

**Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik der Technischen  
Universität München Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Der Einfluß von Vincristin auf die Aufnahme  
von H-3 Leucin in Lymphomzellen**

**Stephan Heres**

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

**Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier**

**Prüfer der Dissertation:**

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

**Die Dissertation wurde am 06.03.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.07.2001 angenommen.**

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>4</b>
	1.1 <i>Kurze Einführung in die Funktionsweise der Positronen-Emissions-Tomographie</i>	4
	1.2 <i>Einsatzgebiete der Positronen-Emissions-Tomographie</i>	5
	1.3 <i>Die Aminosäure Leucin</i>	14
	1.4 <i>Vincalukoblastine</i>	18
	1.5 <i>Ziele dieser Arbeit</i>	20
<b>2</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>22</b>
	<b>2.1 <i>Material</i></b>	<b>22</b>
	2.1.1 Zelllinie	...22
	2.1.2 Kulturmedien	...22
	2.1.3 Zusätze	...22
	2.1.4 Aminosäuren	...22
	2.1.5 radioaktiv markierte Substanzen	...22
	2.1.6 Zytostatika	...22
	2.1.7 sonstige Chemikalien	...23
	2.1.8 Zusammensetzung der verwandten Kulturmedien und anderer Lösungen	...23
	2.1.9 Geräte	...24
	<b>2.2 <i>Methoden</i></b>	<b>25</b>
	<b>2.2.1 Grundregeln beim Arbeiten mit der Zellkultur</b>	<b>...25</b>
	2.2.1.1 Auftauen der Zellen	...26
	2.2.1.2 Zellkultivierung	...26
	2.2.1.3 Wechsel des Kulturmediums	...26
	2.2.1.4 Einfrieren zur Langzeitlagerung	...27
	2.2.1.5 Vorbereitung der Zellen für einen Versuch und die Behandlung mit Vincristin	...27
	2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl	...28
	<b>2.2.2 Versuchsdurchführungen</b>	<b>...29</b>
	2.2.2.1 Abhängigkeit der aufgenommenen Leucinmenge von der Dichte der eingesetzten Zellen	... 29
	2.2.2.2 Abhängigkeit der Zählrate pro 10 <sup>6</sup> Zellen von unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen von H-3 Leucin	... 31
	2.2.2.3 Kinetik der Aufnahme von Leucin im Standardkulturmedium	... 32

2.2.2.4	Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen im Kulturmedium	...33
2.2.2.5	Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 50, 100 und 367 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin	...35
2.2.2.6	Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 17, 34, 50 und 100 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin	...36
2.2.2.7	Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei physiologischer Konzentration von Leucin	... 37
2.2.2.8	Messung der Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin innerhalb der ersten 10 Minuten in der Kontrollgruppe und nach Vincristinbehandlung	...38
2.2.2.8.1	Kurzkinetik ohne Erwärmung im Wasserbad	...38
2.2.2.8.2	Kurzkinetik bei physiologischer Konzentration von Leucin nach Erwärmung im Wasserbad	...39
2.2.2.8.3	Kurzkinetik bei einer Leucinkonzentration von 200 mg/l nach Erwärmung im Wasserbad	...39

### **3 Ergebnisse 41**

<b>3.1</b>	<b><i>Abhängigkeit der aufgenommenen Leucinmenge von der eingesetzten Zelldichte</i></b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Abhängigkeit der Zählrate pro 10<sup>6</sup> Zellen von unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen von H-3 Leucin</i></b>	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Kinetik der Aufnahme von Leucin im Standardkulturmedium</i></b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b><i>Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen im Kulturmedium</i></b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b><i>Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 50, 100 und 367 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin</i></b>	<b>51</b>
<b>3.6</b>	<b><i>Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 17, 34, 50 und 100 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin</i></b>	<b>55</b>

<b>3.7</b>	<b><i>Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei physiologischer Konzentration von Leucin</i></b>	<b>59</b>
<b>3.8</b>	<b><i>Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin innerhalb der ersten 10 Minuten in der Kontrollgruppe und nach Vincristinbehandlung</i></b>	<b>67</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Kurzkinetik ohne Erwärmung im Wasserbad</b>	<b>...67</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Kurzkinetik bei physiologischer Konzentration von Leucin nach Erwärmung im Wasserbad</b>	<b>...68</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Kurzkinetik bei einer Leucinkonzentration von 200 mg/l nach Erwärmung im Wasserbad</b>	<b>...71</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kurze Einführung in die Funktionsweise der Positronen-Emissions-Tomographie

Seit der Entwicklung der  $\gamma$ -Kamera durch Hal Anger im Jahre 1958, der Geburtsstunde der modernen bildgebenden Nuklearmedizin, hat dieses neue diagnostische Verfahren Einzug in viele Teilgebiete der heutigen Medizin gehalten. Auf die skeptische Frage von A.J. Fischman „quo vadis radioimmune imaging?“ (Fischman et al., 1989) fand man gerade in den letzten 10 Jahren eine Vielzahl richtungsweisender Antworten. Als nichtinvasive, bildgebende Verfahren gelangten die single-photon-emission-computed-tomography (SPECT) und die positron-emission-tomography (PET) schnell zu vielseitigen Einsatzmöglichkeiten, geraume Zeit allerdings beschränkten sich diese auf Grund der hohen Kosten und der noch geringen Erfahrung im Hinblick auf die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse auf die Verwendung zu Studienzwecken.

Schon 1995 gab es in Europa 31 Zentren, in denen neue Einsatzgebiete der Positronen-Emissions-Tomography (PET) gefunden wurden (Price et al., 1995), viele von ihnen ausgestattet mit einem hauseigenen Cyclotron. Die Nähe dieser Apparatur zur PET-Untersuchungseinrichtung ist entscheidend bei der Arbeit mit radioaktiv markierten Substanzen, deren Halbwertszeiten im Bereich weniger Minuten liegen, so z.B.  $^{15}\text{O}_2$  mit einer Halbwertszeit von 2 Minuten (Wilson, 1992). Neben dem radioaktiven Sauerstoff kommen auch  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$  und  $^{18}\text{F}$  zum Einsatz, die allesamt Positronen emittieren, die im Gewebe nach kürzester Distanz auf ein Elektron treffen.

Beim Zusammenprall dieser beiden Elementarteilchen entsteht die sogenannte Annihilationsstrahlung, eine  $\gamma$ -Strahlung, bestehend aus zwei Energiequanten à 511 keV, die sich in einem Winkel von  $180^\circ$  zueinander ausbreiten.

Erfasst man nun mittels des PET-Scanners, dessen zwei Detektoren in Koinzidenz miteinander verschaltet sind, diese Energieemissionen, so kann ein Schichtbild der Emission der beiden  $\gamma$ -Quanten im Gewebe erzeugt werden. (Bergström et al., 1993)

## **1.2 Einsatzgebiete der Positronen-Emissions-Tomographie**

Genutzt wird die PET in der Kardiologie, Psychiatrie, in den neurologischen Fachrichtungen und in zunehmendem Maße in der Onkologie. Der generelle Vorteil der PET gegenüber SPECT ist sicherlich die Authentizität der Tracer. Die markierten Moleküle gleichen den am körpereigenen Stoffwechsel beteiligten Substanzen, es unterscheidet sie lediglich die radioaktive Komponente. Gleiches gilt für körperfremde Substanzen: Schon 1993 war es möglich, 80% der handelsüblichen Pharmakotherapeutika radioaktiv zu markieren (Bergström, 1993) und somit deren Verteilung im Organismus, ihre Verstoffwechslung und Ausscheidung sogar in picomolaren Konzentrationsbereichen partiell zu verfolgen.

Die akute Infarkt Diagnostik erhält durch PET-Untersuchung Aufschluß über Perfussion und Funktion des geschädigten Herzens, ja sogar eine Unterscheidung zwischen potentiell erholungsfähigem, ischaemischem Muskelgewebe und nekrotischen Arealen ist durch PET mittels  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) möglich (Tamaki, 1999).

Auch die Erfolgsaussichten einer Bypass-Operation und somit die Indikation des Eingriffs lassen sich durch das FDG-PET abschätzen (Pasquet et al., 2000).

Die Studien an Rezeptormodellen zur Entstehung und Therapie psychiatrischer Erkrankungen, wie beispielsweise der Schizophrenie, konnten durch markierte Rezeptoragonisten (Larisch et Klimke, 1998; Lewis, 1998) genauso vorangetrieben werden wie auch die Bildgebung in der Alzheimer-Diagnostik (Vallabhajosula et Buchsbaum, 1994). In der Epilepsieforschung zeigte sich unter anderem folgende interessante Korrelation: Die Ausprägung des interiktalen Glucose-Hypometabolismus in der Temporallappen-Region ist als Prädiktor für den zu erwartenden Benefit einer temporalen Lobektomie einzuschätzen (Radtke et al., 1993).

Speziell in der Onkologie ergaben sich für die PET-Diagnostik eine Vielzahl überaus hilfreicher Einsatzmöglichkeiten, die 1997 auf der 2. Deutschen Konsensuskonferenz zusammengefaßt wurden (Weber et al, 1999).

Die Einsatzgebiete innerhalb der Onkologie kann man laut der II. deutschen interdisziplinären Konsensuskonferenz grob in folgender Weise unterteilen:

- Tumorsuche im allgemeinen, Auffinden unklarer Primärherde (Kopf- und Halscarcinome, Pankreascarcinom)
- Tumorstaging und -grading, Lymphknotenstaging, Metastasensuche (Gehirntumoren, Kopf- und Halscarcinome, nicht-kleinzellige Lungencarcinome, colorektales Carcinom, malignes Melanom, malignes Lymphom)

- Unterscheidung zwischen Rezidiv und narbigem Residuum (Gehirntumoren, colorektales Carcinom, differenziertes Schilddrüsenkarzinom)

Noch in der Forschungs- bzw. Erprobungsphase befinden sich folgende Einsatzmöglichkeiten:

- Prognosestellung schon vor der Behandlung
- genaue Charakterisierung des Tumors hinsichtlich des Rezeptor-Status oder des Hypoxygrades
- Response-Beurteilung bei Radio- und Chemotherapie
- OP-Planung bei stereotaktischen Eingriffen durch Hirnarealmapping
- Forschung an der multi-drug-resistance (MDR)

Die dynamische Flußmessung der Perfusion von Tumoren und deren Sauerstoffmetabolismus waren erste Schritte, vollzogen durch den Einsatz von  $^{15}\text{O}_2$  als Tracer bei Hirn- und Brusttumoren (Beaney et al., 1984). Vor allem die Erfolgchancen der Behandlung durch Chemotherapeutika, monoklonale Antikörper, Hyperthermie oder Radiotherapie konnten somit besser abgeschätzt werden, worauf später noch im Detail eingegangen werden wird.

Das Ganzkörper-PET bietet gerade bei Tumor- bzw. Metastasensuche schwer zu diagnostizierender Tumorarten besondere Vorteile. Mammakarzinom Herde unter 2 cm Durchmesser werden durch das  $^{18}\text{F}$ -FDG PET signifikant besser erkannt als mit SPECT, befallene axillare Lymphknoten von nur 1 cm Durchmesser können in hohem Maße, ohne diagnostische Exstirpation mittlerweile sicher erkannt werden (Avril et al., 1996; Yutani et al., 1999).



Auch die oft nicht darstellbaren Metastasen von Carcinoiden werden durch die selektive, irreversible Aufnahme von  $^{11}\text{C}$ -5-Hydroxytryptophan auffindbar (Bergström, 1993).

In der Literatur stößt man auf zahlreiche weitere Berichte über den Einsatz von PET in Diagnostik und Staging verschiedenster Tumorarten, so z.B. Gliomen (DiChiro, 1987; Delbeke et al., 1995; Kaschten et al. 1998), Mammacarcinomen (Nieweg et al., 1993; Dose et al. 1997; Avril et al., 1999; Avril et al., 2000), Lymphomen (Newman et al., 1994; Lapela et al., 1995; Moog et al., 1997), Lungencarcinomen (Guhlmann et al., 1997; Steinert et al., 1997; Vansteenkiste et al., 1998 ), Weichteiltumoren (Kole et al., 1997; Lucas et al., 1998), Kopf- und Halstumoren (Kole et al., 1998; Aassar et al., 1999) und Neoplasien im Thorax (Calvo et al., 2000).

Gerade in einem so entscheidenden Gebiet wie der Differentialdiagnostik tumoröser Erkrankung stellen sich die Vorteile der PET klar heraus.

Sind solitäre pulmonale Rundherde zu beurteilen, so ist bei Einsatz von  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET nicht nur eine sichere Diagnostik durch eine einzige Untersuchung gewährleistet (Gupta et al., 1996; Bury et al., 1996; Dewan et al., 1997; Lowe et al., 1998; Präuer et al., 1998), sondern auch eine Kostenminderung beim Staging des nicht-kleinzelligen Lungencarcinoms (NSCLC) (Gould et al., 1998; Gambhir et al., 1996) möglich. Schwierigkeiten ergeben sich bei den Carcinoiden mit primärer Lokalisation in der Lunge (Erasmus et al., 1998) und den bronchioalveolären Carcinomen (Higashi et al., 1997), deren Diagnose im PET bisher nur unzureichend zu stellen ist.

Zur Differentialdiagnose von Gliomen niedrigen Malignitätsgrades und nichttumorösen Strukturen erwies sich  $^{11}\text{C}$ -Methionin als geeignet

(Herholz et al., 1998), schon seit langem lassen sich Meningeome von Hypophysentumoren sowohl durch  $^{11}\text{C}$ -Methionin (Bergström, 1993) als auch durch das MAO-B-bindende  $^{11}\text{C}$ -Deprenyl (Bergström et al., 1992) unterscheiden.

Auf dem Gebiet der gynäkologischen Tumoren sind zystische Strukturen von benignen Tumoren und dem Mamma-Carcinom mittels  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET (Avril et al., 1996; Avril et al., 1997; Palmedo et al., 1997; Avril et al., 1999; Avril et al., 2000) diagnostisch klarer abzugrenzen als im MRT und Rezidive des Ovarial-Carcinoms (Karlan et al., 1993) früher zu erkennen. Dies erscheint umso bedeutsamer, als bekanntermaßen die Heilungschancen bei spätem Erkennen denkbar gering sind. Der Befall axillärer Lymphknoten, mitentscheidend für die Prognose, ist im Bereich bis zu 1 cm Durchmesser sicher durch PET beurteilbar (Avril et al., 1996; Crippa et al., 1998; Smith et al., 1998, Avril et al., 1999), im Bereich weniger Millimeter erwies sich die Untersuchung des Sentinel-Lymphknotens als überlegen (Krag et al., 1998). Lobuläre Mamma-Carcinome limitieren auf Grund ihrer geringgradigen Glucose-Utilisation die Einsatzmöglichkeiten der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET (Crippa et al., 1998; Avril et al., 2000).

Nebennierenrinden-Tumoren können von denen des Nebennierenmarks in der konventionellen Bildgebung mit CT oder MRT praktisch nicht unterschieden werden. Fehlen die wegweisenden pathologisch erhöhten Hormonspiegel, wird die nichtinvasive Diagnosestellung zum Problem. Abhilfe schafft hier der Einsatz von  $^{11}\text{C}$ -Metomidate, dem markierten Methyl-Ester eines  $11\beta$ -Hydroxylase-Hemmstoffes, im PET, dessen Messung die Zuordnung zu Rinde bzw. Mark, schneller und eindeutiger

als in der planaren Szintigraphie oder dem SPECT erlaubt (Bergström et al., 2000).

Daten zur Differentialdiagnose zwischen einer Entzündung des Pankreas und einer Neoplasie liegen bisher nur für fortgeschrittene Tumorstadien vor (Zimny et al., 1997; Keogan et al., 1998), vor allem die häufig anzutreffende hyperglykämische Stoffwechsellage bereitet hierbei große Probleme im Einsatz von  $^{18}\text{F}$ -FDG (Diederichs et al., 1998).

Befallene Lymphknoten und Metastasen von Melanomen können mit PET sicherer erkannt werden als in der planaren Szintigraphie oder SPECT (Holder et al., 1998; Macfarlane et al., 1998; Rinne et al., 1998), zusätzlich werden auch die Kosten der Diagnosestellung gesenkt (von Schulthess et al., 1998).

Entscheidende Fortschritte haben sich durch den Einsatz von PET auch bei der oft schwierigen Abgrenzung des rekurrentem Tumorwachstums von narbig-nekrotischen Arealen bei Gliomen (Barker et al., 1997), colorectalen Carcinomen (Keogan et al., 1997; Ogunbiyi et al., 1997), Lungentumoren (Patz et al., 1994; Inoue et al., 1995) und Neoplasien der Kopf-/Halsregion (Greven et al., 1997; Fischbein et al., 1998; Paulus et al., 1998) erzielen lassen.

Vor der Behandlung bietet sich bei manchen Tumoren eine Bestimmung des Rezeptorstatus an, da bei Nachweis geeigneter Bindungspartner spezielle Chemotherapeutika zum Einsatz kommen können, so etwa bei Hypophysentumoren (Muhr et al., 1991). Auch der Sauerstoffgehalt von Neoplasien kann vor Radiotherapie mittels markierter Nitroimidazole oder  $^{18}\text{F}$ -FDG beurteilt werden (Rasey et al., 2000; Hodgkiss et al., 1995;

Koh et al., 1992), was die Abschätzung erleichtert, ob eine Bestrahlung erfolgversprechend ist oder nicht. Generell befinden sich jedoch sowohl die Rezeptorbestimmung als auch die Messung des Sauerstoffgehaltes noch im Forschungsstadium und werden noch nicht in der klinischen Routine eingesetzt.

Ist die Therapieentscheidung gefallen, so ist es des weiteren bei einigen Krebserkrankungen möglich, durch Messung der Stoffwechselaktivität im betroffenen Gewebe, Aussagen über den Malignitätsgrad bzw. die Heilungschancen zu machen. Eingesetzt wurden hierzu markierte Aminosäuren und  $^{18}\text{F}$ -FDG, deren Aufnahme ins Tumorgewebe gemessen wurde, so bei NonHodgkin-Lymphomen (Rodriguez et al., 1995; Leskinen-Kallio et al., 1991), Gliomen (Alavi et al., 1988; DiChiro et al., 1987; Patronas et al., 1985; Barker et al., 1997), Lymphomen (Okada et al., 1991; Okada et al., 1994), intracraniellen Meningeomen (DiChiro et al., 1987), Mammacarcinomen (Adler et al., 1995; Oshida et al., 1998; Avril et al., 1999) und Lungencarcinomen (Fujiwara et al., 1989).

Eine stärkere Glucose-Utilisation bzw. Aufnahme von Aminosäuren wurden in diesen Studien als Zeichen gesteigerter Wachstumsaktivität und somit einer höhergradigen Malignität gedeutet. Bei näherer Betrachtung zeigte sich, daß nach der malignen Transformation einer Zelle die Aufnahme von Glucose um den Faktor fünf zunahm (Flier et al., 1987), was auf die Änderungen der Aktivität der Hexokinase und des transmembranösen Glucosetransports zurückzuführen war (Birnbaum et al., 1987).

Neben diesen Untersuchungen, die Aussagen zur Prognose ermöglichen, trieb man in den letzten Jahren zunehmend auch Studien voran, die bereits kurz nach Beginn einer Chemo- oder Strahlentherapie zuverlässige Ergebnisse in puncto Wirksamkeit der eingeleiteten Maßnahme liefern können. Als sogenannten Response-Predictoren wurden wiederum  $^{18}\text{F}$ -FDG aber vor allem auch diverse markierte Aminosäuren verwandt. Der Grundgedanke aller dieser Studien ist die Messung einer Stoffwechselleistung des Tumorzellverbandes zum Zeitpunkt vor und nach der angewandten Therapie. Findet man einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Messungen und tritt im Verlauf der weiteren Behandlung eine Besserung des klinischen Zustandes ein, so könnte eventuell die Bestimmung dieses Stoffwechselvorganges ein Predictor für die Wirksamkeit der Therapieform bei dieser speziellen Tumorentität und des zu erwartenden Langzeiterfolgs sein.

Beispielsweise zeigte eine in vitro Untersuchung einer menschlichen Colonicarcinom-Zellreihe 24 Stunden nach Behandlung mit dem Zytostatikum Dinaline<sup>®</sup> eine geringere Aufnahme an Thymidin als Zeichen der verminderten DNA-Synthese und somit eines Wachstumsrückganges. Desweiteren stieg initial die Aufnahme von FDG in die Tumorzelle an, was man als Streßreaktion der Zelle bezeichnet (Wertheimer et al., 1991; Pasternak et al., 1991). Methionin wurde auf Grund der gesteigerten Proteinbiosynthese in höherem Maße verstoffwechselt und  $\alpha$ -Amino-Iso-Buttersäure konnte ob eines Transporterdefektes gar nicht mehr aufgenommen werden (Schaidler et al., 1996).

Weitere Erkenntnisse konnte man für folgende Tumorarten und deren

Ansprechen auf die gewählte Therapieform bisher sammeln: Radiotherapie bei Kopf- und Halstumoren (Ichiya et al., 1991; Sato et al., 1992); Chemotherapie kindlicher Tumoren der hinteren Schädelgrube und primitiver neuroektodermaler Carcinome (Holthoff et al., 1993); Radiotherapie von Adenocarcinomen (Higashi et al., 1993); Chemotherapie von Colonicarcinomen (Schaidler et al., 1996) und Hypophysentumoren (Bergström et al., 1987); bei Lebertumoren (Oya et al., 1996) und deren Chemoembolisation (Vitola et al., 1996); Radiotherapie von Hirntumoren (Lau et al., 1994), Chemotherapie bei Lymphomen (Römer et al., 1998) und Mammacarcinomen (Avril et al., 1999).

Zum Abschluß dieses Einblicks noch ein paar interessante aktuelle Forschungsausblicke: Ist bei einer Tumorerkrankungen eine Operation in der Gegend des sulcus centralis indiziert, so konnte bisher nur die intraoperative corticale Stimulation (ICS) Aufklärung über die Verteilung der Funktionsareale in dieser äußerst wichtigen Zone bringen. Durch den gemeinsamen präoperativen Einsatz von funktionellem MRT und PET ist es neuerdings möglich, einigen Funktionen ihre Repräsentanz auf dem Cortex zuzuordnen (Bittar et al., 3/1999 und 12/1999), wodurch auf lange Sicht eventuell die gefahrenträchtigere ICS entbehrlich werden kann.

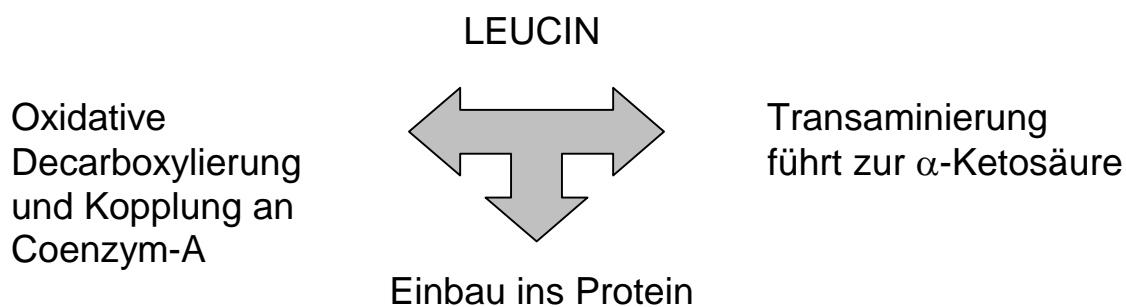
Die Optimierung der Planung stereotaktischer Operationen oder Biopsie-Entnahmen mittels PET ist schon seit längerem ein gebräuchliches Verfahren in der Neurochirurgie (Levivier et al., 1995; Maciunas et al., 1992).

Auch bei der Aufklärung des Zustandekommens der multiple-drug-resistance (MDR) wird das PET unter Verwendung von  $^{11}\text{C}$ -Colchicin eingesetzt. Besser als mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi im SPECT, das

nicht elektroneutral ist, gelingt mit dem markierten Colchicin eine ergänzende Beschreibung der Wirkungsweise des P-Glycoproteins, das für die MDR mitverantwortlich gemacht wird (Levchenko et al., 2000).

### 1.3 Die Aminosäure Leucin

Neben Valin und Isoleucin vervollständigt Leucin mit einem Molekulargewicht von 131 die Gruppe der verzweigt-kettigen neutralen Aminosäuren. Alle Angehörigen dieser Gruppe können vom menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden und zählen somit zu den essentiellen Aminosäuren. Die Resorption erfolgt im Dünndarm über Transportsysteme mit hoher Affinität zum Substrat, worauf später noch im Detail eingegangen werden wird. Nach Aufnahme in das Zytoplasma stehen der Zelle drei wesentliche Wege zur weiteren Nutzung des Leucins zur Verfügung:



Nach Transaminierung und oxidativer Decarboxylierung kann der an Coenzym-A gekoppelte Rest zu Acetyl-CoA und Acetoacetat gespalten werden, weshalb Leucin zu den ketoplastischen Aminosäuren zählt. Somit dient es als Energie- und Aminogruppenspender, jedoch steht der Einbau ins Protein eindeutig im Vordergrund (Ishiwata et al., 1993; Ishiwata et al., 1993).

In einer Untersuchung waren bereits 60 Minuten nach Injektion von radioaktiv markiertem Leucin über 95% in die Proteinsynthese geflossen und somit in der säureunlöslichen Fraktion des Zell-Lysates nachweisbar (Lauenstein et al., 1987).

Bei der Behandlung schwerer Erkrankungen, wie Sepsis, systemischen Entzündungen, Traumata, Verbrennungen, Leber- und Nierenversagen spielen Aminosäuren im Allgemeinen eine wesentliche Rolle (Clevenger, 1993). Man fand in Studien zu diesem Thema heraus, daß Leucin zusätzlich die Bildung von Akute-Phase-Proteinen ganz besonders stark stimulieren kann, was der Heilung zuträglich ist (Grant, 1994).

Die Charakterisierung des Transports über eine biologische Membran warf beim Leucin einige Probleme auf. Schon 1973 beschrieb H.N. Christensen den  $\text{Na}^+$ -unabhängigen L-Transporter, der verzweigt-kettige neutrale Aminosäuren bevorzugt (Christensen, 1973; Stevens et al., 1984; Souba et al., 1992). Die Aminosäuren, die über dieses Transportsystem aufgenommen werden (Leucin, Isoleucin und Valin), konkurrieren an dem Transporter miteinander.

Allerdings ist die Aufnahme von Leucin durch andere neutrale Aminosäuren, z.B. Alanin hemmbar (Christensen, 1985; Ramesh et al., 1997), in geringem Maße sogar durch basische Aminosäuren (Stevens, 1992; Souba et al., 1992).

Auch resultiert die Blockierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe durch Ouabain in einem Rückgang der Aufnahme. Es erscheinen also neben dem L-System auch der Transport über das  $\text{Na}^+$ -abhängige A-, ASC bzw. B<sup>o</sup>-System und Diffusionsvorgänge eine Rolle zu spielen. Die starke Hemmung der Aufnahme von Leucin durch 2-aminobicyclo(2,2,1)heptan-



2-carboxyl-Säure (BCH), einem spezifischen Inhibitor des L-Leucins-Transporters stellt sicherlich dessen führende Rolle heraus (Le Cam und Freychet, 1977; Barker et al., 1999; Heiss et al., 1999).

Bei der genaueren Untersuchung dieses Transporters an Chondrozyten fand man heraus, daß er zwar in fast allen Systemen des menschlichen Körpers präsent ist, aber in manchen Geweben eine vielfach höhere Affinität zum Substrat, sogar in  $\mu\text{molaren}$  Konzentrationsbereichen aufweist. Möglicherweise besteht also der L-Leucins-Transporter nicht nur aus einem, immer gleichen Makromolekül, sondern besitzt Unterformen verschiedener Affinität zum Substrat Leucin (Barker et al., 1999). Ähnliche Beobachtungen gibt es für Hepatozyten (Weissbach et al., 1982), Lymphozyten (Segel et al., 1983; Segel et al., 1984; Segel et al., 1988) und von der Blut-Hirn-Schranke (Christensen, 1989).

