

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Charakterisierung des Transportes der Aminosäuren L-
[Methyl-³H]-Methionin (Met) und O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-L-
Tyrosin (FET) in humane Lymphozyten, Makrophagen und
Kolonkarzinomzellen**

Barbara Stöber

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. apl. Prof. Dr. V. H. Schusdziarra

Die Dissertation wurde am 24.05.2004 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2004
angenommen.

Damit das Mögliche entsteht,
muss immer wieder
das Unmögliche versucht werden.

Hermann Hesse
dt. Schriftsteller

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>3</u>
2	<u>ZIELSETZUNG</u>	<u>11</u>
3	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>15</u>
3.1	MATERIAL	15
3.1.1	ZELLEN.....	15
3.1.2	KULTURMEDIUM UND ZUSÄTZE	15
3.1.3	VERSUCHSMEDIUM.....	15
3.1.4	AMINOSÄUREN	16
3.1.5	HEMMSUBSTANZEN	16
3.1.6	STIMULANTIEN	16
3.1.7	ISOLIERUNG VON ENTZÜNDUNGSZELLEN AUS BLUT BZW. BUFFY COATS	16
3.1.8	CHEMIKALIEN.....	16
3.1.9	RADIOAKTIVE SUBSTANZEN	17
3.1.10	GERÄTE	18
3.1.11	GEBRAUCHSMATERIAL.....	19
3.2	METHODEN	19
3.2.1	ZELLKULTIVIERUNG	19
3.2.1.1	Isolierung der Entzündungszellen aus Blutkonserven und deren Aufnahme in Kulturmedium	19
3.2.1.2	Auftauen der Tumorzelllinie SW707, Passagieren und Einfrieren der Zellen	22
3.2.1.2.1	Auftauen der Tumorzelllinie SW707.....	22
3.2.1.2.2	Passagieren der adhärenenten SW707-Zellen	22
3.2.1.2.3	Das Einfrieren der SW707-Zellen	23
3.2.2	VORBEREITUNG DER ZELLEN FÜR DIE VERSUCHE ZUR AMINOSÄUREAUFNAHME	23
3.2.2.1	Stimulation der Entzündungszellen.....	23
3.2.2.2	Vitalitätsbestimmung der Zellen.....	25
3.2.2.3	Überführen der Zellen in Versuchsmedium.....	26
3.2.2.4	Zellzahlbestimmung.....	26
3.2.3	DURCHFÜHRUNG DER AMINOSÄURE-AUFNAHME-VERSUCHE.....	27
3.2.3.1	Met- und FET-Aufnahme in Tumorzellen, stimulierten und unstimulierten Entzündungszellen	27

3.2.3.2	Aufzeigen der pH-Abhängigkeit der Traceraufnahme	29
3.2.3.3	Durchführung der Hemmstoffversuche	29
3.2.3.4	Michaelis-Menten-Kinetik von Met an Lymphozyten, Makrophagen und SW707-Tumorzellen.....	30
3.2.3.5	Michaelis-Menten-Kinetik von FET an Lymphozyten, Makrophagen und SW707....	31
3.2.3.6	Proteinbestimmung nach Bradford.....	31
3.2.3.7	Auswertung	33
4	<u>ERGEBNISSE</u>	35
4.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM MET-TRANSPORT	35
4.1.1	CHARAKTERISIERUNG DES MET-TRANSPORTES	35
4.1.1.1	Vergleich der Met-Aufnahme bei Tumorzellen, stimulierten und unstimulierten Entzündungszellen	35
4.1.1.2	Met-Aufnahme in Abhängigkeit steigender Methionin-Konzentrationen (Michaelis-Menten-Kinetik)	36
4.1.1.3	pH-Abhängigkeit der Met-Aufnahme.....	39
4.1.2	CHARAKTERISIERUNG DER TRANSPORTWEGE VON MET.....	40
4.1.2.1	Wirkung spezifischer Transportinhibitoren auf die Met-Aufnahme	40
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM FET-TRANSPORT	43
4.2.1	CHARAKTERISIERUNG DES FET-TRANSPORTES	43
4.2.1.1	Vergleich der FET-Aufnahme bei unstimulierten, stimulierten Entzündungszellen und Tumorzellen.....	43
4.2.1.2	FET-Aufnahme in Abhängigkeit steigender Fluorethyltyrosin-Konzentrationen (Michaelis-Menten-Kinetik)	44
4.2.1.3	pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme	46
4.2.2	CHARAKTERISIERUNG DER TRANSPORTWEGE VON FET.....	48
4.2.2.1	Wirkung spezifischer Transportinhibitoren auf die FET-Aufnahme.....	48
4.3	VERGLEICH DER ABSOLUTEN FET- UND MET-AUFNAHME	50
5	<u>DISKUSSION</u>	53
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	67
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	69
8	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	79
9	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	81
10	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	83
11	<u>DANKSAGUNG</u>	85

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in der Medizin zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Neben den, seit Jahren in der Medizin zum Einsatz kommenden bildgebenden Verfahren, wie z. B. Computertomographie (CT) oder Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), stellt PET, über die Darstellung physiologischer Vorgänge, in mittlerweile vielen medizinischen Disziplinen eine Möglichkeit dar, Tumordiagnostik, -staging und Therapiemonitoring eines Patienten umfassender zu betreiben.

Die Positronen-Emissions-Tomographie kommt besonders auf dem Sektor der Neurologie, Psychiatrie, Kardiologie und Onkologie zum Einsatz [Senekowitsch, Papst, 1992; Frost, 1988; Bustany et al., 1983; Wiesel et al., 1991].

Neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind bösartige Neubildungen, also Tumorerkrankungen, in Deutschland die häufigste Todesursache. Laut Statistischem Bundesamt (Zweigstelle Bonn) starben im Jahr 2001 28.529 Männer am Bronchialkarzinom, 11.150 am Prostatakarzinom und 9.115 am kolorektalen Karzinom. Frauen starben in erster Linie am Mammakarzinom (17.504 im Jahr 2001), gefolgt vom kolorektalen Karzinom (10.835) und dem Bronchialkarzinom (9.996).

Betrachtet man die hohe Tumorinzidenz und nicht zuletzt die hohe Tumormortalität, so kommt der Charakterisierung von Tumoren zur Auswahl der optimalen Tumorthherapie große Bedeutung zu.

In diesem Zusammenhang stellt FDG-PET zum Tumorstaging und zum Therapiemonitoring eine sehr gute Ergänzung zu den bisherigen bildgebenden Verfahren dar. Denn tumoröse Veränderungen, die sich im CT und MRT nicht darstellen lassen, sind im PET, durch die Erfassung

eines veränderten Gewebstoffwechsels durchaus zu erkennen. Des Weiteren bietet PET gegenüber CT und MRT den Vorteil, zwischen vitalem Tumorgewebe, Ödem, postoperativen Veränderungen oder Strahlennekrosen unterscheiden zu können [Weber et al., 1997] und gibt in dieser Weise Hilfestellung im Bezug auf die weitere Therapieplanung. PET dient nicht nur zur Darstellung definierter Strukturen, sondern stellt biochemische und physiologische Vorgänge in räumlicher und zeitlicher Abhängigkeit dar, und das schon bevor morphologische Veränderungen auftreten.

An dieser Stelle sei kurz auf die Funktionsweise des PET eingegangen: Für die Durchführung der PET-Untersuchung werden bioaktive Substanzen, wie beispielsweise Glukose oder Aminosäuren, mit Radionukliden gekoppelt (man spricht in diesem Zusammenhang von Radiopharmazeutika), die ihrerseits Positronen emittieren (z. B. ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C). Wenn die, von den Radionukliden ausgesandten Positronen mit Elektronen rekombinieren, entsteht γ -Strahlung in Form von zwei 511-keV-Photonen, die im Winkel von 180° emittiert werden. Diese γ -Strahlung wird vom PET-Scanner mit zwei in Koinzidenz geschalteten Detektoren erfasst, und zu einem Schichtbild verarbeitet, das wiederum Aufschluss über die Verteilung des Nuklids im Körper gibt [Coleman, 1991; Bergström et al., 1993].

Da Tumorgewebe einen erhöhten Stoffwechsel aufweist, reichern sich die radioaktiv-markierten, bioaktiven Substanzen (z. B. Glukose oder Aminosäuren) in den Zellen verstärkt an. Auf diese Weise wird bei der PET-Untersuchung das Tumorgewebe sichtbar und ist vom „Normalgewebe“ gut abgrenzbar.

Zwei Faktoren können sich negativ auf diese Anreicherung und damit die Sichtbarmachung der Tumorherde auswirken: Zum einen die Tatsache, dass die radioaktiv-markierten bioaktiven Substanzen die Zellen wieder verlassen, zum anderen, dass diese Substanzen schnell metabolisiert werden und ihrerseits aus den Zellen austreten. Um eine hohe Akkumulation zu erreichen, sollte der Efflux der radioaktiv-markierten, bioaktiven Substanzen möglichst gering sein und es sollten aus diesen Substanzen keine radioaktiven Metabolite entstehen, die wiederum die Zellen verlassen. Zudem sollte eine stabile Markierungsmethode und eine geeignete Position am Molekül zur Markierung gewählt werden [Laverman et al., 2002].

Da die zur PET-Untersuchung applizierten Radiopharmazeutika meist mit Positronenemittern markiert werden, deren Halbwertszeiten sehr kurz sind, sollte die Herstellung dieser Stoffe (z. B. Substanzen markiert mit ^{11}C) möglichst im hauseigenen Zyklotron erfolgen. Mit den oben genannten vier Radionukliden können die meisten am Stoffwechsel (Glukosestoffwechsel, Aminosäuretransport, Proteinsynthese, Zellteilung

etc.) beteiligten Verbindungen markiert und quantitativ erfasst werden [Weber et al., 1999].

Eingesetzt werden nur sehr geringe Substanzmengen der Radiopharmazeutika, die keinen pharmakologischen Effekt zeigen, der zur Beeinflussung des zu beobachtenden biochemischen Prozesses führen könnte [Weber et al., 1999].

An dieser Stelle seien einige Radiopharmazeutika, die in der Onkologie Verwendung finden genannt:

Tabelle 1: Für PET-Studien in der Onkologie verwendete Radiopharmazeutika [Weber et al., 1999]

Radiopharmazeutikum	Physikalische Halbwertszeit in min	Biochemischer Prozess
¹⁸ F-Fluordeoxyglucose (FDG)	110	Glukosemetabolismus
¹¹ C-Methionin (Met)	20	Aminosäuretransport und Aminosäurestoffwechsel
¹⁸ F-Fluormethyltyrosin	110	Aminosäuretransport
¹⁸ F-Fluorethyltyrosin (FET)	110	Aminosäuretransport
¹⁸ F-Fluorisonidazol	110	Hypoxie
¹⁵ O-Wasser	2	Perfusion
¹³ N-Ammoniak	13	Perfusion
¹⁸ F-Fluorthymidin	110	Proliferation
¹¹ C-Thymidin	20	Proliferation
¹¹ C-Cholin	20	Cholinmetabolismus bzw. Membransynthese
¹⁸ F-Fluor	110	Knochenstoffwechsel
¹²⁴ I-FIAU (Fluor-deoxy-arabin-furanosyl-uracil)	4,2 Tage	Expression der Herpes-Simplex-Thymidin-Kinase

Der am häufigsten verwendete Tracer ist FDG. Für Gliome [Di Chiro et al., 1982; Kaschten et al., 1998], Leberkarzinome [Kern et al., 1988], Myosarkome [Okazumi et al., 1992], Ösophaguskarzinome [Fukunaga et al., 1998], Lungenkarzinome [Präuer et al., 1998; Weber et al., 1999], Non-Hodgkin-Lymphome [Leskinen-Kallio et al., 1992; Römer et al., 1998; Kotzerke et al., 1999], Mammakarzinome und deren Rezidive [Avril et al., 1996/1997; Moon et al., 1998], Keimzelltumoren [Cremerius et al., 1998] und Lymphknotenmetastasen von Kopf-Hals-Tumoren [Adams et al., 1998] konnte bereits eine gute Korrelation zwischen FDG-Aufnahme und Tumorigradung beschrieben werden.

Römer et al. (1998) nennt FDG einen guten Tracer für die Verlaufskontrolle einer Therapie bei Non-Hodgkin-Tumoren, Cremerius et al. (1998) sagt Selbiges für Keimzelltumoren aus. Ott et al. (2001) beschreibt FDG-PET als gute Methode zum Monitoring neoadjuvanter Therapien.

FDG wird über exakt die gleichen Transportwege in die Zelle aufgenommen wie Glukose und durch das Enzym „Hexokinase“ in ¹⁸F-

FDG-6-Phosphat umgewandelt. Im Gegensatz zum weiteren Abbau von Glukose-6-Phosphat, ist der Abbau von ^{18}F -FDG-6-Phosphat gehemmt. Es kommt also zu keiner weiteren Verstoffwechselung, weder zur Glykolyse noch zur Glukosesynthese. Nur die Rückreaktion zu FDG ist möglich, allerdings ist das dafür benötigte Enzym „Glukose-6-Phosphatase“ bis auf einige Ausnahmen in den meisten Geweben nur sehr gering ausgeprägt [Fischman und Alpert, 1993; Hughes et al., 1996]. Als stark polares Molekül kann ^{18}F -FDG-6-Phosphat die Zellmembran nicht mehr passieren und bleibt in der Zelle eingeschlossen [Fischman und Alpert, 1993]. Es kommt zur Akkumulation in der Zelle.

Die FDG-Aufnahme in Tumorzellen ist proportional zur gesteigerten Glykolyse derselben. Dies mag zum einen daran liegen, dass die Dichte und die Aktivität der membrangebundenen GLUT-Transportproteine ansteigt [Bell et al., 1993; Wahl et al., 1996], zum anderen aber daran, dass die Aktivität der Hexokinase erhöht ist [Hughes et al., 1996].

Für die Diagnostik von Hirntumoren wird FDG heute wegen seiner hohen Anreicherung in der grauen Substanz des ZNS weniger verwendet, da der Kontrast zwischen normalem Hirngewebe und Tumor zu gering ist [Gross et al., 1998]. Ebenso problematisch, wegen der vermehrten Radionuklidanreicherung bei der Ausscheidung, ist die Darstellung des Urogenitaltraktes. Auch Leber, Milz, Schilddrüse und einige andere Organe zeigen variable FDG-Aufnahmen, die zu falsch-positiven Befunden führen können [Shreve et al., 1999].

Allerdings nimmt, wie schon beschrieben, die Mehrheit maligner, humaner Tumoren FDG vermehrt auf [Rigo et al., 1996].

Mittlerweile ist belegt, dass der Glukosemetabolismus neben Tumorzellen auch in aktiven Entzündungszellen gesteigert ist und dass sich FDG somit in Tumor- und Entzündungszellen anreichert. So kam es zu falsch-positiven Ergebnissen bei Abszessen und Pneumonien [Strauss et al., 1996], bei entzündlich granulomatösen Prozessen in der Lunge, wie Aspergillose, Sarkoidose etc. [Lowe et al., 1998; Präuer et al., 1998], bei Sinusitis [Yasuda et al., 1998], bei akuter Pankreatitis und in Operationswunden [Haberkorn et al., 1991]. Aufgrund dieser Tatsache wird versucht Substanzen einzusetzen, die sich nur im Tumor anreichern. Als Versuchsansatz dienen Aminosäuren:

6- ^{18}F fluoro-L-dihydroxyphenylalanine (6-FDOPA) wird beispielsweise zur Tumorsichtbarmachung verwendet, wobei sich gezeigt hat, dass sich 6-FDOPA allein nicht zum Auffinden tumoröser Herde eignet, wohl aber in Kombination mit FDG [Graham, 2001]. L-2- ^{18}F fluorophenylalanine wurde von Kubota et al. (1996) an einem Hepatom-Ratten-Modell mit ^{11}C -Methionin verglichen. L-2- ^{18}F fluorophenylalanine wurde von den Tumoren ebenso gut aufgenommen wie Met, die Leber zeigte signifikant

niedrigere L-2-[18F]fluorophenylalanine-Aufnahme, wobei das Pankreas sehr hohe Aufnahmen beider Tracer aufwies. Samnick et al. (2000) verglich p-[¹²³I]iodo-L-phenylalanine (IPA), L-[¹²³I]iodo-1,2,3,4-tetrahydro-7-hydroxyisoquinoline-3-carboxylic acid (ITIC) und L-3-[¹²³I]iodo- α -methyltyrosine im Bezug auf das Imaging von Gehirntumoren. 2004 veröffentlichte er zudem Daten über die in vivo und in vitro p-[¹²³I]iodo-L-phenylalanine-Aufnahme in humane Pankreaskarzinomzellen.

Prolin gilt weithin als Kollagen-Synthese-Marker und ist in dieser seiner Funktion zum Tumor-Imaging herangezogen worden. Wester et al. (1999) verglich 4-[18F]Fluoro-L-Prolin in der cis- und trans-Form in einem Maus-Modell. Die cis-Form zeigte sich in dieser Studie als vielversprechend. Langen et al., 2001 wendete dann die cis-Form in einer Patientenstudie zur Darstellung urologischer Tumoren an, wobei sich cis-4-[18F]Fluoro-L-Prolin nicht in diesen Tumoren anreicherte. Wallace et al., 2002 sieht in cis-4-[18F]Fluoro-L-Prolin einen sensitiven PET-Marker für die Detektion von Lungenfibrosen. Wolf et al., 2001, synthetisierte C¹-[¹⁸F]Fluorethylaminoasparagin, ein Derivat der Aminosäure Asparagin zur Messung der Tumor-Aminosäure-Aufnahme-Rate mittels PET [Laverman et al., 2002]. Nishii et al., 2003 entwickelte 3-iodo-4-hydroxyphenyl-L-cysteine um, basierend auf der Melaninsynthese, maligne Melanome zu detektieren.

Aus dem Bereich der Aminosäuren ist ¹¹C-Methionin (Met) wohl die am häufigsten verwendete.

Methionin ist eine essentielle, glukoplastische Aminosäure mit hydrophobem Rest. Methionin kann sowohl über die Nahrung aufgenommen werden, als auch über verschiedene Mechanismen im Körper synthetisiert werden [Hofmann, 1985].

Die Methionin-Synthese erfolgt über zwei Stoffwechselwege, bei denen Homocystein methyliert wird. Homocystein ist die unmittelbare Vorstufe von Methionin und kann durch eine erneute Methylierung wieder in Homocystein umgewandelt werden kann.

Der eine Stoffwechselweg wird durch eine Betain-abhängige Methioninsynthetase katalysiert, der andere wird über eine Methyltetrahydrofolat-Vitamin-B12-Methioninsynthetase katalysiert [Larrabee et al., 1961].

Methionin selbst nimmt an vielen verschiedenen Stoffwechselwegen teil. Zum Beispiel wird Methionin in Proteine eingebaut, auch spielt es eine entscheidende Rolle in der Initiation der Proteinsynthese und nicht zuletzt wird Methionin mit Hilfe von ATP zu S-Adenosyl-Methionin (AdoMet) und fungiert so als wichtigster Methylgruppendedonator der Zelle zur Methylierung verschiedenster Substanzen [Cantoni 1951].

Wie Warburg schon 1956 herausfand, werden Aminosäuren, so auch Methionin, wie Glukose im malignen Gewebe vermehrt aufgenommen.

Bis heute etablierte sich die Aminosäure Methionin in Form von ^{11}C -Methionin für PET-Untersuchungen [Bergstrom et al., 1983]. Bustany et al. (1986) und Sorensen et al. (2000) messen Met bei der Gliomdiagnostik einen hohen Stellenwert bei. Erhöhte Met-Anreicherungen wurden auch in Kopf-Hals-Tumoren [Leskinen-Kallio et al., 1992; Lindholm et al., 1998], Urothelkarzinomen [Ahlstrom et al., 1996], Mammakarzinomen [Leskinen-Kallio et al., 1991], malignen Melanomen [Lindholm et al., 1995], Rektumkarzinomen [Wieder et al., 2002] und malignen Lymphomen [Leskinen-Kallio et al., 1991] gefunden. Aber auch Methionin-Analoga, wie beispielsweise S-(2- ^{18}F -fluoroethyl)-L-methionine finden im Bereich der Tumordetektion Verwendung [Tang et al., 2003].

Kubota et al. (1991) vertritt die Meinung, dass Met sich zur Verlaufskontrolle nach Strahlentherapie eignet. Methionin reichert sich im Gegensatz zu FDG vor allem in vitalen Tumorzellen an, aber nur sehr gering in nekrotischem Gewebe mit umgebenden Makrophagen [Kubota et al., 1995] und wird zudem noch schneller als FDG wieder aus dem Blut ausgeschieden [Kubota et al., 1985].

Aufgrund der extrem kurzen Halbwertszeit von ^{11}C ist ^{11}C -Methionin nur beschränkt einsatzfähig zur Diagnostik von Tumoren und Fernmetastasen in extrakraniellen Bereichen, zumal Methionin, was eine Beurteilung von abdominalen Strukturen noch erschwert, physiologischer Weise eine hohe Anreicherung in Pankreas, Leber und teilweise auch im Intestinaltrakt aufweist. Zudem ist die Met-Anreicherung in den meisten malignen Tumoren signifikant geringer als die FDG-Anreicherung [Rodriguez et al., 1995].

Geht man von einem idealen Aminosäure-Tracer aus, so sollte dieser in einem hohen Maße in Proteine eingebaut werden und an möglichst keinem weiteren Stoffwechselweg teilnehmen. Methionin nimmt neben der Proteinsynthese als Methylgruppendedonator an einer Reihe weiterer Stoffwechselwege teil und wird so nicht nur in Proteine, sondern ebenso in andere Makromoleküle eingebaut [Ishiwata et al., 1988]. Deshalb eignet sich Met auch nicht für die Bestimmung der Proteinsyntheserate [Vaalburg et al., 1992].

Das vielfach angewendete Met ist durch die Vielzahl an Stoffwechselwegen, an denen es beteiligt ist, und durch seine Anreicherung im Entzündungsgewebe kein optimaler Aminosäure-Tracer. Deshalb richtete man das Augenmerk auf andere Aminosäuren, um sie als Aminosäure-Tracer heranzuziehen.

Tyrosin, das durch seine Hydroxylgruppen sehr reaktiv ist und an weniger Stoffwechselwegen beteiligt ist als Met, ist Ausgangssubstanz für Katecholamine, wie Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin und spielt

zudem eine wichtige Rolle bei der Melaninsynthese und der Synthese der Schilddrüsenhormone.

Tyrosin wird entweder aus Phenylalanin direkt gebildet oder über einige Zwischenschritte aus Erythrose-4-Phosphat oder aus Phosphoenolpyruvat hergestellt.

Paans et al. (1996) und Braams et al. (1996) sind der Meinung, dass sich Tyrosin als Tracer zur Darstellung des Aminosäuretransportes und der Proteinsynthese eignet.

Das große Interesse an Tyrosin als Tracer für PET und SPECT spricht für sich. Folgende radioaktive Tyrosinanaloga wurden bisher eingesetzt:

- L-[C-11]-tyrosine (Tyr) zum Therapiemonitoring von Weichteiltumoren [Kole et al., 1999] und zur Hirntumordiagnostik [Pruim et al., 1995]
- 3-[I-123] Iodo-O-methyl-alpha-methyl-L-tyrosine (123I-OMIMT) [Langen et al., 1997; Pauleit et al., 2004]
- [F-18]-alpha-methyltyrosine (FMT) [Tomiyoshi et al., 1999]
- [F-18]Fluoro-beta-fluoromethylene-m-tyrosine [Huang et al., 1999]
- [I-123]-alpha-methyl-L-tyrosine (¹²³I-IMT) [Weber et al., 1997; Pauleit et al., 2004; Diericks et al., 2003]
- L-[F-18]-Fluorotyrosine (F-Tyr) [Wienhard et al., 1991]
- [F-18]Fluoroethyl-L-tyrosine (FET) [Wester et al., 1999; Heiss et al., 1999; Weber et al., 2000]

Primäre Hirntumoren, Metastasen und maligne Non-Hodgkin-Lymphome konnten mit 89% diagnostischer Genauigkeit mittels Tyrosinanaloga detektiert werden [Pruim et al., 1995]. In Dysplasien und Plattenepithelkarzinomen von Kopf-Hals-Tumoren wurde Tyrosin sogar in höherem Maß aufgenommen als FDG [Braams et al., 1998]. Desweiteren reichert sich Tyrosin bei der Darstellung des Brustdrüsengewebes geringer im fibrozystischen Anteil des Gewebes an als FDG [Wiesel et al., 1991].

Der Aminosäure Tyrosin kommt neben Methionin eine große Bedeutung für die Darstellung des Hirnstoffwechsels zu. Normales Hirngewebe zeigt eine geringe Aminosäure-Aufnahme, doch sobald die Blut-Hirn-Schranke z. B. durch einen Tumor gestört ist, steigt die Aminosäure-Aufnahme an. Samnick et al. (2002); Jager et al. (2001); Weckesser et al. (2002); Henze et al. (2004); Schmidt et al. (2001) und Weber et al. (2001) nutzten ¹²³I-IMT für verschiedenste in vivo und in vitro Studien an Hirntumoren, besonders Gliomen und sehen in ¹²³I-IMT einen vielversprechenden Tracer für die Diagnostik von primären Hirntumoren und deren Rezidiven. Weber et al., 2001 fand eine signifikante Korrelation zwischen ¹²³I-IMT-Uptake in postoperativen Gliomresiduen und der Überlebenszeit der Patienten. Eine ähnliche Korrelation zwischen Traceruptake und Prognose der Patienten fand Henze et al. 2004 an einer

Astrozytompatientenstudie. Überdies zeichnete sich in einer weiteren Studie mit, an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches leidenden Patienten ab, dass die adjuvante Therapie, die aufgrund der sensitiven (123)I-IMT-Tumordetektion sehr schnell und effektiv eingeleitet werden kann, die Prognose der Patienten deutlich verbessern kann [Diericks et al., 2003].

Im radiochemischen Labor der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München ist das Aminosäureanalogon [F-18]Fluorethyl-L-tyrosin (FET, HWZ 109,71min) synthetisiert worden. In dieser Arbeit sollte die FET-Anreicherung in Lymphozyten, Makrophagen und SW707-Tumorzellen näher untersucht werden.

Im Gegensatz zu anderen ^{18}F -markierten Tyrosintracern ist FET einfach in zwei Schritten und innerhalb einer Stunde herstellbar [Wester et al., 1999]. Aus pharmakologischen Studien ist bekannt, dass FET als künstliche Aminosäure nur zu 1% in der hochmolekularen Fraktion wiedergefunden wird, also nicht in Proteine eingebaut wird. Deshalb eignet sich FET nicht zur Untersuchung der Proteinsyntheserate, sehr wohl aber zur Untersuchung des Aminosäuretransportes [Langen et al., 1997; Wienhard et al., 1991]. In ersten in vivo Studien zeigte FET eine gute Anreicherung in Kolonkarzinomzellen [Heiss et al., 1999] und auch bei der erstmaligen Anwendung an Astrozytompatienten erlaubte FET eine klare Darstellung des tumorösen Gewebes [Wester et al., 1999]. In weiteren Patientenstudien konnten Weber et al., 2000 und Jarosch et al., 2000 eine Vergleichbarkeit der Met- und FET-Aufnahme in Tumoren feststellen, ebenso wie Pauleit et al., 2004 in einer, die FET- und (123)I-IMT-Aufnahme vergleichenden Patientenstudie, die für die Tumordiagnostik gute Nutzbarkeit beider Tracer herausstellte.

F-18-FET erscheint, auch aufgrund der längeren Halbwertszeit von ^{18}F im Vergleich zu C-11, ein vielversprechender Aminosäure-Tracer für PET zu sein.

2 Zielsetzung

„Cancer or inflammation? A holy grail for nuclear medicine“ lautete 1994 der Titel von Larsons Veröffentlichung. Larsons Titelworte spiegeln genau die Fragestellung wieder, die dieser Arbeit zugrunde liegt.

Seit Jahren wird FDG als PET-„Goldstandard“ zum Tumornachweis verwendet. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass Tumoren in Abhängigkeit ihres Malignitätsgrades im Vergleich zum gesunden Gewebe höhere Glykolyseraten und damit einen erhöhten Glukoseverbrauch aufweisen [Warburg, 1930].

Allerdings zeigen neben Tumoren auch entzündliche Veränderungen des Körpers, wie z. B. Gelenksentzündungen [Shreve et al., 1999], Abszesse [Strauss et al., 1996 und Tahara et al., 1989], Pneumonien [Strauss et al., 1996 und Bakheet u. Powe, 1998] usw. eine erhöhte FDG-Aufnahme, die zu falsch positiven Ergebnissen bei der Tumordarstellung führen können.

