

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
Granulozyten, Lymphomzellen und Astrozytomzellen

Ursula Tanase

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 20.12.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007 angenommen.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	8
1 <u>Einleitung und Zielsetzung</u>	10
2 <u>Grundlagenwissen/ Literaturübersicht</u>	13
2.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in der Onkologie	13
2.1.1 Technik	13
2.1.2 Indikationen	15
2.1.3 Vergleich mit anderen bildgebenden Verfahren	16
2.2 PET-Tracer	17
2.2.1 [¹⁸ F]Fluor-2-Deoxy-D-Glukose (FDG)	17
2.2.2 Aminosäuretracer	19
2.2.2.1 Methionin (Met)	20
2.2.2.2 O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl-L-Tyrosin (FET)	23
2.3 Transmembraner Aminosäuretransport	27
2.3.1 Natriumabhängige Transportsysteme	29
2.3.2 Natrium-unabhängige Transportsysteme	31
2.3.3 Transporter-Gene und –Proteine	36
3 <u>Material</u>	43
3.1 Chemikalien	43
3.2 Aminosäuren	43
3.3 Zellen	44
3.4 Pufferlösungen, Medien und Zusätze	44
3.5 Geräte	45
3.6 Sonstiges	45
4 <u>Methodik</u>	46
4.1 Bereitstellung der verwendeten Zellen	46
4.1.1 Gewinnung von humanen Granulozyten	46
4.1.2 Gliomzellen	47
4.1.3 Lymphomzellen	48
4.1.4 Einfrieren der Zellen	49
4.1.5 Auftauen der Zellen	49

4.1.6	Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau	50
4.1.7	Zellzahlbestimmung	50
4.2	Standard-Versuchsablauf	51
4.3	Durchführung der Versuche	55
4.3.1	Vergleich der Aufnahme von MET und FET in verschiedene Zellen	55
4.3.1.1	Aufnahme von MET in verschiedene Zellen	55
4.3.1.2	Aufnahme von FET in verschiedene Zellen	55
4.3.2	Aufnahme von MET und FET in stimulierte Granulozyten	56
4.3.3	Aufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten	56
4.3.4	Hemmstoff-Versuche	57
4.3.5	Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen	58
4.3.5.1	Einfluss der Met-Konzentration auf die Aufnahme von MET	59
4.3.5.2	Einfluss der Fluorethyl-L-Tyrosin-Konzentration auf die Aufnahme von FET	59
4.3.6	Abhängigkeit der Aufnahme von der Inkubationszeit	60
4.3.7	Michaelis-Menten-Kinetik	60
5	Ergebnisse	62
5.1	Vergleich der Aufnahme von MET und FET in verschiedene Zellen	62
5.1.1	Aufnahme von MET in verschiedene Zellen	62
5.1.2	Aufnahme von FET in verschiedene Zellen	64
5.1.3	Vergleich der Quotienten aus der Aufnahme von MET und FET in Tumorzellen und Granulozyten	65
5.2	Aufnahme von MET und FET in stimulierte Granulozyten	66
5.2.1	MET-Aufnahme in stimulierte Granulozyten	66
5.2.2	FET-Aufnahme in stimulierte Granulozyten	67
5.3	Aufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten	67
5.3.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Aufnahme von MET	67
5.3.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Aufnahme von FET	69
5.4	Hemmstoff-Versuche	70
5.4.1	Einfluss spezifischer Hemmstoffe auf die Aufnahme von MET	70
5.4.2	Einfluss spezifischer Hemmstoffe auf die Aufnahme von FET	71
5.5	Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen	72
5.5.1	Einfluss der Met-Konzentration auf die Aufnahme von MET	72
5.5.2	Einfluss der Fluorethyl-L-Tyrosin-Konzentration auf die Aufnahme von FET	76
5.5.3	Vergleich der Sättigbarkeit der Aufnahme von MET und FET	79

5.6	Abhängigkeit der Aufnahme von der Inkubationszeit	81
5.6.1	MET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	81
5.6.2	FET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	83
5.7	Michaelis-Menten-Kinetik	85
5.7.1	Michaelis-Menten-Kinetik für die Aufnahme von MET	85
5.7.2	Michaelis-Menten-Kinetik für die Aufnahme von FET	89
5.7.3	Vergleich der Aufnahmekinetiken für MET und FET	93
6	<u>Diskussion</u>	Seite 95
7	<u>Zusammenfassung</u>	Seite 111
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	Seite 113
9	<u>Veröffentlichung</u>	Seite 127
10	<u>Danksagung</u>	Seite 128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AS	Aminosäure
ATA	Amino Acid Transporter A; Aminosäure-Transporter A
ATB ^{0,+}	Amino Acid Transporter B ^{0,+} ; Aminosäure-Transporter B ^{0,+}
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-spaltendes Enzym
BAT	Broad Scope Transport Proteins; Aminosäure-Transporterklasse mit breiter Substratspezifität
BCH	2-aminobicyclo-[2,2,1]-heptane-2-carboxylic acid; = 2-Amino-2-Norbornan Carboxylsäure
Bq	Bequerel
CAT	Cationic Amino Acid Transporter; Transporter für kationische Aminosäuren
Ci	Curie
CPM	Counts per minute; Zähleinheiten pro Minute
CT	Computer Tomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter; Exzitatorische Aminosäuretransporter
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
FDG	[¹⁸ F]Fluor-2-Deoxy-D-Glukose
FET	O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl-L-Tyrosin
FET*	Fluorethyl-L-Tyrosin
FKS	Fetales Kälberserum
FMT	L-3-[¹⁸ F]Fluor- α -Methyltyrosin
FTyr	L-2-[¹⁸ F]Fluortyrosin
GLYT	Glycin Transporter
gpaAT	glycoprotein associated Amino Acid Transporter; Glykoprotein-assoziierte Aminosäuretransporter
HAT	Heterodimeric Amino Acid Transporter; heterodimerische Aminosäuretransporter
HWZ	Halbwertszeit
IMT	3- ¹²³ I-Jod- α -Methyl-L-Tyrosin
kBq	kilo Bequerel
kDa	kilo Dalton
keV	kilo Elektronenvolt
K _m	Michaelis-Konstante
L	Liter

LAT	L-type amino acid transporter/ Large neutral amino acid transporter; L-Typ Aminosäuretransporter
LPS	Lipopolysaccharid
MeAIB	Alpha-(Methylamino)-iso-Buttersäure
MET	L-[Methyl- ³ H]-Methionin
Met	L-Methionin
¹¹ C-Met	L-[Methyl- ¹¹ C]Methionin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonuclein Acid; Boten-Ribonukleinsäure
MRS	Magnet Resonanz Spektroskopie
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
mSv	Milli Sievert
NaPyr	Natriumpyruvat
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer; Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatpuffer-Lösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronen Emissions Tomographie
PET/CT	Kombinationsverfahren aus PET und CT
PET/MRT	Kombinationsverfahren aus PET und MRT
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RPMI	(Zellkulturmedium des) Roswell Park Memorial Institute
SLC	solute carrier Genfamilie
SNAT	sodium-coupled neutral amino acid transporter; natriumabhängige Transporter für neutrale Aminosäuren
SPECT	single photon emission computed tomography; Einzelphotonen- Emissions-Tomographie
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tab	Tabelle
TNFα	Tumornekrosefaktor Alpha
Tyr	Tyrosin
¹¹ C-Tyr	L-[¹¹ C]-Tyrosin
V _{max}	Grenzwert der Aufnahmegeschwindigkeit
ZP	Zellprotein

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die spezifische Unterscheidung von Tumor und Entzündung ist bis heute ein weitgehend ungelöstes Problem in der nuklearmedizinischen Tumordiagnostik. Zwar ist die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) im Bereich der Onkologie zunehmend im klinischen Alltag etabliert und gilt in vielen Fragestellungen als die sensitivste Untersuchungsmethode, doch schränken falsch positive Resultate die diagnostische Genauigkeit ein [Fisher & Mortensen 2006], [Uchida et al. 2005], [Voth et al. 2003], [Albes et al. 2002], [Diederichs et al. 1999]. Der am häufigsten eingesetzte PET-Tracer [^{18}F]Fluor-2-Deoxy-D-Glukose (FDG) zeigt sowohl im Experiment [Zhang et al. 2006], [Spaeth et al. 2004], [Rau et al. 2002], [Kaim et al. 2002a], [Sugawara et al. 1999], [Yamada et al. 1995], [Kubota et al. 1992] als auch am Patienten [Fisher & Mortensen 2006], [Strauss 2000], [Bakheet 2000 a/b], [Tahara et al. 1989] eine starke Anreicherung in Entzündungszellen und -gewebe. Problematisch ist dies nicht nur bei der Primärdiagnostik eines Tumors sondern auch im Rahmen des Stagings und insbesondere bei der Rezidivdiagnostik, da Therapieeffekte reaktiv-entzündliche Veränderungen hervorrufen können. Zur Differenzierung von Tumor und Entzündung werden daher tumorspezifische PET-Tracer gefordert.

Ein viel versprechender Ansatz ist der Einsatz von radioaktiv markierten Aminosäuren. Diese ermöglichen als PET-Tracer die nicht-invasive Untersuchung von Stoffwechselveränderungen, die mit der gesteigerten Aminosäureutilisation maligner Zellen in Zusammenhang stehen [Jager et al. 2001]. Wegen der im Vergleich zu FDG geringeren Aufnahme in gesundes Hirngewebe sind Aminosäuretracer vorteilhaft bei der Darstellung von Hirntumoren [Laverman et al. 2002]. Sie eignen sich aber ebenfalls zur Diagnostik von peripheren Tumoren wie Lymphomen [Leskinen-Kallio et al. 1991a], Lungen- [Nettelbladt et al. 1998] und Mamma-Karzinomen [Kole et al. 1997], [Leskinen-Kallio et al. 1991b] sowie von Tumoren der Kopf-Hals-Region [Leskinen-Kallio et al. 1992]. Bestimmte Aminosäuretracer eignen sich möglicherweise besser als FDG zur spezifischen Differenzierung von Tumor und Entzündung. Der zurzeit am häufigsten eingesetzte Aminosäuretracer L-[Methyl- ^{11}C]Methionin (^{11}C -Met) zeigte in mehreren Studien eine im Vergleich zu FDG geringere Aufnahme in Entzündungsgewebe [Sugawara et al. 1999], [Reinhardt et al. 1997], [Kubota et al. 1995]. Wegen der kurzen Halbwertszeit von nur 20 Minuten ist der Einsatz von ^{11}C -markierten Tracern wie ^{11}C -Met oder L-[^{11}C]-Tyrosin [Kole et al. 1997] jedoch auf Zentren mit eigenem Zyklotron beschränkt und nicht für die Nutzung an peripheren

PET-Einrichtungen geeignet [Langen et al. 2006], [Laverman et al. 2002]. ^{18}F -markierte Tracer mit einer Halbwertszeit von 109 Minuten sind unter diesem Aspekt technisch und logistisch vorteilhafter.

Das Tyrosinderivat O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET) erwies sich in ersten Studien als besonders viel versprechender Tumor-Tracer. Sowohl in experimentellen Tumoren [Heiss et al. 1999], [Wester et al. 1999] als auch bei Patienten mit Hirntumoren [Weber et al. 2000], [Wester et al. 1999] wurde FET stark angereichert. Im Tiermodell an der Maus war mit FET im Gegensatz zu FDG und ^{11}C -Met eine Differenzierung von entzündeten und metastatisch veränderten Lymphknoten möglich [Rau et al. 2002]. Mehrere experimentelle und klinische Studien bestätigten seither die fehlende FET-Anreicherung in Entzündungsgewebe bei ähnlich guter Sensitivität für maligne Tumoren wie andere PET- und SPECT-Tracer wie ^{11}C -Met oder 3- ^{123}I Iod-alpha-Methyl-L-Tyrosin [Weckesser et al. 2005], [Pöpperl et al. 2004], [Pauleit et al. 2004], [Kaim et al. 2002a]. FET kann zudem in einem automatisierten Verfahren schnell und mit hoher Ausbeute synthetisiert werden [Wester et al. 1999] und erscheint daher gut geeignet für den klinischen Einsatz.

Für die Anreicherung eines Aminosäuretracers in einem Gewebe ist die zelluläre Aufnahmerate entscheidender als der Einbau in Proteine [Laverman et al. 2002], [Ishiwata et al. 1993]. FET wird über spezifische Aminosäuretransporter zellulär aufgenommen, jedoch nicht in Proteine eingebaut und ist daher ein reiner Aminosäure-Transport-Tracer [Wester et al. 1999]. ^{11}C -Met hingegen nimmt nach der Aufnahme in die Zelle an verschiedenen Stoffwechselwegen teil und wird in Proteine eingebaut. Die zelluläre Aminosäureaufnahme erfolgt über spezifische Transportermoleküle in der Zellmembran. Die Transportrate wird einerseits durch die Affinität der Transporter zu dem jeweiligen Substrat und andererseits durch die Transportkapazität, also die Anzahl aktiver Transporter auf der Zelloberfläche, bestimmt. Hinzu kommen äußere Einflüsse wie pH-Wert, Temperatur oder Aminosäurekonzentration. Eine unterschiedliche Anreicherung bestimmter Aminosäuren in verschiedenen malignen und nicht-malignen Zellen kann also zum einen durch eine unterschiedliche Anzahl aktiver Transporter, zum anderen durch die Expression qualitativ unterschiedlicher Transporter mit unterschiedlichen Affinitäten bedingt sein. Das Wissen um die Aufnahmemechanismen von Aminosäure-Traceern kann die Interpretation positiver oder negativer Befunde verbessern und den gezielten Einsatz für bestimmte Fragestellungen ermöglichen.

ZIELSETZUNG

Gegenstand dieser in vitro Studie war der Vergleich der Aufnahme von FET und L-[methyl- ^3H]Methionin (MET) in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und humane Granulozyten und die Charakterisierung der beteiligten Aufnahmemechanismen. Mit Hilfe kompetitiver Hemmstoffe für die drei Aminosäure-Transportsysteme A, L und ASC wurde ihr jeweiliger Anteil an der Aufnahme von MET bzw. FET ermittelt. Durch gleichzeitige Hemmung aller drei Systeme wurde der nicht spezifisch hemmbare Anteil der Aufnahme bestimmt. Des Weiteren wurde der Einfluss des pH-Wertes und der Tracerkonzentration auf die Aufnahme untersucht. Durch Untersuchung der Aufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik wurden Transporter-Affinität K_m und Transportkapazität $V_{\max}$ ermittelt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf Unterschieden zwischen Granulozyten einerseits und den untersuchten Tumorzellen andererseits, mit dem Ziel die Eignung von FET und MET zur Differenzierung von Tumor und Entzündung auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

2. GRUNDLAGENWISSEN/ LITERATURÜBERSICHT

2.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in der Onkologie

Maligne Neubildungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Die Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten erlaubt heute jedoch in vielen Fällen eine definitive Heilung maligner Erkrankungen oder zumindest eine Verlängerung der Überlebenszeit bei guter Lebensqualität. Entscheidend für die Prognose ist eine möglichst frühzeitige Identifizierung und exakte Beurteilung maligner Veränderungen. Die Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten erfordert deshalb im gleichen Maß immer differenziertere und sensitivere Diagnosetechniken.

Nach Anamnese und klinischer Untersuchung kommen zur Diagnostik in erster Linie bildgebende Verfahren wie Ultraschall, konventionelles Röntgen, Computertomographie (CT) und Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) zum Einsatz. Diesen Verfahren gemeinsam ist die Beurteilung nach anatomisch-morphologischen Kriterien wie Größe, Ausdehnung, anatomische Lage, Abgrenzung und Binnenstruktur eines Befundes. Im Gegensatz zu den morphologisch ausgerichteten bildgebenden Verfahren bieten metabolisch ausgerichtete Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder auch die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT) eine Möglichkeit, nicht-invasiv pathophysiologische und biochemische Vorgänge bildgebend darzustellen und quantitativ zu beurteilen ohne sie in ihrem Ablauf zu beeinflussen. Die PET bietet so eine Möglichkeit, in vivo Vitalität, Dignität und Stoffwechselaktivität zu beurteilen. Bei der Entstehung maligner Tumoren gehen biochemische Veränderungen den morphologischen voraus und können durch metabolisch ausgerichtete Methoden noch vor dem Auftreten anatomischer Veränderungen erfasst werden [Coleman 1991], [Wilson 1992], [Koh et al. 1994].

2.1.1 Technik

Für die PET werden Radioisotope verwendet, die unter Aussendung eines Positrons (β^+) zerfallen. Ein Positron ist das positiv geladene Antiteilchen eines negativ geladenen Elektrons. Beim Aufeinandertreffen eines Positrons und eines Elektrons zerstrahlen beide Teilchen in Energie in Form zweier Gammastrahlen von je 511 keV, die zueinander in einem Winkel von 180° abgestrahlt werden. Die PET beruht auf der extrakorporalen Detektion dieser Annihilationsstrahlung (Vernichtungsstrahlung). Bei

einem PET-Scanner sind wenige Millimeter große Szintillationskristalle ringförmig um den Patienten angeordnet. Nur zwei Photonen, die innerhalb eines bestimmten Zeitfensters von einander gegenüberliegenden Detektoren registriert werden, werden als Ereignis gewertet (Koinzidenz). Aus dem Laufzeitunterschied der beiden koinzident detektierten Photonen und weiteren Parametern wird die genaue Lokalisation des Strahlungsursprungs berechnet. Da im Körper aufgrund der Elektronendichte die Flugstrecke des Positrons bis zur Rekombination mit einem Elektron sehr kurz ist, kann so mit hoher räumlicher Auflösung der Ort der Traceranreicherung lokalisiert werden.

Biomoleküle werden zu PET-Tracern indem sie mit Positronen-emittierenden Radionukliden markiert werden. Als Bindungssubstanzen eignen sich sowohl Moleküle des körpereigenen Stoffwechsels als auch synthetische Pharmaka. Zur Herstellung von Radiopharmazeutika werden dabei vor allem die Isotope ^{11}C (Halbwertszeit $t_{1/2}=20\text{min}$), ^{13}N ($t_{1/2}=10\text{min}$), ^{15}O ($t_{1/2}=2\text{min}$) und ^{18}F ($t_{1/2}=110\text{min}$) verwendet. Mit diesen Isotopen können organische Verbindungen markiert werden ohne ihre Strukturen und biologischen Eigenschaften zu verändern und ohne biologische Funktionen zu beeinflussen. Der PET-Tracer verhält sich im Körper wie das entsprechende nicht markierte Molekül. Nach der Injektion erfolgt die Verteilung über den Blutweg und die Aufnahme und Metabolisierung durch bestimmte Zellen. Mit Hilfe eines Hochleistungsrechners können Stoffwechselvorgänge qualitativ in Form von Querschnittsbildern dargestellt werden. Die Anzahl der registrierten Zerfallsereignisse ist proportional zur Zerfallsaktivität, sodass die angereicherte Tracermenge quantifiziert werden kann.

Positronenstrahlende Isotope werden über Kernreaktionen im Zyklotron künstlich erzeugt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten der Positronenstrahler erfordert die PET deshalb ein Zyklotron in unmittelbarer Nähe, weshalb ihr Einsatz in der Regel großen Zentren mit eigenem Zyklotron vorbehalten ist. Zunehmend werden aber auch externe PET-Satelliten ohne eigenes Zyklotron mit PET-Tracern beliefert. Abhängig von der Entfernung zwischen Zyklotron und Tomograph ist der Einsatz aber auf Nuklide mit Halbwertszeiten von mindestens einer Stunde limitiert.

Bisher werden mit Hilfe der PET vor allem physiologische Parameter wie Blutfluss, Sauerstoffverbrauch, Glukose-, Aminosäure- und Fettstoffwechsel untersucht. Die PET stellt darüber hinaus eine Technik des Molecular Imaging für Stoffwechselverläufe und Genexpression dar. PET-Sonden und Medikamente werden gemeinsam entwickelt um Funktionen darzustellen und gezielt therapeutisch zu beeinflussen [Schaller 2004].

Durch die Entwicklung von Gensonden oder Liganden für Neurotransmittersysteme und andere Rezeptoren könnten Immunreaktionen, neuronale Signaltransduktion oder genetische Veränderungen in vivo dargestellt werden.

2.1.2 Indikationen

Neben dem Einsatz zu Forschungszwecken hat die PET in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der klinischen Praxis gewonnen und kommt vor allem in den Gebieten Neurologie, Psychiatrie, Kardiologie und Onkologie in Ergänzung zu konventionellen Verfahren zum Einsatz. Die häufigste klinische Anwendung findet die PET bei onkologischen Fragestellungen.

Im Rahmen der Primärdiagnostik wird die PET zur Differenzierung maligner und benigner Veränderungen und bei der Suche nach okkulten (Primär-)Tumoren eingesetzt [Schneider et al. 2006], insbesondere wenn nach konventioneller Bildgebung Unklarheit besteht [Reske et al. 1996]. Bei der Diagnostik von Hirntumoren verbessert die PET die Planung von Biopsien durch Identifikation der metabolisch aktivsten Tumorregionen und Differenzierung von vitalem Tumorgewebe und Nekrosen [Schaller 2004]. Im Rahmen des Stagings liefert die PET Informationen zur Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung und wird insbesondere zur Metastasensuche sowohl von Lymphknoten- als auch von Fernmetastasen genutzt. Ein Vorteil der PET ist die Beurteilung von Lymphknoten unabhängig von ihrer Größe anhand veränderter Stoffwechseleigenschaften. Metastasen können dadurch früher identifiziert werden [Damian et al. 1996]. Im Rahmen des Therapiemonitorings kann mit Hilfe der PET frühzeitig die Wirksamkeit der eingeleiteten Therapie beurteilt und Therapiestrategien verändert werden [Price & Jones 1995], [Damian et al. 1996], [Schaller 2004], da Veränderungen im Tumormetabolismus Veränderungen der Tumormasse vorausgehen [Römer & Schwaiger 1998]. PET-Studien mit markierten Zytostatika liefern bereits vor Therapiebeginn Aussagen zu deren zellulärer Aufnahme oder Elimination und ermöglichen Voraussagen zum Therapieansprechen [Dimitrakopoulou-Strauss et al. 2006]. Eine häufige PET-Indikation ist auch die frühzeitige Erfassung von Tumorrezidiven und deren Differenzierung von Narbengewebe und reaktiven Veränderungen, wobei die PET morphologischen Methoden überlegen ist [Pöpperl et al. 2002]. Mehrere Studien beschreiben eine Korrelation von Tracer-Anreicherung und histopathologischem Malignitätsgrad [Dimitrakopoulou-Strauss et al. 2006], [Borbely et al. 2006], [Padma et al. 2003], sodass die PET möglicherweise Aussagen zum Grading maligner Befunde erlaubt.

2.1.3 Vergleich mit anderen bildgebenden Verfahren

Viele Studien belegen für die PET eine höhere Sensitivität als für CT und MRT. Bei Lungen- und kolorektalen Karzinomen, Melanomen und Lymphomen verbessert FDG-PET die diagnostische Genauigkeit um 8-43% gegenüber konventionellen Methoden [Phelps 2000]. Bei der Diagnostik von Lymphknotenmetastasen bei Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) wird mit Hilfe von FDG-PET eine Sensitivität von über 92% erreicht [Liewald et al. 2000]. Die Staging-Information ist dabei der der morphologischen Bildgebung überlegen und die diagnostische Genauigkeit wird durch die PET verbessert [Strauss 2000]. Bei der Diagnostik von Mamma-Karzinomen zeigte die PET eine größere Sensitivität als Sonographie, CT und MRT [Ruhlmann et al. 1997]. Beim Metastasen-Screening von malignen Melanomen bietet die PET einen zeitlichen Vorsprung von bis zu mehreren Monaten im Vergleich zu radiologischen Verfahren [Damian et al. 1996]. Vitales Tumorgewebe kann aufgrund des gesteigerten Stoffwechsels von Nekrosen, Ödem und anderen therapiebedingten Veränderungen differenziert werden. Insbesondere bei der Rezidivdiagnostik ist die PET daher anderen Verfahren überlegen [Pöpperl et al. 2002].

Hinsichtlich der Darstellung anatomischer Strukturen ist die PET radiologischen Verfahren unterlegen, sodass kombinierte Verfahren wie PET/ CT oder PET/ MRT an Bedeutung gewinnen [Townsend et al. 2004]. Im Vergleich zu den einzelnen Verfahren kann die diagnostische Genauigkeit dadurch weiter erhöht werden [Seemann et al. 2006]. Gegenüber der Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT), die wegen des geringeren Kosten- und Materialaufwandes häufig propagiert wird, bietet die PET den Vorteil der um mehr als 100-fach größeren Empfindlichkeit, da durch die Technik der Koinzidenzmessung bei der PET keine Filter zur Richtungsdefinition und Absorption unerwünschter Quanten benötigt werden. Im Vergleich zur SPECT liefert die PET eine bessere räumliche Auflösung, was eine bessere Beurteilung anatomischer Strukturen im PET-Bild ermöglicht [Pauleit et al. 2004].

2.2 PET-Tracer

2.2.1 [¹⁸F]Fluor-2-Deoxy-D-Glukose (FDG)

Der bisher am häufigsten verwendete PET-Tracer ist [¹⁸F]Fluor-2-Deoxy-D-Glukose (FDG). Er wird analog zu Glukose zellulär aufgenommen und zu [¹⁸F]Fluor-2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, jedoch nicht weiter metabolisiert, sodass es zur intrazellulären Akkumulation kommt [Fanti et al. 2006]. Alle Gewebe mit hohem Glukosebedarf reichern FDG an; physiologischerweise sind dies in erster Linie Muskel-, Fett- und Gehirnzellen. Die Aufnahme in Muskel- und Fettzellen erfolgt insulinabhängig, sodass die PET-Untersuchung nach einer Fastenperiode von 6-12 Stunden durchgeführt wird [Czech et al. 2000]. Der Glukosemetabolismus von Tumorzellen ist im Vergleich zu gesundem Gewebe gesteigert. FDG wird deshalb als hochsensitiver PET-Tracer im Rahmen von Primärdiagnostik, Staging, Therapiemonitoring, Restaging nach neoadjuvanten Therapien, zur Planung von Strahlentherapien und in der Rezidivdiagnostik vieler Krebserkrankungen eingesetzt [Fischer & Mortensen 2006], [Ruiz Hernandez et al. 2005]. Bei speziellen Fragestellungen zählt FDG-PET mittlerweile zu den Standardmethoden in der Diagnostik von Lymphomen, Melanomen sowie Karzinomen der Lunge, des Dickdarms, der Speiseröhre, der Brustdrüse und der Kopf-Hals-Region [Kumar et al. 2005]. Für verschiedene Tumorarten wie z. B. Gliome [Borbely et al. 2006], [Padma et al. 2003], [Kaschten et al. 1998] und Weichteiltumoren [Dimitrakopoulou-Strauss et al. 2006] konnte eine Korrelation zwischen FDG-PET-Befund und histologischem Grading nachgewiesen werden. In neueren Studien werden für Aussagen zum Grading dynamische PET-Untersuchungen empfohlen, die den herkömmlichen Methoden überlegen sein sollen [Pöpperl et al. 2006a]. FDG-PET wird zum Lymphknotenstaging bei Lungen-Karzinomen, Kopf-Hals-Tumoren, Kolorektal-Karzinomen und malignen Melanomen empfohlen [Reske et al. 1996]. Bei der Suche nach unbekannten Primärtumoren ist das kombinierte Verfahren FDG-PET/ CT konventionellen Methoden überlegen [Pelosi et al. 2006]. FDG-PET eignet sich zur Differenzierung von residualem Tumorgewebe oder Tumorrezidiven und therapiebedingten Gewebeveränderungen wie Narbengewebe und Fibrose [Römer & Schwaiger 1998], [Ito et al. 1992]. Bereits wenige Tage nach Beginn einer Standard-Chemotherapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen zeigt sich bei Therapieansprechen eine deutliche Abnahme der FDG-Aufnahme [Römer et al. 1998], sodass frühzeitig Vorhersagen zum Therapieerfolg möglich sind.

FDG-Anreicherung in Entzündungsgewebe

Problematisch bei der Tumordiagnostik mit FDG ist vor allem die starke Anreicherung des Tracers in Entzündungsgewebe, die zu falsch positiven Resultaten führt [Strauss 2000]. Viele Studien belegen den gesteigerten Glukosemetabolismus bei Entzündungsreaktionen [Lowe & Naunheim 1998], [Kubota et al. 1992], [Yamada et al. 1995], [Reinhardt et al. 1997]. Eine starke FDG-Anreicherung wird für abdominale [Tahara et al. 1989] und zerebrale Abszesse [Meyer et al. 1993], [Sasaki et al. 1990], Pneumonien [Kubota et al. 1990], [Lowe & Naunheim 1998], [Kapucu et al. 1998], [Bakheet et al. 2000a] und Tuberkulose [Bakheet et al. 1998] beschrieben. Akute und chronische Mastitis und postoperative Veränderungen der Mamma können in der FDG-PET ebenfalls maligne Tumoren vortäuschen [Bakheet et al. 2000b]. Falsch positive Befunde werden auch im Zusammenhang mit reaktiv veränderten Lymphknoten beschrieben [Adams et al. 1998], [Strauss 2000]. Entzündlich veränderte Lymphknoten verringern die diagnostische Genauigkeit von FDG-PET beim Staging suspekter NSCLC [Albes et al. 2002]. Insbesondere in Fällen starker FDG-Anreicherung ist oft keine Differenzierung von Primärtumor, Metastase und akuter Entzündung möglich [Halter et al. 2000]. Experimentell erzeugte bakterielle und abakterielle Lymphadenitiden zeigen eine stark erhöhte Anreicherung von FDG [Rau et al. 2002], [Sugawara et al. 1999]. Die FDG-Anreicherung ist dabei sowohl in akutem wie auch in chronischem Entzündungsgewebe gesteigert [Rau et al. 2002].

Aufgrund der starken Anreicherung in Entzündungsgewebe wird FDG als hochsensitiver Tracer zur Diagnostik entzündlicher Erkrankungen genutzt [Boerman et al. 2001]. Beschrieben ist unter anderem der Einsatz zur Detektion okkultter Entzündungsherde [Sugawara et al. 1998] und zur Diagnostik bei chronischer Osteomyelitis [Guhlmann et al. 1998]. FDG eignet sich zur Aufdeckung von Entzündungsherden bei Morbus Crohn [Neurath et al. 2002] und ist hochsensitiv bei der Diagnostik von unklarem Fieber [Meller & Becker 2001].

Die Steigerung des Glukosestoffwechsels nach einer Verletzung korreliert mit dem Auftreten von Entzündungszellen, insbesondere von Makrophagen [Schuster et al. 2003], [Daley et al. 1990]. Seit langem ist bekannt, dass Makrophagen die Glukoseaufnahme im Rahmen der Infektabwehr erheblich steigern [Bonventre et al. 1977]. An experimentellen Weichteilabszessen wurde gezeigt, dass die starke FDG-Anreicherung in Entzündungsgewebe vor allem auf die starke Aufnahme in Granulozyten (akute Phase) und Makrophagen (chronische Phase) zurück zu führen ist [Kaim et al. 2002b]. Dies bestätigt frühere Arbeiten, die bereits darauf hinweisen, dass

aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten entscheidend an der gesteigerten FDG-Anreicherung in Entzündungsgewebe beteiligt sind [Yamada et al. 1995], [Kubota et al. 1995], [Kubota et al. 1992], [Daley et al. 1990]. Werden Neutrophile durch TNF α aktiviert, kommt es zu einer Steigerung der FDG-Aufnahme [Jones et al. 2002]. Die Aktivierung von Neutrophilen führt vermittelt durch Tyrosinkinassen und Proteinkinase C zu einer Steigerung der Affinität der Glukosetransporter [Tan et al. 1998]. Auch die Aktivierung von Monozyten führt zu einer Erhöhung der Transporteraffinität [Ahmed et al. 1997] und zu einer Steigerung der FDG-Aufnahme um ein Vielfaches [Paik et al. 2004].