Aufgrund mehrerer günstiger Eigenschaften empfiehlt sich die Markierung von Leucin für Beobachtungen des Stoffwechsels von Tumorzellen: Die Aminosäure wird nach der Aufnahme in die Zelle nahezu vollständig zur Proteinsynthese verwandt. Dies erleichtert die Interpretation der Meßergebnisse enorm, da andere Aminosäuren, wie beispielsweise das Methionin, zahlreiche weitere Stoffwechselwege innerhalb der Zelle beschreiten (Lauenstein et al., 1987; Ishiwata et al., 1993; Shields et al., 1996).

In punkto Markierung ist allerdings zu beachten, daß durch, zwar minimale aber mögliche oxidative Decarboxylierung die Messung verfälscht werden kann. Trägt die Carboxylgruppe die Markierung im Kohlenstoffatom so wird die gekennzeichnete Gruppe vom restlichen Molekül abgetrennt. Zusätzlich stellt das radioaktive  $^{11}\text{CO}_2$  vor der

Abatmung eine Störgröße dar (Shields et al., 1992). In dieser Arbeit wurde  $^3\text{H}$ -(4,5)Leucin benutzt, um diesem Effekt vorzubeugen.

Die Decarboxylierung spielt bei anderen Aminosäuren, z.B. Methionin eine wesentlich größere Rolle, weshalb der Anteil dieser Aminosäuren an der säureunlöslichen Fraktion (acid precipitable fraction=APF) geringer ist (Lauenstein et al., 1987; Ishiwata et al., 1993; Heiss et al., 1999) als der des  $^{11}\text{C}$ -Leucins.

Auch bilden hierbei zusätzlich zum Protein, die Lipide (Ishiwata et al., 1988; Lakher et al., 1987) und Nukleinsäuren (Phelps et al., 1984) einen Teil der APF, was man beim Leucin nicht beobachten kann (Ishiwata et al., 1993; Ishiwata et al., 1993). Die aromatische Aminosäure-Decarboxylase wiederum hat auf das oft verwandte  $^{14}\text{C}$ -Tyrosin einen starken Einfluß (Ishiwata et al., 1988), der beim  $^{14}\text{C}$ -Leucin weit weniger ausgeprägt festzustellen war (Keen et al., 1989).

Im Bereich der Bildgebung von Tumoren des ZNS sind Aminosäuren wesentlich besser geeignet als der sonst so gebräuchliche Tracer  $^{18}\text{F}$ -FDG. Dies liegt einerseits an der hohen Glucose-Utilisation, die man in der grauen Substanz unter physiologischen Bedingungen antrifft, weshalb ein nur schwacher Kontrast zu möglichen Neoplasien resultieren würde. Aminosäuren liefern hier einen ungleich höheren Kontrast, da ihr Stoffwechsel auf einem deutlich niedrigeren Grundniveau verläuft (Weber et al., 1997). Andererseits mißt man in entzündlichen Bereichen aufgrund der Makrophagenaktivierung gerade nach erfolgter Therapie eine stark erhöhte Glucose-Aufnahme. Selbiger Effekt soll bei Aminosäuren in geringerem Maße auftreten (Kubota et al., 1994; Kubota et al., 1995).

Weder akute noch chronische Hyperglykaemie haben einen signifikanten Einfluß auf die Aufnahme von Leucin in die Tumorzelle, was eine wichtige Grundvoraussetzung darstellt, wenn man bedenkt, daß ca. 37 bis 60% der Krebspatienten bei einem Standard-Glucose-Toleranztest pathologische Ergebnisse aufweisen (Levin et Gevers, 1981).

Die akute Hyperglykaemie veränderte bei Einsatz von  $^{18}\text{F}$ -FDG und  $^3\text{H}$ -Thymidin die Messungsergebnisse signifikant (Langen et al., 1993; Lindholm et al., 1993). Bei  $^3\text{H}$ -Methionin und  $^3\text{H}$ -Leucin trat dieser Effekt nicht auf (Torizuka et al., 1997).

Eine gesteigerte Aufnahme ist für  $^{18}\text{F}$ -FDG bei minderoxygenierten Adenocarcinomen und Melanomen bereits bekannt (Wahl et al., 1992; Clavo et al., 1995). Weniger aussagekräftig sind die Untersuchungen des Einflusses eines verminderten Sauerstoffgehaltes des Gewebes auf die Leucinaufnahme. Während Thymidin bei 0% und 1,5% Sauerstoffbegasung sowohl von Melanom- wie Ovarialcarcinomzellen weniger stark aufgenommen wurde, zeigte Leucin bei den unterschiedlichen Konzentrationen und Carcinomtypen verschiedenes Verhalten, bei Methionin trat keine Veränderung der Aufnahme ein (Clavo et Wahl, 1996).

#### **1.4 Vincalokoblastine**

Im Rahmen des experimentellen Abschnittes dieser Arbeit wird das Pharmacon Vincristin Verwendung finden, weshalb kurz auf seine Eigenschaften näher eingegangen wird.

Aus der Pflanze *Catharanthus rosea* kann ein dimerer Alkohol gewonnen werden, dessen Sulfatsalz als Vincristin bezeichnet wird. Dieses ist

strukturell dem Vinblastin gleich und besteht aus zwei verbundenen aromatischen Multiringssystemen, dem Vindolin und Catharanthin. Als Pharmakon wird Vincristin intravenös appliziert, worauf es sich schnell im Organismus verteilt und an Thrombozyten und Erythrozyten bindet. Die Ausscheidung erfolgt zu ca. 70% hepatisch, zu 30% renal.

Man beobachtete schon 1960 einen Effekt dieser Substanzen auf die Zellteilung, den man bereits vom Colchicin her kannte. Die untersuchten Zellen zeigten eine höhere Mitosedichte als die unbehandelte Kontrolle, was jedoch nicht auf einer höheren Teilungsrate, sondern auf dem „Verharren“ der Zellen in der Metaphase der Zellteilung beruhte. Dieses Bild war als sogenannte C-Mitose, in Anlehnung an das Colchicin bereits vorbeschrieben (Palmer et al., 1960; Frei et al., 1964).

Der Effekt der Stathmokinesis war beim Vincristin ungleich größer als beim Colchicin, jedoch ließ sich der Effekt durch Zugabe von Aminosäuren hemmen, was beim Colchicin nicht der Fall ist (Cutts, 1961). Da die Vinkaleukoblastine lediglich reversibel an das  $\alpha$ - und  $\beta$ - Tubulin des Spindelapparates bei der Zellteilung binden, beobachtete man keine Effekte wie Chromosomenstickiness oder –brüche, die man von anderen Medikamenten mit Wirkung auf die Zellteilung kannte (Noble und Beer, 1968). Allerdings ordnete man die Änderung der Lokalisation der Golgi-Apparate und die Aufweitung des Endoplasmatischen Retikulums zuerst dem direkten Einfluß des Vincristins zu (Ericson, 1980).

Weitere Studien, die sich mit dem genauen Vorgang des programmierten Zelltodes, der Apoptose unter Einwirken verschiedener Zytostatika befaßten, legten eher den Schluß nahe, daß durch Vincristin und andere Pharmaka, wie 5-Fluorouracil oder Methotrexat, Signale des

Zellwachstums und Stoffwechsels gestört werden, die dann sekundär zum Zelltod führen (Marks und Fox, 1991; Lowe et al., 1993).

Diese These stützt auch die Erkenntnis, daß bei Aktivierung des bcl-2-Onkogens, welches den Vorgang der Apoptose im späten Stadium blockieren kann, zwar der Zelltod ausbleibt, die initiale Wirkung der Zytostatika aber unverändert zu beobachten ist (Fisher et al., 1993; Kamesaki et al., 1993; Yin et al., 1995; Tey et al., 2000).

Die Phänomene der Apoptose lassen sich bei einigen Zytostatika (Vincristin, Dexamethason, Methotrexat, FudR und 5-FU) in der Zellmorphologie und in der DNA-Degradierung genau charakterisieren, der Effekt tritt von den genannten Substanzen bei Vincristin am schnellsten ein, nämlich schon nach 18 Stunden (Huschtscha et al., 1996). Eine interessante unerwünschte Nebenwirkung der Vincaläuboblastine ist die mögliche Induktion einer multiple-drug-resistance, die vermehrt unter dem Einsatz von Vincristin beobachtet wird (Sirotnak, 1986). Die Zellreihe, die in dieser Arbeit Verwendung findet ist sensibel gegenüber der Einwirkung von Vincristin, verharrt also nach Applikation des Chemotherapeutikums in der Mitose. Die Auswirkungen dieser Stathmokinosis auf die Aufnahme der Aminosäure Leucin und deren weitere Verstoffwechslung innerhalb der Tumorzelle werden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

## **1.5 Ziele dieser Arbeit**

Da Leucin nach der Aufnahme in die Zelle praktisch ausschließlich in Proteine eingebaut wird, bietet sich die Aminosäure als idealer Parameter zur Bestimmung der Proteinsyntheseleistung einer Zelle an.

An der Lymphomzelllinie soll primär untersucht werden, ob die Geschwindigkeit der Aufnahme der Aminosäure in die Zelle nach einer

gewissen Zeit ein Plateau erreicht, wie dies für anderen Aminosäuren beschrieben ist.

Anhand von Messungen der Aufnahmekinetik innerhalb der ersten Minuten soll die Funktionsweise des zugrunde liegenden Transporters und des Effektes der Transstimulation charakterisiert werden.

Ferner war von Interesse, ob Aufnahme und Einbau parallel zueinander verlaufen und somit die Menge an freier Aminosäure in der Zelle konstant bleibt.

Unter der Annahme, daß der Einbau in das Protein den zeitlich limitierenden Schritt darstellt, dürfte die Proteinsynthese auch nicht durch hohe Mengen an angebotenen Leucin im Kulturmedium steigerbar sein. Hierzu wurden Versuche in verschiedenen Konzentrationsbereichen an Leucin durchgeführt.

Das Chemotherapeutikum Vincristin läßt Tumorzellen in der Metaphase des Teilungszykluses verharren und hat somit auch Auswirkungen auf die Proteinsynthese der Zellen. Diesen Effekt und eine eventuelle Auswirkung auf die Aufnahme der Aminosäure oder den Einbau in das Protein galt es nachzuweisen.

Auch sollten Versuche bei verschiedenen Konzentrationen an Leucin zeigen, ob die vermuteten Effekte von der Menge des angebotenen Leucins abhängig sind.

Anhand der Ergebnisse sollte beurteilt werden, ob die Aufnahme von radioaktiv markiertem Leucin ins Tumorgewebe möglicherweise als Responseprädiktor für die Wirksamkeit einer Vincristinbehandlung bei Lymphomzellen geeignet ist.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zelllinie**

In den Experimenten dieser Arbeit wurden Zellen der Suspensionszelllinie SU DHL-4 verwandt. Diese Zellen entstammen einem humanen, schnellwachsenden, histiozytären Lymphom und wurden von der III. Medizinischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar zur Verfügung gestellt..

#### **2.1.2 Kulturmedien**

RPMI 1640	Best. Nr. 1215	Biochrom KG
RPMI 1640 (ohne L-Leucin)	Best. Nr. 11871	Gibco-BRL (Life Technologies)

#### **2.1.3 Zusätze**

Neonatales Kälberserum	Best. Nr. S 0125	Biochrom KG
------------------------	------------------	-------------

#### **2.1.4 Aminosäuren**

L-Leucin	Best. Nr. 21077-011	Gibco-BRL (Life Technologies)
----------	---------------------	----------------------------------

#### **2.1.5 radioaktiv markierte Substanzen**

L-[4,5- <sup>3</sup> H] Leucin (spezifische Aktivität 2,59 TBq/mmol)	Best. Nr. TRK754 Buckinghamshire,GB	Amersham Internat.
---	--	--------------------

#### **2.1.6 Zytostatika**

Vincristin Bristol, Trockensubstanz (1mg)	Bristol-Meyer, Squibb
---	-----------------------

### 2.1.7 sonstige Chemikalien

Natriumhydroxid, 3 N		Hausapotheke MRI
PBS- Dulbecco	Best. Nr. L 1825	Biochrom KG
Quickszint 2000	Best. Nr. 1007700	Zinsser Analytik
SDS Sodiumdodecylsulfat	Best. Nr. 161-0302	Bio- Rad
Trypanblau-Lsg. 0,5 %	Best. Nr. T- 8154	Sigma
DMSO Dimethylsulfoxid	Best. Nr. D- 05879	Sigma

### 2.1.8 Zusammensetzung der verwandten Kulturmedien und anderer Lösungen

Standardkulturmedium	500 ml RPMI 1640 / 1215 50 ml neonatales Kälberserum
leucinfreies Kulturmedium	500 ml RPMI 1640 / 11871 50 ml neonatales Kälberserum
leucinangereicherte Kulturmedien	500 ml RPMI 1640 / 11871 jeweiliger Zusatz von L-Leucin [50mg/10ml]
Einfriermedium 20 % NKS	60 % Kulturmedium  20 % DMSO
TCA-Lösung	10%ige Tetrachloressigsäure
NaOH zur Zellyse 390 ml NaOH, 3 N	15 ml Aqua dest.  45 ml SDS (1%)



## 2.1.9 Geräte

Wärmeschrank:	Typ 6060 CU Firma Heraeus Instruments, Hanau eingestellt auf 37°C, bei 5% CO <sub>2</sub>
Arbeitsbank (steril):	Typ Lamin Air HB 2472 Firma Heraeus Instruments, Hanau
Gefrierbehälter:	Stickstoffbehälter BT 55 Deutsche Air Liquid Anlagebau GmbH, Wiesbaden
Schüttelapparatur:	4010 Multi-Tube Vortexer, Corning Medical, Medfield (USA)  Vibrofix VF1 electronic Jahnke und Kunkel, IKA Labortechnik
Mikroskop:	Typ Axiovert 10 Zeiss Oberkochen
Zentrifugen:	Typ Megafuge 1,0, Typ Biofuge 13 und 15 Heraeus Sepatech, Osterode
Analytikwaage:	Typ A 120 S Sartorius Analytic GmbH Göttingen

Kulturgefäße: Cellstar  
Typ 75 ccm/ 250 ml, Art.Nr. 658170  
Typ 175 ccm/ 650 ml, Art.Nr: 660160  
Firma Greiner

Wasserbad: Kötterman 3745

Szintillationsröhrchen: Art.Nr. 3020001  
Zinsser Analytic, Frankfurt,

Neubauer-Zählkammer: Art.Nr.13612  
MD-Kova, Madaus Diagnostika Köln,

Betacounter: Typ1219 Rackbeta  
Liquid Szintillation Counter  
LKB Instrument GmbH Oberschleißheim

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Grundregeln beim Arbeiten mit der Zellkultur**

Alle Medienwechsel und Arbeitsschritte innerhalb der Versuche wurden bis zum Zeitpunkt der Inkubation im Wasserbad unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Verwendung kamen lediglich sterile Medien und Zusätze, gearbeitet wurde an einer sterilen Arbeitsbank mit sterilen Geräten. Die Kulturmedien und sämtliche Zusätze wurden im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.1.1 Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden aus der portionsweisen Lagerung in flüssigem Stickstoff entnommen und der Inhalt des Gefäßes unter fließendem warmen Wasser langsam aufgetaut. Die entstandene Zellsuspension wurde mit 5 ml Standardkulturmedium versetzt, kurz mit der Pipette resuspendiert und nach ca. 2 Minuten Ruhephase bei 390 g über 5 Minuten in der Megafuge zentrifugiert. Der Überstand über dem resultierenden Pellet wurde abgesaugt und verworfen, die Zellen mit 5 ml Standardkulturmedium sorgfältig resuspendiert, zu 10 ml Medium in einer neuen Kulturflasche hinzugefügt und im Wärmeschrank aufbewahrt.

### **2.2.1.2 Zellkultivierung**

Die Zellen wurden in 250 ml Kulturflaschen in jeweils 15 ml Standardkulturmedium bei 37°C unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> und 100%iger Luftfeuchtigkeit im Wärmeschrank kultiviert. Somit waren optimale Wachstumsbedingungen gegeben.

### **2.2.1.3 Wechsel des Kulturmediums**

In zwei- bis dreitägigem Rhythmus wurden die Zellen in neues Medium eingebracht. Das starke Wachstum machte es zusätzlich notwendig, daß die Dichte der Zellen pro Kulturflaschen ca. bei jedem zweiten Wechsel halbiert werden mußte. Nach der Entnahme aus dem Wärmeschrank wurden die Zellen kurz mit der Pipette in der Kulturflasche gleichmäßig in Lösung gebracht, in Zentrifugenröhrchen abpipettiert und anschließend über 5 Minuten bei 390 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pelett mit 15 ml frischem Standardkulturmedium versetzt und in eine neue Kulturflasche eingebracht.

#### **2.2.1.4 Einfrieren zur Langzeitlagerung**

Die überschüssigen Zellen wurden zur Langzeitlagerung auf eine Konzentration von ca.  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml in Kulturmedium mit 20%igem NKS-Anteil eingebracht. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten im Kühlraum bei 4°C, alle Lösungen waren dementsprechend temperiert. Das Einfriermedium wurde tropfenweise zugegeben, bis eine Verdünnung von 1:2 der Ausgangslösung erreicht war. Die Zellsuspension wurde in Kryo-Röhrchen zu je 1ml abpipettiert und zunächst bei -60° C für 24 Stunden vorgekühlt, dann in flüssigem Stickstoff bei -189°C gelagert.

#### **2.2.1.5 Vorbereitung der Zellen für einen Versuch und die Behandlung mit Vincristin**

Am Vortag der Behandlung wurden die Zellen mit frischem Standardkulturmedium versorgt und auf ca.  $2,6 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Es zeigte sich, daß die Zelldichte innerhalb von 24 Stunden um ca. 50% zunahm. Die Zellen blieben generell bei allen Versuchen bis eine Stunde vor Inkubation mit H-3 Leucin in Standardkulturmedium, in Abhängigkeit vom jeweiligen Versuchsaufbau wurde in der letzten Stunde vor Zugabe des radioaktiven Tracers die Konzentration an Leucin im Medium variiert.

### **2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50  $\mu\text{l}$  einer frisch resuspendierten Zellkultur aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und mit 150  $\mu\text{l}$  Trypanblau im Eppendorfcup mittels Vortex gleichmäßig vermischt. Nach Einbringen in eine Neubauer-Zählkammer war die Unterscheidung zwischen den abgestorbenen, farbstoffanreichernden Zellen und den lebenden, farbstofffreien Zellen möglich. Es wurden sämtliche 9 Zählkammern unter Einbeziehung zweier, immer gleichbleibender Randlinien zur Vermeidung von Doppelzählungen ausgewertet. Der Mittelwert des begutachteten Kammern ergab mit dem Verdünnungsfaktor 4 und dem kammerspezifischen Zählfaktor ( $10^4$ ) die entsprechende Zellzahl pro ml Zellsuspension. Die Zelldichte pro Kulturflasche konnte daraufhin für das kontrollierte Wachstum im Wärmeschrank bzw. die Versuchsbedingungen optimal eingestellt werden.

## **2.2.2 Versuchsdurchführungen**

### **2.2.2.1 Abhängigkeit der aufgenommenen Leucinmenge von der Dichte der eingesetzten Zellen**

Am Vortag des Versuches wurden die Zellen in den Kulturflaschen mit neuem Standardkulturmedium versorgt und auf  $2,6 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Am Versuchstag selbst wurde eine Zellsuspension von  $3,9 \times 10^6$  Zellen pro ml eine Stunde vor Zugabe des radioaktiv markierten Leucins in frisches Standardkulturmedium eingebracht und anschließend auf Eis gelagert. Damit verhinderte man das fortschreitende Wachstum der Zellen bis zum Versuchsbeginn.

Jeweils 50 und 100  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden mit Standardkulturmedium auf 150 $\mu\text{l}$  Gesamtmenge ergänzt, wodurch zwei Lösungen mit Zelldichten von 1,29 und  $2,59 \times 10^6$  Zellen pro ml, neben der Ausgangslösung mit  $3,88 \times 10^6$  Zellen pro ml entstanden. Dieser Bereich der Zelldichte war bereits in vorausgegangenen Versuchen innerhalb der Forschungsgruppe als geeignet beschrieben worden.

In drei parallelen Versuchreihen wurden nun Eppendorfcups auf Eis mit je 150  $\mu\text{l}$  eiskalter H-3 Leucinlösung der Aktivitätskonzentration von 20  $\mu\text{Ci/ml}$  (0,74 MBq/ml) und 150  $\mu\text{l}$  einer der drei verschiedenen Zellsuspensionen gefüllt. Der Versuchsansatz wurde auf Eis angesetzt, um einen vorzeitigen Beginn der stark temperaturabhängigen Aufnahme von Leucin zu verhindern. Nach kurzem Vermischen der Reagenzien durch Vortexen erfolgte die Inkubation für 45 Minuten im Schüttelwasserbad bei konstanten 37 °C.

Die Reaktion wurde nach Entnahme aus dem Wasserbad durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS sofort abgestoppt und die Zellen durch Zentrifugieren bei 390 g über 5 Minuten vom Überstand getrennt. Das "Waschen" erfolgte in der Kältekammer bei 5°C durch Resuspension des Pellets nach Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS, Vortexen und erneutem Abzentrifugieren der Zellen. Dieser Waschvorgang wurde in gleicher Weise bei allen Versuchen dreimal hintereinander vollzogen. Nach dem letzten Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 1 ml NaOH + 1% SDS, Vortexen und einer Ruhephase über Nacht.

Am folgenden Tag entnahm man nach erneuter Durchmischung des Zell-Lysates durch Vortexen zwei Aliquots (à 400µl) und ergänzte diese durch 3 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsröhrchen. Im Beta-Counter wurde die Aktivität je Probe in counts per minute (cpm) bestimmt und durch die spezifische Zählrate (cpm / nmol Leucin) (vgl. Punkt 3.3) die aufgenommene Menge an Leucin berechnet.

Die spezifische Zählrate resultierte aus der eingesetzten Menge an markierter Aminosäure und der Gesamtmenge an Leucin im Versuchansatz. Hieraus läßt sich berechnen, wie viele Impulse pro Minute (cpm) man bei der Aufnahme eines nmol an Leucin registriert. Je geringer der Anteil an markierter Aminosäure am Gesamtpool von Leucin im Versuchansatz ist, desto weniger cpm werden bei der Aufnahme von einem nmol Leucin gemessen werden.

### **2.2.2.2 Abhängigkeit der Zählrate pro $10^6$ Zellen von unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen von H-3 Leucin**

In Anlehnung an den vorangegangenen Versuch wurde nun die eingesetzte Zelldichte normiert und die Konzentration der zugesetzten radioaktiven Aminosäure variiert. Zu diesem Zweck fanden der Mediumwechsel und die Einstellung der Zellzahl am Vortag in oben beschriebener Weise statt, die Zellsuspension wurde 1 Stunde vor Versuchsbeginn mit frischem Standardkulturmedium versorgt, auf eine Konzentration von  $2,4 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt und auf Eis gekühlt. Eine Stammlösung mit einer Aktivitätskonzentration von  $10 \mu\text{Ci/ml}$  ( $0,37 \text{ MBq/ml}$ ) wurde im Verhältnis 2:1 und 1:2 mit Standardkulturmedium verdünnt, sodaß Konzentrationen von  $6,67 \mu\text{Ci/ml}$  ( $0,24 \text{ MBq/ml}$ ) und  $3,33 \mu\text{Ci/ml}$  ( $0,12 \text{ MBq/ml}$ ) resultierten. Alle drei Aktivitäts-Lösungen wurden auf Eis gekühlt.

In den parallelen Versuchsreihen bildeten je  $150 \mu\text{l}$  der Zellsuspension und  $150 \mu\text{l}$  einer jeweiligen Aktivitäts-Lösungen einen Ansatz, der in eisgekühlte Eppendorfcups eingebracht und mit dem Vortex vermischt wurde. Die Inkubation erfolgte über 45 Minuten im Schüttelwasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  mit anschließendem sofortigem Abstoppen durch Zugabe von  $1 \text{ ml}$  eiskaltem PBS. Die Eppendorfcups wurden dreimal hintereinander zuerst bei  $390 \text{ g}$  zentrifugiert, dann mit  $1 \text{ ml}$  kaltem PBS resuspendiert, gevortext und anschließend wieder zentrifugiert. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte die Lyse durch Zugabe von  $1 \text{ ml NaOH} + 1\% \text{ SDS}$  und eine Ruhephase über Nacht.

Am folgenden Tag wurden jeweils zwei Aliquots ( $\acute{a}$   $400 \mu\text{l}$ ) nach



Szintillationsröhren abpipettiert und mit jeweils 3 ml Szintillationsflüssigkeit ergänzt. Die Messung der Aktivität der Proben (cpm) erfolgte im Beta-Counter.

### **2.2.2.3 Kinetik der Aufnahme von Leucin im Standardkulturmedium**

Die Betrachtung der Aufnahme des radioaktiv markierten L-Leucins in die Tumorzelle wurde nun auf mehrere verschiedenen Zeitpunkte ausgedehnt. Als Wachstums- und Versuchsmedium diente das Standardkulturmedium mit einer Konzentration an L-Leucin von 50 mg/l (dreifach physiologische Konzentration an Leucin). Die Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von  $2,6 \times 10^6$  Zellen / ml in frisches Standardkulturmedium eingebracht und am Versuchstag auf  $2,4 \times 10^6$  Zellen eingestellt. Die letzte Stunde vor der Inkubation wurden die Zellen in frischem Medium auf Eis gekühlt.

Je 150 µl einer H-3 Leucin-Lösung von 10 µCi/ml (0,37 MBq/ml) ergaben zusammen mit 150 µl der Zellsuspension einen Versuchsansatz, der in Eppendorfcups auf Eis pipettiert und mit Hilfe des Vortex gründlich vermischt wurde.

Die Proben wurden sofort in das Schüttelwasserbad überführt und nach 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten entnommen. Jeweils sofort nach Entnahme wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS abgestoppt und die Zellen in oben beschriebener Weise (vgl. Punkt 2.2.2.1) dreimal in der Kältekammer hintereinander gewaschen. Die jeweiligen Proben wurden zu diesem Zweck nicht sukzessive gesammelt, sondern immer anschließend an die Zugabe von PBS gleich

gewaschen, um ein mögliches Fortlaufen des Aufnahmeprozesses trotz Kälteeinwirkung zu vermeiden.

Am darauffolgenden Tag wurden nach erneuter Durchmischung des Zell-Lysates durch Vortexen zwei Aliquots (à 400µl) entnommen und diese durch 3 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsröhrchen ergänzt. Im Beta-Counter wurde die Aktivität je Probe in counts per minute (cpm) bestimmt und durch die spezifische Zählrate (cpm / nmol Leucin) (vgl. Punkt 3.3) die aufgenommene Menge an Leucin berechnet.

#### **2.2.2.4 Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen im Kulturmedium**

Zuätzlich zur Aufnahme von Leucin in die Tumorzelle wurde nun auch der säureunlösliche Teil des Pellets durch Zugabe von Tetrachloressigsäure (TCA) getrennt bestimmt. Der Verlauf der Reaktion wurde zu mehreren Zeitpunkten und bei zwei verschiedenen Konzentrationen an angebotenen Leucin betrachtet.

Eine Versuchsreihe wurde mit Standardkulturmedium (50 mg/l Leucin, 3-fach physiologische Konzentration) durchgeführt, die andere nach Zugabe von nicht markiertem L-Leucin zur Zellsuspension bei 255 mg/l (15-fach physiologische Konzentration) an Leucin. Die Zellen wurden am Vortag auf eine Konzentration von  $2,6 \times 10^6$  Zellen pro ml gebracht und in frischem Standardkulturmedium belassen. Eine Stunde vor Inkubation mit H-3 Leucin fand eine Aufteilung des auf  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellten Pools statt. Eine Versuchsreihe lagerte in Standardkulturmedium, die andere in Kulturmedium mit einer Leucinkonzentration von 255 mg/l auf Eis. Auch die H-3 Leucinlösung (Aktivitätskonzentration 10 µCi/ml bzw. 0,37 MBq/ml) wurde vor Zugabe aufgeteilt und eine Hälfte auf 255 mg/l Leucin angereichert. Zu je 150 µl

Zellsuspension wurden 150  $\mu$ l Aktivitätslösung gegeben, der Inhalt der Eppendorfcups auf dem Vortex gut vermischt und die Proben für 15, 30, 45 und 60 Minuten im Schüttelwasserbad belassen.