Warburg stellte bereits 1956 fest, dass malignes Gewebe nicht nur einen erhöhten Glukosestoffwechsel aufweist, sondern dass, aufgrund des an sich erhöhten Tumorstoffwechsels auch Aminosäuren vermehrt aufgenommen werden. Diese Eigenschaft des Tumors nutzten Hubner et al. (1982); Bergstrom et al. (1983) und Kubota et al. (1983) und berichteten über die vermehrte ^{11}C -Met-Anreicherung in Tumoren. Kubota et al. schreibt FDG und Met in einer Studie an Lungentumoren 1990 eine annähernd gleiche Sensitivität von 80% zu und bezeichnet Met in einer Studie mit 5 experimentellen Tumoren und einer Vielzahl von verschiedenen Tracern (1991) als geeignet für die Diagnostik von Gehirntumoren und Tumoren im Thoraxbereich.

Met zeigte sogar Vorteile gegenüber FDG bei der Hirntumordiagnostik. Da die Proteinsyntheserate der grauen Substanz weitaus geringer ist als

ihr Glukoseverbrauch, bietet die Met-PET einen besseren Kontrast zwischen normalem Hirngewebe und Tumor [Weber et al., 1997].

Obwohl Leskinen-Kallio et al. (1993) und Kubota et al. (1995) die These postulierten, dass sich Met nur in geringem Maße im entzündlichen Gewebe anreichert, konnte an einem Tumor- und Lymphadenitismodell an der Maus in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sich sowohl Met (im Gegensatz zur These von Leskinen-Kallio und Kubota), als auch FDG in tumorös und entzündlich veränderten Lymphknoten anreichert [Rau et al., 2002]. Eine weitere Aminosäure, die ebenfalls in der Tumor- und Lymphadenitis-Studie verwendet worden war, O-(2-[¹⁸F]-Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET), reichte sich im Gegensatz zu FDG und Met nicht in entzündlich veränderten, sehr wohl aber in tumorös veränderten Lymphknoten an [Rau et al., 2002].

Ziel dieser Arbeit war es nun, die in vitro Aufnahme von Met und FET in humane Lymphozyten, Makrophagen und humane Adenokarzinomzellen des Darmes (SW707) näher zu untersuchen.

Neben Unterschieden in der absoluten AS-Aufnahme der untersuchten Zellen sollte untersucht werden, über welche Transportsysteme die jeweilige Aminosäure aufgenommen wird. Die in der Literatur beschriebenen drei Haupttransportsysteme für neutrale Aminosäuren sind das A-, das L- und das ASC-System. Diese unterscheiden sich in ihrer Hemmbarkeit, ihrer Na⁺- und pH-Abhängigkeit etc. [Oxender et al., 1977; Dall Asta et al., 1991]. Das A-System lässt sich spezifisch durch MeAIB, das L-System durch BCH und das ASC-System durch L-Serin blockieren [Maroni et al., 1986; Cam et al., 1976]. Durch Zugabe dieser spezifischen Inhibitoren sollte in dieser Arbeit erfasst werden, über welche Wege und zu welchen Anteilen die Aminosäuren Met und FET in die verschiedenen untersuchten Zellen aufgenommen werden.

Auch war es von Bedeutung zu sehen, wie sich die Aminosäure-Aufnahme verhält, wenn sich der pH-Wert des Versuchsmediums ändert. Bekannt ist, dass in vivo im entzündlichen Gewebe, verglichen mit dem physiologischen humanen Serums-pH, ein saureres Milieu vorherrscht. Verantwortlich dafür sind die Stoffe, z. B. Enzyme oder Peroxidasen, die von Entzündungszellen ausgeschüttet werden [Karow, Lang, 2000]. Fraglich war, in welchem Maß die jeweilige Aminosäure von den untersuchten Tumor- und Entzündungszellen aufgenommen wird, wenn der pH-Wert des Versuchsmediums zwischen 6,8 und 7,8 variiert wird.

Zur näheren Charakterisierung der FET- und Met-Aufnahme wurden für die verschiedenen untersuchten Zellen Michaelis-Menten-Kinetiken erstellt, die eine Aussage darüber erlauben, wie sich die Aminosäure-Aufnahmegeschwindigkeiten der verschiedenen Zellen verhalten, wie hoch

die Aminosäure-Aufnahme bei einem jeweils definierten Aminosäureangebot ist, ob die Aufnahme einer Sättigung unterliegt und auch wie stark die Affinität zwischen Aminosäure und Transporter ist.

All diese Untersuchungen sollten dazu dienen, ein wenig Licht in das Dunkel der Frage Larsons „Cancer or inflammation?“ zu bringen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Tumorzelllinie:

SW707 (humanes Adenokarzinom
des Dickdarms)

DKFZ Heidelberg

Entzündungszellen:

Lymphozyten und Makrophagen isoliert aus buffy coats, Blutbank,
Klinikum rechts der Isar, München

3.1.2 Kulturmedium und Zusätze

RPMI 1640 Medium (1x), 2g/l NaHCO₃

Biochrom, Berlin, FG 1215

Fetales Kälberserum, FKS

Biochrom, Berlin, SO115

Penicillin/Streptomycin, 10000U/10000µg/ml

Biochrom, Berlin, A2212

3.1.3 Versuchsmedium

NaCl 6000mg/l

Merck, Darmstadt, 106404

KCl 400mg/l

Merck, Darmstadt, 4936

Na₂HPO₄, 7H₂O 1512mg/l

Merck, Darmstadt,
1065741000

MgSO₄, 7H₂O 100mg/l

Sigma, St. Louis, USA, M-
7506

Ca(NO₃)₂, 4H₂O 100mg/l

Merck, Darmstadt

D-Glucose	2000mg/l	Gibco, Karlsruhe, 39002-019
NaHCO ₃	2000mg/l	Merck, Darmstadt

...gelöst in destilliertem Wasser, pH-Wert eingestellt zwischen 7,35 und 7,45

3.1.4 Aminosäuren

L-Methionin		Sigma, Taufkirchen, M9625
L-Serin		Sigma, Steinheim, S450
L-Tyrosin		Fluka, Buchs, Schweiz, 93829
Fluorethyltyrosin		Wester et al., TU München

3.1.5 Hemmsubstanzen

2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure (BCH)		Sigma, Steinheim, A-7902
α -(Methylamino)-Isobuttersäure (MeAIB)		Sigma, Steinheim, M-2383
L-Serin		Sigma, Steinheim, S450

3.1.6 Stimulantien

Concanavalin A (ConA)		ICN, 194069, Eschwege
Lipopolysaccharide (LPS) from E.coli Serotyp 0111:B4		Sigma, Steinheim, L-2630

3.1.7 Isolierung von Entzündungszellen aus Blut bzw. buffy coats

Biocoll (Dichte 1,077)		Biocoll, Berlin
Histopaque 1119-1 (Dichte 1,119)		Sigma, Steinheim, 031K6015
PBS-Dubelco (w/o Ca, Mg)		Biochrom, Berlin, L1825
PBS (10x)		Gibco, Karlsruhe, 14080-048
destilliertes Wasser		

3.1.8 Chemikalien

<u>zur Vitalitätsbestimmung der Zellen:</u> Trypanblau-Lösung 0,5%		Sigma, Steinheim, T 8154
---	--	--------------------------

zur Proteinbestimmung nach Bradford:

Natriumhydroxid NaOH	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V, Rinderserumalbumin	Merck, Darmstadt, 112018
PBS-Dubelco (w/o Ca, Mg)	Biochrom, Berlin, L 1825
Proteinbestimmungsreagenz	Bio-Rad, München, 600-0005

zur pH-Wert-Einstellung des Versuchsmediums:

3M-Natronlauge NaOH	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt, 109057

zur Zellzahlbestimmung:

Casi®ton, Verdünnungslösung für Zellkulturen	Schärfe System, Reutlingen
---	----------------------------

Sonstige Chemikalien:

Sodiumdodecylsulfat SDS	Bio-Rad, München, 161-0302
Scintillationscocktail	Packard, Groningen, Niederlande, 3097
Hionic-Flour-LSC-Cocktail	c. c. pro, Neustadt/W., Z-17-M
EDTA, 1% in PBS ohne Ca, Mg	Apotheke, Klinikum rdl, München
Ethanol, 75%ig	Sigma, Steinheim, D 05879
DMSO Dimethylsulfoxid	

3.1.9 Radioaktive Substanzen

L-[Methyl- ³ H]Methionin (spezifische Aktivität 3,07TBq/mmol)	Amersham, Freiburg, TRK583-37MBq ³ H-HWZ: 12,35 Jahre
O-(2[¹⁸ F]Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET);	Synthese im radio- chemischen Labor der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München; ¹⁸ F-HWZ: 109,71min

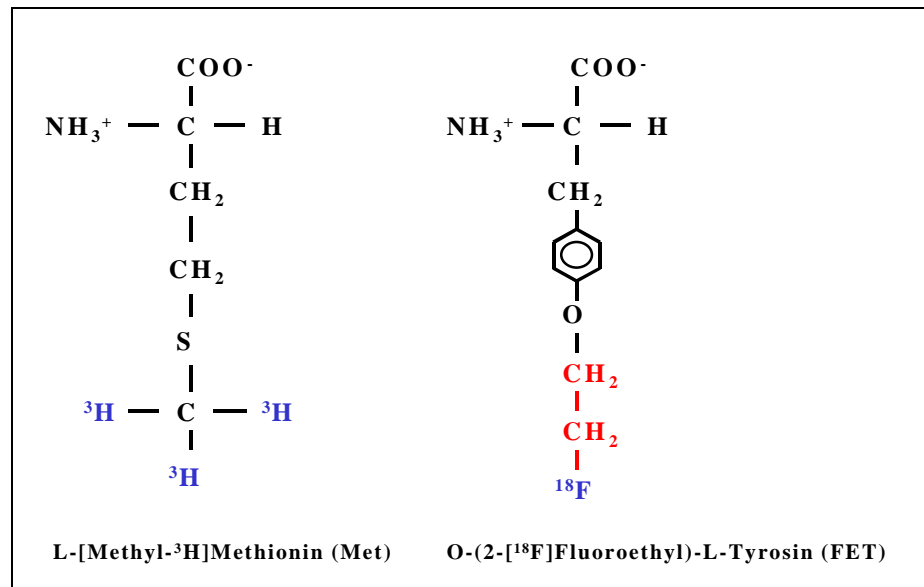


Abbildung 1: Aminosäure-Tracer-Strukturformeln. Die rote Markierung stellt die substituierte Fluorethylgruppe, die blauen Markierungen die jeweiligen Nuklide dar.

3.1.10 Geräte

Beta-counter Liquid Scintillation,
counter 1414

Brutschrank Typ 6000

Gamma-counter TYP 1480 Wizard TM 3

Casy-Zellzählgerät

Photoapparat, Minolta X-300s

Mikroskop, Axiovert 10

Laminair Haeraeus HB 2472

Wasserbad

Pipetus ®-akku

Vortex-Genie

Stickstoffbehälter BT 55

Zentrifuge, Megafuge 1,0 R

UV/VIS Spektrometer Uvikon 931 Plus

Analysenwaage Sartorius,

Typ LA 230S-OCE

ph-Meter, pH 522

Neubauer-Zählkammer

Milli-Q UF Plus

Wallac, Turku, Finnland

Heraeus

Wallac, Turku, Finnland

Schärfe System, Reutlingen

Japan, 54007156

Zeiss, Göttingen

Haeraeus

GFL 1092

Hirschmann, Laborgeräte

Bender&Hobein AG, Zürich,
Schweiz

Deutsche Air Liquid
Anlagebau GmbH,
Wiesbaden

Haeraeus

Kontron Instruments, Italien

Sartorius, Göttingen

WTW, Weilheim

MD-Kova, Madaus

Diagnostika, Köln

Millipore S. A. Molsheim,
Frankreich

3.1.11 Gebrauchsmaterial

Casy-Probenröhrchen	Schärfe System, Reutlingen
Eppendorfpipetten (1-10, 10-100, 100-1000µl)	Eppendorf
Sterile Messpipetten (5, 10, 25ml)	Falcon, Becton Dickinson, USA
Messkolben 100ml	Schott, Duran, Deutschland
Nunc Cryo Tubes 1,8ml 3-63401	Nunc Inter Med, Denmark, Roskilde
Kulturflaschen, 550ml	Greiner, Solingen, 660 160
Pasteurpipetten aus Glas	Wagner&Munz, 99411015
Polyvials, 6 und 20ml	Zinsser Analytic, Frankfurt
Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 und 2ml	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Corning, Bodenheim, 430291
Einmalküvetten 1,5ml halbmikro PS 7590 15	PLASTIBRAND

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

3.2.1.1 Isolierung der Entzündungszellen aus Blutkonserven und deren Aufnahme in Kulturmedium

Alle, im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zur Isolierung von Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten können sowohl Vollblut, als auch Blutkonserven, sogenannte buffy coats, verwendet werden, wobei buffy coats aufgrund ihrer Aufbereitung im Vorfeld eine höhere Konzentration an Entzündungszellen aufweisen. Buffy coats stellen die konzentrierte Entzündungszellfraktion des Blutes dar, die sich nach Zentrifugation der eigentlichen Blutkonserve von Erythrozyten- und Plasma/Thrombozyten-Layer abtrennen lässt (Blutdepot, Klinikum rechts der Isar, München).

Der Inhalt des buffy coats bzw. das Vollblut wurde auf 50ml-Zentrifugenröhrchen verteilt, 1:1 mit PBS verdünnt und gut durchmischt. Durch die Verdünnung mit PBS stellen sich nach der Dichtegradientenzentrifugation die einzelnen Zelllayer besser dar.

In weiteren 50ml-Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 12,5ml Biocoll (Dichte: 1077; bei Raumtemperatur, lichtgeschützt aufbewahrt) vorgelegt,

vorsichtig mit dem Blut/PBS-Gemisch überschichtet und 30min (break off!, 2200U/min, 20°C) zentrifugiert.

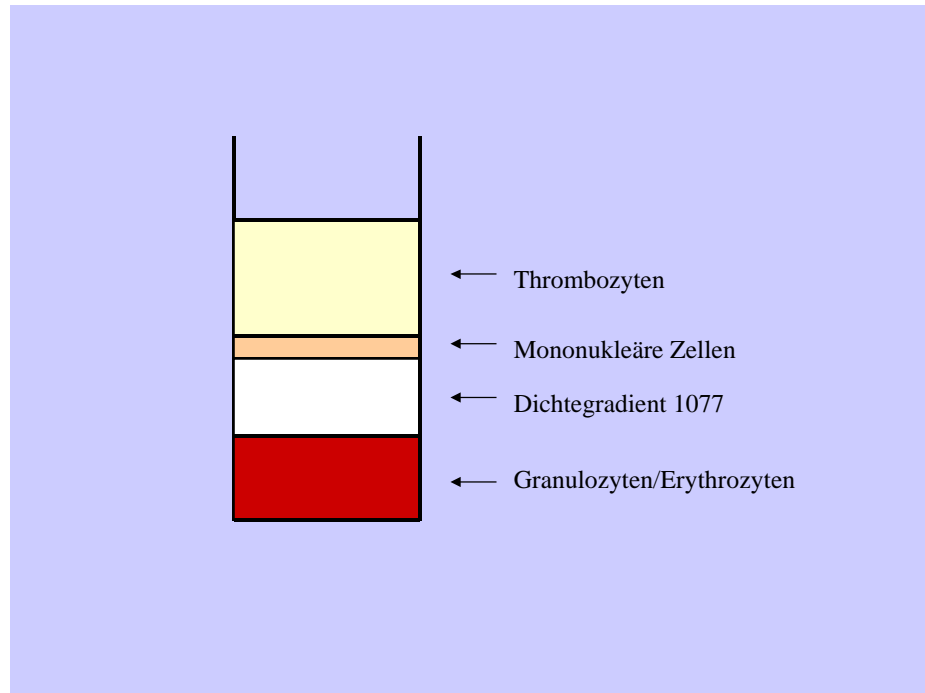


Abbildung 2: Schichtung der Zellschicht nach Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem Gradienten (frei nach Pharmacia Biotechnology)

Der gelbliche Überstand, der dem Blutplasma entspricht, wurde abgesaugt bis zur „grau-wolkigen“ mononukleären Zellschicht (Abb. 2). Diese wurde vorsichtig abgenommen, möglichst ohne mit dem Biocoll- oder Erythrozyten-Layer in Berührung zu kommen, in ein neues 50ml-Zentrifugenröhrchen eingebracht, mit PBS aufgefüllt und erneut bei 1000U/min, 10min und 20°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes konnten die mononukleären Zellen in ca. 25ml Kulturmedium (RPMI 1640, versetzt mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) in Kulturflaschen aufgenommen werden. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ konnte bereits beobachtet werden, dass sich die mononukleäre Zellfraktion in Makrophagen und Lymphozyten aufteilte, indem sich die adhärennten Makrophagen am Boden der Kulturflasche absetzten, die Lymphozyten aber in Suspension blieben.

Zur Gewinnung von Granulozyten ist es notwendig zwei Gradienten unterschiedlicher Dichte zu verwenden.

In einem 50ml-Zentrifugenröhrchen wurden ca. 12ml des Histopaque-Dichtegradienten (Dichte: 1119) vorgelegt, ca. 12ml eines zweiten Dichtegradienten, Biocoll (Dichte: 1077) wurden vorsichtig darauf pipettiert. Zuletzt erfolgte die vorsichtige Überschichtung der Dichtegradienten mit dem Blut/PBS-1:1-Gemisch. Nach Zentrifugation bei

20°C für 30min, break off! und 2200U/min stellten sich die Layer wie folgt dar (Abb. 3):

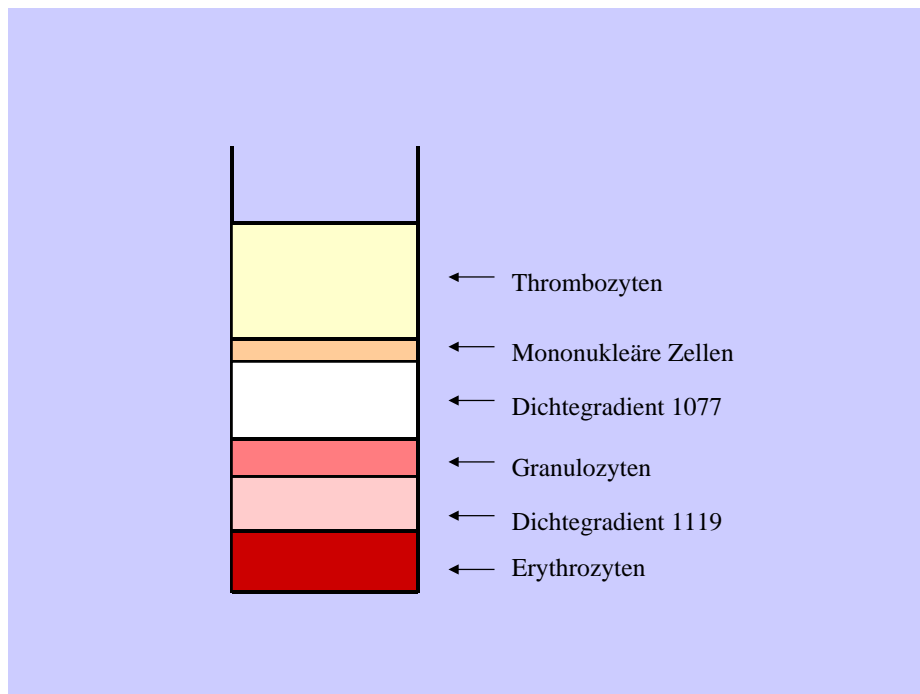


Abbildung 3: Darstellung der Blutzellschichten nach Dichtegradienten-Zentrifugation mit zwei Gradienten (frei nach Pharmacia Biotechnology)

Nach Absaugen des Plasmas konnte die mononukleäre Zellschicht abgenommen und wie oben beschrieben in Kultur genommen werden. Der Biocoll-Überstand wurde ebenfalls abgesaugt und verworfen, um letztendlich zur Granulozyten-Schicht vorzudringen. Diese wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 50ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, mit PBS aufgefüllt und bei 20°C, 1000U/min, 10min zentrifugiert. Da sich in der Granulozytenschicht eine relativ hohe Menge an Erythrozyten befindet, wurden zur Erythrozytenlyse, nach Absaugen des Überstandes ca. 10ml hypotones destilliertes Wasser gegeben. Nach einigen Sekunden wurde PBS (2fach konzentriert) zugeben, um die Zelllyse zu stoppen und um das hypotone Medium zu neutralisieren. Nach Zentrifugation (1000U/min, 5min und 20°C) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen konnten in ca. 25ml Kulturmedium (RPMI 1640, versetzt mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) in Kulturflaschen aufgenommen werden.

In Kultur überleben Granulozyten ca. 2 Tage, Makrophagen und Lymphozyten lassen sich bei mehrfachem Mediumwechsel ca. 2-3 Wochen am Leben erhalten (Aufbewahrung der Kulturen im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung und 100% Wasserdampfsättigung).

Zum Mediumwechsel von Makrophagen wurde das Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und neues Kulturmedium zugegeben. Da Lymphozyten Suspensionszellen sind, wurden die Zellen mit dem Kulturmedium in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (5min, bei 1000U/min und 20°C). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche mit ca. 25ml Kulturmedium umgesetzt.

3.2.1.2 Auftauen der Tumorzelllinie SW707, Passagieren und Einfrieren der Zellen

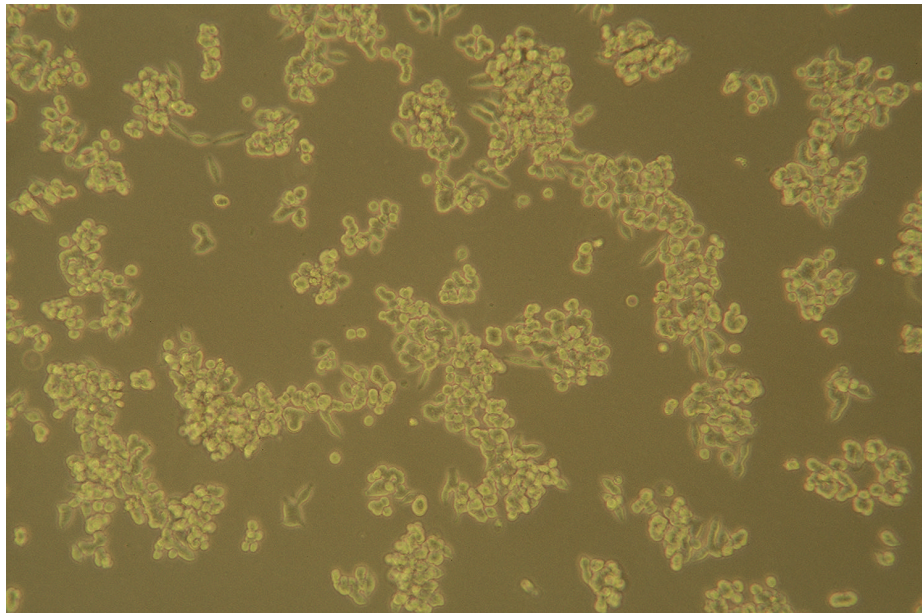


Abbildung 4: Nativaufnahme von SW707-Tumorzellen

3.2.1.2.1 Auftauen der Tumorzelllinie SW707

Zur Langzeitaufbewahrung lagerten die Tumorzellen SW707 in flüssigem Stickstoff in 1,8ml Kryoröhrchen. Zum Auftauen wurde das Röhrchen so lange unter warmes Wasser gehalten oder ins Wasserbad gestellt, bis sich die gefrorene Zellsuspension von der Gefäßwand gelöst hatte. Unter sterilen Bedingungen wurde die wieder verflüssigte Zellsuspension in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert, in das bereits im Vorfeld ca. 15ml Kulturmedium (RPMI 1640, versetzt mit 10% FKS) vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000U/min, 20°C, 5 min), mit 6ml Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen mit 25ml Kulturmedium pipettiert.

3.2.1.2.2 Passagieren der adhärennten SW707-Zellen

Das Medium wurde mit einer sterilen Pasteurpipette aus der Kulturflasche abgesaugt. Anschließend wurden 5ml EDTA-Lösung (15ml EDTA in 500ml PBS) zu den Zellen gegeben, um diese vom Flaschenboden

abzulösen. Um den Vorgang zu beschleunigen, kann die Kulturflasche für einige Minuten in den Brutschrank gestellt werden.

In einem 50ml-Zentrifugenröhrchen wurden 20ml Kulturmedium vorgelegt, die Zellen in der EDTA-Lösung aus der Kulturflasche zupipettiert und zentifugiert (1000U/min, 20°C, 3min). Der Überstand wurde abgesaugt, in 6ml Kulturmedium resuspendiert und auf 2-4 Kulturflaschen, in die ca. 25ml Kulturmedium vorgelegt worden waren, verteilt. Die befüllten Kulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung und 100% Wasserdampfsättigung aufbewahrt.

Das Umsetzen der Zellen erfolgte alle 2 bis 4 Tage.

3.2.1.2.3 Das Einfrieren der SW707-Zellen

Nach Ablösung der SW707-Zellen vom Kulturflaschenboden mit EDTA-Lösung, wurden die Zellen in Kulturmedium abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in vorgewärmten DMSO Freeze Medium (17–25°C) resuspendiert, wobei ca. 5×10^6 Zellen in 1ml DMSO enthalten sein sollten. Die Zell-/DMSO-Suspension wurde nun steril in 1,8ml Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen verblieben 5 bis 10min im Einfriermedium bis der Einfriervorgang gestartet werden konnte.

Für 24 Stunden wurden die befüllten Kryoröhrchen bei –20°C aufbewahrt, dann für ca. 24 Stunden bei –70°C, um letztendlich in den Flüssigstickstoffbehälter überführt werden zu können.

3.2.2 Vorbereitung der Zellen für die Versuche zur Aminosäureaufnahme

3.2.2.1 Stimulation der Entzündungszellen

Makrophagen

Zur Stimulation von Makrophagen wurden in 25ml Kulturmedium ca. 48 Stunden vor Versuchsbeginn 100ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) pipettiert. Aus Vorversuchen war bekannt, dass der Stimulationsgrad bei der genannten LPS-Konzentration nach etwa 2 Tagen sein Maximum erreicht hatte.

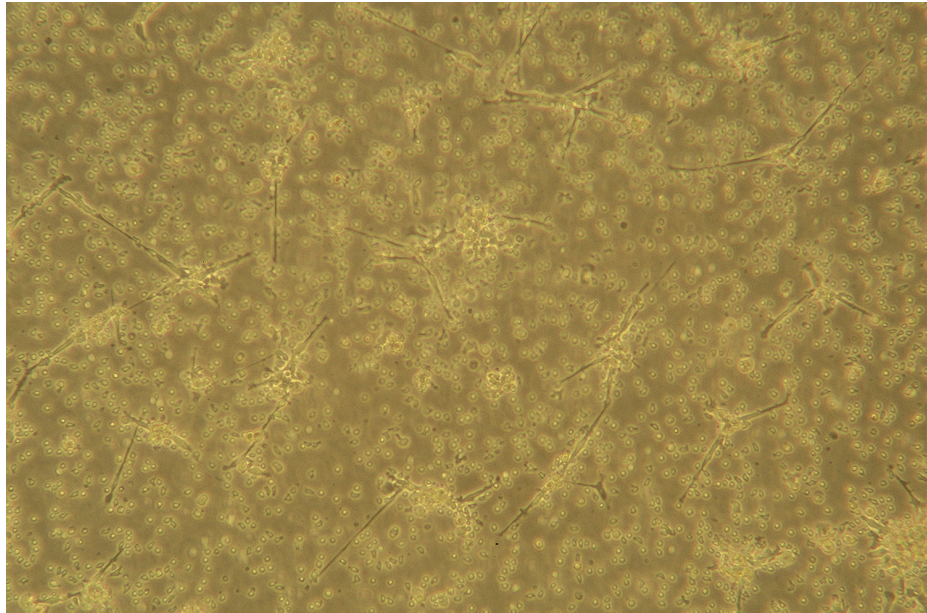


Abbildung 5: Makrophagen unstimuliert (Nativaufnahme), 2 Stunden nach Isolation und Absaugung der Lymphozyten.