2.2.2 Aminosäuretracer

Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle für das Wachstum von Tumoren [Johnstone & Scholefield 1965]. Der gesteigerte Aminosäure-Metabolismus von Tumorzellen kann mit Hilfe radioaktiv markierter Aminosäuren dargestellt werden. Aminosäuretracer könnten vor allem in Bereichen hilfreich sein, in denen der Einsatz von FDG problematisch ist, wie z. B. im Gehirn oder zur Differenzierung von Tumoren und Entzündungen [Jager et al. 2001]. Bereits in den 1980er Jahren wurden ^{11}C -markierte Aminosäuren zur Darstellung von Hirntumoren eingesetzt [Hubner et al. 1982]. Bei der Markierung mit ^{11}C wird die chemische Struktur der Aminosäuren nicht verändert, doch ^{18}F -markierte fluorierte Aminosäurederivate gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie den Vorteil der längeren Halbwertszeit bieten. Eingang in die klinische Diagnostik fanden bisher vor allem der PET-Tracer L-[Methyl- ^{11}C]Methionin und der SPECT-Tracer 3- ^{123}I -Jod- α -Methyl-L-Tyrosin (IMT) [Biersack et al. 1989]. L-[^{11}C]-Tyrosin [Kole et al. 1997], [Pruim et al. 1995] und zahlreiche Tyrosin-Derivate wie L-2-[^{18}F]Fluortyrosin (FTyr) [Langen et al. 2003], [Wienhard et al. 1991], [Coenen et al. 1989], L-3-[^{18}F]Fluor- α -Methyltyrosin (FMT) [Inoue et al. 1998], O-[^{18}F]Fluormethyl-L-Tyrosin [Yamaura et al. 2006], O-2-[^{18}F]Fluorethyl-L-Tyrosin (FET) [Wester et al. 1999] sowie L-2-[^{18}F]Fluorphenylalanin [Kubota et al. 1996] und cis-4-[^{18}F]Fluor-L-Prolin [Langen et al. 2001] werden ebenfalls auf ihre Eignung als PET-Tracer untersucht.

Ob sich Aminosäuretracer generell besser zur Differenzierung von Tumor und Entzündung eignen als FDG, ist fraglich. Zwar gibt es Hinweise dafür, dass Entzündungszellen Aminosäuren weniger stark anreichern als FDG [Kubota et al. 1995], mehrere Studien beschreiben jedoch auch für verschiedene Aminosäuretracer eine erhebliche Anreicherung in Entzündungsgewebe [Van Waarde et al. 2006], [Rau et al. 2002], [Kole et al. 1999], sodass möglicherweise nur bestimmte Aminosäure-Tracer eine höhere Tumorspezifität besitzen.

2.2.2.1 Methionin (Met)

L-[Methyl- ^{11}C]Methionin (^{11}C -Met) ist die am häufigsten in onkologischen PET-Untersuchungen als Tracer eingesetzte Aminosäure. Sie wird analog zu Methionin zellulär aufgenommen, in Proteine eingebaut und metabolisiert. Methionin ist eine absolut essenzielle glukogene Aminosäure mit hydrophobem Rest und folgt in der Zelle neben dem Einbau in Proteine verschiedenen Stoffwechselwegen (Abb. 1).

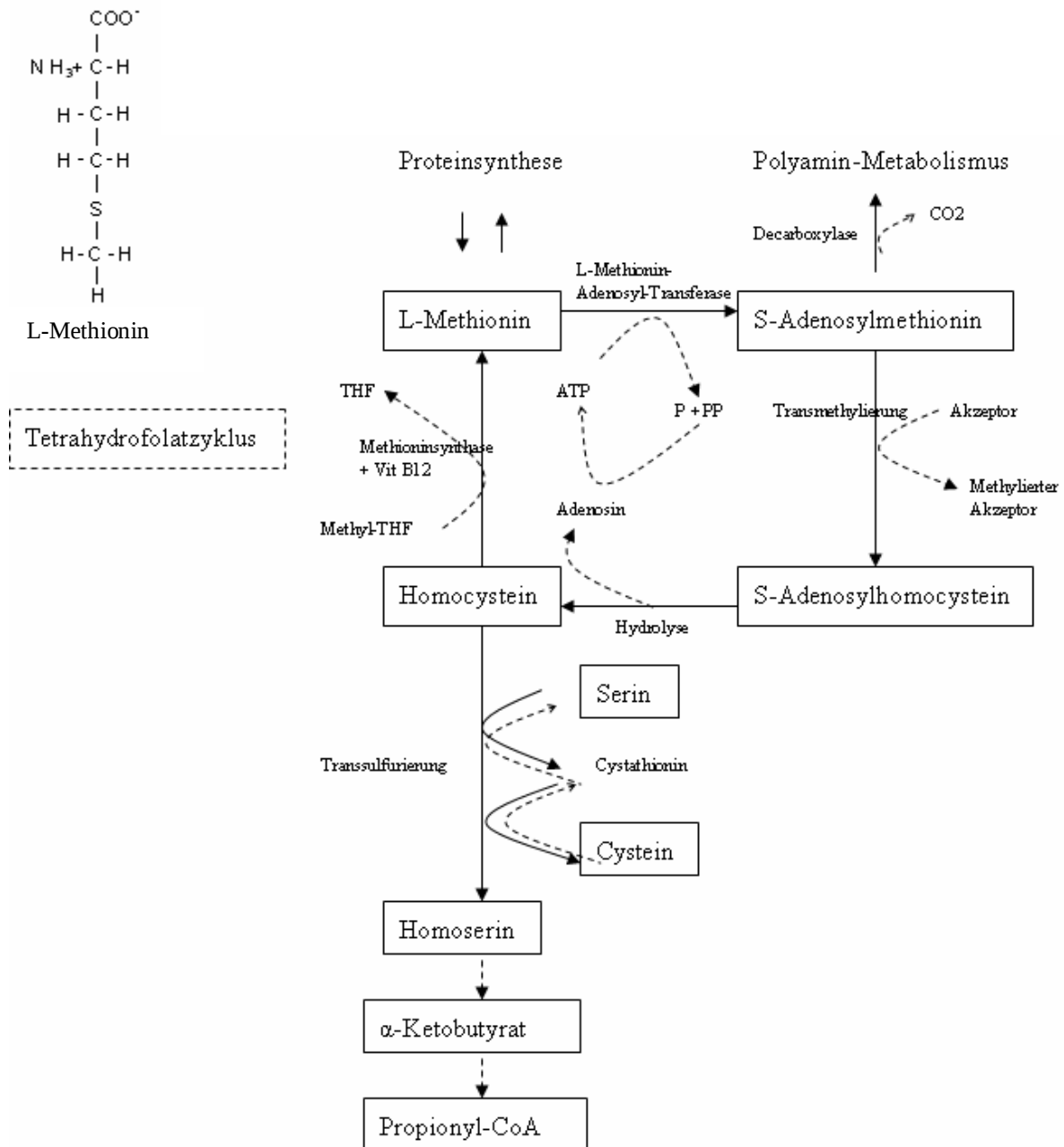


Abb. 1: Methioninstoffwechsel
[nach Petrides P. Stoffwechsel der essentiellen Aminosäuren, 1998, S. 541-566]

S-Adenosylmethionin ist der wichtigste physiologische Methylgruppendonator in Stoffwechselreaktionen. Die Sulfhydrylgruppe dient als Schwefellieferant bei der Proteinsynthese. Die meisten Körperzellen können Methionin bei ausreichendem

Angebot von Homocystein, Vitamin B und Folsäure durch Remethylierung (re)synthetisieren. Viele Tumorzellen sind hingegen direkt von exogener Methioninzufuhr abhängig, da die Umwandlungskapazität von Homocystein aufgrund der erhöhten Transmethylierungsrate infolge der gestörten Proliferationskontrolle überschritten wird [Hoffman 1985]. Vorteile gegenüber FDG bietet ^{11}C -Met aufgrund der geringeren Aufnahme in gesundes Hirngewebe besonders bei der Diagnostik von Hirntumoren. Diese werden mit ^{11}C -Met hochsensitiv erfasst [De Witte et al. 2001], [Herholz et al. 1998], [Kaschten et al. 1998], wobei eine bessere Darstellung der tatsächlichen Tumorausbreitung möglich ist als mit konventionellen Methoden [Pirotte et al. 2003], [Ogawa et al. 1993], [Bergström et al. 1983]. Im Unterschied zur Anreicherung von Kontrastmitteln für CT oder MRT erfolgt die Met-Aufnahme in Gliome unabhängig von einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, woraus sich eine höhere Sensitivität für niedrig-maligne Gliome ohne Schrankenstörung ergibt [Herholz et al. 1998], [Ogawa et al. 1993]. Die FDG-Aufnahme in low-grade Gliomen ist oft ähnlich hoch wie in normale graue Substanz [Weber et al. 1997], sodass insbesondere niedrigmaligne Gliome durch ^{11}C -Met besser dargestellt werden als durch FDG [Narayanan et al. 2002], [Kaschten et al. 1998].

^{11}C -Met eignet sich auch zur Diagnostik peripherer Tumoren, weist bei der Darstellung maligner Lungentumoren und deren Metastasen eine ebenso hohe diagnostische Genauigkeit von 89-95% auf wie FDG [Nettelbladt et al. 1998] und ist der CT überlegen [Yasukawa et al. 2000]. Auch für Mammakarzinome [Leskinen-Kallio et al. 1991b] und Tumoren der Kopf-Hals-Region [Leskinen-Kallio et al. 1992] sowie zur Darstellung von Lymphomen [Nuutinen et al. 1998], [Rodriguez et al. 1995], [Leskinen-Kallio et al. 1991a] erwies sich ^{11}C -Met als sensitiver Tracer. Ob anhand der ^{11}C -Met-Aufnahme Aussagen zum histopathologischen Grading gemacht werden können, wird unterschiedlich beurteilt. Mehrere Studien beschreiben eine Korrelation zwischen ^{11}C -Met-Aufnahme und histopathologischem Grading für Gliome [Narayanan et al. 2002], [Derlon et al. 2000], [Kaschten et al. 1998]. Aufgrund erheblicher Überlappungen scheint eine genaue Vorhersage des Malignitätsgrades jedoch nicht möglich zu sein. FDG gilt in dieser Fragestellung als überlegen [Borbely et al. 2006], [Rodriguez et al. 1995]. Eine Korrelation der Met-Verteilung innerhalb von Hirntumoren mit dem lokalen Malignitätsgrad konnte durch stereotaktische Biopsien belegt werden. Met eignet sich demnach insbesondere als Tracer für PET-geführte stereotaktische Biopsien und Resektionen [Pirotte et al. 2003]. Nuutinen beschreibt eine Korrelation der Met-Aufnahmegeschwindigkeit mit dem Malignitätsgrad von Lymphomen [Nuutinen et al. 1998] nicht jedoch mit der Überlebenszeit. Bei Gliomen korreliert eine hohe Met-

Aufnahme mit kürzeren Überlebenszeiten [De Witte et al. 2001], [Kaschten et al. 1998]. Die ^{11}C -Met-Aufnahme in Gliome reduziert sich unter Strahlentherapie dosisabhängig [Wurker et al. 1996] und ^{11}C -Met erwies sich als besonders günstig zur Differenzierung von Gliomrezidiven und Strahlennekrosen [Sonoda et al. 1998].

Problematisch ist die starke Methionin-Anreicherung in den abdominalen Organen Pankreas, Niere, Leber und Intestinum [Kubota et al. 1996], [Comar et al. 1976], welche die Darstellung abdominalen Tumoren erschwert. Die physiologische Methioninverteilung beeinträchtigt auch die Interpretation von Met-Anreicherungen beim Staging malignen Lymphome [Sutinen et al. 2000]. Ein technisches Problem stellt die kurze Halbwertszeit von ^{11}C dar, die nur kurze Untersuchungszeiträume erlaubt und den Einsatz an peripheren PET-Einheiten ohne eigenes Zyklotron praktisch unmöglich macht.

^{11}C -Methionin zur Differenzierung von Tumor und Entzündung

Es stellt sich die Frage, ob ^{11}C -Met hinsichtlich der Tumor-Spezifität FDG überlegen ist. Reaktiv veränderte Lymphknoten bei experimentell erzeugten bakteriellen Infektionen reichern weniger Met als FDG an [Sugawara et al. 1999]. Autoradiographische Untersuchungen ergaben, dass sich Met vor allem in vitalen Tumorzellen aber nur wenig in nekrotischem bzw. in mit Makrophagen infiltriertem Gewebe anreichert [Reinhardt et al. 1997], [Kubota et al. 1995]. ^{11}C -Met wurde deshalb als möglicher Tracer zur Differenzierung von Tumor und Entzündung diskutiert [Kubota et al. 1989]. Zahlreiche Publikationen beschreiben jedoch auch eine erhebliche Anreicherung von Methionin in Entzündungsprozesse [Kubota et al. 1990], [Rau et al. 2002], [Ishii et al. 1993], [Yamada et al. 1998]. Entzündlich (akut und chronisch) veränderte Lymphknoten reichern mehr Methionin an als metastasierte Lymphknoten [Rau et al. 2002] und können zu falsch-positiven Ergebnissen beim Lymphknotenstaging mit Methionin führen [Yasukawa et al. 2000]. Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe ergaben eine stärkere Methioninanaufnahme in Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen als in verschiedene Tumorzellen [Stöber et al. 2006]. Eine sichere Unterscheidung von malignen und entzündlichen Veränderungen ist also auch durch Met-PET nicht möglich.

2.2.2.2 O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl-L-Tyrosin (FET)

Tyrosin ist eine bedingt essenzielle aromatische Aminosäure, die in der Leber durch irreversible Hydroxylierung von Phenylalanin synthetisiert wird. Der Abbau erfolgt gluko- und ketogen zu Fumarat und Acetacetat. Tyrosin dient als Vorstufe von Melanin, Dopamin, der Schilddrüsenhormone und der Katecholamine (Abb. 3). Der Benzolring dient der Synthese weiterer aromatischer Verbindungen wie z. B. Ubichinon.

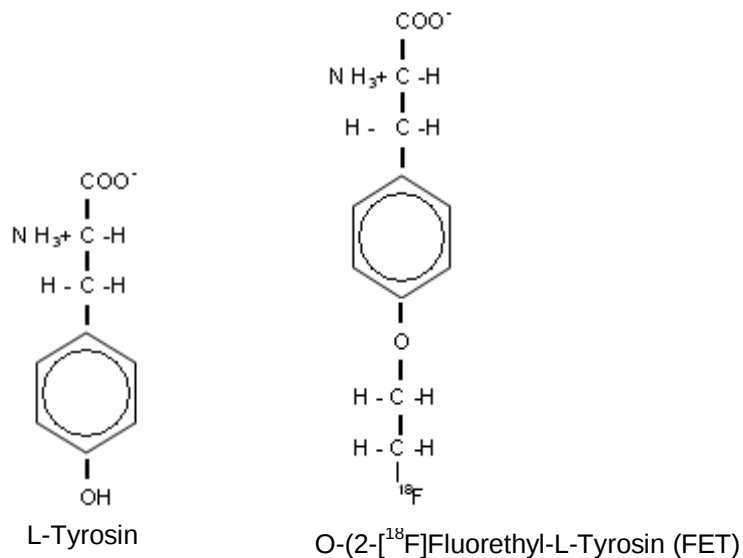
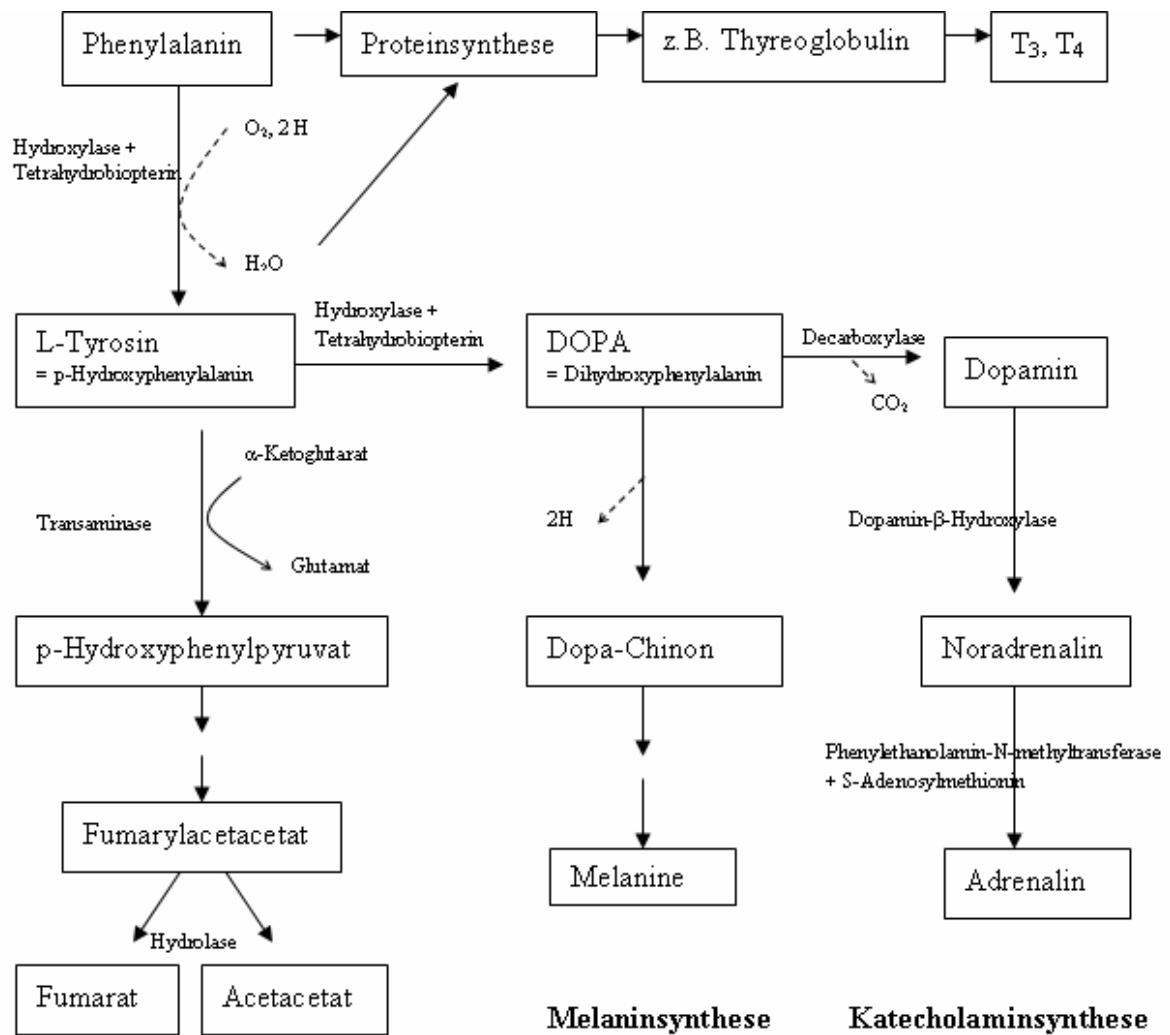


Abb. 2: Strukturformeln von L-Tyrosin und FET

Das Tyrosin-Derivat FET kann in einem automatisierten Verfahren kosten- und zeitsparend mit hoher Ausbeute synthetisiert werden [Wester et al. 1999]. Die zelluläre Aufnahme erfolgt stereospezifisch über spezifische Aminosäuretransporter [Wester et al. 1999], [Heiss et al. 1999]. FET wird nicht in Proteine eingebaut [Langen et al. 2003], [Wester 1999] und scheint auch nicht an anderen Biosyntheseschritten beteiligt zu sein [Langen et al. 2006], sodass es sich um einen reinen Aminosäuretransport-Tracer handelt. FET verhält sich in vivo relativ stabil; eine gewisse Degradierung findet im menschlichen Organismus jedoch statt, wobei die langsam gebildeten Metabolite rasch renal ausgeschieden werden [Pauleit et al. 2003]. Erste Versuche an experimentellen Tumoren [Wester et al. 1999], [Heiss 1999] ebenso wie bei Patienten mit Hirntumoren [Wester et al. 1999], [Weber et al. 2000] waren vielversprechend: FET wurde in malignen Tumoren stark angereichert, zeigte aber keine Akkumulation in nicht-malignem Gewebe und ermöglichte eine klare Tumorabgrenzung [Wester et al. 1999]. Im Tierversuch zeigte FET im Gegensatz zu FDG und Met nur eine geringfügige Anreicherung in Entzündungszellen und entzündeten Lymphknoten [Kaim et al. 2002a], [Rau et al. 2002].



Abbau

Abb. 3: Tyrosinstoffwechsel
(nach Petrides P. Stoffwechsel der essentiellen Aminosäuren, 1998, S. 541-566)

FET zur Darstellung von Hirntumoren

Neuere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven bestätigen FET-PET als eine geeignete Methode zur Identifikation maligner Hirntumoren [Weckesser et al. 2005]. Rezidive von niedrig- und hochmalignen Gliomen können durch FET-PET zuverlässig von post-therapeutischen benignen Veränderungen differenziert werden [Pöpperl et al. 2004]. Im direkten Vergleich von ^{11}C -Met und FET bei Patienten mit primären oder rezidivierenden Hirntumoren korrelierte die Aufnahme beider Tracer bei allen Läsionen stark. Die Anreicherung von ^{11}C -Met war zwar stärker, doch beim Kontrast zwischen Tumor und normalem Gewebe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede [Weber et al. 2000]. Der Vergleich der FET- und 3H -Met-Aufnahme in experimentelle Rattengliome ergab für beide Tracer ein ähnliches Verteilungsmuster innerhalb der Tumoren sowie eine hohe Korrelation der Tumor-zu-Gehirn-Ratios beider

Tracer [Langen et al. 2003]. Auch die Tumor-zu-Gehirn-Ratios von IMT und FET korrelieren signifikant [Pauleit et al. 2004]. Der Kontrast zwischen Tumor und Gehirn und die Unterscheidung anatomischer Strukturen sind in der FET-PET jedoch deutlich besser als in der IMT-SPECT.

Sowohl bei primären Gliomen als auch bei Glioblastomrezidiven ermöglicht die Kombination von MRT und FET-PET eine bessere Wiedergabe der tatsächlichen Tumorausdehnung als MRT allein [Plotkin et al. 2006], [Pauleit et al. 2005b]. Tumorgewebe wird durch MRT allein mit einer Sensitivität von 96% erkannt, die Spezifität beträgt jedoch nur 53%. Hingegen bringt die Kombination aus MRT und FET-PET eine Verbesserung der Spezifität auf 94% bei einer Sensitivität von 93%, sodass FET-PET die Lokalisation von Biopsieorten und die Therapieplanung verbessern könnte [Pauleit et al. 2005b]. Tatsächlich erwies sich FET als hilfreich bei der Planung stereotaktischer Biopsien bei diffusen Gliomen. Im Vergleich zum MR-Befund konnten durch die FET-PET zusätzliche Tumorherde aufgedeckt und die Biopsielokalisation verbessert werden [Messing-Jünger et al. 2002]. Plotkin et al. beschreiben FET-PET als wertvolle Methode zur Bestimmung der Zielvolumina zur Implantation magnetischer Nanopartikel in Glioblastomrezidiven [Plotkin et al. 2006].

Inwiefern anhand der FET-Aufnahme Aussagen zum Grading oder zur Prognose möglich sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Weckesser beschreibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Tumor-zu-Gehirn-Ratios niedrig- (WHO Grad I+II) oder hochmaligner (WHO Grad III+IV) Tumoren nur in frühen Aufnahmen 10 Minuten nach Tracerinjektion, während nach 40 Minuten kein signifikanter Unterschied mehr bestand [Weckesser et al. 2005]. Andere Autoren beschreiben eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der FET-Anreicherung mit steigendem Malignitätsgrad [Pöpperl et al. 2004]. Die Aufnahmekinetik in hoch- und niedrigmaligne Hirntumoren soll sich unterscheiden, sodass sich daraus zusätzliche Informationen zur Differenzierung suspekter Hirnläsionen ergeben könnten [Weckesser et al. 2005]. Für dynamische FET-PET Aufnahmen wird eine hohe diagnostische Genauigkeit bei der Differenzierung von High-grade und Low-grade Astrozytomrezidiven beschrieben [Pöpperl et al. 2006a].

FET wurde erfolgreich zum Therapiemonitoring bei Glioblastomrezidiven eingesetzt [Pöpperl et al. 2005]. Vier Wochen nach Therapie wurde im Gegensatz zur Kontrastmittelanreicherung in der MRT ein Rückgang der FET-Aufnahme dokumentiert. Erst bei erneutem Tumorwachstum kam es wieder zu einem lokalen

Anstieg der FET-Aufnahme. Ebenso zeigte sich FET-PET als sensitive Methode zur Beurteilung der Wirkung einer intrakavitären Radioimmuntherapie bei hochmalignen Gliomen [Pöpperl et al. 2006b]. Therapiebedingte benigne Veränderungen führten zu einer homogenen FET-Anreicherung, während noduläre stärkere FET-Anreicherungen auf ein Tumorrezidiv hinwiesen.

FET zur Differenzierung von Tumor und Entzündung

In Tierversuchen zeigte sich weder eine FET-Anreicherung in bakteriellen Abszessen [Kaim et al. 2002a] noch in akut oder chronisch entzündeten Lymphknoten [Rau et al. 2002]. Autoradiographische Untersuchungen ergaben, dass FET nicht von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten angereichert wird [Kaim et al. 2002a]. FET eignet sich somit möglicherweise zur spezifischen Differenzierung maligner und entzündlicher Veränderungen und weist eine höhere Tumorspezifität auf als FDG oder ^{11}C -Met. Eine Differenzierung von Gliomrezidiven und therapiebedingten Läsionen wie Radionekrosen ist durch konventionelle Methoden nur unzureichend möglich. Gliomrezidive nach verschiedenen Therapiemaßnahmen wurden durch MRT mit einer Sensitivität von 93,5% erfasst, jedoch nur mit einer Spezifität von 50% von benignen therapiebedingten Veränderungen unterschieden. Im Vergleich dazu wurde mit FET-PET eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 92,9% erreicht [Rachinger et al. 2005]. An experimentellen Radionekrosen wurde lediglich eine geringe FET-Anreicherung beobachtet, die auf die Schrankenstörung zurückgeführt wurde und deutlich geringer war als die Anreicherung in malignen Tumoren. Im Gegensatz zu FDG fand darüber hinaus keine Anreicherung von FET in Makrophagen statt [Spaeth et al. 2004]. In einer neueren Publikation wird hingegen eine Anreicherung von FET in zwei von fünf zerebralen Abszessen wie auch in einem demyelinisierenden Prozess beschrieben [Floeth et al. 2006]. Dieselbe Arbeitsgruppe beschreibt jedoch sehr gute Ergebnisse bei der Differenzierung benigner und maligner Hirnläsionen durch die Kombination von FET-PET und MR-Spektroskopie [Floeth et al. 2005].

FET zur Darstellung peripherer Tumoren

In der bisher einzigen Studie zum Einsatz von FET bei peripheren Tumoren schnitt FET erheblich schlechter ab als FDG [Pauleit et al. 2005a]. Nur 13 von 38 Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren zeigten eine Anreicherung von FET, 37 waren hingegen positiv für FDG. Überraschenderweise wurde FET fast ausschließlich von Plattenepithelkarzinomen angereichert, während die meisten Adenokarzinome (in Kolon, Pankreas, Ovar und Prostata) und Lymphome FET-negativ waren. Die Sensitivität für Plattenepithelkarzinome war ebenso gut aber nicht besser als mit FDG

[Pauleit et al. 2005a]. Plattenepithel-Karzinome der Kopf-Hals-Region wurden durch FET mit einer höheren diagnostischen Genauigkeit erfasst als mit FDG, da FET eine bessere Differenzierung von tumorösen und entzündlichen Veränderungen ermöglichte [Pauleit et al. 2006]. Die Sensitivität war jedoch wegen der insgesamt geringeren FET-Anreicherung vor allem bei kleinen Tumoren niedriger als mit FDG [Pauleit et al. 2006]. FET-PET kommt somit vor allem als zusätzliche Methode zur Differenzierung von Tumoren und Entzündungen in Betracht [Langen et al. 2006].

2.3 Transmembraner Aminosäuretransport

Die zelluläre Aufnahme von Aminosäuren wird durch spezifische Aminosäure-Transporter vermittelt [Souba & Pacitti 1992]. In der Lipiddoppelschicht der Zellmembran befinden sich dafür spezialisierte Membranproteine. Membrankanäle bilden eine hydrophile Pore, die die Diffusion kleiner Moleküle oder Ionen entlang eines Konzentrations- und Ladungsgefälles ermöglichen. Sie sind substratspezifisch und spannungs- oder ligandenabhängig regulierbar, zeigen jedoch keine Sättigungskinetik. Im Unterschied dazu läuft der Transport über einen Transporter (Carrier) erst nach spezifischer Bindung der zu translozierenden Substanz ab. Der Transport ist spezifisch, sättigbar und zeigt häufig eine hyperbolische Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Kinetik) [Löffler G. 1998, S. 178-187]. Der Transportvorgang aus Bindung, Translokation und Freigabe der Substanz ist dabei mit einer Enzymreaktion vergleichbar: Substrat S und Transporter T bilden einen Komplex ST, es kommt zur Konformationsänderung des Transporters T', die den Transportvorgang bewirkt, und daraufhin zur Dissoziation von T' und S. Geschwindigkeit bestimmend ist die Bindung von Substrat und Transporter. Die Transportgeschwindigkeit wird deshalb zum einen bestimmt von der Affinität des Transporters zum Substrat (K_m -Effekt) zum anderen von der Kapazität des Transportsystems (V_{max} -Effekt). Maß für die Affinität ist die Michaeliskonstante K_m , die die Substratkonzentration bezeichnet, bei der die halbmaximale Transportgeschwindigkeit erreicht wird. Strukturelle Veränderungen des Transporters oder des Substrates führen zu einer Veränderung der Affinität. So können Subtypen eines Transporters dieselbe Substanz mit unterschiedlicher Geschwindigkeit transportieren. Die Kapazität beschreibt die maximal mögliche Transportgeschwindigkeit V_{max} bei Sättigung des Transportsystems. Verändert wird die Kapazität durch eine Änderung der Zahl aktiver Transporter durch Synthese, Abbau, Aktivierung oder Inaktivierung. Welche Rolle diese Effekte bei der erhöhten Aminosäureaufnahme von Tumorzellen spielen, ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird

jedoch vermutet, dass aktivierte Zellmembrantransporter an Wachstum und maligner Entartung von Tumorzellen beteiligt sind.

Einfache Carrier transportieren Substanzen ausschließlich in Richtung eines Konzentrationsgefälles. Diese Art des Transportes wird als carriervermittelte oder erleichterte Diffusion bezeichnet. Sie erfolgt passiv, ohne Aufwendung von Energie. Man spricht hingegen von aktivem Transport, wenn Substanzen unter Aufwendung von Energie auch gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert werden. Beim primär aktiven Transport ist der Transportvorgang direkt mit der Spaltung von ATP gekoppelt, der Carrier hat die Funktion einer ATPase. Beim sekundär aktiven Transport finden ATP-Verbrauch und Transport getrennt voneinander statt. Der häufigste sekundär aktive Transportmechanismus ist der Transport unter Ausnutzung des transmembranen Natriumgradienten. Das Natrium-Konzentrationsgefälle zwischen Extra- und Intrazellularraum ist so groß, dass der Einstrom von Natrium über den Transporter genug Energie liefert, um im selben Transportvorgang eine andere Substanz gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren. Der Energieverbrauch in Form von ATP findet dabei an der Na^+/K^+ -ATPase statt, die in einem primär aktiven Transportprozess den Natriumgradienten aufrecht hält.

Aminosäuretransporter

Seit den frühen 1960er Jahren wurden verschiedene Transportsysteme für Aminosäuren identifiziert [Christensen 1990] und anhand funktioneller Eigenschaften wie Substratspezifität, Eigenschaften der transportierten Aminosäuren (z. B. anionisch, kationisch, neutral), Wirkung kompetitiver Hemmstoffe und Energie- oder Natriumabhängigkeit klassifiziert. Bis heute wird diese Klassifikation in funktionellen Studien angewandt, wenn molekulare Transportmechanismen unbekannt sind [Langen & Broer 2004]. In den 1990er Jahren begann die Aufklärung der molekularen Strukturen und Funktionsweisen der Aminosäuretransporter, was zu neuen Klassifikationen führte.

Oxender und Christensen beschrieben 1963 erstmals zwei unterschiedliche Transportsysteme für neutrale Aminosäuren mit breit überlappenden Spezifitäten, die sie nach den jeweils bevorzugten Substraten als Alanin-bevorzugendes **A-System** und Leucin-bevorzugendes **L-System** bezeichneten [Oxender & Christensen 1963]. Als Transportsystem mit hoher Affinität für die kurzkettigen neutralen Aminosäuren Alanin, Serin und Cystein wurde wenige Jahre später das **ASC-System** beschrieben [Christensen et al. 1967]. Bis heute dienen diese drei Transportsysteme zur funktionellen Beschreibung der wichtigsten Transport-Typen für neutrale Aminosäuren,

wenn auch mittlerweile für jedes der drei Systeme mehrere Genprodukte bzw. Transporter-Moleküle identifiziert und weitere Transportsysteme abgegrenzt wurden.

Natriumabhängige Systeme werden im Allgemeinen mit Großbuchstaben, natriumunabhängige Systeme mit Kleinbuchstaben bezeichnet. Ausnahmen sind die natriumunabhängigen Systeme L und T.