Als Neuerung wurden sofort nach Einsetzen in das Wasserbad Proben zur Bestimmung eines sogenannten „Nullwertes“ entnommen, diese sogleich mit 1ml eiskaltem PBS abgestoppt und dreimal gewaschen. Sämtliche anderen Proben wurden in oben beschriebener Weise gewaschen und lysiert (vgl. Punkt 2.2.2.1).

Jeweils paarig zu den Proben der Aufnahmebestimmung wurden Proben zunächst dreimal mit PBS gewaschen, dann jedoch die säureunlösliche Fraktion (acid precipitable fraction=APF) durch Zugabe von 1 ml eiskalter 10%iger TCA (Tetrachloressigsäure)-Lösung ausgefällt. Nach 30 minütiger Ruhephase auf Eis erfolgte die Trennung der APF vom Überstand durch Zentrifugieren bei 2940 g (Aufbrechen der Zellmembran) über 5 Minuten. Das Pellet wurde in 1 ml eiskalter 10%iger TCA-Lösung resuspendiert und nach 10 Minuten auf Eis endgültig die TCA-Fraktion durch erneutes Zentrifugieren in oben beschriebener Weise abgetrennt. Nach Lyse durch Zugabe von 1 ml NaOH+1% SDS ruhten die Eppendorfcups für 24 Stunden.

Am folgenden Tag wurden nach erneuter Durchmischung des Zell-Lysates durch Vortexen zwei Aliquots ( $\hat{a}$  400 $\mu$ l) entnommen und diese durch 3 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsröhrchen ergänzt. Im Beta-Counter wurde die Aktivität je Probe in counts per minute (cpm) bestimmt und durch die spezifische Zählrate (cpm / nmol Leucin) (vgl. Punkt 3.3) die aufgenommene Menge an Leucin sowie der Anteil des Säurepräzipitats an der Aufnahme, nachfolgend als Einbaufraktion bezeichnet, errechnet.

### **2.2.2.5 Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 50, 100 und 367 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin**

Die Zellsuspension wurde in gewohnter Weise auf  $2,6 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit frischem Standardkulturmedium versetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für eine Stunde in frischem Standardmedium im Wärmeschrank gelagert und anschließend die Zellzahl erneut auf obigen Wert gebracht. Zu den 15 ml Zellsuspension in der Kulturflasche wurden nun 300  $\mu$ l einer Vincristinlösung auf Basis des Standardkulturmediums mit einer Konzentration von 1  $\mu$ g/l an Vincristin pipettiert und die Flasche leicht geschwenkt, um das Zytostatikum gleichmäßig zu verteilen.

Die Konzentration der Vincristinlösung entspricht ca. 20% des Serumspitzenspiegels des Medikaments im Plasma. Während der Behandlungsphase von vier Stunden ruhten die behandelten Kulturflaschen im Wärmeschrank bei 37°C, wurden anschließend, ebenso wie die Kontrollgruppe nochmals einem Mediumwechsel mit Standardkulturmedium unterzogen.

Der Versuchsansatz änderte sich grundsätzlich von 2 x 150  $\mu$ l auf jetzt 3 x 100  $\mu$ l, um die Arbeitsschritte bei Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen an unmarkiertem L-Leucin zu vereinfachen. Jeweils 100 $\mu$ l bestanden aus der markierten Aminosäurelösung bei 50mg/l an Leucin, weitere 100  $\mu$ l aus der Zellsuspension bei 50 mg/l an Leucin, während die Konzentration an Leucin in den restlichen 100  $\mu$ l variiert werden konnte.

Zu je 100  $\mu$ l Zellsuspension und 100 $\mu$ l Aktivitätslösung von 15  $\mu$ Ci/ml

Versuchsansatz) kamen entweder 100 µl einer Leucinlösung von 50 mg/l (Standardmedium), 200 mg/l oder 1000 mg/l.

Es resultierten Gesamtkonzentrationen von 50, 100 und 367 mg/l an Leucin in den Versuchansätzen, was dem drei-, sechs- und 20-fachem der physiologischen Konzentration entspricht. Die Messung der Aufnahme wurde also im mehrfach erhöhten physiologischen Bereich der Konzentration an Leucin durchgeführt. Die Zusammenführung der Reagenzien erfolgte auf Eis, durch kurzes Vortexen wurden die Ansätze gleichmäßig vermischt und für 30 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert.

Das Abstoppen durch Zugabe von eiskaltem PBS, dreimaliges Waschen mit PBS und zweimalige Fällung der säureunlöslichen Fraktion durch Tetrachloressigsäure wurden wie im Versuch zuvor durchgeführt (vgl. Punkt 2.2.2.4). Lyse der Zellen mit 1 ml NaOH + 1% SDS und Ruhephase über Nacht schlossen sich an. Messung im Beta-Counter wie oben beschrieben (vgl. Punkt 2.2.2.1).

#### **2.2.2.6 Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 17, 34, 50 und 100 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin**

Die Behandlung der Zellen am Vortag des Versuches fand in der unter Punkt 2.2.2.5 beschriebenen Weise statt. Nach der Einwirkdauer des Vincristins von 4 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt (Standardkulturmedium) und die Zellen für 18 Stunden im Brutschrank gelagert. Kontrolle und behandelte Zellen wurden 2 Stunden vor der Inkubation mit frischem Kulturmedium (17 mg/l Leucin) in einer Zelldichte von  $3,3 \times 10^6$  Zellen/ml zurechtgelegt, die letzte Stunde auf Eis. Der

Versuch fand somit 24 Stunden nach Beginn der zytostatischen Behandlung statt.

Der Versuch wurde mit Ansätzen zu je 100 µl Zellsuspension, 100 µl Aktivitätslösung (15 µCi/ml bzw. 0,56 MBq/ml) und 100 µl einer Lösung unterschiedlicher L-Leucin-Konzentration durchgeführt. Es resultierten nach Vermischung der Anteile auf Eis und kurzem Vortexen Gesamtkonzentrationen von 17, 34, 50 und 100 mg/l an Leucin. Hierbei sollte nun der ein-, zwei-, drei- und fünffach physiologische Konzentrationsbereich an Leucin betrachtet werden. Die Eppendorfcups wurden für 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert, dann nach unter 2.2.2.1 beschriebener Art dreimal gewaschen und die Proben zur Bestimmung des Säurepräzipitats zweimal mit TCA behandelt (vgl. Punkt 2.2.2.4). Lyse und Messung erfolgten wie unter 2.2.2.1 ausgeführt.

#### **2.2.2.7 Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin**

##### **24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei physiologischer Konzentration von Leucin**

Die Behandlung der Zellen am Vortag des Versuches fand in der unter Punkt 2.2.2.6 beschriebenen Weise statt. Kontrolle und behandelte Zellen wurden 2 Stunden vor der Inkubation in frisches physiologisches Kulturmedium (Leucin=17mg/l) in einer Zelldichte von  $3,3 \times 10^6$  Zellen/ml eingebracht, die letzte Stunde ruhten sie auf Eis. Die Zugabe der radioaktiv markierten Aminosäure erfolgte also 24 Stunden nach Beginn der Vincristinbehandlung.

Die Menge an radioaktiv markierter Substanz wurde durch Zugabe von 200 µl Aktivitätslösung (Leucin bei 17 mg/l) verdoppelt, der Anteil an der

Zellsuspension blieb mit 100 µl gleich, insgesamt lag eine Konzentration von 17mg/l an Leucin im Versuchsansatz vor.

Das Zusammenführen der Ansatzanteile fand auf Eis statt, nach kurzem Vortexen wurde für 15, 25, 35 und 45 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert, danach sofort wie unter Punkt 2.2.2.1 geschildert abgestoppt, dreimal gewaschen und ein Teil der Proben zweimal mit TCA ausgefällt (vgl. Punkt 2.2.2.4). Die Lyse und Messung wurden in bereits beschriebener Weise (siehe Punkt 2.2.2.1) durchgeführt.

### **2.2.2.8 Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin innerhalb der ersten 10 Minuten in der Kontrollgruppe und nach Vincristinbehandlung**

#### **2.2.2.8.1 Kurzkinetik ohne Erwärmung im Wasserbad**

Die Zellen wurden, wie unter Punkt 2.2.2.6 ausgeführt am Vortag mit Vincristin behandelt, der Versuch startete exakt 24 Stunden nach Behandlungsbeginn mit dem Zytostatikum. Zwei Stunden vor Zugabe der radioaktiv markierten Aminosäure fand ein Wechsel des Kulturmediums statt, wonach die Zellen in einer Dichte von  $2,6 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium mit einer Konzentration von 17 mg/l lagerten, die letzte Stunde wiederum auf Eis. Zu je 150 µl der Zellsuspension wurden auf Eis 150 µl der Aktivitätslösung mit einer Leucinkonzentration von ebenfalls 17 mg/l und  $10\mu\text{Ci/ml}$  ( $0,37 \text{ MBq/ml}$ ) an markiertem Leucin gegeben, der Inhalt der Eppendorfcups durch Vortexen gleichmäßig vermischt. Die Versuchsansätze brachte man nun nicht ins Wasserbad zur Inkubation ein, sondern stoppte einen sogenannten "Nullwert" sofort durch Zugabe von 1 ml eißkaltem PBS ab und verfuhr in der

und 10 Minuten. Unter der Annahme, daß die Aufnahme der Aminosäure über einen temperaturabhängigen Transporter abläuft, wäre somit keine oder nur eine minimale Aufnahme aufgrund von Diffusionsvorgängen nachweisbar. Nach dreimaligem Waschen, wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben wurden die Zellen in gleicher Weise lysiert und am Folgetag zur Auswertung im Beta-Counter pipettiert.

#### **2.2.2.8.2 Kurzkinetik bei physiologischer Konzentration von Leucin nach Erwärmung im Wasserbad**

Die Behandlung mit Vincristin am Vortag verlief wie unter Punkt 2.2.2.6 erläutert. Zwei Stunden vor Inkubation mit der markierten Aminosäure wurden die Zellen in einer Dichte von  $2,6 \times 10^6$  Zellen/ml in das Medium mit 17 mg/l an Leucin überführt, verblieben die letzte Stunde vor dem Versuch auf Eis gelagert. Je 100  $\mu$ l einer Zellsuspension von  $3,3 \times 10^6$  Zellen/ml formten mit 200 $\mu$ l an Aktivitätslösung von 10  $\mu$ Ci/ml (0,37 MBq/ml) bei einer Gesamtkonzentration von 17 mg/l Leucin den Versuchsansatz, der auf Eis vermischt und gevortext wurde. Die Inkubation im Schüttelwasserbad wurde sofort ("Nullwert") und nach 1,2,3,4,7 und 10 Minuten (vgl. Punkt 2.2.2.8.1) abgebrochen und die Zellen in gleicher Weise weiterverarbeitet, lysiert und im Beta-Counter gemessen (siehe Punkt 2.2.2.1).

#### **2.2.2.8.3 Kurzkinetik bei einer Leucinkonzentration von 200 mg/l nach Erwärmung im Wasserbad**

Am Vortag erfolgte die Behandlung mit Vincristin in der Art des Versuches unter Punkt 2.2.2.6., somit exakt 24 Stunden vor Versuchbeginn. Die zwei Stunden vor der Inkubation im Wasserbad



wurden die Zellen in einer Dichte von  $2,6 \times 10^6$  Zellen/ml in frischem Kulturmedium mit einer Konzentration an Leucin von 200 mg/l, die letzte Stunde wiederum auf Eis gelagert. Auch der Versuch wurde bei der identischen Gesamtkonzentration von 200 mg/l Leucin durchgeführt, je 100  $\mu$ l Zellsuspension und 200  $\mu$ l Aktivitätslösung von 10  $\mu$ Ci/ml (0,37 MBq/ml) bildeten, auf Eis vermischt und gevortext den Ansatz pro Eppendorfcup. Wie unter Punkt 2.2.2.8.1 fand die Inkubation im Schüttelwasserbad, das Abstoppen, Waschen, Lysieren und Messen statt.

### 3 Ergebnisse:

#### 3.1 Abhängigkeit der aufgenommenen Leucinmenge von der eingesetzten Zelldichte

Um die direkte Abhängigkeit der gemessenen Aktivitätsaufnahme von der Dichte der eingesetzten Zellen darzulegen, wurde eine Zellkultur bei normierter Zellzahl für den Versuch herangezogen und am Versuchstag auf  $3,88 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt und im Kulturmedium für 1 Stunde vorinkubiert. Wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben, wurden drei Lösungen verschiedener Zelldichte über 45 Minuten im Wasserbad inkubiert, die Reaktion gestoppt, die Zellsuspensionen gewaschen, lysiert und am folgenden Tag im Betacounter die aufgenommene Aktivität gemessen. Für die resultierenden Werte wurde in jeder Gruppe der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der Stoffmenge an aufgenommenem Leucin erfolgte über die spezifische Zählrate (cpm / nmol Leucin), die je nach Anteil der markierten Aminosäure am Gesamtpool an Leucin im jeweiligen Versuchsansatz variierte.

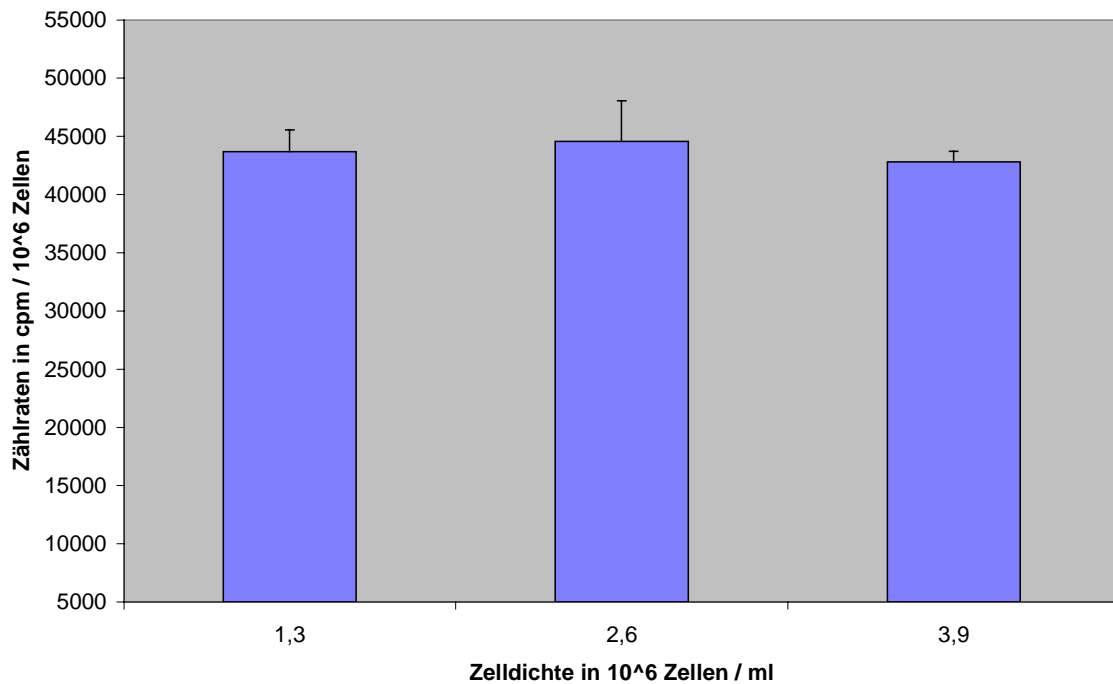
Alle Ergebnisse wurden auf eine Dichte von  $10^6$  Zellen/ml bezogen.

**Tab. 1: Aufnahme von Leucin in Kulturmedium in Abhängigkeit von unterschiedlichen Zelldichten**

Zelldichte ( $10^6$ Zellen/ml)	Normierte Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen); Mittelwerte; n=3	Aufnahme Leucin (nmol/ $10^6$ Zellen)
1,3	$44028 \pm 1889$	$3,21 \pm 0,13$
2,6	$44752 \pm 3498$	$3,26 \pm 0,25$
3,9	$43031 \pm 917$	$3,14 \pm 0,06$

Aus der graphischen Darstellung der Zählraten läßt sich entnehmen, daß die Messung der Aktivität des aufgenommenen Leucins im Konzentrationsbereich von 1,29 bis  $3,88 \times 10^6$  Zellen pro ml bezogen auf

doppelter Zelldichte auch die doppelte Menge an insgesamt aufgenommenem Leucin. Somit kann man in diesem Bereich der Konzentration an Zellen pro ml davon ausgehen, daß eine größere Zelldichte die Aufnahme nicht behindert, somit eine Angabe der Ergebnisse pro  $10^6$  Zellen/ml generell möglich ist.



**Abb. 1: Darstellung der Zählraten in Abhängigkeit von der Dichte der eingesetzten Zellen**

### **3.2 Abhängigkeit der Zählrate pro $10^6$ Zellen von unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen an H-3 Leucin:**

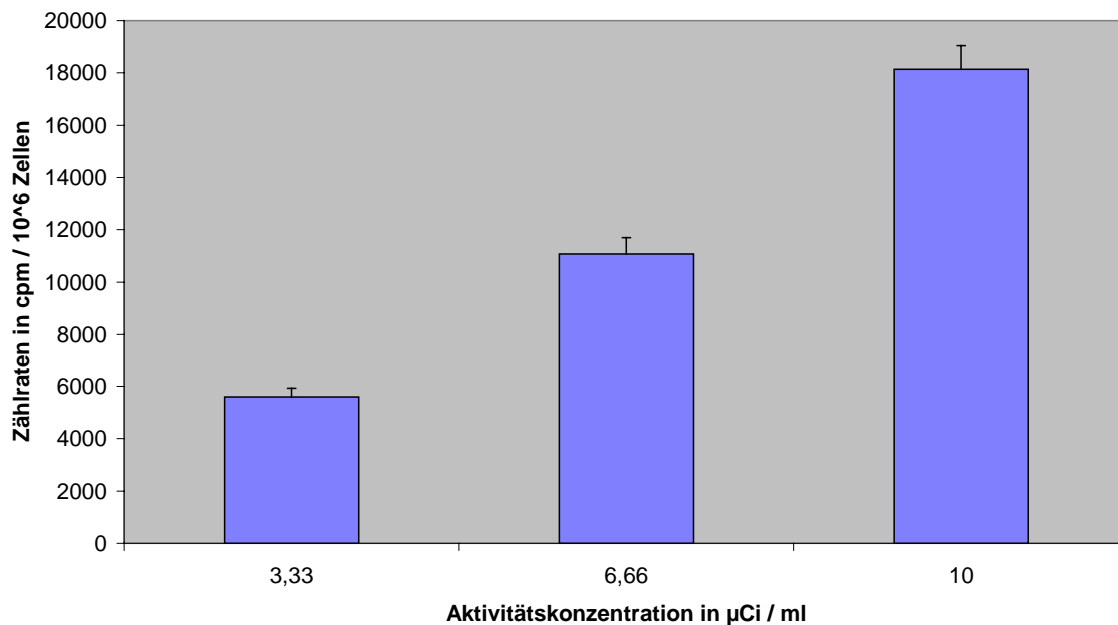
Der Anteil des markierten H-3-Leucins an der Gesamtmenge des angebotenen Leucins in der Versuchsanordnung ist maßgebend für die Berechnung der aufgenommenen Stoffmenge der Aminosäure. In diesem Versuch wurde, wie unter Punkt 2.2.2.2 beschrieben, die Konzentration

(0,12 MBq/ml) bis 10  $\mu\text{Ci/ml}$  (0,37 MBq/ml) variiert. Diese Angabe bezieht sich auf die Stammlösung, aus den Ergebnissen wurde wiederum der Mittelwert gebildet. Auf die Berechnung der aufgenommenen Leucinmenge wurde verzichtet.

**Tab. 2: Zählraten bei unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen**

Aktivitätskonzentration in der Stammlösung ( $\mu\text{Ci/ml}$ )	Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen) Mittelwerte; n=3
3,33	$5605 \pm 321$
6,66	$11068 \pm 627$
10,0	$18143 \pm 904$

Die graphische Darstellung der Zählraten spiegelt den Zusammenhang des Anteils von H-3-Leucin am Gesamtpool und der gemessenen Zählrate wider:



**Abb. 2: Abhängigkeit der gemessenen Zählraten von der Aktivitätskonzentration**

Aus dem Balkendiagramm und der Tabelle läßt sich ersehen, daß die aufgenommene Aktivität pro  $10^6$  Zellen direkt proportional zur Aktivitätskonzentration ist. Alle weiteren Messungen bis zur Vincristin-Gruppe (vgl. Punkt 2.2.2.5) wurden bei einer Aktivitätskonzentration von  $10 \mu\text{Ci/ml}$  ( $0,37 \text{ MBq/ml}$ ) an H-3-Leucin in der Stammlösung durchgeführt.

### 3.3 Kinetik der Aufnahme von Leucin im Standardkulturmedium

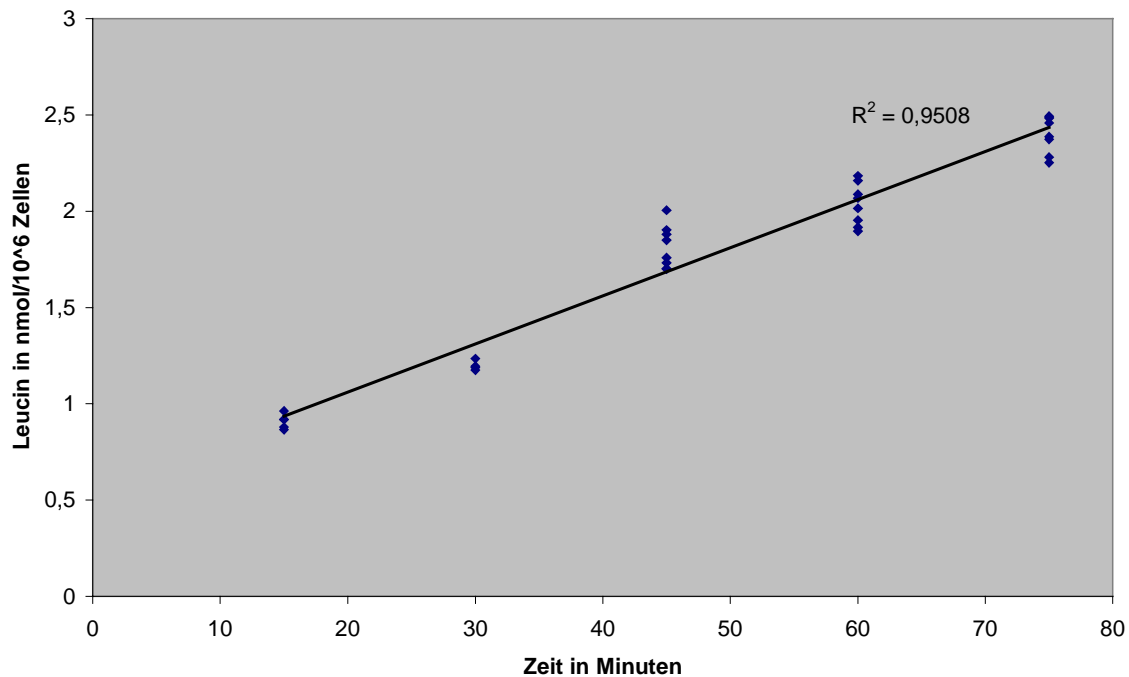
Um den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Leucin in die Zelle zu verfolgen, wurde die einheitliche Inkubationszeit von 45 Minuten der bisherigen Versuche um weitere Meßpunkte erweitert. Nach 15, 30, 45, 60 und 75 Minuten wurde die Aufnahme von Leucin in die Zellen, wie unter 2.2.2.3 dargestellt gemessen. Die registrierten Counts wurden auf  $10^6$  Zellen bezogen. Zur Berechnung der aufgenommenen Stoffmenge an Leucin diente die spezifische Zählrate (vgl. 3.1).

Für die Messungen bei der Standardmediumkonzentration an Leucin von  $50 \text{ mg/l}$  ergaben sich folgende Ergebnisse und resultierende Aufnahmemengen:

**Tab. 3: Kinetik der Aufnahme von Leucin bei  $50 \text{ mg/l}$  an Leucin ( $n=4$ )**

Zeit (min)	Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ $10^6$ Zellen)
15	$14989 \pm 3459$	$1,09 \pm 0,25$
30	$19647 \pm 3565$	$1,43 \pm 0,26$
45	$26212 \pm 2115$	$1,91 \pm 0,15$
60	$29866 \pm 2461$	$2,18 \pm 0,18$
75	$35073 \pm 4993$	$2,56 \pm 0,36$

In der graphischen Darstellung zeigte sich ein linearer Anstieg der Gesamtaufnahme über den Zeitraum von 15 bis 75 Minuten nach der Inkubation mit der radioaktiv markierten Aminosäure.



**Abb.3: Aufnahme von Leucin bei 50 mg/l an Leucin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

### **3.4 Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen im Kulturmedium**

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Zusammenhang zwischen der Aufnahme bzw. dem Einbau von Leucin und der Konzentration der Aminosäure im Kulturmedium zu beleuchten. Jeweils 150µl einer Stammlösung mit H-3 Leucin wurden mit 150 µl einer Zellsuspension angesetzt und für 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten inkubiert (2.2.2.4). Die resultierenden Gesamtkonzentrationen an Leucin in den

physiologische Konzentration) und 255 mg/l (15-tach physiologische Konzentration), die Aktivitätskonzentration bei 10  $\mu\text{Ci/ml}$  (0,37 MBq/ml). Die spezifischen Zählraten betragen 13700 cpm/nmol bei 50 mg/l an Leucin, entsprechend 2683 cpm/nmol für die Messungen bei 255 mg/l.

Dies spiegelt den Zusammenhang wider, daß bei hohen Konzentrationen an unmarkiertem Leucin im Versuchsansatz der Anteil meßbarer, markierter Moleküle wesentlich geringer ist und somit weniger cpm pro nmol aufgenommenem Leucins gemessen werden können. Die säureunlösliche Fraktion wurde mittels TCA-Fällung, wie unter Punkt 2.2.2.4 beschrieben gesondert gemessen, die Berechnung der eingebauten Stoffmengen folgten dem oben genannten Prinzip (vgl. Punkt 3.3). Es ergaben sich folgende Messungen:

**Tab. 4: Kinetik der Aufnahme von Leucin bei 50 mg/l an Leucin im Kulturmedium (n=4)**

Zeit (min)	Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ $10^6$ Zellen)
0	$6502 \pm 1375$	$0,45 \pm 0,09$
15	$17837 \pm 1488$	$1,30 \pm 0,11$
30	$25714 \pm 3781$	$1,88 \pm 0,28$
45	$31246 \pm 5430$	$2,28 \pm 0,40$
60	$39992 \pm 8517$	$2,92 \pm 0,62$

Der graphische Verlauf der Darstellung ist dem der Abbildung 3 vergleichbar und wurde hier nicht nochmals aufgeführt.

Die Meßwerte der säureunlösliche Fraktion, auf deren Bedeutung bereits in der Einleitung eingegangen worden war (vgl. Punkt 1.4), lagen zu den verschiedenen Zeitpunkten in den folgenden Größenordnungen:

**Tab. 5: Kinetik des Einbaus von Leucin bei 50 mg/l Leucin im Kulturmedium (n=4)**

Zeit (min)	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
0		
15	5525 ± 779	0,40 ± 0,06
30	11413 ± 2468	0,83 ± 0,18
45	17710 ± 3947	1,29 ± 0,29
60	22413 ± 7010	1,64 ± 0,51

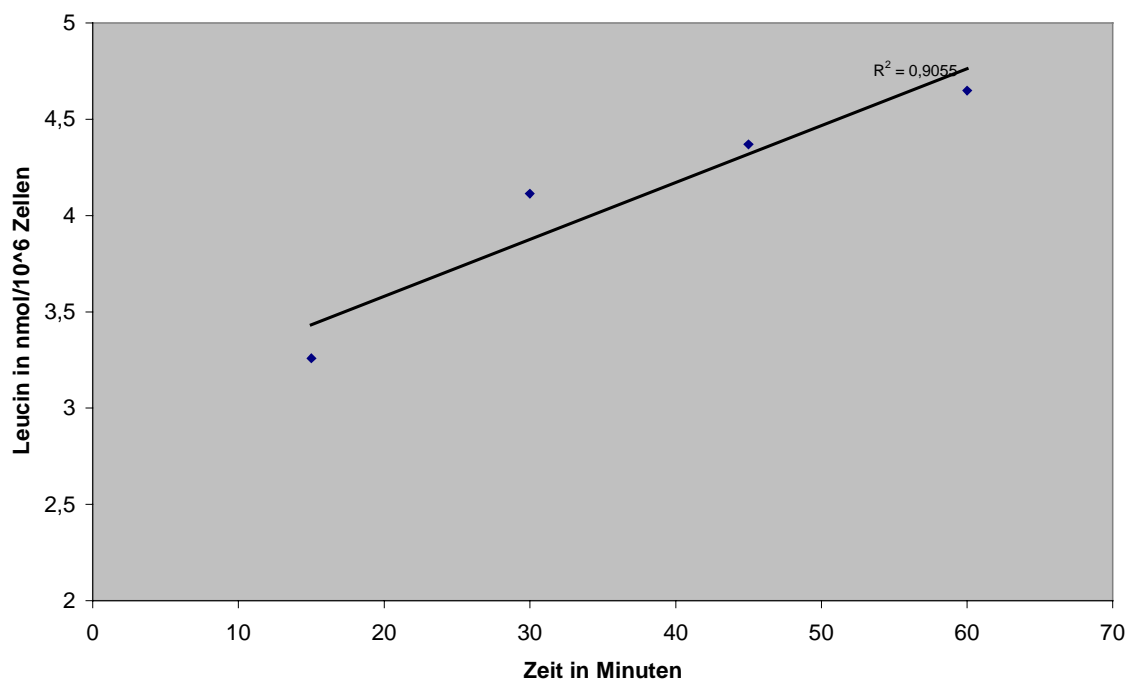
Die graphische Darstellung des Einbaus findet sich in der Abbildung 6 im Vergleich mit den Ergebnissen der Messung bei 255 mg/l an Leucin.