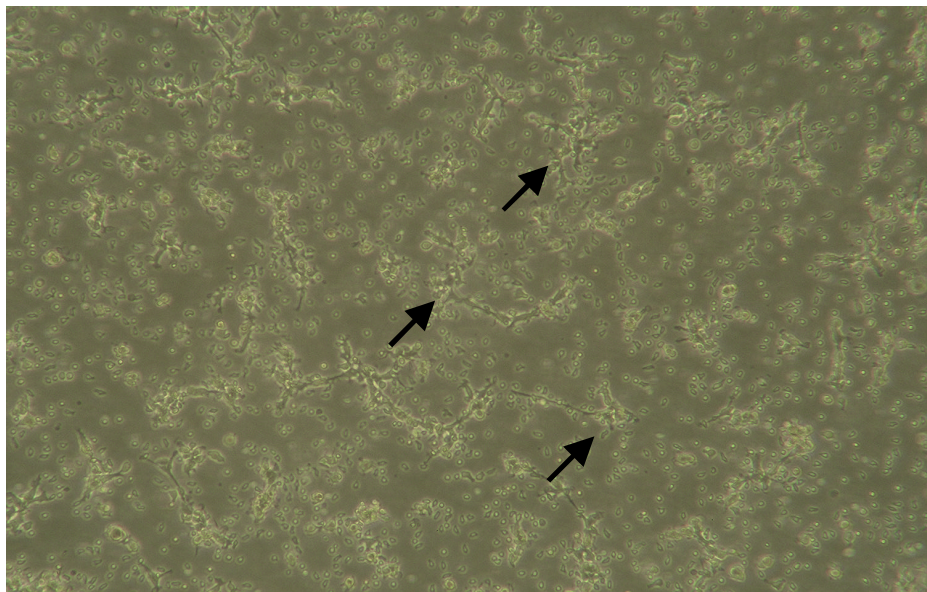


Abbildung 6: Makrophagen (Nativaufnahme), 2 Tage nach Stimulation mit 100ng/ml LPS. Zu beachten sind hier die kleinen, vielgestaltigen Fortsätze (siehe Pfeile) der länglichen Makrophagen, die sich erst nach Stimulation ausbilden

Lymphozyten

Zur Stimulation von Lymphozyten wurden in 25ml Kulturmedium ca. 24 Stunden vor Versuchsbeginn 0,25mg/ml Concanavalin A (ConA) pipettiert. Auch hier war aus Vorversuchen bekannt, dass die Stimulation mit genannter ConA-Konzentration nach etwa einem Tag ihr Maximum erreicht hatte.

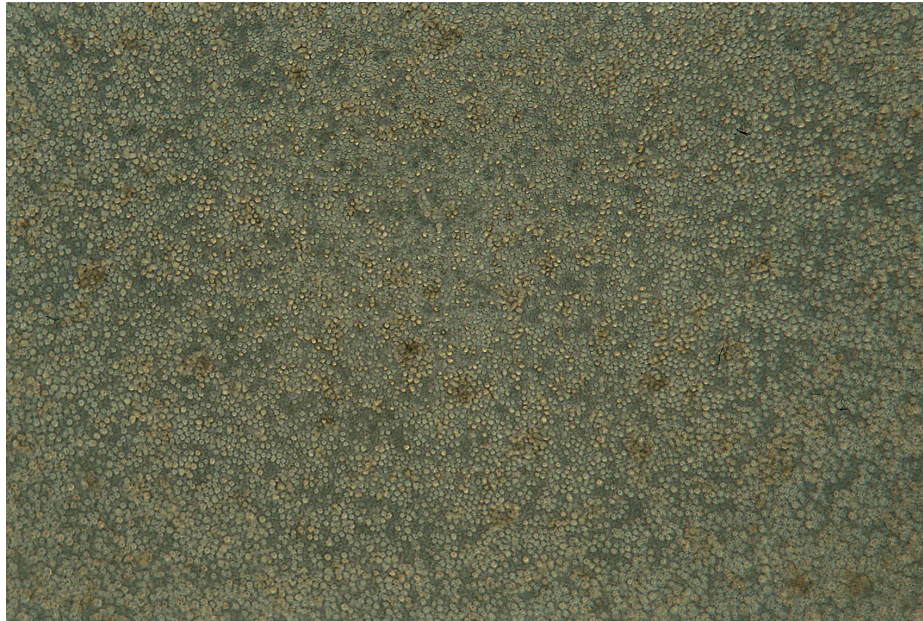


Abbildung 7: Lymphozyten (Nativaufnahme), unstimuliert

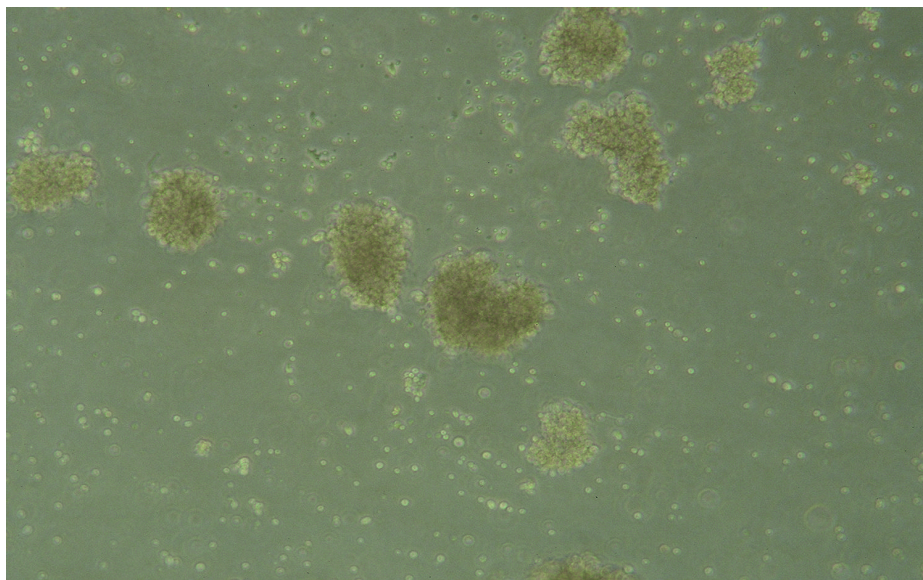


Abbildung 8: Lymphozyten (Nativaufnahme), 1 Tag nach Stimulation mit 0,25mg/ml ConA. Man beachte die Zusammenballung der Lymphozyten, die nur nach Stimulation auftritt.

3.2.2.2 Vitalitätsbestimmung der Zellen

Der Nachweis von mindestens 70–80% vitaler Zellen einer Population galt als Voraussetzung für die Durchführung eines Aminosäure-Aufnahmeversuchs. Zur Vitalitätsbestimmung wurden 100µl Zellsuspension und 100µl Trypanblau-Lösung in einem Eppendorf-Cup vermischt und 5 Minuten abgewartet.

Anschließend wurde eine ausreichende Menge des Zell-Farbstoff-Gemisches auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop betrachtet.

Findet sich der Farbstoff im Inneren der Zellen, so ist davon auszugehen, dass die Zellen tot sind, da der Farbstoff durch bestehende Defekte in der Zellwand in die Zelle eindringen kann. Ist jedoch kein Farbstoff in den Zellen zu sehen, so ist die Zellwand der Zellen intakt und die Zellen sind folglich vital.

3.2.2.3 Überführen der Zellen in Versuchsmedium

Lymphozyten:

Als Suspensionszellen waren die Lymphozyten mit dem Kulturmedium in 50ml-Zentrifugenröhrchen zu überführen. Nach dem Zentrifugieren bei 1000U/min und 20°C für 5min wurde der Überstand abgesaugt, das Zentrifugenröhrchen mit dem Versuchspuffer aufgefüllt und die Zellen darin resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgesaugt und je nach Zellzahl bzw. benötigtem Versuchsvolumen eine entsprechende Menge an Versuchspuffer zugegeben.

Makrophagen und SW707-Tumorzellen:

Da Makrophagen und SW707 Adhäsionszellen sind, musste zuerst das Kulturmedium abgesaugt und zur Ablösung der Zellen vom Kulturflaschenboden 5ml EDTA/PBS-Lösung zugegeben werden. Der Ablösungsvorgang konnte durch Wärmeeinwirkung im Brutschrank beschleunigt werden.

Waren die Zellen ausreichend abgelöst, wurden sie (mit der EDTA-Lösung) in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert, in das im Vorfeld ca. 30ml Versuchspuffer vorgelegt worden waren. Nach dem Abzentrifugieren (1000U/min, 5min, 20°C) wurde der Überstand abgesaugt und erneut ca. 30ml Versuchspuffer zu dem Zellpellet gegeben. Nach Resuspension der Zellen wurde nochmals zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Je nach Zellzahl bzw. benötigtem Versuchsvolumen wurden die Zellen in einer entsprechenden Menge Versuchspuffer resuspendiert.

Bis zur Zugabe der radioaktiven Substanzen wurden die Zellen zu je 100µl in Eppendorfcups pipettiert und ca. 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem CASY1-Zellzählgerät. 50µl der Zellsuspension (Zellen/Versuchspuffer) wurden jeweils in ein CASY1-Probenröhrchen zu 10ml Casyton-Lösung pipettiert. Bei einer Verdünnung von 1:200 wurde dann die Zellzahl unter Berücksichtigung der Zellgröße und des dementsprechenden Messbereiches bestimmt. Neben der Zellzahlbestimmung ermöglicht das CASY1-Zellzählgerät die Bestimmung des mittleren Volumens der jeweiligen Zellart, des mittleren Durchmessers, des Volumens und des Durchmesser am Maximum der Zellzählkurve.

Um den Messbereich für vitale Zellen optimal einstellen und um die Zellkerne abgestorbener Zellen aus der Zellzählung ausschließen zu können, wurde im Vorfeld die Größe der Zellkerne bestimmt. Dies erfolgte dadurch, dass zu 50µl Zellsuspension, 200µl Ethanol 96% gegeben wurden, 5min abgewartet wurde und letztendlich im CASY1-Zellzählgerät das Volumen am Maximum der Zellzählkurve bestimmt wurde. Durch die Einwirkung des Ethanols ist davon auszugehen, dass die Zellen abgetötet werden, sich Zellwände zersetzen und die Zellkerne hervortreten. Bei der Zellzählung ist zu erwarten, dass das Volumen der Zellkerne im Ergebnis erscheint. Da die Zellkerne kleiner sind als die Zellen selbst, konnte nun der Messbereich für die lebenden Versuchszellen so festgelegt werden, dass erst Zellen ab einem höheren Volumen als dem Zellkernvolumen für die Bestimmung der Zellzahl berücksichtigt wurden. Der Messbereich variierte bei den unterschiedlichen Zellen (Tab. 2).

Tabelle 2: Messbereich der Durchmesser verschiedener Zellen mittels Casy-Zellzählgerät

	Lymphozyten	Makrophagen	SW707
Messbereich	7,0 – 30µm	8,0 – 30 µm	8,0 – 30 µm

Für die Versuche wurde die Zellzahl auf ca. 10^6 /ml je Zellart eingestellt.

3.2.3 Durchführung der Aminosäure-Aufnahme-Versuche

3.2.3.1 Met- und FET-Aufnahme in Tumorzellen, stimulierten und unstimulierten Entzündungszellen

Um die Met-Aufnahme in den untersuchten Zellen zu vergleichen, wurden die Zellen, die bereits 2 Stunden im Brutschrank in Versuchsmedium (pH 7,35–7,45), in Eppendorf-Cups zu je 100µl inkubiert worden waren, mit 100µl einer Mischung aus kaltem (nicht radioaktiv markiertem) und heißem (radioaktiv markiertem) Met versetzt.

Da die physiologische Methioninkonzentration im humanen Serum 4,4mg/l beträgt, und bereits 100µl Zellsuspension im Versuchspuffer (ohne Aminosäuren) im Eppendorf-Cup vorpipettiert worden waren, musste die Konzentration in der Mischung aus kaltem und heißem Met 8,8mg/l (gelöst in Versuchsmedium) bei einer Aktivität von 3,7kBq(0,1µCi)/100µl betragen. Davon wurden 100µl zu 100µl Zellsuspension gegeben, nachdem die Zellsuspension im Eppendorf-Cup kurz gevortext wurde, um die Zellen, die sich nach 2 Stunden Inkubation abgesetzt hatten zu resuspendieren.

Um die FET-Aufnahme der Zellen untereinander zu vergleichen, wurden auch hier der Zellsuspension nach 2 Stunden Inkubation in Versuchsmedium (pH 7,35–7,45) im Brutschrank eine Mischung aus heißem und kaltem FET zugegeben.

Da die physiologische Tyrosinkonzentration im humanem Serum 12,0mg/l beträgt, musste wegen der vorgelegten Zellsuspension eine Mischung aus kaltem und heißem Tyrosin mit 24mg/l (gelöst in Versuchsmedium) bei einer Aktivität von 370kBq(10 μ Ci)/100 μ l zugegeben werden. Vor der Zugabe des Aminosäuregemisches wurde die Zellsuspension im Eppendorf-Cup kurz gevortext.

In beiden Fällen wurde die geringe Konzentration der heißen Aminosäure für die Berechnung vernachlässigt. Als ausschlaggebend wurde nur die Konzentration des kalten Methionins bzw. des kalten Fluorethyltyrosins betrachtet, wobei davon auszugehen war, dass die kalte Aminosäure in gleichem Maße aufgenommen wurde wie die heiße, messbare Aminosäure. Sind also in 100 μ l Inkubationsmedium beispielsweise 10000cpm zu messen, in den untersuchten Zellen nur 100cpm, so wird 1% der heißen Aminosäure aufgenommen. Geht man nun davon aus, dass die kalte Aminosäure zu gleichen Teilen aufgenommen wird wie die heiße Aminosäure, so ergibt sich bei einer Ausgangskonzentration von 4,4mg/l Methionin eine Methionin-Aufnahme der Zellen von 1%, also 0,044mg/l, bei einer Ausgangskonzentration von 12,0mg/l Fluorethyltyrosin eine Fluorethyltyrosin-Aufnahme der Zellen von 0,12mg/l.

15min nach Zugabe des heiß/kalten Aminosäuregemisches wurden 1000 μ l eiskaltes PBS zugegeben, um die Aminosäureaufnahme zu stoppen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben auf Eis gelegt.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 5000U/min, 0°C für 5min. Die Überstände wurden aus den Eppendorf-Cups abgegossen und erneut 1000 μ l eiskaltes PBS zugeben. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass nach dem dritten Waschschrift annähernd keine Aktivität mehr im Überstand gemessen werden konnte.

Nach der vierten Zentrifugation wurde der Probenüberstand komplett abgenommen, wobei darauf zu achten war, dass das Zellpellet, dass sich am Grund des Eppendorf-Cups befand, vollständig im Eppendorf-Cup verblieb.

Für die ¹⁸FET-Messung konnten die Proben (Zellen in Eppendorf-Cups) sofort in Messröhrchen eingebracht und die Aktivität im γ -Counter bestimmt werden.

Bei der ³H-Met-Messung wurden den Proben nach vollständiger Abnahme des Überstandes 0,5ml 2%ige SDS-Lösung zugegeben, um die Zellen zu lysieren und einige Stunden stehen gelassen.

Die Zellen in der SDS-Lösung wurden dann aus den Eppendorf-Cups jeweils in Szintillationsröhrchen pipettiert. Die im Eppendorf-Cup verbleibenden Rückstände wurden mit 0,5ml PBS aus dem Cup gewaschen und ebenfalls in die entsprechenden Polyvials pipettiert. Nach

Zugabe von 2ml des β -Szintillationscocktail, konnte die Messung der β -Strahlung von ^3H im β -Counter erfolgen.

3.2.3.2 Aufzeigen der pH-Abhängigkeit der Traceraufnahme

Um die pH-Abhängigkeit der Met- bzw. FET-Aufnahme zu testen, wurden 6 Versuchspufferansätze von pH 6,8 bis 7,8 in 0,2-Schritten eingestellt. Für den Versuch wurden die Zellen in Versuchspuffer eines bestimmten pH-Wertes aufgenommen, zu je 100 μl in Eppendorf-Cups überführt, 2 Stunden im Brutschrank belassen und, nachdem die Proben gevortext worden waren, 100 μl Aktivität zugegeben (3,7KBq (0,1 μCi)/100 μl bei Met; 370kBq (10 μCi)/100 μl bei FET). Nach 15min Inkubation wurden 1000 μl eiskaltes PBS zugegeben, um die Traceraufnahme zu stoppen und die Proben auf Eis gestellt. Nach 3 Waschschrritten wurden die Proben nach vollständiger Abnahme des Überstandes in γ -Counter bzw. nach Auflösung der Zellen mit 2%igem SDS und Zugabe des β -Counter-Szintillationscocktails im β -Counter gemessen.

3.2.3.3 Durchführung der Hemmstoffversuche

In der Literatur werden die drei Carrier L, A und ASC als die Haupttransporter für neutrale Aminosäuren beschrieben. Spezifische Hemmstoffe für die Aminosäure-Transporter sollen in Rahmen dieser Arbeit aufzeigen über welches Transportsystem die jeweilige Aminosäure aufgenommen wird.

BCH, 2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure, ist der spezifische Hemmstoff für das L-Aminosäuretransportsystem. Es handelt sich hierbei um eine synthetische Aminosäure, die in der Zelle nicht verstoffwechselt werden kann, mit einem Molekulargewicht von 155. Der Großteil, nämlich 95% des Hemmstoffes, werden über das L-System aufgenommen, die restlichen 5% über nicht sättigbare Aufnahmewege [Shotwell et al., 1981].

MeAIB (α -Methylamino)-Isobuttersäure, der spezifische Hemmstoff für das A-Transportsystem ist ebenfalls eine Aminosäure, die von der Zelle nicht metabolisierbar ist. Sie zeichnet sich durch ihre Spezifität dem A-System gegenüber aus und hemmt die Aufnahme der, über das A-System typischerweise transportierten Aminosäuren kompetitiv. Auch MeAIB gelangt zu einem Großteil, 94% über das A-System in die Zelle, nur 6% finden ihren Weg in die Zelle über nicht sättigbare Wege.

Die natürliche Aminosäure L-Serin ist der spezifische Inhibitor des ASC-Systems. Nach Shotwell et al. (1981) wird L-Serin zu 75% über das ASC-System und zu etwa 20% über das A-System aufgenommen.

In der Literatur ist sowohl von der Verwendung einer Kombination aus MeAIB und L-Serin, als auch von der Verwendung von L-Serin bzw. Cystein alleine die Rede, um das ASC-System zu hemmen.

Aus einigen Vorversuchen, die die Aufnahme-Hemmung durch Zugabe von allen Kombinationen aus L-Serin, Cystein und MeAIB und dieser Stoffe allein vergleichen sollte, ergaben sich in der Aufnahme jedoch keine nennenswerten Unterschiede. Deshalb wurde zur Hemmung des ASC-Systems im Zuge dieser Arbeit L-Serin allein verwendet.

Nachdem die zu untersuchenden Zellen in Versuchspuffer (pH 7,35–7,45) aufgenommen und zu je 100µl in Eppendorf-Cups pipettiert worden waren, wurden 100µl einer 180mM Lösung BCH bzw. MeAIB bzw. L-Serin bzw. BCH+MeAIB+L-Serin zu den Zellen pipettiert. Der Versuchsansatz wurde zur Inkubation 2 Stunden in Brutschrank aufbewahrt. Mittels Vorversuchen wurde die Hemmstoffkonzentration mit der größten Inhibitionswirkung festgestellt.

Wie bereits beschrieben, wurden auch hier 100µl der jeweiligen Aminosäure zugegeben, wobei die Aktivität 3,7kBq (0,1µCi)/100µl für Met bzw. 370kBq (10µCi)/100µl für FET betrug. Nach 15min wurde die Traceraufnahme mit eiskaltem PBS gestoppt und die Proben auf Eis gestellt. Auch hier folgten drei Waschschrte. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurden die Proben im γ - bzw. nach SDS-Lyse der Zellen und Zugabe des β -Counter-Szintillationscocktails im β -Counter gemessen.

3.2.3.4 Michaelis-Menten-Kinetik von Met an Lymphozyten, Makrophagen und SW707-Tumorzellen

Zur Durchführung einer Met-Aufnahmekinetik wurde eine Verdünnungsreihe von kaltem Methionin angelegt (Tab. 3), versehen mit jeweils einer Aktivität von 3,7kBq (0,1µCi). Die geringe Menge an Aminosäure des radioaktiv-markierten Met wurde bei der Berechnung vernachlässigt.

Tabelle 3: Met-Verdünnungsreihe zur Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik

Zellsuspension (100µl)	Verdünnungsreihe für Met in mg/l (Aktivitätskonzentration: 3,7kBq (0,1µCi)/100µl)	Verdünnungsreihe für Met in mmol/l (Aktivitätskonzentration: 3,7kBq (0,1µCi)/100µl)
Ca. 10 ⁶ Zellen/ml	352,0	2,362
	70,4	0,472
	35,2	0,236
	17,6	0,118
	8,8	0,0599
	4,4	0,0295
	2,2	0,0148
	0,22	0,00148
	0,022	0,000148

Um die tatsächlichen Aminosäurekonzentrationen der Verdünnungsreihe zu erhalten, sind die Werte der Tabelle zu halbieren, da 100µl der aufgeführten Met-Konzentrationen zu 100µl Zellsuspension pipettiert werden.

Bei je vier Aliquots wurde 1, 5 und 10min nach Zugabe der definierten Menge an Met und ^3H -Met (3,7kBq (0,1µCi)) die Aminosäure-Aufnahme durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Die Proben wurden auf Eis gestellt, 3 Waschschrte mit eiskaltem PBS durchgeführt und der Überstand vollständig abgenommen. Nach Lyse der Zellen mit 2%igem SDS und Zugabe von 2ml β -Counter-Cocktail wurde die Aktivität im β -Counter bestimmt.

3.2.3.5 Michaelis-Menten-Kinetik von FET an Lymphozyten, Makrophagen und SW707

Zur Durchführung einer FET-Aufnahmekinetik wurde, analog zur Met-Aufnahme, eine Verdünnungsreihe von nicht-radioaktiv markiertem Fluorethyltyrosin angelegt (Tab. 4), versehen mit einer ^{18}F -FET-Aktivität von 370kBq (10µCi).

Tabelle 4: FET-Verdünnungsreihe zur Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik

Zellsuspension (100µl)	Verdünnungsreihe für FET in mg/l (Aktivitätskonzentration: 370kBq (10µCi)/100µl)	Verdünnungsreihe für FET in mmol/l (Aktivitätskonzentration: 370kBq (10µCi)/100µl)
Ca. 10^6 Zellen/ml	180,0	0,994
	90,0	0,497
	48,0	0,265
	36,0	0,199
	24,0	0,132
	12,0	0,0662
	6,0	0,0331
	2,0	0,011
	0,2	0,0011
	0,02	0,00011

Um die tatsächlichen Aminosäurekonzentrationen der Verdünnungsreihe zu erhalten, sind auch bei FET die Werte der Tabelle zu halbieren.

Die FET-Aufnahme wurde 1, 5 und 10 min (je 4 Aliquots) nach Zugabe der definierten Menge an FET und ^{18}F FET 370kBq (10µCi) durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt und die Proben auf Eis gestellt. Nach drei Waschschrten mit eiskaltem PBS und vollständiger Abnahme des Überstandes wurde die Aktivität im γ -Counter bestimmt.

3.2.3.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford dient dazu, den Proteingehalt der jeweiligen Zellart mittels Photometer zu bestimmen.

Dieses Verfahren war notwendig zur Bestimmung der Aminosäure-Aufnahme pro mg Zellprotein. Aufgrund der unterschiedlichen Zellgröße und des unterschiedlichen Proteingehaltes der untersuchten Zellen erschien es sinnvoller die AS-Aufnahme pro mg Zellprotein anzugeben und nicht pro Zellzahl, um die Zellen und ihr AS-Aufnahmeverhalten untereinander vergleichen zu können.

Zunächst mussten die Zellen, deren Proteingehalt bestimmt werden sollte, in 1M NaOH-Lösung lysiert werden. Um eine genaue Aussage über die Höhe des tatsächlichen Proteingehaltes der Proben machen zu können, wurden die Zellen, die zur Proteinbestimmung vorgesehen waren, ebenso behandelt wie die „Versuchszellen“: Dafür wurden 100µl Zellsuspension in ein Eppendorf-Cup pipettiert und 2 Stunden in Brutschrank aufbewahrt. Anstelle der Aktivität wurden 100µl Versuchspuffer und 1000µl PBS zugegeben. Es folgten dann die bereits beschriebenen drei Waschschrte, um zuletzt den Überstand komplett abzunehmen, sodass sich nur noch das Zellpellet im Eppendorf-Cup befand. Eine Stunde nach Zugabe der 200µl NaOH-Lösung und gutem Durchschütteln war davon auszugehen, dass sich die Zellpellets aufgelöst hatten. Daneben war es notwendig eine Standard-Protein-Messreihe zu erstellen (Tab. 5):

Tabelle 5: Standard-Protein-Messreihe zur Zellprotein-Bestimmung nach Bradford

[ml]	Referenz	Standard 1 (0,002mg Protein)	Standard 2 (0,004mg Protein)	Standard 3 (0,007mg Protein)	Standard 4 (0,01mg Protein)	Standard 5 (0,02mg Protein)
PBS	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
BSA-Standard (2mg/ml):PBS =1:10		0,01	0,02	0,035	0,05	0,1
H ₂ O:PBS=1:10	0,1	0,09	0,08	0,065	0,05	
Farbstoff	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Aus den Proben für die Proteinbestimmung wurden 20µl des NaOH-Zell-Gemisches entnommen und mit 0,7ml PBS, 0,08ml H₂O:PBS=1:1 und 0,2ml Farbstoff versehen.

Nach gutem Durchmischen des Standard- und Probeninhalts, erfolgte dann die Proteinbestimmung im Photometer bei $\lambda=595\text{nm}$ und einer Inkubationszeit von 5 min.

Durch die Standardgerade, die mit den, in Tab. 5 aufgeführten Standards erstellt werden konnte, konnte letztendlich der Proteingehalt der Versuchsproben bestimmt werden.

3.2.3.7 Auswertung

Zur Aufnahme wurden den zu untersuchenden Zellen eine Mischung aus einer definierten Menge der nicht-radioaktiv-markierten Aminosäure Methionin bzw. Fluorethyltyrosin und einer festgelegten Menge der radioaktiv-markierten Aminosäure angeboten, sodass im Fall von FET eine Aktivitätskonzentration von 370kBq (10 μ Ci)/100 μ l, im Fall von Met eine Aktivitätskonzentration von 3,7kBq (0,1 μ Ci)/100 μ l erreicht wurde.

Neben der Messung der aufgenommenen Aktivität in den Zellen im β - bzw. γ -Counter, wurden zur Errechnung des prozentualen Anteils der Aktivität bzw. der kalten Aminosäure Probenstandards mitgemessen, die genau 100 μ l des Inkubationsmediums enthielten, also 100% der Aktivität entsprachen.

Ausschlaggebend für die Berechnung der AS-Aufnahme war die Menge der nicht-radioaktiv-markierten Aminosäure, während die geringe Menge an radioaktiv-markierter Aminosäure vernachlässigt wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass heiße und kalte Aminosäure prozentual zu gleichen Teilen aufgenommen wurden (Rechenbeispiel s. 3.2.3.1).

Bei dem Vergleich der Met- bzw. FET-Aufnahme in Tumorzellen, stimulierten und unstimulierten Entzündungszellen, der pH-Abhängigkeit der Traceraufnahme und bei der Durchführung der Hemmstoffversuche wurde von den, im Counter gemessenen „counts per minute“ der Nullwert subtrahiert und das Ergebnis durch den Proteingehalt der Zellen bzw. durch die Zellzahl geteilt.

Wie bereits erwähnt wurde ein 100%-Wert, der den zugegebenen 100 μ l Aktivität/Aminosäure-Gemisch entsprach, gemessen und durch ihn der prozentuale Aktivitätsanteil und folglich der von den Zellen aufgenommene Aminosäureanteil ermittelt.

Bei den Aufnahmekinetiken wurde die Traceraufnahme nach 1, 5 und 10 Minuten bestimmt. Da sich gezeigt hatte, dass sich die Traceraufnahme nach 5 Minuten nicht wesentlich unterschied von der Traceraufnahme nach 10 Minuten, wurde der 1-Minuten-CPM-Wert vom 5-Minuten-CPM-Wert subtrahiert, und das Ergebnis durch vier geteilt, um die Traceraufnahme pro Minute zu erhalten. Vom bislang errechneten Wert wurde auch hier der Nullwert abgezogen, das Ergebnis durch den Proteingehalt der Zellen geteilt und über den „100%-Aktivitätswert“ die prozentuale, von den Zellen aufgenommene Aminosäureaufnahme bestimmt. Aus den errechneten Werten ließ sich eine Michaelis-Menten-Kinetik erstellen. Auf der Abszisse wurde die ansteigende Aminosäure-Konzentration in mmol/l angegeben, auf der Ordinate die Aufnahmegeschwindigkeit in nmol Aminosäure*min⁻¹*mg Zellprotein⁻¹. Durch die Annahme, dass die verwendeten Aminosäuren über Transportsysteme in die Zellen gelangen und diese Transporter einer Sättigung unterliegen, war ein einer Hyperbel ähnlicher Graph zu

erwarten. Ab einer gewissen Aminosäurekonzentration, die von Zellart zu Zellart variierte, stellte sich ein Plateau, d. h. ein Maximum, also eine Sättigung der beteiligten Transportsysteme ein. Aus der Kurve wurde graphisch V_{\max} ermittelt, die Maximalgeschwindigkeit der Aminosäureaufnahme, bei der alle Transportmoleküle der Zellmembran besetzt sind. Die Konzentration, bei der die Aufnahmegeschwindigkeit den halben Wert der von V_{\max} erreicht ($V_{\max}/2$), wird als Michaelis-Konstante bezeichnet und in den jeweiligen Abbildungen graphisch bestimmt. K_M , angegeben in mmol/l, gibt die Aminosäurekonzentration an, bei der die Hälfte der Aminosäure-Transporter besetzt ist, des weiteren stellt sie ein Maß für die Affinität eines Transporters zur Aminosäure dar. Je größer K_M , desto geringer ist die Affinität, je kleiner K_M , desto größer ist die Affinität zwischen Aminosäure und Transporter.