2.3.1 Natriumabhängige Transportsysteme

Transportsystem A (A-Type Amino Acid Transporter, ATA)

Das A-System ist das wichtigste Transportsystem für kurze aliphatische Aminosäuren wie Alanin, Glycin und Serin, aber auch Prolin und längerkettige unverzweigte aliphatische Aminosäuren wie Methionin werden zumindest teilweise über Transporter vom A-Typ zellulär aufgenommen. System A-Transporter sind Aminosäure-Natrium-Kotransporter mit 1:1 Stöchiometrie, der sekundär aktive Transportmechanismus ermöglicht dabei eine stark konzentrierte Funktionsweise. Alpha-(Methylamino)-iso-Buttersäure (MeAIB) gilt als spezifisches Substrat mit hoher Affinität und kann als spezifischer kompetitiver Hemmstoff für das A-System eingesetzt werden [Christensen 1989]. Die Aktivität von System A ist bei Substratmangel gesteigert und verringert sich bei hohem Substratangebot im Sinne einer adaptiven Regulation. Hohe intrazelluläre Substrat- und Natriumkonzentrationen führen ebenfalls zu einer Verringerung der Aktivität im Sinne einer Transinhibition [White & Christensen 1983]. Die Transportrate wird durch Hormone, Zytokine und Mitogene beeinflusst [Souba & Pacitti 1992]. Die Aktivierung von Lymphozyten durch Mitogene führt zu einer 4-8fachen Steigerung der System-A-Aktivität [Scanlon et al. 1983]. Interleukin-1 β hingegen verringert die System A-Aktivität in Trophoblasten [Thongsong et al. 2005]. System A spielt eine Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Proliferation [Bading et al. 1996]. Maligne Transformation führt über eine Steigerung der Transportersynthese zu einer erhöhten System-A-Aktivität [Saier et al. 1988]. Transportsystem A spielt in vielen verschiedenen Geweben eine wichtige Rolle. In der Leber wird die System A-Aktivität durch Glukagon und Insulin reguliert, wobei Aminosäuren der Glukoneogenese und der Harnstoffproduktion zugeführt werden [Christensen & Kilberg 1995]. Inkubation von Fibroblasten in hypertonem Milieu führt zu einer Steigerung der System-A-Aktivität. Die vermehrte Aminosäureaufnahme wirkt dabei der Zellschrumpfung entgegen [Dall'Asta et al. 1994]. In der Plazenta spielt System A eine wichtige Rolle bei der Aminosäureversorgung des Feten [Desforgues et al. 2006].

Bisher wurden drei Mitglieder der Slc38 Gen-Familie als Subtypen des A-Systems identifiziert und als „Sodium-Coupled Neutral Amino Acid Transporter“ SNAT1 (ATA1), SNAT2 (ATA2) und SNAT4 (ATA3) bezeichnet [Desforgues et al. 2006], [Mackenzie & Erickson 2004]. SNAT2 wird in Säugetier-Geweben ubiquitär exprimiert, SNAT1 vor allem in Herz, Gehirn und Plazenta. SNAT4 wird vor allem in der Leber exprimiert, in geringerem Maß auch in Muskeln, Niere, Pankreas und Plazenta [Desforgues et al. 2006], [Hatanaka et al. 2001]. Über Austauschmechanismen mit anderen Transportsystemen beeinflusst SNAT2 die intrazelluläre Konzentration fast aller Aminosäuren. Die bereits beschriebene Rolle von System A zur Aufrechterhaltung des Zellvolumens in hypertonem Milieu wurde durch eine Steigerung der SNAT2-Gen-Expression in hypertonem Milieu bestätigt [Franchi-Gazzola et al. 2006]. Die adaptive Steigerung der System-A-Aktivität bei extrazellulärem Aminosäuremangel kommt ebenfalls über eine verstärkte de-novo Synthese von SNAT2 zustande [Gaccioli et al. 2006], [Tanaka et al. 2005].

Transportsystem ASC (ASC-Type Amino Acid Transporter, ASCT)

Das ASC-System ist wie das A-System natriumabhängig und transportiert vorwiegend kurze Aminosäuren mit 3-5 Kohlenstoffatomen wie Alanin, Serin und Cystein, aber auch Prolin und Threonin. Im Gegensatz zu System A ist es unempfindlich gegenüber N-methylierten Aminosäurederivaten wie MeAIB [Christensen et al. 1967]. In Zellen ohne System A-Expression wie z. B. nicht aktivierten Lymphozyten ist das ASC-System das wichtigste natriumabhängige Transportsystem für neutrale Aminosäuren [Borghetti et al. 1981]. Einige Autoren beschreiben für System ASC eine titrierbare pH-Abhängigkeit der Substratspezifität. Demnach transportiert System ASC bei physiologischen pH-Werten um 7,4 neutrale Aminosäuren, bei sauren pH-Werten zunehmend auch anionische Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat [Vadgama & Christensen 1984]. Möglicherweise bewirkt der saure pH-Wert eine Protonierung der sauren Aminosäuren, sodass diese in elektrisch neutraler Form zu Substraten des ASC-Systems werden [Utsunomiya-Tate et al. 1996]. Bisher wurden zwei Subtypen des ASC-Transportsystems identifiziert: ASCT1 [Arriza et al. 1993] und ASCT2 [Utsunomiya-Tate et al. 1996].

Weitere natriumabhängige Transportsysteme

System B^{0,+} wurde erstmals in Maus-Blastozysten, später auch in epithelialen Zellen nachgewiesen [Van Winkle et al. 1985]. Die Substratspezifität ist breiter als für die Systeme A und ASC. Das System transportiert natriumabhängig neutrale (auch verzweigte und aromatische), basische und bizyklische Aminosäuren wie Alanin, Lysin

und 2-Amino-2-Norbornan Carboxylsäure = 2-aminobicyclo-[2,2,1]-heptane-2-carboxylic acid (BCH). Die vorher verbreitete Ansicht, dass BCH als spezifischer Hemmstoff für System L eingesetzt werden kann, gilt somit nur in natriumfreier Umgebung. Der entsprechende humane $\text{ATB}^{0,+}$ Transporter wurde als Na^+/Cl^- abhängiger Transporter der Neurotransmitter-Transporter-Genfamilie identifiziert und in verschiedenen Geweben wie Lunge, Speichel- und Brustdrüse, Magen und Hypophyse nachgewiesen [Sloan & Mager 1999]. Das natriumabhängige **Transportsystem N** bevorzugt als Substrate Glutamin, Asparagin und Histidin und spielt eine wichtige Rolle im Glutamin-Metabolismus [Kilberg et al. 1980]. Zwei Mitglieder der Slc38 Gen-Familie, SNAT3 (NAT1) und SNAT5 (NAT 2), stellen Subtypen dieses Systems dar. Im Gegensatz zu den Subtypen von System A, findet ein Gegentransport von H^+ statt, was ihre bidirektionale Funktionsweise erklären könnte [Mackenzie & Erickson 2004], [Fei et al. 2000]. **System Gly** mit den Subtypen GLYT1 und GLYT2 ist spezifisch für Glycin und Sarcosin und wurde vor allem im Gehirn nachgewiesen, GLYT-1 auch in Chondrozyten [Barker et al. 1999]. Der Transport ist Na^+ - und Cl^- abhängig. **System β** ist ein natriumabhängiges Transportsystem für β -Aminosäuren und Taurin [Christensen 1964]. Als System X_{AG} wurden natriumabhängige Transporter für anionische Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) bezeichnet. Inzwischen wurden verschiedene neuronale, epitheliale und gliale Glutamat-Transporter identifiziert, die zur großen Gen-Familie der „Excitatory Amino Acid Transporters“ (EAAT) gehören. Für Prolin wird neben System A und ASC noch ein prolinspezifisches Transportsystem mit den Subtypen PROT1 und PROT2 erwähnt.

2.3.2 Natriumunabhängige Transportsysteme

Transportsystem L (Large Neutral Amino Acid Transporter LAT)

System L ist das wichtigste Transportsystem für große verzweigte und aromatische neutrale Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Methionin [Christensen 1990]. Der Transport ist stereospezifisch, natriumunabhängig, bidirektional und erfolgt als Aminosäureaustausch [Christensen 1990], [Oxender & Christensen 1963]. 2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure = 2-aminobicyclo-[2,2,1]-heptane-2-carboxylic acid (BCH) ist ein nicht metabolisierbares Substrat und kann als kompetitiver Hemmstoff genutzt werden [Christensen et al. 1969]. Im Gegensatz zu System A führen hohe intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen zur Erhöhung der Kapazität im Sinne einer Transstimulation [Maroni et al. 1986]. Die Vorinkubation mit System-L-transportierten Aminosäuren fördert die Aktivität ebenfalls (Preloading-Stimulation). L-Typ-Transport wurde fast ubiquitär in verschiedenen Spezies und Geweben nachgewiesen, darunter Gehirn, Muskeln, Niere, Leber, Dünndarm und Plazenta [Segawa et al. 1999],

[Christensen 1990]. System L spielt eine wichtige Rolle beim Aminosäure-Transport über die Blut-Hirnschranke und an Gliazellen [Broer et al. 1995].

Bisher wurden drei verschiedene L-Transporter identifiziert: LAT1 [Kanai et al. 1998], LAT2 [Pineda et al. 1999], [Segawa et al. 1999] und LAT3 [Babu et al. 2003]. LAT-1 und LAT-2 sind klassische L-Typ Transporter, die natriumunabhängig neutrale Aminosäuren transportieren und durch BCH hemmbar sind. Es handelt sich um Heterodimere aus dem Glykoprotein h4F2hc und den katalytischen Leichtketten hLAT1 bzw. hLAT2 (s.u.). Beide Untereinheiten sind zur Bildung eines funktionsfähigen Transporters notwendig. LAT-1 ist ein obligatorischer Aminosäure-Austauscher mit 1:1 Stöchiometrie [Kanai et al. 1998]. Pineda et al. beschreiben auch für LAT-2 eine starke Transstimulierbarkeit, sodass ebenfalls eine Austauscher-Funktion als bevorzugter Mechanismus angenommen wird [Pineda et al. 1999]. Segawa et al. halten für LAT-2 auch den Mechanismus der erleichterten Diffusion ohne Aminosäureaustausch für möglich [Segawa et al. 1999]. Der Nettotransport großer neutraler Aminosäuren über LAT1 und LAT2 hängt von der gleichzeitigen Expression unidirektionaler Transporter mit überlappender Substratspezifität (wie System A oder N) ab. Diese Transporter liefern und recyceln die intrazellulären Aminosäuren, die als Austausch-Substrate die Transporterfunktion aufrecht halten. Unidirektionale Transporter kontrollieren somit über die Bereitstellung der Austauschsubstrate die Aktivität von LAT1 und LAT2. LAT3 ist ohne weitere Untereinheit ein funktionsfähiges Transport-Protein und ermöglicht Influx und Efflux durch erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Austausch-Mechanismus [Babu et al. 2003]. Im Gegensatz zu LAT1 und LAT2, deren Affinitäten im mikromolaren Bereich liegen (hohe Affinität), liegt die Affinität von LAT3 zu seinen Substraten im millimolaren Bereich (niedrige Affinität).

LAT1 wird in den meisten Geweben, besonders in Gehirn, Milz, Thymus, Leber, Ovar, Testes, Plazenta und aktivierten Lymphozyten exprimiert [Wagner et al. 2001], [Prasad et al. 1999], [Kanai et al. 1998] und dient vermutlich dem Zellwachstum. Im Gehirn spielt LAT1 eine wichtige Rolle beim Aminosäuretransport über die Blut-Hirn-Schranke. LAT1 wird von vielen malignen Zellen überexprimiert und die Expression korreliert mit dem Tumorwachstum [Shennan et al. 2003], [Ohkame et al. 2001], [Yanagida et al. 2001], [Kanai et al. 1998]. LAT-1 ist pH-unabhängig und transportiert vor allem mittlere bis lange, verzweigte und aromatische Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Valin und auch BCH.

LAT-2 transportiert L-Isomere fast aller neutralen Aminosäuren, darunter sowohl große verzweigte und aromatische als auch kleine Aminosäuren wie Alanin, Serin, Threonin, Cystein und Glycin. Die Affinität zu Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Threonin, Asparagin, Isoleucin, Cystein, Serin, Leucin, Valin und Glutamin ist höher als zu Histidin, Alanin, Methionin und Glycin [Segawa et al. 1999]. BCH wirkt ebenfalls als Hemmstoff. Die Aktivität von LAT-2 steigt sich bei sauren pH-Werten mit einem Maximum bei pH 6,25 [Segawa et al. 1999]. LAT2 wurde vor allem auf den basolateralen Membranen von Transportepithelien in Niere, Dünndarm, Plazenta, Gehirn und Leber aber auch in Skelett- und Herzmuskelzellen nachgewiesen [Pineda et al. 1999], [Segawa et al. 1999], sodass eine wichtige Rolle bei transepithelialen (re)absorptiven Vorgängen angenommen wird.

LAT-3 transportiert vor allem klassische L-System-Substrate wie L-Leucin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin, L-Methionin und L-Valin. BCH wirkt als Hemmstoff. Im Gegensatz zu LAT-1 und LAT-2 werden auch bestimmte Aminosäure-Alkohole wie L-Leucinol, L-Valinol und L-Phenylalaninol trotz positiver Nettoladung über LAT-3 transportiert [Babu et al. 2003]. LAT-3 ist pH-abhängig mit einer Verringerung der Aktivität bei pH-Werten unter 6,5 und über 8. *N*-Ethylmaleimid (*NEM*) wirkt als starker Inhibitor. LAT-3 wird in vielen Geweben exprimiert und wurde z. B. in Pankreas, Leber, Skelettmuskel, fetaler Leber, in geringerem Maß auch in Herz, Plazenta, Lunge, Niere, Milz, Prostata, Ovar, Dünndarm, Colon, Lymphknoten und Knochenmark nachgewiesen. LAT3 ist identisch mit dem Genprodukt von POV1, einem in Prostata-Tumoren überexprimierten Gen; der erste Nachweis von LAT3 wurde an Leberzellkarzinomzellen erbracht, sodass möglicherweise ein Zusammenhang mit kanzerogenetischen Mechanismen besteht [Babu et al. 2003].

Weitere natriumunabhängige Transportsysteme

Zu den natriumunabhängigen Aminosäuretransportsystemen zählen neben System L auch die Systeme T, y^+ , y^+L , $b^{0,+}$, asc, und x_c^- [Wagner et al. 2001]. **System T** wurde in humanen Erythrozyten neben System L als weiteres Transportsystem für aromatische Aminosäuren wie L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Phenylalanin identifiziert [Rosenberg et al. 1980]. Spezifischer Hemmstoff für System T ist 4-Azidophenylalanin. Im Unterschied zu System L wirken auf System T auch N-methylierte und N-acetylierte Derivate aromatischer Aminosäuren inhibitorisch, nicht jedoch Aminosäure-Methylester [Kim et al. 2001], [Rosenberg et al. 1980]. Das entsprechende Transportermolekül TAT1 (T-Type Amino Acid Transporter1) konnte in Dünndarm, Plazenta und Leber nachgewiesen werden [Kim et al. 2001]. TAT1 transportiert spezifisch aber mit niedriger Affinität aromatische Aminosäuren sowie aromatische Aminosäurederivate

wie L-DOPA und 3-O-methyl-DOPA, nicht jedoch α -Methyl-DOPA, α -Methyl-Tyrosin, Tyramin oder Schilddrüsenhormone. Der Mechanismus ist natriumunabhängig, vermutlich als erleichterte Diffusion. TAT1 wurde basolateral an Transportepithelien des Ratten-Dünndarms lokalisiert und scheint somit eine Rolle beim transepithelialen Transport aromatischer Aminosäuren zu spielen [Kim et al. 2001]. BCH oder MeAIB zeigen keine inhibitorische Wirkung auf TAT1.

Das **y⁺-System**, früher als Ly⁺-System bezeichnet [Christensen & Liang 1966], [Christensen & Antonioli 1969], ist ein spezifisches Transportsystem für kationische (dibasische) Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Ornithin. Bisher wurden vier verschiedene Transportermoleküle CAT1-4 identifiziert. Der Transportmechanismus ist natriumunabhängig, vermutlich als erleichterte Diffusion, und reagiert sensibel auf Veränderungen des Membranpotenzials [Kavanaugh 1993].

Als weiteres Transportsystem für kationische Aminosäuren wurde das **y⁺L-System** zuerst in humanen Erythrozyten, später auch in Plazenta, Dünndarm, Niere, Fibroblasten und anderen Geweben beschrieben [Devés et al. 1992]. Es weist eine höhere Affinität, jedoch geringere Kapazität auf als das y⁺-System [Eleno et al. 1994]. Im Unterschied zum y⁺-System werden nicht nur kationische sondern in Anwesenheit von Natriumionen auch langkettige neutrale Aminosäuren v. a. Leucin, Methionin und Glutamin mit hoher Affinität transportiert [Devés et al. 1998]. Der Transport erfolgt bevorzugt als Austausch von intrazellulären kationischen gegen extrazelluläre neutrale Aminosäuren und Natrium. In Transportepithelien befindet sich System y⁺L basolateral und vermittelt die (Re)absorption kationischer Aminosäuren. In Abwesenheit von Natrium werden kationische Aminosäuren wechselseitig ausgetauscht. BCH hat keinen Einfluss auf das y⁺L-System [Devés et al. 1998]. Bisher wurden die zwei Isoformen y⁺LAT1 und y⁺LAT2 molekular identifiziert [Torrents et al. 1998]. y⁺LAT1 spielt eine wichtige Rolle beim basolateralen Transport basischer Aminosäuren in der Niere, wurde aber auch in Dünndarm, peripheren Leukozyten, Lunge, Plazenta, Milz, Leber, Pankreas, Epididymis, Testis, Ovar und Schilddrüse nachgewiesen [Torrents et al. 1998], [Wagner et al. 2001]. Defekte im y⁺LAT1-Gen verursachen die autosomal rezessive Lysinurische Proteinintoleranz [Torrents et al. 1998]. y⁺LAT2 wurde im Gehirn sowohl bei Neuronen als auch Astrozyten nachgewiesen, außerdem in Testis, Parotis und in geringerem Maß in Dünndarm, Niere und Herz. y⁺LAT2 fungiert möglicherweise hauptsächlich als Arginin/Glutamin-Austauscher und soll eine wichtige Rolle im ZNS und an der Blut-Hirn-Schranke spielen [Broer et al. 2000].

Transportsystem $b^{0,+}$ vermittelt natriumunabhängig den Transport neutraler und dibasischer (kationischer) Aminosäuren und von Cystin [Van Winkle et al. 1988]. Es handelt sich um einen obligatorischen Austauscher, der bevorzugt extrazelluläre kationische Aminosäuren und Cystin gegen intrazelluläre neutrale Aminosäuren austauscht. Der Transportvorgang verursacht dabei einen einwärts gerichteten Ladungsfluss. Das Transportermolekül $b^{0,+}$ AT wird unter anderem an der luminalen Seite von Transportepithelien in Niere, Dünndarm und Plazenta exprimiert. Ein genetischer Defekt des $b^{0,+}$ -Transporters verursacht Cystinurie [Chairoungdua et al. 1999], [Pfeiffer et al. 1999].

System asc ist ein natriumunabhängiges Transportsystem für kurzkettige neutrale Aminosäuren wie Alanin, Serin, Cystein, Glycin und Threonin [Young et al. 1988]. Neben den L-Formen werden auch D-Serin und D-Alanin transportiert. System asc wurde zuerst auf humanen Erythrozyten beschrieben. Genetisch identifiziert wurde der Transporter asc-1, die entsprechende mRNA wurde in Gehirn, Plazenta, Lunge und Dünndarm nachgewiesen [Fukasawa et al. 2000]. **System x_c^-** , ein natriumunabhängiges Transportsystem für anionische Aminosäuren, dient vor allem der zellulären Aufnahme von Cystin im Austausch gegen Glutamat [Christensen 1990]. Ein entsprechendes Transportermolekül xCT wurde genetisch identifiziert [Wagner et al. 2001].

2.3.3 Transporter-Gene und -Proteine

Die traditionelle Einteilung der Aminosäuretransporter anhand Substratspezifität und physiologischer Eigenschaften wird zunehmend ersetzt durch neue Klassifikationen, die auf der fortschreitenden Aufklärung molekularer Strukturen beruhen. Die Aminosäuretransporter gehören zu verschiedenen SLC (Solute Carrier) Genfamilien, einen Überblick gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Genfamilien verschiedener Aminosäure-Transporter [nach Hoffmann R. 2006]

Genfamilie	Beschreibung	zugehörige Aminosäure-Transporter
SLC1	„Glutamat-Transporter-Familie“ Exzitatorische Aminosäure-Transporter (EAAT Excitatory Amino Acid Transporters)	Glutamat-Transporter, ASCT1 und ASCT2
SLC38	„SNAT-Familie“ Natriumabhängige Neutrale Aminosäure-Transporter (Sodium Dependant Neutral Amino Acid Transporter SNAT)	ATA1 (SNAT1), ATA2 (SNAT2), ATA3 (SNAT4), NAT1 (SNAT3), NAT2 (SNAT5)
SLC6	Neurotransmitter-Transporter	ATB ^{0,+} , GLYT1, GLYT2, PROT1, PROT2
SLC7	Kationische und „Broad-Scope“ Aminosäure-Transporter (CAT- und BAT-Familie)	CAT1-4 LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, asc1, xCT (Dimere mit 4F2hc); b ^{0,+} AT (Dimer mit rBAT); möglicherweise asc2 mit unbekannter schwerer Kette
SLC3	schwere Untereinheiten der heterodimerischen Aminosäure- Transporter	Glykoproteine rBAT und 4F2hc

Die Glutamat-Transporter-Familie (SLC1-Familie)

Bisher wurden mindestens fünf verschiedene gliale, neuronale und epitheliale exzitatorische Aminosäuretransporter identifiziert, die natriumabhängig Glutamat und Aspartat transportieren entsprechend dem Transportsystem X_{AG}^- . Nachgewiesen wurden sie vor allem in Gliazellen und Neuronen des ZNS. Zur gleichen Genfamilie gehören auch die Transporter ASCT1 und ASCT2, die dem ASC-System entsprechend natriumabhängig kleine neutrale Aminosäuren transportieren [Tamarappoo et al. 1996], [Utsunomiya-Tate et al. 1996], [Arriza et al. 1993].

Die SNAT-Familie (SLC38-Familie)

Zur Familie der natriumabhängigen neutralen Aminosäure-Transporter (Sodium Dependant Neutral Amino Acid Transporter SNAT) gehören drei Transporter vom A-Typ, sowie zwei Transporter vom N-Typ. ATA1, ATA2, ATA3 und NAT2 sind Natrium-Cotransporter, NAT1 funktioniert als Austausch von zwei Na^+ -Ionen und einer Aminosäure gegen ein H^+ -Ion. Es handelt sich um integrale Membranproteine mit

vermutlich 11-12 Transmembrandomänen [Desforgues et al. 2006], [Franchi-Gazzola et al. 2006], [Gaccioli et al. 2006], [Tanaka et al. 2005], [Mackenzie & Erickson 2004], [Mackenzie et al. 2003], [Gu et al. 2001], [Nakanishi et al. 2001], [Wang et al. 2000], [Fei et al. 2000], [Yao et al. 2000], [Sugawara et al. 2000].

Die Neurotransmitter-Transporter-Familie (SLC6-Familie)

Zu dieser Familie zählen neben zwei zerebralen Glycin- und Prolin-Transportern auch der Transporter $ATB^{0,+}$ mit breiter Substratspezifität für kationische und neutrale Aminosäuren. Der Transportvorgang ist natrium- und chloridabhängig [Sloan & Mager 1999].

Die CAT-Familie (Cationic Amino Acid Transporters, SLC7-Familie)

Aktive CAT-Transporter entsprechen dem Aminosäure-Transportsystem y^+ für kationische Aminosäuren [Devés & Boyd 1998]. Bisher sind drei Gene für insgesamt 4 Transporter bekannt: CAT-1, CAT-2A, CAT-2B und CAT-3. Es handelt sich um Proteine mit 12-14 Transmembrandomänen. Alle CAT-Transporter transportieren mit hoher Affinität kationische Aminosäuren durch erleichterte Diffusion. Der Transport ist natriumunabhängig. Sie sind an der Regulation der NO-Synthese durch Kontrolle der Argininaufnahme beteiligt. Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich in Gewebeverteilung, Kinetik und Regulation.

Die BAT-Familie (Broad-Scope Transport Proteins, SLC7-Familie)

Dazu gehört die große Gruppe der heterodimerischen Aminosäuretransporter (HAT), die sich aus einer leichten Kette mit Transporterfunktion und einer schweren Glykoprotein-Kette mit Regulatorfunktion zusammensetzen [Palacin & Kanai 2004]. Sie werden deshalb auch als Glycoprotein-assoziierte Aminosäuretransporter bezeichnet (gpaAT). Funktionell ist diese Transportergruppe heterogen und umfasst verschiedene Transportsysteme der traditionellen Einteilung mit unterschiedlichen Substratspezifitäten und physiologischen Eigenschaften. Die meisten HATs funktionieren als Aminosäure-Austauscher [Verrey et al. 1999]. Zu den HATs gehören Transporter vom L-Typ für große neutrale Aminosäuren, vom asc-Typ für kleine neutrale Aminosäuren, vom x_c^- -Typ für anionische Aminosäuren, vom y^+L -Typ für kationische und neutrale Aminosäuren (natriumabhängig bei neutralen Aminosäuren) und vom $b^{0,+}$ -Typ für kationische und neutrale Aminosäuren [Devés & Boyd 1998].

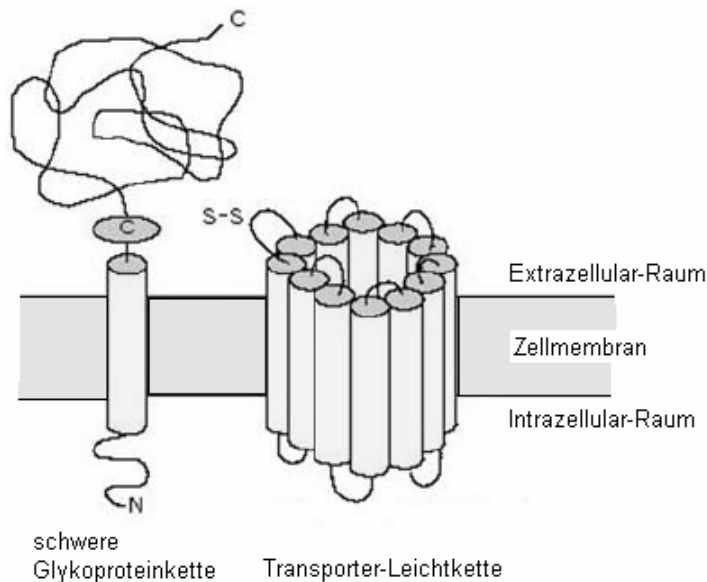


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines heterodimerischen Aminosäuretransporters

Die **schweren Ketten** sind Glykoproteine der SLC3-Genfamilie [Palacin & Kanai 2004]. Bisher sind zwei schwere Ketten bekannt: 4F2hc (CD98) und rBAT (D2, NBAT) [Broer et al. 1995], weshalb die Transporter-Familie auch als rBAT/ 4F2hc-Familie bezeichnet wird [Verrey et al. 2004], [Malandro & Kilberg 1996]. Bei den schweren Ketten handelt es sich um Typ II Membranglykoproteine von 59-78 kDa mit 1-4 Transmembrandomänen, extrazellulärem C- und intrazellulärem N-Terminus [Palacin & Kanai 2004]. Die Hauptaufgabe der schweren Ketten ist es, den Transporter zur Plasmamembran zu dirigieren [Palacin & Kanai 2004], rBAT ist möglicherweise außerdem auch direkt am Substrattransport beteiligt [Broer & Wagner 2002]. 4F2hc ist bekannt als Proliferationsmarker für normales und neoplastisches Zellwachstum und wurde ursprünglich als Marker für Tumorzellen und aktivierte Lymphozyten beschrieben [Broer et al. 1995]. Neben den Glykoproteinen 4F2hc und rBAT werden noch weitere, bisher unbekannte schwere Ketten vermutet. So soll beispielsweise ein heterodimerischer Transporter vom asc-Typ (asc-2) weder mit 4F2hc noch mit rBAT assoziiert sein [Chairoungdua et al. 2001]. Zwischen den verschiedenen Untereinheiten heterodimerischer Transporter gibt es komplexe Interaktionen, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind [Wagner et al. 2001].

Die **leichten oder katalytischen Ketten** der heterodimerischen Aminosäuretransporter gehören zur SLC7-Genfamilie [Palacin & Kanai 2004]. Sie besitzen vermutlich 12 Transmembrandomänen und sind über eine Disulfidbrücke mit den schweren Ketten 4F2hc oder rBAT verbunden [Kanai & Endou 2001]. Bisher sind 7 verschiedene leichte Ketten bekannt: 4F2hc interagiert mit den Leichtketten LAT1,

LAT2, y^+ LAT1, y^+ LAT2, asc1 und xCT und bildet so Transporter der Typen L, y^+ L, asc und x_c^- [Wagner et al. 2001]. Mutationen im y^+ LAT1-Gen führen zur Lysinurischen Proteinintoleranz (LPI) [Torrents et al. 1998]. Im Unterschied zu 4F2hc dimerisiert das Glykoprotein rBAT nur mit einer Leichtkette, dem $b^{0,+}$ Aminosäuretransporter für Cystin, kationische und neutrale Aminosäuren [Wagner et al. 2001]. rBAT- $b^{0,+}$ wurde vor allem in Niere und Dünndarm an den Mikrovilli der proximalen Tubuli und der Dünndarmmukosa gefunden und ist verantwortlich für die apikale Reabsorption von Cystin in der Niere. Mutationen im rBAT-Gen führen zu Cystinurie [Palacin et al. 2001]. LAT1 gilt als Prototyp des neutralen Aminosäure-Transporters. Es wird vermutet, dass sich andere HATs wie y^+ LAT1, y^+ LAT2 und $b^{0,+}$ daraus divergierend weiterentwickelt haben und als Folge auch mit elektrisch geladenen Aminosäure-Seitenketten interagieren [Kanai & Endou 2001].

Bei der Charakterisierung von Transportmechanismen geht es zunehmend um einzelne Moleküle und deren Interaktionen. Eine Charakterisierung auf zellulärer Ebene anhand funktioneller Eigenschaften, wie sie in dieser Arbeit erfolgte, liefert hingegen Informationen über das Aufnahmeverhalten bestimmter Zellen unter bestimmten Konditionen, wobei verschiedene Transportmechanismen, unterschiedliche Transportmoleküle und deren Interaktionen am Transportvorgang beteiligt sein können. Beobachtungen auf zellulärer Ebene ermöglichen einerseits Rückschlüsse auf das Verhalten bestimmter Gewebe und Zellverbände, andererseits können sie eine Grundlage schaffen für weitergehende Untersuchungen auf molekularer Ebene. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Aminosäure-Transportsysteme und entsprechende Gene und Proteine.