Entsprechend die Ergebnisse der Aufnahme und der säureunlöslichen Fraktion bei 255 mg/l Leucin im Versuchsansatz:

**Tab. 6: Kinetik der Aufnahme von Leucin bei 255 mg/l an Leucin im Kulturmedium (n=4)**

Zeit (min)	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
0	2548 ± 253	0,95 ± 0,09
15	8742 ± 479	3,26 ± 0,18
30	11036 ± 1472	4,11 ± 0,55
45	11724 ± 2045	4,37 ± 0,76
60	12473 ± 1290	4,65 ± 0,48



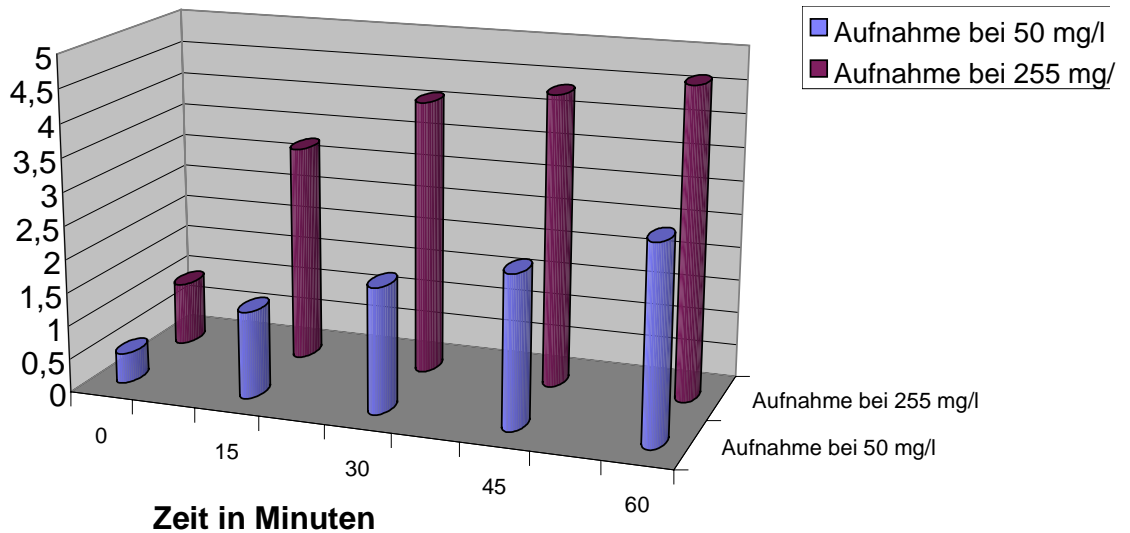


**Abb. 4: Mittelwerte der aufgenommenen Leucinstoffmenge pro 10<sup>6</sup> Zellen bei 255 mg/l an Leucin in Abhängigkeit von der Zeit**

**Tab. 7: Kinetik des Einbaus von Leucin bei 255 mg/l an Leucin im Kulturmedium (n=4)**

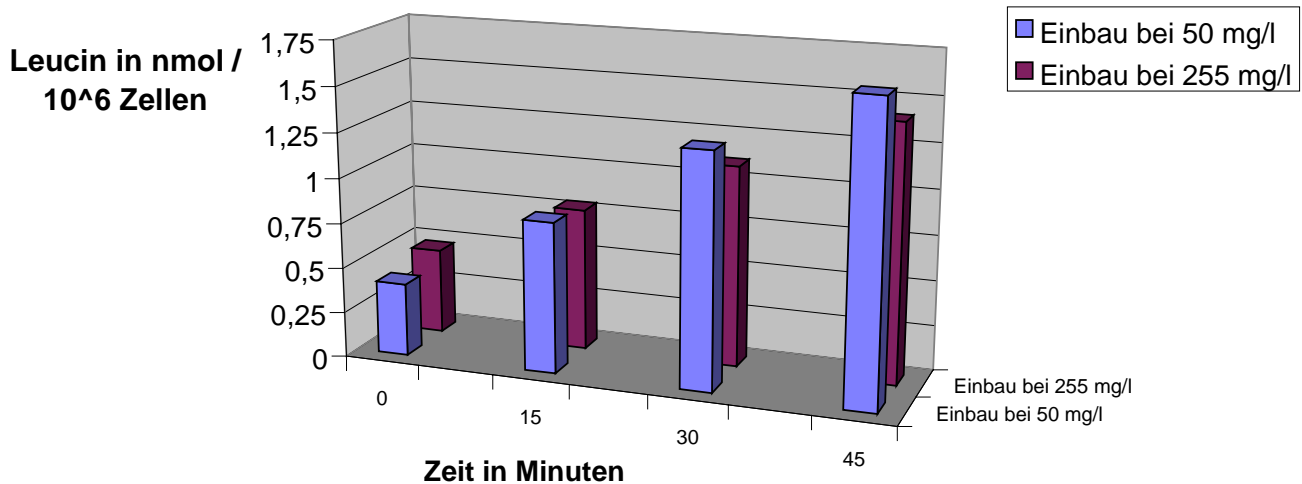
Zeit (min)	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
0		
15	1271 ± 593	0,47 ± 0,22
30	2116 ± 670	0,79 ± 0,25
45	2972 ± 650	1,11 ± 0,24
60	3796 ± 663	1,41 ± 0,25

Leucin in nmol /  
10<sup>6</sup> Zellen



**Abb. 5: Vergleich der Aufnahme von Leucin in Abhängigkeit von der Zeit bei 50 und 255 mg/l an Leucin im Kulturmedium**

In der oben stehenden Graphik ist im direkten Vergleich die Aufnahme von Leucin in den beiden Konzentrationsbereichen dargestellt (Abb. 5), auf der nachfolgenden Seite der Einbau von Leucin (Abb. 6).



**Abb. 6: Vergleich des Einbaus von Leucin in Abhängigkeit von der Zeit bei 50 und 255 mg/l an Leucin im Kulturmedium**

Hierbei zeigte sich, daß die Aufnahme durch höhere Mengen angebotenen Leucins im Versuchsansatz deutlich steigerbar war, beim Säurepräzipitat dieser Effekt jedoch unabhängig von der Konzentration an Leucin ausblieb.

Diese Erkenntnis bildete den Grundstock für die weiteren Versuche bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (vgl. Punkte 3.5 und 3.6), da untersucht werden sollte, ob die gleiche Beobachtung auch in höheren und annähernd physiologischen Konzentrationsbereichen gemacht werden kann.

### **3.5 Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 50, 100 und 367 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin**

Der Probenansatz wurde nun grundsätzlich von 2 x 150 µl auf 3 x 100 µl umgestellt, deshalb die Aktivitätskonzentration von 10 µCi/ml (0,37 MBq/ml) auf 15 µCi/ml (0,56 MBq/ml) in der Stammlösung angehoben, wodurch die resultierenden Messungen der counts per minute (cpm) mit den Ergebnissen der vorherigen Versuchsansätze vergleichbar blieben. Die Zellsuspension wurde 1 Stunde vor Behandlung mit Vincristin auf etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen eingestellt und in frisches Kulturmedium mit einer Leucinkonzentration von 50 mg/l eingebracht. Nach Zugabe der Vincristinlösung und einer Einwirkdauer des Zytostatikums von 4 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt (Standardkulturmedium) und die Zellen auf Eis bis zum Versuchsbeginn gelagert.

Da die Aufnahme und der Einbau von Leucin nun in einem noch höheren Konzentrationsbereich von Leucin gemessen werden sollten, lagen die resultierenden Gesamtkonzentrationen im jeweiligen Ansatz bei 50 bzw. 100 und 367 mg/l an Leucin, die Messungen wurden nach 30 Minuten Wärmeeinwirkung im Wasserbad durchgeführt. Die säureunlösliche Fraktion konnte durch TCA-Fällung gesondert gemessen werden.

Für die Kontrollgruppe ergaben sich folgende Meßwerte:

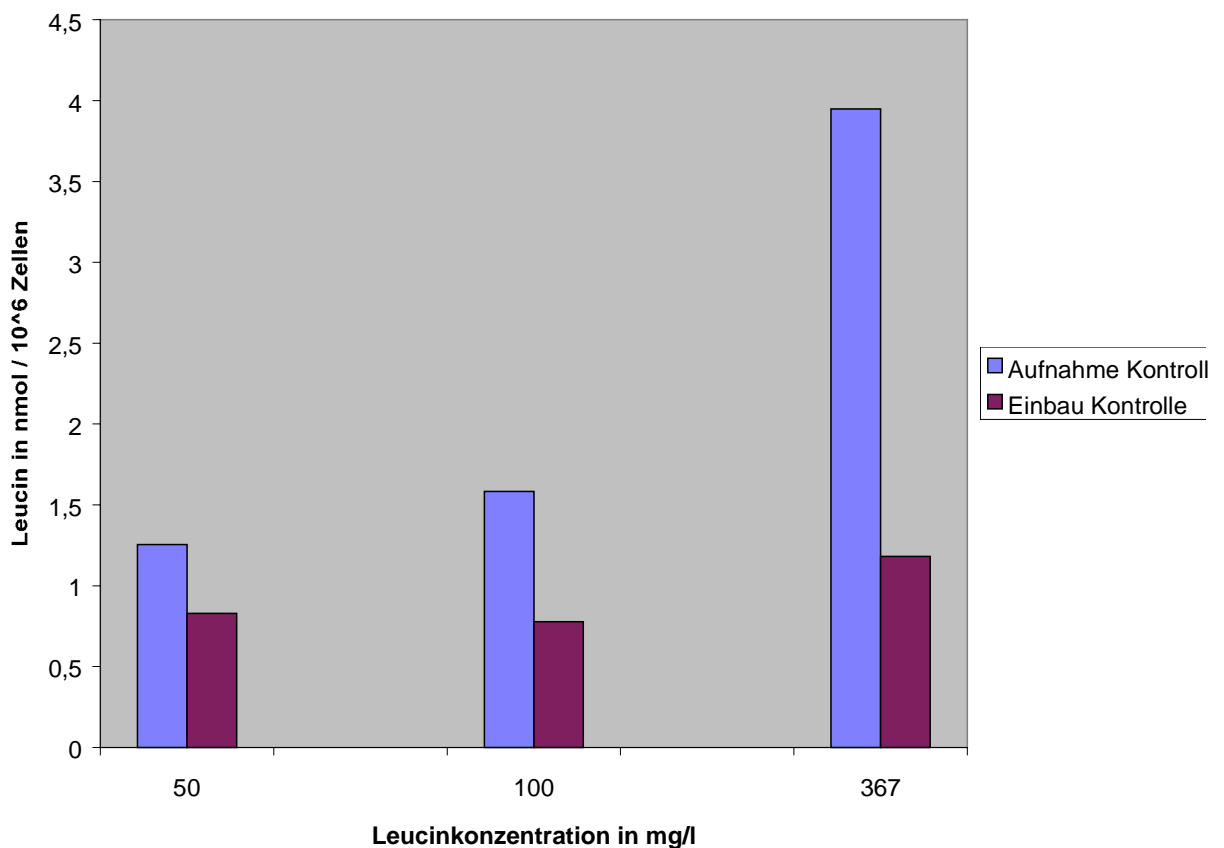
**Tab. 8 : Aufnahme von Leucin bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin unter Kontrollbedingungen (n=3)**

Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ $10^6$ Zellen)
50	$11463 \pm 1482$	$1,26 \pm 0,16$
100	$7230 \pm 1213$	$1,58 \pm 0,27$
367	$4917 \pm 1461$	$3,95 \pm 1,17$

**Tab. 9: Einbau von Leucin bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin unter Kontrollbedingungen (n=3)**

Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
50	7568 ± 241	0,83 ± 0,03
100	3550 ± 30	0,78 ± 0,01
367	1470 ± 180	1,18 ± 0,14

In der Zusammenfassung zeigt sich, daß die Aufnahme der Aminosäure deutlich zunimmt, während der Anteil der säureunlöslichen Fraktion in diesen Konzentrationsbereichen an Leucin nur unwesentlich variiert, also nicht steigerbar ist.



**Abb. 7: Aufnahme und Einbau von Leucin unter Kontrollbedingungen bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin**

Dieser Effekt wird in den folgenden Versuchen auch unter 17 und 34 mg/l an Leucin noch weiter beschrieben werden.

Bei den behandelten Zellen sah man eine höhere Aufnahmerate als bei der Kontrollgruppe:

**Tab. 10: Aufnahme von Leucin im Anschluß an eine 4-stündige Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin(n=3)**

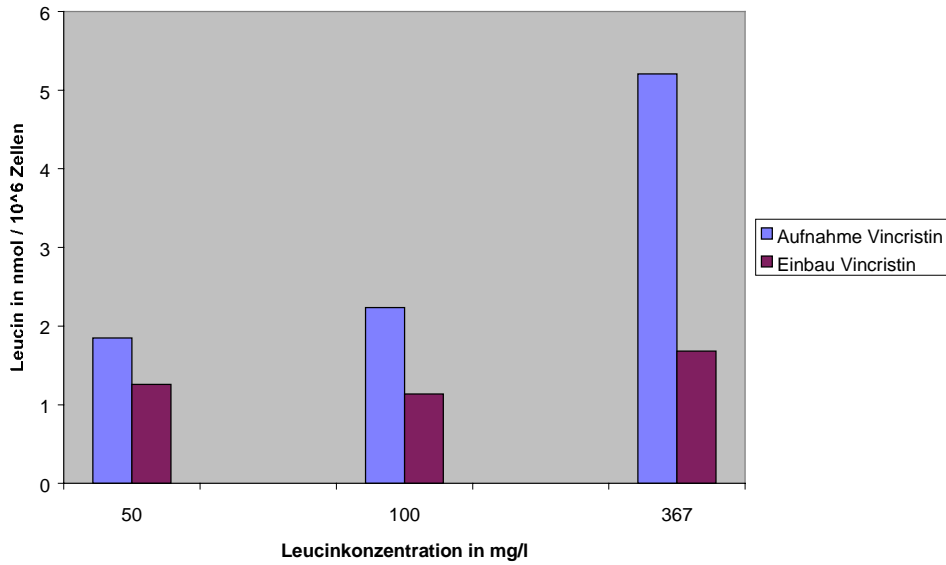
Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
50	16881 ± 8885	1,85 ± 0,97
100	10204 ± 6458	2,23 ± 1,41
367	6481 ± 4153	5,20 ± 3,33

Ebenso verhielt es sich mit dem Anteil des Säurepräzipitates an der Gesamtaufnahme:

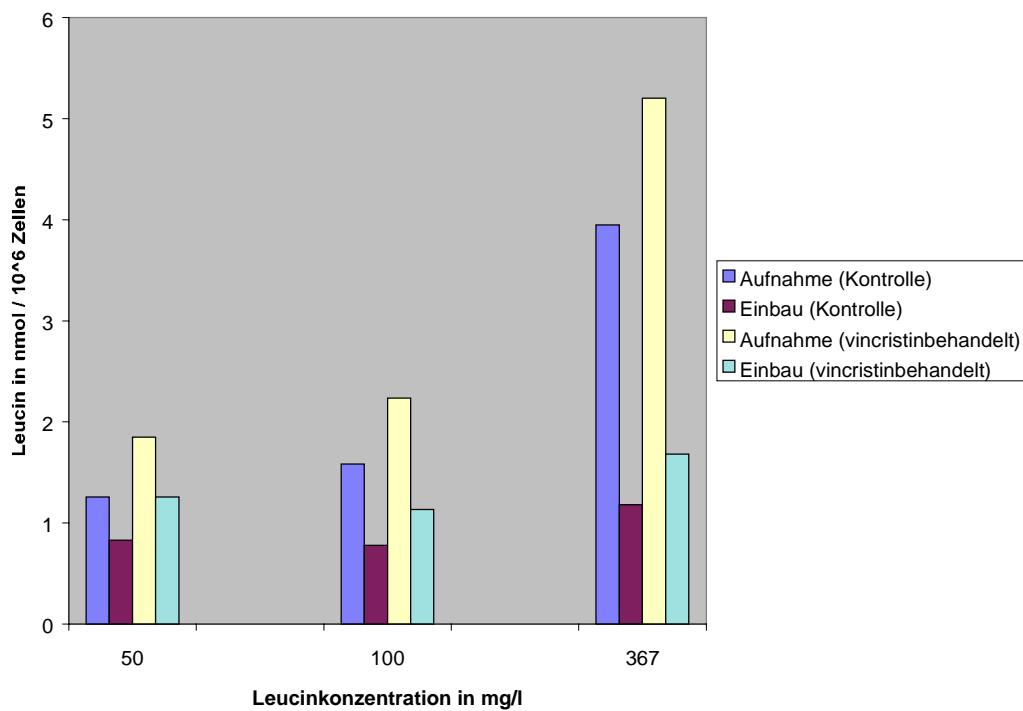
**Tab. 11: Einbau von Leucin im Anschluß an eine 4-stündige Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (n=3)**

Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
50	11489 ± 5754	1,26 ± 0,63
100	5181 ± 2088	1,13 ± 0,46
367	2095 ± 776	1,68 ± 0,62

Die folgenden Graphiken zeigen die Verhältnisse für die behandelten Zellen direkt nach Einwirken von Vincristin über 4 Stunden und den Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen.



**Abb. 8:** Aufnahme und Einbau von Leucin im Anschluß an eine 4-stündige Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin



**Abb. 9:** Aufnahme und Einbau von Leucin unter Kontrollbedingungen und im Anschluß an eine 4-stündige Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin

### **3.6 Messung der Aufnahme und des Einbaus von Leucin bei Konzentrationen von 17, 34, 50 und 100 mg/l Leucin unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Vincristin**

Die Zellsuspension wurde 1 Stunde vor Behandlung mit Vincristin auf etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen eingestellt und in frisches Kulturmedium mit einer Leucinkonzentration von 50 mg/l eingebracht. Nach Zugabe der Vincristinlösung wurde nach 4 Stunden Einwirkdauer das Medium erneut gewechselt (Standardkulturmedium). Die Zellen ruhten für weitere 20 Stunden im Brutschrank, die letzten zwei Stunden in Kulturmedium mit physiologischer Konzentration an Leucin, davon 60 Minuten auf Eis (vgl. Punkt 2.2.2.6). Der Versuch wurde somit 24 Stunden nach Beginn der Vincristintherapie durchgeführt.

Nun erfolgte die Inkubation im Wasserbad für 30 Minuten in Versuchsansätzen mit gestaffelter Konzentration an Leucin. Es resultierten Gesamtkonzentrationen an Leucin im jeweiligen Ansatz von 17, 34, 50 und 100 mg/l Leucin. Der Gesamtkonzentrationsbereich liegt somit zwischen dem physiologischen (17mg/l) und seinem 6-fachen (100 mg/l).

Für die unbehandelte Kontrollgruppe ergaben sich folgende Meßwerte:

**Tab. 12: Aufnahme von Leucin unter Kontrollbedingungen bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (n=3)**

Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ $10^6$ Zellen)
17	$28397 \pm 5161$	$1,06 \pm 0,19$
34	$16601 \pm 2102$	$1,24 \pm 0,16$
50	$12850 \pm 1172$	$1,41 \pm 0,13$
100	$8780 \pm 877$	$1,92 \pm 0,19$



Durch TCA-Fällung wurde der Anteil der säureunlöslichen Fraktion bestimmt:

**Tab. 13: Einbau von Leucin unter Kontrollbedingungen bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (n=3)**

Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
17	18977 ± 4844	0,71 ± 0,18
34	9767 ± 2105	0,73 ± 0,16
50	6765 ± 1210	0,74 ± 0,13
100	3514 ± 654	0,77 ± 0,14

Hierbei fiel auf, daß genauso wie in den vorangegangenen Versuchen (vgl. Punkte 3.4 und 3.5) die Aufnahme der Aminosäure in die Zelle durch Variation der Konzentration an Leucin steigerbar war, der Einbau allerdings schon bei physiologischer Konzentration (17 mg/l) maximal ausgelastet ist und nicht weiter zunimmt.

Dieser Effekt wird auch in der graphischen Darstellung am Ende dieses Abschnittes deutlich, in der die Aufnahme und der freie, säurelösliche Pool mit steigender Leucinkonzentration zunehmen, jedoch die Stoffmenge des ins Protein eingebauten Leucins gleich bleibt.

Bei den behandelten Zellen sanken sowohl Aufnahme wie auch Einbau in die säureunlösliche Fraktion deutlich ab, das Säurepräzipitat blieb allerdings auch hier von der Variation der Leucinkonzentration im Versuchsansatz unbeeinflusst.

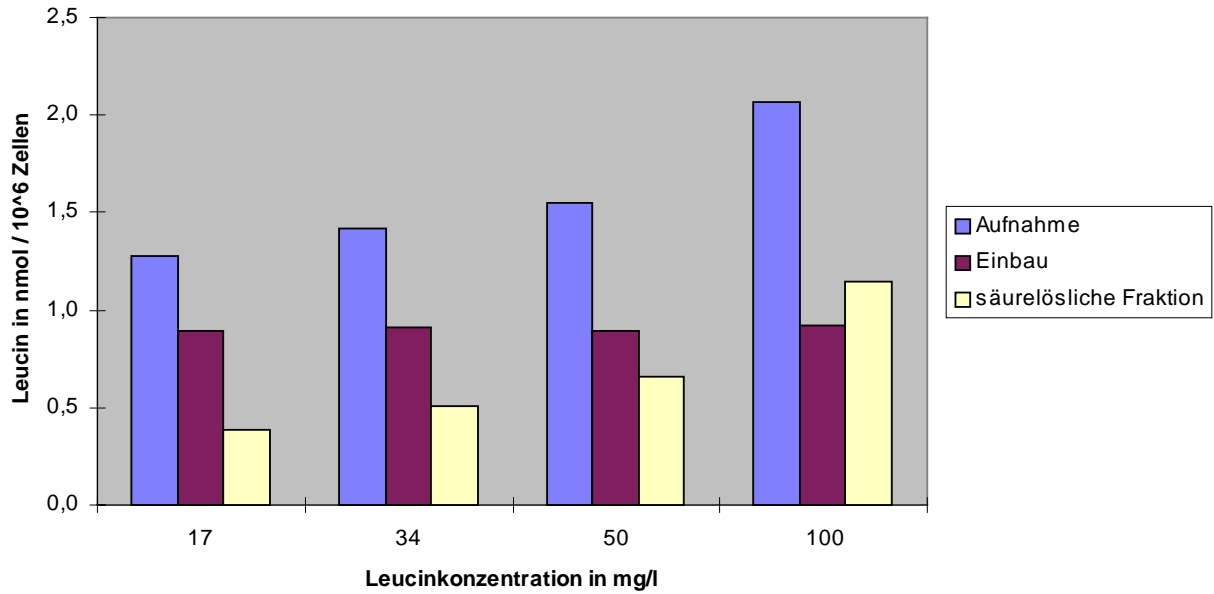
**Tab. 14: Aufnahme von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Leucin (n=9)**

Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
17	21795 ± 4430	0,81 ± 0,16
34	13074 ± 2496	0,97 ± 0,19
50	10208 ± 1680	1,12 ± 0,18
100	7162 ± 1087	1,57 ± 0,24

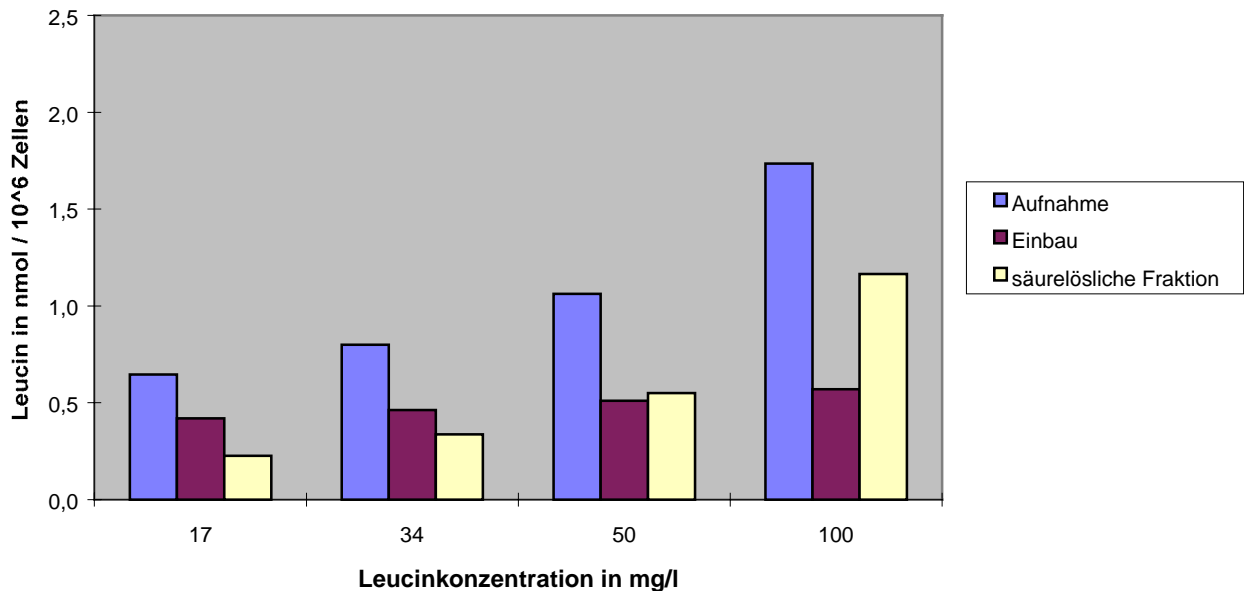
**Tab. 15: Einbau von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Leucin (n=9)**

Leucin in mg/l	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
17	14393 ± 3660	0,54 ± 0,14
34	7477 ± 1490	0,56 ± 0,11
50	5140 ± 756	0,56 ± 0,08
100	2719 ± 338	0,60 ± 0,07

Zum Abschluß dieser Versuchsreihe noch der direkte graphische Vergleich der Ergebnisse der Kontrollgruppe und der behandelten Zellreihen, in dem sich die verringerte Aufnahme- und Einbaukapazität nach der Behandlung mit Vincristin zeigt. Deutlich wird auch, daß der Einbau in beiden Gruppen von der Gesamtkonzentration an Leucin unabhängig ist:



**Abb. 10: Aufnahme und Einbau von Leucin in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin unter Kontrollbedingungen**



**Abb. 11: Aufnahme und Einbau von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin**

### **3.7 Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei physiologischer Konzentration von Leucin**

Die Zellsuspension wurde 1 Stunde vor Behandlung mit Vincristin auf etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen eingestellt und in frisches Kulturmedium mit einer Leucinkonzentration von 50 mg/l eingebracht. Nach Zugabe von 300 $\mu$ l Vincristinlösung und 4 Stunden Einwirkdauer wurde das Medium erneut gewechselt (Standardkulturmedium). Die Zellen ruhten für weitere 20 Stunden im Brutschrank, die letzten beiden Stunden in frischem physiologischen Kulturmedium (siehe Punkt 2.2.2.7).