4 Ergebnisse

An einem Lymphadenitis- und Tumormodell an der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass sich Met im Gegensatz zu FET nicht eignet, tumoröse von entzündlichen Läsionen zu unterscheiden [Rau et al., 2001]. Im Zuge dieser Arbeit sollte weiterführend die in-vitro-Aufnahme von Methionin und FET in humane SW707-Tumorzellen, Lymphozyten und Makrophagen untersucht werden.

4.1 Untersuchungen zum Met-Transport

4.1.1 Charakterisierung des Met-Transportes

4.1.1.1 Vergleich der Met-Aufnahme bei Tumorzellen, stimulierten und unstimulierten Entzündungszellen

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 3.2.3.1 bereits beschrieben. Nach Überführung der Zellen in aminosäurefreies Versuchsmedium und Inkubation im Brutschrank wurden zu 100µl Zellsuspension 100µl Methionin mit der physiologischen, humanen Serumkonzentration von 4,4mg/l und einer ^3H -Aktivitätskonzentration von 0,1µCi/100µl zugeben. Nach einer Inkubation von 15min erfolgten die bereits beschriebenen drei Waschschrte und die vollständige Abnahme des Überstandes. Zuletzt wurde nach SDS-Zellyse und Zugabe des Szintillationscocktails die Methionin-Aufnahme im β -Counter bestimmt. Ein Probenstandard, der 100% der zugegebenen Aktivität entsprach, wurde mitgemessen.

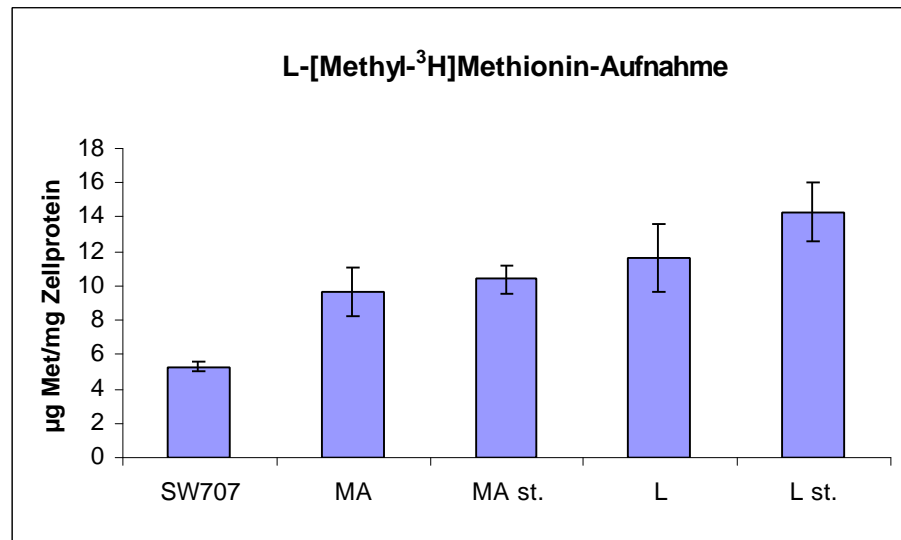


Abbildung 9: Met-Aufnahme (in µg/mg Zellprotein) unstimulierter, stimulierter Lymphozyten, Makrophagen und SW707-Tumorzellen (MW±SD; n=5)

Tabelle 6: Met-Aufnahme in Tumor- und Entzündungszellen

Mittelwerte aus 5 Aufnahmeversuchen (je 5 Aliquots)		µg Met/mg Zellprotein (MW±SD)
	Lymphozyten	11,6 ± 2,0
	Stimulierte Lymphozyten	14,3 ± 1,7
	Makrophagen	9,6 ± 1,5
	Stimulierte Makrophagen	10,4 ± 0,8
	SW707	5,2 ± 0,3

Die höchste Aufnahme zeigten mit 14,3µg Met/mg Zellprotein die Lymphozyten, die ca. 24 Stunden mit 0,25mg/ml ConA stimuliert worden waren, gefolgt von den nicht-stimulierten Lymphozyten mit 11,6 µg Met/mg Zellprotein. Die Stimulation der Lymphozyten führte somit zu einer Steigerung der AS-Aufnahme um 13,1%. Die Makrophagen, die 48 Stunden mit LPS stimuliert (100ng/ml) worden waren, nahmen 10,4µg Met/mg Zellprotein auf, nicht-stimulierte Makrophagen 9,67µg Met/mg Zellprotein. Die geringste Aufnahme zeigten die SW707-Tumorzellen mit 5,28µg Met/mg Zellprotein (Abb. 9; Tab.6). Stimulierte und unstimulierte Entzündungszellen nahmen also die ca. 2-3fach höhere Menge an Methionin auf als die untersuchte Tumorzelllinie.

4.1.1.2 Met-Aufnahme in Abhängigkeit steigender Methionin-Konzentrationen (Michaelis-Menten-Kinetik)

Um die Met-Aufnahme in die untersuchten Zellen weitergehend zu charakterisieren, sollten Erkenntnisse über die Affinität des Methioninis zu bestimmten Transportern oder darüber, ob Methionin über definierte

Transportsysteme und nicht nur unspezifisch in das Zellinnere aufgenommen wird, gewonnen werden.

Deshalb wurden den Zellen, nach Überführung in Versuchsmedium und Inkubation im Brutschrank, steigende Konzentrationen (Tab. 3) nicht-radioaktiv markierten Methionins zugegeben, die jeweils mit einer fixen ^3H -Methionin-Aktivitätskonzentration von $3,7\text{kBq}$ ($0,1\mu\text{Ci}$)/ $100\mu\text{l}$ versehen waren. Die Aktivitätskonzentration blieb somit immer gleich, es änderte sich lediglich die Menge des Methionins. Die vernachlässigbar geringe Aminosäurekonzentration des radioaktiv-markierten Methionins wurde bei Berechnung nicht berücksichtigt.

Die Geschwindigkeit (V_{max}), bei der die Sättigung der Aufnahme durch die AS-Transporter erreicht ist, wurde graphisch ermittelt. $V_{\text{max}}/2$ wurde ebenfalls graphisch festgelegt. Die Aminosäurekonzentration, die bei $V_{\text{max}}/2$ vorliegt, entspricht K_M . Aus den Abbildungen 10 bis 12 wurden die, in Tabelle 7 angegebenen Daten graphisch ermittelt.

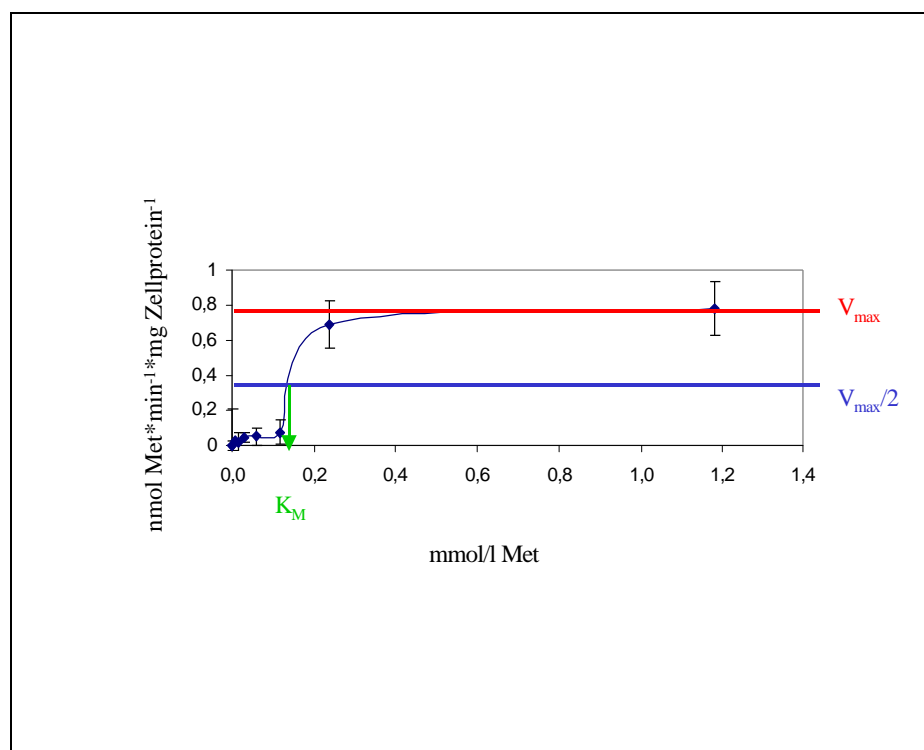


Abbildung 10: Michaelis-Menten-Kinetik von Met bei Lymphozyten

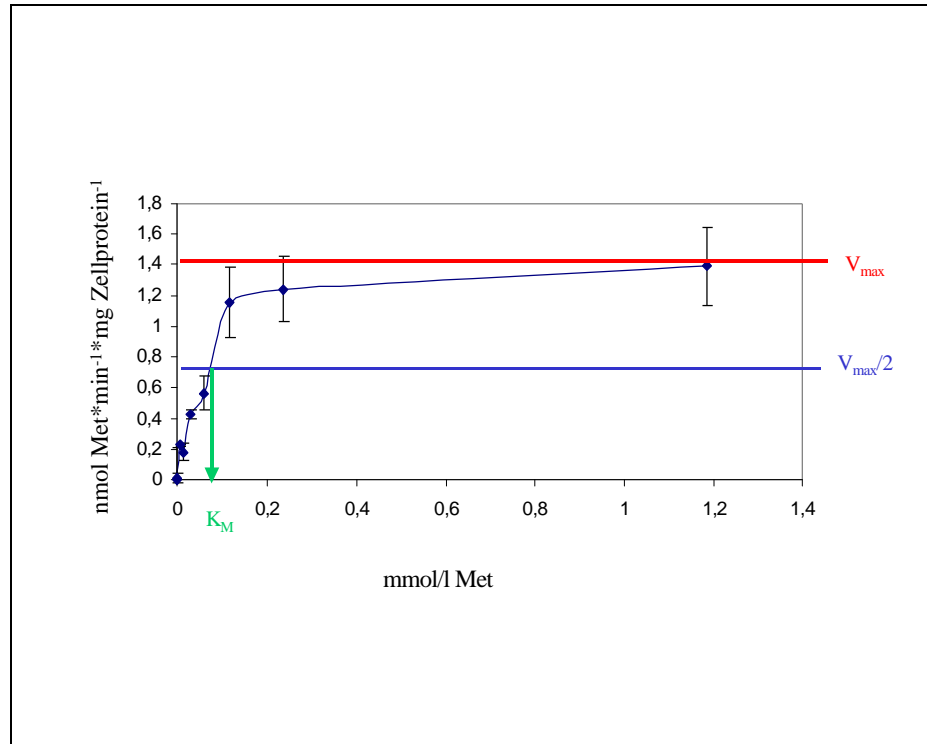


Abbildung 11: Michaelis-Menten-Kinetik von Met bei SW707

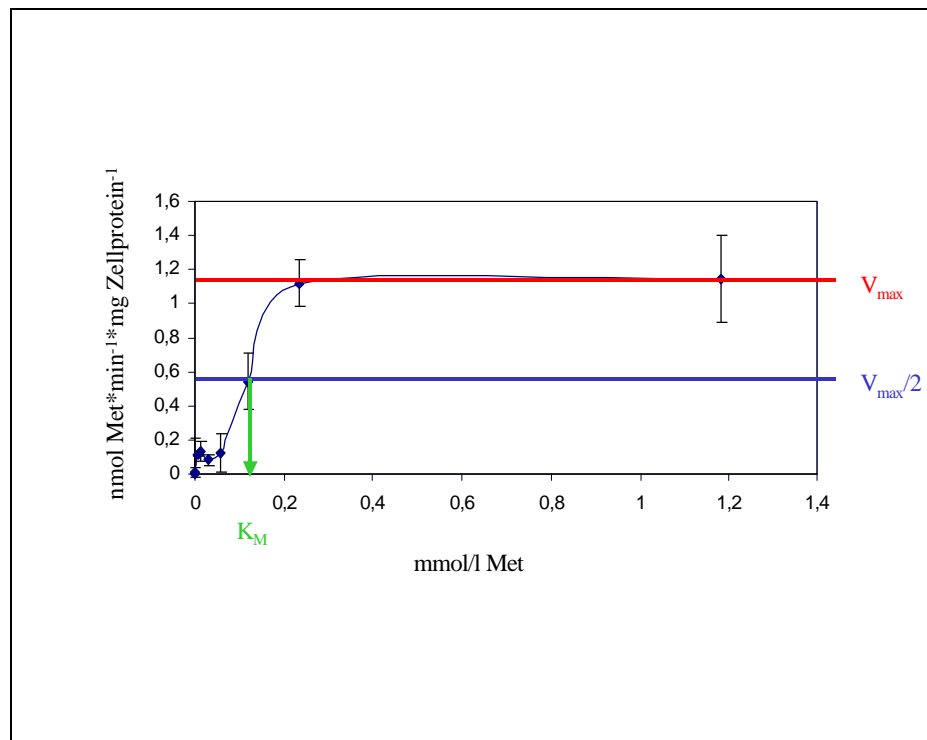


Abbildung 12: Michaelis-Menten-Kinetik von Met bei Makrophagen

Tabelle 7: V_{max} , $V_{max}/2$ und K_M der Met-Michaelis-Menten-Kinetik für die untersuchten Zellen

	V_{max} in nmol/min/mg Zellprotein	$V_{max}/2$ in nmol/min/mg Zellprotein	K_M in mmol/l
Lymphozyten	0,78	0,39	0,13
Makrophagen	1,17	0,59	0,11
SW707	1,41	0,71	0,06

Die SW707-Tumorzellen zeigten unter den untersuchten Zellen die höchste Aufnahmegeschwindigkeit, ein V_{max} von 1,41 nmol Met/min/mg Zellprotein. Die Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} der Makrophagen betrug 1,17 nmol Met/min/mg Zellprotein, die der Lymphozyten 0,775.

Die höchste Affinität zwischen Methionin und den entsprechenden Transportern, also die niedrigste Michaelis-Menten-Konstante zeigten die SW707-Tumorzellen mit $K_M = 0,063$ mmol/l.

Lymphozyten und Makrophagen zeigten ähnlich niedrige Affinitäten von 0,125 bzw. 0,113 mmol/l.

4.1.1.3 pH-Abhängigkeit der Met-Aufnahme

Die Versuche zur pH-Abhängigkeit der Met-Aufnahme der untersuchten Zellen zeigte, dass bei den Entzündungszellen, d. h. sowohl bei den Lymphozyten als auch bei den Makrophagen, das Met-Aufnahmemaximum bei pH 7,2, während das Traceraufnahmemaximum von SW707 bei 7,4 lag (Abb. 13/14).

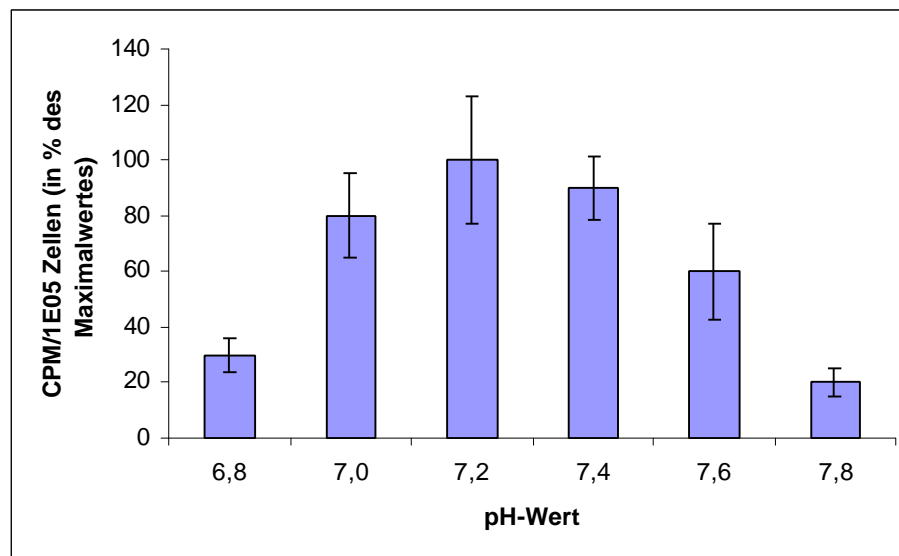


Abbildung 13: pH-Abhängigkeit der Met-Aufnahme bei Makrophagen und Lymphozyten

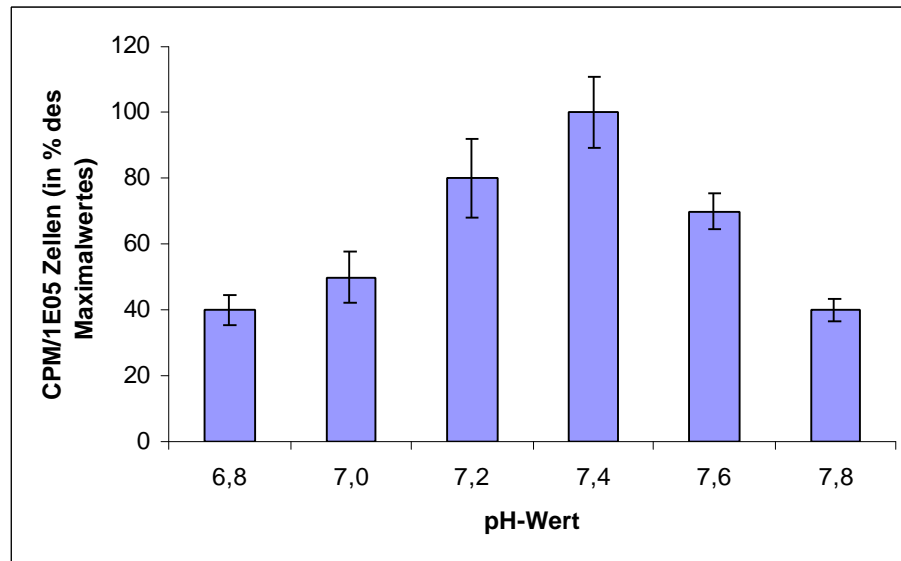


Abbildung 14: pH-Abhängigkeit der Met-Aufnahme bei SW707

4.1.2 Charakterisierung der Transportwege von Met

4.1.2.1 Wirkung spezifischer Transportinhibitoren auf die Met-Aufnahme

Die Met-Aufnahme-Wege in SW707-Tumorzellen, Lymphozyten und Makrophagen sollten näher charakterisiert werden. Die drei bekanntesten Transportsysteme der Aminosäuren sind das L-, das A- und das ASC-System.

Das L-System unterscheidet sich vom A- und ASC-System durch seine Natriumunabhängigkeit und durch die, von ihm transportierten Aminosäuren. Das L-System transportiert in erster Linie verzweigt-kettige und aromatische Aminosäuren. Da Methionin zu den schwefelhaltigen, verzweigt-kettigen Aminosäuren zählt, ist eine Aufnahme dieser Aminosäure durch das A- und auch das L-System wahrscheinlich.

Für die erwähnten Transportwege sind bereits spezifische Hemmstoffe bekannt: Für das L-System der Hemmstoff BCH (2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure), für das System A der Hemmstoff MeAIB und das ASC-System der Hemmstoff L-Serin.

Durch die Verwendung der verschiedenen, spezifischen Transportsystem-Hemmstoffe sollte untersucht werden, über welche Wege Met vornehmlich in die Zellen aufgenommen wird.

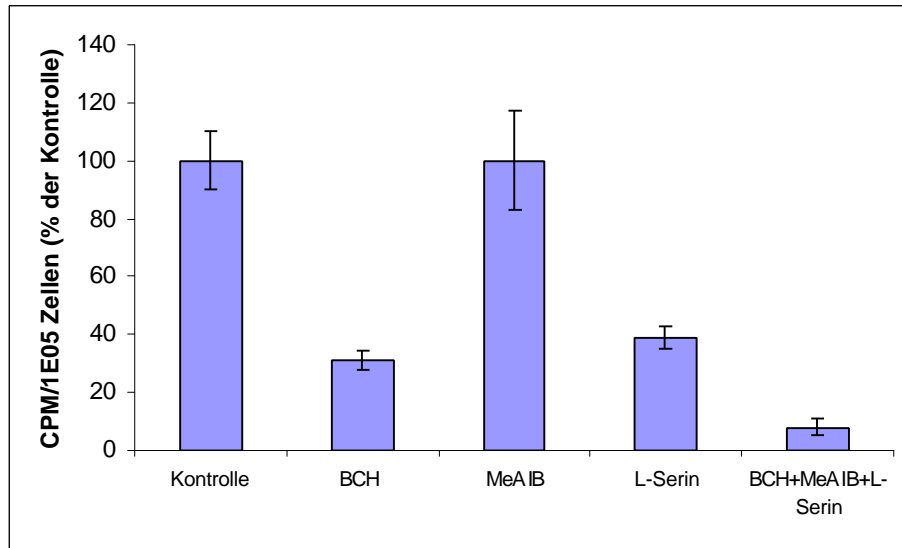


Abbildung 15: Hemmung der Met-Aufnahme in SW707-Tumorzellen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (% der Kontrolle); $WM \pm SD$; n=5

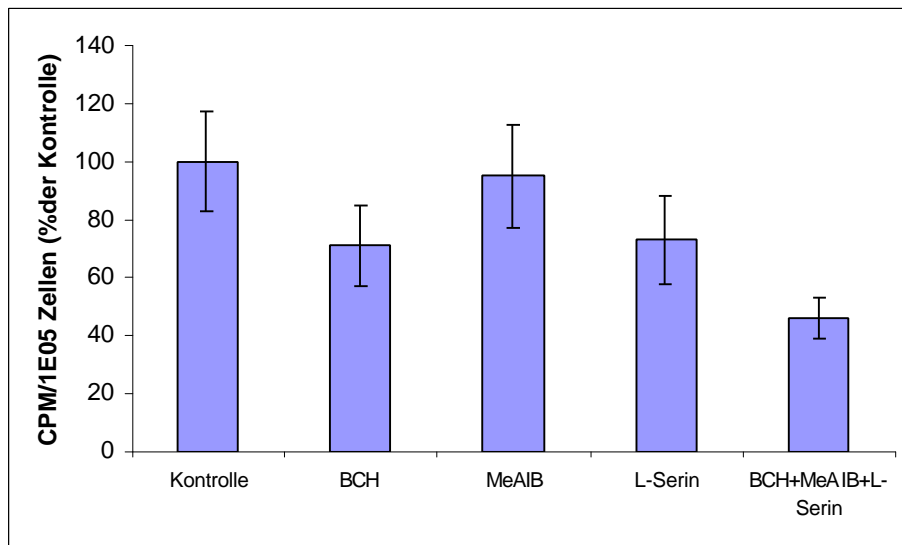


Abbildung 16: Hemmung der Met-Aufnahme in Lymphozyten durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (% der Kontrolle); $WM \pm SD$; n=5

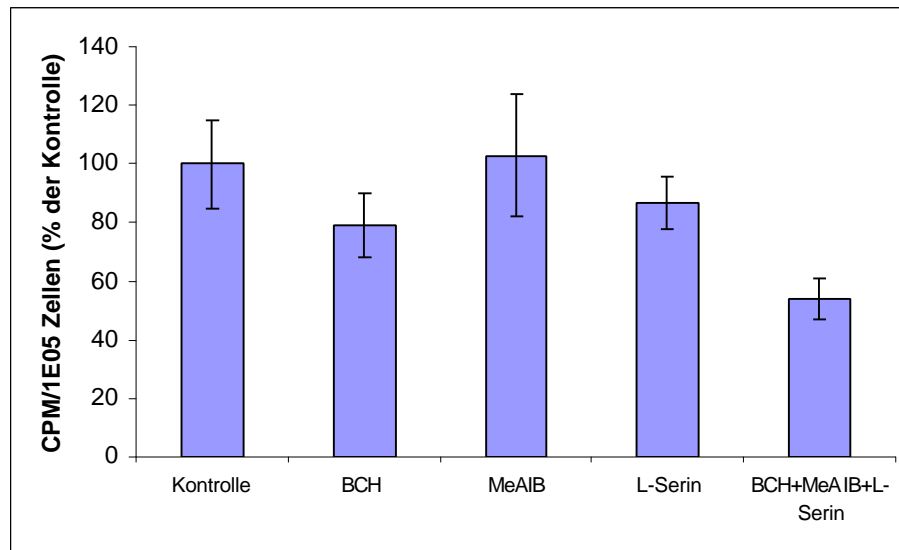


Abbildung 17: Hemmung der Met-Aufnahme in Makrophagen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (% der Kontrolle); $WM \pm SD$; $n=5$

Tabelle 7: Hemmwirkung der spezifischen Aminosäuretransporter-Inhibitoren auf die Methioninaufnahme der untersuchten Zellen ($MW \pm SD$)

Inhibitoren	Met - Aufnahme in % der Kontrolle ($MW \pm SD$)		
	SW707	Lymphozyten	Makrophagen
Kontrolle	100 \pm 10,0	100 \pm 17,1	100 \pm 15,0
BCH	31 \pm 3,1	71 \pm 14,0	79 \pm 11,0
MeAIB	100 \pm 17	95 \pm 18,1	103 \pm 21,2
L-Serin	39 \pm 4,1	73 \pm 15,0	87 \pm 9,0
BCH+MeAIB+L-Serin	8 \pm 3,0	46 \pm 7,0	54 \pm 6,9

Bei 5 Versuchen mit je 4 Aliquots erwies sich BCH bei den untersuchten Tumor- und Entzündungszellen als der effektivste Hemmstoff der Met-Aufnahme. Jedoch konnte bei SW707 eine Hemmung der Aufnahme durch BCH von ca. 70% erreicht werden, während die Entzündungszellen nur zu ca. 20 bis 30% in ihrer Aufnahme gehemmt werden konnten (Tab. 7).

MeAIB zeigte bei SW707-Tumorzellen und Makrophagen gar keine hemmende Wirkung, bei Lymphozyten eine nur geringe Hemmwirkung von 5%. L-Serin hemmte die Met-Aufnahme in SW707 bis zu 60%, in den Lymphozyten und Makrophagen nur zu ca. 25%.

Die Met-Aufnahme der SW707-Tumorzellen konnte unter Verwendung aller drei spezifischer AS-Transport-Inhibitoren zu ca. 90% gehemmt werden, während die Met-Aufnahme in die Lymphozyten und Makrophagen nur zu ca. 50% hemmbar war (Tab. 7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Großteil (ca. 70%) des Methioninangebots von den SW707-Tumorzellen über das L-System

aufgenommen wurde, nur ca. 60% über das ASC-System (Abb. 15). Unter Verwendung aller Inhibitorstoffe konnte die Met-Aufnahme in SW707 um mehr als 90% gehemmt werden (Abb. 15). Die Met-Aufnahme von Lymphozyten und Makrophagen dagegen konnte durch BCH nur zu 20–30%, durch L-Serin nur zu 10–20% gehemmt werden (Abb. 16/17). Hervorzuheben ist, dass die untersuchten Entzündungszellen unter Verwendung aller Transportinhibitoren nur zu ca. 50% hemmbar waren, was auf eine hohe AS-Aufnahme über unspezifische Transportwege deutet (Tab. 7).