Tab. 2: Aminosäure-Transportsysteme und entsprechende Gene und Proteine

Abkürzungen: SLC: Solute Carrier Family; Co: Cotransport; eD: erleichterte Diffusion; A: Austauschere-Funktion; AS: Aminosäure(n), extraz: extrazellulär, intraz: intrazellulär, (un)abh: (un)abhängig

Gen*	Protein / Synonyme	Substrate	Mechanismus	Gewebe	Sonstiges
System X_{AG}: natriumabhängiger Transport von anionischen Aminosäuren					
SLC1A1	EAAC1	EAAC1, EAAT3, Excitatory amino-acid carrier 1, Excitatory amino acid transporter 3, Neuronal and epithelial glutamate transporter, Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 3			
SLC1A2	GLT1	EAAT2, Excitatory amino acid transporter 2, GLT1, GLT-1, Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 2			
SLC1A3	GLAST1	EAAT1, Excitatory amino acid transporter 1, GLAST, GLAST1, GLAST-1, Glial glutamate transporter, Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 1			
SLC1A6	EAAT4	EAAT4, Excitatory amino acid transporter 4, MGC33092, Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter			
SLC1A7	EAAT5	EAAT5, Excitatory amino acid transporter 5, Retinal glutamate transporter			
Transport-System A: natriumabhängig; kurze aliphatische, auch polare Seitenketten; Gly, Ala, Ser, Pro; pH-sensitiv (inaktiv bei pH < 6), adaptive Regulation, Transinhibition, Preload Hemmung, spez. Hemmstoff MeAIB					
SLC38A1	ATA-1 (amino acid transporter A), SAT1, SNAT1	kleine aliphatische neutrale AS v.a. Ala, Gly, Gln, MeAIB	Na ⁺ -Co	Plazenta, Herz, Neurone, Gliazellen	487 AS, mit vermutlich 11 Transmembrandomänen; pH sensitiv
SLC38A2	ATA-2 SAT2, SNAT2	kleine aliphatische neutrale AS, MeAIB	Na ⁺ -Co	In vielen Geweben	Geninduktion bei extrazellulärem AS-Mangel und bei hypertonem Stress; pH sensitiv
SLC38A4	ATA-3 SNAT4	kleine aliphatische neutrale AS, MeAIB	Na ⁺ -Co	Leber >> Muskel, Niere, Pankreas, Plazenta	547 AS; pH sensitiv
Transport-System N: natriumabhängig; Glutamin, Asparagin, Histidin					
SLC38A3	NAT-1 (N-type amino acid transport), SNAT3, SN1 (System N amino acid transport)	Gln, His, Asn, Ala	2Na ⁺ /1AS gegen 1H ⁺	Astrozyten, Hepatozyten	504 AS, pH sensitiv, stärkere bidirektionale Funktionsweise als System A
SLC38A5	NAT-2 SNAT5, SN2	Gln, His, Asn, Ala, Ser, Gly	Na ⁺ -Co	v.a. Gehirn und Leber	472 AS; hochgradig pH sensitiv
Transport-System ASC: natriumabhängig; kleine neutrale Aminosäuren (Gly, Ala, Ser, Pro), Resistent gegen MeAIB, Transstimulation					
SLC1A4	ASCT1 (ASC-type transport), SATT	bei pH 7,4: Na ⁺ -abh. kleine neutrale AS; nicht MeAIB bei saurem pH: zunehmend anionische AS	Na ⁺ -Co		
SLC1A5	ASCT2 , ATB(0), Baboon M7 virus receptor, M7VS1, RD114/ simian type D retrovirus receptor	kleine neutrale AS, nicht MeAIB	Na ⁺ -Co		
Transportsystem B^{0,+}: natrium- und chloridabhängig; breites Substratspektrum: neutrale und kationische Aminosäuren					
SLC6A14	ATB^{0,+} (amino acid transporter B ^{0,+}), OBX	Breite Substratspezifität: kationische und neutrale AS (auch verzweigte/ aromatische): Ala, Lys, Arg, Gly, Trp; auch BCH	Na ⁺ /Cl ⁻ -abh.	Epitheliale Gewebe, Lunge, Speichel- und Brustdrüse, Magen, Hypophyse	

Glycin- und Prolintransporter					
SLC6A5	GLYT2	Glycin	Na ⁺ /Cl ⁻ -abh.		
SLC6A9	GLYT1	Glycin	Na ⁺ /Cl ⁻ -abh.		
SLC6A7	PROT1	Prolin	Na ⁺ -Co		
SLC6A20	PROT2 , Neurotransmittertransporter rB21A homolog, SIT1, XTRP3, XT3	Prolin	Na ⁺ /Cl ⁻ -abh.		
Transport-System y⁺: natriumunabhängig; kationische Aminosäuren					
SLC7A1	CAT-1 (cationic amino acid transporter), ATRC1, ERR, REC1	kationische L-AS	eD; A (nicht obligat)	Ubiquitär außer in der Leber; auf Epithelzellen basolateral	
SLC7A2	CAT-2 (A oder B), TEA, ATRC2	kationische L-AS	eD	CAT-2A: Leber, Skelettmuskel Pankreas CAT-2B: viele verschiedene Gewebe	CAT-2A: niedrige Affinität CAT-2B: hohe Affinität
SLC7A3	CAT-3 , ATRC3	kationische L-AS	eD	Thymus, Ovar, Testes, Neurone	
SLC7A4	CAT-4 (?)	?	?	Gehirn, Testes, Plazenta	
Transport System L: natriumunabhängig große verzweigt-kettige und aromatische neutrale AS; adaptive Regulation, Transstimulation, Preload Stimulation, kompetitiver Hemmstoff ist BCH					
SLC7A5	LAT1 (Large neutral amino acids transporter / L-Type Amino acid transporter), hLAT1, Integral membrane protein E16	große neutrale L-AS mit verzweigten oder aromatischen Seitenketten: Leu, Phe; BCH; auch T3, T4, L-Dopa, keine AS mit Ladung	A: mit ähnl. extraz. u. intraz. Substratspezifität, geringere intraz. Affinität	Gehirn, Ovar, Testes, Plazenta, Blut-Hirn-Schranke, aktivierte Lymphozyten, Tumorzellen; geringere Expression in vielen weiteren Geweben	507 AS, dimerisiert mit der schweren Kette 4F2hc/CD98; Unabhängig von pH und Na ⁺
SLC7A8	LAT2	Breitere Substratspezifität als LAT1: kleine und große neutrale L-AS	A oder eD	Niere>>> Plazenta >> Gehirn, Leber> Milz, Skelett- und Herzmuskel, Dünndarm, Lunge; basolateral auf Transportepithel	535 AS, dimerisiert mit der schweren Kette 4F2hc/CD98, 12 Transmembrandomänen, höchste Affinität bei pH 6,25
SLC43A1	LAT3 POV1, Prostate cancer overexpressed gene 1 protein	große verzweigte oder aromatische AS, BCH; Aminosäure-Alkohole	eD		Ohne weitere Untereinheiten aktiv
Transport-System y⁺L: Austausch von intrazellulären kationischen AS gegen extrazelluläre neutrale AS + Na⁺ (Transport neutraler AS ist natriumabhängig, Transport kationischer AS natriumunabhängig)					
SLC7A7	y⁺LAT1 (y ⁺ L-type amino acid transporter), Monocyte amino acid permease 2	Na ⁺ -unabh.: kationische AS Na ⁺ -abh.: große neutrale L-AS	A: intraz. kationische gegen extraz. neutrale AS + Na ⁺	basolateral in Niere und Dünndarm, Leukozyten, Plazenta, Milz, Lunge	511 AS, Dimerisiert mit 4F2hc/CD98; 12 Transmembrandomänen, Defekt verursacht lysinurische Proteinintoleranz (LPI)
SLC7A6	y⁺LAT2	Na ⁺ -unabh.: kationische AS; Na ⁺ -abh.: große neutrale L-AS	A: intraz. kationische gegen extraz. neutrale AS + Na ⁺	Weite Verbreitung: Gehirn, Dünndarm, Parotis, Herz, Niere, Lunge, Leber; basolateral auf Transportepithel	515 AS, Dimerisiert mit 4F2hc/CD98; 12 Transmembrandomänen

Transport-System $b^{0,+}$: natriumunabhängiger Austausch von extrazellulären kationischen AS oder Cystin gegen intrazelluläre neutrale AS					
SLC7A9	$b^{0,+}$AT ($b^{0,+}$ -type amino acid transporter), BAT1	hohe Affinität für Cystin und kationische AS: Arg, Lys geringere Affinität für große neutrale AS: Leu, Phe, Gln	A: extraz. kationische / Cystin gegen intraz. neutrale AS	Luminal/ apikal auf Transport-epithel in Niere und Dünndarm, Plazenta, Gehirn, Leber	Dimerisiert mit rBAT, Defekt verursacht Cystinurie Typ B
Transport-System asc: natriumunabhängig; kleine neutrale AS					
SLC7A10	Asc1 (asc-type amino acid transporter)	natriumunabh. kleine neutrale AS: Gly, Ala, Ser, Thr, Cys (D- und L-Form)	bevorzugt A	Gehirn, Herz- und Skelettmuskel, Niere (bei der Maus auch Lunge, Dünndarm und Plazenta; basolateral auf Transportepithel	Dimerisiert mit der schweren Kette 4F2hc/CD98
Slc7a12 (Maus)	Asc2 (?) , XAT1		eD oder A	Bisher nur in murinen Geweben nachgewiesen	Dimerisiert mit unbekannter Heavy Chain
Transport-System x_c^-: natriumunabhängiger Cystin/Glutamat-Austauscher					
SLC7A11	xCT	Natriumunabh. anionische AS: L-Glu, Cystin (in anionischer Form)	A: extraz. Cystin gegen Glutamat	Makrophagen, Gehirn, Retina, Leber, Niere; basolateral auf Transportepithel	Dimerisiert mit der schweren Kette 4F2hc/CD98
Schwere Ketten der heterodimerischen Aminosäuretransporter					
SLC3A1	rBAT , ATR1, B(0,+)-type amino acid transport protein, NBAT, Neutral and basic amino acid transport protein	Aktivator für Transport von Cystin, dibasischen und neutralen AS (System $b^{0,+}$)			Dimerisiert mit der leichten Kette $b^{0,+}$ AT; Mutationen im rBAT-Gen verursachen Cystinurie
SLC3A2	4F2hc 4F2 cell-surface antigen heavy chain, CD98 antigen, Lymphocyte activation antigen 4F2 large subunit	Aktivator für Transport von dibasischen und neutralen AS (Systeme L, y ⁺ L, asc und x_c^-)			Dimerisiert mit den leichten Ketten LAT1, LAT2, y ⁺ LAT1, y ⁺ LAT2, asc1 und xCT

* Die Zuordnung der Gene erfolgte nach Hoffmann R. Information hyperlinked over proteins (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP>) Stand:10.10.2006

3. MATERIAL

3.1 Chemikalien

Calciumnitrat-Tetrahydrat $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	Merck, Darmstadt	
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat $[\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$	Merck, Darmstadt	1065741000
Ethanol 70%		
D-Glukose	Gibco, Karlsruhe	39002-019
Glukose Lösung, x100	Gibco, Karlsruhe	
Kaliumchlorid $[\text{KCl}]$	Merck, Darmstadt	4936
Magnesiumsulfat-Heptahydrat $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$	Sigma, St. Louis	M-7506
Natriumchlorid $[\text{NaCl}]$	Merck, Darmstadt	106404
Natriumchlorid Lösung 0,9%	Merck, Darmstadt	106404
Natriumhydrogencarbonat $[\text{NaHCO}_3]$	Merck, Darmstadt	
Natronlauge 3N und 1N	Apotheke Klinikum Rechts der Isar	
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt	109057
Natrium-Lauryl-Sulfat (SDS)	Bio Rad	161-0302
Scintillations cocktail Lumasafe Plus	Lumac LSC	

Kompetitive Hemmstoffe für Aminosäuretransporter

2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure (BCH)	Sigma, Steinheim	A-7902
α -(Methylamino)isobuttersäure (MeAIB)	Sigma, Steinheim	M-2383
L-Serin	Sigma, Steinheim	S-450

3.2 Aminosäuren

Aminosäuren ohne radioaktive Markierung

L-Methionin (Met)	Sigma, Taufkirchen	M9625
L-Serin (Ser)	Sigma, Steinheim	S450
L-Tyrosin (Tyr)	Fluka, Buchs (CH)	93829
Fluorethyl-L-Tyrosin (FET*)	Nuklearmedizinische Klinik der TUM	

Radioaktiv markierte Aminosäuren

L-[methyl- ^3H]Methionin (MET)	Amersham biotech	TRK705
--	------------------	--------

Wässrige Lösung mit 0,2% Mercaptoethanol

Aktivität: 37,0 MBq/ml (1mCi/ml)

spezifische Aktivität: 3,0 TBq/mmol (83,0 Ci/mmol)

molares Gewicht: 155 g/mol (markiert), 149 g/mol (unmarkiert)

Reinheit: 96,7%

Tritium ^3H : HWZ 12,35 Jahre; Elektronenstrahlung (β^- -Zerfall), 18,6 keV

O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET)

molares Gewicht: 181,19 g/mol

spez. Aktivität über 18,5 GBq/ μmol

Herstellung im radiochemischen Labor der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München durch ^{18}F -Fluoraktylisierung von Tyrosin [Wester et al. 1999]

^{18}F : HWZ 109,71 min, Positronenstrahler (β^+ -Zerfall), Vernichtungsstrahlung (γ -Photonen) 511 keV

Herstellung durch Protonenbeschleunigung auf ein ^{18}O -Wassertarget (Zyklotron der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München, 11-MeV-Zyklotron RDS 112, CTI / Siemens)

3.3 Zellen

Tumorzellen

Humane Gliomzellen HS-683

Herkunft: Zell- und Tumor-Bank des West German Cancer Center Essen,
ATCC-Nr.: HTB 138
Monolayer-Zellen, Verdopplungszeit 15-20 h
Mittlerer Zelldurchmesser: 16 µm
Mittleres Zellvolumen: 3000 fl

Humane Lymphom-Zellen Su-DHL-4

Histiozytisches Burkitt-Lymphom
University of Umea, Schweden
Mittlerer Zelldurchmesser: 9,75 µm
Mittleres Zellvolumen: 486 fl

Granulozyten

Isoliert aus frischen Buffy Coats der Blutbank des Klinikums Rechts der Isar
der TU München durch Dichtegradienten-Separation
Mittlerer Zelldurchmesser: 8,88 µm
Mittleres Zellvolumen: 870 fl

Material zur Isolation der Granulozyten:

Buffy Coat	Blutdepot des Klinikum Rdl
Histopaque 1119-1 (Dichte 1,119)	Sigma, Steinheim 1119-1
Histopaque 1077 (Dichte 1,077)	Sigma, Steinheim 1077-1
Dulbecco's PBS, 10x	Gibco, Karlsruhe 14080-048
Trypan-Blau 0,4%	Sigma T8154

Granulozyten-Stimulans:

Lipopolysaccharid (LPS), E. coli Serotyp 0111:B4	Sigma, Steinheim	L-2630
--	------------------	--------

Material zur Zellproteinbestimmung

Natronlauge N3	Apotheke, Klinikum Rdl
Bio-Rad Protein Assay	Bio Rad
BSA-Standard 2 mg/ml	Uptima interchim

3.4 Pufferlösungen, Medien und Zusätze

RPMI 1640 Medium, 2 g/L NaHCO ₃	Biochrom, Berlin	FG 1215
Einfriermedium: DMSO-Freeze-Medium	IGEN international	
Phosphatpuffer: Dulbecco's PBS, w/o Ca, Mg	Biochrom	L 1825
Casy-ton isotone Salzlösung für Zellzählgerät		
Dulbecco's MEM		
mit 3,7 g/L NaHCO ₃ , 4,5 g/L D-Glucose, ohne NaPyr	Biochrom, Berlin	FG 0435
Fetales Kälberserum, FKS	Biochrom, Berlin	SO115
EDTA 1% in PBS	c.c.pro	
davon 30 ml/L in PBS		
= 0,03% Endkonzentration		
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ 10000 µg/ml	Biochrom	
Natriumpyruvat 100 mmol/L	Biochrom	
2-Mercaptoethanol 1000-fach stock solution		
(34,9 µl/ 10 ml H ₂ O = 50 mmol/L = 3900 mg/L)		

Zusammensetzung der Kulturmedien:

Kulturmedium für HS-683 Gliomzellen:

Dulbecco's MEM	500 ml
FKS	75 ml (15%)
NaPyr (100mmol/l)	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml (100 U/ml)
2-Mercaptoethanol*	3,9 mg/L Endkonzentration

* zur Wachstumsstimulation nur bei Bedarf

Kulturmedium für Lymphomzellen und Granulozyten:

RPMI 1640 Medium	500 ml
FKS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml (100 U/ml)

Zusammensetzung des Versuchspuffers:

NaCl	6000 mg/L
KCl	400 mg/L
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	1400 mg/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	100 mg/L
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	100 mg/L
NaHCO ₃	2000 mg/L
D-Glucose	2000 mg/L
Aqua dest. ad 1000 ml	
Salzsäure bzw. Natronlauge zur Einstellung des pH-Wertes	

3.5 Geräte

Absauggerät ECOMP 4153	Eppendorf
Analysenwaage LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Beta-counter Win spectral 1414	
liquid scintillation counter	Wallac, Finnland
Flow: Laminair HB 2472	Heraeus
Gamma-counter 1480 Wizard 3"	Wallac, Finnland
Kamera: Minolta X-300s	Minolta, Japan
Kühlschränke: 5°C, -20°C, -70°C	
Mikroskop: Axiovert 10	Zeiss, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Madaus Diagnostika, Köln
UV/VIS Spektrophotometer Uvikon 9331	Kontron Instruments, Italien
Vortex-Genie	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbad, GFL 1092, 37°C	
Zellkulturschrank Typ 6000, 37° C, 5% CO ₂	Heraeus
Zellzählgerät: Casy 1	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus

3.6 Sonstiges

Eppendorfpipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf
Eppendorf-Multipette plus und combitips 5 ml	Eppendorf
Einmalküvetten 1,5 ml Halbmikro	Plastibrand
Nunc Cryo Tubes 1,8 ml	Nunc Inter Med, Dänemark
Pasteurpipetten	Greiner, Solingen
Polyvials 6 ml und 20 ml	Zinsser Analytic, Frankfurt
Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Zellkulturflaschen cellstar, 550 ml	Greiner, Solingen
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Falcon, Greiner Labortechnik

4. METHODIK

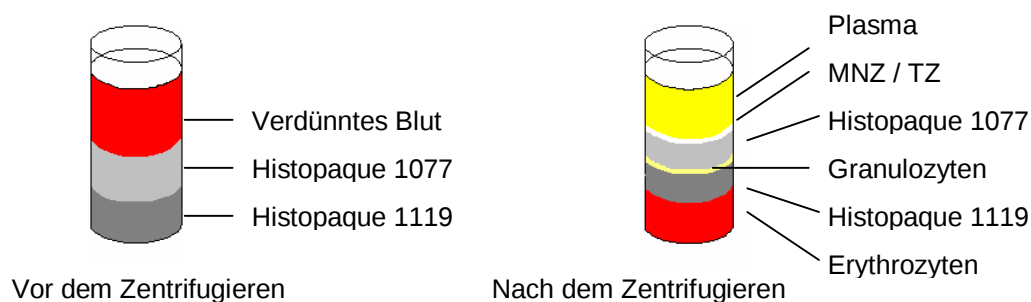
4.1 Bereitstellung der verwendeten Zellen

Humane Granulozyten wurden durch Dichtegradienten-Separation aus Buffy Coats isoliert. Dies sind Blutkonserven nach weitgehender Abtrennung der Erythrozyten- und Plasma-/Thrombozytenfraktion durch Zentrifugieren. Gliomzellen wurden als Monolayer-Zellen, Lymphomzellen als Suspensionszellen in Zellkulturflaschen mit Luftfilter bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

4.1.1 Gewinnung von humanen Granulozyten

Dichtegradienten-Separation

Zur Isolierung von Granulozyten wurden Buffy Coats aus 500 ml Vollblut verwendet, was 100-150 ml Buffy Coat entsprach. Um eine Überladung des Dichtegradienten zu vermeiden war eine Verdünnung mit PBS im Verhältnis von 1:1 notwendig. In Zentrifugenröhrchen wurden von unten nach oben nacheinander 12,5 ml Histopaque 1119, 12,5 ml Histopaque 1077 und 25 ml Blut-PBS-Gemisch übereinander geschichtet und bei 2200 Umdrehungen pro Minute (rpm) 30 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren stellt sich die Schichtung von oben nach unten folgendermaßen dar: Plasma, mononukleäre Zellen (MNZ) und Thrombozyten (TZ), Dichtegradient 1077, Granulozytenfraktion, Dichtegradient 1119, Erythrozytenfraktion.



Nach Absaugen der darüberliegenden Schichten bis ca. 0,5 cm über der Granulozytenschicht wurde diese möglichst exakt mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, in einem frischen Zentrifugenröhrchen mit mindestens der dreifachen Menge PBS vermischt (Waschschritt), anschließend bei 1000 rpm 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Hypotone Lyse der Erythrozyten

Da die Dichtegradienten-Separation nur eine grobe Trennung der Zellfraktionen erlaubt, ist auch bei exaktem Arbeiten eine „Verunreinigung“ der Granulozytenfraktion

mit Erythrozyten nicht zu vermeiden. Zur Beseitigung der verbliebenen Erythrozyten durch hypotone Lyse nutzt man deren im Vergleich zu den Granulozyten geringere osmotische Resistenz. Nach dem Waschschrift wurden dazu die Zellpellets in 10 ml sterilem Aqua dest. resuspendiert, was zum Platzen der Erythrozyten, nicht aber der Granulozyten führt. Nach 20-30 Sekunden wurde die hypotone Lyse durch Zugabe von 10 ml zweifach konzentrierter PBS gestoppt und die nunmehr isotone Suspension erneut bei 1000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension in 5 ml Kulturmedium. Anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium aufgenommen und bis zum Versuch im Brutschrank aufbewahrt. Vitalitätskontrollen mit Trypanblau ergaben eine Absterberate von 20-30% nach einem Tag, sodass die Zellen nie länger als einen Tag aufbewahrt wurden.

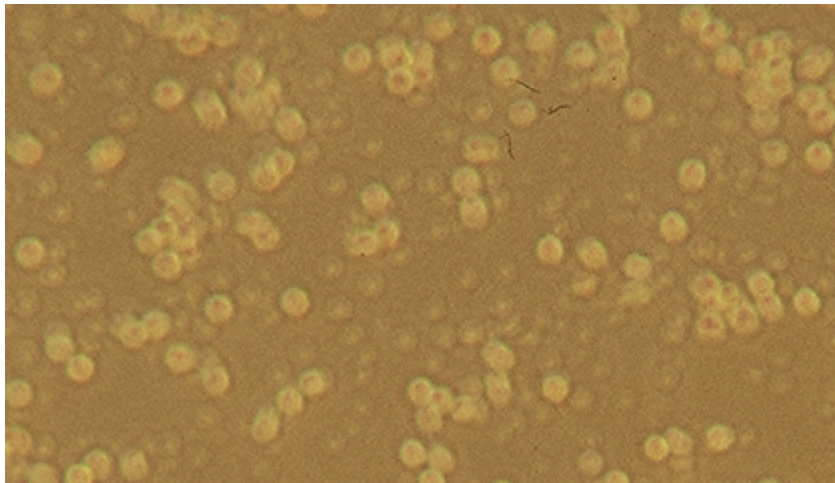


Abb. 5: Granulozyten nach der Isolation. Nativaufnahme in 400-facher Vergrößerung

Stimulation

Für Versuche mit stimulierten Granulozyten wurde dem Kulturmedium 8 Stunden vor dem Versuch lyophilisiertes LPS von *E. coli* in einer Endkonzentration von 100 ng/ml zugegeben.

4.1.2 Gliomzellen

Verwendet wurde die humane Astrozytomlinie HS-683. Die Monolayer-Zellen wurden in beschichteten Kulturflaschen mit 20-25 ml Dulbecco's MEM-Medium mit 15% FKS, 1% NaPyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Mediumwechsel

Nach leichtem Beklopfen der Kulturflasche zum Ablösen abgestorbener Zellen wurde das Medium über der Zellschicht mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch 20-25 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt. Bei einer Verdopplungszeit von 15-20 Stunden war jeweils nach 5-8 Tagen der Boden einer Kulturflasche komplett bewachsen und eine Zellpassage notwendig.

Ablösen der Zellen und Passage

Das Medium wurde abgesaugt, anschließend 6 ml 0,03% EDTA-Lösung zum Ablösen der adhären Zellen sowie der interzellulären Kontakte zugegeben. Nach 10 Minuten im Brutschrank und kräftigem Beklopfen der Kulturflasche lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab (Kontrolle unter dem Mikroskop). Zur Entfernung der EDTA-Lösung wurden die abgelösten Zellen in 20ml vorbereitetem frischem Medium gewaschen, bei 1000 rpm, 20°C, 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 6 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und auf 3-6 frische Kulturflaschen mit je 20ml Medium verteilt.

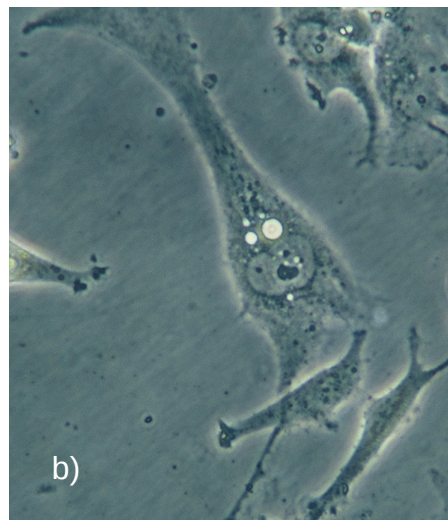
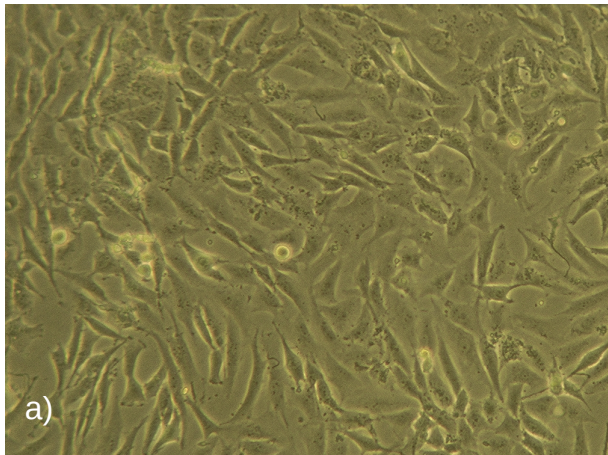


Abb. 6: HS-683 Gliomzellen 5 Tage nach Passage, Nativaufnahmen
a) 300-fache Vergrößerung, b) 125.000-fache Vergrößerung

4.1.3 Lymphomzellen

Die humanen su-DHL-4 Burkitt-Lymphomzellen wurden als Suspensionszellen in RPMI-Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Aufgrund des raschen Wachstums war alle 2-4 Tage eine Passage notwendig. Die Zellsuspension wurde dazu aus der Kulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, bei 1000 rpm, 20°C, 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die in frischem Medium resuspendierten Zellen wurden dann auf vorbereitete Kulturflaschen mit je 25 ml Medium verteilt.

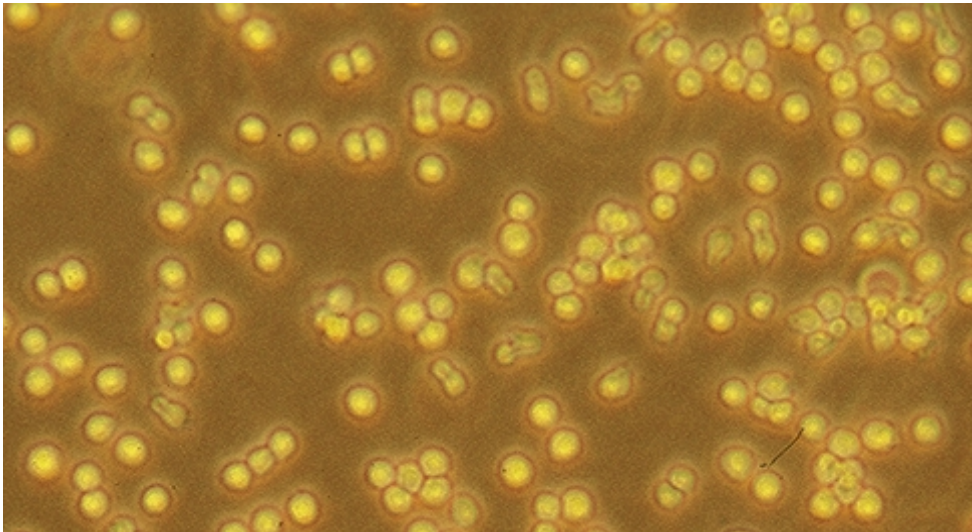


Abb. 7: DHL-4 Lymphomzellen, Nativaufnahme in 400-facher Vergrößerung

4.1.4 Einfrieren der Zellen

Es wurden nur Zellen aus Kulturen in optimalem Zustand eingefroren. Ein Vitalitätstest mit Trypanblau musste mindestens 70% vitale Zellen ergeben, da sich die Erholung der Zellen nach dem Auftauen proportional zur Vitalität vor dem Einfrieren verhält. Bei den Gliomzellen wurde ein Zeitpunkt gewählt, zu dem die Zellen gerade den Kulturflaschenboden bedeckten, sich aber noch keine Nekrosen in der Mitte der Zellnester zeigten. Bei den Lymphomzellen wurde ein Zeitpunkt 2-3 Tage nach der letzten Passage gewählt. Die Zellen wurden wie zur Passage aus den Kulturflaschen entnommen, das Kulturmedium bei 1000 rpm, 5 min, 20°C abzentrifugiert, die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die endgültige Konzentration im Einfriermedium sollte $5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml betragen, sodass entsprechend die benötigte Menge Einfriermedium berechnet wurde. Das Kulturmedium wurde bei 1000 rpm, 5 min, 20°C abzentrifugiert, die Zellen in der berechneten Menge DMSO Freeze Medium resuspendiert und auf sterile Kryoröhrchen verteilt. Nach 5-10 Minuten Inkubation im DMSO-Medium wurden die Zellen für 24 h bei -20°C, dann für weitere 24 h bei -70°C vorgekühlt bevor sie zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff gebracht wurden.

4.1.5 Auftauen der Zellen

20 ml des entsprechenden Kulturmediums wurden auf 37°C vorgewärmt in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Das Kryoröhrchen mit der gefrorenen Zellsuspension wurde aus dem Flüssigstickstoff genommen und unter 37°C warmem fließendem Wasser erwärmt. Sobald die Zellsuspension nach 40-60 Sekunden geschmolzen war, wurde sie unter sterilen Bedingungen in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit dem vorgelegten Kulturmedium vermischt. Um das Einfriermedium zu

entfernen, wurde bei 1000 rpm, 20°C, 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und auf vier vorbereitete Kulturflaschen mit jeweils 25ml Kulturmedium verteilt. Nach 24 Stunden im Brutschrank wurde die neue Kultur unter dem Mikroskop auf Wachstum und Kontamination durch Bakterien oder Pilze kontrolliert. Zu diesem Zeitpunkt mussten vitale Gliomzellen bereits am Boden der Kulturflasche angewachsen sein und erste Zellfortsätze zeigen. Die Lymphomzellen sollten sich als einheitliche kreisrunde Zellen frei in Suspension befinden und zeigten häufig bereits eine Vermehrung im Vergleich zum Vortag. Zur Kontrolle der Vitalität wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Nach drei Tagen fand der erste Mediumwechsel statt (siehe oben). Die Lymphomzellen zeigten in der Regel bereits wenige Tage nach dem Auftauen gutes Wachstum. Die Gliomzellen erholten sich dagegen wesentlich langsamer. Zum Teil war erst 1-3 Wochen nach dem Auftauen die erste Passage möglich, sodass bis dahin lediglich zweimal pro Woche ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Als Wachstumsstimulans für HS-683 Gliomzellen wurden 3,9 mg/L Mercaptoethanol zugegeben. Sowohl Lymphom- als auch Gliomzellen wurden ab der dritten Passage nach dem Auftauen für Versuche verwendet.

4.1.6 Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau

Zur Vitalitätsbestimmung wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl Trypanblau-Lösung in einem Reaktionsgefäß vermischt und 5 Minuten inkubiert. Intakte Zellmembranen sind undurchlässig für Trypanblau, vitale Zellen erscheinen somit ungefärbt. Zellen mit defekten Membranen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen kräftig blau. Die Auszählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer bei 100-facher Vergrößerung. Bestimmt wurde das Verhältnis angefärbter Zellen zur Gesamtzellzahl in vier großen Quadraten der Zählkammer. Voraussetzung für die Durchführung eines Versuches waren mindestens 70% vitale Zellen.

4.1.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte im Casy-Zellzählgerät. Die Bestimmung erfolgte je nach Zellzahl bei einer Verdünnung von 1:200 oder 1:1000 (10 bzw. 50µl Zellsuspension auf 10 ml Casy-ton-Lösung) als Mittelung zweier Zählungen derselben Probe. Zur Bestimmung der Zellzahl einer Suspension wurden insgesamt drei Proben ausgezählt und der Mittelwert bestimmt.

4.2 Standard-Versuchsablauf

Vor der Beschreibung der eigentlichen Versuche zu bestimmten Fragestellungen wird hier zunächst der allgemeine Versuchsablauf unter Standardbedingungen detailliert dargestellt.

Versuchsprinzip

Die in Versuchspuffer suspendierten Zellen wurden zu je 100 µl (ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen) in Eppendorf-Cups pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurden je 100 µl radioaktive Aminosäurelösung zugegeben. Dies entsprach einer Aktivität von 3,7 kBq (0,1 µCi) bei MET oder 370 kBq (10 µCi) bei FET. Außer der entsprechenden radioaktiv markierten Aminosäure enthielt die Aminosäurelösung definierte Konzentrationen an nicht radioaktiv markiertem Methionin (Met) bzw. Fluorethyl-L-Tyrosin (FET*). Die Proben wurden erneut für 15 Minuten bei 37°C inkubiert („Aufnahmezeit“). Die Aufnahme wurde dann durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS gestoppt und von den Zellen nicht aufgenommenes MET bzw. FET in drei Waschschritten mit jeweils 1 ml eiskaltem PBS wieder ausgewaschen. Bis nach dem dritten Waschschriff wurden die Proben kontinuierlich bei 0-5°C gekühlt, um eine weitgehende Inaktivierung aller Transportmechanismen zu erreichen. Die nach dem Waschen noch in den Proben verbliebene Aktivität wurde als von den Zellen aufgenommene Aktivität betrachtet und im Gamma- bzw. Betacounter gemessen. Um die Aufnahme in verschiedene Zellen vergleichen zu können, wurde anschließend der Proteingehalt der Proben bestimmt.