Die Zählraten liegen in dieser Versuchsreihe höher als in den vorigen, da die doppelte Menge an radioaktiv markiertem H-3 Leucin zugegeben wurde. Die jeweilige Stoffmenge an Leucin bleibt durch die Berechnung der spezifischen Zählrate mit den vorherigen Versuchen vergleichbar (vgl. Punkt 3.3).

Im Beobachtungszeitraum zwischen 15 und 45 Minuten nach der Inkubation mit der markierten Aminosäure ergaben sich für die Kontrollgruppe folgende Werte:

**Tab. 16: Kinetik der Aufnahme von Leucin unter Kontrollbedingungen (n=4)**

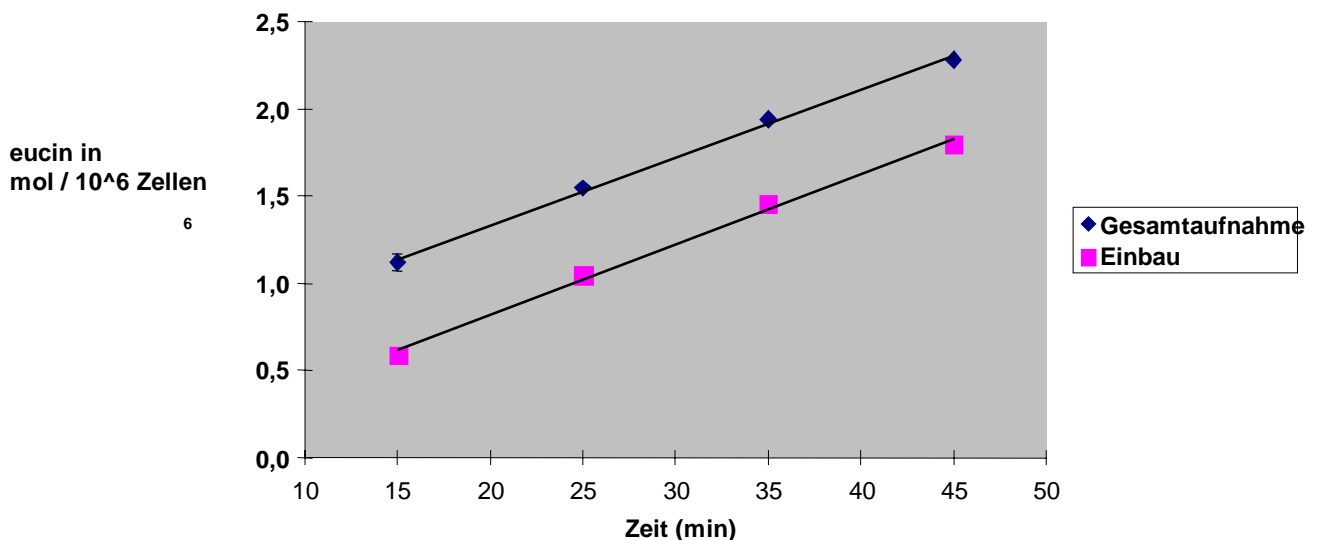
Zeit in min.	Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ $10^6$ Zellen)
15	$54064 \pm 9768$	$0,93 \pm 0,22$
25	$76045 \pm 7723$	$1,31 \pm 0,25$
35	$91329 \pm 12003$	$1,57 \pm 0,32$
45	$111838 \pm 10902$	$1,97 \pm 0,28$

Der Anteil der säureunlöslichen Fraktion stieg ebenfalls im Laufe des Beobachtungszeitraumes an:

**Tab. 17: Kinetik des Einbaus von Leucin unter Kontrollbedingungen (n=4)**

Zeit in min.	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
15	31712 ± 729	0,55 ± 0,09
25	53045 ± 2845	0,92 ± 0,14
35	73484 ± 4200	1,31 ± 0,14
45	92822 ± 3798	1,56 ± 0,33

Somit lassen sich die Aufnahme der Aminosäure und der Einbau in die Proteine exemplarisch folgendermaßen graphisch darstellen:



**Abb. 12: Aufnahme und Einbau von Leucin unter Kontrollbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit**

Die Steigungen der beiden Geraden werden in der statistischen

Die behandelten Zellen nahmen im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich weniger Leucin im Beobachtungszeitraum auf:

**Tab. 18: Kinetik der Aufnahme von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung (n=10)**

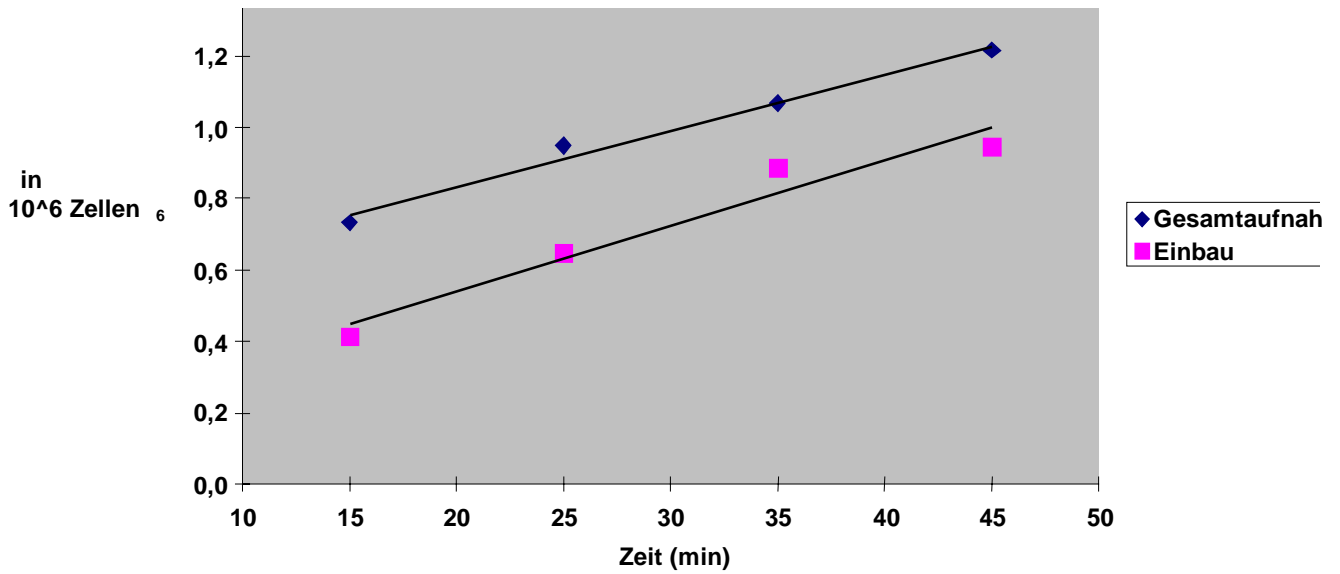
Zeit in min.	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
15	29283 ± 7476	0,55 ± 0,14
25	40333 ± 8723	0,75 ± 0,16
35	48499 ± 11163	0,90 ± 0,21
45	61147 ± 9987	1,14 ± 0,19

Auch der Einbau in die säureunlösliche Fraktion sank durch die Behandlung ab:

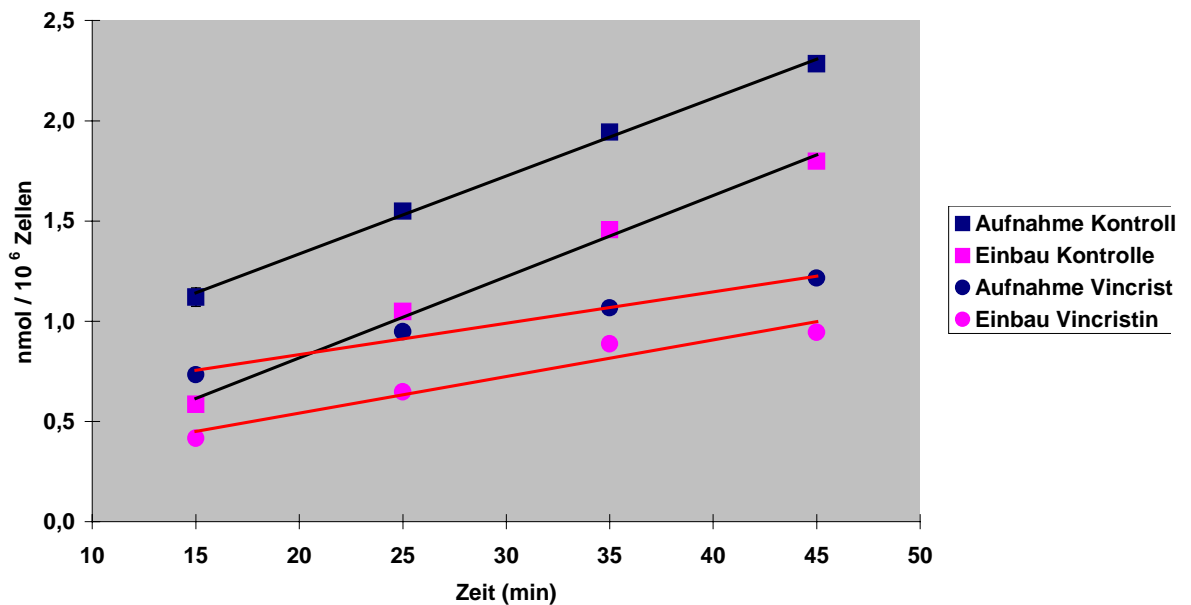
**Tab. 29: Kinetik des Einbaus von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung (n=10)**

Zeit in min.	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Einbau Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
15	17147 ± 4415	0,32 ± 0,08
25	27668 ± 5422	0,52 ± 0,10
35	37549 ± 6721	0,70 ± 0,13
45	43555 ± 7623	0,81 ± 0,14

Die beiden Geraden des Aufnahme- und Einbaukinetik stellten sich wie in der folgenden Abbildung gezeigt dar, hierbei war auffallend, daß genauso wie in der Kontrollgruppe der Verlauf der beiden Geraden annähernd parallel erscheint.



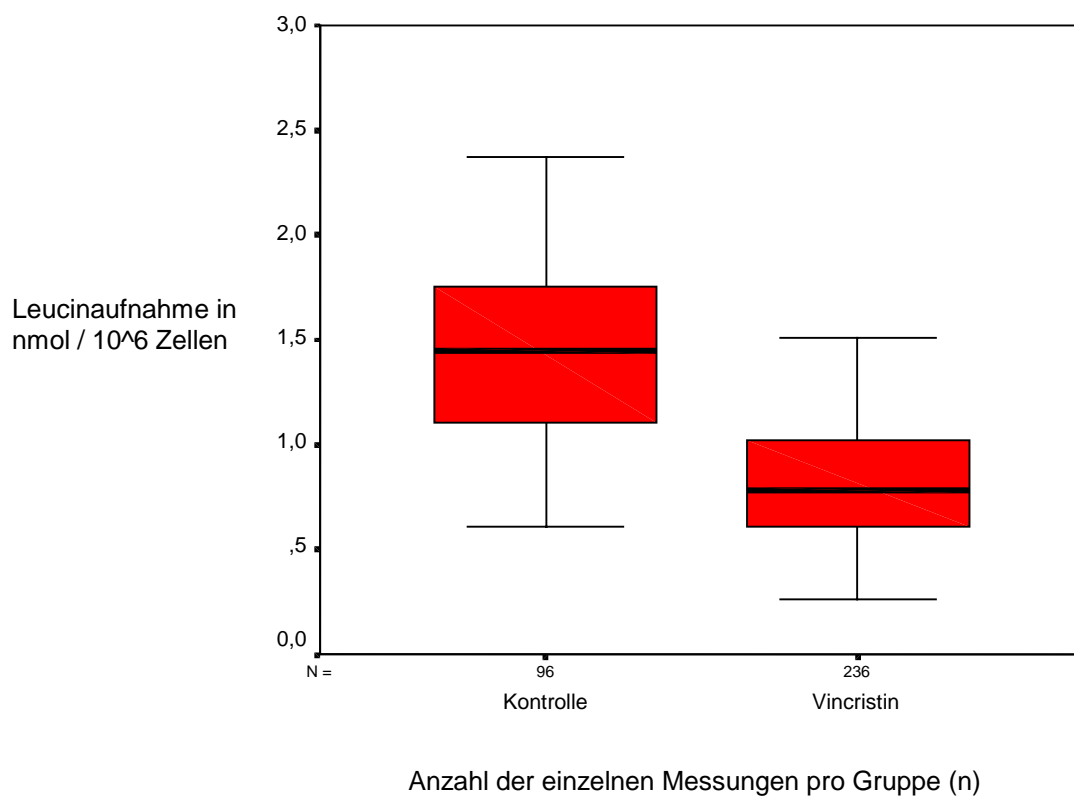
**Abb. 13: Aufnahme und Einbau von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung in Abhängigkeit von der Zeit**



**Abb. 14 : Vergleich der Aufnahme und des Einbaus von Leucin unter Kontrollbedingungen und 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung in Abhängigkeit von der Zeit**

Im direkten Vergleich der Geraden für Aufnahme und Einbau sowohl der Kontrollgruppe als auch der behandelten Zellen zeigt sich die starke Abnahme beider beobachteten Vorgänge besonders deutlich.

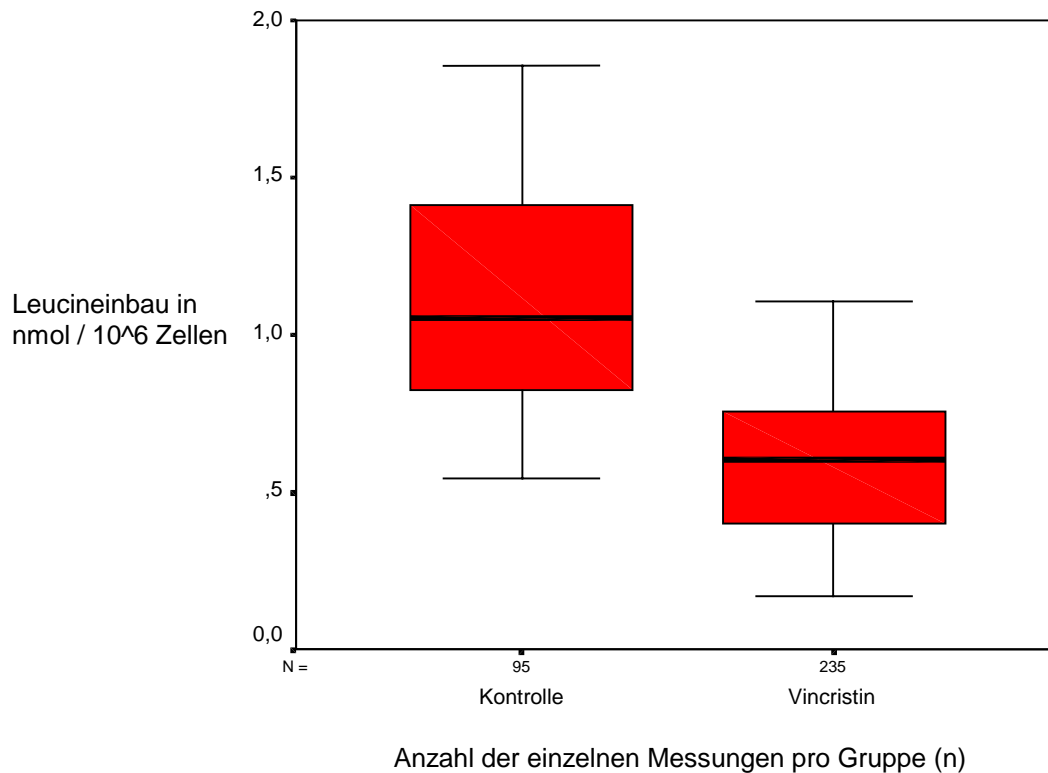
Daß sowohl die Aufnahme als auch der Einbau eindeutig langsamer verliefen, sollen die folgenden Boxplot-Darstellungen der Meßwerte beider Gruppen verdeutlichen:



**Abb. 15: Boxplot aller Meßwerte der Aufnahme von Leucin unter Kontrollbedingungen und 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung**



Hierbei zeigt sich, daß sich die zentralen 50% der Meßwerte der jeweiligen Gruppen nicht überschneiden. Dies war auch für den Einbau in die säureunlösliche Fraktion der Fall, wie in der nächsten Abbildung ersichtlich.



**Abb. 16: Boxplot aller Meßwerte des Einbaus von Leucin unter Kontrollbedingungen und 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung**

Die Mittelwerte aller Messungen zu den jeweils betrachteten Zeitpunkten innerhalb der Versuche bilden die Punkte einer Geraden.

Die Steigungswerte der Geraden der Aufnahme und des Einbaus sollte sich entsprechen, wenn man davon ausgeht, daß ein Fließgleichgewicht zwischen der aktiven Aufnahme der Aminosäure in das Zellinnere und deren weiterer Verstoffwechslung besteht und keine Zunahme des freien Pools der aufgenommenen Aminosäure zu messen ist.

Im Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben läßt sich kein signifikanter Unterschied der Steigung in der graphischen Darstellung der Aufnahme und des Einbaus bestimmen. Dies gilt sowohl für die Kontrolle als auch für die behandelten Zellen.

**Tab. 20: Vergleich der Steigung der Geraden der Aufnahme und des Einbaus von Leucin unter Kontrollbedingungen und 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung**

Aufnahme Kontrolle	Einbau Kontrolle	Aufnahme Vincristin	Einbau Vincristin
0,0298	0,0235	0,0143	0,0147
0,0389	0,0405	0,0137	0,0177
0,0316	0,0350	0,0190	0,0132
0,0349	0,0383	0,0233	0,0168
		0,0157	0,0183
		0,0251	0,0198
		0,0207	0,0160
		0,0236	0,0211
		0,0185	0,0155
		0,0193	0,0129

Hierbei ist zu beachten, daß aufgrund der Versuchsanordnung pro Kontrollwert jeweils mehrere Werte für die Messung der behandelten Zellen vorliegen.

**Tab. 21: Wilcoxon-Test der Kontrollen:**

Mann-Whitney-U	6,000
Wilcoxon-W	16,000
Z	-,577
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,564
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	<b>,686</b>

**Tab. 22: Wilcoxon-Test der mit Vincristin behandelten Zellen:**

Mann-Whitney-U	29,000
Wilcoxon-W	84,000
Z	-1,587
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,112
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	<b>,123</b>

### **3.8 Kinetik der Aufnahme und des Einbaus von Leucin innerhalb der ersten 10 Minuten in der Kontrollgruppe und nach Vincristinbehandlung**

#### **3.8.1 Kurzkinetik ohne Erwärmung im Wasserbad**

Die Zellreihe wurde in oben beschriebener Weise (vgl. Punkt 2.2.2.6) 24 Stunden vor Inkubation mit der markierten Aminosäure über 4 Stunden mit Vincristin behandelt. 2 Stunden vor Inkubation wurde ein Mediumwechsel mit Kulturmedium physiologischer Leucinkonzentration von 17 mg/l vollzogen. Jeweils 150 µl der Zellsuspension von ca.  $2,2 \times 10^6$  Zellen/ml bildeten mit 150 µl an H-3 Leucin (10 µCi/ml bzw. 0.37 MBq/ml) den Versuchsansatz. Diese Versuchsansätze wurden nach Zugabe des H-3 Leucins nicht in Wasserbad gestellt, sondern im Kälteraum bei 5°C nach jeweils 0,1,2,3,4,7, und 10 Minuten mit 1ml PBS versetzt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Dieser Versuch sollte die Temperaturabhängigkeit des zugrunde liegenden Transportvorganges verdeutlichen, lediglich minimale Diffusionsvorgänge dürften bei der gewählten Temperatur meßbar sein.

Nach Lyse der Zellen und Messung der Aufnahme der markierten Aminosäure im Beta-Counter am folgenden Tag, ergaben sich für alle Zeitpunkte sowohl in der Kontrolle, wie auch bei den behandelten Zellen diffus gestreute Werte zwischen 66 und 697 cpm. Eine Auswertung dieser Ergebnisse war nicht möglich, eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die starke Temperaturabhängigkeit des Transporters, der den Hauptanteil an der Aufnahme der Aminosäure beisteuert (vgl. Punkt 1.4).

### 3.8.2 Kurzkinetik bei physiologischer Konzentration von Leucin nach Erwärmung im Wasserbad

Der Versuchsaufbau wurde von Punkt 3.8.1 übernommen, jedoch eine Inkubation der Versuchsansätze im Wasserbad für 0,1,2,3,4,7 und 10 Minuten durchgeführt. Außerdem setzte sich der Versuchsansatz aus 100 µl Zellsuspension von ca.  $3,3 \times 10^6$  Zellen und 200 µl H-3 Leucinlösung (10 µCi/ml bzw. 0,37 MBq/ml) zusammen.

In den ersten 10 Minuten des Aufnahmeprozesses wurden folgende Stoffmengen an Leucin über die Zellmembran transportiert:

Tab. 23: Kinetik der Aufnahme von Leucin über einen Zeitraum von 10 Minuten unter Kontrollbedingungen (n=6)

Zeit in min.	Zählrate (cpm/ $10^6$ Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ $10^6$ Zellen)
0	$13132 \pm 2945$	$0,23 \pm 0,04$
1	$16858 \pm 1974$	$0,31 \pm 0,04$
2	$15162 \pm 1899$	$0,27 \pm 0,02$
3	$22485 \pm 1314$	$0,42 \pm 0,02$
4	$25653 \pm 1876$	$0,48 \pm 0,03$
7	$30989 \pm 3235$	$0,58 \pm 0,06$
10	$38354 \pm 2826$	$0,71 \pm 0,05$

Die Aufnahmekinetik ließ sich in Form einer Kurve darstellen, jedoch sollten weitere Versuche unter Ausnutzung des Effektes der Transstimulation dies noch stärker verdeutlichen.

(Der Effekt der Transstimulation wird in der Diskussion erläutert.)

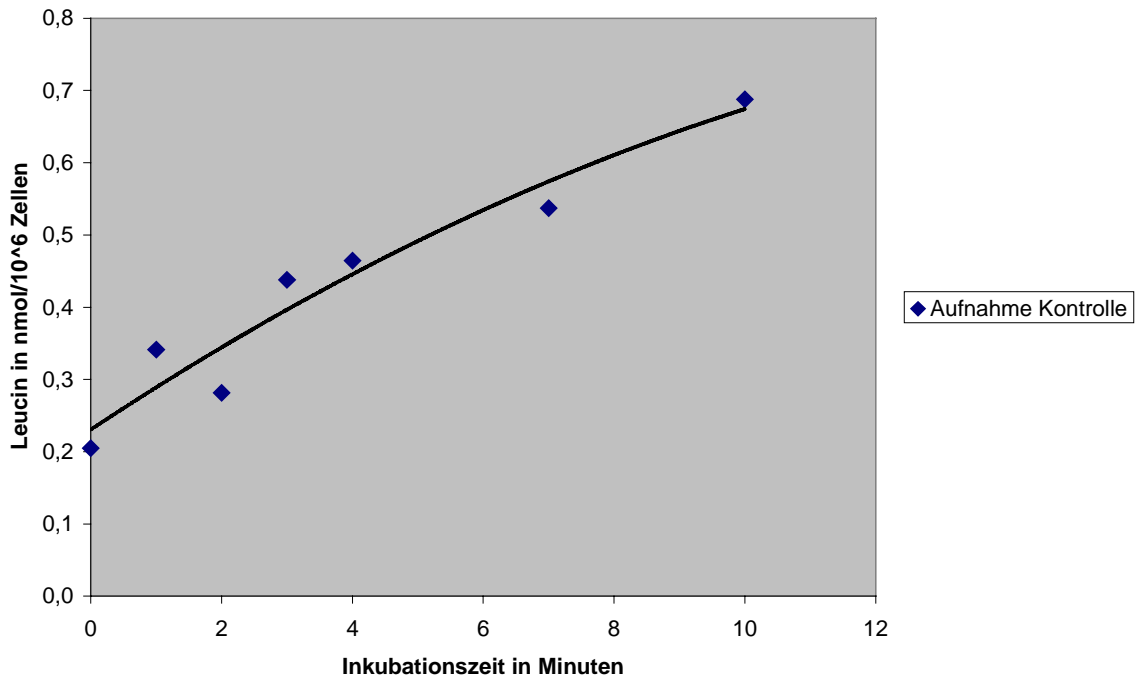


Abb. 17: Aufnahme von Leucin in den ersten 10 Minuten unter Kontrollbedingungen bei physiologischer Leucinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit

Für die behandelten Zellen lagen die Werte auf deutlich niedrigerem Niveau, die graphische Darstellung stellt sich in ähnlicher Form wie die der Kontrolle dar.

Tab. 24: Kinetik der Aufnahme von Leucin über einen Zeitraum von 10 Minuten 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung (n=6)

Zeit in min.	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
0	10102 ± 842	0,19 ± 0,02
1	11937 ± 615	0,22 ± 0,01
2	13560 ± 1072	0,25 ± 0,02
3	15169 ± 494	0,28 ± 0,01
4	18684 ± 504	0,35 ± 0,01
7	21257 ± 1570	0,40 ± 0,03

+

+

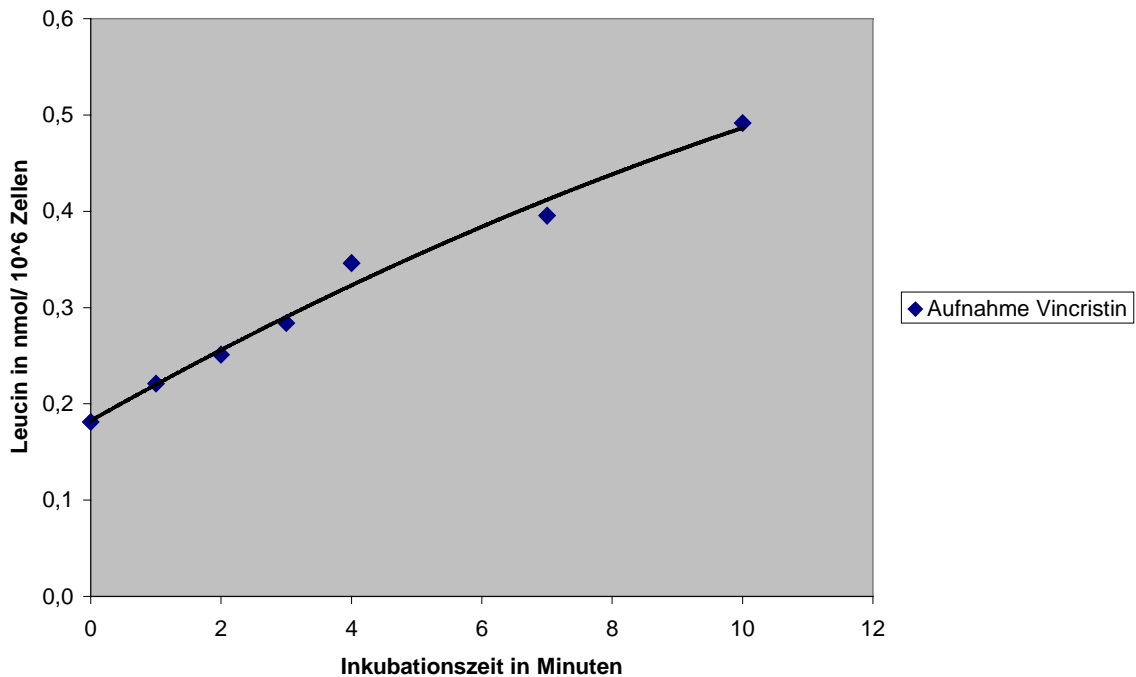


Abb. 18: Aufnahme von Leucin in den ersten 10 Minuten 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei physiologischer Leucinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit

Der Haupt-Transporter, der Leucin über die Zellmembran ins Cytoplasma überführt, arbeiten auf Basis eines Austauschprozesses (siehe Punkt 1.4), demnach sollte die graphische Darstellung eine Kurve und keine Gerade beschreiben. Dies müßte sich deutlicher zeigen, wenn dem Transport nach außen mehr Substrat im Zellinneren zur Verfügung gestellt wird, d.h. eine Transstimulation (vgl. Punkt 5) stattfindet.