4.2 Untersuchungen zum FET-Transport

4.2.1 Charakterisierung des FET-Transportes

4.2.1.1 Vergleich der FET-Aufnahme bei unstimulierten, stimulierten Entzündungszellen und Tumorzellen

Um die FET-Aufnahme in unstimulierten, stimulierten Lymphozyten und Makrophagen und in SW707-Tumorzellen vergleichen zu können, wurden die Aufnahmeversuche aller zu untersuchenden Zellen unter gleichen Bedingungen durchgeführt (s. 3.2.3.1)

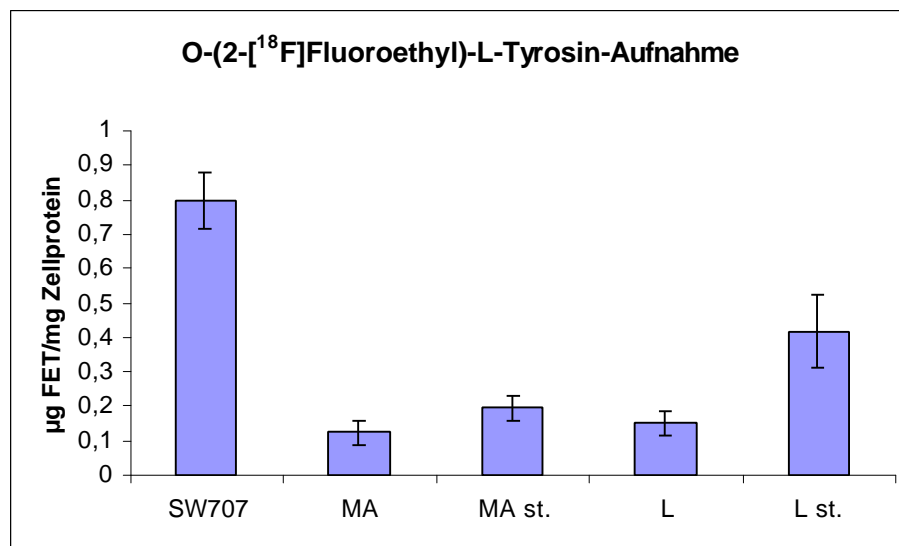


Abbildung 18: O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-Tyrosin-(FET)-Aufnahme in µg FET/mg Zellprotein unstimulierter und stimulierter Lymphozyten, Makrophagen und SW707-Tumorzellen (MW±SD, n=5)

Tabelle 8: FET-Aufnahme in Tumor- und Entzündungszellen

Mittelwerte aus 5 Aufnahmeversuchen (je 5 Aliquots)		$\mu\text{g FET/mg Zellprotein (MW}\pm\text{SD)}$
	Lymphozyten	$0,15 \pm 0,03$
	Stimulierte Lymphozyten	$0,42 \pm 0,10$
	Makrophagen	$0,12 \pm 0,04$
	Stimulierte Makrophagen	$0,20 \pm 0,04$
	SW707	$0,80 \pm 0,08$

Die Tumorzelllinie SW707 zeigte mit $0,80\mu\text{g FET/mg Zellprotein}$ die höchste FET-Aufnahme. An zweiter Stelle, mit einer Aufnahme von $0,42\mu\text{g FET/mg Zellprotein}$ standen die Lymphozyten, die ca. 24 Stunden mit $0,25\text{mg/l Concanavalin A}$ stiumliert worden waren. Die Makrophagen, die ca. 48 Stunden mit $100\text{ ng/ml Lipopolysaccharid}$ stimuliert worden waren, nahmen $0,20\mu\text{g FET/mg Zellprotein}$ auf, die unstimulierten Lymphozyten $0,15\mu\text{g FET/mg Zellprotein}$ und die unstimulierten Makrophagen $0,12\mu\text{g FET/mg Zellprotein}$ (Die Stimulation der Lymphozyten bewirkte eine Mehraufnahme von FET um das 2,8fache, die Stimulation der Makrophagen um das 1,7fache) (Abb. 18, Tab. 8).

Somit nimmt die Tumorzelllinie SW707 deutlich mehr FET auf, als unstimulierte und sogar stimulierte Lymphozyten und Makrophagen.

4.2.1.2 FET-Aufnahme in Abhängigkeit steigender Fluorethyltyrosin-Konzentrationen (Michaelis-Menten-Kinetik)

Zur Feststellung einer Sättigung von Transportwegen der FET-Aufnahme und somit zu ihrer näheren Charakterisierung wurde nach Zugabe ansteigender Fluorethyltyrosin-Konzentrationen (Tab. 4) mit einer Aktivitätskonzentration von $370\text{kBq (}10\mu\text{Ci)}/100\mu\text{l}$ die Aminosäureaufnahme der Zellen nach 1 und nach 5 Minuten gemessen. Durch zusätzliche Messung eines Standards, der 100% der Aktivität widerspiegelte, konnte die absolute Menge des aufgenommenen FET bestimmt werden, und durch Subtraktion des 1-Minuten-Wertes vom 5-Minuten-Wertes und Division durch 4 die FET-Aufnahmegeschwindigkeit in $\text{nmol FET}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Zellprotein}^{-1}$ errechnet werden. V_{max} , $V_{\text{max}}/2$ und K_{M} wurden auch an dieser Stelle graphisch ermittelt.

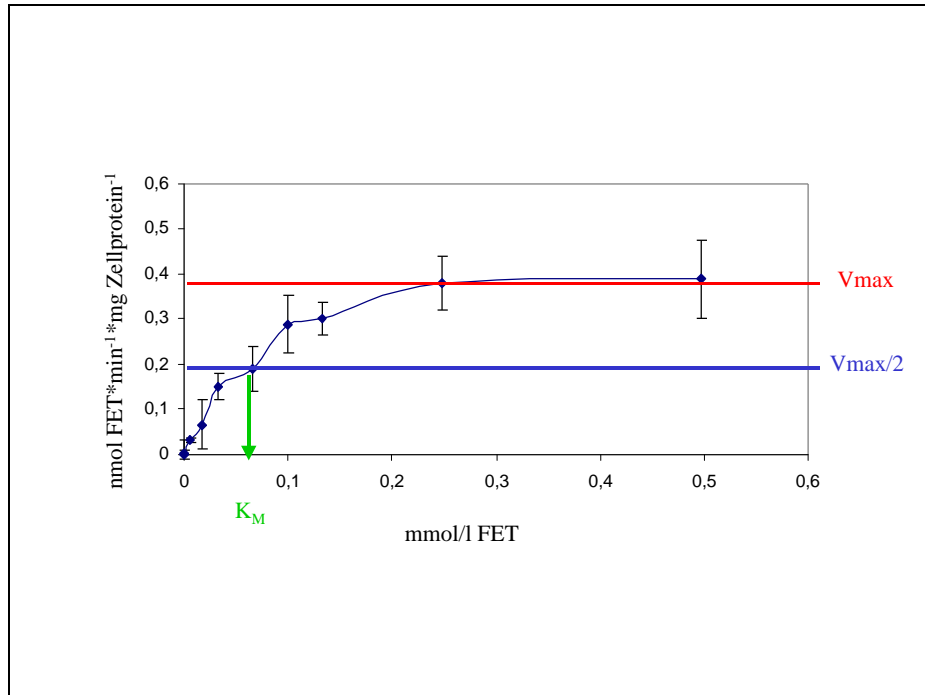


Abbildung 19: Michaelis-Menten-Kinetik von FET bei Lymphozyten

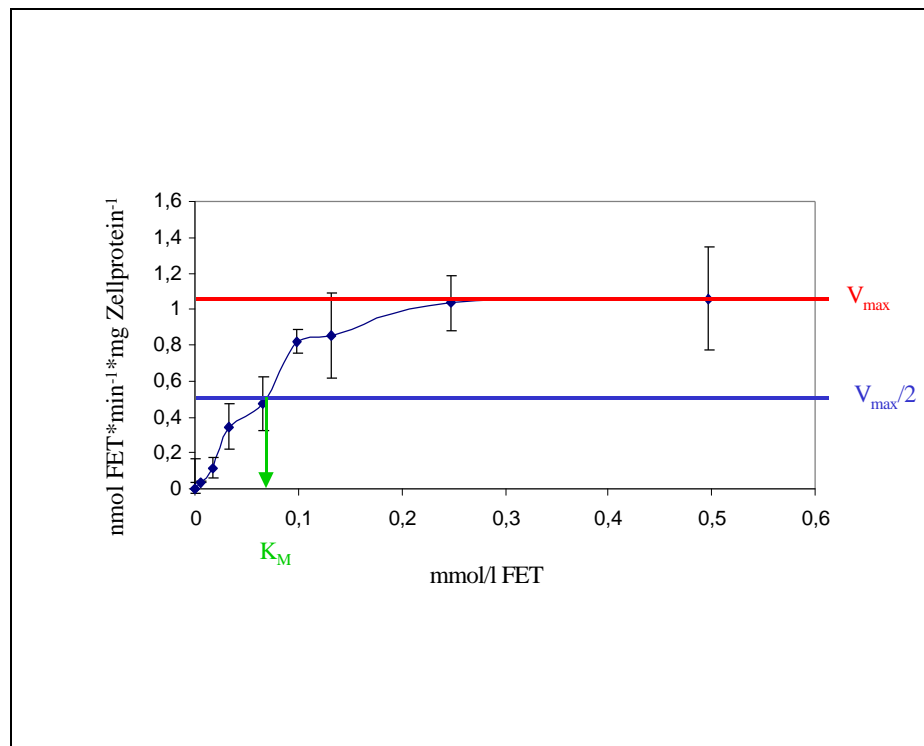


Abbildung 20: Michaelis-Menten-Kinetik von FET bei SW707

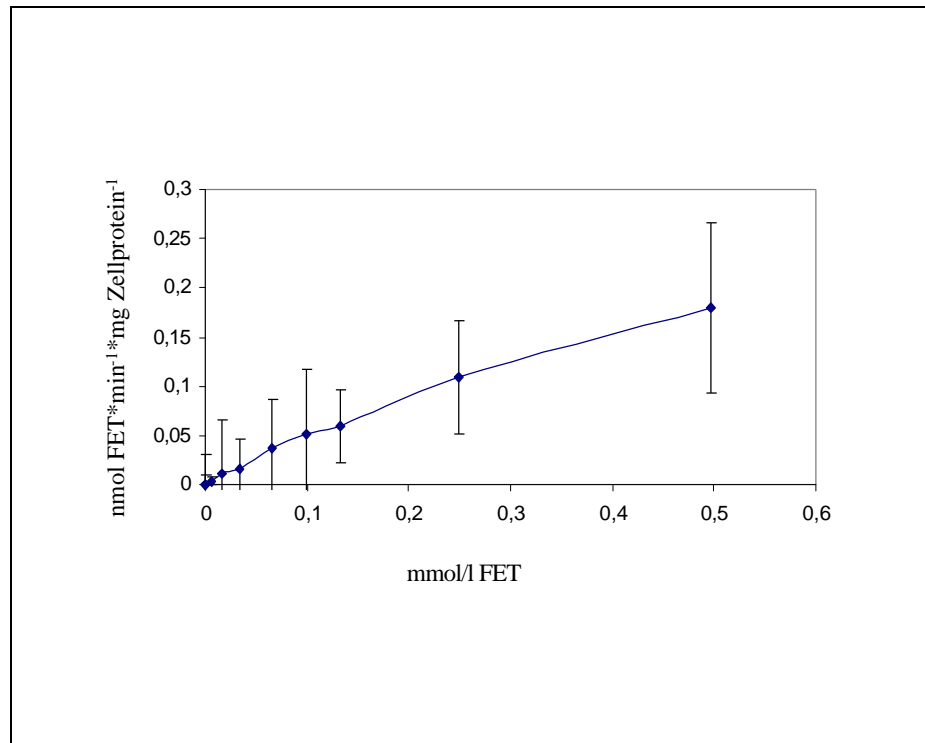


Abbildung 21: Michaelis-Menten-Kinetik von FET bei Makrophagen

Tabelle 9: V_{\max} , $V_{\max}/2$ und K_M der FET-Michaelis-Menten-Kinetik für die untersuchten Zellen

	V_{\max} in nmol/min/mg Zellprotein	$V_{\max}/2$ in nmol/min/mg Zellprotein	K_M in mmol/l
Lymphozyten	0,3875	0,19375	0,068
Makrophagen	-----	-----	-----
SW707	1,08	0,54	0,07

Obwohl die Michaelis-Konstante der Lymphozyten kleiner war als die der SW707-Tumorzellen, d. h. die Affinität der Transportsysteme der Lymphozyten zum Substrat FET höher als die der Tumorzellen, erreichten die Tumorzellen eine deutlich höhere Maximalgeschwindigkeit als die Lymphozyten.

Für Makrophagen war im untersuchten FET-Konzentrationsbereich im Gegensatz zu den anderen beiden Zellarten keine Sättigung erreichbar und somit weder die Bestimmung von V_{\max} noch von K_M möglich.

4.2.1.3 pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme

Um die pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme an den untersuchten Zellen aufzuzeigen, wurde der pH-Wert des Versuchsmediums bei 6,8–7,0–7,2–7,4–7,6 und 7,8 eingestellt und mit den Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, verfahren (s. 3.2.3.2).

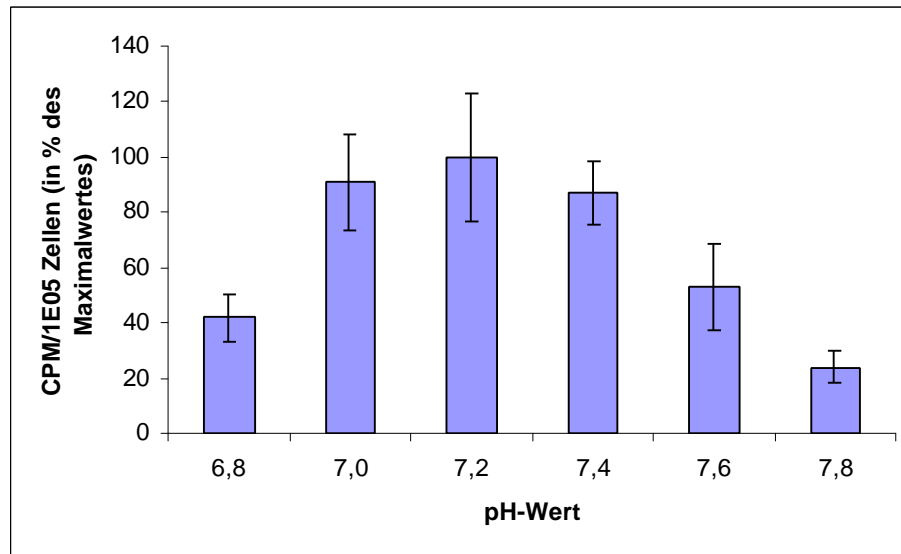


Abbildung 22: pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme bei Makrophagen und Lymphozyten (in % des Maximalwertes)

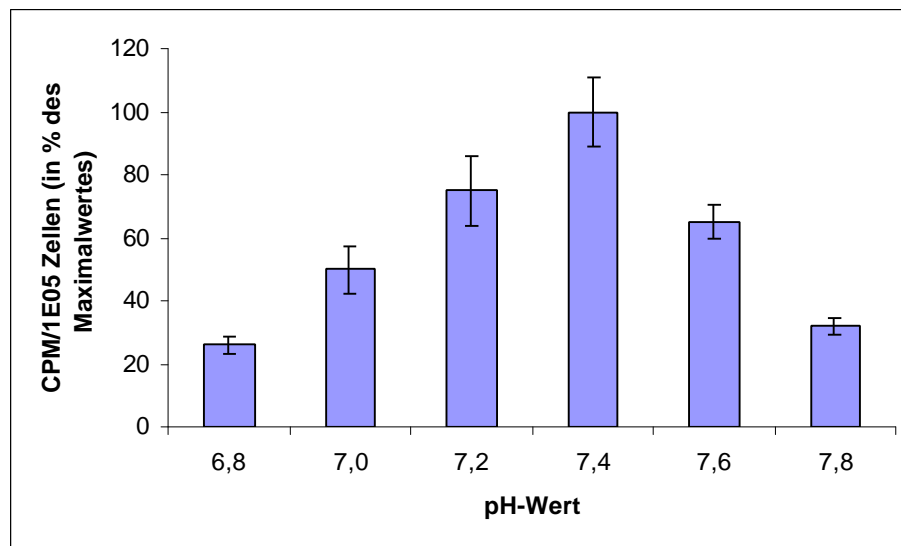


Abbildung 23: pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme bei SW707 (in % des Maximalwertes)

Die Ergebnisse zur pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme der untersuchten Zellen glich dem der Met-Aufnahme. So zeichnete sich das FET-Aufnahmemaximum von Lymphozyten und Makrophagen bei pH 7,2 ab, während das Aufnahmemaximum von SW707 bei 7,4 lag.

4.2.2 Charakterisierung der Transportwege von FET

4.2.2.1 Wirkung spezifischer Transportinhibitoren auf die FET-Aufnahme

Um herauszufinden, ob FET als aromatische Aminosäure über die AS-Transportsysteme L, A und ASC aufgenommen wird, wurden spezifische Hemmstoffe der Transportsysteme herangezogen: BCH für das L-System, MeAIB für das A-System und L-Serin für das ASC-System.

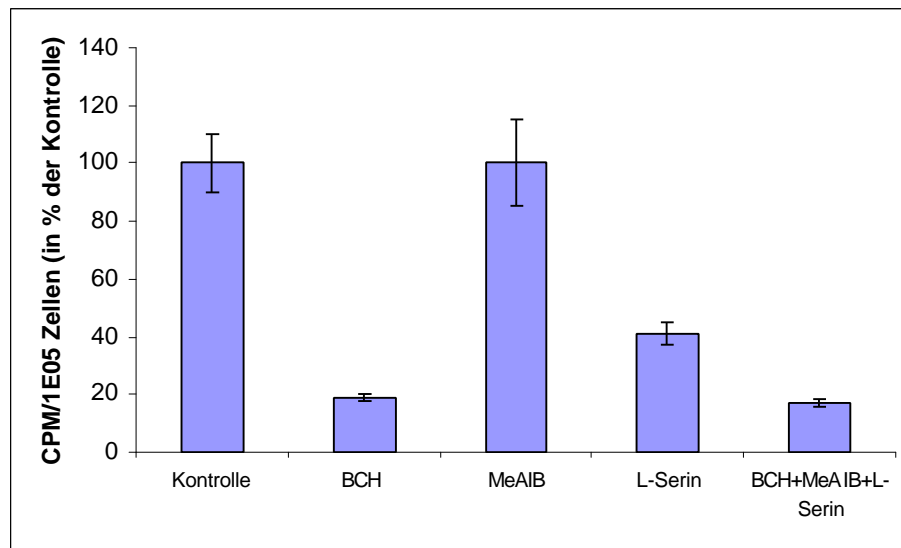


Abbildung 24: Hemmung der FET-Aufnahme in SW707-Tumorzellen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (in % der Kontrolle); MW \pm SD, n=5

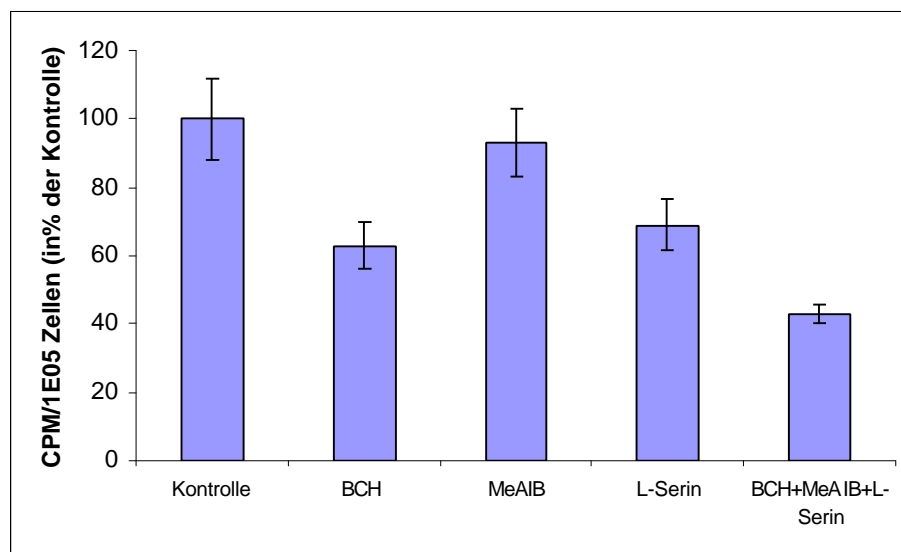


Abbildung 25: Hemmung der FET-Aufnahme in Lymphozyten durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (in % der Kontrolle); MW \pm SD, n=5

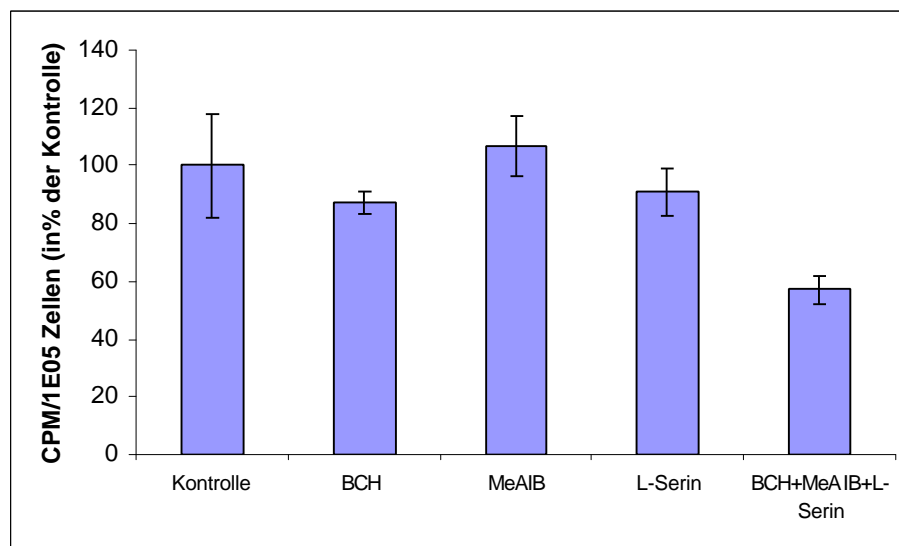


Abbildung 26: Hemmung der FET-Aufnahme in Makrophagen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (in % der Kontrolle); MW±SD, n=5

Tabelle 10: Hemmwirkung der spezifischen Aminosäuretransporter-Inhibitoren auf die FET-Aufnahme der untersuchten Zellen

Inhibitoren	FET - Aufnahme in % der Kontrolle (MW±SD)		
	SW707	Lymphozyten	Makrophagen
Kontrolle	100 ± 10	100 ± 12	100 ± 18
BCH	19 ± 1,5	63 ± 6,9	87 ± 3,9
MeAIB	100 ± 15	93 ± 10	107 ± 10,5
L-Serin	41 ± 4,0	69 ± 7,3	91 ± 8,2
BCH+MeAIB+L-Serin	17 ± 1,3	43 ± 2,9	57 ± 5,1

Sowohl bei SW707-Tumorzellen, als auch bei den untersuchten Entzündungszellen erwies sich BCH als der effektivste Hemmstoff der FET-Aufnahme. Jedoch konnte bei SW707 eine Hemmung der Traceraufnahme durch BCH von ca. 80% erreicht werden, während Lymphozyten und Makrophagen nur zu ca. 20 bis 40% in ihrer Aufnahme gehemmt werden konnten.

MeAIB zeigte bei SW707-Tumorzellen und Makrophagen keine hemmende Wirkung und nur einen sehr geringen inhibitorischen Effekt auf Lymphozyten. L-Serin hemmte die FET-Aufnahme in Tumorzellen bis zu 60%, in den Entzündungszellen nur bis ca. 30%. Bei der Verwendung aller drei spezifischer AS-Transport-Inhibitoren zeichnete sich bei den SW707-Tumorzellen eine Hemmung von ca. 80% ab, während die FET-Aufnahme der Lymphozyten und Makrophagen nur zu ca. 55% hemmbar war.

FET wurde sowohl von den SW707-Tumorzellen, als auch von den Makrophagen und Lymphozyten hauptsächlich über das L-System in die Zellen aufgenommen. Zu erwähnen ist der FET-Anteil, der über das ASC-System in die Zellen aufgenommen wurde und der Anteil an

unspezifischer Aufnahme, der bei den Lymphozyten und Makrophagen sehr ausgeprägt ist.

4.3 Vergleich der absoluten FET- und Met-Aufnahme

Betrachtet man die FET- bzw. Met-Aufnahme der untersuchten SW707-Tumorzellen, der Lymphozyten und Makrophagen, so fehlt noch die Gegenüberstellung der absoluten Aufnahme der beiden Aminosäuren durch die Zellen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sowohl die SW707-Tumorzellen als auch die unstimulierten und stimulierten Makrophagen und Lymphozyten deutlich mehr Met aufnehmen als FET.

Tabelle 11: Absolute FET- bzw. Met-Aufnahme der untersuchten Tumor- und Entzündungszellen

	FET in mg/mg Zellprotein	Met in mg/mg Zellprotein	Met-Aufnahme/FET-Aufnahme
SW707	0,000798	0,005280	6,6
Makrophagen	0,000124	0,009670	77,9
Makrophagen stimuliert	0,000195	0,010400	53,3
Lymphozyten	0,000152	0,011600	76,3
Lymphozyten stimuliert	0,000418	0,014300	34,2

In Zahlen bedeutet es, dass SW707-Zellen 6,6mal mehr Met als FET, Makrophagen 77,9mal mehr, stimulierte Makrophagen 53,3mal mehr, Lymphozyten um den Faktor 76,3 und stimulierte Lymphozyten um den Faktor 34,2 mehr Met als FET aufnehmen.

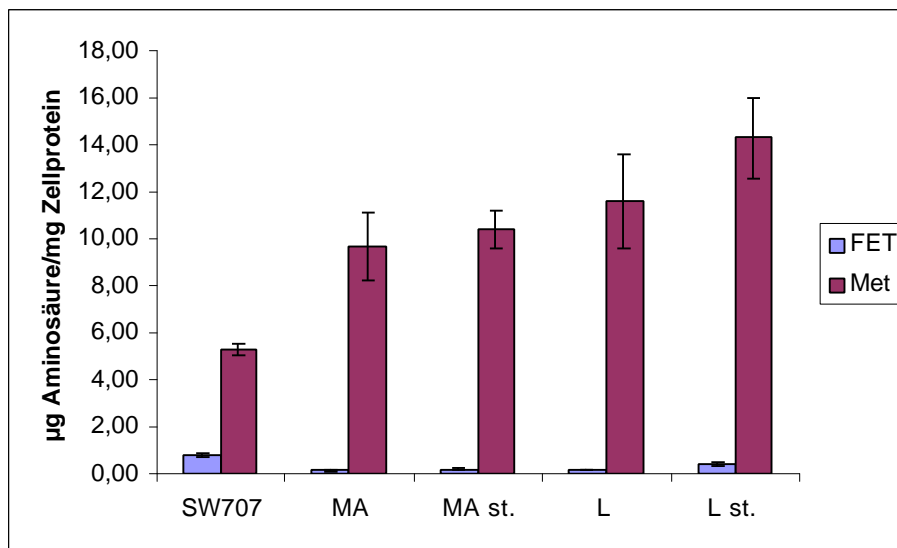


Abbildung 27: Absolute FET- bzw. Met-Aufnahme der untersuchten Zellen in µg Aminosäure/mg Zellprotein (n=5)

Zusammenfassend sei an dieser Stelle betont, dass die Lymphozyten und Makrophagen mehr Met aufgenommen haben, als die SW707-Tumorzellen. FET hingegen wurde von den untersuchten Tumorzellen in wesentlich größerem Maße aufgenommen, als von unstimulierten und stimulierten Lymphozyten und Makrophagen.

5 Diskussion

Verglichen zum Normalgewebe sind der Aminosäurestoffwechsel und die Proteinsynthese ebenso wie der Glukosestoffwechsel im Tumorgewebe erhöht. Aus diesem Grund werden bis heute neben Glukose auch verschiedene Aminosäuren zum Tumorstaging und zum Therapiemonitoring mittels PET verwendet. Methionin (Met) ist die bislang am häufigsten eingesetzte Aminosäure. Met reichert sich gut in verschiedenen malignen Läsionen an. Zusätzlich eignen sich Aminosäuren wie Met besser als FDG zur Diagnostik von Tumoren des Gehirns, da der physiologische Glukosestoffwechsel des Gehirns sehr hoch ist und deshalb kein guter Kontrast zwischen Tumor und Hirngewebe gegeben ist. Zudem postulierte Kubota et al., 1995, dass sich Aminosäuren, insbesondere Met, im Gegensatz zu FDG in einem deutlich geringeren Maße in entzündlich veränderten Geweben anreichern.

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei Aminosäuretracer L-[Methyl-³H]Methionin (Met) und O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET) dahingehend untersucht, ob sie sich in humanen Entzündungszellen, ebenso wie in humanen Tumorzellen anreichern. Im Gegensatz zur These Kubotas (1995) reicherte sich Met in einem weitaus höheren Maße in humanen, unstimulierten und stimulierten Lymphozyten und Makrophagen an, als in SW707-Tumorzellen. FET dagegen zeigt im Vergleich eine deutlich höhere Anreicherung in SW707-Tumorzellen als in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten und Makrophagen.

Aminosäuren sind weithin als Bausteine der Proteine bekannt. Alle 20 Aminosäuren, davon 9 essentielle, die dem Organismus über die Nahrung zugeführt werden müssen [Jager et. al., 2001], weisen (ausgenommen Prolin) dieselbe Strukturformel auf: Am α -Atom jeder Aminosäure befindet

sich eine freie Carboxylsäure-Gruppe und eine freie, nicht substituierte Aminogruppe. Sie unterscheiden sich lediglich durch ihren Rest [R-CH-(NH₂)-COOH]. Eingeteilt werden die Aminosäuren nach der Polarität ihres Restes: (1) nicht-polar oder hydrophober Rest, (2) neutraler Rest, (3) positiv-geladener Rest und (4) negativ-geladener Rest. Alle Aminosäuren existieren als D- und L-Stereoisomere, außer Glycin, das kein chirales Zentrum besitzt und Threonin und Isoleucin, die jeweils zwei chirale Zentren aufweisen. Alle natürlich vorkommenden Aminosäuren, eingebaut in Proteine, sind L-Stereoisomere [Lehninger, 1976].