Vorbereitung der Zellsuspension

Die zelluläre Aufnahme einer bestimmten Aminosäure ist unter anderem abhängig von der Aminosäurekonzentration im Medium. Um die Aufnahme von MET und FET unbeeinflusst von anderen Aminosäuren zu untersuchen, wurde ein aminosäurefreier Versuchspuffer mit pH 7,4 gewählt. Die Gliomzellen wurden wie oben beschrieben mit EDTA abgelöst und in Versuchspuffer einmal gewaschen. Das Kulturmedium der Suspensionszellen wurde abzentrifugiert und die Zellen ebenfalls einmal in Versuchspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm, 20°C, 5 Minuten zentrifugiert, in 10 ml Versuchspuffer resuspendiert und die Zellzahl im Zellzählgerät bestimmt. Durch weitere Zugabe von Versuchspuffer wurde die Zellkonzentration zwischen $1 \cdot 10^6$ und $5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt und als Mittelwert dreier Messungen genau bestimmt. Je 100 µl Zellsuspension wurden in die vorbereiteten Reaktionsgefäße (Eppendorfcups) pipettiert, je nach Versuch weitere

Reagenzien zugegeben und die Proben für 1 Stunde bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Vorbereitung der radioaktiven Aminosäurelösung

Während der Inkubation der Proben in Versuchspuffer wurde aus Versuchspuffer, unmarkiertem Methionin (Met) bzw. Fluorethyl-L-Tyrosin (FET*) und radioaktiv markiertem MET bzw. FET die radioaktive Aminosäurelösung hergestellt. Der Anteil der radioaktiv markierten Aminosäuren an der gesamten Aminosäure-Stoffmenge der Lösung war dabei vernachlässigbar klein, sodass die Aminosäurekonzentration der Lösung allein durch kaltes Met bzw. FET* eingestellt wurde und unabhängig von der Radioaktivität beliebig variiert werden konnte. Die Standard-Aminosäurekonzentration orientierte sich an den physiologischen Plasmakonzentrationen von Methionin (4,4 mg/L) und Tyrosin (12 mg/L). Unter Berücksichtigung der 2:1-Verdünnung im Versuchsansatz wurden die Aminosäurelösungen mit 8,8 mg/L Met bzw. 24 mg/L FET* vorbereitet. Die Methionin-Lösung wurde dann durch Zugabe von MET auf eine Aktivität von 37 kBq/ml (1 µCi/ml), die FET-Lösung durch Zugabe von FET auf eine Aktivität von 3700 kBq/ml (100 µCi/ml) eingestellt.

Aufnahmezeit

Als Aufnahmezeit wurde die Zeit zwischen Zugabe der radioaktiven Aminosäurelösung und dem Abstoppen der Aufnahme durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS bezeichnet. Um eine Temperatur von 37°C während der Aufnahme zu erhalten, wurden sowohl die Proben als auch die Aminosäurelösung auf 37°C vorgewärmt und bei Aufnahmezeiten von zehn Minuten und länger die Proben während der Aufnahme im Brutschrank inkubiert. Wie die Kinetik-Versuche zeigen, nahm die Aufnahmegeschwindigkeit ausgehend von einem Maximum unmittelbar nach Zugabe der Aktivität in den ersten Minuten rasch ab. Innerhalb der ersten Minuten wirkten sich Schwankungen der Aufnahmezeit deshalb am deutlichsten aus. Als Standard wurde daher eine relativ lange Aufnahmezeit von 15 Minuten gewählt.

Abstoppen und Waschen

Nach dem Abstoppen mit 1 ml eiskaltem PBS wurden die Proben bei 5000 rpm, 0°C, 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden erneut in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und bei 5000 rpm, 0°C, 5 Minuten zentrifugiert. Insgesamt wurde dreimal auf diese Weise gewaschen. Nach dem dritten Waschen wurde der Überstand komplett abpipettiert.

Aktivitätsmessung

Versuche mit FET: Nach dem dritten Waschschrift wurden die Reaktionsgefäße samt Inhalt in 20 ml Szintillationsröhrchen gestellt und die Aktivität im Gammacounter gemessen.

Versuche mit MET: Nach dem dritten Waschschrift wurden 0,5 ml zweiprozentige SDS-Lösung zur Lyse der Zellen zugegeben und bis zum folgenden Tag bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde die SDS-Lösung mit den lysierten Zellen in Szintillationsröhrchen pipettiert. Zum Ausspülen der Eppendorf-Cups wurden jeweils 0,5 ml PBS verwendet, die ebenfalls in das jeweilige Szintillationsröhrchen pipettiert wurden. Es wurden 2 ml Szintillationscocktail zugegeben und durch mehrmaliges Kippen gleichmäßig mit der Probe vermischt. Anschließend wurde die Aktivität im Betacounter gemessen.

Standards

Bei jedem Versuch wurden Standards der verwendeten radioaktiven Aminosäurelösung mitgeführt. Dazu wurden bestimmte Mengen der verwendeten radioaktiven Aminosäurelösung direkt in Szintillationsröhrchen pipettiert (bei MET mit 2 ml Szintillationscocktail), ihre Radioaktivität im Gamma- bzw. Betacounter gemessen und Standardgeraden erstellt. Als Standards wurden 0%, 0,1%, 1%, 10%, 50% und 100% der im jeweiligen Versuch den Proben zugegebenen radioaktiven Aminosäurelösung verwendet.

Proteinbestimmung

Um die Größenunterschiede der verschiedenen Zelllinien zu berücksichtigen, wurde die Aufnahme auf die Zellproteinmasse in mg bezogen. Dazu wurde bei jedem Versuch der Proteingehalt an 5 Proben jeder Zelllinie nach der Bradford-Methode bestimmt und der Mittelwert berechnet. Zur Proteinbestimmung wurden 100 µl der jeweiligen Zellsuspension verwendet und durch den gesamten Versuch mit den übrigen Proben mitgeführt. Statt der radioaktiven Aminosäurelösung wurden 100 µl Versuchspuffer zugegeben. Nach dem dritten Waschschrift wurde wie bei den übrigen Proben der Überstand komplett abpipetiert, die Zellpellets in 200 µl NaOH (1N) resuspendiert und eine Stunde lang lysiert. 20 µl des Zelllysates wurden mit 700 µl PBS und 80 µl PBS/H₂O-Gemisch (1:1) gleichmäßig vermischt und 200 µl Farbstoff-Reagenz zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge (λ) von 595 nm gemessen und anhand von Proteinstandards der Proteingehalt der Proben bestimmt.

Tab. 3: Pipettierschema zur Proteinbestimmung

	Referenz	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Probe
Proteingehalt (mg)	0	0,002	0,004	0,007	0,01	0,02	
PBS	700 µl	700 µl	700 µl	700 µl	700 µl	700 µl	700 µl
BSA-Standard* + PBS (1:10)	-	10 µl	20 µl	35 µl	50 µl	100 µl	-
PBS + H ₂ O (1:10)	100 µl	90 µl	80 µl	65 µl	50 µl	0 µl	80 µl
Farbstoff-Reagenz	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Probe zur Proteinbestimmung	-	-	-	-	-	-	20 µl
Gesamt	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

* BSA-Standard: 2mg/ml Proteingehalt

Wellenlänge: $\lambda=595\text{nm}$

Messdauer: 10sec

Inkubationszeit: 5min

Auswertung

Die Radioaktivitätsmessung im γ - bzw. β -Counter liefert Messwerte in der Einheit „Counts Per Minute (CPM)“, also detektierte Strahlungsereignisse pro Minute. Diese Einheit entspricht weder der Aktivität der Proben in Bq, noch existiert ein konstanter Umrechnungsfaktor. Lediglich innerhalb derselben Messung besteht ein direkt proportionaler Bezug zwischen CPM und Radioaktivität der Proben. Das Gerät berücksichtigt dabei rechnerisch bereits den Zerfall während der Messzeit der Proben und bezieht alle Ergebnisse auf den Zeitpunkt des Messbeginns der ersten Probe. Anhand der mitgeführten Standards mit bekannter Radioaktivität wurde für jeden Versuch eine Standardgerade erstellt. Über die Standardgerade wurde der prozentuale Anteil der aufgenommenen Radioaktivität ermittelt und die Messwerte von CPM in % aufgenommene Radioaktivität umgerechnet.

Der Anteil der aufgenommenen Radioaktivität entspricht dem Anteil der aufgenommenen Tracermenge. Da sich radioaktiv markierte und nicht-markierte Aminosäuren bei der Aufnahme in die Zelle nicht unterscheiden, gilt derselbe Anteil auch für die gesamte Methionin- bzw. Fluorethyl-L-Tyrosinmenge in der Probe. Diese wurde allein durch die jeweilige nicht-markierte Aminosäure bestimmt, da der mengenmäßige Anteil der markierten Aminosäuren vernachlässigbar klein war. Über die bekannte Aminosäurekonzentration in den Proben konnte somit die aufgenommene Methionin- bzw. Fluorethyl-L-Tyrosinmenge in μg oder nmol berechnet werden. Über die bekannte Zellzahl pro Probe wurde die Aufnahme pro 100.000 Zellen berechnet, alternativ wurde der Proteingehalt der Probe bestimmt und die Aufnahme pro mg Zellprotein ausgedrückt.

4.3 Durchführung der Versuche

4.3.1 Vergleich der Aufnahme von MET und FET in verschiedene Zellen

Die Aufnahme von MET und FET wurde an HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und humanen Granulozyten untersucht und verglichen.

4.3.1.1 Aufnahme von MET in verschiedene Zellen

Der Versuchsablauf entsprach dem oben beschriebenen Standard-Versuchsablauf. Für jede Zelllinie wurden 5 Proben mit je ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μ l Versuchspuffer vorbereitet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In jede Probe wurden anschließend 100 μ l Methioninlösung pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 4,4 mg/L Methionin bei einer Radioaktivität von 3,7 kBq resultierte. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Aufnahme durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS gestoppt. Es folgten wie im Standardversuch beschrieben drei Waschschriffe unter kontinuierlicher Kühlung der Proben. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde der Überstand vollständig abpipettiert, die Zellen in zweiprozentiger SDS-Lösung lysiert und nach Zugabe von 2 ml Szintillationscocktail die aufgenommene Aktivität im Betacounter gemessen. An mitgeführten Proben zur Proteinbestimmung wurde der Proteingehalt bestimmt.

4.3.1.2 Aufnahme von FET in verschiedene Zellen

Die FET-Aufnahme wurde analog zum Methioninversuch untersucht. Je Probe wurden 100 μ l FET-Lösung zugegeben, was einer Endkonzentration von 12 mg/L bei 370 kBq entsprach. Nach einer Aufnahmezeit von 15 Minuten bei 37°C wurde die FET-Aufnahme durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS gestoppt und die Proben unter kontinuierlicher Kühlung dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurde der Überstand abpipettiert, die Reaktionsgefäße mit Inhalt in Szintillationsröhrchen für den γ -Counter gestellt und die aufgenommene Radioaktivität gemessen. Am folgenden Tag (nach ca. 10 HWZ) konnte nach Zerfall der Aktivität der Proteingehalt an den Proben selbst bestimmt werden.

Anhand mitgeführter Standards mit bekannten Mengen der verwendeten MET- bzw. FET-Lösung wurde festgestellt, welcher Prozentsatz der ursprünglich zugegebenen Radioaktivität von den Zellen aufgenommen worden war. Über die bekannten Met- und FET*-Konzentrationen der Lösungen wurde daraus die absolute Met- und FET*-Aufnahme in nmol berechnet. Die Aufnahme wurde auf $1 \cdot 10^5$ Zellen und auf mg Zellprotein bezogen. Die Mittelwerte aus den Messwerten der jeweils fünf Aliquots

ergaben das Ergebnis für einen Versuch. Insgesamt wurde jeder Versuch fünfmal durchgeführt. Die Mittelwerte daraus ergaben das Endergebnis für jede Zelllinie.

4.3.2 Aufnahme von MET und FET in stimulierte Granulozyten

Im Verlauf einer Entzündungsreaktion werden Granulozyten durch Zytokine und bakterielle Bestandteile aktiviert. Da die Aktivierung Transporteigenschaften verändern kann, wurde die Auswirkung einer Stimulation der Granulozyten auf die Aufnahme von MET und FET untersucht.

Granulozyten eines Buffy Coats wurden isoliert und in zwei Kulturflaschen mit RPMI-Medium gebracht. Einer Kulturflasche wurde mindestens acht Stunden vor dem Versuch lyophilisiertes LPS von *E. coli* in einer Endkonzentration von 100 ng/ml zugesetzt und bei 37°C inkubiert. Das Kulturmedium wurde dann bei 1000 rpm, 5min abzentrifugiert, die Zellen einmal gewaschen und in Versuchspuffer resuspendiert. Je Probe wurden 100 µl Granulozytensuspension mit etwa $1 \cdot 10^5$ Granulozyten vorbereitet und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Für stimulierte und nicht-stimulierte Granulozyten wurden jeweils fünf Aliquots untersucht, außerdem jeweils 5 Proben zur Proteinbestimmung mitgeführt.

Wie im Standard-Versuchsablauf beschrieben wurde Methioninlösung mit 37 kBq/ml MET und 8,8 mg/L kaltem Met bzw. FET-Lösung mit 3700 kBq FET und 24 mg/L kaltem FET* vorbereitet und auf 37°C erwärmt. Den Proben wurden 100 µl der jeweiligen Lösung zugegeben, was einer Methioninkonzentration von 4,4 mg/L bei 3,7 kBq bzw. einer FET*-Konzentration von 12 mg/L bei 370 kBq entsprach. Nach einer Aufnahmezeit von 15 Minuten bei 37°C wurde die Aufnahme durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Standard-Versuchsablauf.

4.3.3 Aufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten

Der pH-Wert hat entscheidenden Einfluss auf viele Stoffwechselschritte. Auch für verschiedene Aminosäuretransportsysteme ist eine pH-Abhängigkeit der Aktivität bekannt. Für die Anreicherung von PET-Tracern im Gewebe stellt der pH-Wert somit einen wichtigen Parameter dar. Ziel war es daher, die pH-Abhängigkeit der MET- bzw. FET-Aufnahme zu untersuchen.

Versuchspuffer wurde in sechs Portionen von ca. 25 ml aufgeteilt und durch Zugabe von NaOH bzw. Salzsäure auf pH-Werte von 6,8 / 7,0 / 7,2 / 7,4 / 7,6 und 7,8

eingestellt. Der Rest des Versuchspuffers wurde auf pH 7,0 eingestellt. Wie beschrieben wurde das Kulturmedium der Suspensionszellen abzentrifugiert und die abgelösten Monolayer-Zellen in Versuchspuffer von pH 7,0 suspendiert und dieser ebenfalls abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in mindestens 50 ml Versuchspuffer (pH 7,0) gleichmäßig resuspendiert und die Zellzahl auf ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die Suspension wurde zu je 8 ml auf 6 Zentrifugenröhrchen verteilt, 5 min bei 1000 rpm, 20°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in je 5 ml Pufferlösung mit pH-Werten von 6,8 bis 7,8 resuspendiert. Anschließend wurde jeweils die genaue Zellzahl bestimmt. Je 100 µl eines pH-Wertes wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die radioaktive Aminosäurelösung unter Verwendung von Versuchspuffer mit pH 7,0 hergestellt. Die Aktivität der MET-Lösung betrug 37 kBq/ml (1 µCi/ml), die der FET-Lösung 3700 kBq/ml (100 µCi/ml). Da nur ein relativer Vergleich der verschiedenen Zellen angestrebt wurde, wurde bei den pH-Versuchen auf einen Zusatz kalter Aminosäuren verzichtet. Je Probe wurden 100 µl der radioaktiven MET- bzw. FET Lösung (3,7 bzw. 370 kBq) zugegeben und nach einer Aufnahmezeit von 15 min bei 37°C abgestoppt. Der weitere Ablauf entsprach dem Standard-Versuch. Die Proteinbestimmung wurde im FET-Versuch am folgenden Tag an den Proben selbst, bei MET an mitgeführten Proben zur Proteinbestimmung durchgeführt. Für jeden pH-Wert wurden fünf Aliquots untersucht.

4.3.4 Hemmstoff-Versuche

Aminosäuren werden über spezifische Transportsysteme zellulär aufgenommen. Als wichtigste Aminosäuretransporter für neutrale Aminosäuren gelten das A-, das L- und das ASC-System. Ziel war es, den Anteil dieser Transportsysteme an der Aufnahme von MET und FET in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten festzustellen. BCH (2-Amino-2-Norbornan-Carboxylsäure) ist eine synthetische Aminosäure mit hoher Affinität zum L-System, die als kompetitiver Hemmstoff für das L-Transportsystem eingesetzt wurde. MeAIB (α -(Methylamino)-Isobuttersäure) ist ebenfalls eine synthetische Aminosäure, die von der Zelle aufgenommen aber nicht weiter metabolisiert wird und gilt als spezifischer kompetitiver Hemmstoff für das A-System. Die natürliche Aminosäure L-Serin wird vorwiegend über das ASC-System transportiert und wurde als kompetitiver Hemmstoff für dieses System eingesetzt. In der Literatur werden zur Untersuchung des ASC-Systems teilweise auch MeAIB und Serin kombiniert und davon der A-System-Anteil (MeAIB allein) subtrahiert. Da dieses Verfahren in Vorversuchen keinen Unterschied gegenüber L-Serin allein brachte, wurde auf die Kombination mit MeAIB verzichtet. Der durch den jeweiligen Hemmstoff

hemmbare Anteil der Tracer-Aufnahme wurde als Anteil des entsprechenden Transporters am Gesamttransport gewertet. Der durch die genannten Hemmstoffe nicht hemmbare Anteil der Aufnahme wurde als „unspezifische Aufnahme“ bezeichnet. Sie wurde ermittelt, indem die Aufnahme in Anwesenheit aller drei Hemmstoffe bestimmt wurde.

Hemmstofflösungen mit 180 mmol/L BCH, MeAIB oder L-Serin sowie mit je 180 mmol/L aller drei Hemmstoffe in Versuchspuffer wurden vorbereitet. Die Zellsuspensionen wurden wie im Standard-Versuchsablauf beschrieben vorbereitet und je 100 µl (ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen) in Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurden 100 µl der jeweiligen Hemmstofflösung zugegeben. Durch die Verdünnung ergab sich somit eine Hemmstoffkonzentration von 90 mmol/L während der Inkubationszeit und von 60 mmol/L während der Aufnahmezeit. Zur Messung der ungehemmten Aufnahme wurden 100 µl Versuchspuffer ohne Hemmstoffe zugegeben. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für jede Hemmstofflösung und die ungehemmte Aufnahme wurden je 4 Aliquots untersucht, der Versuch wurde für jede Zelllinie dreimal durchgeführt. Die verwendete Hemmstoffkonzentration wurde in Vorversuchen als Konzentration mit maximaler Hemmwirkung ermittelt. Durch eine weitere Erhöhung der Hemmstoffkonzentrationen ließen sich keine besseren Hemmwirkungen erzielen. Während der Inkubationszeit wurde radioaktive Aminosäurelösung mit 37 kBq/ml MET bzw. 3700 kBq FET vorbereitet. Je Probe wurden 100 µl zugegeben, entsprechend einer Aktivität von 3,7 kBq MET bzw. 370 kBq FET. Nach einer Aufnahmezeit von 15 min wurde die Aufnahme mit eiskaltem PBS gestoppt. Die weiteren Schritte Waschen, Aktivitätsmessung und Proteinbestimmung entsprachen dem Standard-Versuchsablauf.

4.3.5 Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen

Die Abhängigkeit eines Transportvorgangs von der Substratkonzentration lässt Rückschlüsse auf die Art der beteiligten Transportmechanismen zu. Während unspezifische Mechanismen wie Diffusion eine lineare Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufweisen, zeigt die Aufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei spezifischen Transportern typischerweise den Verlauf einer Sättigungskurve. Um die Konzentrationsabhängigkeit und Sättigbarkeit des Transportes von MET und FET in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten zu untersuchen, wurde die Aufnahme in Anwesenheit unterschiedlich hoher Konzentrationen von unmarkiertem Met bzw. FET* bestimmt. Der nicht sättigbare Anteil der Aufnahme wurde bei sehr hohen Met- bzw. FET*-Konzentrationen

von 176 bzw. 180 mg/L ermittelt und zur Berechnung der sättigbaren Aufnahme von der Gesamtaufnahme abgezogen.

4.3.5.1 Einfluss der Met-Konzentration auf die Aufnahme von MET

Um die Abhängigkeit der MET-Aufnahme von der Methioninkonzentration zu untersuchen wurden folgende Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem Methionin in Versuchspuffer hergestellt; Angabe in mg/L (mmol/L): 0,022 (0,000148) / 0,22 (0,00148) / 2,2 (0,0148) / 4,4 (0,0295) / 8,8 (0,0599) / 17,6 (0,118) / 35,2 (0,236) / 70,4 (0,472) / 352 (2,362). Zu allen Lösungen wurde MET zugegeben, sodass die Aktivität bei allen Konzentrationen 37 kBq/ml (1 µCi/ml) betrug. In Relation zur gesamt-Methioninkonzentration der Lösung ist dabei die Stoffmenge von MET vernachlässigbar klein, sodass die Methionin-Konzentration der Lösung allein durch die Konzentration kalten Methionins bestimmt wird.

4.3.5.2 Einfluss der FET*-Konzentration auf die Aufnahme von FET

Um die Abhängigkeit der FET-Aufnahme von der FET*-Konzentration zu untersuchen, wurden folgende Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem FET* hergestellt; Angabe in mg/L (mmol/L): 0,02 (0,00011) / 0,2 (0,0011) / 2 (0,011) / 6 (0,033) / 12 (0,066) / 24 (0,13) / 36 (0,2) / 48 (0,27) / 90 (0,5) / 180 (1,0) / 360 (2,0). Durch Zugabe von FET wurde die Aktivität bei allen Konzentrationen auf 3700 kBq/ml eingestellt. Für die Fluorethyl-L-Tyrosin-Konzentration der Lösung war wiederum allein die Konzentration von kaltem FET* relevant.

Versuchsablauf:

Die Proben mit 100 µl Zellsuspension (ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen) wurden wie im Standard-Versuchsablauf beschrieben vorbereitet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden 100 µl der jeweiligen Aminosäurelösung zugegeben. Die End-Konzentration der jeweiligen Aminosäure entsprach durch die 1:1-Verdünnung der Hälfte der oben angegebenen Konzentrationen. Die Aufnahmezeit bis zum Abstoppen betrug 15 Minuten. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Standard-Versuchsablauf. 100 µl jeder Konzentrationsstufe wurden als Standards im Beta- bzw. Gammacounter gemessen. Die Proteinbestimmung wurde beim MET-Versuch an eigens mitgeführten Proben zur Proteinbestimmung durchgeführt, beim FET-Versuch am folgenden Tag an den Proben selbst. Je Konzentration und Zelllinie wurden vier Aliquots untersucht.

4.3.6 Abhängigkeit der Aufnahme von der Inkubationszeit

Die Aufnahme von MET und FET in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten wurde nach unterschiedlichen Aufnahmezeiten gestoppt, um so die Traceraufnahme in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen. Die Aufnahmezeiten betrugen 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 und 90 Minuten. Die vorbereiteten Proben mit 100 µl Zellsuspension in Versuchspuffer (ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen) wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde MET-Lösung mit einer Aktivität von 37 kBq/ml und die FET-Lösung mit einer Aktivität von 3700 kBq/ml aus der jeweiligen radioaktiv markierten Aminosäure und Versuchspuffer hergestellt und bei 37°C vorgewärmt. Je Probe wurden 100 µl radioaktive Aminosäurelösung zugegeben und zugleich die Zeitmessung begonnen. Nach der jeweiligen Aufnahmezeit wurde die Aufnahme durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS abgestoppt und die Proben sofort in Eis gekühlt. Anschließend folgten wie im Standard-Versuch beschrieben drei Waschschrte mit eiskaltem PBS. Alle weiteren Schritte zur Messung der Aktivität und Proteinbestimmung erfolgten wie im Standard-Versuchsablauf. Für die Aufnahmezeit 0 Minuten wurden die Proben bereits bei Zugabe der radioaktiven Aminosäure auf Eis gekühlt und die radioaktive Aminosäurelösung vor Zugabe ebenfalls auf Eis gekühlt. Die Aufnahmegeschwindigkeit wurde aus der Differenz der Aufnahme zwischen aufeinander folgenden Zeitpunkten, geteilt durch die Zeitdifferenz in Minuten, berechnet. Für jede Aufnahmezeit wurden fünf Aliquots untersucht.

4.3.7 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Transportgeschwindigkeit eines spezifischen Transporters wird von $V_{\max}$ und K_m bestimmt. Die Transportgeschwindigkeit v geht mit steigender Substratkonzentration asymptotisch gegen $V_{\max}$, dem Maß für die Kapazität des Transportsystems. Die Michaelis-Konstante K_m gibt die Substratkonzentration an, bei der $v = \frac{1}{2} V_{\max}$ ist. Sie ist ein Maß für die Affinität des Transporters zum Substrat. Die Affinität beschreibt die Passgenauigkeit des Transporters für ein bestimmtes Substrat, also die Qualität mit der der Transporter sein Substrat binden kann. Die Kapazität beschreibt die maximale Transportrate des Transportsystems und ist abhängig von der Anzahl aktiver Transporter. Um $V_{\max}$ und K_m für den Transport von MET und FET in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten zu ermitteln, wurden Michaelis-Menten-Kinetiken erstellt. Dazu wurde die Aufnahmegeschwindigkeit bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen ermittelt.

Die Zellsuspensionen wurden wie im Standardversuchsablauf beschrieben vorbereitet, je 100 µl (ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen) in die Reaktionsgefäße pipetiert und für 1 Stunde bei 37°C

inkubiert. Aus unmarkiertem Met bzw. FET* und Versuchspuffer wurden Verdünnungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (Tabelle 4) hergestellt und durch Zugabe von MET bzw. FET auf Aktivitäten von 37 kBq/ml bzw. 3700 kBq/ml eingestellt.

Tab. 4: Für Michaelis-Menten-Kinetik verwendete Met- und FET*-Konzentrationen

Met		FET*	
mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
352	2,362	360	1,98
70,4	0,472	180	0,994
35,2	0,236	90	0,497
17,6	0,118	48	0,265
8,8	0,0599	24	0,132
4,4 *	0,0295	12 **	0,0662
2,2	0,0148	6	0,0331
0,22	0,00148	2	0,011
0,022	0,000148	0,2	0,0011
		0,02	0,00011

* physiologische Met-Konzentration

**physiologische Tyrosin-Konzentration

Für die Aminosäurekonzentration der Lösungen war allein die Menge der unmarkierten Aminosäure relevant. Je Probe wurden 100µl vorgewärmte Aminosäurelösung je einer Konzentration zugegeben. Die Radioaktivität in den Proben betrug bei allen Konzentrationen 3,7 kBq MET bzw. 370 kBq FET. Während der Aufnahmezeit befanden sich die Proben in Raumtemperatur von ca. 25°C. Die Aufnahme wurde nach 1 bzw. 5 Minuten durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt und nach drei Waschschritten die zellulär aufgenommene Radioaktivität gemessen. Waschschrritte, Messung der aufgenommenen Aktivität und Proteinbestimmung erfolgten wie in den bereits beschriebenen Versuchen. Für jede Konzentrationsstufe wurden jeweils vier Aliquots mit 1 bzw. 5 Minuten Aufnahmezeit untersucht. Der Versuch wurde für jede Zelllinie dreimal durchgeführt. Für jede Konzentrationsstufe wurde die Radioaktivität definierter Mengen als Standards gemessen und eine Standard-Gerade erstellt. Aus dem aufgenommenen Anteil der zugegebenen Radioaktivität und der bekannten Met- bzw. FET*-Konzentration im Ansatz wurde die aufgenommene Met- bzw. FET*-Menge berechnet. Für jede Konzentration wurde die Differenz aus der Aufnahme nach 5 Minuten und nach 1 Minute gebildet und durch 4 dividiert, sodass die durchschnittliche Aufnahmegeschwindigkeit zwischen der 1. und 5. Minute nach Zugabe der Aminosäurelösung bestimmt wurde. Bei reziproker Darstellung in einem Diagramm nach Lineweaver-Burk mit der x-Achse $1/\text{Substratkonzentration}$ und der y-Achse $1/\text{Aufnahmegeschwindigkeit}$ kann $1/V_{\max}$ als Schnittpunkt des Graphen mit der y-Achse und $-1/K_m$ als Schnittpunkt des Graphen mit der x-Achse direkt abgelesen oder aus der Geradengleichung des Graphen berechnet werden.

5. ERGEBNISSE

5.1 Vergleich der Aufnahme von MET und FET in verschiedene Zellen

Die MET- und FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und humane Granulozyten wurde unter jeweils gleichen Bedingungen verglichen. Die Aufnahme wurde in Prozent der eingesetzten Aktivität bestimmt und zum Ausgleich unterschiedlicher Zellzahlen einheitlich auf 100.000 Zellen bezogen. Bei dieser Art der Darstellung ist die Zellgröße ein entscheidender Faktor, sodass zum Vergleich unterschiedlich großer Zellen der Bezug auf mg Zellprotein aussagekräftiger erschien. Dabei besteht andererseits das Problem, dass bei Zellen mit großem intrazellulärem Proteingehalt wie den Gliomzellen der verzerrte Eindruck einer geringeren Aufnahme entsteht. Zum Vergleich wird die Aufnahme deshalb im Folgenden sowohl bezogen auf 100.000 Zellen als auch auf mg Zellprotein dargestellt. Die absolut aufgenommene Aminosäuremenge wurde aus dem aufgenommenen Anteil der eingesetzten Radioaktivität und der bekannten Menge an kaltem Methionin (Met) bzw. Fluorethyl-L-Tyrosin (FET*) im Probenansatz berechnet und in $\mu\text{g}/100.000$ Zellen bzw. $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein ausgedrückt.

5.1.1 Aufnahme von MET in verschiedene Zellen

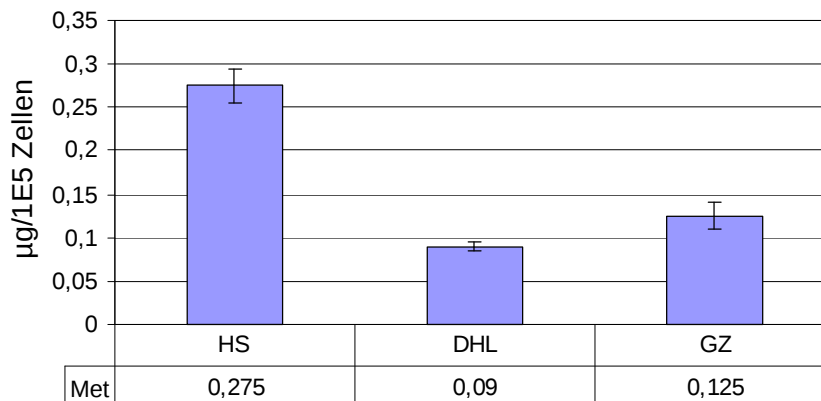
Die Proben wurden mit 3,7 kBq (0,1 μCi) MET bei einer Konzentration von 4,4 mg/L unmarkiertem Met 15 Minuten bei 37°C inkubiert. HS-683 Gliomzellen zeigten mit 0,275 μg die stärkste Methionin-Aufnahme pro 100.000 Zellen, gefolgt von Granulozyten mit 0,125 μg und DHL-4 Lymphomzellen mit 0,09 $\mu\text{g}/100.000$ Zellen. Granulozyten nahmen trotz ihrer geringeren Größe mehr Methionin pro Zelle auf als DHL-4 Lymphomzellen.

Bezogen auf die Zellproteinmasse nahmen Granulozyten mit 15,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein mit Abstand am meisten Methionin auf. DHL-4 Lymphomzellen nahmen mit 6,35 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein weniger als die Hälfte, HS-683 Gliomzellen mit 2,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein nur ein Fünftel davon auf. Tabelle 5 und Abbildung 8 zeigen die Methioninaufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in $\mu\text{g}/100.000$ Zellen und in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein.