Im folgenden Versuch wurde deshalb Kulturmedium mit einer Konzentration von 200 mg/l an Leucin zur zweistündigen Ruhephase vor Inkubation und während des Versuches eingesetzt, um das Zellinnere

### 3.8.3 Kurzkinetik bei einer Leucinkonzentration von 200 mg/l nach Erwärmung im Wasserbad

Entsprechender Versuchsablauf wie im Vorversuch unter 3.8.2, jedoch wurden die Zellen 2 Stunde vor der Inkubation nicht mit physiologischem Medium gewechselt, sondern mit einem Kulturmedium mit einer Leucinkonzentration von 200 mg/l, um die Zellen stärker mit Leucin zu sättigen. Auch der Versuch wurde bei 200 mg/l Leucin im Versuchsansatz durchgeführt.

Durch die Transstimulation stieg die aufgenommene Leucinstoffmenge erwartungsgemäß an, wie man der folgenden Tabelle entnehmen kann.

Tab. 25: Kinetik der Aufnahme von Leucin über einen Zeitraum von 10 Minuten unter Kontrollbedingungen bei 200mg/l an Leucin(n=6)

Zeit in min.	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
0	1670 ± 254	0,73 ± 0,11
1	2778 ± 343	1,23 ± 0,15
2	3394 ± 270	1,50 ± 0,09
3	3761 ± 337	1,63 ± 0,15
4	4281 ± 178	1,87 ± 0,08
7	4933 ± 391	2,20 ± 0,12
10	5967 ± 321	2,61 ± 0,14

Da nun dem Antiporter von Beginn der Inkubation an mehr Substrat aus dem Zellinneren zur Verfügung stand, wurde in der graphischen Darstellung der Charakter der Aufnahmekurve deutlicher als im Vorversuch.



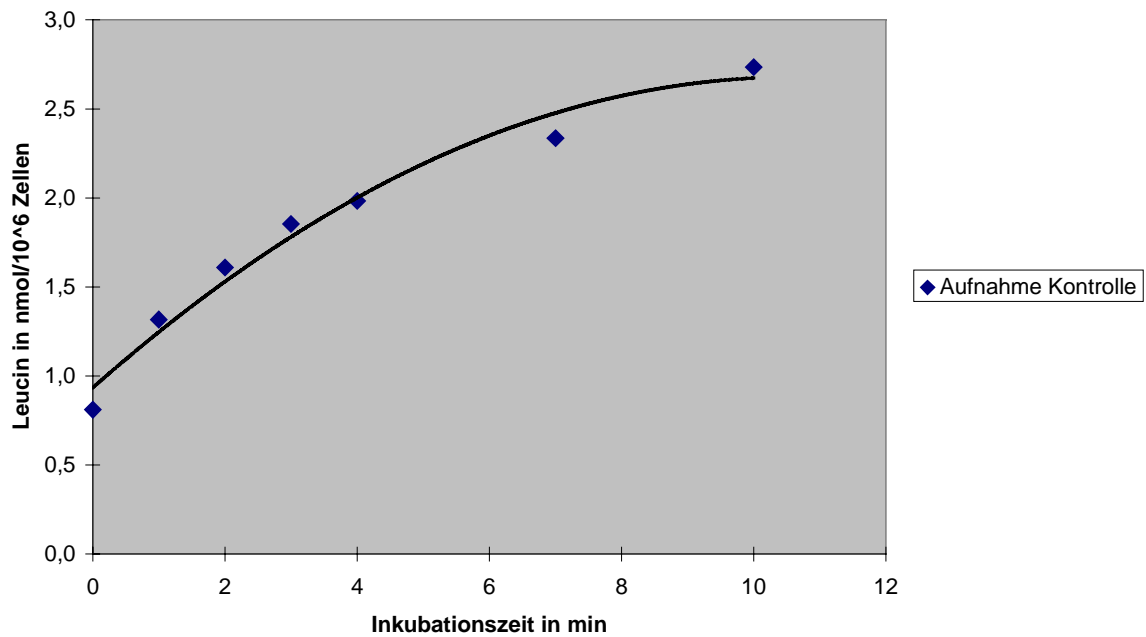


Abb. 19: Aufnahme von Leucin innerhalb der ersten 10 Minuten unter Kontrollbedingungen bei 200 mg/l an Leucin im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Zeit

Der Effekt der Transstimulation ließ sich auch bei den behandelten Zellen nachweisen:

Tab. 26: Kinetik der Aufnahme von Leucin über einen Zeitraum von 10 Minuten 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung (n=6)

Zeit in min.	Zählrate (cpm/ 10 <sup>6</sup> Zellen)	Aufnahme Leucin (nmol/ 10 <sup>6</sup> Zellen)
0	827 ± 65	0,36 ± 0,03
1	1371 ± 445	0,60 ± 0,19
2	1773 ± 434	0,80 ± 0,20
3	2534 ± 178	1,12 ± 0,06
4	2870 ± 209	1,26 ± 0,09
7	3190 ± 303	1,44 ± 0,12
10	3493 ± 563	1,52 ± 0,23

Folglich ist nun auch in der Graphik ein klarer Kurvenverlauf der Aufnahme durch den Transporter zu erkennen, da von Beginn der Beobachtung an ausreichend Substrat für den Transport aus der Zelle hinaus zu Verfügung steht.

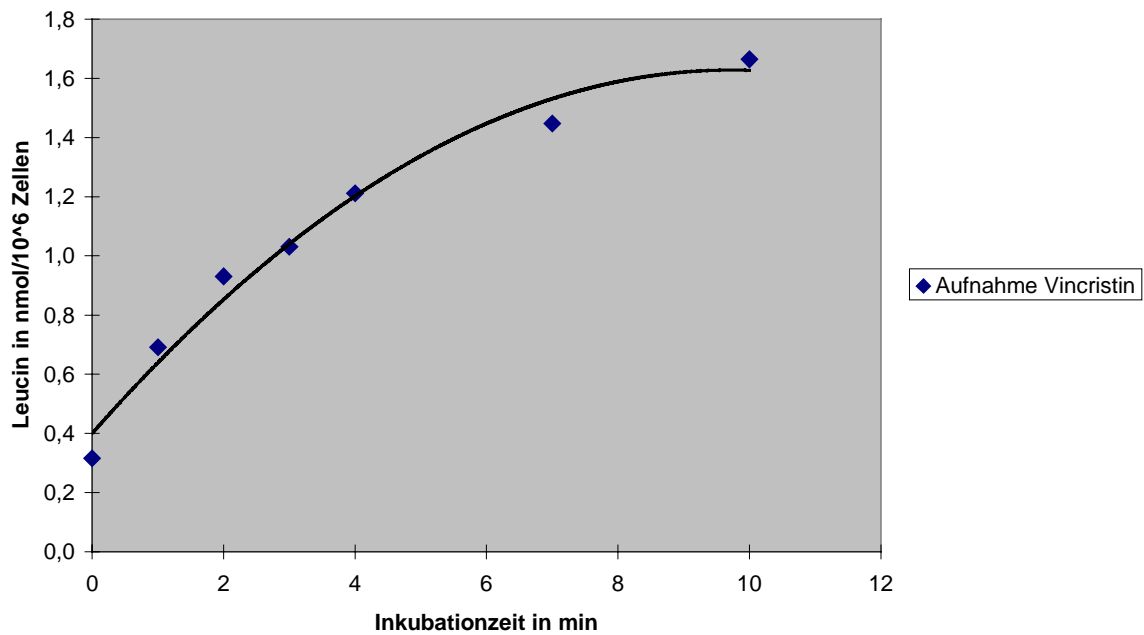


Abb. 20: Aufnahme von Leucin über einen Zeitraum von 10 Minuten 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei 200 mg/l an Leucin im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Zeit

## 4 Diskussion

In der Einleitung wurde bereits dargestellt, daß neben dem am häufigsten verwandten Tracer  $^{18}\text{F}$ -FDG auch radioaktiv markierte Aminosäuren, wie z.B. Tyrosin, Methionin und das bisher wenig verwandte Leucin zunehmende Bedeutung in Diagnosestellung, Prognose und Bewertung des Behandlungserfolg einer Therapie im Rahmen einer Tumorerkrankung erlangten (Ishiwata et al., 1993; Higashi et al, 1993; Rodriguez et al, 1995; Schaidler et al.,1996; Clavo et al., 1996; Torizuka et al, 1997; Inoue et al, 1998; Shields et al., 1998; Wester et al, 1999).

Aussagen über Dignität und metabolischen Zustand (Oxygenierung, Grad der Malignität) eines Tumors liefern Grundlage für die Optimierung der Behandlung. So ist eine Chemotherapie bei mitosereichen Carcinomen eher erfolgversprechend als bei Tumoren, die nur langsam wachsen. In der Strahlentherapie spielt der Sauerstoffgehalt der Zielregion eine wesentliche Rolle, da der zytotoxische Effekt mit dem Grad der Oxygenierung korreliert (Wahl et al., 1992; Clavo et al., 1995).

Natürlich reagieren Tumoren einer bestimmten Entität nicht immer in absolut gleicher Weise auf die Einwirkungen der Therapie. Hilfreich wäre hierbei die Messung einer solitären Stoffwechselleistung des Tumorzellverbandes vor und nach Behandlung, die darüber Aufschluß geben könnte, ob die angewandte Therapie Wirkung zeigt oder nicht. Somit könnte man idealer Weise schon nach der Erstanwendung darüber befinden, ob der Tumor auf die gewählte Behandlungsart anspricht oder eine Alternative zu erwägen ist.

Solche sogenannten Response-Prädiktoren wurden in der Literatur mittlerweile an mehreren Stellen beschrieben (Minn et al., 1988; Ichiya et al., 1991; Holthoff et al., 1993; Higashi et al., 1993; Bergström et al., 1987; Vitola et al., 1996; Lau et al., 1994), allerdings spielen die Aminosäuren, obwohl beinahe "Spiegelbild" der für das Tumorstadium so wichtigen Proteinbiosynthese, bisher nur eine untergeordnete Rolle.

Gegenstand dieser Arbeit sollte sein, die Aufnahme der Aminosäure Leucin in eine Lymphomzelllinie und den Einbau in Makromoleküle in vitro zu charakterisieren. Im Rahmen der kinetischen Betrachtungen wird kurz auf den bereits weitgehend beschriebenen membranösen Transport von Leucin eingegangen. Etwaige Abhängigkeiten von äußeren Einflüssen dieser Vorgänge, wie z.B. der Menge der angebotenen Aminosäure oder der Zelldichte werden dargestellt.

Das Hauptinteresse soll der zu erwartenden Änderung dieser Gesetzmäßigkeiten nach Therapie mit dem Chemotherapeutikum Vincristin gelten, da hierdurch eventuell eine Aussage zur Früherkennung des Ansprechens auf die Therapie möglich wird.

Bestimmte man die Leucinaufnahme bei verschiedenen Zelldichten der Suspensionszelllinie so stellte man fest, daß in den Bereichen von 1,29 bis  $3,88 \times 10^6$  Zellen/ml keine wesentliche Änderung der Leucinaufnahme pro Zelle zu messen war (Punkt 3.1). Dieser Effekt war unerwartet, da für die Adhäsionszelllinie eines Lymphoms bei Mäusen gegenteilige Ergebnisse vorliegen. Oxender et al. beobachteten 1977 eine deutliche Steigerung der Aufnahme an markiertem Leucin, je stärker die Zellen im Monolayer konfluieren (Oxender et al., 1977).

Da in einer Adhäsionszelllinie bei höheren Konfluenzraten von einem Rückgang des Zellwachstums ausgegangen werden kann, stieg somit die Aufnahme mit Abnahme der Proliferation. In der Anzucht der DHL-4 Zelllinie lag durchgehend ein gleichmässiges Wachstum vor, konfluierende Zellen fielen bei den Zählungen im Rahmen der Medienwechsel nicht auf. Es liegt deshalb der Schluß nahe, daß im Bereich der Zelldichten, bei denen die Versuche dieser Arbeit durchgeführt wurden, keine gesteigerte Aufnahme der Aminosäure aufgrund der Abnahme der Proliferation auftrat.

Unter Punkt 3.2 ist ersichtlich, daß auch die unterschiedliche Aktivitätskonzentration des markierten Leucins zwischen 3,33  $\mu\text{Ci/ml}$  (0,12 MBq/ml) und 10  $\mu\text{Ci/ml}$  (0,37 MBq/ml) vergleichbare Ergebnisse liefert. Im Bereich dieser Aktivitätskonzentrationen ergeben sich für die Gesamtaufnahme an der Aminosäure keine Unterschiede, die auf eine mögliche Fehlerquelle aufgrund der Wahl der verwandten Aktivitätskonzentration hinweisen würden.

Mißt man die Aufnahme der Aminosäure in einem Zeitintervall von 15 bis 75 Minuten nach Inkubation mit der radioaktiv markierten Substanz, so zeigt sich in allen Versuchen ein linearer Anstieg der Gesamtaufnahme mit hohem Regressionsgrad. Diesen Effekt kann man in einem Konzentrationsbereich an Leucin von der annähernd physiologischen Konzentration (0,078-0,176 nM laut Schmidt et Thews, 1997) bei 17mg/l (0,13 mM) bis hin zum 15fachen dieses Wertes bei 255mg/l (1,95 mM) beobachten (vgl. Punkte 3.3, 3.4 und 3.6).

In der Literatur ist an mehreren Stellen der Effekt der sogenannten Trans-Stimulation beschrieben worden. Hinter diesem Begriff versteckt

sich eine steigerbare Aktivität der Aminosäuretransporter, die nach dem Austauschprinzip arbeiten, so z.B. auch der für Leucin entscheidene L-Transporter (Oxender et al., 1963). Inkubiert man Zellen in einem Medium vor, das reich an austauschbaren Aminosäuren des L-Transporter-Systems ist (Phenylalanin, Leucin), so kann man bei der anschließenden Messung der Aufnahme weit höhere Aufnahmeraten feststellen als bei Inkubation in Medium mit physiologischen Konzentrationen der Aminosäuren (Oxender et al., 1977).

Dies basiert auf der resultierenden hohen intrazellulären Konzentration an austauschbarer Aminosäure, wodurch dem Antiporter schon zu Beginn der Messung Substrat für den Transport aus der Zelle heraus zur Verfügung steht, was die Transportrate ins Zellinnere steigert.

Der selbe Effekt zeigt sich auch in einer vollständigen Entleerung der Zellen in aminosäurefreiem Medium innerhalb von 10 Minuten bei zuvor physiologischen Ausgangswerten im Zytoplasma, wobei dieser Vorgang wesentlich schneller als bei dem weit verbreiteten A-Transport-System abläuft (Oxender et al., 1977).

Die Transstimulation ist in mehreren Versuchen (siehe Punkte 3.3, 3.4, 3.5 und 3.6) zu beobachten, allerdings ist hierbei auffallend, daß in sämtlichen Messungen die korrespondierende säureunlösliche Fraktion, also der Anteil des ins Protein eingebauten Leucins (vgl. 1.4) konstant bleibt und nicht steigerbar ist. Ebenso bleibt der freie Pool an aufgenommener Aminosäure über die Zeit hinweg annähernd konstant (vgl. 3.7). Dies legt den Schluß nahe, daß bereits bei physiologischer Konzentration an Leucin im Kulturmedium die maximale Geschwindigkeit des Einbauvorganges der Aminosäure in das Protein erreicht wird und

somit zwar die Aufnahme durch die Transstimulation steigerbar ist, der Einbau in das Protein aber hiervon unberührt bleibt.

Aus vorausgegangenen Untersuchungen von Glassy und Furlong war bekannt, daß die Aufnahme von Leucin humaner diploider Lymphoblastoidzellen WIL-2 beim Durchlaufen eines Zellzykluses starken Schwankungen unterliegt (Glassy et Furlong, 1981). Beim Übertritt von der S- in die G<sub>2</sub>-Phase sinkt die Aufnahme um ca. 100% ab, um beim Durchschreiten der M-Phase ihr Minimum bei nur noch ca. 30% des Ausgangswertes zu erreichen. Nachdem in der M-Phase alle Aktivitäten des Zellstoffwechsels beinahe ruhen, steigt der Wert in der G<sub>1</sub>-Phase wiederum auf das Ausgangsniveau an.

Unter der Voraussetzung, daß Vincristin, wie unter Punkt 1.3 beschrieben, die Zellen in der M-Phase verharren läßt, müßte somit eine deutliche Verringerung der Aufnahme an Leucin zu messen sein. Bei denjenigen Zellen, die nicht auf das Chemotherapeutikum reagieren, sollte dieser Effekt nicht auftreten. In der Literatur sind Lymphomzellen größtenteils als sensibel für den Einsatz von Vinkaleukoblastinen beschrieben (Llanos et al., 1994; Meyer et al., 1995), was sich auch im geltenden Therapie-Schema CHOP (Herold et al., 1997) manifestiert hat.

Die Aussagekraft dieser Versuche ist dadurch eingeschränkt, daß die Zellen für jeden Versuch zwar gepoolt wurden, allerdings keine Synchronisation der Zellzyklen stattfand, was sich bei der Messung der unbehandelten Versuchsansätze in höheren Standardabweichungen bemerkbar machte. Allerdings gilt es zu bedenken, daß auch in vivo eine solche Gleichschaltung der Teilungsaktivität nicht praktikabel wäre.

Unter Punkt 3.5 wird ersichtlich, daß nach einer Behandlungsdauer mit

Vincristin von 4 Stunden und anschließender sofortiger Messung eine leichte Zunahme der Aufnahme und des Einbaus von Leucin unter beträchtlichen Schwankungen in die säureunlösliche Fraktion eingetreten ist.

Dies ist ein nicht unerwarteter Effekt, der in einigen Studien zur Response-Prädiktion von Radio- und Chemotherapie verschiedener Tumorarten sowohl für Aminosäuren (Bustany et al., 1986; Schaidler et al., 1995) als auch für  $^{18}\text{F}$ -FDG (De Witte et al., 1994; Rozenthal et al., 1989) bereits aufgefallen war. Der initiale Anstieg des Glucosemetabolismus kurz nach Therapie wurde meist als Zeichen einer Streßreaktion der Zelle gedeutet, die gesteigerte Aufnahme von Aminosäuren im Rahmen der forcierten Proteinbiosynthese. Deshalb sollten laut vergleichender Studien zur Response-Beurteilung die Betrachtungszeitpunkte auf 24 bis 48 Stunden, bei Verlaufsstudien eines Therapie-Response sogar auf Wochen ausgedehnt werden (Price et al., 1995).

Aufgrund der erheblichen Schwankungen der Ergebnisse gepaart mit hohen Standardabweichungen bei sofortiger Messung nach Behandlung und der Datenlage der Literatur wurde der Betrachtungszeitpunkt auf 24 Stunden nach Therapie verlegt. Die Messungen dieser Versuche zeigten ein wesentlich homogeneres Ergebnisbild (vgl. Punkte 3.6, 3.7 und 3.8).

Im einzelnen konnte gezeigt werden, daß sich sowohl in puncto Aufnahme als auch Einbau in das Protein die Messungen der unbehandelten Kontrollgruppen und der behandelten Zellen signifikant voneinander unterscheiden (siehe 3.7). Die Behandlung mit Vincristin verringert also sowohl die Aufnahme der Aminosäure in die Zelle als auch die Einbaurrate in die Proteine. Gleichzeitig konnte kein signifikanter



Unterschied zwischen den Steigungen der Kinetik der Aufnahme und des Einbaus, in beiden Gruppen getrennt betrachtet, festgestellt werden (vgl. Punkt 3.7).

Somit erscheint nach diesen Ergebnissen sowohl in der Kontrollgruppe wie auch bei den behandelten Zellen keine zunehmende Pool-Bildung an aufgenommener Aminosäure innerhalb der Zelle stattzufinden, es herrscht ein Flußgleichgewicht zwischen Aufnahme und Einbau.

Der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Aufnahme unter diesen Bedingungen ist nicht die Kapazität des transmembranösen Transporters sondern der Einbau in das Protein. Diese Erkenntnis gründet sich darauf, daß zwar für beide Gruppen eine Transstimulation der Aufnahme durch Variation der angebotenen Aminosäure zwischen 0,13 mM (physiologisch) und 2,8 mM möglich, der Einbau in das Protein aber stets nur minimalen Schwankungen unterworfen war (vgl. Punkt 3.6). Das gesteigerte Angebot an Leucin wirkt sich folglich nur auf die Aufnahme, nicht aber auf die Einbaurrate in die Proteine aus, die Kapazität dieses Vorganges ist bei physiologischen Konzentrationsverhältnissen bereits voll ausgeschöpft.

Wäre also der Effekt des Vincristins in Form einer erniedrigten Aufnahme- und Einbaurrate alleine auf eine Änderung der Transportrate zurückzuführen, so stünde dem Einbauvorgang nicht mehr genug Leucin zur Verfügung, weshalb die beobachteten niedrigeren Werte der Einbaurrate als in der Kontrollgruppe resultierten. Dann müßte allerdings eine Annäherung der Einbaurrate an die Aufnahmerate im Falle der behandelten Zellen eintreten, ebenso ein signifikanter Unterschied der Steigungen der beiden Geraden nachweisbar sein bzw. der frei Pool an aufgenommener Aminosäure stetig kleiner werden, da der

Einbauvorgang den freien Pool „aufzehren“ müßte. Auch kommt eine alleinige Änderung der Einbaurrate nicht in Frage, da auch innerhalb der ersten Minuten nach Zugabe der markierten Aminosäure, in denen der Einbau noch nicht Triebfeder der Aufnahme sein kann bereits eine Verringerung der Transportrate auftritt (siehe Punkte 3.8.2 und 3.8.3).

In humanen Lymphozyten beträgt der Anteil der nicht näher charakterisierten Diffusionsvorgänge lediglich 5%. Das L-System stellt mit 70% den Hauptweg der Aminosäure in das Zellinnere dar, daneben tragen noch das ASC mit 10% und das A-System mit 7,5% zum Transport von Leucin bei (Segel et al., 1983). Die Kapazität des L-Transporters wurde bei Lymphomzellen des B-Typs im Rahmen einer chronischen lymphatischen Leukämie als vermindert beschrieben, die Gewichtung der einzelnen Systeme blieb allerdings weitgehend unverändert (Woodlock et al., 1997)

Es scheinen also nach diesen Ergebnissen sowohl Effekte des Vincristins auf die Einbaurrate der Aminosäure Leucin in die Proteine vorzuliegen, als auch Änderungen der Transportkapazität meßbar zu sein. Dies könnte auf der Fähigkeit des Vincristins beruhen, in der Zielzelle den Vorgang des programmierten Zelltodes, der Apoptose zu initiieren (vgl. Punkt 1.3). Im Gegensatz zum Zelltod durch Nekrose, bei dem die zelluläre Homöostase aufgrund gesteigerter Membranpermeabilität langsam zusammenbricht (Wyllie, 1980) läuft bei der Apoptose eine Kaskade verschiedener programmierter Veränderungen im Zellstoffwechsel ab.

DNA-Degradierung, das Auftreten des „Leitermusters“ in der Gel-Elektrophorese und spezifischer Kerngranulationen wurden beschrieben (Arends et al., 1991), die genauen Vorgänge und Auslösemechanismen

bis heute jedoch weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieses Absterbens der Zelle könnten auch Änderungen der Transportfähigkeit der Membran eine Rolle spielen.

Daß weiterhin eine für Austausch-Transportsysteme charakteristische Aufnahmekurve ableitbar ist, konnte man in den ersten zehn Minuten nach Inkubation beobachten. Sowohl unter physiologischen (0,13 mM) als auch stark erhöhten Leucinkonzentrationen (1,53 mM) war eine Abnahme der Transportrate nach Vincristinbehandlung zu erkennen (vgl. Punkte 3.8.1, 3.8.2 und 3.8.3). Die Präsenz des stark temperaturabhängigen L-Transporters (siehe Punkt 1.4) wurde auch bei diesem Versuch deutlich, sobald man die Zellen nach der Inkubation weiter auf Eis beließ. Im Temperaturbereich von ca. 5°C war praktisch keinerlei Aufnahme in die Zellen zu messen, lediglich minimale Diffusionsvorgänge können hier eine zu vernachlässigende Rolle spielen.

Die säureunlösliche Fraktion wurde nicht bestimmt, da der Schwerpunkt dieses Versuches allein auf der Betrachtung des Transportvorganges lag. Theoretisch könnte der Einbau in die Makromoleküle innerhalb der ersten 5-10 Minuten bereits im meßbaren Bereich liegen, da das rasche Einmünden Leucins in die Proteinbiosynthese in vivo an zahlreichen Stellen in der Vergangenheit beschrieben wurde (Ishiwata et al., 1993; Lauenstein et al., 1987).

Der Effekt der Transstimulation ist vor allem zu Beginn des Aufnahmeprozesses graphisch leicht darstellbar, da der Zelle zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger Aminosäure im Zellinneren zur Verfügung steht, die in den Austauschvorgang einbezogen werden könnte als im Inkubationsmedium vorhanden ist. Sättigt man das Zellinnere mit Leucin

im Vorfeld des Versuches, so zeigte sich dies in Form einer höheren Gesamtaufnahme bei langsamerem Anstieg des Anteils von markiertem Leucin am intrazellulären Pool. Die Kurve der Kinetik (Abb. 20 und 21) beschreibt keinen linearen Verlauf, wie man bei einem unidirektionalen Transporter erwarten könnte (vgl. Punkt 3.8.3).

Insgesamt konnte in den Messungen der starke Effekt des Chemotherapeutikums Vincristin auf Aufnahme und weitere Verstoffwechslung der Aminosäure Leucin *in vitro* beschrieben werden. Es wurde klar, daß sowohl die verminderte Proteinbiosynthese im Rahmen der Stathmokinesis als auch der, vermutliche durch Apoptose ausgelöste Rückgang der Transportrate sich eindeutig im Leucinstoffwechsel meßbar widerspiegeln. Gerade die für die Tumorzelle überlebenswichtige Produktion der Proteine ist durch den Einsatz von Leucin unmittelbarer nachvollziehbar als mit anderen Aminosäuren (siehe Punkt 1.4).

Ähnliche Untersuchungen des Stoffwechsels der Aminosäure Leucin *in vivo* könnten weiteren Aufschluß darüber geben, ob die markierte Aminosäure als möglicher Response-Prediktor für die Therapie eines Lymphomes in Frage kommt, was die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen. Im Rahmen des CHOP-Chemotherapie Schemas findet Vincristin bei der Therapie der Lymphome weltweit Verwendung (Herold et al., 1997; Llanos et al., 1994; Meyer et al., 1995) und könnte so eventuell auf seine Wirksamkeit im Einzelfall hin durch den Einsatz von Leucin als Responsemarker besser beurteilt werden.

Allerdings erlaubt die Messung des Leucin-Transportes an sich keine Aussage hinsichtlich des Malignitätsgrades der Lymphome, da bei der

Betrachtung von 86 verschiedenen Tumorhybriden zwar eine korrelierende Varianz des Hexose-Transportes und somit der Glucose-Utilisation nachweisbar war, die Präsenz und Aktivität der Transportsysteme A, ASC und L aber weitgehend unverändert blieben (White, 1984). Auch eine Aussage hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der Lymphome ist durch die Messung der  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme als Marker der Proliferation möglich, v.a. im Bereich hochgradig maligner Lymphome, wofür Leucin eher ungeeignet erscheint (Okada et al., 1992).

Bei der Beurteilung des Wachstumsverhaltens und auch bei der Diagnose der Lymphome steht der Einsatz des PET unter Verwendung von  $^{18}\text{F}$ -FDG im Vordergrund, das eine höhere Spezifität als das CT ausweist und außerdem posttherapeutische Gewebeveränderungen, Narben oder Rezidiv sicher zu unterscheiden vermag (Stumpe et al., 1998; Hoh et al., 1997; Moog et al., 1998; Bangerter et al., 1998).

In der Beurteilung der Lymphknoten im Hilusbereich der Lunge und intrapulmonal im Rahmen der Lymphomkrankung zeigte sich die attenuation correction als hilfreiche Verbesserung (Kotzerke et al., 1999). Hierbei werden durch Voraufnahmen störende Unschärfen in der Bildgebung minimiert. Insgesamt erhöhte sich allerdings die diagnostische Präzision gegenüber dem konventionellen PET nicht, liegt aber ebenso wie letzteres klar vor dem CT (Bengel et al., 1997). Durch Kombination mit der dreidimensionalen Darstellung im MRT wurde nochmals eine Verbesserung bei der Lokalisation der befallenen Strukturen möglich (Kotzerke et al., 1999), wodurch die Planung einer operativen oder strahlentherapeutischen Behandlung optimiert werden kann.