Zahllose Mechanismen sind an der Synthese der Aminosäuren – soweit sich nicht essentiell sind –, an ihrem Transport innerhalb des Körpers, an ihrer Aufnahme in die verschiedenen Körperzellen und ihrer Inkorporation beteiligt [Laverman et al., 2002].

Schon seit Jahren ist bekannt, dass Aminosäuren eine große Rolle für das Tumorstadium spielen [Johnstone et al., 1965]. Es konnte gezeigt werden, dass sich Tumorzellen, um sich mit adäquaten Mengen an Aminosäuren zu versorgen, verschiedener Transportmechanismen bedienen. Definierte aktive Transportmechanismen für Aminosäuren wurden entdeckt, die spezifisch für Aminosäuren mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften ausgestattet sind. Nach dem Transport der Aminosäuren in die Zelle, wird ein gewisser Anteil zur Proteinsynthese verwendet. Das Enzym „Amino-Acyl-RNA-Synthetase“ bewirkt die Veresterung der L-Aminosäure zu Amino-Acyl-tRNA. Diese bindet an ein Ribosom und folglich an das korrespondierende Codon auf der mRNA. So entsteht ein neues Polypeptid. Der andere Anteil der Aminosäuren wird als Substrat für diverse Stoffwechselwege gebraucht [Lehninger, 1976].

Die zelluläre Aminosäure-Aufnahme ist abhängig von verschiedenen Parametern, wie z. B. dem pH-Wert, der Temperatur, der Na⁺-Abhängigkeit oder der Aminosäurekonzentration. Der Haupttransport der Aminosäuren findet über spezifische Carrier statt, deren Aktivität zum einen auf der Affinität zwischen Carrier und Aminosäure, zum anderen auf der Kapazität der Carrier (in Zahl und Größe) basiert. So kann ein Anstieg der Aminosäureaufnahme zum einen in einer steigenden Affinität (K_M), zum anderen in einer Zunahme der Transporterzahl (V_{max}) oder beidem begründet sein [Laverman et al., 2002]. Der eigentliche Transport der Aminosäuren in die Zelle geschieht, indem die Aminosäure sich an ein spezifisches, katalytisches Zentrum des Transportproteins bindet [Shotwell et al., 1983].

Wachstum und Malignität von Tumorzellen wird über aktivierte Zellmembrantransporter kontrolliert [Oxender et al., 1977]. Die drei bisher bekannten Aminosäuretransporter von eukaryoten Zellen für neutrale Aminosäuren sind das A-, das L- und das ASC-System [Shotwell et al.,

1981; White et al., 1982; Kubota et al., 1984; Christensen et al., 1990; Chen et al., 1994]. A- und L-System sind ubiquitär auf jeder Körperzelle vorhanden. Diese beiden Aminosäuretransportsysteme wurden auch bereits 1963 von Christensen et al. und Oxender et al. beschrieben, das ASC-System dagegen wurde erst viel später entdeckt.

Das A-System wurde ursprünglich nach seiner Affinität zur Aminosäure Alanin benannt. Dieses, bislang bestuntersuchte Aminosäuretransportsystem wird als Protein ATAT2 bezeichnet und besteht aus 504 Aminosäuren. Lin et al. beschreiben 1994 zwei unterschiedliche Typen des A-Systems deren Proteine noch nicht bekannt sind. Lin et al. begründen ihre Aussage darin, dass nach Insulingabe eine Differenzierung zweier unterschiedlicher A-Systeme durch ein unterschiedliches Transportverhalten möglich sei. Über das A-Transportsystem gelangen vorwiegend kurze, geradkettige, neutrale Aminosäuren, wie Alanin, Glycin und Prolin Na^+ -abhängig in die Zelle bzw. aus der Zelle. Bei einem pH-Wert kleiner 6 [Sailer et al., 1988] bzw. kleiner 7 [Kilberg et al., 1982] ist das A-System inaktiv.

Der Transport über das A-System ist Na^+ -abhängig: Mittels ATP-abhängiger Na^+/K^+ -Pumpe wird Natrium unter Energieverbrauch vom Intra- in den Extrazellularraum überführt. Durch den hohen extrazellulären und den niedrigen intrazellulären Natriumgehalt entsteht ein Membranpotential. Ein mobiler Carrier, wie z. B. das A-System, mit einer Bindungsstelle für Na^+ und für die zu transportierende Aminosäure, befördert, betrieben vom Gradienten, die Na^+ -Ionen in die Zelle, wobei die Aminosäuren durch Cotransport ebenfalls in die Zelle gelangen [Bading et al., 1996]. Pro Na^+ -Ion wird eine Aminosäure transportiert. Auf der Zellmembraninnenseite dissoziieren der Transporter und seine Transportsubstanzen und der Carrier diffundiert frei zurück. Dies bedeutet, dass die Anzahl der Carrier die Transportkapazität einschränkt, dass also ab einer bestimmten Menge des transportierten Stoffes eine Sättigung eintreten muss [Harvey et al., 1989]. Der Aminosäuretransport über das A-System erfolgt bidirektional [Lewis et al., 1984].

Horio et al. erhöhten 1999 die NaCl-Konzentration im Medium (hypertone Werte) und stellen schon nach 4 bis 8 Stunden eine 36-fache Steigerung der Aufnahme von MeAIB, dem spezifischen Substrat des A-Systems fest. Nach Sailer et al., 1988 scheint die Regulation des A-Systems durch Onkogene und Protoonkogene beeinflusst, was dessen Anteil an der Regulation des Zellwachstums erklären könnte. Bading et al., 1996 sieht ebenfalls eine Korrelation zwischen System-A-Transport und dem Tumorwachstum.

Kilberg et al. 1986 postuliert sogar ein eigenes A-System-Gen, in dem das transportinaktivierende Protein ein nukleares Regulationsgen ist, das dazu dient, die Transkription der Gene zu modulieren, die das System-A-assoziierte Glykoprotein kodieren.

Die Transportinhibition von neutralen Aminosäuren über dieses System gelingt vollständig mit einem synthetischen, nicht metabolisierbaren, A-spezifischen Analogon: MeAIB [α -(Methylamino)-Isobuttersäure]. Es handelt sich hier um eine Aminosäure, die von der Zelle nicht metabolisiert werden kann. MeAIB hemmt die Aufnahme der, typischerweise durch das A-System aufgenommenen Aminosäuren kompetitiv. MeAIB gelangt zu 94% über das A-System in die Zelle, nur 6% über nicht sättigbare Wege. MeAIB fungiert also als kompetitiver Hemmstoff für neutrale Aminosäuren am A-Transport-System.

Obwohl Matthews et al. (1979) behaupten, dass Methionin zum Großteil durch die Aminosäuretransportsysteme L und A aufgenommen wird, ergaben die verschiedenen Versuchsreihen, dass Met von SW707-Tumorzellen primär über das L- und ASC-System aufgenommen wird, bei Lymphozyten und Makrophagen eine nicht unbeträchtliche Met-Aufnahme über unspezifische Wege stattfand. Laut Oxender et al., 1976; Shotwell et al., 1981; Chen et al., 1994 und Schaidler et al., 1995 gelten das L-, A- und ASC-System als die Haupttransporter für Met. Shotwell et al. 1981 legt den nicht-sättigbaren Transportanteil von Met bei 18% fest.

FET wurde weder von SW707-Tumorzellen noch von Lymphozyten und Makrophagen über das A-System aufgenommen. Als Haupttransporter kristallisierten sich auch der L- und der ASC-Carrier heraus, wobei hier die untersuchten Entzündungszellen einen nicht unwesentlichen unspezifischen FET-Transport aufwiesen

Die Buchstaben des Akronyms ASC stehen für die Aminosäuren Alanin, Serin und Cystein, die über das ASC-System in die Zelle gelangen. Wie das A-System ist auch das ASC-System Na^+ -abhängig. Im Allgemeinen werden Aminosäuren mit 3 bis 5 C-Atomen bevorzugt über dieses Aminosäuretransportsystem transportiert. In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben zur pH-Abhängigkeit dieses Systems. Weissbach et al., 1982 sagten dem ASC-System eine pH-Unabhängigkeit nach, während Saier et al, 1988 bei pH 6 einen Verlust der maximalen Aktivität von 20% feststellten.

Im Gegensatz zum A-System wird das ASC-, ebenso wie das L-System durch einen „Preload“ von zu transportierenden Aminosäuren, wie z. B. Alanin stimuliert. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Transstimulation [Bussolati et al., 1992].

Über die Hemmung des ASC-Systems herrscht Uneinigkeit unter den Autoren. Einerseits sei die Hemmung des Systems bei Anwesenheit von MeAIB durch Zugabe der natürlichen Aminosäure L-Serin am effektivsten, andererseits führen Cystein oder Serin allein zur wirksamen Blockierung des Aminosäuretransportes durch das ASC-System [Del Castillo et al., 1991; Shotwell et al., 1981; Brookes et al., 1988].

In Vorversuchen zeigte sich, dass L-Serin allein sich als effektivster Hemmstoff herausstellte bzw. zeigte die Verwendung verschiedenster Kombinationen aus L-Serin, L-Cystein und MeAIB keine nennenswerten

Unterschiede in der Hemmung des ASC-Systems. Nach Shotwell et al. (1981) wird L-Serin zu 75% über das ASC-System und zu etwa 20% über das A-System aufgenommen. In dieser Arbeit nahmen SW707 59% des ihnen zugesetzten FET über das ASC-System auf, Lymphozyten 31%, Makrophagen 9%. Der Met-Anteil, der über das ASC-System in die untersuchten Zellen aufgenommen wurde, betrug 61% bei SW707, 27% bei Lymphozyten und 13% bei Makrophagen.

Unter allen Lebewesen zeigt das L-System die weiteste Verbreitung, allerdings mit unterschiedlicher Ausprägung. So haben beispielsweise Rattenerythrozyten 400mal mehr L-Transporter als humane Erythrozyten [Harvey et al., 1989].

Im Gegensatz zum A- und ASC-System handelt es sich bei dem L-System um einen Na^+ -unabhängigen Aminosäuretransporter [Angelo et al., 1996]. Er transportiert bevorzugt verzweigt-kettige und aromatische, neutrale und hydrophobe Aminosäuren und ist so der Haupttransporter für Tyrosin [Saier et al., 1988]. Der Mechanismus des L-Aminosäuretransporters ist noch nicht hinreichend geklärt. Einige Autoren gehen davon aus, dass das L-System entlang eines Konzentrationsgradienten Aminosäuren vom Zellinneren nach außen und umgekehrt transportiert. Andere Autoren sind der Meinung, dass Aminosäuren über einen Aminosäure-Protonen-Kotransport in der Plasmamembran (in Vesikeln von Hepatozyten) [Mitsumoto et al., 1983] die Zellmembran passieren. Wieder andere schreiben von einem Hetero-Austausch, d. h. die Akkumulation von einigen Aminosäuren steigert die Aufnahme von anderen Aminosäuren [Harvey et al., 1989]. Zusätzlich kann das L-System als sogenannter Countertransport für eine zweite Aminosäure dienen, deren Konzentrationsgradient über einen Na^+ -abhängigen Transporter wieder aufrechterhalten wird.

Im Hinblick auf die Hemmung des L-Systems findet man einheitliche Aussagen: Das synthetische, nicht metabolisierbare Analogon BCH (2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure) mit einem Molekulargewicht von 155 ist der spezifische Hemmstoff für das L-System [Shotwell et al., 1981; Del Castillo et al., 1991; Tovar et al., 1991]. 95% des Hemmstoffes gelangen über das L-System in die Zelle, die restlichen 5% über nicht sättigbare Aufnahmewege [Shotwell et al., 1981]. BCH führt somit zu einer kompetitiven Hemmung der Aminosäureaufnahme an diesem Transporter.

Laut Oxender et al. (1977) und Gazzola et al. (1980) steigt die Aktivität des L-Systems sowohl bei einem Mangel an Aminosäuren, als auch bei einem Überangebot (Preload) an Substrat. Nach Shotwell et al. (1981) zeigt das L-System eine Steigerung der Aktivität bei fallendem pH. In Hepatozyten wurde die Lokalisation des L-Systems genauer bestimmt. Es befindet sich vorwiegend an kanalikulären Membranen und der basolateralen Oberfläche [Novak et al., 1994]. Ein Mangel an

Aminosäuren führt zur einer 2-4fachen Steigerung der L-Transportaktivität.

Neuere Studien bringen das Oberflächenantigen CD98, das früher als 4F2 bezeichnet wurde, mit dem L-System in Verbindung. CD98 ist ein Proliferationsmarker für Zellwachstum, sowohl malignes, als auch benignes [Broer et al., 1998]. Neben vielen anderen Funktionen stellt CD98 eben auch ein Aminosäuretransportsystem dar, das mehrere Systeme, darunter das L-System, beinhaltet. Devés et Boyd (2000) identifizierten die eigentliche Struktur von CD98. Es handelt sich um ein heterodimeres Membranglykoprotein, das aus einer schweren glykosierten Kette und einer leichten nichtglykosierten Kette besteht.

Die schwere Kette besteht aus über 500 Aminosäuren und enthält eine transmembrane Domäne (hc), von ca. 20 Aminosäuren Länge. Schwere und leichte Kette sind über Cystein-vermittelte Disulfidbrücken verbunden [Pfeiffer et al., 1998]. Die 6 leichten Ketten, die bisher identifiziert werden konnten, stellen ebenso Proteine mit 12 Membrandomänen dar. Auf diese Weise können bislang 6 unterschiedliche Aminosäuretransporter benannt werden, die sich in ihren Transporteigenschaften und ihrer Lokalisation unterscheiden.

Aufgabe der schweren Kette CD98hc ist es, die Transporterfunktion der leichten Ketten zu aktivieren. Man findet die schwere Kette ubiquitär, stark exprimiert in proliferierenden Zellen. Aufgrund der 6 verschiedenen leichten Ketten gibt es 6 verschiedene Transporter, die der LAT-Familie angehören. LAT-1 transportiert vor allem lange, neutrale Aminosäuren mit verzweigten und aromatischen Seitenketten (darunter auch Tyrosin und Methionin) und ist Na⁺-unabhängig. Diese leichte Kette wird bei Mäusen und Ratten in Gehirn, Plazenta, Skelettmuskulatur, Milz, Hoden, aktivierten Lymphozyten und einigen Tumorzellarten gefunden. LAT-1 findet sich überdies in allen humanen Geweben, außer in Dünndarm und aktivierten Lymphozyten [Prasad et al., 1999] und ist der verantwortliche Aminosäuretransporter an der Blut-Hirn-Schranke [Boado et al., 1999; Kim et al., 2002].

LAT-2 besitzt eine höhere Affinität zu kurzen als zu langen, neutralen Aminosäuren, hat auch ein höheres Substratspektrum als LAT-1 und ist ebenfalls Na⁺-unabhängig. LAT-2 ist bevorzugt in folgenden murinen Geweben: Basolaterale Membran von Transportepithelien, Niere, Plazenta, Dünndarm, Gehirn und Skelettmuskulatur. Sowohl LAT-1, als auch LAT-2 können durch den spezifischen Hemmstoff BCH gehemmt werden. Aufgrund der genannten Eigenschaften werden LAT-1 und LAT-2 als Transporter des L-Typs bezeichnet. LAT-2 ist im Gegensatz zu LAT-1 streng stereospezifisch und pH-abhängig [Rajan et al., 2000]. Laut Segawa et al., 1999 ist die Affinität von LAT-2 zu Tyrosin höher als zu Methionin. y⁺-LAT-1 und y⁺-LAT-2 befördern in erster Linie kationische und neutrale Aminosäuren und sind Na⁺-abhängig bei neutralen Aminosäuren, wobei y⁺-LAT-1 in Niere, Dünndarm, Leukozyten und vielen

anderen Geweben zu finden ist, die Lokalisation der γ^+ -LAT-2-Transporter jedoch noch nicht näher bestimmt worden ist. XCT, ein weiterer Transporter der LAT-Familie gilt als Na^+ -unabhängiger Cystin/Glutamin-Austauschtransporter in aktivierten Makrophagen, Zellkulturen und im Gehirn. Über SPRM1, dessen Lokalisation bis heute noch nicht genau bestimmt werden konnte, gelangen zum Teil Na^+ -abhängig kationische und neutrale Aminosäuren in die Zelle [Devés et Boyd, 2000].

Andere Autoren benennen neben CD98 bzw. 4F2hc eine zweite schwere Kette: rBAT, mit der eine weitere leichte Kette verbunden ist: $\text{b}^{0,+}\text{AT}$. Daneben wurden auch schon weitere leichte Ketten gefunden: ORF1-ORF7, die mit CD98 verknüpft sind [Chillaron et al., 2001; Verrey et al., 1999]. Allerdings ist die wissenschaftliche Erkenntnis auf diesem Gebiet noch in den Kinderschuhen und deshalb lange noch nicht abgeschlossen.

BCH, der spezifische Hemmstoff des L-Systems erwies sich als effektivster Hemmstoff, sowohl der Met- als auch der FET-Aufnahme in Tumor- und Entzündungszellen. Allerdings konnte die Aminosäureaufnahme (FET und Met) in SW707-Tumorzellen wesentlich besser gehemmt werden (81% bei FET und 69% bei Met), als die Aufnahme der Lymphozyten und Makrophagen (13% Hemmung der FET-Aufnahme in Makrophagen und 37% in Lymphozyten; 21% Hemmung der Met-Aufnahme in Makrophagen und 29% in Lymphozyten). Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit berichten Heiss et al. (1999), dass 80% des FET über das L-System aufgenommen werden. Langen et al. (2000), die die 3- ^{123}I iodo-alpha-Methyl-L-Tyrosin- und Met-Aufnahme in humane Gliomzellen verglichen, stellten ebenfalls fest, dass beide Tracer vornehmlich über das L-System in die Zellen aufgenommen werden.

Auch bei Verwendung aller drei spezifischer Hemmstoffe (BCH, MeAIB und L-Serin) konnte die Aminosäureaufnahme in SW707-Tumorzellen in einem wesentlich höheren Maße gehemmt werden, als bei Lymphozyten und Makrophagen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Lymphozyten und Makrophagen die Aminosäuren über andere Subtypen der bekannten Aminosäuretransporter aufnehmen oder, dass sie einen höheren Anteil der Aminosäuren über unspezifische Wege aufnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die bekannten drei Aminosäuretransportsysteme, das A-, L- und ASC-System in ihrer Beeinflussbarkeit durch äußere Stimuli und in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Die Substratspezifitäten können sich allerdings auch überlappen, da jede Aminosäure zu verschiedenen Anteilen über die einzelnen Transporter aufgenommen wird. Auch die Ausprägung der einzelnen Systeme variiert in den verschiedenen Geweben [Maroni et al., 1986; Brookes et al., 1988].

Zu den äußeren Stimuli, d. h. den Einflussfaktoren auf den Aminosäuretransport zählen die intrazelluläre Aminosäurekonzentration, der Glukosegehalt [Torizuka et al., 1997], der O_2 -Gehalt [Minn et al., 1996], verschiedene Hormone, wie z. B. Wachstumshormone, Insulin und

Schilddrüsenhormone [Kilberg, 1982], die Na^+ -Konzentration, der pH-Wert, die Energieverfügbarkeit, das Ursprungsgewebe und die Teilungsrates der Zellen. Die Zelldichte [Gazzola et al., 1980] und das Angebot an Aminosäuren ist wichtig für die Ausprägung der Transportsysteme. Mit Ausprägung ist zum einen die Änderung der Tertiärstruktur des jeweiligen Carriers gemeint, wodurch mehr Substrat an das Transportsystem gebunden und befördert werden kann. Mit anderen Worten steigt die Affinität des Transporters zur Aminosäure. Man spricht hierbei auch vom K_M -Effekt (K_M =Michaelis-Menten-Konstante). Damit ist diejenige Substratkonzentration gemeint, bei der die Hälfte der maximalen Transportgeschwindigkeit erreicht wird. Zum anderen ist mit Ausprägung der Transportsysteme eine Variation der Anzahl der aktiven Transportproteine und damit eine Veränderung der maximalen Transportgeschwindigkeit gemeint. Eine Erhöhung der Anzahl der aktiven Transportsysteme ist erstens möglich durch eine Novo-Proteinsynthese des Carriers selbst oder zweitens durch die Synthese eines Regulatorproteins, das Transporter aktiviert. In diesem Zusammenhang spricht man von einem V_{\max} -Effekt (V_{\max} gibt die Anzahl der aktiven Transporter in der Zellmembran an, d. h. die Menge Aminosäure, die pro Einheit Transporterprotein pro Zeiteinheit transportiert wird). Unklar ist allerdings, welche Effekte sich bei der Met- bzw. FET-Aufnahme durch SW707-Tumorzellen, Lymphozyten und Makrophagen auswirkten!

Neben den genannten definierten Transportsystemen existieren auch nicht sättigbare Wege für die Aufnahme von Aminosäuren durch die Zellmembran. Am wahrscheinlichsten werden die Aminosäuren auf dem Wege der freien Diffusion aufgenommen. Denn charakteristischer Weise ist die Aufnahme unspezifisch (was die zu transportierende Aminosäure angeht), bidirektional (d. h. der Transport erfolgt in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus), entlang eines Gradienten (d. h. passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles), nicht sättigbar, ohne durch den Transportvorgang verursachten Energieverlust und nicht durch spezifische Inhibitoren hemmbar [Le Cham et al., 1977; Shotwell et al., 1981; Maroni et al., 1986; Yao et al., 1993; Nicklin et al., 1992]. In der Literatur sind noch einige weitere Transportwege beschrieben, die sich jedoch hauptsächlich auf Kationen, Zwitterionen und spezifische einzelne Aminosäuren beziehen [White et al., 1982; Dorio et al., 1984; Christensen et al., 1985; van Winkle et al., 1988; Angelo et al., 1996].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Met vor allem über das L-System in die untersuchten Zellen aufgenommen wurde, was indirekt über die Hemmung der AS-Aufnahme durch BCH bestimmt wurde. Jedoch variierte der Anteil der Aufnahme bei den jeweiligen Zellen. SW707-Tumorzellen nahmen 69% des Met-Angebotes über das L-System auf, 61% über das ASC-System und ca. 8% über unspezifische Aufnahme. MeAIB, als spezifischer Inhibitor des A-Systems hatte keinen Effekt auf die Met-Aufnahme in SW707-Zellen. Lymphozyten nahmen

29% des Met-Angebots über das L-System auf, 5% über das A-System, 27% über das ASC-System und ca. 46% über unspezifische Aufnahmewege. Makrophagen nutzten zu 21% das L-System, zu 13% das ASC-System und zu 54% unspezifische Transportwege zur Met-Aufnahme. MeAIB zeigte keine inhibitorische Wirkung auf die Met-Aufnahme in Makrophagen, d. h. die Aufnahme erfolgte nicht über das A-System.

FET wurde ebenfalls in erster Linie über das L-System aufgenommen. SW707-Tumorzellen nahmen 81% des FET-Angebots über das L-System auf, 59% über das ASC-System und 17% über unspezifische Aufnahme. Lymphozyten transportierten 37% über das L-System, 7% über das A-System, 31% über das ASC-System und 43% über unspezifische Wege. Bei den Makrophagen verhielt es sich ähnlich, wie bei den Lymphozyten. Sie nahmen 13% des FET über das L-System, 9% über das ASC-System und 57% unspezifisch auf. Diese Werte wurden indirekt unter Zuhilfenahme von spezifischen Hemmstoffen für die jeweiligen Transportsysteme ermittelt.

Für die durchgeführten Versuche wurde eine Hemmstoffkonzentration von 60mmol/l festgelegt. Diese Konzentration, so ergab sich aus Vorversuchen, war jene mit der effektivsten Hemmwirkung. Bussolati et al., 1992 und Chen et al., 1994 beschreiben die Hemmstoffkonzentration der spezifischen Transportsystem-Inhibitoren, die zur vollständigen Blockade der jeweiligen Transporter führt, als wesentlich niedriger: Zur Hemmung des A-Systems seien beispielsweise 10mmol/l MeAIB ausreichend. Castillo et al., 1991 beschreibt eine maximale Hemmung aller Inhibitoren bei 20mmol/l.

Zur Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetiken wurden definierte, ansteigende Konzentrationen von Met bzw. FET zur Zellsuspension gegeben. Die höchsten Konzentrationen überstiegen die physiologischen humanen Serumkonzentrationen bei Weitem. Bei einem solchen Überangebot ist davon auszugehen, dass alle Aminosäuretransporter besetzt sind und folglich eine Sättigung des Transportes eintritt [Harvey et al., 1989], wie es auch bei den hohen Konzentrationen der durchgeführten Michaelis-Menten-Kinetiken zu beobachten war.

Wenn mit steigender Aminosäurekonzentration keine Sättigung der bekannten Transportsysteme erzielt werden kann, sind multiple Systeme am Aminosäuretransport beteiligt, die eine unterschiedliche Affinität zur transportierenden Aminosäure aufweisen [Harvey et al., 1998]. Diese Aussage könnte als Begründung gelten, warum die FET-Michaelis-Menten-Kinetik an Makrophagen keiner Sättigung unterlag.

Was die Aminosäuretransporter im Einzelnen anbelangt, so zeigt das A-System bei einem Überangebot an Aminosäuren eine Verringerung der

Aufnahme (Transinhibition) [Maroni et al., 1986], d. h. die Transportleistung des A-Systems wird nicht durch ein vermehrtes Angebot an Aminosäuren erhöht, sondern im Gegenteil erniedrigt. Man spricht in diesem Zusammenhang vom Phänomen der Transinhibition. Das L-System hingegen steigert in Anwesenheit eines Substratüberschusses seinen Aminosäure-Austausch, man spricht dann von einer Transstimulation. Den Effekt der Transstimulation des L-Systems nutzen Lahoutte et al. (2002) zur besseren Sichtbarmachung von Tumoren mittels $3\text{-}^{123}\text{I}$ -Iodo-L- α -Methyltyrosin (3-IMT). Dieses genannte Tyrosinderivat wird ebenso wie Tyrosin über das L-System in die Zellen aufgenommen. In einer Tierstudie konnte nun gezeigt werden, dass sich nach einem Aminosäurepreload der eigentliche Tracer 3-IMT in einem höheren Maße in Tumorzellen anreichert und sich so ein deutlicherer Bildkontrast einstellt.

Unter geringem AS-Angebot wird sowohl das L-System als auch das A-Transportsystem in BALB/BT3-Zellen der Maus „upreguliert“, ASC-Transporter und der nicht sättigbare Anteil bleiben unverändert in der Kapazität [Oxender et al., 1977]. Ähnliche Beobachtungen zur Stimulation des L- und A-Systems unter Substratmangel machten auch Muniz et al. (1993) und Shotwell et al. (1983).

White et al. (1984) stellte sich die Frage, ob der nicht sättigbare Anteil des Aminosäuretransportes mit dem Grad der Tumormalignität korreliert, dass durch die maligne Transformation die Zellmembranstruktur verändert oder die Zellmembran gar geschädigt sei. Lymphozyten und Makrophagen zeigten jedoch einen wesentlich höheren Anteil an unspezifischer Aminosäureaufnahme als die SW707-Tumorzellen. Bading et al. (1996) fand eine Korrelation zwischen A-System und Malignität. Das A-System wird als Ziel onkogener Aktivität beschrieben, dessen Funktion mit der Tumorzellproliferation korreliert, während das L- und ASC-System und die nicht sättigbare Aminosäureaufnahme von maligner Transformation nicht betroffen sein sollen [Glassy et al., 1981; Bading et al., 1996]. Nur Woodlock et al. (1997) beschreibt eine 90%ige Reduktion der L-System-Kapazität in CLL-B-Lymphomzellen im Vergleich zu nicht malignen B-Lymphozyten.

Die Erklärung der unterschiedlichen Met- bzw. FET-Aufnahme durch Makrophagen und Lymphozyten mag zum einen darin begründet sein, dass die beiden Aminosäuren über unterschiedliche L-Transporter-Subtypen aufgenommen werden, oder über ein und denselben L-Transporter in die Zelle gelangen, dieser Transporter aber unterschiedliche Affinitäten zu den Aminosäuren aufweist. Möglicherweise existieren neben den 6 genannten leichten Ketten noch weitere, bisher nicht bekannte, die ebenso die Eigenschaften des typischen Na^+ -unabhängigen L-Transport-Systems aufweisen und zwar Methionin, nicht aber FET transportieren. Betrachtet man die Tatsache, dass sich FET laut Studien bei Patienten in einigen Organen, die typischerweise einen hohen

Aminosäure-Uptake zeigen nur sehr gering anreichert, lässt auch dies darauf schließen, dass FET über spezielle Subtypen des L-Systems in die Zellen aufgenommen wird.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, ob durch die Aminosäuretracer Met und FET eine Differenzierung zwischen Tumor und Entzündung möglich sei.