Tab. 5: Methioninaufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in $\mu\text{g}/100.000$ Zellen und in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein

	$\mu\text{g}/1 \cdot 10^5$ Zellen	$\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein
HS-683 Gliomzellen	$0,275 \pm 0,020$	$2,8 \pm 0,3$
DHL-4 Lymphomzellen	$0,09 \pm 0,006$	$6,35 \pm 0,5$
Granulozyten	$0,125 \pm 0,015$	$15,1 \pm 4,0$

a)



b)

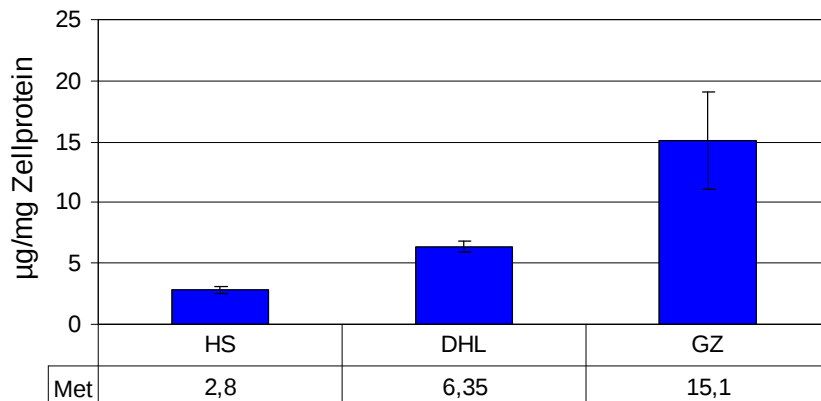


Abb. 8: Methionin-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten a) in $\mu\text{g}/100.000$ Zellen und b) in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein

Relativer Vergleich

Pro Zelle war die Met-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen um den Faktor 2,1 größer als die Aufnahme in Granulozyten. Diese nahmen wiederum 1,25 mal so viel Met auf wie DHL-4 Lymphomzellen. Bezogen auf die Zellproteinmasse war die Met-Aufnahme in Granulozyten 5,56 mal größer als die der Gliomzellen und 2,38 mal größer als die der Lymphomzellen.

5.1.2 Aufnahme von FET in verschiedene Zellen

Die Proben wurden analog zur Anordnung für Methionin 15 Minuten bei 37°C mit 370 kBq (10 µCi) FET und einer Konzentration von 12 mg/L FET* inkubiert. Die FET*-Aufnahme in Granulozyten betrug 0,001 µg/100.000 Zellen und war damit um ein Vielfaches geringer als die Aufnahme der Tumorzellen. HS-683 Gliomzellen nahmen mit 0,0653 µg/100.000 Zellen am meisten FET* pro Zelle auf, bei DHL-4 Lymphomzellen betrug die Aufnahme 0,049 µg/100.000 Zellen.

Bezogen auf die Zellproteinmasse war die Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen mit 3,18 µg/mg Zellprotein am größten, HS-683 Gliomzellen nahmen 0,66 µg/mg Zellprotein auf, Granulozyten lediglich 0,12 µg/mg Zellprotein. Tabelle 6 und Abb. 9 zeigen die FET*-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in µg/100.000 Zellen und in µg/mg Zellprotein.

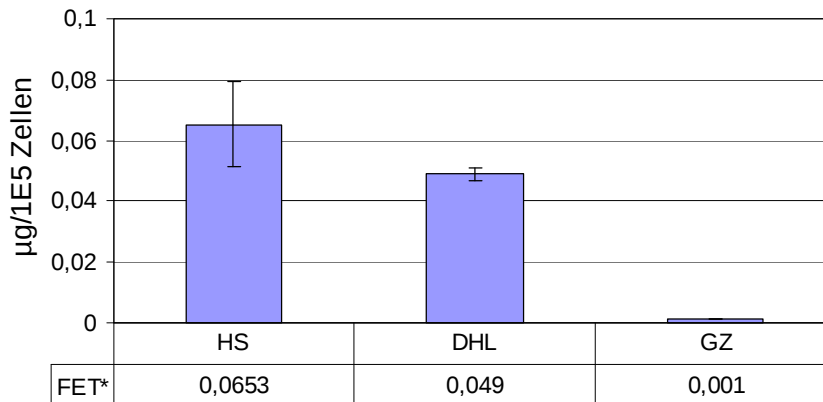
Relativer Vergleich

Pro Zelle war die FET*-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen 66,3 mal und die Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen 49,8 mal größer als die Aufnahme in Granulozyten. Bezogen auf die Zellproteinmasse war die Aufnahme in HS-683 Gliomzellen 5,5 mal und die Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen 26,5 mal größer als die Aufnahme in Granulozyten. Wie bei Methionin wirkt sich der große Proteingehalt der Gliomzellen in einer geringeren FET*-Aufnahme pro mg Zellprotein aus.

Tab. 6: FET*-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in µg/100.000 Zellen und in µg/mg Zellprotein

	µg/1*10 ⁵ Zellen	µg/mg Zellprotein
HS-683 Gliomzellen	0,0653 ± 0,014	0,666 ± 0,146
DHL-4 Lymphomzellen	0,049 ± 0,002	3,18 ± 0,155
Granulozyten	0,001 ± 0,0005	0,12 ± 0,006

a)



b)

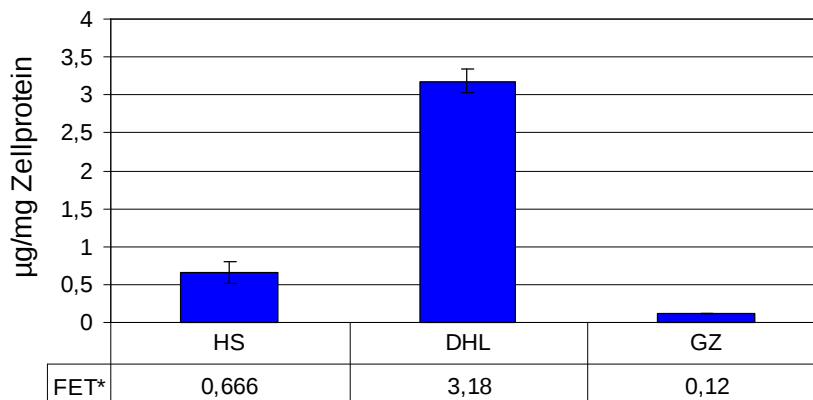


Abb. 9: FET*-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten a) in $\mu\text{g}/100.000$ Zellen und b) in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein

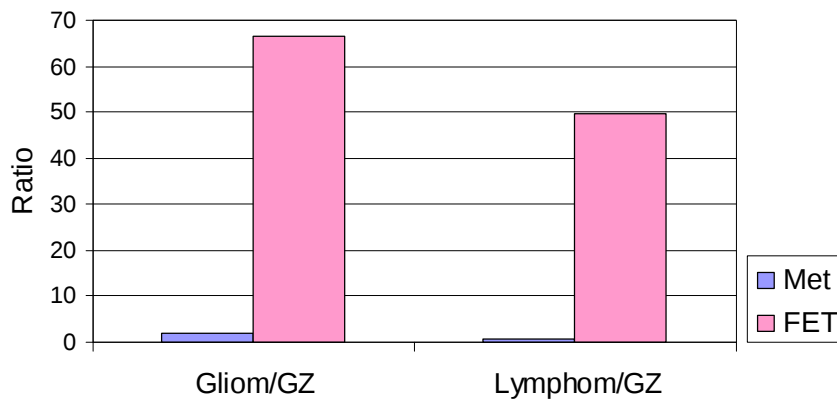
5.1.3 Vergleich der Quotienten aus der Aufnahme in Tumorzellen und Granulozyten für MET und FET

Als Maß für die Differenzierungsfähigkeit zwischen Tumor- und Entzündungszellen wurden für beide Tracer die Quotienten aus der Aufnahme in Gliom- und Lymphomzellen einerseits und Granulozyten andererseits gebildet. Tab. 7 und Abb. 10 zeigen das relative Verhältnis der Traceraufnahme in Gliom- und Lymphomzellen zur Aufnahme in Granulozyten zum einen bezogen auf die Aufnahme pro Zelle, zum anderen bezogen auf die Aufnahme pro mg Zellprotein. Aus den Grafiken geht hervor, dass sowohl hinsichtlich der Aufnahme pro Zelle, als auch hinsichtlich der Aufnahme pro mg Zellprotein lediglich FET, nicht aber MET eine deutliche Differenzierung beider Tumorzelllinien von den Granulozyten ermöglicht.

Tab. 7: Relatives Verhältnis der Traceraufnahme in Tumorzellen zur Aufnahme in Granulozyten jeweils bezogen auf die Aufnahme pro Zelle und bezogen auf die Aufnahme pro mg Zellprotein

	MET-Aufnahme		FET-Aufnahme	
	pro Zelle	pro mg Zellprotein	pro Zelle	pro mg Zellprotein
Verhältnis Gliomzellen/Granulozyten	2,1	0,18	66,34	5,55
Verhältnis Lymphomzellen/Granulozyten	0,8	0,42	49,76	26,52

a)



b)

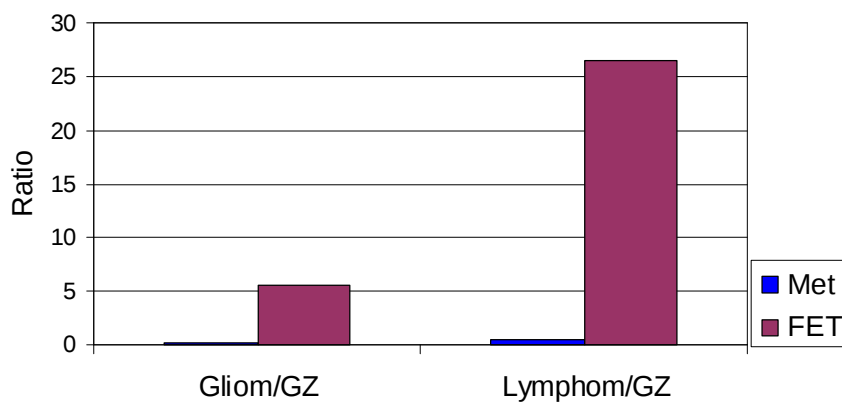


Abb. 10: Relatives Verhältnis der Traceraufnahme in Tumorzellen zur Aufnahme in Granulozyten a) bezogen auf die Aufnahme pro Zelle und b) bezogen auf die Aufnahme pro mg Zellprotein

5.2 Aufnahme von MET und FET in stimulierte Granulozyten

5.2.1 MET-Aufnahme in stimulierte Granulozyten

Die Aufnahme von Methionin vergrößerte sich durch eine Stimulation mit LPS 8 Stunden vor dem Versuch um den Faktor 1,85 gegenüber der unstimulierten Aufnahme. Die Met-Aufnahme in stimulierte Granulozyten betrug $27,9 \pm 3,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein, im Vergleich zur unstimulierten Aufnahme von $15,1 \pm 4,0 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein.

Abb. 11 zeigt die Methioninaufnahme in stimulierte und unstimulierte Granulozyten in μg pro mg Zellprotein.

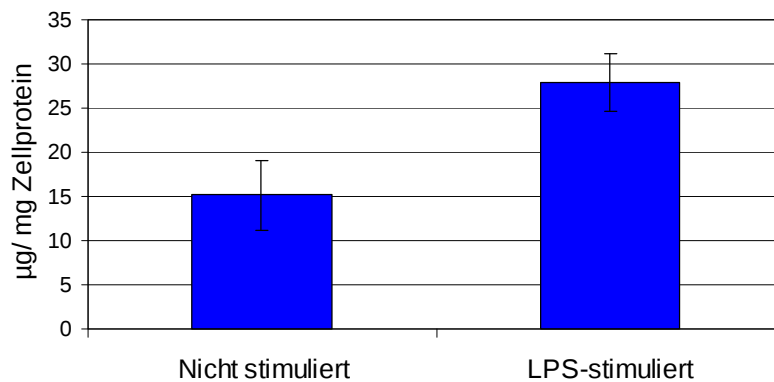


Abb. 11: Methioninaufnahme in LPS-stimulierte und unstimulierte Granulozyten in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein.

5.2.2 FET-Aufnahme in stimulierte Granulozyten

Die Stimulation mit LPS hatte keinen Einfluss auf die FET*-Aufnahme in Granulozyten. Die FET*-Aufnahme in stimulierte Granulozyten betrug $0,126 \pm 2,52 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein und war nahezu identisch mit der Aufnahme in unstimulierte Granulozyten von $0,12 \pm 0,006 \mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein. Abb. 12 zeigt die Aufnahme von FET* in stimulierte und unstimulierte Granulozyten in μg pro mg Zellprotein.

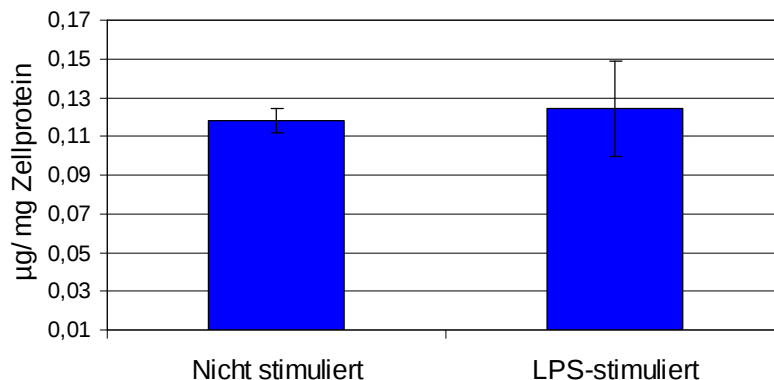


Abb. 12: FET*-Aufnahme in LPS-stimulierte und unstimulierte Granulozyten in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellprotein

5.3 Aufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten

5.3.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Aufnahme von MET

Die MET-Aufnahme in alle drei Zelllinien war abhängig vom pH-Wert. Das pH-Optimum lag für HS-683 Gliomzellen und Granulozyten bei pH 7,2 und für DHL-4 Lymphomzellen bei pH 7,4. Ansäuerung des Milieus auf pH 6,2 führte bei allen Zelllinien zu einer Reduktion der MET-Aufnahme um rund 40%. Die Erhöhung des pH

auf 7,6 führte zu einem Rückgang der MET-Aufnahme um rund 40% bei den Tumorzellen und um rund 60% bei den Granulozyten. Bei weiterer Alkalisierung auf pH 8,2 reduzierte sich die MET-Aufnahme der Tumorzellen um 50% und die der Granulozyten um 75%.

pH-Erhöhungen wirkten sich somit stärker negativ auf die MET-Aufnahme aus als eine Senkung des pH. Die Alkalisierung reduzierte die MET-Aufnahme der Granulozyten stärker als die der Tumorzellen, während Granulozyten leicht saure Werte von pH 6,8 besser tolerierten als die Tumorzellen. Tab. 8 zeigt die MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten bei unterschiedlichen pH-Werten in kBq/100.000 Zellen und in Prozent der maximalen Aufnahme. Abb. 13 zeigt die MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in Abhängigkeit vom pH-Wert in Prozent der maximalen Aufnahme.

Tab. 8: MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten bei pH-Werten zwischen 6,2 und 8,2 in kBq/100.000 Zellen und in Prozent der maximalen Aufnahme

pH-Wert	HS-683		DHL-4		Granulozyten	
	kBq/1*10 ⁵ Zellen	% d. max. Aufnahme	kBq/1*10 ⁵ Zellen	% d. max. Aufnahme	kBq/1*10 ⁵ Zellen	% d. max. Aufnahme
6,2	0,027	66%	0,068	60%	0,051	62%
6,8	0,030	74%	0,082	72%	0,073	90%
7,2	0,040	100%	0,108	95%	0,081	100%
7,4	0,040	98%	0,114	100%	0,068	83%
7,6	0,027	67%	0,068	60%	0,033	40%
8,2	0,023	56%	0,054	48%	0,020	25%

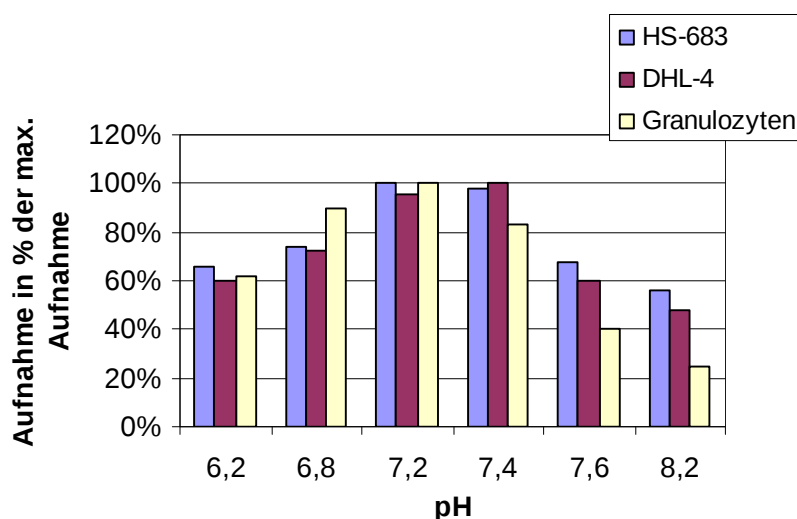


Abb. 13: MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 6,2 und 8,2 in Prozent der maximalen Aufnahme

5.3.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Aufnahme von FET

Bei den Tumorzellen wurde die FET-Aufnahme in nahezu gleicher Weise durch pH-Veränderungen beeinflusst wie die MET-Aufnahme. Hingegen wurde die FET-Aufnahme der Granulozyten durch Veränderungen des pH weniger beeinflusst als bei den Tumorzellen und erwies sich als deutlich weniger pH-abhängig als die Aufnahme von MET in Granulozyten.

Wie bei MET lag das pH-Optimum der FET-Aufnahme für alle Zellen bei pH 7,2-7,4. Ansäuerung auf pH 6,2 reduzierte die FET-Aufnahme beider Tumorzelllinien um rund 50%. Alkalisierung auf pH 7,6 reduzierte die FET-Aufnahme der Gliom- und Lymphomzellen um 30% bzw. 39%, stärkere Alkalisierung auf pH 8,2 führte zu einem Rückgang um 45% bzw. 62%. Die (geringe) FET-Aufnahme in Granulozyten wurde durch pH-Veränderungen weniger stark beeinflusst: Die Aufnahme reduzierte sich bei pH 6,2 um 30% und bei pH 8,2 um 20%. Tabelle 9 zeigt die FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten bei unterschiedlichen pH-Werten in kBq/100.000 Zellen und in Prozent der maximalen Aufnahme. Abb. 14 zeigt die FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in Abhängigkeit vom pH-Wert in Prozent der maximalen Aufnahme.

Tab. 9: FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten bei pH-Werten zwischen 6,2 und 8,2 in kBq/100.000 Zellen und in Prozent der maximalen Aufnahme

pH-Wert	HS-683		DHL-4		Granulozyten	
	kBq/1*10 ⁵ Zellen	% d. max. Aufnahme	kBq/1*10 ⁵ Zellen	% d. max. Aufnahme	kBq/1*10 ⁵ Zellen	% d. max. Aufnahme
6,2	5,07	47%	3,85	48%	0,59	70%
6,8	7,77	72%	5,99	75%	0,74	87%
7,2	10,47	97%	8,03	100%	0,85	100%
7,4	10,80	100%	7,88	98%	0,74	87%
7,6	7,55	70%	4,96	61%	0,63	74%
8,2	5,96	55%	3,07	38%	0,67	78%

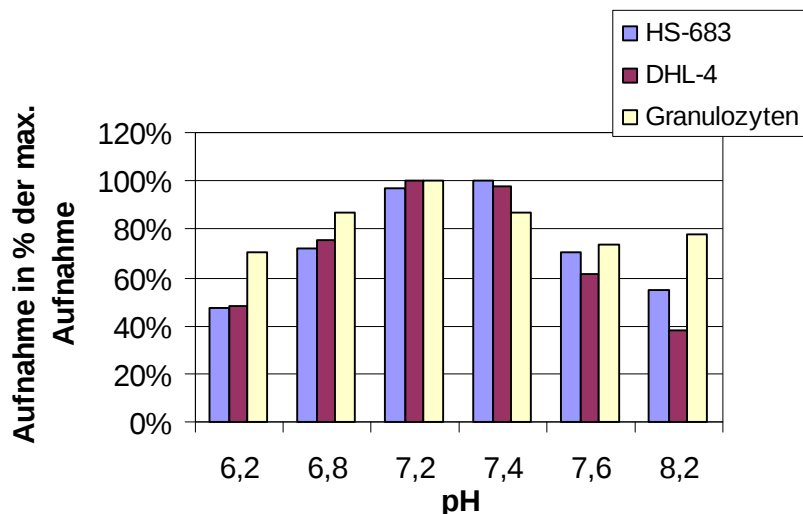


Abb. 14: FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 6,2 und 8,2 in % der maximalen Aufnahme

5.4 Hemmstoff-Versuche

5.4.1 Einfluss spezifischer Hemmstoffe auf die Aufnahme von MET

Die MET-Aufnahme wurde bei allen Zellen am stärksten durch BCH gehemmt. Und zwar um 58% bei HS-683 Gliomzellen, um 68% bei DHL-4 Lymphomzellen und um 36% bei Granulozyten. Die Anwesenheit von L-Serin verringerte die MET-Aufnahme um 46% bei HS-683 Gliomzellen, um 60% bei DHL-4 Lymphomzellen und um 20% bei Granulozyten. MeAIB bewirkte bei keiner der untersuchten Zelllinien eine Hemmung der MET-Aufnahme.

Die Kombination aller drei Hemmstoffe bewirkte eine Hemmung um 88% bei HS-683 Gliomzellen, um 86% bei DHL-4 Lymphomzellen und um 53% bei Granulozyten. Der verbleibende nicht hemmbare Anteil der Aufnahme wurde als „unspezifische Aufnahme“ bezeichnet. Bei Granulozyten fällt somit im Vergleich zu den Tumorzellen ein hoher Anteil an unspezifischer Aufnahme von 47% auf. Tabelle 10 und Abb. 15 zeigen die MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten nach Inkubation mit jeweils 90 mmol/L BCH, MeAIB und L-Serin sowie in Anwesenheit von 90 mmol/L aller drei Hemmstoffe in % der ungehemmten Aufnahme.

Tab. 10: MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in Anwesenheit kompetitiver Hemmstoffe in Prozent der ungehemmten Aufnahme

	HS-683 Gliomzellen	DHL-4 Lymphomzellen	Granulozyten
	%	%	%
ohne Hemmstoffe (O)	100	100	100
mit BCH (B)	42 ± 21	32 ± 4,5	64 ± 21
mit MeAIB (M)	132 ± 68	79 ± 17	96 ± 19
mit L-Serin (S)	54 ± 8	40 ± 20	80 ± 10
mit BCH, MeAIB und L-Serin (BMS)	12 ± 2,8	14 ± 6	47 ± 22

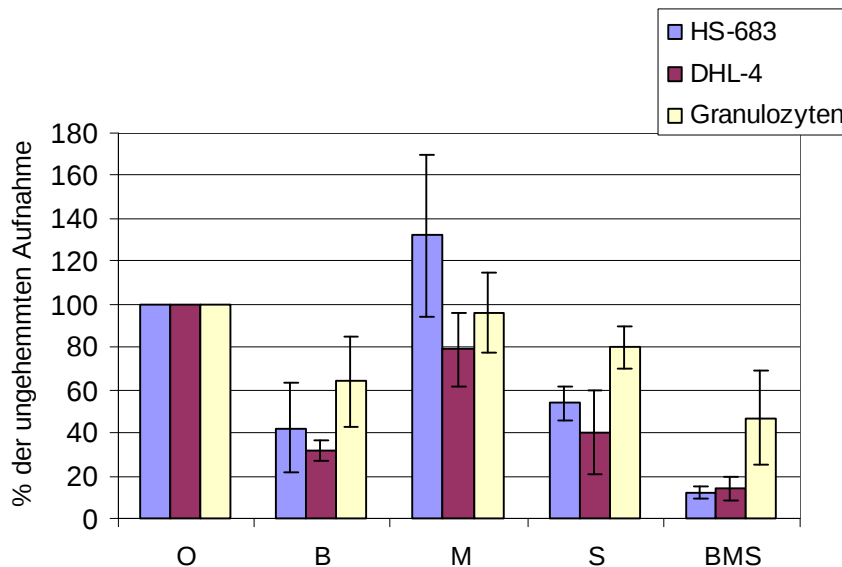


Abb. 15: MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in Anwesenheit der kompetitiven Hemmstoffe BCH (B), MeAIB (M) und L-Serin (S) sowie aller drei Hemmstoffe (BMS) in Prozent der ungehemmten Aufnahme (O)

5.4.2 Einfluss spezifischer Hemmstoffe auf die Aufnahme von FET

Die FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen und DHL-4 Lymphomzellen wurde sowohl durch BCH als auch durch L-Serin im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme um mehr als 90% gesenkt. Bei Granulozyten wurde die FET-Aufnahme durch BCH um 39% und durch L-Serin um 24% gehemmt. MeAIB hatte bei keiner der untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die FET-Aufnahme.

Der nicht kompetitiv hemmbare Anteil der FET-Aufnahme nach Inkubation mit 90mmol/L aller drei Hemmstoffe war bei Granulozyten mit 63% erheblich größer als bei HS-683 Gliomzellen mit 5,4% und DHL-4 Lymphomzellen mit 3,7%.

Tabelle 11 und Abb. 16 zeigen die FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten nach Inkubation mit jeweils 90 mmol/L BCH, MeAIB und L-Serin sowie in Anwesenheit von 90 mmol/L aller drei Hemmstoffe in Prozent der ungehemmten Aufnahme.

Tab. 11: FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in Anwesenheit kompetitiver Hemmstoffe in Prozent der ungehemmten Aufnahme

	HS-683 Gliomzellen	DHL-4 Lymphomzellen	Granulozyten
	%	%	%
ohne Hemmstoffe (O)	100	100	100
mit BCH (B)	$7,5 \pm 3,6$	$5,5 \pm 2,7$	61 ± 23
mit MeAIB (M)	60 ± 35	51 ± 30	102 ± 21
mit L-Serin (S)	$8 \pm 1,6$	$4,8 \pm 1,3$	76 ± 35
mit BCH, MeAIB und L-Serin (BMS)	$5,4 \pm 2,3$	$3,7 \pm 2,3$	63 ± 20

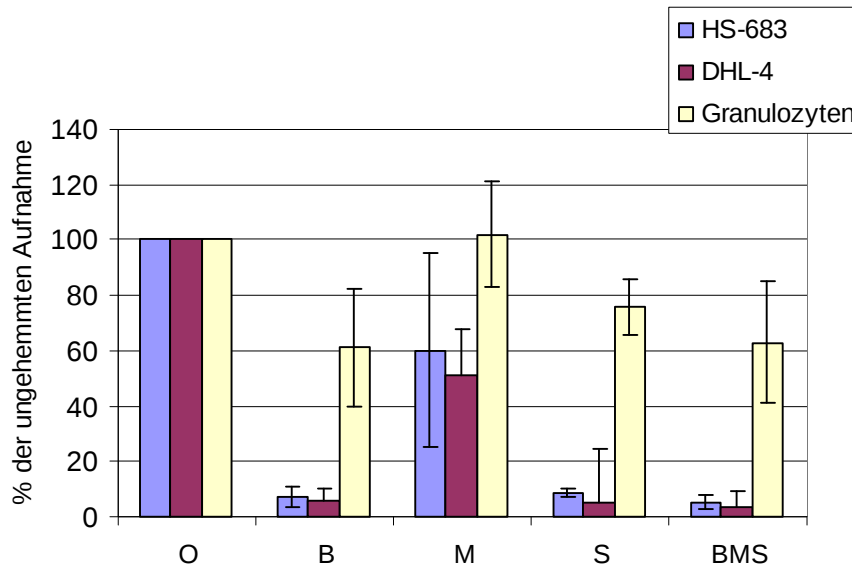


Abb. 16: FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten in Anwesenheit der kompetitiven Hemmstoffe BCH (B), MeAIB (M) und L-Serin (S) sowie aller drei Hemmstoffe (BMS) in Prozent der ungehemmten Aufnahme (O)

5.5 Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen

Der Transport über spezifische Transportsysteme zeigt bei steigendem Substratangebot typischerweise den Verlauf einer Sättigungskurve. Um den Einfluss steigender Methionin- und FET*-Konzentrationen auf deren Aufnahme zu untersuchen und den Sättigungsbereich der verschiedenen Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C mit ansteigenden Konzentrationen kalten Methionins bzw. Fluorethyl-L-Tyrosins inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 37°C mit 3,7 kBq (1 µCi) MET bzw. 370 kBq (10 µCi) FET inkubiert. Der nicht sättigbare Anteil der Aufnahme wurde als Tracer-Aufnahme bei sehr hohen Met- bzw. FET*-Konzentrationen von 176 bzw. 180 mg/L ermittelt. Zur Berechnung der sättigbaren Aufnahme wurde der nicht-sättigbare Anteil von der Gesamtaufnahme subtrahiert.

5.5.1 Einfluss der Met-Konzentration auf die Aufnahme von MET

HS-683 Gliomzellen

Die Aufnahme von MET war bei niedrigen Met-Konzentrationen von 0,011 und 0,11 mg/L gering. Eine Erhöhung der Met-Konzentration führte zunächst zu einer

Steigerung der MET-Aufnahme mit Maximum bei einer Met-Konzentrationen von 1,1 mg/L ($7,4 \cdot 10^{-3}$ mmol/L). Die weitere Erhöhung der Met-Konzentration über 2,2 mg/L verringerte die MET-Aufnahme zunehmend im Sinne einer Sättigung der Transportsysteme.

Bei einer unphysiologisch hohen Met-Konzentration von 176 mg/L betrug die MET-Aufnahme noch 1,01 kBq pro mg Zellprotein. Diese Aufnahme wurde als nicht-sättigbar betrachtet und von der Gesamtaufnahme subtrahiert um die sättigbare Met-Aufnahme zu ermitteln. Die nicht-sättigbare MET-Aufnahme bei 176 mg/L Met-Konzentration betrug 7,7% der maximalen MET-Aufnahme. Tabelle 12 zeigt die MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen bei steigenden Met-Konzentrationen von 0,011 mg/L bis 176 mg/L. Die Aufnahme ist angegeben in kBq pro mg Zellprotein. Aus der aufgenommenen Radioaktivität minus der nicht-sättigbaren Aufnahme wurde über die bekannten Methioninkonzentrationen im Ansatz die sättigbare Met-Aufnahme berechnet und in nmol/mg Zellprotein angegeben.

Tab. 12: MET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein und sättigbare Aufnahme von Met in nmol/mg Zellprotein in HS-683 Gliomzellen in Abhängigkeit von der Met-Konzentration

Met-Konzentration		MET- Aufnahme	sättigbare Met-Aufnahme
mg/L	μmol/L	kBq/mg Zellprotein	nmol/mg Zellprotein
0,011	0,074	1,35	0,001
0,11	0,74	1,38	0,015
1,1	7,4	13,09	4,83
2,2	14,8	12,19	8,95
4,4	29,6	7,21	9,92
8,8	59	4,04	9,66
17,6	118	2,12	7,06
35,2	236	1,32	3,96
176	1180	1,01	-

Abbildung 17 veranschaulicht den Einfluss steigender Met-Konzentrationen auf die MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen. Die rote Kurve zeigt die Aufnahme von MET in Abhängigkeit von der Met-Konzentration in kBq/mg Zellprotein. Die blaue Kurve zeigt die sättigbare Met-Aufnahme in Abhängigkeit von der Met-Konzentration in nmol/mg Zellprotein. Die Kurve steigt bis zum Sättigungsbereich und zeigt ein Plateau bei Met-Konzentrationen von 14,8-59 μmol/L (2,2-8,8 mg/L) mit einer Aufnahme von knapp 10 nmol/mg Zellprotein. Eine weitere Erhöhung der Met-Konzentration führt zu einem Rückgang der sättigbaren Aufnahme. Möglicherweise verringern Kontrollmechanismen wie Substrathemmung die Aufnahme bei hohen Met-Konzentrationen.

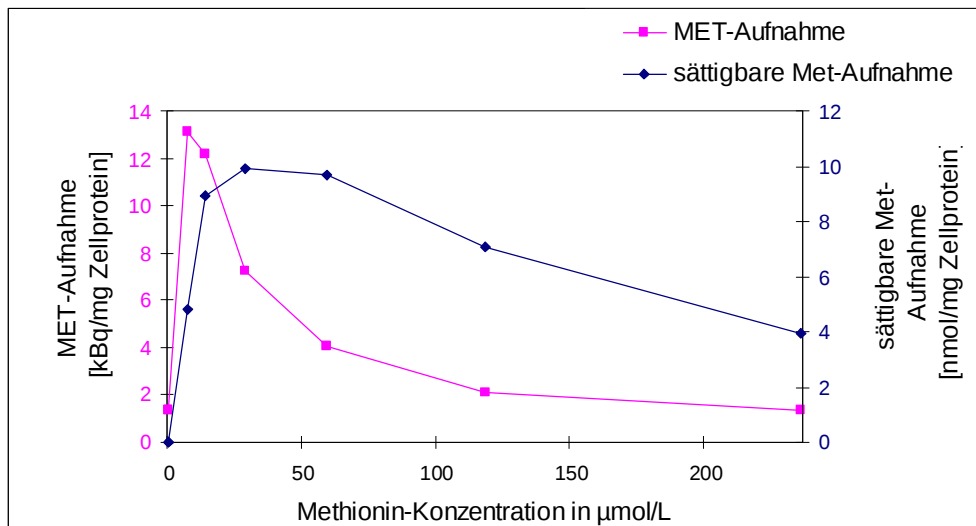


Abb. 17: Aufnahme von MET und sättigbare Aufnahme von Met in HS-683 Gliomzellen in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration

DHL-4 Lymphomzellen

Auch bei DHL-4 Lymphomzellen war die MET-Aufnahme bei niedrigen Met-Konzentrationen von 0,011 und 0,11 mg/L gering und nahm zunächst mit steigenden Met-Konzentrationen zu. Die MET-Aufnahme war maximal bei einer Met-Konzentration von 1,1 mg/L. Ab einer Konzentration von 2,2 mg/L trat die Sättigung der Transportsysteme ein und die MET-Aufnahme wurde wieder geringer. Die nicht sättigbare Aufnahme von MET bei einer Met-Konzentration von 176 mg/L betrug 1,5 kBq pro mg Zellprotein bzw. 12% der maximalen Aufnahme. Tabelle 13 zeigt die MET-Aufnahme und die sättigbare Met-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen bei steigenden Met-Konzentrationen von 0,011 mg/L bis 176 mg/L.