Für das CHOP Schema gibt es bereits Studien unter Verwendung von  $^{18}\text{F}$ -FDG, die sich für die Abschätzung des unmittelbaren Therapieerfolges nach 7 Tagen, des Langzeitbenefits nach dem zweiten Zyklus der Chemotherapie empfehlen (Römer et al., 1998).

Allerdings lieferten die Ausgangs-Messungen vor der Therapie in einigen Untersuchungen ausgeprägte Abweichungen (Rodriguez et al., 1995; Lapela et al., 1995), was die Beurteilung des Effektes erschweren kann.

Ferner unterliegt die Aufnahme des Tracers  $^{18}\text{F}$ -FDG unter anderem dem Einfluß des Plasma-Glucose-Spiegels, was die Verwertbarkeit der Ergebnisse bei den Patienten mit Erkrankungen im Bereich dieses Parameters (siehe Punkt 1.4) einschränkt. Tumorpatienten haben in 37 bis 60% der Fälle einen pathologischen Standard-Glucose-Toleranz-Test (Lindholm et al., 1993; Langen et al., 1993).

Für die weitere Erforschung eines aussagekräftigen Markers zur Response-Prädiktion der Therapie maligner Lymphome würde sich Leucin als Vertreter der Aminosäure-Marker somit geradezu anbieten, da die Störgröße der Blut-Glucose-Schwankungen bei Messungen mit Leucin nicht ins Gewicht fällt (vgl. 1.4). Die akute Hyperglykaemie veränderte bei Einsatz von  $^{18}\text{F}$ -FDG und  $^3\text{H}$ -Thymidin die Messungsergebnisse signifikant (Langen et al., 1993; Lindholm et al., 1993). Bei  $^3\text{H}$ -Methionin und  $^3\text{H}$ -Leucin trat dieser Effekt nicht auf (Torizuka et al., 1997).

Speziell im Bereich der Bildgebung von Tumoren des ZNS sind Aminosäuren wesentlich besser geeignet als  $^{18}\text{F}$ -FDG. Dies liegt einerseits an der hohen Glucose-Utilisation, die man in der grauen Substanz unter physiologischen Bedingungen antrifft, weshalb ein nur schwacher Kontrast zu möglichen Neoplasien resultieren würde.

Aminosäuren liefern hier einen ungleich höheren Kontrast, da ihr Stoffwechsel auf einem deutlich niedrigeren Grundniveau verläuft (Weber et al., 1997). Andererseits mißt man in entzündlichen Bereichen, gerade nach erfolgter Therapie eine stark erhöhte Glucose-Aufnahme in die Zellen aufgrund der Makrophagenaktivierung. Selbiger Effekt tritt nach Kubota bei Aminosäuren nicht auf und entfällt als mögliche Störgröße (Kubota et al., 1994; Kubota et al., 1995).

## 5 Zusammenfassung

Aminosäuren finden in den letzten Jahren mehr Beachtung in der Diagnostik und Therapie-Evaluation mittels der Positronen-Emissions-Tomography. Lange Zeit galt die  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglucose für fast alle Fragestellungen der Tumorforschung mit PET als vielversprechender Tracer unter den markierbaren Substanzen. Zumal jedoch vor allem in der Verlaufkontrolle einer Tumorthherapie die Proteinbiosynthese ein verlässlicher Parameter des Therapieerfolges sein kann, kamen die Edukte dieses Stoffwechselprozesses, die Aminosäuren neuerdings zur Verwendung.

Leucin als Vertreter der neutralen, verzweigt-kettigen Aminosäuren bot sich als solcher Tracer besonders an, da man bereits aus früheren Versuchen wußte, daß Leucin praktisch vollständig nach der Aufnahme in die Zelle der Proteinsynthese zur Verfügung steht. Dies ist bei den meisten anderen Aminosäuren, so z.B. auch bei dem häufig verwandten Methionin nicht der Fall, das als Methylgruppen-Donator an mehreren Stoffwechselwegen teilnimmt.

Die Aufnahme von Leucin in das Innere der Zelle erfolgt zu 95% über spezifische Aminosäure-Transporter, lediglich zu 5% über nicht näher charakterisierte Diffusionsvorgänge. Den Großteil macht hierbei der L-Transporter aus, der auch nach der Aminosäure Leucin benannt wurde.

In den Versuchen sollte die Aufnahme von Leucin in Lymphomzellen und der Einbau in die Makromoleküle, die im Falle des Leucins gleichzusetzen ist mit der Proteinsyntheseleistung der Zelle, dargestellt



hohen, nicht physiologischen Konzentrationsverhältnissen stattgefunden hatten, war auch von Interesse, inwiefern beide Vorgänge auf ein physiologisches Angebot an Leucin im Kulturmedium reagieren würden. Der Zusatz des Chemotherapeutikums Vincristin, das im Rahmen des CHOP-Schemas in der Behandlung der Lymphome weltweit Verwendung findet diente als exemplarische Therapieform, um eventuell meßbare Veränderung der Aufnahme und des Einbaus nach der Therapie im Leucinstoffwechsel der Tumorzellen zu demonstrieren. Dies ließe einen Schluß auf das Anprechen des Tumors auf die gewählte Therapie zu, wäre also ein Prädiktor des Response.

Im Rahmen der Ergebnisse war zunächst festzuhalten, daß die Aufnahme und der Einbauvorgang der Aminosäure in vitro im Beobachtungszeitraum von 15 bis 75 Minuten parallel zueinander verliefen, d.h. es fand keine Pool-Bildung von Leucin in der Tumorzelle statt. Dieser Umstand war auch nicht durch ein höheres Angebot an Leucin im Kulturmedium zu verändern, auch wenn es zu einer insgesamt stärkeren Aufnahme der Aminosäure in die Zelle kam. Interessanter Weise trat dieser Effekt beim Einbau in die Proteine nicht in Erscheinung, die Proteinbiosynthese konnte durch ein Mehrangebot an Leucin nicht gesteigert werden. Der freie Pool an aufgenommener Aminosäure war deshalb bei höherem Angebot an Leucin im Kulturmedium deutlich größer, blieb jedoch im Beobachtungszeitraum ebenso wie die Einbaurrate konstant. Bei physiologischen Konzentrationen scheint somit der Verbrauch an Leucin in der Proteinbiosynthese die Aufnahmerate zu regeln.

Betrachtete man die ersten zehn Minuten des Aufnahmevorganges so zeigte sich bei physiologischer Leucinkonzentration nur vage der zu

erwartende Kurvenverlauf des bidirektionalen Antiporters, der Leucin zum überwiegenden Teil über die Zellmembran schleust. Nutzte man die Flußrichtung des Antiporters aus der Zelle hinaus mittels Transstimulation, dem Aufsättigen der Zelle mit Leucin vor dem Versuch, so konnte man den Vorgang der Aufnahme von Leucin in das Zellinnere im Sinne eines bidirektionalen Transportes beschreiben. Sowohl die Aufnahme der Aminosäure als auch der Einbau in die Proteine sanken 24 Stunden nach Behandlung mit Vincristin deutlich ab. Dieser Effekt war bei allen gewählten Konzentrationsbereichen an Leucin im Kulturmedium in gleicher Weise darstellbar.

Vermutlich wirken hierbei die folgenden Vorgänge zusammen: Die Stathmokinesis, erzeugt durch die reversible Bindung des Vincristins an das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin des Spindelapparates in der M-Phase der Zellteilung, bei deren Eintreten ein starker Rückgang der Proteinbiosynthese der Tumorzelle resultiert. Dieser Effekt tritt wiederum nur bei der Initiierung des programmierten Zelltodes, der Apoptose auf. Vermutlich kommt es im Rahmen dieses Absterbens der Zelle auch zu Veränderungen der Transportkapazitäten an der Zellmembran, was sich in einer reduzierten Aufnahme an Leucin meßbar niederschlägt.

Obwohl die Ergebnisse einer in vitro-Untersuchung aus mehreren Gründen immer nur von beschränkter Aussagekraft für Parallelschlüsse auf in vivo Verhältnisse sein können, genannt sei an dieser Stelle nur die fehlende Nachahmung der Perfusionsverhältnisse im Tumorzellverband, so geben sie doch Hinweise auf Stoffwechselwege in vivo. Deshalb empfiehlt sich die Aminosäure Leucin nach den Ergebnissen dieser Arbeit für die Bewertung der Erfolgsaussichten einer Vincristinbehandlung bei malignen Lymphomen, da sie zweifelsfrei eine

herausragende Stellung in der Beurteilung der Proteinbiosynthese einer Tumorzelle unter den Aminosäuren besitzt.

## 6 Literaturverzeichnis

Aassar, O. S., Fischbein, N. J., Caputo, G. R., Kaplan, M. J., Price, D. C., Singer, M. I., Dillon, W. P., Hawkins, R. A.  
Metastatic head and neck cancer: role and usefulness of FDG PET in locating occult primary tumors. *Radiology*, 1999, 210: 177-181

Adler, D. D. und Wahl, R. L.

New methods for imaging the breast: techniques, findings, and potential.  
*AJR Am J Roentgenol*, 1995, 164: 19-30

Alavi, J. B., Alavi, A., Chawluk, J., Kushner, M., Powe, J., Hickey, W., Reivich, M.

Positron emission tomography in patients with glioma. A predictor of prognosis. *Cancer*, 1988, 62: 1074-1078

Arends, M. J. und Wyllie, A. H.

Apoptosis: mechanisms and roles in pathology  
*Int Rev Exp Pathol*, 1991, 32: 223-254

Avril, N., Dose, J., Janicke, F., Ziegler, S., Romer, W., Weber, W., Herz, M., Nathrath, W., Graeff, H., Schwaiger, M.

Assessment of axillary lymph node involvement in breast cancer patients with positron emission tomography using radiolabeled 2-(fluorine-18)-fluoro-2-deoxy-D-glucose.

*J Natl Cancer Inst*, 1996, 88: 1204-1209

Avril, N., Dose, J., Janicke, F., Bense, S., Ziegler, S.,  
Laubenbacher, C., Romer, W., Pache, H., Herz, M., Allgayer,  
B., Nathrath, W., Graeff, H., Schwaiger, M.

Metabolic characterization of breast tumors with positron emission  
tomography using F-18 fluorodeoxyglucose.

*J Clin Oncol*, 1996, 14: 1848-1857

Avril, N., Bense, S., Ziegler, S. I., Dose, J., Weber, W.,  
Laubenbacher, C., Romer, W., Janicke, F., Schwaiger, M.  
Breast imaging with fluorine-18-FDG PET: quantitative image analysis.

*J Nucl Med*, 1997, 38: 1186-1191

Avril, N., Schelling, M., Dose, J., Weber, W., Schwaiger, M  
Utility of PET in breast cancer.

*Clinical Positron Imaging*, 1999, 2: 261-271

Avril, N., Rose, C. A., Schelling, M., Dose, J., Kuhn, W., Bense,  
S., Weber, W., Ziegler, S., Graeff, H., Schwaiger, M.

Breast imaging with positron emission tomography and fluorine-18  
fluorodeoxyglucose: use and limitations (Abstract only)

*J Clin Oncol*, 2000, 18: 3495-3502

Bangerter, M., Moog, F., Buchmann, I., Kotzerke, J.,  
Griesshammer, M., Hafner, M., Elsner, K., Frickhofen, N.,  
Reske, S. N., Bergmann, L.

Whole-body 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission  
tomography (FDG-PET) for accurate staging of Hodgkin's disease  
*Ann Oncol*, 1998, 9: 1117-1122

Barker, F. G., Chang, S. M., Valk, P. E., Pounds, T. R.,  
Prados, M. D.

18-Fluorodeoxyglucose uptake and survival of patients with suspected  
recurrent malignant glioma. *Cancer*, 1997, 79: 115-126

Barker, G. A., Wilkins, R. J., Golding, S., Ellory, J. C.  
Neutral amino acid transport in bovine articular chondrocytes.  
*J Physiol (Lond)*, 1999, 514 ( Pt 3): 795-808

Beaney, R. P.

Positron emission tomography in the study of human tumors.  
*Semin Nucl Med*, 1984, 14: 324-341

Bengel, F. M., Ziegler, S. I., Avril, N., Weber, W.,  
Laubenbacher, C., Schwaiger, M.

Whole-body positron emission tomography in clinical oncology:  
comparison between attenuation-corrected and uncorrected images.  
*Eur J Nucl Med*, 1997, 24: 1091-1098

Bergstrom, M., Muhr, C., Lundberg, P. O., Bergstrom, K., Gee, A. D., Fath, K. J., Langstrom, B.

Rapid decrease in amino acid metabolism in prolactin-secreting pituitary adenomas after bromocriptine treatment: a PET study.

*J Comput Assist Tomogr*, 1987, 11: 815-819

Bergstrom, M., Muhr, C., Jossan, S., Lilja, A., Nyberg, G., Langstrom, B.

Differentiation of pituitary adenoma and meningioma: visualization with positron emission tomography and [11C]-L-deprenyl.

*Neurosurgery*, 1992, 30: 855-861

Bergstrom, M.

Positron emission tomography in tumor diagnosis and treatment follow-up.

*Acta Oncol*, 1993, 32: 183-188

Bergstrom, M., Juhlin, C., Bonasera, T. A., Sundin, A., Rastad, J., Akerstrom, G., Langstrom, B.

PET imaging of adrenal cortical tumors with the 11beta-hydroxylase tracer 11C-metomidate. *J Nucl Med*, 2000, 41: 275-282

Birnbaum, M. J., Haspel, H. C., Rosen, O. M.

Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science*, 1987, 235: 1495-1498

Birnbaum, M. J., Haspel, H. C., Rosen, O. M.

Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science* ,1987, 235: 1495-1498

Bittar, R. G., Olivier, A., Sadikot, A. F., Andermann, F.,  
Comeau, R. M., Cyr, M., Peters, T. M., Reutens, D. C.

Localization of somatosensory function by using positron emission tomography scanning: a comparison with intraoperative cortical stimulation.

*J Neurosurg*, 1999, 90: 478-483

Bittar, R. G., Olivier, A., Sadikot, A. F., Andermann, F., Pike, G.  
B., Reutens, D. C.

Presurgical motor and somatosensory cortex mapping with functional magnetic resonance imaging and positron emission tomography.

*J Neurosurg*, 1999, 91: 915-921

Bury, T., Dowlati, A., Paulus, P., Corhay, J. L., Benoit, T.,  
Kayembe, J. M., Limet, R., Rigo, P., Radermecker, M.

Evaluation of the solitary pulmonary nodule by positron emission tomography imaging. *Eur Respir J* ,1996, 9: 410-414

Bustany, P., Chatel, M., Derlon, J. M., Darcel, F., Sgouropoulos,  
P., Soussaline, F., Syrota, A.

Brain tumor protein synthesis and histological grades: a study by positron emission tomography (PET) with C11-L-Methionine

*J Neurooncol*, 1986, 3: 397-404



Calvo, R., Marti-Climent, J. M., Richter, J. A., Penuelas, I.,  
Crespo-Jara, A., Villar, L. M., Garcia-Velloso, M. J.

Three-dimensional clinical PET in lung cancer: validation and practical  
strategies. *J Nucl Med*, 2000, 41: 439-448

Christensen, H. N.

On the development of amino acid transport systems.

*Fed Proc*, 1973, 32: 19-28

Christensen, H. N.

On the strategy of kinetic discrimination of amino acid transport systems.

*J Membrane Biol*, 1985, 84: 97-103

Christensen, H. N.

Distinguishing amino acid transport systems of a given cell or tissue.

*Methods Enzymol*, 1989, 173: 576-616

Clavo, A. C., Brown, R. S., Wahl, R. L.

Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increased by  
hypoxia. *J Nucl Med*, 1995, 36: 1625-1632

Clavo, A. C. und Wahl, R. L.

Effects of hypoxia on the uptake of tritiated thymidine, L-leucine, L-  
methionine and FDG in cultured cancer cells.

*J Nucl Med*, 1996, 37: 502-506

Clevenger, F. W.

Nutritional support in the patient with the systemic inflammatory response syndrome. *Am J Surg*, 1993, 165: 68S-74S

Crippa, F., Seregni, E., Agresti, R., Chiesa, C., Pascali, C., Bogni, A., Decise, D., De, S., V, Greco, M., Daidone, M. G., Bombardieri, E.

Association between [18F]fluorodeoxyglucose uptake and postoperative histopathology, hormone receptor status, thymidine labelling index and p53 in primary breast cancer: a preliminary observation

*Eur J Nucl Med*, 1998, 25: 1429-1434

Crippa, F., Agresti, R., Seregni, E., Greco, M., Pascali, C., Bogni, A., Chiesa, C., De, S., V, Delledonne, V., Salvadori, B., Leutner, M., Bombardieri, E.

Prospective evaluation of fluorine-18-FDG PET in presurgical staging of the axilla in breast cancer. *J Nucl Med*, 1998, 39: 4-8

De Witte, O., Hildebrand, J., Luxen, A., Goldman, S.

Acute effect of carmustine on glucose metabolism in brain and glioblastoma

*Cancer*, 15-11-1994, 74: 2836-2842

Delbeke, D., Meyerowitz, C., Lapidus, R. L., Maciunas, R. J., Jennings, M. T., Moots, P. L., Kessler, R. M.

Optimal cutoff levels of F-18 fluorodeoxyglucose uptake in the differentiation of low-grade from high-grade brain tumors with PET

Dewan, N. A., Shehan, C. J., Reeb, S. D., Gobar, L. S., Scott, W. J., Ryschon, K.

Likelihood of malignancy in a solitary pulmonary nodule: comparison of Bayesian analysis and results of FDG-PET scan.

*Chest*, 1997, 112: 416-422

Di Chiro, G.

Positron emission tomography using [18F] fluorodeoxyglucose in brain tumors. A powerful diagnostic and prognostic tool.

*Invest Radiol*, 1987, 22: 360-371

Di Chiro, G.

Positron emission tomography using [18F] fluorodeoxyglucose in brain tumors. A powerful diagnostic and prognostic tool.

*Invest Radiol*, 1987, 22: 360-371

Di Chiro, G., Hatazawa, J., Katz, D. A., Rizzoli, H. V.,

De Michele, D. J.

Glucose utilization by intracranial meningiomas as an index of tumor aggressivity and probability of recurrence: a PET study.

*Radiology*, 1987, 164: 521-526

Diederichs, C. G., Staib, L., Glatting, G., Beger, H. G., Reske, S. N.

FDG PET: elevated plasma glucose reduces both uptake and detection rate of pancreatic malignancies.

*J Nucl Med*, 1998, 39: 1030-1033

Erasmus, J. J., McAdams, H. P., Patz, E. F., Jr., Coleman, R. E., Ahuja, V., Goodman, P. C.

Evaluation of primary pulmonary carcinoid tumors using FDG PET  
*AJR Am J Roentgenol*, 1998, 170: 1369-1373

Erickson, L. E.

Inhibition of intracellular protein transport in the mouse exocrine pancreas induced by vinblastine. *Cell Tissue Res*, 1980, 206: 73-81

Fischbein, N. J., AAssar, O. S., Caputo, G. R., Kaplan, M. J., Singer, M. I., Price, D. C., Dillon, W. P., Hawkins, R. A.

Clinical utility of positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose in detecting residual/recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck

*AJNR Am J Neuroradiol*, 1998, 19: 1189-1196

Fischman, A. J., Khaw, B. A., Strauss, H. W.

Quo vadis radioimmune imaging. *J Nucl Med*, 1989, 30: 1911-1915

Fisher, T. C., Milner, A. E., Gregory, C. D., Jackman, A. L., Aherne, G. W., Hartley, J. A., Dive, C., Hickman, J. A.

bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways.

*Cancer Res*, 1993, 53: 3321-3326

Flier, J. S., Mueckler, M. M., Usher, P., Lodish, H. F.

Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science*, 1987, 235: 1492-1495

Frei, E. III., Whang, J., Scoggins, R. B., Van Scott, E. J., Rall, D. P., Ben, M.

The stathmokinetic effect of vincristine.

*Cancer Research*, 1964, 24: 1918-1925

Fujiwara, T., Matsuzawa, T., Kubota, K., Abe, Y., Itoh, M.,

Fukuda, H., Hatazawa, J., Yoshioka, S., Yamaguchi, K., Ito, K.

Relationship between histologic type of primary lung cancer and carbon-11-L-methionine uptake with positron emission tomography.

*J Nucl Med*, 1989, 30: 33-37

Gambhir, S. S., Hoh, C. K., Phelps, M. E., Madar, I., Maddahi, J.

Decision tree sensitivity analysis for cost-effectiveness of FDG-PET in the staging and management of non-small-cell lung carcinoma.

*J Nucl Med*, 1996, 37: 1428-1436

Glassy, M. C. und Furlong, C. E.

Neutral amino acid transport during the cell cycle of cultured human lymphocytes. *J Cell Physiol*, 1981, 107: 69-74

Gould, M. K. und Lillington, G. A.

Strategy and cost in investigating solitary pulmonary nodules.

*Thorax*, 1998, 53 Suppl 2: S32-S37

Grant, J. P.

Nutritional support in critically ill patients. *Ann Surg*, 1994, 220: 610-616

Greven, K. M., Williams, D. W., III, Keyes, J. W., Jr., McGuirt, W. F., Watson, N. E., Jr., Case, L. D.

Can positron emission tomography distinguish tumor recurrence from irradiation sequelae in patients treated for larynx cancer? ]

*Cancer J Sci Am* ,1997, 3: 353-357

Guhlmann, A., Storck, M., Kotzerke, J., Moog, F., Sunder-Plassmann, L., Reske, S. N.

Lymph node staging in non-small cell lung cancer: evaluation by [18F]FDG positron emission tomography (PET)

*Thorax* ,1997, 52: 438-441

Gupta, N. C., Maloof, J., Gunel, E.

Probability of malignancy in solitary pulmonary nodules using fluorine-18-FDG and PET

*J Nucl Med* ,1996, 37: 943-948

Heiss, P., Mayer, S., Herz, M., Wester, H. J., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R.

Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo

*J Nucl Med*, 1999, 40: 1367-1373

Herholz, K., Holzer, T., Bauer, B., Schroder, R., Voges, J., Ernestus, R. I., Mendoza, G., Weber-Luxenburger, G., Lottgen, J., Thiel, A., Wienhard, K., Heiss, W. D.

<sup>11</sup>C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas

*Neurology*, 1998, 50: 1316-1322

Higashi, K., Clavo, A. C., Wahl, R. L.

In vitro assessment of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, L-methionine and thymidine as agents to monitor the early response of a human adenocarcinoma cell line to radiotherapy.

*J Nucl Med*, 1993, 34: 773-779

Hodgkiss, R. J., Webster, L., Wilson, G. D.

Development of bioreductive markers for tumour hypoxia.

*Acta Oncol*, 1995, 34: 351-355

Hoh, C. K., Glaspy, J., Rosen, P., Dahlbom, M., Lee, S. J., Kunkel, L., Hawkin, R. A., Maddahi, J., Phelps, M. E.

Whole-body FDG-PET imaging for staging of Hodgkin's disease and lymphoma. *J Nucl Med*, 1997, 38: 343-348

Holder, W. D., Jr., White, R. L., Jr., Zuger, J. H., Easton, E. J., Jr., Greene, F. L.

Effectiveness of positron emission tomography for the detection of melanoma metastases

*Ann Surg*, 1998, 227: 764-769

Holthoff, V. A., Herholz, K., Berthold, F., Widemann, B., Schroder, R., Neubauer, I., Heiss, W. D.

In vivo metabolism of childhood posterior fossa tumors and primitive neuroectodermal tumors before and after treatment.

*Cancer*, 1993, 72: 1394-1403

Huschtscha, L. I., Bartier, W. A., Ross, C. E., Tattersall, M. H.

Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Br J Cancer*, 1996, 73: 54-60

Ichiya, Y., Kuwabara, Y., Otsuka, M., Tahara, T., Yoshikai, T., Fukumura, T., Jingu, K., Masuda, K.

Assessment of response to cancer therapy using fluorine-18-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography.

*J Nucl Med*, 1991, 32: 1655-1660

Inoue, T., Kim, E. E., Komaki, R., Wong, F. C., Bassa, P., Wong, W. H., Yang, D. J., Endo, K., Podoloff, D. A.

Detecting recurrent or residual lung cancer with FDG-PET

*J Nucl Med*, 1995, 36: 788-793



Inoue, T., Tomiyoshi, K., Higuichi, T., Ahmed, K., Sarwar, M., Aoyagi, K., Amano, S., Alyafei, S., Zhang, H., Endo, K.

Biodistribution studies on L-3-[fluorine-18]fluoro-alpha-methyl tyrosine: a potential tumor-detecting agent

*J Nucl Med*, 1998, 39: 663-667

Ishiwata, K., Vaalburg, W., Elsinga, P. H., Paans, A. M., Woldring, M. G.

Comparison of L-[1-11C]methionine and L-methyl-[11C]methionine for measuring in vivo protein synthesis rates with PET.

*J Nucl Med*, 1988, 29: 1419-1427

Ishiwata, K., Vaalburg, W., Elsinga, P. H., Paans, A. M., Woldring, M. G.

Metabolic studies with L-[1-14C]tyrosine for the investigation of a kinetic model to measure protein synthesis rates with PET.

*J Nucl Med*, 1988, 29: 524-529

Ishiwata, K., Kubota, K., Murakami, M., Kubota, R., Senda, M.

A comparative study on protein incorporation of L-[methyl-3H]methionine, L-[1-14C]leucine and L-2-[18F]fluorotyrosine in tumor bearing mice.

*Nucl Med Biol*, 1993, 20: 895-899

Ishiwata, K., Kubota, K., Murakami, M., Kubota, R., Sasaki, T.,  
Ishii, S., Senda, M.

Re-evaluation of amino acid PET studies: can the protein synthesis rates  
in brain and tumor tissues be measured in vivo?

*J Nucl Med*, 1993, 34: 1936-1943

Ito, K., Kato, T., Ohta, T., Tadokoro, M., Yamada, T., Ikeda, M.,  
Nishino, M., Ishigaki, T., Gambhir, S.

Fluorine-18 fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography in  
recurrent rectal cancer: relation to tumour size and cellularity

*Eur J Nucl Med*, 1996, 23: 1372-1377

Kamesaki, S., Kamesaki, H., Jorgensen, T. J., Tanizawa, A.,  
Pommier, Y., Cossman, J.

bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on  
events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and  
their repair

[published erratum erschienen in *Cancer Res* 1994 Jun 1;54(11):3074].

*Cancer Res*, 1993, 53: 4251-4256

Karlan, B. Y., Hawkins, R., Hoh, C., Lee, M., Tse, N., Cane, P.,  
Glaspy, J.

Whole-body positron emission tomography with 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-  
D- glucose can detect recurrent ovarian carcinoma.

*Gynecol Oncol*, 1993, 51: 175-181

Kaschten, B., Stevenaert, A., Sadzot, B., Deprez, M.,  
Degueldre, C., Del Fiore, G., Luxen, A., Reznik, M.  
Preoperative evaluation of 54 gliomas by PET with fluorine-18-  
fluorodeoxyglucose and/or carbon-11-methionine  
*J Nucl Med* ,1998, 39: 778-785

Keen, R. E., Barrio, J. R., Huang, S. C., Hawkins, R. A.,  
Phelps, M. E.  
In vivo cerebral protein synthesis rates with leucyl-transfer RNA used as  
a precursor pool: determination of biochemical parameters to structure  
tracer kinetic models for positron emission tomography.  
*J Cereb Blood Flow Metab*, 1989, 9: 429-445

Keogan, M. T., Lowe, V. J., Baker, M. E., McDermott, V. G.,  
Lyerly, H. K., Coleman, R. E.  
Local recurrence of rectal cancer: evaluation with F-18  
fluorodeoxyglucose PET imaging. *Abdom Imaging* ,1997, 22: 332-337

Keogan, M. T., Tyler, D., Clark, L., Branch, M. S., McDermott,  
V. G., DeLong, D. M., Coleman, R. E.  
Diagnosis of pancreatic carcinoma: role of FDG PET  
*AJR Am J Roentgenol* ,1998, 171: 1565-1570

Koh, W. J., Rasey, J. S., Evans, M. L., Grierson, J. R.,  
Lewellen, T. K., Graham, M. M., Krohn, K. A., Griffin, T. W.  
Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992, 22: 199-212

Kole, A. C., Nieweg, O. E., van Ginkel, R. J., Pruim, J.,  
Hoekstra, H. J., Paans, A. M., Vaalburg, W., Koops, H. S.  
Detection of local recurrence of soft-tissue sarcoma with positron  
emission tomography using [18F]fluorodeoxyglucose.  
*Ann Surg Oncol*, 1997, 4: 57-63

Kole, A. C., Nieweg, O. E., Pruim, J., Hoekstra, H. J., Koops, H.  
S., Roodenburg, J. L., Vaalburg, W., Vermey, A.  
Detection of unknown occult primary tumors using positron emission  
tomography. *Cancer*, 1998, 82: 1160-1166

Kotzerke, J., Guhlmann, A., Moog, F., Frickhofen, N.,  
Reske, S. N.  
Role of attenuation correction for fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron  
emission tomography in the primary staging of malignant lymphoma  
*Eur J Nucl Med*, 1999, 26: 31-38

Krag, D., Weaver, D., Ashikaga, T., Moffat, F., Klimberg, V. S.,  
Shriver, C., Feldman, S., Kusminsky, R., Gadd, M., Kuhn, J.,  
Harlow, S., Beitsch, P.  
The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study  
*N Engl J Med*, 1998, 339: 941-946

Kubota, K., Kubota, R., Yamada, S., Tada, M.  
Effects of radiotherapy on the cellular uptake of carbon-14 labeled L-  
methionine in tumor tissue. *Nucl Med Biol*, 1995, 22: 193-198

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

Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nucl Med* ,1994, 35: 104-112

Lakher, M. B. und Wurtman, R. J.

