$	Maximalgeschwindigkeit
XTT	sodium 3'-[1-phenyl-aminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulphonic acid)
WHO	World Health Organisation

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms
Tab. 2:	WHO-Klassifikation von 2004
Tab. 3:	Standart-Protein-Messreihe zur Zellprotein-Bestimmung nach Bradford
Tab. 4:	$^{18}\text{F}$ -FDG Uptake (fmol/mg Zellprotein) in Blasenkarzinomzellen in Abhängigkeit von der Zeit
Tab. 5:	$^3\text{H}$ -Cholin-Uptake (pmol/mg Zellprotein) in Abhängigkeit von der Zeit und Einfluss von $\text{Na}^+$ -Ionen
Tab. 6:	$^3\text{H}$ -Cholin-Uptake in den Zelllinien EJ28 und RT112 in Abhängigkeit vom pH
Tab. 7:	Geschwindigkeit des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Cholinkonzentration
Tab. 8:	Vergleich von $K_M$ und $V_{\max}$ für den Cholin-Uptake in Blasenkarzinomzelllinien EJ28 und RT112
Tab. 9:	Wirkung von verschiedenen Inhibitoren auf den Cholin-Uptake in Zellen der Linien EJ28 und RT112
Tab. 10:	Dose-Response-Werte in der Zelllinie EJ28 nach Exposition mit Gemcitabin
Tab. 11:	Dose-Response-Werte in der Zelllinie RT112 nach Exposition mit Gemcitabin
Tab. 12:	Dose-Response-Werte in der Zelllinie EJ28 nach Exposition mit Docetaxel
Tab. 13:	Dose-Response-Werte in der Zelllinie RT112 nach Exposition mit Docetaxel
Tab. 14:	Dose-Response-Werte in der Zelllinie EJ28 nach Exposition mit Cisplatin

- Tab. 15: Dose-Response-Werte in der Zelllinie RT112 nach Exposition mit Cisplatin
- Tab. 16: IC50-Werte der Chemotherapeutika in den Zelllinien EJ28 und RT112
- Tab. 17: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Konzentration der Chemotherapeutika in den Linien EJ28 und RT112
- Tab. 18: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika in den Linien EJ28 und RT112
- Tab. 19: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika in den Linien EJ28 und RT112

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Cholin-Metabolismus
- Abb. 2:  $^{18}\text{F}$ -FDG-Uptake in den Blasenkarzinomzelllinien EJ28 und RT112 in Abhängigkeit von der Zeit
- Abb. 3:  $^3\text{H}$ -Cholin-Uptake in der Linie EJ28 in Abhängigkeit von der Zeit und Einfluss von  $\text{Na}^+$ -Ionen
- Abb. 4:  $^3\text{H}$ -Cholin-Uptake in der Linie RT112 in Abhängigkeit der Zeit und Einfluss von  $\text{Na}^+$ -Ionen
- Abb. 5:  $^3\text{H}$ -Cholin-Uptake in den Zelllinien EJ28 und RT112 in Abhängigkeit vom pH
- Abb. 6: Michaelis-Menten Kinetik für den Cholin-Uptake in EJ28 Zellen
- Abb. 7: Michaelis-Menten Kinetik für den Cholin-Uptake in RT112 Zellen
- Abb. 8: Wirkung der verschiedenen Inhibitoren auf den Cholin-Uptake in den Zellen der Linien EJ28 und RT112
- Abb. 9: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie EJ28 mit Gemcitabin
- Abb. 10: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie RT112 mit Gemcitabin
- Abb. 11: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie EJ28 mit Docetaxel
- Abb. 12: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie RT112 mit Docetaxel
- Abb. 13: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie EJ28 mit Cisplatin
- Abb. 14: Dose-Response Kurve nach Exposition der Zelllinie RT112 mit Cisplatin
- Abb. 15: EJ28 Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase

- Abb. 16: RT112 Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase
- Abb. 17: EJ28 Zellen nach Exposition mit Docetaxel
- Abb. 18: RT112 Zellen nach Exposition mit Cisplatin
- Abb. 19: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von Gemcitabin in Linien EJ28 und RT112
- Abb. 20: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von Docetaxel- in Linien EJ28 und RT112
- Abb. 21: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Cisplatin in Linien EJ28 und RT112
- Abb. 22: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika in der Linie EJ28
- Abb. 23: Modulation des Cholin-Uptakes in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zytostatika in der Linie RT112

## 9 Danksagung

Mein erster Dank geht an den Direktor der urologischen Klinik und Poliklinik Herrn Univ.-Prof.Dr. med. Gschwend für die Überlassung des Themas.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Betreuer, Prof.Dr.med. Uwe Treiber für die Unterstützung und Motivation während meiner Doktorarbeit bedanken. Ohne seine Hilfe und Geduld wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank geht auch an Fr.Prof.Dr. phil. Dr. med. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die nette und freundliche Unterstützung auch in von Frustration geprägten Zeiten. Ihre wertvollen Verbesserungsvorschläge waren immer hilfreich. Herzlichen Dank geht auch an alle MTA-s des nuklearmedizinischen und urologischen Labors.

Zu Dank bin ich auch Frau Dr. Lehmer für die die große Hilfe bei der Herstellung von IC-50 Kurven und Dr. Nawroth für die kritische Gedanken verpflichtet.

Abschließend danke ich ganz herzlich meiner Familie, die mich während der ganzen Zeit in jeder Hinsicht unterstützt und motiviert hat.