Tab. 13: MET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein und sättigbare Aufnahme von Met in nmol/mg Zellprotein in DHL-4 Lymphomzellen in Abhängigkeit von der Met-Konzentration

Met-Konzentration		MET-Aufnahme	sättigbare Met-Aufnahme
mg/L	µmol/L	kBq/mg Zellprotein	nmol/mg Zellprotein
0,011	0,074	5,11	0,014
0,11	0,74	6,03	0,181
1,1	7,4	11,98	4,19
2,2	14,8	8,42	5,54
4,4	29,6	6,70	8,33
8,8	59	4,28	8,86
17,6	118	3,41	9,82
35,2	236	2,11	7,74
176	1180	1,5	-

Abbildung 18 veranschaulicht den Einfluss steigender Met-Konzentrationen auf die MET-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen. Die rote Kurve zeigt die MET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Met-Konzentration in kBq/mg Zellprotein. Die blaue Kurve zeigt

den Verlauf der sättigbaren Met-Aufnahme in Abhängigkeit von der Met-Konzentration in nmol/mg Zellprotein. Die Aufnahme steigt bis zum Sättigungsbereich und zeigt ein Plateau bei Met-Konzentrationen von 29,6-236 $\mu\text{mol/L}$ (4,4-35,2 mg/L) mit einer Met-Aufnahme zwischen rund 8 und 9 nmol/mg Zellprotein.

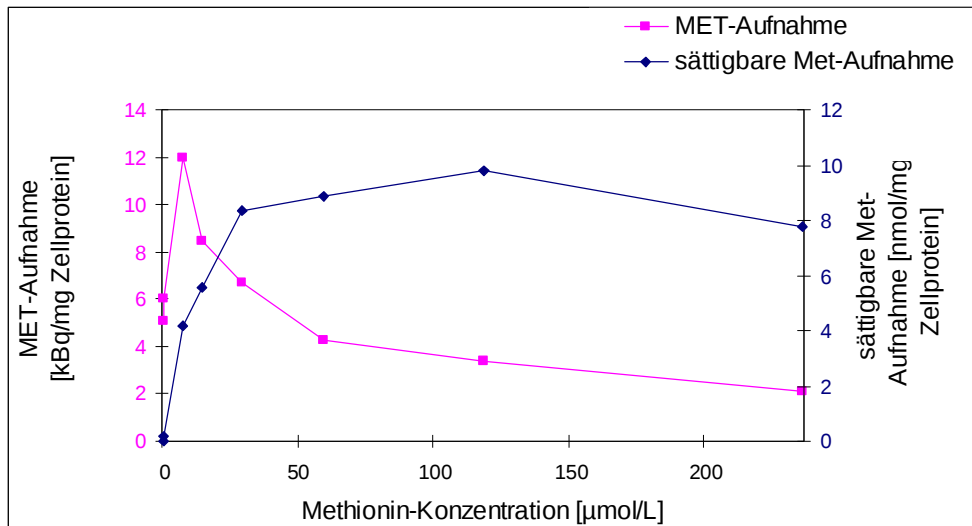


Abb. 18: Aufnahme von MET und sättigbare Aufnahme von Met in DHL-4 Lymphomzellen in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration

Granulozyten

Auch bei Granulozyten nahm die MET-Aufnahme bei niedrigen Met-Konzentrationen bis 4,4 mg/L mit steigenden Met-Konzentrationen zu. Die Sättigung der Transportsysteme begann bei einer Konzentration von 8,8 mg/L. Die nicht-sättigbare Aufnahme bei einer Met-Konzentration von 176 mg/L betrug 0,66 kBq/mg Zellprotein. Dies entsprach 4% der maximalen MET-Aufnahme. Tabelle 14 zeigt die MET-Aufnahme und die sättigbare Met-Aufnahme in Granulozyten bei steigenden Met-Konzentrationen von 0,011 mg/L bis 176 mg/L.

Tab. 14: MET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein und sättigbare Aufnahme von Met in nmol/mg Zellprotein in Granulozyten in Abhängigkeit von der Met-Konzentration

Met-Konzentration		MET- Aufnahme	sättigbare Met-Aufnahme
mg/L	$\mu\text{mol/L}$	kBq/mg Zellprotein	nmol/mg Zellprotein
0,011	0,074	0,18	0,001
0,11	0,74	0,82	0,006
1,1	7,4	5,15	1,79
2,2	14,8	14,43	11,00
4,4	29,6	15,78	24,20
8,8	59	11,47	34,50
17,6	118	6,48	37,10
35,2	236	3,15	31,70
176	1180	0,66	-

Abbildung 19 veranschaulicht den Einfluss steigender Met-Konzentrationen auf die MET-Aufnahme in Granulozyten. Die rote Kurve zeigt die MET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Met-Konzentration in kBq/mg Zellprotein. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf der sättigbaren Met-Aufnahme. Sie steigt bis zum Sättigungsbereich und zeigt ein Plateau bei Met-Konzentrationen von 59-236 $\mu\text{mol/L}$ (8,8-35,2 mg/L) mit einer Met-Aufnahme zwischen 30 und 35 nmol/mg Zellprotein.

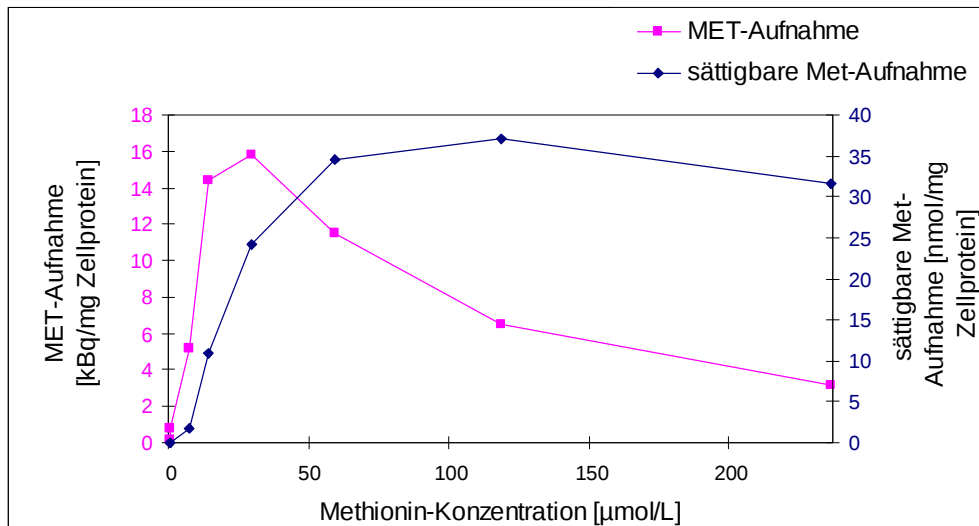


Abb. 19: Aufnahme von MET und sättigbare Aufnahme von Met in Granulozyten in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration

5.5.2 Einfluss der FET*-Konzentration auf die Aufnahme von FET

HS-683 Gliomzellen

Die FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen war bei niedrigen FET*-Konzentrationen von 0,01 bis 12,0 mg/L am höchsten und blieb in diesem Bereich annähernd konstant. Die weitere Steigerung der FET*-Konzentration führte ab einer Konzentration von 18 mg/L im Sinne einer Sättigung der spezifischen Transporter zu einem Rückgang der FET-Aufnahme. Bei einer sehr hohen FET*-Konzentration von 180 mg/L betrug die nicht-sättigbare FET-Aufnahme 29,6 kBq/mg Zellprotein bzw. 35% der maximalen Aufnahme. Der nicht-sättigbare Anteil war damit deutlich größer als bei der Methioninaufnahme.

Tabelle 15 zeigt die FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen bei steigenden FET*-Konzentrationen von 0,01-180 mg/L. Abbildung 20 veranschaulicht den Einfluss steigender Konzentrationen auf die FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen. Die rote Kurve gibt die FET-Aufnahme in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein wieder. Die blaue Kurve zeigt die sättigbare FET*-Aufnahme. Sie steigt bei FET*-Konzentrationen von 0,055 bis 66 $\mu\text{mol/L}$ zunächst proportional zur FET*-

Konzentration an, flacht dann ab und erreicht ein Plateau mit einer maximalen FET*-Aufnahme von etwa 3 nmol/mg Zellprotein.

Tab. 15: FET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein und sättigbare Aufnahme von FET* in nmol/mg Zellprotein in HS-683 Gliomzellen in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration

FET*-Konzentration		FET-Aufnahme	sättigbare FET*-Aufnahme
mg/L	μmol/L	kBq/mg Zellprotein	nmol/mg Zellprotein
0,01	0,055	85,47	0,002
0,1	0,55	74,37	0,013
1	5,5	80,66	0,152
3	16,5	76,59	0,419
6	33	79,55	0,891
12	66	80,66	1,82
18	99	66,6	1,98
24	133	61,79	2,13
45	249	51,8	2,99
90	499	40,7	2,99
180	990	29,6	-

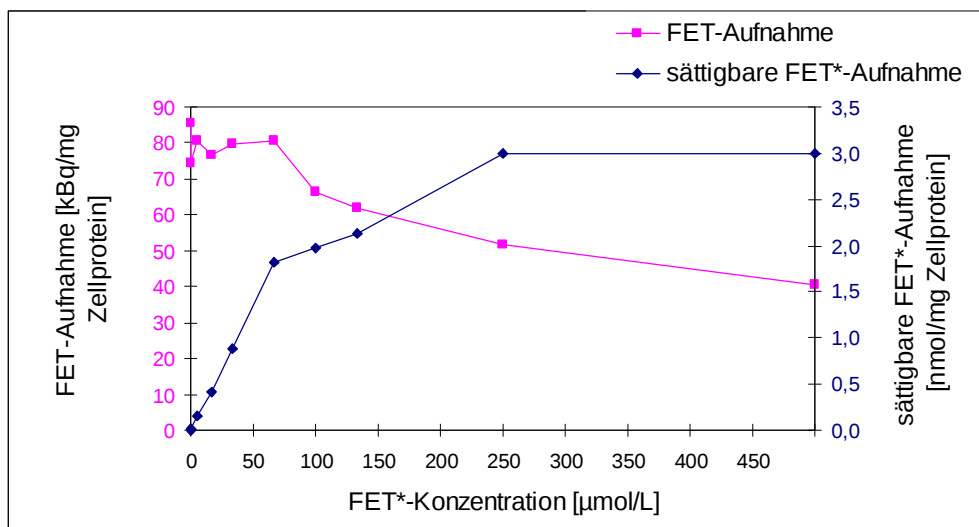


Abb. 20: FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration

DHL-4 Lymphomzellen

Die FET-Aufnahme war bei niedrigen FET*-Konzentrationen von 0,01 mg/L bis 0,1 mg/L am höchsten und nahm bei höheren Konzentrationen ab 1mg/L im Sinne einer Sättigung ab. Die nicht-sättigbare Aufnahme bei 180 mg/L FET* betrug 35% der maximalen Aufnahme.

Tabelle 16 zeigt die FET-Aufnahme von DHL-4 Lymphomzellen bei steigenden FET*-Konzentrationen von 0,01-180 mg/L. Abbildung 21 veranschaulicht den Einfluss steigender FET*-Konzentrationen auf die FET-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen.

Die rote Kurve gibt die FET-Aufnahme in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein wieder. Die blaue Kurve zeigt die sättigbare FET*-Aufnahme. Bei FET*-Konzentrationen von 0,055 bis 99 $\mu\text{mol/L}$ steigt sie steil an mit einem Maximum bei 5,3 nmol/mg Zellprotein, nimmt dann wieder ab und bildet ein Plateau bei einer Aufnahme von etwa 3,5 nmol/mg Zellprotein.

Tab. 16: FET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein und sättigbare Aufnahme von FET* in nmol/mg Zellprotein in DHL-4 Lymphomzellen in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration

FET*-Konzentration		FET-Aufnahme	sättigbare FET*-Aufnahme
mg/L	$\mu\text{mol/L}$	kBq/mg Zellprotein	nmol/mg Zellprotein
0,01	0,055	758	0,015
0,1	0,55	757	0,145
1	5,5	714	1,38
3	16,5	632	3,23
6	33	447	3,16
12	66	383	4,01
18	99	369	5,29
24	133	340	5,05
45	249	293	3,54
90	499	291	3,5
180	990	271	-

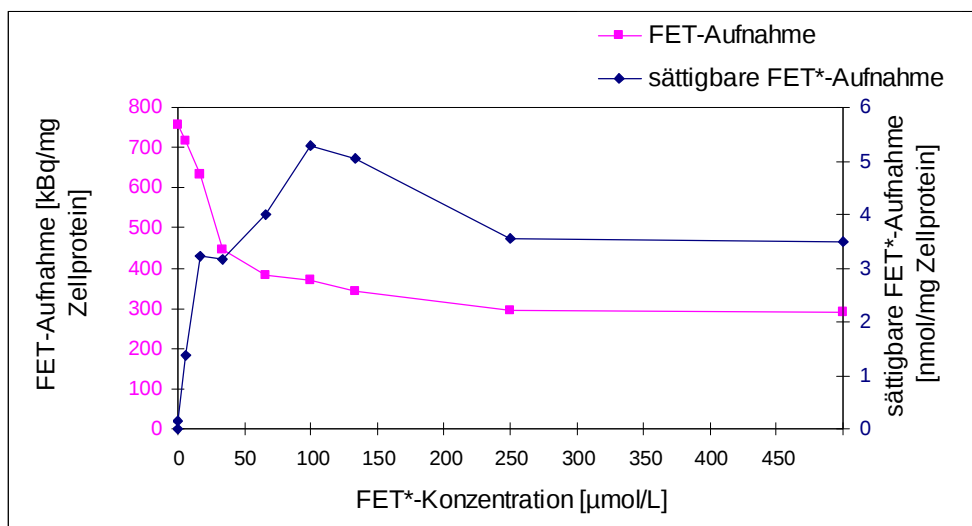


Abb. 21: FET-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration

Granulozyten

Die FET-Aufnahme war bei einer FET*-Konzentrationen von 1,0 mg/L maximal und verringerte sich bei höheren Konzentrationen ab 3,0 mg/L kontinuierlich. Bei 180mg/L betrug die Aufnahme noch 1,04 kBq/mg Zellprotein bzw. 20% der maximalen Aufnahme. Tabelle 17 zeigt die FET-Aufnahme in Granulozyten bei steigenden FET*-Konzentrationen von 0,01-180 mg/L.

Abbildung 22 veranschaulicht den Einfluss steigender FET*-Konzentrationen auf die FET-Aufnahme in Granulozyten. Die rote Kurve gibt die FET-Aufnahme in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration in kBq/mg Zellprotein wieder. Die blaue Kurve zeigt die sättigbare FET*-Aufnahme in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration in nmol/mg Zellprotein. Sie zeigt bei FET*-Konzentrationen bis 133 $\mu\text{mol/L}$ einen annähernd linearen Verlauf, flacht dann ab und erreicht bei einer Konzentration von 259 $\mu\text{mol/L}$ ihr Maximum mit einer Aufnahme von etwa 0,36 nmol/mg Zellprotein.

Tab. 17: FET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein und sättigbare Aufnahme von FET* in nmol/mg Zellprotein in Granulozyten in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration

FET*-Konzentration		FET-Aufnahme	sättigbare FET*-Aufnahme
mg/L	$\mu\text{mol/L}$	kBq/mg Zellprotein	nmol/mg Zellprotein
0,01	0,055	5,11	1,32E-04
0,1	0,55	5,03	1,89E-03
1	5,5	5,55	1,45E-02
3	16,5	5,37	4,19E-02
6	33	5,07	7,85E-02
12	66	4,92	1,52E-01
18	99	4,33	1,96E-01
24	133	4,22	2,55E-01
45	249	3,37	3,64E-01
90	499	1,85	3,19E-01
180	990	1,04	-

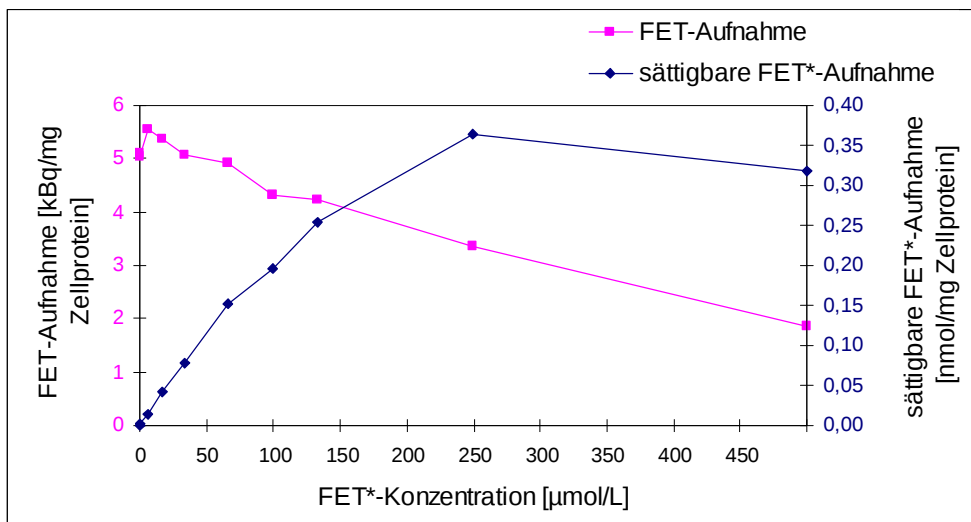


Abb. 22: FET-Aufnahme in Granulozyten in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration

5.5.3 Vergleich der Sättigbarkeit der Aufnahme von MET und FET

Beide Tracer wurden bei allen Zellen vorwiegend über sättigbare Transportmechanismen aufgenommen. Der Anteil der nicht-sättigbaren FET-Aufnahme bei einer FET*-Konzentration von 180 mg/L betrug 20-35% der maximalen FET-

Aufnahme. Die nicht-sättigbare MET-Aufnahme bei einer Met-Konzentration von 176 mg/L betrug 4% der maximalen MET-Aufnahme bei den Granulozyten und 7,7% bzw. 12% bei den Gliom- bzw. Lymphomzellen.

Bei allen Zelllinien fiel auf, dass die MET-Aufnahme bei Met-Konzentrationen unterhalb der Sättigungskonzentration mit steigenden Met-Konzentrationen zunahm. Die Transportsysteme scheinen also von der Met-Konzentration abhängig zu sein. Möglicherweise führt eine sehr niedrige Met-Konzentration zur Inaktivierung von Transportern, die bei steigender Konzentration wieder aktiviert werden. Auch die intrazelluläre Met-Konzentration könnte dabei eine Rolle spielen. Die Sättigung der Met-Transporter trat bei HS-683 Gliomzellen und DHL-4 Lymphomzellen bei einer Met-Konzentration von 2,2 mg/L ein, bei Granulozyten bei 8,8 mg/L. Die maximale sättigbare Met-Aufnahme von Granulozyten war mit 37 nmol/mg Zellprotein etwa 3,7 mal so groß wie bei den Tumorzellen mit 9,9 (HS-683 Gliomzellen) bzw. 9,8 nmol/mg Zellprotein (DHL-4 Lymphomzellen).

Im Unterschied zu Methionin war die FET-Aufnahme bei sehr niedrigen FET*-Konzentrationen maximal hoch. Die FET*-Konzentration hatte also keinen Einfluss auf die Aktivität von Transportern. Die Sättigung trat bei HS-683 Gliomzellen ab einer FET*-Konzentration von 18 mg/L, bei Granulozyten ab 3 mg/L und bei DHL-4 Lymphomzellen bereits ab 1 mg/L ein. Die maximale sättigbare FET*-Aufnahme von HS-683 Gliomzellen und DHL-4 Lymphomzellen war mit 3 bzw. 5,3 nmol/mg Zellprotein um die Faktoren 8,3 bzw. 15 höher als bei Granulozyten mit einer maximalen sättigbaren Aufnahme von 0,36 nmol/mg Zellprotein. Tabelle 18 zeigt die Met- und FET*-Konzentrationen mit maximaler Traceraufnahme, die jeweiligen Konzentrationen bei der die Sättigung der Transportsysteme eintritt, die maximale sättigbare Aufnahme der verschiedenen Zellen und die nicht-sättigbare Traceraufnahme in Prozent der maximalen.

Tab. 18: Vergleich der Sättigbarkeit der Aufnahme von Methionin und FET* in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten

	Methionin			FET*		
	HS-683	DHL-4	GZ	HS-683	DHL-4	GZ
Konzentration mit maximaler Tracer-Aufnahme [mg/L]	1,1	1,1	4,4	0,01-12	0,01-0,1	1,0
Sättigungskonzentration [mg/L]	2,2	2,2	8,8	18,0	1,0	3,0
Maximale sättigbare Aufnahme [nmol/mg Zellprotein]	9,9	9,8	37,1	3	5,3	0,36
nicht-sättigbare Aufnahme in % der maximalen Aufnahme	7,7%	12%	4%	35%	35%	20%

5.6 Abhängigkeit der Aufnahme von der Inkubationszeit

5.6.1 MET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Aufnahmegeschwindigkeit für MET war bei allen drei Zelllinien in der ersten Minute der Inkubationszeit am größten und nahm innerhalb weniger Minuten deutlich ab. Die höchste maximale Aufnahmegeschwindigkeit hatten Granulozyten mit 0,5 kBq/min/mg Zellprotein, gefolgt von HS-683 Gliomzellen mit 0,16 kBq/min/mg Zellprotein und DHL-4 Lymphomzellen mit 0,05 kBq/min/mg Zellprotein.

Zwischen der ersten und zweiten Minute der Inkubationszeit betrug die Aufnahmegeschwindigkeit bei DHL-4 Lymphomzellen noch 100% der Anfangsgeschwindigkeit, während sie sich bei HS-683 Gliomzellen und Granulozyten bereits auf 58% bzw. 27% der Anfangsgeschwindigkeit reduziert hatte. Zwischen der zweiten und fünften Minute der Inkubationszeit betrug die durchschnittliche Aufnahmegeschwindigkeit bei DHL-4 Lymphomzellen 58%, bei HS-683 Gliomzellen 34% und bei Granulozyten 14% der initialen Aufnahmegeschwindigkeit. Während die Aufnahmegeschwindigkeit bei den Lymphomzellen und Granulozyten kontinuierlich gegen Null ging und im Zeitabschnitt von 60 bis 90 Minuten noch 0,5% (Lymphomzellen) bzw. 0,4% (Granulozyten) der Anfangsgeschwindigkeit betrug, blieb sie bei HS-683 Gliomzellen über längere Zeit annähernd konstant und betrug nach 60-90 Minuten noch 22% der Anfangsgeschwindigkeit. Die Abnahme der Aufnahmegeschwindigkeit kann durch bidirektional funktionierende Transportsysteme erklärt werden, durch die sich bei entsprechend hoher intrazellulärer Konzentration ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Auswärtstransport einstellt.

Tabelle 19 zeigt die MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten nach 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 und 90 Minuten in kBq pro mg Zellprotein. Tabelle 20 zeigt die durchschnittliche Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in den Zeitabschnitten von 0-1, 1-2, 2-5, 5-10, 10-20, 20-40, 40-60 und 60-90 Minuten der Inkubationszeit. Die Aufnahmegeschwindigkeit ist angegeben in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und in % der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit. Abbildung 23 veranschaulicht die MET-Aufnahme aller drei Zelllinien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in kBq pro mg Zellprotein. Abbildung 24 zeigt die Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Prozent der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit.

Tab. 19: MET-Aufnahme in kBq pro mg Zellprotein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Inkubationszeit	HS-683 Gliomzellen	DHL-4 Lymphomzellen	Granulozyten
min	kBq/mg Zellprotein	kBq/mg Zellprotein	kBq/mg Zellprotein
1	0,16	0,05	0,50
2	0,26	0,10	0,63
5	0,42	0,19	0,84
10	0,70	0,36	1,00
20	1,30	0,50	1,20
40	1,98	0,59	1,31
60	2,93	0,76	1,34
90	4,00	0,77	1,40

Tab. 20: Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in verschiedenen Abschnitten der Inkubationszeit in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und in Prozent der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit

Inkubationszeit	HS-683 Gliomzellen		DHL-4 Lymphomzellen		Granulozyten	
min	kBq/mg/min	%	kBq/mg/min	%	kBq/mg/min	%
0-1	0,16	100	0,05	100	0,5	100
1-2	0,10	58	0,05	100	0,13	27
2-5	0,05	34	0,03	58	0,07	14
5-10	0,05	34	0,03	64	0,03	7
10-20	0,06	37	0,014	27	0,02	4
20-40	0,03	21	0,005	9	0,006	1,2
40-60	0,05	29	0,008	16	0,001	0,3
60-90	0,04	22	0,0002	0,5	0,002	0,4

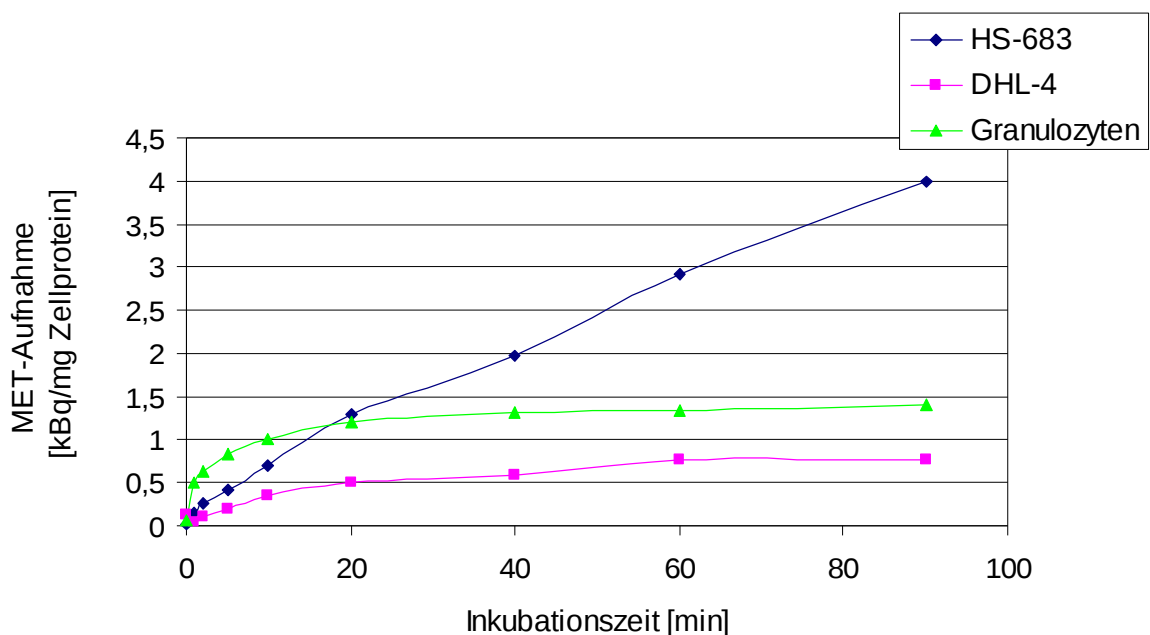


Abb. 23: MET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten

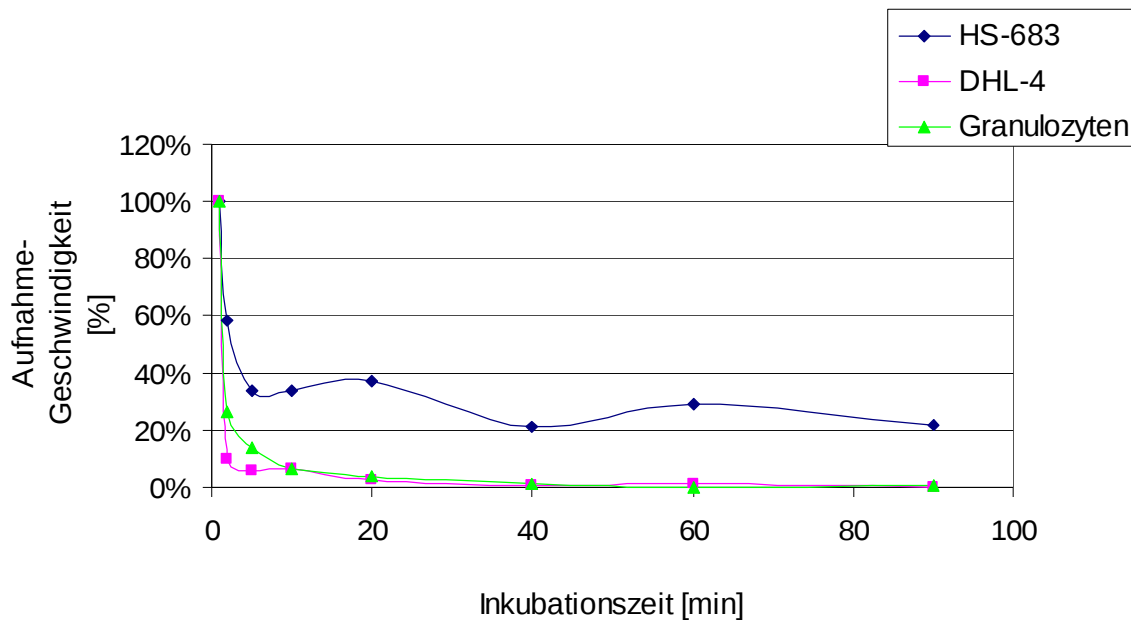


Abb. 24: Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Prozent der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit für HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten.

5.6.2 FET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Auch die Aufnahmegeschwindigkeit für FET war bei allen Zellen initial am höchsten und nahm innerhalb weniger Minuten rasch ab. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit betrug bei HS-683 Gliomzellen 45,1 kBq/min/mg Zellprotein, bei DHL-4 Lymphomzellen 133 kBq/min/mg Zellprotein und bei Granulozyten 12,21 kBq/min/mg Zellprotein.

Die Aufnahmegeschwindigkeit nahm bei Granulozyten am schnellsten ab: Bereits zwischen der ersten und zweiten Minute der Inkubationszeit betrug sie nur noch 18% der Anfangsgeschwindigkeit, während sie in diesem Zeitabschnitt bei beiden Tumorzelllinien noch rund 65% der Anfangsgeschwindigkeit betrug. Zwischen 5 und 10 Minuten Inkubationszeit betrug die durchschnittliche Aufnahmegeschwindigkeit noch 20% (Gliomzellen), 13% (Lymphomzellen) bzw. 6% (Granulozyten) der Anfangsgeschwindigkeit, zwischen 60 und 90 Minuten noch 19% (Gliomzellen), 3% (Lymphomzellen) und 0,2% (Granulozyten) der Anfangsgeschwindigkeit. Tabelle 21 zeigt die Aufnahme von FET in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten nach 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 und 90 Minuten in kBq pro mg Zellprotein. Tabelle 22 zeigt die durchschnittliche Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in den Zeitabschnitten von 0-1, 1-2, 2-5, 5-10, 10-20, 20-40, 40-60 und 60-90 Minuten der Inkubationszeit. Die Aufnahmegeschwindigkeit ist angegeben in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und in % der Anfangsgeschwindigkeit. Abbildung 25 zeigt die FET-

Aufnahme aller drei Zelllinien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in kBq/mg Zellprotein, Abbildung 26 zeigt die Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in % der Anfangsgeschwindigkeit.