Molecular composition of the phosphatidylcholines produced by the phospholipid methylation pathway in rat brain in vivo.

*Biochem J*, 1987, 244: 325-330

Lapela, M., Leskinen, S., Minn, H. R., Lindholm, P., Klemi, P. J.,  
Soderstrom, K. O., Bergman, J., Haaparanta, M., Ruotsalainen,  
U., Solin, O.

Increased glucose metabolism in untreated non-Hodgkin's lymphoma: a study with positron emission tomography and fluorine-18-fluorodeoxyglucose. *Blood* ,1995, 86: 3522-3527

Langen, K. J., Braun, U., Rota, K. E., Herzog, H., Kuwert, T.,  
Nebeling, B., Feinendegen, L. E.

The influence of plasma glucose levels on fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake in bronchial carcinomas. *J Nucl Med*, 1993, 34: 355-359

Larisch, R. und Klimke, A.

Clinical impact of cerebral dopamine-D2 receptor scintigraphy.

*Nuklearmedizin*, 1998, 37: 245-250

Lau, Y.H., Wang, G.-J., Vilchow, N.D., Fowler, J.S., Meek, A.G., Park, T.L. et al.

Determination of glucose metabolism of brain tumors and adjacent normal brain tissue and their early response to radiotherapy by F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography. (Abstract)

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994, 30 (Suppl 1): 296

Lauenstein, L., Meyer, G. J., Sewing, K. F., Schober, O., Hundeshagen, H.

Uptake Kinetics of <sup>14</sup>C L-Leucine and <sup>14</sup>C L- and D-Methionine in rat brain and incorporation into protein.

*Neurosurg Rev*, 1987, 10: 147-150

Le Cam, A. und Freychet, P.

Neutral amino acid transport. Characterization of the A and L systems in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1977, 252: 148-156

Leskinen-Kallio, S., Ruotsalainen, U., Nagren, K., Teras, M., Joensuu, H.

Uptake of carbon-11-methionine and fluorodeoxyglucose in non-Hodgkin's lymphoma: a PET study. *J Nucl Med*, 1991, 32: 1211-1218

Levchenko, A., Mehta, B. M., Lee, J. B., Humm, J. L., Augensen, F., Squire, O., Kothari, P. J., Finn, R. D., Leonard, E. F., Larson, S. M.

Evaluation of <sup>11</sup>C-colchicine for PET imaging of multiple drug resistance. *J Nucl Med*, 2000, 41: 493-501

Levin, L. und Gevers, W.

Metabolic alterations in cancer. Part I. Carbohydrate metabolism.

*S Afr Med J*, 1981, 59: 518-521

Levivier, M., Goldman, S., Pirotte, B., Brucher, J. M., Baleriaux, D., Luxen, A., Hildebrand, J., Brotchi, J.

Diagnostic yield of stereotactic brain biopsy guided by positron emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose.

*J Neurosurg*, 1995, 82: 445-452

Lewis, R.

Typical and atypical antipsychotics in adolescent schizophrenia: efficacy, tolerability, and differential sensitivity to extrapyramidal symptoms.

*Can J Psychiatry*, 1998, 43: 596-604

Lindholm, P., Minn, H., Leskinen-Kallio, S., Bergman, J., Ruotsalainen, U., Joensuu, H.

Influence of the blood glucose concentration on FDG uptake in cancer -- a PET study. *J Nucl Med*, 1993, 34: 1-6

Llanos, M., Tabernerero, J., Brunet, J., Amenedo, M., Pallares, C., de Andres, L., Lopez, J. J.

CHOP chemotherapy of intermediate and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Oncol*, 1994, 33: 935-939

Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., Housman, D. E.  
p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer  
agents. *Cell*, 1993, 74: 957-967

Lowe, V. J., Fletcher, J. W., Gobar, L., Lawson, M., Kirchner,  
P., Valk, P., Karis, J., Hubner, K., Delbeke, D., Heiberg, E. V.,  
Patz, E. F., Coleman, R. E.  
Prospective investigation of positron emission tomography in lung  
nodules  
*J Clin Oncol*, 1998, 16: 1075-1084

Lucas, J. D., O'Doherty, M. J., Wong, J. C., Bingham, J. B.,  
McKee, P. H., Fletcher, C. D., Smith, M. A.  
Evaluation of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the  
management of soft-tissue sarcomas  
*J Bone Joint Surg Br*, 1998, 80: 441-447

Macfarlane, D. J., Sondak, V., Johnson, T., Wahl, R. L.  
Prospective evaluation of 2-[18F]-2-deoxy-D-glucose positron emission  
tomography in staging of regional lymph nodes in patients with  
cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 1998, 16: 1770-1776

Maciunas, R. J., Kessler, R. M., Maurer, C., Mandava, V., Watt,  
G., Smith, G.  
Positron emission tomography imaging-directed stereotactic  
neurosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg*, 1992, 58: 134-140



Marks, D. I. und Fox, R. M.

DNA damage, poly (ADP-ribosyl)ation and apoptotic cell death as a potential common pathway of cytotoxic drug action.

*Biochem Pharmacol*, 1991, 42: 1859-1867

Martin, G. V., Biskupiak, J. E., Caldwell, J. H., Rasey, J. S., Krohn, K. A.

Characterization of iodovinylmisonidazole as a marker for myocardial hypoxia. *J Nucl Med*, 1993, 34: 918-924

Meyer, R. M., Browman, G. P., Samosh, M. L., Bengner, A. M., Bryant-Lukosius, D., Wilson, W. E., Frank, G. L., Leber, B. F., Sternbach, M. S., Foster, G. A.

Randomized phase II comparison of standard CHOP with weekly CHOP in elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma

*J Clin Oncol*, 1995, 13: 2386-2393

Moog, F., Bangerter, M., Diederichs, C. G., Guhlmann, A., Kotzerke, J., Merkle, E., Kolokythas, O., Herrmann, F., Reske, S. N.

Lymphoma: role of whole-body 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose (FDG) PET in nodal staging. *Radiology*, 1997, 203: 795-800

Moog, F., Bangerter, M., Kotzerke, J., Guhlmann, A.,  
Frickhofen, N., Reske, S. N.

18-F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography as a new  
approach to detect lymphomatous bone marrow. *J Clin Oncol*, 1998, 16:  
603-609

Muhr, C. und Bergstrom, M.

Positron emission tomography applied in the study of pituitary  
adenomas.

*J Endocrinol Invest*, 1991, 14: 509-528

Newman, J. S., Francis, I. R., Kaminski, M. S., Wahl, R. L.

Imaging of lymphoma with PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose:  
correlation with CT. *Radiology*, 1994, 190: 111-116

Nieweg, O. E., Kim, E. E., Wong, W. H., Broussard, W. F.,  
Singletary, S. E., Hortobagyi, G. N., Tilbury, R. S.

Positron emission tomography with fluorine-18-deoxyglucose in the  
detection and staging of breast cancer. *Cancer*, 1993, 71: 3920-3925

Noble, R. L. and Beer, C. J.

Experimental observations concerning the mode of action of vinca  
alkaloids. *Entnommen aus Shedden: The vinca alkaloids in the  
chemotherapy of malignant disease*,

*John Sherratt and Sons, Alburcham, England; 1968: 4-11*

Ogunbiyi, O. A., Flanagan, F. L., Dehdashti, F., Siegel, B. A., Trask, D. D., Birnbaum, E. H., Fleshman, J. W., Read, T. E., Philpott, G. W., Kodner, I. J.

Detection of recurrent and metastatic colorectal cancer: comparison of positron emission tomography and computed tomography.

*Ann Surg Oncol*, 1997, 4: 613-620

Okada, J., Yoshikawa, K., Imazeki, K., Minoshima, S., Uno, K., Itami, J., Kuyama, J., Maruno, H., Arimizu, N.

The use of FDG-PET in the detection and management of malignant lymphoma: correlation of uptake with prognosis.

*J Nucl Med*, 1991, 32: 686-691

Okada, J., Oonishi, H., Yoshikawa, K., Itami, J., Uno, K., Imaseki, K., Arimizu, N.

FDG-PET for predicting the prognosis of malignant lymphoma.

*Ann Nucl Med*, 1994, 8: 187-191

Okazumi, S., Isono, K., Enomoto, K., Kikuchi, T., Ozaki, M., Yamamoto, H., Hayashi, H., Asano, T., Ryu, M.

Evaluation of liver tumors using fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET: characterization of tumor and assessment of effect of treatment.

*J Nucl Med*, 1992, 33: 333-339

Oshida, M., Uno, K., Suzuki, M., Nagashima, T., Hashimoto, H.,  
Yagata, H., Shishikura, T., Imazeki, K., Nakajima, N.

Predicting the prognoses of breast carcinoma patients with positron  
emission tomography using 2-deoxy-2-fluoro[18F]-D-glucose.

*Cancer*, 1998, 82: 2227-2234

Oxender, D. L., Lee, M., Cecchini, G.

Regulation of amino acid transport activity and growth rate of animal  
cells in culture

*J Biol Chem*, 25-4-1977, 252: 2680-2683

Oxender, D. L., Lee, M., Moore, P. A., Cecchini, G.

Neutral amino acid transport systems of tissue culture cells

*J Biol Chem*, 25-4-1977, 252: 2675-2679

Oya, N., Nagata, Y., Tamaki, N., Takagi, T., Murata, R.,  
Magata, Y., Abe, M., Konishi, J.

FDG-PET evaluation of therapeutic effects on VX2 liver tumor

*J Nucl Med*, 1996, 37: 296-302

Palmedo, H., Bender, H., Grunwald, F., Mallmann, P., Zamora,  
P., Krebs, D., Biersack, H. J.

Comparison of fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission  
tomography and technetium-99m methoxyisobutylisonitrile  
scintimammography in the detection of breast tumours

*Eur J Nucl Med*, 1997, 24: 1138-1145

Palmer, C. G., Livengood, D., Warren, A.K., Simpson, P. J.,  
Johnson, I. S.

The action of vincalkebostine on mitosis in vitro

*Exp Cell Res*, 1960, 20: 198-201

Pasquet, A., Lauer, M. S., Williams, M. J., Secknus, M. A.,  
Lytle, B., Marwick, T. H.

Prediction of global left ventricular function after bypass surgery in  
patients with severe left ventricular dysfunction. Impact of pre- operative  
myocardial function, perfusion, and metabolism. *Eur Heart J*, 2000, 21:  
125-136

Pasternak, C. A., Aiyathurai, J. E., Makinde, V., Davies, A.,  
Baldwin, S. A., Konieczko, E. M., Widnell, C. C.

Regulation of glucose uptake by stressed cells

*J Cell Physiol*, 1991, 149: 324-331

Patronas, N. J., Di Chiro, G., Kufta, C., Bairamian, D., Kornblith,  
P. L., Simon, R., Larson, S. M.

Prediction of survival in glioma patients by means of positron emission  
tomography. *J Neurosurg*, 1985, 62: 816-822

Patz, E. F., Jr., Lowe, V. J., Hoffman, J. M., Paine, S. S., Harris,  
L. K., Goodman, P. C.

Persistent or recurrent bronchogenic carcinoma: detection with PET and  
2-[F-18]-2-deoxy-D-glucose. *Radiology*, 1994, 191: 379-382

Paulus, P., Sambon, A., Vivegnis, D., Hustinx, R., Moreau, P., Collignon, J., Deneufbourg, J. M., Rigo, P.

<sup>18</sup>F-FDG-PET for the assessment of primary head and neck tumors: clinical, computed tomography, and histopathological correlation in 38 patients

*Laryngoscope*, 1998, 108: 1578-1583

Phelps, M. E., Barrio, J. R., Huang, S. C., Keen, R. E., Chugani, H., Mazziotta, J. C.

Criteria for the tracer kinetic measurement of cerebral protein synthesis in humans with positron emission tomography.

*Ann Neurol*, 1984, 15 Suppl: S192-S202

Radtke, R. A., Hanson, M. W., Hoffman, J. M., Crain, B. J., Walczak, T. S., Lewis, D. V., Beam, C., Coleman, R. E., Friedman, A. H.

Temporal lobe hypometabolism on PET: predictor of seizure control after temporal lobectomy. *Neurology*, 1993, 43: 1088-1092

Prauer, H. W., Weber, W. A., Romer, W., Treumann, T., Ziegler, S. I., Schwaiger, M.

Controlled prospective study of positron emission tomography using the glucose analogue [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose in the evaluation of pulmonary nodules. *Br J Surg*, 1998, 85: 1506-1511

Ramesh, K., Torres-Imuamozano, V., Fri, Y.-J. et al.  
Molecular and functional characterization of intestinal Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter B<sup>0</sup>.  
*Am J Physiol*, 1997, 272: G1463-G1472

Rasey, J. S., Koh, W. J., Evans, M. L., Peterson, L. M.,  
Lewellen, T. K., Graham, M. M., Krohn, K. A.  
Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [18F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996, 36: 417-428

Rasey, J. S., Casciari, J. J., Hofstrand, P. D., Muzi, M.,  
Graham, M. M., Chin, L. K.  
Determining hypoxic fraction in a rat glioma by uptake of radiolabeled fluoromisonidazole. *Radiat Res*, 2000, 153: 84-92

Rinne, D., Baum, R. P., Hor, G., Kaufmann, R.  
Primary staging and follow-up of high risk melanoma patients with whole-body 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography: results of a prospective study of 100 patients. *Cancer*, 1998, 82: 1664-1671

Rodriguez, M., Rehn, S., Ahlstrom, H., Sundstrom, C.,  
Glimelius, B.  
Predicting malignancy grade with PET in non-Hodgkin's lymphoma.  
*J Nucl Med*, 1995, 36: 1790-1796

Romer, W., Hanauske, A. R., Ziegler, S., Thodtmann, R.,  
Weber, W., Fuchs, C., Enne, W., Herz, M., Nerl, C., Garbrecht,  
M., Schwaiger, M.

Positron emission tomography in non-Hodgkin's lymphoma: assessment  
of chemotherapy with fluorodeoxyglucose

*Blood*, 1998, 91: 4464-4471

Rozental, J. M., Levine, R. L., Nickles, R. J., Dobkin, J. A.

Glucose uptake by gliomas after treatment. A positron emission  
tomographic study. *Arch Neurol*, 1989, 46: 1302-1307

Sato, K., Kameyama, M., Ishiwata, K., Katakura, R.,  
Yoshimoto, T.

Metabolic changes of glioma following chemotherapy: an experimental  
study using four PET tracers. *J Neurooncol*, 1992, 14: 81-89

Schaider, H., Haberkorn, U., Berger, M. R., Oberdorfer, F.,  
Morr, I., van Kaick, G.

Application of alpha-aminoisobutyric acid, L-methionine, thymidine and  
2-fluoro-2-deoxy-D-glucose to monitor effects of chemotherapy in a  
human colon carcinoma cell line. *Eur J Nucl Med*, 1996, 23: 55-60

Schmidt, R.F. u. a.

Physiologie des Menschen

*Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2000



Segel, G. B., Simon, W., Lichtman, M. A.

A multicomponent analysis of amino acid transport systems in human lymphocytes. 1. Kinetic parameters of the A and L systems and pathways of uptake of naturally occurring amino acids in blood lymphocytes.

*J Cell Physiol*, 1983, 116: 372-378

Segel, G. B., Simon, W., Lichtman, M. A.

Multicomponent analysis of amino acid transport in human lymphocytes. Diminished L-system transport in chronic leukemic B lymphocytes.

*J Clin Invest*, 1984, 74: 17-24

Segel, G. B., Woodlock, T. J., Lichtman, M. A.

Trans-stimulation of L-system amino acid transport in normal and chronic leukemic human lymphocytes: phorbol ester restores function in CLL.

*J Cell Physiol*, 1988, 134: 503-508

Senekowitsch-Schmidtke, R., Matzen, K., Truckenbrodt, R., Mattes, J., Heiss, P., Schwaiger, M.

Tumor cell spheroids as a model for evaluation of metabolic changes after irradiation. *J Nucl Med*, 1998, 39: 1762-1768

Shields, A. F., Graham, M. M., Kozawa, S. M., Kozell, L. B., Link, J. M., Swenson, E. R., Spence, A. M., Bassingthwaite, J. B., Krohn, K. A.

Contribution of labeled carbon dioxide to PET imaging of carbon-11-labeled compounds. *J Nucl Med*, 1992, 33: 581-584

Shields, A. F., Mankoff, D., Graham, M. M., Zheng, M., Kozawa, S. M., Link, J. M., Krohn, K. A.

Analysis of 2-carbon-11-thymidine blood metabolites in PET imaging  
*J Nucl Med* ,1996, 37: 290-296

Shields, A. F., Grierson, J. R., Dohmen, B. M., Machulla, H. J., Stayanoff, J. C., Lawhorn-Crews, J. M., Obradovich, J. E., Muzik, O., Mangner, T. J.

Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nat Med* ,1998, 4: 1334-1336

Sirotnak, F. M., Yang, C. H., Mines, L. S., Oribe, E., Biedler, J. L.

Markedly altered membrane transport and intracellular binding of vincristine in multidrug-resistant Chinese hamster cells selected for resistance to vinca alkaloids. *J Cell Physiol*, 1986, 126: 266-274

Smith, I. C., Ogston, K. N., Whitford, P., Smith, F. W., Sharp, P., Norton, M., Miller, I. D., Ah-See, A. K., Heys, S. D., Jibril, J. A., Eremin, O.

Staging of the axilla in breast cancer: accurate in vivo assessment using positron emission tomography with 2-(fluorine-18)-fluoro-2-deoxy- D-glucose. *Ann Surg* ,1998, 228: 220-227

Souba, W. W. und Pacitti, A. J.

How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1992, 16: 569-578

Souba, W. W. und Pacitti, A. J.

How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1992, 16: 569-578

Steinert, H. C., Hauser, M., Allemann, F., Engel, H., Berthold, T., von Schulthess, G. K., Weder, W.

Non-small cell lung cancer: nodal staging with FDG PET versus CT with correlative lymph node mapping and sampling  
*Radiology*, 1997, 202: 441-446

Stevens, B. R., Kaunitz, J. D., Wright, E. M.

Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles. *Annu Rev Physiol*, 1984, 46: 417-433

Stevens, B. R.

Amino acid transport in intestine. *Entnommen aus Kilberg, M.S. und Hassinger, D.: Mammalian amino acid transport. Plenum, New York, NY, USA, 1992, 149-163*

Stumpe, K. D., Urbinelli, M., Steinert, H. C., Glanzmann, C., Buck, A., von Schulthess, G. K.

Whole-body positron emission tomography using fluorodeoxyglucose for staging of lymphoma: effectiveness and comparison with computed tomography. *Eur J Nucl Med*, 1998, 25: 721-728

Tamaki, N.

Progress in nuclear cardiology: new imaging beyond perfusion and function. (Abstract)

*Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi*, 1999, 59: 656-662

Tey, B. T., Singh, R. P., Piredda, L., Piacentini, M.,  
Al Rubeai, M.

Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures.

*J Biotechnol*, 2000, 79: 147-159

Torizuka, T., Clavo, A. C., Wahl, R. L.

Effect of hyperglycemia on in vitro tumor uptake of tritiated FDG,  
thymidine, L-methionine and L-leucine. *J Nucl Med*, 1997, 38: 382-386

Vallabhajosula, S. und Buchsbaum, M.

PET studies in psychiatry: validity, accuracy and future.

*J Nucl Med*, 1994, 35: 24-26

Vansteenkiste, J. F., Stroobants, S. G., De Leyn, P. R., Dupont,  
P. J., Bogaert, J., Maes, A., Deneffe, G. J., Nackaerts, K. L.,  
Verschakelen, J. A., Lerut, T. E., Mortelmans, L. A.,  
Demedts, M. G.

Lymph node staging in non-small-cell lung cancer with FDG-PET scan: a  
prospective study on 690 lymph node stations from 68 patients

*J Clin Oncol*, 1998, 16: 2142-2149

Vitola, J. V., Delbeke, D., Meranze, S. G., Mazer, M. J.,  
Pinson, C. W.

Positron emission tomography with F-18-fluorodeoxyglucose to evaluate the results of hepatic chemoembolization. *Cancer*, 1996, 78: 2216-2222

von Schulthess, G. K., Steinert, H. C., Dummer, R., Weder, W.  
Cost-effectiveness of whole-body PET imaging in non-small cell lung cancer and malignant melanoma. *Acad Radiol* ,1998, 5 Suppl 2: S300-S302

Wahl, R. L., Henry, C. A., Ethier, S. P.

Serum glucose: effects on tumor and normal tissue accumulation of 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rodents with mammary carcinoma.

*Radiology*, 1992, 183: 643-647

Wahl, R. L., Zasadny, K., Helvie, M., Hutchins, G. D., Weber, B., Cody, R.

Metabolic monitoring of breast cancer chemohormonotherapy using positron emission tomography: initial evaluation

*J Clin Oncol* ,1993, 11: 2101-2111

Weber, W., Bartenstein, P., Gross, M. W., Kinzel, D., Daschner, H., Feldmann, H. J., Reidel, G., Ziegler, S. I., Lumenta, C., Molls, M., Schwaiger, M.

Fluorine-18-FDG PET and iodine-123-IMT SPECT in the evaluation of brain tumors. *J Nucl Med* ,1997, 38: 802-808

Weissbach, L., Handlogten, M. E., Christensen, H. N.,  
Kilberg, M. S.

Evidence for two Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity.

*J Biol Chem*, 1982, 257: 12006-12011

Wertheimer, E., Sasson, S., Cerasi, E., Ben Neriah, Y.

The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88: 2525-2529

Wester, H. J., Herz, M., Weber, W., Heiss, P., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Stocklin, G.

Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J Nucl Med*, 1999, 40: 205-212

White, M. K.

Kinetic parameters of neutral amino acid transport in hybrids between malignant and non-malignant cells. *J Cell Sci*, 1984, 67: 63-68

Wilson, C. B.

PET scanning in oncology. *Eur J Cancer*, 1992, 28: 508-510

Woodlock, T. J., Chen, X., Young, D. A., Bethlendy, G.,  
Lichtman, M. A., Segel, G. B.

Association of HSP60-like proteins with the L-system amino acid transporter. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 338: 50-56

Wyllie, A. H.

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980, 284: 555-556

Yin, D. X. und Schimke, R. T.

BCL-2 expression delays drug-induced apoptosis but does not increase clonogenic survival after drug treatment in HeLa cells  
*Cancer Res*, 1995, 55: 4922-4928

Yutani, K., Tatsumi, M., Shiba, E., Kusuoka, H.,  
Nishimura, T.

Comparison of dual-head coincidence gamma camera FDG imaging with FDG PET in detection of breast cancer and axillary lymph node metastasis. *J Nucl Med*, 1999, 40: 1003-1008

Zimny, M., Bares, R., Fass, J., Adam, G., Cremerius, U.,  
Dohmen, B., Klever, P., Sabri, O., Schumpelick, V., Buell, U.  
Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the differential diagnosis of pancreatic carcinoma: a report of 106 cases  
*Eur J Nucl Med*, 1997, 24: 678-682

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Darstellung der Zählraten in Abhängigkeit von der Dichte der eingesetzten Zellen (S.42)
- Abb.2: Abhängigkeit der gemessenen Zählraten von der Aktivitätskonzentration (S.43)
- Abb.3: Aufnahme von Leucin bei 50 mg/l an Leucin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (S.45)
- Abb. 4: Mittelwerte der aufgenommenen Leucinstoffmenge pro  $10^6$  Zellen bei 255 mg/l an Leucin in Abhängigkeit von der Zeit (S.48)
- Abb. 5: Vergleich der Aufnahme von Leucin in Abhängigkeit von der Zeit bei 50 und 255 mg/l an Leucin (S.49)
- Abb. 6: Vergleich des säureunlöslichen Anteils an der Aufnahme von Leucin in Abhängigkeit von der Zeit bei 50 und 255 mg/l an Leucin im Kulturmedium (S.50)
- Abb. 7: Aufnahme und Einbau von Leucin unter Kontrollbedingungen bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (S.52)
- Abb. 8: Aufnahme und Einbau von Leucin im Anschluß an eine 4-stündige Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (S.54)
- Abb. 9: Aufnahme und Einbau von Leucin unter Kontrollbedingungen und im Anschluß an eine 4-stündige Vincristinbehandlung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (S.54)
- Abb. 10: Aufnahme und Einbau von Leucin in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin unter Kontrollbedingungen (S.58)
- Abb. 11: Aufnahme und Einbau von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an Leucin (S.58)



- Abb. 12: Aufnahme und Einbau von Leucin ohne Vincristinbehandlung in Abhängigkeit von der Zeit (S.60)
- Abb. 13: Aufnahme und Einbau von Leucin 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung in Abhängigkeit von der Zeit (S.62)
- Abb. 14 : Vergleich der Aufnahme und des Einbaus von Leucin unter Kontrollbedingungen und 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung in Abhängigkeit von der Zeit (S.62)
- Abb. 15: Boxplot aller Meßwerte der Aufnahme von Leucin unter Kontrollbedingungen und 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung (S.63)
- Abb. 16: Boxplot aller Meßwerte des Einbaus von Leucin unter Kontrollbedingungen und 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung (S.64)
- Abb. 17: Aufnahme von Leucin in den ersten 10 Minuten unter Kontrollbedingungen bei physiologischer Leucinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit (S.69)
- Abb. 18: Aufnahme von Leucin in den ersten 10 Minuten 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei physiologischer Leucinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit (S.70)
- Abb. 19: Aufnahme von Leucin innerhalb der ersten 10 Minuten unter Kontrollbedingungen bei 200 mg/l an Leucin im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Zeit (S.72)
- Abb. 20: Aufnahme von Leucin über einen Zeitraum von 10 Minuten 24 Stunden nach Beginn einer vierstündigen Vincristinbehandlung bei 200 mg/l an Leucin im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Zeit (S.73)

## 8 Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Frau Professor Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke für die interessante Aufgabenstellung dieser Arbeit. Zudem wurde mir die Möglichkeit gegeben, die Experimente in den Laborräumlichkeiten der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Technischen Universität München durchzuführen.

Ferner danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. P.Heiss, der mir über große Strecken meiner Arbeit in Planung und Durchführung der Experimente hilfreich zur Seite stand.

Die Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Nuklearmedizin war stets angenehm, es herrschte eine Atmosphäre von Teamgeist und Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich Frau S. Mayer, die mir mit Ihren Kenntnissen als MTA eine große Stütze war.

Bei der statistischen Aufarbeitung der Daten war mit Fr. Flatau vom Institut für Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar eine große Hilfe, auch hierfür herzlichen Dank.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Großmutter danken, die mich während meines gesamten Studiums und darüber hinaus auf vielfältige Weise unterstützten und mir somit einen Hochschulabschluß ermöglichten.

Ein besonderer Dank gebührt auch meiner Freundin, die mich in den letzten Monaten ertragen mußte, was sicherlich nicht leicht war.