Im peripheren Blut eines Menschen sind die Leukozyten, also Entzündungszellen prozentual wie folgt verteilt: Granulozyten (60-80%), Lymphozyten (20-30%), und Monozyten bzw. Makrophagen (2-6%) [Pschyrembel, 1994]. Im inflammatorisch veränderten Gewebe findet man bei einer akuten Entzündung in erster Linie Granulozyten, bei einer chronischen Entzündung v. a. Lymphozyten [Rau et al., 2001].

Bemerkenswert ist, dass die Entzündungszellen, also auch die untersuchten Makrophagen und Lymphozyten bei ihrer Antwort auf Infektionen ihren Sauerstoff-, Glukose- und Aminosäurestoffwechsel enorm steigern können [Fantone et al., 1982]. Darley et al. (1990) zeigte an einem Rattenmodell einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Entzündungszellen im inflammatorischen Areal, einer damit verbundenen erhöhten Glukoseaufnahme und einer erhöhten Laktatproduktion. Auch Kubota et al., 1992 beschreibt eine vermehrte FDG-Anreicherung im Bereich eines von Makrophagen durchsetzten Granulationsgewebes im Vergleich zum vitalen Tumorgewebe.

Interessant war es zu sehen, wie sich stimulierte Lymphozyten und Makrophagen im Gegensatz zu unstimulierten -die Aminosäuretracer-Aufnahme betreffend- verhalten. Zur Stimulation von Makrophagen wird in der Literatur v. a. Lipopolysaccharid (LPS) angegeben [Sass et al., 2002]. LPS bewirkt an Makrophagen eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-1 beta, IL-6, NF-kappaB und sonstiger Mediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen [Eliopoulos et al., 2002; An et al., 2002]. Desweiteren stimuliert LPS Rattenalveolarmakrophagen zur Produktion von NO durch Anregung der NO-Synthetase [Li et al., 2002]. LPS steigert die Expression der COX-2 [Guastadisegni C et al., 2002] und die Arginaseaktivität der Makrophagen [Klasen et al., 2001]. In dieser Arbeit wurden Makrophagen mit 100ng/ml LPS ca. 48 Std. lang stimuliert. So konnte gezeigt werden, dass LPS-stimulierte Makrophagen 1,08mal mehr Met und 1,6mal mehr FET aufnehmen als unstimulierte Makrophagen.

Zur Stimulation von Lymphozyten wurde Concanavalin A (ConA) eingesetzt (0,25mg/ml) [Sass et al., 2002]. ConA ist ein T-Zell-Mitogen und führt zu einer selektiven Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten. B-Lymphozyten können durch ConA nicht direkt stimuliert werden, man geht aber davon aus, dass sie indirekt doch stimuliert

werden [Anderson et al., 1972]. Da es sich bei den, aus buffy coats isolierten mononukleären Zellen um eine Mischpopulation aus T- und B-Lymphozyten handelte, wurde durch die erhöhte Aminosäureaufnahme in die Lymphozyten, nach Behandlung mit ConA die Stimulation der Zellen sichtbar. ConA-stimulierte Lymphozyten nahmen 1,2mal mehr Met und 2,75mal mehr FET auf, als unstimulierte Lymphozyten. Bestätigend sagt Scanion et al. (1983), dass mitogen aktivierte Lymphozyten vor allem über die Na⁺-abhängigen Transportsysteme (v. a. A-System) eine 4-8fache Aufnahme von Met zeigen, das L-System spielt dabei keine Rolle. Souba und Pacetti (1992) sehen die Transportrate des A-Systems durch verschiedene Hormone, Zytokine wie Interleukin-1 und durch Mitogene beeinflussbar. Bei unstimulierten Lymphozyten spielt nach Scanion et al. (1983) das L-System die Hauptrolle bei der Aminosäure-Aufnahme. Allerdings zeigen sich die Autoren uneinig, da Devés und Boyd (2000) bei der Betrachtung der L-Transportsystem Subtypen, diese auch auf stimulierten Entzündungszellen finden und somit sehr wohl auch das L-System verantwortlich machen für die erhöhte Aminosäureaufnahme aktivierter Lymphozyten. Genauer gesagt wurden LAT-1-Transporter auf der Oberfläche aktiverter Lymphozyten gefunden, nicht aber LAT-2.

In ConA-stimulierten murinen Lymphknoten reichert sich FDG mehr an als in tumorinfiltrierten Lymphknoten. Ebenso verhält es sich bei der Met-Aufnahme. Im Gegensatz dazu reichert sich FET nur im tumorösen Lymphknoten an [Rau et al, 2002]. Diese in vivo Daten spiegeln die Ergebnisse dieser Arbeit wieder. Stimulierte und unstimulierte Lymphozyten und Makrophagen nahmen deutlich mehr Met auf, als SW707-Tumorzellen, wohingegen FET vor allem von SW707-Tumorzellen aufgenommen wurde, die stimulierten und unstimulierten Lymphozyten und Makrophagen nur eine geringe FET-Anreicherung zeigten.

Bei der Betrachtung der absoluten Aufnahme von Met und FET fällt sofort auf, dass Met deutlich mehr von den untersuchten Zellen aufgenommen wurde als FET (bis zu 78mal!). Bei den Hemmstoffversuchen stellte sich heraus, dass das L-System der Haupttransporter der Aminosäuretracer Met und FET in die Zellen ist. LAT-1 und LAT-2 transportieren erwiesenermaßen Methionin und Tyrosin. Beide Transporter können durch BCH, den spezifischen Hemmstoff des L-Systems gehemmt werden. Segawa et al., 1999 fanden heraus, dass LAT-2 eine höhere Affinität zu Tyrosin als zu Methionin hat. Durch seine schwefelhaltige Seitenkette zählt Methionin zu den hydrophoben Aminosäuren. Tyrosin, das allein schon durch seinen aromatischen Rest zu den hydrophoben Aminosäuren zu rechnen ist, wird durch die substituierte Fluorethylgruppe noch hydrophober.

Da die Zellmembranen aller Lebewesen aus einer Lipiddoppelschicht bestehen, deren polarer Abschnitt jeweils zum Zelläußeren bzw.

Zellinneren gerichtet ist, sollte eine gute Aufnahme der in dieser Arbeit untersuchten lipophilen Aminosäure-Tracer gewährleistet sein. Hier ist eventuell auch die Erklärung für eine unspezifische Aufnahme der Tracer durch die Zellen zu suchen. Warum Met nun in einem so viel größeren Maße aufgenommen wurde als FET ist unklar, zumal FET durch seine zusätzliche Äthylgruppe hydrophober sein müsste und deshalb noch leichter Zellmembranen passieren könnte.

Was die pH-Abhängigkeit der Met- und FET-Aufnahme anbelangt, so konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lymphozyten und Makrophagen ihr Tracer-Aufnahmemaximum bei pH 7,2 hatten, während die SW707-Tumorzellen ihr Maximum bei pH 7,4 zeigten. Eine Erklärung findet diese Beobachtung möglicherweise in der Tatsache, dass physiologischer Weise im in vivo entzündlichen Gewebe ein niedrigerer pH vorherrscht als im nicht entzündlichen Gewebe. Grund dafür ist die vermehrte Enzym- und Mediatorausschüttung (z. B. Peroxidase, Wasserstoffperoxid, Proteasen usw.) durch Entzündungszellen, die am Entzündungsort zugegen sind [Karow, Lang, 2000].

Eine andere Erklärung dafür, warum die untersuchten Entzündungszellen ihr Aufnahmemaximum bei einem anderen pH-Wert aufwiesen als die Tumorzellen mag sein, dass die unterschiedlichen Zellen in unterschiedlicher Ausprägung mit den verschiedenen spezifischen und unspezifischen Aminosäuretransportern ausgestattet sind. So gilt beispielsweise das L-System als pH-unabhängig, auch steigt seine Aktivität mit sinkendem pH-Wert. Allerdings wird dem LAT-1 Aminosäuretransporter im Gegensatz zum LAT-2 Transporter eine pH-Unabhängigkeit nachgesagt. Laut Weissbach et al. (1982) ist auch das ASC-System pH-unabhängig, während Saier et al. (1988) bei pH 6 einen Aktivitätsverlust des ASC-Systems von 20% feststellten. Das A-System ist ebenso pH-abhängig. Saier et al. (1988) erklären, dass es bei pH 6 inaktiv sei, Kilberg et al. (1982) stellen die Inaktivität des A-Systems schon bei pH 7 fest.

Die Michaelis-Menten-Kinetiken, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, zeigten, dass die SW707-Tumorzellen mit $1,41 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Zellprotein}^{-1}$ die höchste Maximalgeschwindigkeit aufwiesen (V_{max}), gefolgt von den Makrophagen mit 1,17 und den Lymphozyten mit 0,775. Die kleinste Michaelis-Konstante (K_M) und damit die höchste Affinität zwischen Met und Aminosäuretransporter zeigten mit 0,063 mmol/l die SW707-Tumorzellen. Die K_M der Makrophagen betrug 0,113 mmol/l, die der Lymphozyten 0,125 mmol/l. SW707-Tumorzellen zeigten also die größte Maximalgeschwindigkeit, als auch die höchste Affinität.

Bei der Michaelis-Menten-Kinetik für FET konnte für Makrophagen keine Maximalgeschwindigkeit und keine Michaelis-Konstante ermittelt werden, da im Bereich der eingesetzten FET-Konzentrationen keine Sättigung der

Aminosäure-Aufnahme erreicht werden konnte. Obwohl die Tumorzellen bei FET mit einem V_{\max} von 1,08 eine höhere Maximalgeschwindigkeit hatten als die Lymphozyten mit einem V_{\max} von 0,3875, so wiesen die Lymphozyten mit $K_M=0,068\text{mmol/l}$ doch eine höhere Affinität zwischen FET und den Aminosäuretransportern auf als die SW707-Tumorzellen mit $K_M=0,07\text{mmol/l}$. Die genannten, aus der Michaelis-Menten-Kinetik ermittelten Werte für FET und Met bei Lymphozyten, niedrige Maximalgeschwindigkeit und relativ hohe Affinität, könnten ebenso wie der hohe Anteil an unspezifischer FET-Aufnahme und die geringe absolute FET-Aufnahme dafür sprechen, dass es Lymphozyten an spezifischen Transportern für FET mangelt. Riemann et al. (1999) erstellten Michaelis-Menten-Kinetiken an C6-Gliomzellen mit 3- ^{123}I]Iodo-L-alpha-Methyltyrosin (^{123}I -IMT) und erhielten ähnliche Werte für V_{\max} ($35,4\text{nmol}\cdot\text{mg Zellprotein}^{-1}\cdot 10\text{min}^{-1}$) und K_M ($26,2\mu\text{mol/l}$) und sahen ^{123}I -IMT durch das L-Transportsystem aufgenommen.

Wie bereits erwähnt hat Tumorgewebe einen erhöhten Bedarf, nicht nur an Glukose, sondern auch an Aminosäuren. Die erhöhte AS-Aufnahme ist nötig, um genügend „Material“ für die gesteigerte Proteinsynthese- und Transmethylierungsrate im neoplastischen Gewebe bereitstellen zu können. Diese Tatsache lässt Nuutinen et al. (1998) zum Schluß kommen, dass ein Stop der Aminosäurezufuhr mit einem Rückgang des Tumorstadiums verknüpft sein sollte.

Die Fragestellung, die dieser Doktorarbeit zugrunde liegt ist, ob Met und FET die Differenzierung zwischen Tumor- und Entzündungsgewebe zulassen. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ist durch Met keine Unterscheidung zwischen Inflammation und Neoplasie möglich, wohl aber durch FET.

6 Zusammenfassung

Charakterisierung des Transportes der Aminosäuren L-[Methyl-³H]-Methionin (Met) und O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-L-Tyrosin (FET) in humane Lymphozyten, Makrophagen und Kolonkarzinomzellen

FDG-PET bietet diagnostisch eine sehr gute Möglichkeit Tumoren frühzeitig zu erkennen. Auch bei der Metastasensuche, der Rezidiverkennung und beim Therapiemonitoring gibt FDG-PET gute Hilfestellungen.

Da sich das zur PET-Untersuchung verwendete FDG nicht nur im neoplastischen Gewebe anreichert, sondern auch im inflammatorischen Gewebe, führt es oft zu falsch positiven Ergebnissen in der Tumordiagnostik und erlaubt keine Differenzierung zwischen Tumor und Entzündung.

Entzündungszellen zeigen bei der Immunabwehr aufgrund ihres gesteigerten Stoffwechsels eine erhöhte Glukose- und Aminosäure-Aufnahme. Was FDG betrifft, so ist bereits unumstritten nachgewiesen, dass sich FDG sowohl in vielen Tumorzellarten, als auch in Entzündungszellen anreichert und so keine Differenzierung zwischen Tumor und Entzündung zulässt. Bei Met als Aminosäuretracer finden sich widersprüchliche Aussagen in der Literatur. Während einerseits zu lesen ist, dass Met sich nicht in Entzündungszellen anreichert, sind auch Literaturstellen zu finden, in denen das Gegenteil behauptet wird und Met die Fähigkeit der Differenzierung zwischen Tumor- und entzündlichen Gewebe abgesprochen wird.

In dieser Arbeit sollte daher die Aufnahme der Aminosäuren Met und FET in humane SW707-Tumorzellen, humane Lymphozyten und Makrophagen näher charakterisiert werden.

Es stellte sich heraus, dass Met in höherem Maße von stimulierten und unstimulierten Lymphozyten und Makrophagen aufgenommen wurde, als von den SW707-Tumorzellen. FET dagegen wurde von den SW707-Tumorzellen in einem wesentlich höheren Maße aufgenommen, als von stimulierten und unstimulierten Entzündungszellen. Die stimulierten Lymphozyten und Makrophagen zeigten bei beiden AS-Tracern eine höhere Aufnahme, als die jeweils unstimulierten Formen.

Durch die Verwendung von spezifischen Aminosäuretransporterhemmstoffen konnte gezeigt werden, über welche Wege Met und FET in die untersuchten Zellen aufgenommen wurden. Sowohl Met, als auch FET wurden von SW707-Tumorzellen, ebenso wie von den Lymphozyten und Makrophagen vorwiegend über das L-System aufgenommen, wobei zu bemerken ist, dass der Anteil der unspezifischen Aminosäure-Aufnahme in Lymphozyten und Makrophagen erheblich höher war als in den untersuchten Tumorzellen.

Zur pH-Abhängigkeit der Met- und FET-Aufnahme in den untersuchten Zellen lässt sich zusammenfassend sagen, dass die SW707-Tumorzellen ihr Met- und FET-Aufnahme-Maximum bei pH 7,4 zeigten, während das Aufnahmemaximum der Lymphozyten und Makrophagen bei pH 7,2 lag.

Betrachtet man die absolute Met- und FET-Aufnahme durch die untersuchten Zellen, so wurde Met in beträchtlich höherem Maße von allen drei untersuchten Zellarten aufgenommen als FET.

Bei der Auswertung der angefertigten Michaelis-Menten-Kinetiken für Met zeigte sich, dass die SW707-Tumorzellen sowohl die höchste, maximale AS-Transportgeschwindigkeit, als auch die größte Affinität zwischen Aminosäure und Transporter aufwiesen. Bei den Michaelis-Menten-Kinetiken für FET zeigten Makrophagen in Rahmen der eingesetzten FET-Konzentrationen keine Sättigung der Aufnahme bzw. der AS-Transporter.

Aufgrund der Ergebnisse bezüglich der Met- und FET-Aminosäure-Aufnahme der untersuchten humanen Kolonkarzinomzellen, Lymphozyten und Makrophagen, lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich FET aufgrund seiner geringen Anreicherung in stimulierten und unstimulierten Entzündungszellen und seiner hohen Anreicherung in Tumorzellen im Gegensatz zu Met zur Differenzierung zwischen Tumor und Entzündung eignet.

7 Literaturverzeichnis

- Adams S, Baum RP, Stuckensen T, Bitter K, Hör G. Prospective comparison of 18-F-FDG PET with conventional imaging modalities (CT, MRI, US) in lymph node staging of head and neck cancer. *Eur J Nucl Med* 1998;25:1255-60.
- Ahlstrom H, Malmstrom PU, Letocha H, Andersson J, Langstrom B, Nilsson S. Positron emission tomography in the diagnosis and staging of urinary bladder cancer. *Acta Radiol* 1996;37:180-5.
- An SJ, Pae HO, Oh GS, Choi BM, Jeong S, Jang SI, Oh J, Kwon TO, Song CE, Chung HT. Inhibition of TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 productions in NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Dignoniaceae). *Int Immunopharmacol* 2002;2(8):1173-81.
- Anderson J, Sjoberg O, Moller G. Reversibility of high dose unresponsiveness to concanavalin A in thymus lymphocytes. *Immunology* 1972;23:637-46.
- Angelo S, Irrarrazabal C, Deves R. The binding specificity of amino acid transport system γ^L in human erythrocytes is altered by monovalent cations. *J Membrane Biol.* 1996;153:37-44.
- Avril N, Dose J, Jänicke F, Ziegler S, Römer 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 Nat Cancer Inst* 1996;88:1204-09.
- Avril N, Dose J, Jänicke F, Bense S, Ziegler S, Laubenbacher C, Römer 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 Onc* 1996;6:1848-57.
- Avril N, Dose J, Bense S, Ziegler S, Laubenbacher C, Römer W, Weber W, Schwaiger M. Breast imaging with fluorine-18-FDG PET: quantitative image analysis. *J Nucl Med* 1997;38:1186-97.
- Bading JR, Kan-Mitchell J, Conti PS. System A amino acid transport in cultured human tumor cells: Implication for tumor imaging with PET. *Nucl Med Biol* 1996;23:779-786.
- Bakheet SM and Powr J. Benign causes of 18-FDG uptake on whole body imaging. *Semin Nucl Med* 1998;28:352-8.

- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 1993;268:19161-4.
- Bergström M, Collins VP, Ehrin E, Ericson K, Erikson L, Greitz T, Halledin C, von Holst, Langstrom B, Lilja A et al. Case report. Discrepancies in brain tumor extent as shown by computed tomography and positron emission tomography using [⁶⁸Ga] EDTA, [¹¹C] glucose, [¹¹C] methionine. *J Comput Assist Tomogr* 1983;7:1062-6.
- Bergström M. Positron emission tomography in tumor diagnosis and treatment follow-up. *Acta Oncologica* 1993;32:183-88.
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *PNAS* 1999, vol.96,no.21, 12079-12084.
- Braams JW, Prium J, Nikkels PG, Roodenburg JL, Vaalburg W, Vermey A. Nodal spread of squamous cell carcinoma of the oral cavity detected with PET-tyrosine, MRI and CT. *J Nucl Med* 1996;37:897-901.
- Braams JW, Witjes MJH, Nooren CAAM, Nikkels PGJ, Vaalburg W, Vermey A, Roodenburg JLN. Detection of oral dysplasia in animals with Fluorine-8-FDG and Carbon-11-Tyrosine. *J Nucl Med* 1998;39:1476-80.
- Broer A, Hamprecht B, Broer S. Discrimination of two amino acid transport activities in 4F2 heavy chain-expressing *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 1998;333:549-54.
- Brookes N. Neutral amino acid transport in astrocytes: Characterization of Na⁺-dependent and Na⁺-independent components of α -amino-isobutyric acid uptake. *J Neurochem* 1988;51:1913-18.
- Bussolati O, Laris PC, Rotoli BM, Dall Asta V, Gazzola GC. Transport system ASC for neutral amino acids. *J Biol Chem* 1992;267:8330-8335.
- Bustany P, Chatel M, Derlon JM, Darcel T, 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.
- Bustany P, Henry JF. Brain protein synthesis in normal and demented patients - a study by positron emission tomography with 11-C-L-methionine. *Funkt Rad Br* 1983; 319-26.
- Cam, Le A, Freychet P. Neutral amino acid transport. *J Biol Chem* 1977;252:148-56.
- Cantoni GI. Activation of methionine for transmethylation. *J Biol Chem* 1951 Apr;189(2):745-54.
- Castillo del JR, Muniz R. Neutral amino acid transport by isolated small intestinal cells from guinea pigs. *The American Physiological Society* 1991;261:G1030-G1036.
- Chen J, Zhu Y, Hu M. Mechanisms and kinetics of uptake and efflux of L-methionine in an intestinal epithelial modes (Caco-2). *J Nutr* 1994;124:1907-16.
- Chillarón J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M. Heterodimeric amino acid transporters: biochemistry, genetics and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F995-F1018.
- Coleman RE. Single photon emission computed tomography and positron emission tomography in cancer imaging. *Cancer* 1991;67:1261-70.
- Cremerius U, Effert PJ, Adam G, Sabri O, Zimny M, Wagenknecht G, Kakse G, Buell U. FDG PET for detection and therapy control of metastatic germ cell tumor. *J Nucl Med* 1998;39:815-22.
- Christensen HN. On the strategy of discrimination of amino acid transport systems. *J Membrane Biol* 1985;84:97-103.

- Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990;70:43-76.
- Daley JM, Shearer MA, Mastrofrancesco B, Caldwell MD. Glucose metabolism in injured tissue: a longitudinal study. *Surgery* 1990;107:187-92.
- Dall Asta V, Bussolati O, Guikotti GG, Gazzola GC. Energization of amino acid uptake in gliomas. *Neurosurgery* 1989;25:720-728.
- Devés R, Boyd CAR. Surface Antigen CD98(4F2): Not a Single Membrane Protein, but a Family of Proteins with Multiple Functions. *J Membr Biol* 2000;173:165-77.
- Di Chiro G, De la Plaz RJ, Brookes RA. Glucose utilisation of cerebral gliomas measured by 18-F-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurosurgery*, 1982;32:1323-29.
- Diericks LO, Everaert H, Deron P, Voordeckers M, Lahoutte T, Bossnyk A. Evaluation of the response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma by using 3-[123I]iodo-L-alpha-methyl-tyrosine and single photon emission tomography. *Nucl Med Commun*. 2003 Jun;24(6):633-41.
- Dorio RJ, Hoek JB, Rubin E. Ethanol treatment selectively decreases neutral amino acid transport in cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 1984;259:11430-35.
- Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tschlis PN. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J* 2002;21(18):4831-40.
- Fantone JC and Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982;107:397.
- Fedi M, Reutens D, Okazawa H, Andermann F, Dubeau F, White C, Nakai A, Gross DW, Andermann E, Diksic M. Localisation value of alpha-methyl-L-tryptophane PET in intractable epilepsy of neocortical origin. *Neurology* 2001;57(9):1629-36.
- Fischman AJ and Alpert NM. FDG-PET in Oncology: There's more to it than looking at pictures. *J Nucl Med* 1993;34:6-11.
- Frost JJ. Receptor localization and quantification with PET. *Radiology*, 1988.
- Fukunaga T, Okazumi S, Koide Y, Isono K, Imazeki K. Evaluation of esophageal cancers using fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET. *J Nucl Med* 1998;39:1002-7.
- Gazzola GC, Dall Asta V, Guidotti GG. The transport of amino acids in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1980;256:929-36.
- Glassy MC, Furlong CE. Neutral amino acid transport during the cell cycle of cultured human lymphocytes. *J Cell Physiol* 1981;107:69-74.
- Graham MM. Combined ¹⁸F-FDG-FDOPA tumor imaging for assessing response to therapy. *J Nucl Med* 2001;42:257-8.
- Gross MW, Weber WA, Feldmann HJ, Bartenstein P, Schwaiger M, Molls M. The value of F-18-fluorodeoxyglucose PET for the 3-D radiation treatment planning of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:989-95.
- Guastadisegni C, Nicolini A, Balduzzi M, Ajmone-Cat M, Minghetti L. Modulation of PGE(2) and TNFalpha by nitric oxide in resting and LPS-activated RAW 264.7 cells. *Cytokine* 2002;19(4):175.
- Haberkorn U, Strauss LG, Kimitrakopoulou A, Engenhardt R, Obersdorfer F, Ostertag H, Rohmann J, van Kaick G. PET-studies of fluorodeoxyglucose metabolism in patients with recurrent colorectal tumors receiving radiotherapy. *J Nucl Med* 1991;32:1485-90.

- Harvey CM, Ellory JC. Identification of amino acid transporters in the red blood cell. *Methods in Enzymology* 1989;173:122-160.
- Heiss P, Mayer S, Herz M, Wester HJ, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo. *J Nucl Med* 1999;40:1367-73.
- Henze M, Mohammed A, Schlemmer HP, Herfarth KK, Hoffner S, Haufe S, Mier W, Eisenhut M, Debus J, Haberkorn U. PET and SPECT for detection of tumor progression in irradiated low-grade astrozytoma: Receiver-operating-characteristic analysis. *J Nucl Med* 2004 Apr;45(4):579-86.
- Hoffman RM. Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. *Anticancer research* 1985;5:1-30.
- Horio M, Yamauchi A, Matsuoka Y, Moriyama T, Fukunaga M, Imai E, Orita Y. Effect of hypertonic stress on amino acid levels and system A activity in rat peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1999;19(2):124-30.
- Huang SC, Quintana J, Satayaurthy N, Lacan G, Yu DC, Phelps ME, Barrio JR. [F-18] Fluoro-beta-fluoromethylene-m-tyrosinederivate show stereo, geometrical, and regio specificities as in vivo central dopaminergic probes in monkeys. *Nucl Med Biol* 1999;26(4):365-70.
- Hubner KF, Purvis JT, Mahaley SM Jr, Robertson JT, Rogers S, Gibbs WD, Kings P, Partain CL. Brain tumor imaging by positron emission computed tomography using 11C-labeled amino acids. *J Comput Assist Tomogr* 1982;6:544-50.
- Hughes JMB. 18F-Fluorodeoxyglucose PET scans in lung cancer. *Thorax* 1996;51:16-22.
- Ishiwata K, Ido T, Abe Y, Matsuzawa T, Iwata R. Tumor uptake studies of S-Adenosyl-L-[Methyl-11C]methionine and L-[Methyl-11C]methionine. *Int J Rad Appl Instrum B* 1988;15:123-6.
- Jager PL, Groen HJ, van der Leest A, van Putten JW, Pieterman RM, de Vries EG, Piers DA. L-3-[123I]iodo-alpha-methyl-tyrosine SPECT in non-small cell lung cancer: preliminary observations. *J Nucl Med* 2001;42:579-85.
- Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, de Vries EGE, Langen KJ, Piers DA. Radiolabeled Amino Acids: Basic Aspects and Clinical Applications in Oncology. *J Nucl Med* 2001;42:432-45.
- Jarosch M, Langen KL, Mühlensiepen H, Hamacher K, Zilles K, Coenen HH. Vergleichende Autoradiographie von O-(2-(18F)-Fluorethyl)-L-Tyrosin und [Methyl-3H]-Methionin im Rattengliommodell. *Nuklearmedizin* 2000;2:A42V157.
- Johnstone RM, Scholefield PG. Amino acid transport in tumour cells. *Adv Cancer Res* 1996;9:143-226.
- Karow T, Lang Ruth. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2000.
- Kaschten B, Stevenaert A, Sadzot B, Deprez M. Preoperative evaluation of 54 gliomas by PET with fluorine-18-Fluorodeoxyglucose and / or Carbon-11-Methionine. *J Nucl Med* 1998;39:778-785.
- Kern KA, Brunetti A. Metabolic imaging of human extremity musculoskeletal tumors by PET. *J Nucl Med* 1988;29:181-86.
- Kilberg MS. Amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *J Membrane Biol* 1982;69:1-12.
- Kilberg MS. System A-mediated amino acid transport: metabolic control at the plasma membrane. *TIBS* 11-April 1986;183-186.
- Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim et Biophys Acta* 1565 (2002);112-122.

- Klasen S, Hammermann R, Fuhrmann M, Lindemann D, Beck KF, Pfeilschifter J, Racke K. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 2001;132:1349-57.
- Kole AC, Plaat BE, Hoekstra HJ, Vaalburg W, Molenaar WM. FDG and L-[1-11C]-tyrosine imaging of soft-tissue tumors before and after therapy. *J Nucl Med* 1999;40:381-6.
- Kotzerke J, Guhlmann A, Moog F, Frickhofen N, Reske SN. 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.
- Kubota K, Ito M, Fukuda H, Abe Y, Ito K, Fujiwara T, Yoshioka S, Hatazawa J, Matsuzawa T, Iwata R, et al. Cancer diagnosis with positron computed tomography and carbon-11-labelled L-methionine. *Lancet* 1983;19:1192.
- Kubota K, Yamada K, Fukada H. Tumor detection with carbon-11-labelled amino acids. *Eur J Nucl Med* 1984;9:136-140.
- Kubota K, Matsuzawa T, Ito M, Fujiwara T, Abe Y, Yoshioka S, Fukuda H, Hatazawa J, Iwata R. Lung tumor imaging by positron emission tomography using C-11-L-methionine. *J Nucl Med* 1985;26:37-42.
- Kubota K, Matsuzawa T, Fujiwara T. Differential diagnosis of lung tumor with positron emission tomography: a prospective study. *J Nucl Med* 1990;31:1927-1933.
- Kubota K, Ishiwata D, Kubota R, Yamada S, Tada M, Sato T, Ido T. Tracer feasibility for monitoring tumor radiotherapy; a quadruple tracer study with fluorine-18-fluorodeoxyglucose or fluorine-18-fluorodeoxyuridine, L-[methyl-14C]methionine, [6-3H]thymidine, and gallium-67. *J Nucl Med* 1991;32:2118-23.
- Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Iwata R, Tamahashi N. Methionine uptake by tumor tissue: a microautoradiographic comparison with FDG. *J Nucl Med* 1995;36:484-92.
- Kubota K, Ishiwata K, Kubota R, Yamada S, Takahashi J, Abe Y, Fukuda H, Ido T. Feasibility of fluorine-18-fluorophenylalanine for tumor imaging compared with carbon-11-L-methionine. *J Nucl Med* 1996;37:320-5.
- Lahoutte T, Caverliers V, Franken PR, Bossuyt A, Mertens J, Everaert H. Increased Tumor Uptake of 3-123I-Iodo-L- α -Methyltyrosine After Preloading with Amino Acids: An in Vivo Animal Imaging Study. *J Nucl Med* 2002;43:1201-1206.
- Langen KJ, Ziemons K, Kiwit CW, Herzog H, Kuwert T, Bock WJ, Stocklin G, Feindegen LE, Mueller-Gartner HW. 3-[I-123]iodo-methyltyrosine and [methyl-C-11]-L-methionine uptake in cerebral gliomas: a comparative study using SPECT and PET. *J Nucl Med* 1997;38:517-22.
- Langen KJ, Mühlensiepen H, Holschbach M, Hautzel H, Jansen P, Coenen HH. Transport Mechanisms of 3-[¹²³I]iodo- α -Methyl-L-Tyrosine in a Human Glioma Cell Line: Comparison with [³H-methyl]-L-Methionine. *J Nucl Med* 2000;41:1250-55.
- Langen KJ, Borner AR, Müller-Mattheis V, Hamacher K, Herzog H, Ackermann R, Coenen HH. Uptake of cis-4-[¹⁸F]fluoro-L-proline in urologic tumors. *J Nucl Med* 2001;42:752-54.
- Larabee AR, Hatch FI, Cathou RE, Buchanan JM. Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine. Identification of the enzymes and cofactors involved in the system isolated from *E. coli*. *J Biol Chem* 1961;236:1095-101.
- Larson SM. Cancer or inflammation? A holy grail for nuclear medicine. *J Nucl Med* 1994;35:1653-4.
- Laverman P, Boerman OC, Corstens FHM, Oyen WJG. Fluorinated amino acids for tumor imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 2002;29:681-690.
- Lehninger AL. *Biochemistry*, 2nd edn. New York: Worth, 1976.

- Leskinen-Kallio S, Nagren K, Lehtikoinen P, Ruotsalainen U, Joensuu H. Uptake of C-11-methionine in breast cancer studied by PET: an association with the size of S-phase fraction. *Br J Cancer*. 1991;64:1121-1124.
- Leskinen-Kallio S, Ruotsalainen U, Nagren K, Teras M, Juensuu H. Uptake of carbon-11-methionine and fluorodeoxyglucose in Non-Hodgkin's Lymphoma: a PET study. *J Nucl Med* 1991;32:1211-18.
- Leskinen-Kallio S, Nagren K, Lehtikoinen P, Ruotsalainen U, Teras M, Joensuu H. Carbon-11-methionine and PET is an effective method to image head and neck cancer. *J Nucl Med* 1992;33:691-5.
- Leskinen-Kallio S. [¹¹C] Methionine-PET for Non-CNS-Tumors. *Proc. of the 2nd Int Symp on PET in oncology*. 1993;Mai 16-18 Sendai Japan. S. 123-6.
- Lewis SEM, Goldspink DF. Characteristics of α -aminobutyric acid transport in rat skeletal muscles. *Biochem J* 1984;221:71-79.
- Li YH, Yan ZQ, Brauner A, Tullus K. Activation of macrophage nuclear factor-kappaB and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS. *Respir Res* 2002;3(1):23.
- Lin G, Mc Cormick JI, Johnstone RM. Differential of two classes of "A" system amino acid transporters. *Arch Biochem et Biophys* 1994;312:308-315.
- Lindholm P, Leskinen S, Lapela M. Carbon-11-methionine uptake in squamous cell head and neck cancer. *J Nucl Med* 1998; 39:1393-7.
- Lowe VJ, Fletcher JW, Gobar L, Lawson M, Kirchner P, Valk P, Karis, J, Hubner K, Delbeke D, Heiberg EV, Patz EF. Prospective investigation of positron emission tomography in lung nodules. *J Clin Oncol* 1998;16:1075-84.
- Maroni BJ, Karapanos G, Mitch WE. System A amino acid transport in incubated muscle: effects of insulin and acute uremia. *Am J Physiol* 1986;251:F74-F80.
- Maroni BJ, Karapanos G, Mitch WE. System ASC and sodium-independent neutral amino acid transport in muscle of uremic rats. *Am J Physiol* 1986;251:F81-F86.
- Matthews RH, Sardovia M, Lewis NJ, Zand R. Biphasic kinetic plots and specific analogs distinguishing and describing amino-acid transport sites in S37 ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1975;394(2):182-192
- Minn H, Clavo AC, Wahl RL. Influence of hypoxia on tracer accumulation in squamous-cell carcinoma: In vitro evaluation for PET imaging. *Nucl Med Biol* 1996;23(8):941-946.
- Mitsumoto Y, Sato K, Ohyashiki T, Mohri T. Leucine-Proton Cotransport System in Chang liver cells. *J Biol Chem* 1983 ;261 :4549-4554.
- Moon DH, Maddahi J, Silverman DHS, Glaspy JA, Phelps ME, Hoh CK. Accuracy of whole-body fluorine-18-FDG PET for the detection of recurrent or metastatic breast carcinoma. *J Nucl Med* 1998;39:431-435.
- Muniz R, Burguillo L, Del Castillo JR. Effect of starvation on neutral amino acid transport in isolated small-intestinal cells from guinea pigs. *Pflügers Arch* 1993;423:59-66.
- Nicklin P, Irwin JI, Hassan IF, Mackay M. Proline uptake by monolayers of human intestinal absorptive (Caco-2) cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992;1104:283-292.
- Nishii R, Kawai K, Garcia Flores L2nd, Kataoka H, Jinnouchi S, Nagamachi S, Arano Y, Tamura S. A novel radiopharmaceutical for detection of malignant melanoma, based on melanine formation: 3-iodo-4-hydroxyphenyl-L-cysteine. *Nucl Med Commun*. 2003 May;24(5):575-82.
- Novak DA, Kilberg MS, Beveridge MJ. Ontogeny and plasma-membrane domain localization of amino acid transport system L in rat liver. *Biochem J* 1994;301:671-4.

- Nuutinen J, Leskinen S, Lindholm P, Söderström KO, Nagren K, Huhtala S, Minn K. Use of carbon-11-methionine positron emission tomography to assess malignancy grade and predict survival in patients with lymphomas. *Eur J Nucl Med* 1998;25:729-35.
- Okazumi S, Isono K, Enomoto K. Evaluation of liver tumors using fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET: characterization of tumours and assessment of effect of treatment. *J Nucl Med* 1992;33:339.
- Ott K, Weber WA, Fink U, Schwaiger M, Siewert JR. Responseevaluation durch Positronenemissionstomographie (PET) im Rahmen der neoadjuvanten Therapie Monitoring of response to neoadjuvant therapy by positron emission tomography. *Der Chirurg-Abstract Vol. 72 Issue 9 (2001) pp 1003-1009.*
- Oxender DL, Lee M, Moore PA, Cecchini G. Neutral amino acid transport systems of tissue culture cells. *J Biol Chem* 1977;8:2675-2679.
- Oxender DL, Lee M, Cecchini G. Regulation of amino acid transport activity and growth rate of animal cells in culture. *J Biol. Chem* 1977;252:2680-83.
- Paans AM, Pruijm J, Smit GPA, Visser G, Willemsen ATM, Ullrich K. Neurotransmitter positron emission tomographic-studies in adults with phenylketonuria, a pilot study. *Eur J Pediatr.* 1996;155 Suppl 1:78-81.
- Pauleit D, Floeth F, Tellmann L, Hamacher K, Hautzel H, Müller HW, Coenen HH, Langen KJ. Comparison of O-(2-18F-fluoroethyl)-L-tyrosine PET and 3-123I-iodo-alpha-methyl-L-tyrosine SPECT in brain tumors. *J Nucl Med.* 2004 Mar;45(3):374-81
- Pfeiffer R, Spindler B, Löffing J, Skelly PJ, Shoumaker CB, Verrey F. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 1998;439:157-62.
- Präuer H, Weber W, Römer W, Treumann T, Ziegler S, Schwaiger M. Evaluation of pulmonary nodules by positron emission tomography using the glucose analogue fluorine-18-fluorodeoxyglucose (FDG). A controlled prospective study in 50 patients. *Br J Surg* 1998;85:1506-11.
- Präuer HW, Weber WA, Römer W, Treumann T, Ziegler SI, Schwaiger M. Controlled prospective study of positron emission tomography using the glucose analogue [18F]fluorodeoxyglucose in the evaluation of pulmonary nodules. *Br J Surg* 1998;85:1506-11.
- Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, Ganapathy V. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: Molecular cloning and transport function. *Biochem et Biophys Res Commun* 1999;255:283-8.
- Prujm J, Willemsen AT, Molenaar WM, van Waarde A, Paans AM, Heesters MA, Go KG, Visser GM, Franssen EJ, Vaalburg. Brain tumor: L-[1-C-11]tyrosine PET for visualization and quantification of protein synthesis rate. *Radiology* 1995;197:221-6.
- Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 257. neu bearb. Aufl., WDEG-Verlag, ISBN 3-11-012692-3.
- Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a Na⁺-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. *Biochem et Biophys Acta* 2000;1463:6-14.
- Rau FC, Weber WA, Wester HJ, Herz M, Becker I, Kruger A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. O-(2-[(18)F]Fluoroethyl)-L-tyrosine (FET): a tracer for differentiation of tumor from inflammation in murine lymph nodes. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29(8):1039-46.
- Riemann B, Stögbauer F, Kopka K, Halfter H, Lasic M, Schirmacher A, Kuwert T, Wechesser M, Ringelstein EB, Schober O. Kinetics of 3-[123I]iodo-L- α -methyltyrosine transport in rat C6 glioma cells. *Eur J Nucl Med* 1999;26:1274-78.

- Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, Benoit T, Foidart-Willems J. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* 1996;23:1641-74.
- Rodriguez M, Rehn S, Ahlström H, Sundström C, Glimelius B. Predicting malignancy grade with PET in Non-Hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med* 1995;36:1790-6.
- Römer W, Hanauske AR, Ziegler S, Thödtmann R, Weber W, Fuchs C, Enne W, Herz M, Nerl C, Garbrecht M, Schwaiger M. Positron emission tomography in Non-Hodgkin-Lymphoma: assessment of chemotherapy with fluorodeoxyglucose. *Blood* 1998;91:4464-4471.
- Saier MH Jr, Daniels GA, Boerner P, Lin J. Neutral amino acid transport systems in animal cells: potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth. *J Membr Biol* 1988;104:1-20.
- Samnick S, Richter S, Romeike BF, Heimann A, Feiden W, Kempfski O, Kirsch CM. Investigation of iodine-123-labelled amino acid derivatives for imaging cerebral gliomas: uptake in human glioma cells and evaluation in stereotactically implanted C6 glioma rats. *Eur J Nucl Med* 2000;27:1543-51.
- Samnick S, Bader JB, Hellwig D, Moringlane JR, Alexander C, Romeike BF, Feiden W, Kirsch CM. Clinical value of iodine-123-alpha-methyl-L-tyrosine single-photon emission tomography in the differential diagnosis of recurrent brain tumor in patients pretreated for gliomas at follow-up. *J Clin Oncol* 2002;20:396-404.
- Samnick S, Romeike B, Kubuschok B, Hellwig D, Amon M, Feiden W, Menger M, Kirsch C. p-[123]iodo-L-phenylalanine for detection of pancreatic cancer: basic investigations of the uptake characteristics in primary human pancreatic tumour cells and evaluation in in vivo models of human pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:532-541
- Sass G, Heinlein S, Agli A, Bang R, Schumann J, Ti G. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* 2002;19(3):115.
- Scanion K, Berkowitz K, Pallai M, Waxman S. Inhibition of methionine transport by methotrexate in mitogen stimulated human lymphocytes. *Cancer Treat Rep* 1983;67:631-9.
- Schaider H, Haberkorn U, Berger M, Oberdorfer F, Morr I, van Kaick G. Application of α -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* 1995;23:55-60.
- Schmidt D, Gottwald U, Langen KJ, Weber F, Hertel A, Floeth F, Felsberg J, Reifenberger G, Coenen HH, Muller-Gartner HW. 3-[123]iodo-alpha-methyl-L-tyrosine uptake in cerebral gliomas: relationship to histological grading and prognosis. *Eur J Nucl Med* 2001;28:855-61.
- Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto KI, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 1999;274:19745-51.
- Senekowitsch R, Pabst HW. Einsatz der Positronen-Emissions-Tomographie in der Onkologie. *Münch. med. Wschr.* 1992;134:42-50.
- Shotwell MA, Jayme DW, Kilberg MS, Oxender DL. Neutral amino acid transport systems in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1981;256:5422-27.
- Shotwell MA, Kilberg MS, Oxender DL. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1983;737:267-84.
- Shreve PD, Anzai Y, Wahl RL. Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG PET imaging: physiologic and benign variants. *Radiographics* 1999;19:61-77.

- Sorensen J, Savitcheva I, Engler H, Langstrom B. Utility of PRT and ¹¹C-methionine in the paediatric brain tumors. *Clin Positron Imaging* 2000;3:157.
- Sossi V, de La Fuente-Fernandez R, Holden JE, Doudet DJ, McKenzie J, Stoessl AJ, Ruth TF. Increase in dopamine turnover occurs early in Parkinson's disease: evidence from a new modelling approach to PET ¹⁸F-fluorodopa data. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22(2):232-9.
- Souba WW and Pacetti AJ. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *J Parenter Enteral Nutr* 1992;16:569-78.
- Strauss LG. Fluorine-18 deoxyglucose and false positive results: a major problem in the diagnostics of oncology. *Oncologist* 1997;2:381-8.
- Tahara T, Ichiya Y, Kuwabara Y. High fluorodeoxyglucose uptake in abdominal abscesses : a PET study. *J Comp Assist Tomog* 1989;13:829-31.
- Tang GH, Wang MF, Tang XL, Luo L, Gau MQ. Synthesis and radiopharmacology of S-(2-¹⁸F-fluoroethyl)-L-methionine for tumor imaging. *Yao Xue Xue Bao* 2003 Dec; 38(12):915-8.
- Tomiyoshi K, Inoue T, Higuchi T, Ahmed K, Sarwar M, Alyafei S, Zhang H, Matsubara K, Endo K, Yang D. Metabolic studies of [¹⁸F- α -methyl]tyrosine in mice bearing colorectal carcinoma LS-180. *Anticancer Drugs* 1999;10:329-36.
- Torizuka T, Clavo AC, Wahl RL. Effect of hyperglycemia on in vitro tumor uptake of tritiated FDG, thymidine, L-methionine and L-leucine. *J Nucl Med* 1997;38:382-386.
- Vaalburg W, Coenen HH, Crouzel C, Elsinga PH, Langstrom B, Lemaire C, Meyer GJ. Amino acids for the measurement of protein synthesis in vivo by PET. *Int J Rad Appl Instrum B* 1992;19:227-37.
- Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier Jr. MH, Pfeiffer R. New Glycoprotein-Associated Amino Acid Transporters. *J Membrane Biol* 1999;172:181-192.
- Wahl RL. Targeting glucose transporters for tumor imaging: „sweet“ idea, „sour“ result. *J Nucl Med* 1996;37:1038-41.
- Wallace WE, Gupta NC, Hubbs AF, Mazza SM, Bishop HA, Keane MJ, Battelli LA, Ma J, Schleiff P. Cis-4-[(¹⁸F)fluoro-L-proline PET imaging of pulmonary fibrosis in a rabbit model. *J Nucl Med* 2002;43(3):413-20.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Sciences* 1956;123:309-14.
- Warburg O. *The metabolism of tumors*. London: Constabel & Co.;1930.
- Weber W, Bartenstein P, Groß M, Kinzel D, Daschner M, Feldman HJ, Reidel G, Ziegler SI, Lumenta C, Rolls M, Schwaiger M. Fluorodeoxyglucose PET and I-123- α -methyl-tyrosine SPECT in the evaluation of brain tumors. *J Nucl Med* 1997;38:802-8.
- Weber WA, Avril N, Schwaiger M. Relevance of positron emission tomography (PET) in oncology. *Stahlenther Onkol* 1999;175:356-73.
- Weber WA, Neverve J, Sklarek J, Ziegler SI, Bartenstein P, King B, Treumann T, Enterrottacher A, Krapf M, Häußinger KE, Lichte H, Präuer HW, Thetter O, Schwaiger M. Imaging of lung cancer with fluorine-18-fluorodeoxyglucose: Comparison of a dual-head gamma camera in coincidence mode with a full-ring positron emission tomography system. *Eur J Nucl Med* 1999;26:388-95.
- Weber WA, Wester HJ, Grosu Anca L, Herz M, Dzewas B, Feldmann HJ, Molls M, Stöcklin G, Schwaiger M. O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine and L-(methyl-¹¹C)methionine uptake in brain tumors: initial results of a comparative study. *Eur J Nucl Med* 2000;27:542-9.

- Weber WA, Dick S, Reidl G, Dzewas B, Busch R, Feldmann HJ, Molls M, Lumenta CB, Schwaiger M, Grosu AL. Correlation between postoperative 3-[¹²³I]iodo-L- α -methyltyrosine uptake and survival in patients with gliomas. *J Nucl Med* 2001;42:1144-1150.
- Weckesser M, Matheja P, Schwarzrock A, Rickert G, Strater R, Palkovic S, Riemann B, Kopka K, Ludemann P, Paulus W, Wassmann H, Schober O. Prognostic significance of amino acid transport imaging in patients with brain tumors. *Neurosurgery* 2002;50:958-64.
- Weissbach L, Handlogten ME, Christensen HN, Kilberg MS. Evidence for two Na⁺-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1982;257:12006-11.
- Wester HJ, Herz M, Weber W, Heiss P, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Stöcklin G. Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J Nucl Med* 1999;40:205-12.
- Wester HJ, Herz M, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Stöcklin G, Hamacher K. Preclinical evaluation of 4-[¹⁸F]fluoroprolines: Diastereomeric effect on metabolism and uptake in mice. *Nucl Med Biol* 1999;26:259-265.
- White MF, Christensen HN. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. *J Biol Chem* 1982;257:4450-4457.
- White MF, Christensen HN. The two-way flux of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells is largely explained by a single transport system. *J Biol Chem* 1982;257:10069-80.
- White MF. Kinetic parameters of neutral amino acid transport in hybrids between malignant and non-malignant cells. *J Cell Sci* 1984;67:63-68.
- Wieder H, Ott K, Zimmermann F, Nekarda H, Stollfuss J, Watzlowik P, Siewert JR, Fink U, Becker K, Schwaiger M, Weber WA. PET imaging with [(11)C]methyl-L-methionine for therapy monitoring in patients with rectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29(6):789-96.
- Wienhard K, Herholz K, Coenen HH, Kling RP, Stöcklin G, Heiss WD. Increased amino acid transport into brain tumors measured by PET of 2-[¹⁸F]fluorotyrosine. *J Nucl Med* 1991;32:1338-46.
- Wiesel FA, Blomquist G, Halldin C, Sjögren I, Bjerkenstedt L, Venizelos N, Hagenfeldt L. The transport of tyrosine into the human brain as determined with L-[1-¹⁴C]tyrosine and PET. *J Nucl Med* 1991;32:2043-49.
- Winkle van LJ, Campione AL, Gorman JM. Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by process which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 1988;263:3150-63.
- Wolf B, Schirmacher R, Forster GJ, Bartenstein P, Rösch F. Synthesis of C¹-[¹⁸F]fluoroethylamino asparagine for imaging cancer. *J Labelled Cpd Radiopharm* 2001;44:365-7.
- Woodlock TJ, Chen X, Young DA. Association of HSP60-like proteins with the L-system amino acid transporter. *Archives of biochem. a. biophys.* 1997;338:50-56.
- Yao SYM, George R, Young JD. Reconstitution studies of amino acid transport system L in rat erythrocytes. *Biochem J* 1993;292:665-668.
- Yasuda S, Shohtsu A, Die M, Takagi S, Kijima H, Horiuchi M. Elevated F-18 FDG uptake in plasmacyte-rich chronic maxillary sinusitis. *Clin Nucl Med* 1998;23:176-8.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aminosäure-Tracer-Strukturformeln. Die rote Markierung stellt die substituierte Fluorethylgruppe, die blauen Markierungen die jeweiligen Nuklide dar.....	18
Abbildung 2: Schichtung der Zellschichten nach Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem Gradienten (frei nach Pharmacia Biotechnology).....	20
Abbildung 3: Darstellung der Zellschichten nach Dichtegradienten-Zentrifugation mit zwei Gradienten (frei nach Pharmacia Biotechnology).....	21
Abbildung 4: Nativaufnahme von SW707-Tumorzellen.....	22
Abbildung 5: Makrophagen unstimuliert (Nativaufnahme), 2 Stunden nach Isolation und Absaugung der Lymphozyten.	24
Abbildung 6: Makrophagen (Nativaufnahme), 2 Tage nach Stimulation mit 100ng/ml LPS. Zu beachten sind hier die kleinen, vielgestaltigen Fortsätze (siehe Pfeile) der länglichen Makrophagen, die sich erst nach Stimulation ausbilden.....	24
Abbildung 7: Lymphozyten (Nativaufnahme), unstimuliert.....	25
Abbildung 8: Lymphozyten (Nativaufnahme), 1 Tag nach Stimulation mit 0,25mg/ml ConA. Man beachte die Zusammenballung der Lymphozyten, die nur nach Stimulation auftritt.	25
Abbildung 9: Met-Aufnahme (in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein) unstimulierter, stimulierter Lymphozyten, Makrophagen und SW707-Tumorzellen ($\text{MW}\pm\text{SD}$; $n=5$)...	36
Abbildung 10: Michaelis-Menten-Kinetik von Met bei Lymphozyten.....	37
Abbildung 11: Michaelis-Menten-Kinetik von Met bei SW707.....	38
Abbildung 12: Michaelis-Menten-Kinetik von Met bei Makrophagen.....	38
Abbildung 13: pH-Abhängigkeit der Met-Aufnahme bei Makrophagen und Lymphozyten.....	39
Abbildung 14: pH-Abhängigkeit der Met-Aufnahme bei SW707.....	40
Abbildung 15: Hemmung der Met-Aufnahme in SW707-Tumorzellen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (% der Kontrolle); $\text{WM}\pm\text{SD}$; $n=5$	41
Abbildung 16: Hemmung der Met-Aufnahme in Lymphozyten durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (% der Kontrolle); $\text{WM}\pm\text{SD}$; $n=5$	41
Abbildung 17: Hemmung der Met-Aufnahme in Makrophagen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (% der Kontrolle); $\text{WM}\pm\text{SD}$; $n=5$	42

Abbildung 18: O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl-L-Tyrosin-(FET)-Aufnahme in µg FET/mg Zellprotein unstimulierter und stimulierter Lymphozyten, Makrophagen und SW707-Tumorzellen (MW±SD, n=5).....	43
Abbildung 19: Michaelis-Menten-Kinetik von FET bei Lymphozyten.....	45
Abbildung 20: Michaelis-Menten-Kinetik von FET bei SW707	45
Abbildung 21: Michaelis-Menten-Kinetik von FET bei Makrophagen.....	46
Abbildung 22: pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme bei Makrophagen und Lymphozyten (in % des Maximalwertes).....	47
Abbildung 23: pH-Abhängigkeit der FET-Aufnahme bei SW707 (in % des Maximalwertes).....	47
Abbildung 24: Hemmung der FET-Aufnahme in SW707-Tumorzellen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (in % der Kontrolle); MW±SD, n=5	48
Abbildung 25: Hemmung der FET-Aufnahme in Lymphozyten durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (in % der Kontrolle); MW±SD, n=5	48
Abbildung 26: Hemmung der FET-Aufnahme in Makrophagen durch spezifische AS-Transport-Inhibitoren (in % der Kontrolle); MW±SD, n=5	49
Abbildung 27: Absolute FET- bzw. Met-Aufnahme der untersuchten Zellen in µg Aminosäure/mg Zellprotein (n=5).....	51

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für PET-Studien in der Onkologie verwendete Radiopharmazeutika [Weber et al., 1999].....	5
Tabelle 2: Messbereich der Durchmesser verschiedener Zellen mittels Casy- Zellzählgerät	27
Tabelle 3: Met-Verdünnungsreihe zur Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik ...	30
Tabelle 4: FET-Verdünnungsreihe zur Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik...	31
Tabelle 5: Standard-Protein-Messreihe zur Zellprotein-Bestimmung nach Bradford	32
Tabelle 6: Met-Aufnahme in Tumor- und Entzündungszellen	36
Tabelle 7: Hemmwirkung der spezifischen Aminosäuretransporter-Inhibitoren auf die Methioninaufnahme der untersuchten Zellen (MW±SD)	42
Tabelle 8: FET-Aufnahme in Tumor- und Entzündungszellen.....	44
Tabelle 9: V_{max} , $V_{max}/2$ und K_M der FET-Michaelis-Menten-Kinetik für die untersuchten Zellen.....	46
Tabelle 10: Hemmwirkung der spezifischen Aminosäuretransporter-Inhibitoren auf die FET-Aufnahme der untersuchten Zellen	49
Tabelle 11: Absolute FET- bzw. Met-Aufnahme der untersuchten Tumor- und Entzündungszellen.....	50

10 Abkürzungsverzeichnis

AdoMet	S-Adenosyl-Methionin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriophosphat
BCH	2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure
Bq	Bequerel (1 radioaktiver Zerfall pro Sekunde)
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ radioaktive Zerfälle pro Sekunde)
ConA	Concanavalin A
CPM	count per minute
CT	Computertomographie
DMS	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
eV	Elektronenvolt
FDG	^{18}F -Fluor-2-deoxy-D-Glucose
6-FDOPA	6- ^{18}F Fluoro-L-dihydroxyphenylalanine
FET	0-(2- ^{18}F Fluoroethyl)-L-Tyrosin
FKS	fetales Kälberserum
GLUT	Glukosetransportprotein
HWZ	physiologische Halbwertszeit
IMT bzw ^{123}I -IMT	^{123}I - α -Methyl-L-Tyrosin
ITIC	L-[^{123}I]iodo-1,2,3,4-tetrahydro-7-hydroxyisoquinoline-3-carboxylic acid
K_M	Michaelis-Konstante
LPS	Lipopolysaccharid
MeAIB	α -(Methylamino)-Isobuttersäure
Met	L-[Methyl- ^3H]Methionin bzw ^{11}C -L-Methionin
min	Minute
ml	Milliliter

MRT bzw. MR	Magnet-Resonanz-Tomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
PBS	Phosphatpuffer
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
V_{\max}	maximale Transportgeschwindigkeit

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater, der von Anfang an großen Wert darauf legte, mir Wissen und Bildung zu vermitteln, der mir immer ein Vorbild war, wenn es darum ging sich Herausforderungen zu stellen und Durchhaltevermögen zu zeigen, dabei aber nie die Menschlichkeit und Liebenswürdigkeit auf der Strecke zu lassen.

Vielen Dank an meine Mutter, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, mir immer ein schönes Zuhause bot und mir den, im Leben nötigen Pragmatismus nahebrachte.

Vielen Dank für mentale und natürlich auch finanzielle Unterstützung!

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. phil. Dr. med. Reingard Senekowitsch-Schmidtke bedanken, die es stets verstand, mich mit ihrer mitreißenden und fröhlichen Art zu motivieren, mir in den Labors der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte und mir überdies die Möglichkeit gab auf nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen, um die Ergebnisse meiner Arbeit zu präsentieren. Auf ihre Unterstützung konnte ich immer zählen.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Michael Herz bedanken, der mir sowohl mit Rat (wenn es um die Berechnung von radioaktiven Zerfällen ging) und Tat (wenn es um meine Versorgung mit radioaktiven Substanzen aus dem Zyklotron ging) zur Seite stand.

Ein ganz herzliches „Danke Schön“ geht an dieser Stelle auch an Frau Ursula Grünwald, die keine Diskussion mit mir scheute, die mir stets mit zahlreichen Anregungen und Erklärungen zu Seite stand und mir in den Monaten bzw. Jahren der Zusammenarbeit eine gute Freundin geworden ist.

Danke an Harriet Philippi für Hilfestellungen geistiger und praktischer Art.

Danke auch an alle Mitglieder des Laborteams. In diesem Rahmen war es immer möglich ein nettes Gespräch zu führen, die ein oder andere „Frustinette“ zu essen oder einfach zu lachen und zu weinen.