Tab. 21: FET-Aufnahme in kBq pro mg Zellprotein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Inkubationszeit	HS-683 Gliomzellen	DHL-4 Lymphomzellen	Granulozyten
min	kBq/mg Zellprotein	kBq/mg Zellprotein	kBq/mg Zellprotein
1	33	135	14
2	78	222	17
5	126	381	22
10	134	468	26
20	221	679	36
40	333	988	50
60	490	1295	55
90	747	1433	56

Tab. 22: Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in verschiedenen Abschnitten der Inkubationszeit in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und in Prozent der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit

Inkubationszeit	HS-683 Gliomzellen		DHL-4 Lymphomzellen		Granulozyten	
min	kBq/mg/min	%	kBq/mg/min	%	kBq/mg/min	%
0-1	45,1	100	133	100	12,21	100
1-2	29,6	66	87	65	2,22	18
2-5	16,0	36	53	40	1,73	14
5-10	9,0	20	17	13	0,74	6
10-20	8,7	19	21	16	1,04	8
20-40	5,6	12	15	12	0,72	6
40-60	7,9	17	15	12	0,22	2
60-90	8,5	19	5	3	0,025	0,2

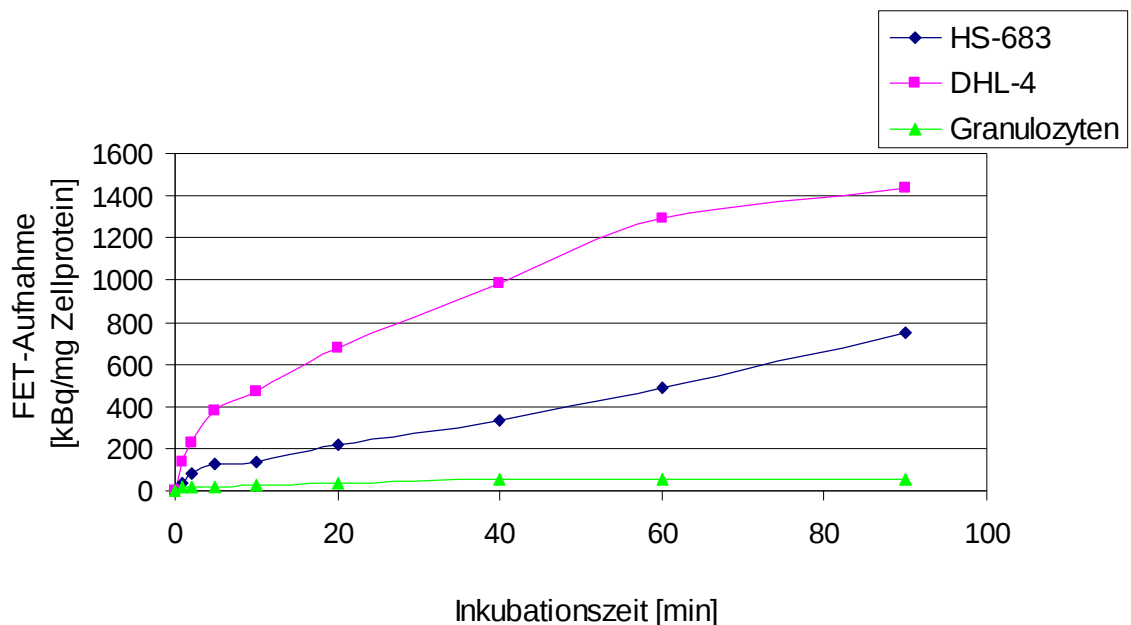


Abb. 25: FET-Aufnahme in kBq/mg Zellprotein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten

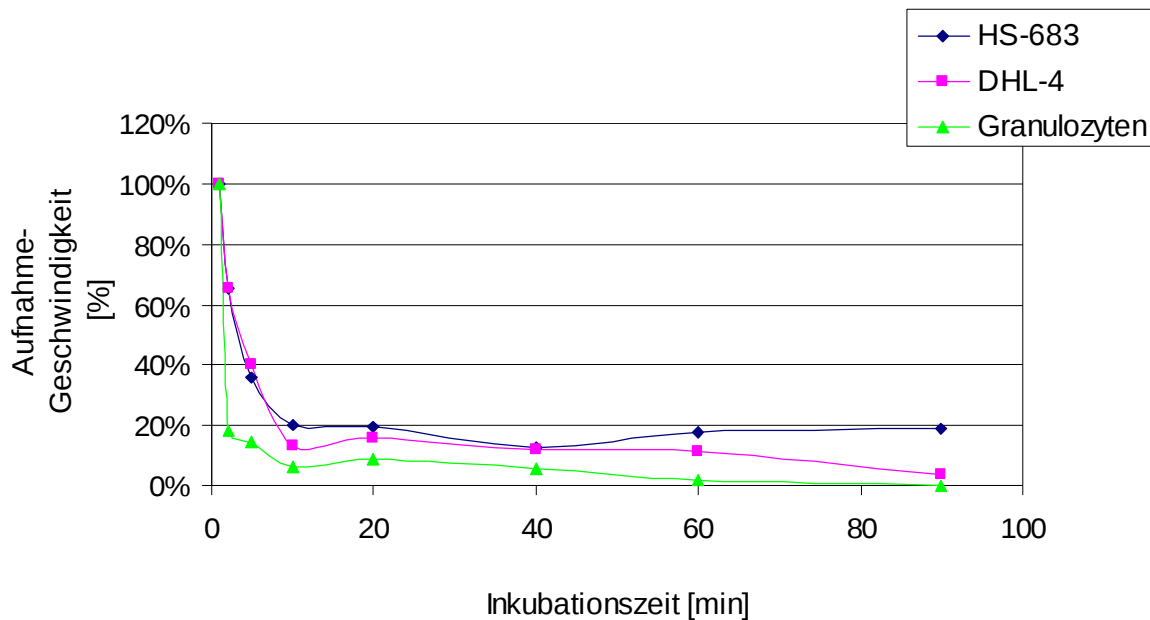


Abb. 26: Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in Prozent der maximalen Aufnahme-geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten

5.7 Michaelis-Menten-Kinetik

Der Transport über ein spezifisches Transportsystem ist vergleichbar mit einer Enzymreaktion und folgt typischerweise einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zeigt den Verlauf einer Sättigungskurve, die sich asymptotisch der maximalen Transportgeschwindigkeit $V_{\max}$ nähert. $V_{\max}$ gibt die Kapazität des Transportsystems wieder und ist ein Maß für die Menge an aktiven Transportern. Die Affinität charakterisiert die Qualität, mit der Transporter und Substrat interagieren und wird wiedergegeben durch die Michaelis-Konstante K_m . K_m entspricht der Substratkonzentration, bei der die Transportgeschwindigkeit $\frac{1}{2}V_{\max}$ beträgt. Je größer die Affinität, umso niedriger ist K_m . Zur Bestimmung von $V_{\max}$ und K_m wurde die Aufnahme von MET und FET bei unterschiedlichen Met- und FET*-Konzentrationen jeweils nach 1 und 5 Minuten gemessen und daraus die durchschnittliche Aufnahmegeschwindigkeit in diesem Zeitabschnitt berechnet.

5.7.1 Michaelis-Menten-Kinetik für die Aufnahme von MET

Die Aufnahmegeschwindigkeit steigt bei allen drei Zelllinien in Abhängigkeit von der Met-Konzentration gemäß einer Sättigungskinetik, die Graphen zeigen einen hyperbolischen Verlauf. Die Kurve für Granulozyten verläuft am steilsten, während der Graph für HS-683 Gliomzellen dem höchsten Grenzwert entgegengeht. Abbildung 27 zeigt die Aufnahmegeschwindigkeit für Met in HS-683 Gliomzellen, DHL-4

Lymphomzellen und Granulozyten bei Met-Konzentrationen von $7,4 \cdot 10^{-5}$ bis $2,3 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,011-35,2 mg/L).

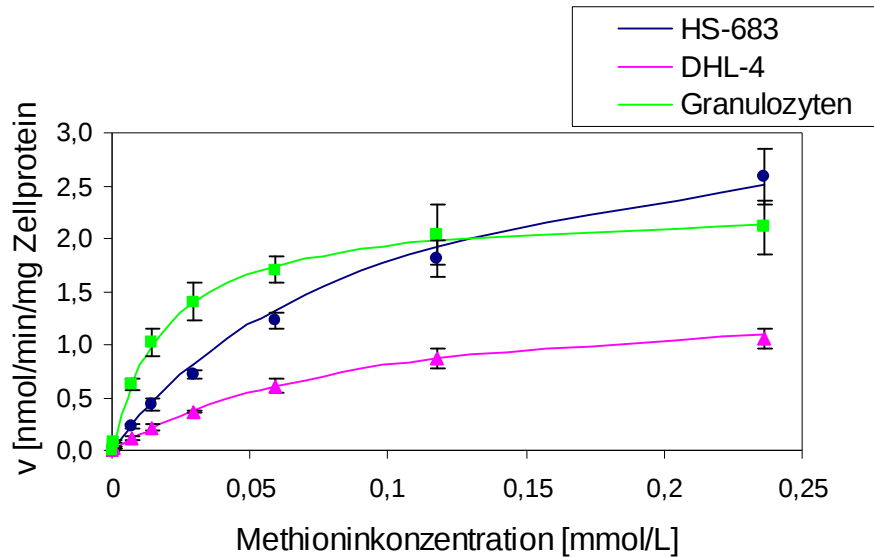


Abb. 27: Michaelis-Menten-Kinetik für die Aufnahme von Methionin in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten

Bestimmung von $V_{\max}$ und K_m in Lineweaver-Burk-Diagrammen

Um $V_{\max}$ und K_m direkt bestimmen zu können, wurden die reziproken Werte für Methioninkonzentration ($1/[Met]$) und Aufnahmegeschwindigkeit ($1/v$) in Lineweaver-Burk-Diagramme eingetragen. Aus der Gleichung der entstandenen Gerade können $1/K_m$ und $1/V_{\max}$ als Schnittpunkte des Graphen mit der x- bzw. y-Achse berechnet werden.

HS-683 Gliomzellen

Tabelle 23 zeigt die Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitet für Met in nmol pro mg Zellprotein pro Minute bei Met-Konzentrationen von $7,4 \cdot 10^{-5}$ bis $2,3 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,011-35,2 mg/L). Abbildung 28 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm für die Methionin-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen. Aus der Geradengleichung ergeben sich für die maximale Aufnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ 3,5 nmol/min/mg Zellprotein und für die Michaelis-Konstante K_m 109 μ mol/L. Eine Met-Konzentration von 109 μ mol/L führt demnach zu halbmaximaler Aufnahmegeschwindigkeit.

Tab. 23: Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitete Aufnahmegeschwindigkeit für Methionin in nmol pro mg Zellprotein pro Minute

Met-Konzentration		gemessene Aufnahmegeschwindigkeit für MET	berechnete Aufnahmegeschwindigkeit für Met
mg/L	mmol/L	kBq/min/mg	nmol/mg/min
0,011	0,000074	0,69	$2,77\text{E-}03 \pm 3,33\text{E-}04$
0,11	0,00074	0,70	$2,80\text{E-}02 \pm 1,96\text{E-}03$
1,1	0,0074	0,56	$2,22\text{E-}01 \pm 2,13\text{E-}02$
2,2	0,0148	0,54	$4,31\text{E-}01 \pm 5,38\text{E-}02$
4,4	0,0296	0,44	$7,10\text{E-}01 \pm 3,55\text{E-}02$
8,8	0,059	0,38	$1,22 \pm 7,34\text{E-}02$
17,6	0,118	0,28	$1,81 \pm 1,63\text{E-}01$
35,2	0,236	0,20	$2,59 \pm 2,59\text{E-}01$

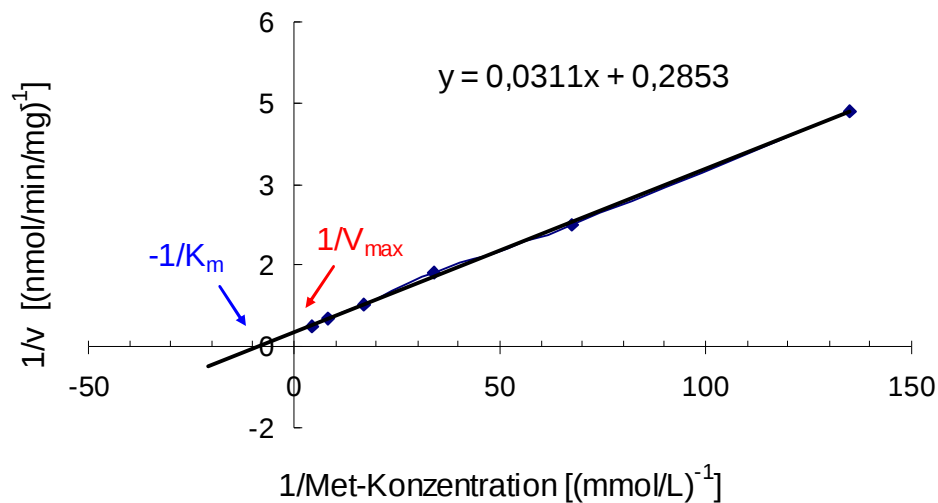


Abb. 28: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Aufnahme von Methionin in HS-683 Gliomzellen

DHL-4 Lymphomzellen

Tabelle 24 zeigt die Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitet die Aufnahmegeschwindigkeit für Met in nmol pro mg Zellprotein pro Minute bei Met-Konzentrationen von $7,4 \cdot 10^{-5}$ bis $2,3 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,011-35,2 mg/L). Abbildung 29 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm für die Met-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen. Aus der Geradengleichung ergeben sich für $V_{\max}$ 1,5 nmol/min/mg Zellprotein und für K_m 86 μ mol/L.

Tab. 24: Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitete Aufnahmegeschwindigkeit für Methionin in nmol pro mg Zellprotein pro Minute

Met-Konzentration		gemessene Aufnahmegeschwindigkeit für MET	berechnete Aufnahmegeschwindigkeit für Met
mg/L	mmol/L	kBq/min/mg	nmol/mg/min
0,011	0,000074	0,31	$1,23\text{E-}03 \pm 1,47\text{E-}04$
0,11	0,00074	0,31	$1,26\text{E-}02 \pm 1,38\text{E-}03$
1,1	0,0074	0,29	$1,16\text{E-}01 \pm 1,45\text{E-}02$
2,2	0,0148	0,26	$2,11\text{E-}01 \pm 2,74\text{E-}02$
4,4	0,0296	0,23	$3,65\text{E-}01 \pm 1,46\text{E-}02$
8,8	0,059	0,19	$6,10\text{E-}01 \pm 6,71\text{E-}02$
17,6	0,118	0,14	$8,69\text{E-}01 \pm 8,69\text{E-}02$
35,2	0,236	0,08	$1,06 \pm 9,57\text{E-}02$

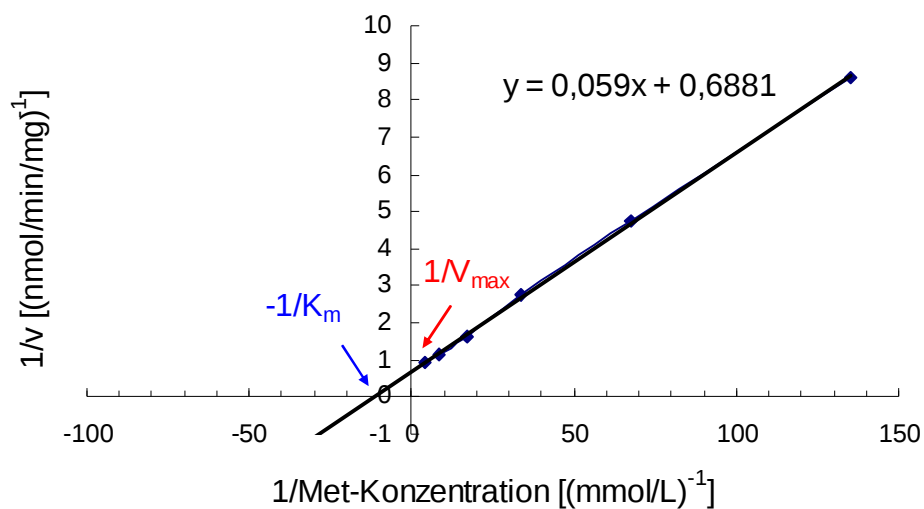


Abb. 29: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Aufnahme von Methionin in DHL-4 Lymphomzellen

Granulozyten

Tabelle 25 zeigt die Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in Granulozyten in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitet die Aufnahmegeschwindigkeit für Met in nmol pro mg Zellprotein pro Minute bei Met-Konzentrationen von $7,4 \cdot 10^{-5}$ bis $2,3 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,011-35,2 mg/L). Abb. 30 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm für die Met-Aufnahme in Granulozyten. Aus der Geradengleichung ergeben sich für $V_{\max}$ 2,3 nmol/min/mg Zellprotein und für K_m 20 $\mu\text{mol/L}$.

Tab. 25: Geschwindigkeit der MET-Aufnahme in Granulozyten in Abhängigkeit von der ethionin-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitete aufnahmegeschwindigkeit für Methionin in nmol pro mg Zellprotein pro Minute

Met-Konzentration		gemessene Aufnahmegeschwindigkeit für MET	berechnete Aufnahmegeschwindigkeit für Met
mg/L	mmol/L	kBq/min/mg	nmol/mg/min
0,011	0,000074	2,10	$8,40\text{E-}03 \pm 1,01\text{E-}03$
0,11	0,00074	2,01	$8,05\text{E-}02 \pm 8,86\text{E-}03$
1,1	0,0074	1,57	$6,28\text{E-}01 \pm 5,74\text{E-}02$
2,2	0,0148	1,27	$1,02 \pm 1,32\text{E-}01$
4,4	0,0296	0,88	$1,40 \pm 1,83\text{E-}01$
8,8	0,059	0,53	$1,71 \pm 1,19\text{E-}01$
17,6	0,118	0,32	$2,03 \pm 2,84\text{E-}01$
35,2	0,236	0,17	$2,11 \pm 2,53\text{E-}01$

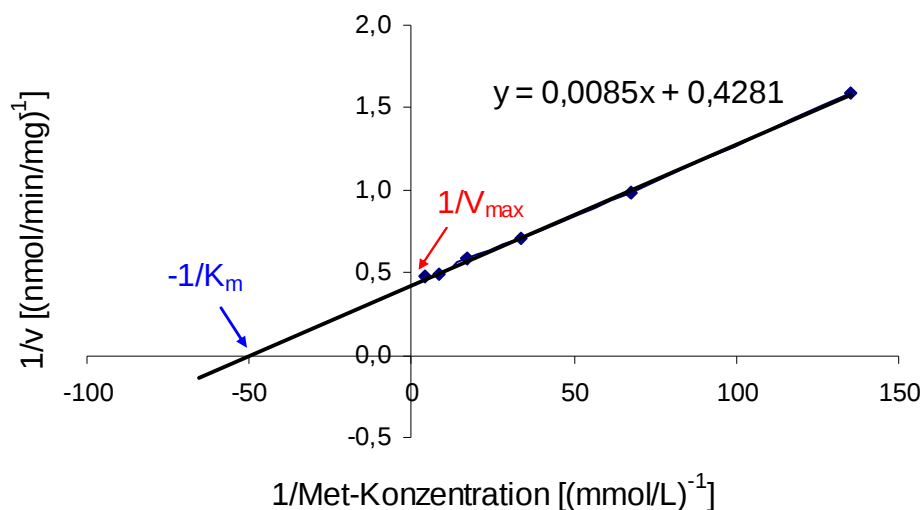


Abb. 30: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Aufnahme von Methionin in Granulozyten

5.7.2 Michaelis-Menten-Kinetik für die Aufnahme von FET

Bei allen drei Zelllinien steigt die Aufnahmegeschwindigkeit abhängig von der FET*-Konzentration gemäß einer Sättigungskinetik, die Graphen verlaufen hyperbolisch ihrem jeweiligen Grenzwert $V_{\max}$ entgegen. Während die Graphen der Tumorzellen sehr ähnlich verlaufen, unterscheidet sich die Kurve für Granulozyten vor allem durch einen deutlich geringeren Grenzwert $V_{\max}$.

Abbildung 31a zeigt die Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten bei FET*-Konzentrationen zwischen $5,5 \cdot 10^{-5}$ und $2,5 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,01-45 mg/L), Abb. 31b zeigt zur besseren Darstellung den Graphen für Granulozyten mit kleinerer Skalierung.

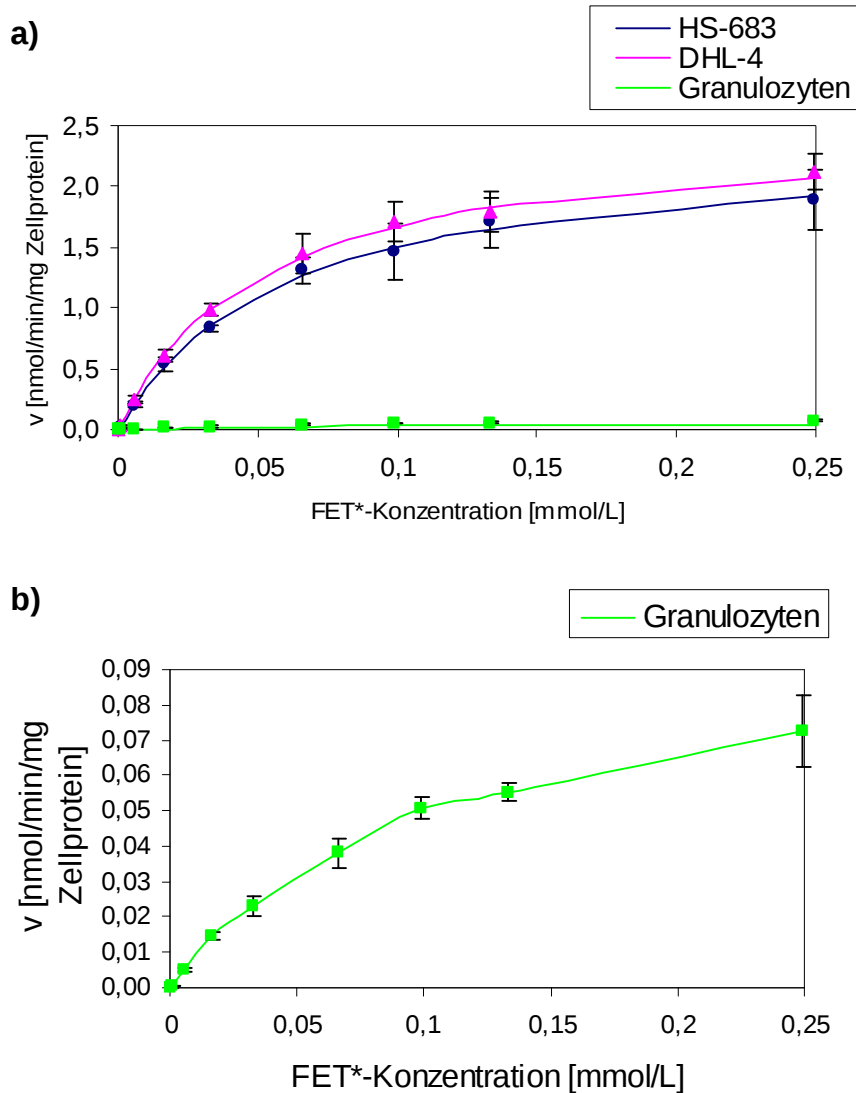


Abb. 31: Michaelis-Menten-Kinetik für die Aufnahme von FET a) in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten, b) mit kleinerer Skalierung für Granulozyten

Bestimmung von $V_{\max}$ und K_m in Lineweaver-Burk-Diagrammen

Die reziproken Werte für FET*-Konzentration ($1/\text{FET}^*\text{-Konzentration}$) und Aufnahmegeschwindigkeit ($1/v$) wurden in Lineweaver-Burk-Diagramme eingetragen. Aus der Geradengleichung wurden $-1/K_m$ und $1/V_{\max}$ als Schnittpunkte des Graphen mit der x- bzw. y-Achse berechnet.

HS-683 Gliomzellen

In Tabelle 26 ist die Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitet die Aufnahmegeschwindigkeit für FET* in nmol pro mg Zellprotein pro Minute bei FET*-Konzentrationen von $5,5 \cdot 10^{-5}$ bis $2,5 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,01-45 mg/L) wiedergegeben. Abb. 32 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm für die FET*-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen. Aus der Geradengleichung

ergibt sich als maximale Aufnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ 2,46 nmol/min/mg Zellprotein und für die Michaelis-Konstante K_m 61,5 $\mu\text{mol/L}$.

Tab. 26: Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitete Aufnahmegeschwindigkeit für FET* in nmol pro mg Zellprotein pro Minute

FET*-Konzentration		Gemessene Aufnahmegeschwindigkeit Für FET	Berechnete Aufnahmegeschwindigkeit für FET*
mg/L	mmol/L	kBq/mg/min	nmol/mg/min
0,01	0,000055	72,16	$2,15\text{E-}03 \pm 2,15\text{E-}04$
0,1	0,00055	69,39	$2,06\text{E-}02 \pm 2,68\text{E-}03$
1	0,0055	67,56	$2,01\text{E-}01 \pm 2,81\text{E-}02$
3	0,0165	60,18	$5,37\text{E-}01 \pm 5,90\text{E-}02$
6	0,033	46,94	$8,37\text{E-}01 \pm 2,51\text{E-}02$
12	0,066	36,59	$1,31 \pm 1,05\text{E-}01$
18	0,099	27,34	$1,46 \pm 2,34\text{E-}01$
24	0,133	23,82	$1,71 \pm 2,05\text{E-}01$
45	0,249	14,11	$1,89 \pm 2,46\text{E-}01$

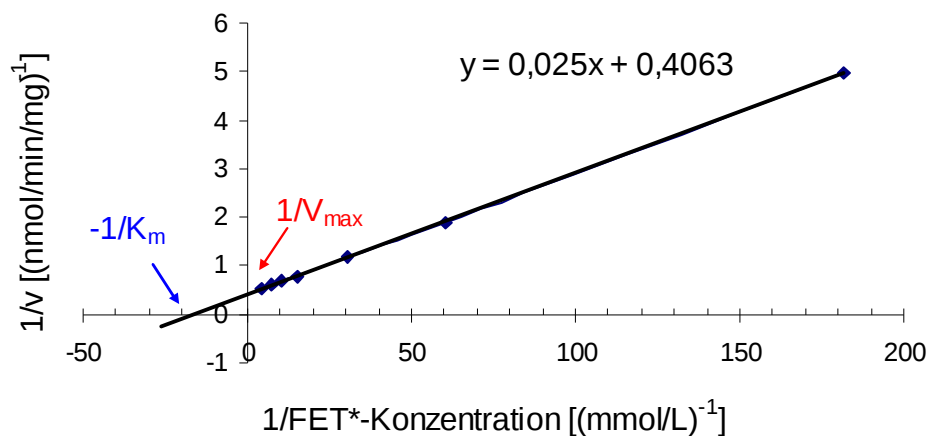


Abb. 32: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Aufnahme von FET* in HS-683 Gliomzellen

DHL-4 Lymphomzellen

Tabelle 27 zeigt die Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitet die Aufnahmegeschwindigkeit für FET* in nmol pro mg Zellprotein pro Minute bei FET*-Konzentrationen von $5,5 \cdot 10^{-5}$ bis $2,5 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,01-45 mg/L). Abbildung 33 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm für die FET*-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen. Aus der Geradengleichung ergeben sich für $V_{\max}$ 2,51 nmol/min/mg Zellprotein und für K_m 50 $\mu\text{mol/L}$.

Tab. 27: Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitete Aufnahmegeschwindigkeit für FET* in nmol pro mg Zellprotein pro Minute

FET*-Konzentration		gemessene Aufnahmegeschwindigkeit für FET	berechnete Aufnahmegeschwindigkeit für FET*
mg/L	mmol/L	kBq/mg/min	nmol/mg/min
0,01	0,000055	95,16	$2,83\text{E-}03 \pm 3,40\text{E-}04$
0,1	0,00055	86,93	$2,58\text{E-}02 \pm 3,36\text{E-}03$
1	0,0055	83,32	$2,48\text{E-}01 \pm 2,73\text{E-}02$
3	0,0165	68,52	$6,11\text{E-}01 \pm 4,89\text{E-}02$
6	0,033	55,16	$9,84\text{E-}01 \pm 4,92\text{E-}02$
12	0,066	40,68	$1,45 \pm 1,59\text{E-}01$
18	0,099	31,97	$1,71 \pm 1,71\text{E-}01$
24	0,133	24,89	$1,79 \pm 1,61\text{E-}01$
45	0,249	15,82	$2,13 \pm 1,49\text{E-}01$

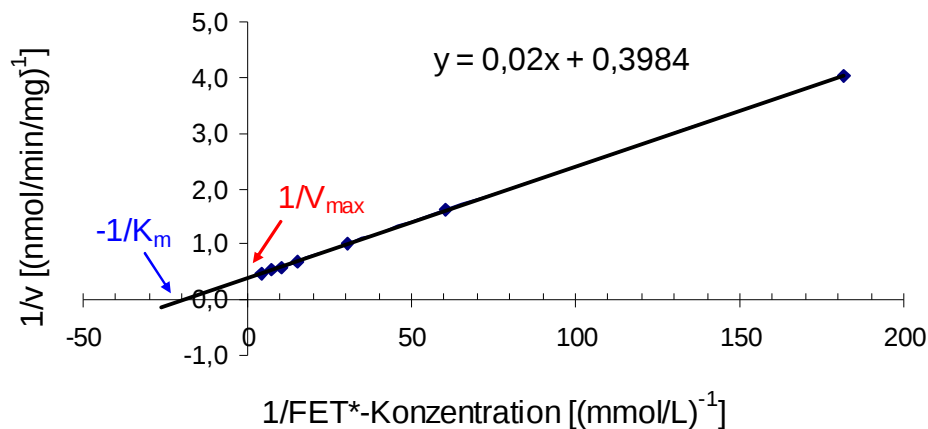


Abb. 33: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Aufnahme von FET* in DHL-4 Lymphomzellen

Granulozyten

Tabelle 28 zeigt die Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in Granulozyten in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitet die Aufnahmegeschwindigkeit für FET* in nmol pro mg Zellprotein pro Minute bei FET*-Konzentrationen von $5,5 \cdot 10^{-5}$ bis $2,5 \cdot 10^{-1}$ mmol/L (0,01-45 mg/L). Abbildung 34 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm für die FET*-Aufnahme in Granulozyten. Anhand der Geradengleichung ergeben sich für $V_{\max}$ 0,1 nmol/min/mg Zellprotein und für K_m 95 $\mu\text{mol/L}$.

Tab. 28: Geschwindigkeit der FET-Aufnahme in Granulozyten in Abhängigkeit von der FET*-Konzentration in kBq pro mg Zellprotein pro Minute und daraus abgeleitete Aufnahmegeschwindigkeit für FET* in nmol pro mg Zellprotein pro Minute

FET*-Konzentration		gemessene Aufnahmegeschwindigkeit für FET	berechnete Aufnahmegeschwindigkeit für FET*
mg/L	mmol/L	kBq/mg/min	nmol/mg/min
0,01	0,000055	1,91	$5,77\text{E-}05 \pm 7,50\text{E-}06$
0,1	0,00055	1,76	$5,31\text{E-}04 \pm 5,31\text{E-}05$
1	0,0055	1,75	$5,22\text{E-}03 \pm 4,70\text{E-}04$
3	0,0165	1,66	$1,46\text{E-}02 \pm 1,02\text{E-}03$
6	0,033	1,32	$2,31\text{E-}02 \pm 3,00\text{E-}03$
12	0,066	1,10	$3,82\text{E-}02 \pm 4,20\text{E-}03$
18	0,099	0,96	$5,07\text{E-}02 \pm 3,04\text{E-}03$
24	0,133	0,78	$5,54\text{E-}02 \pm 2,77\text{E-}03$
45	0,249	0,55	$7,28\text{E-}02 \pm 1,02\text{E-}02$

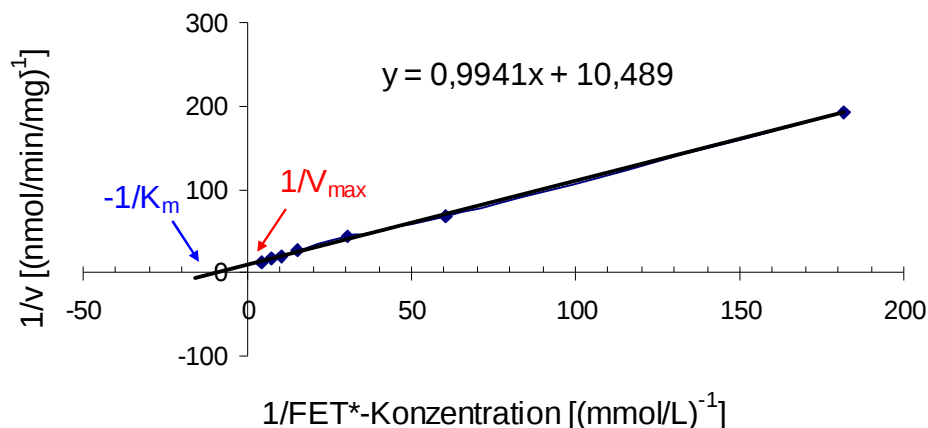


Abb. 34: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Aufnahme von FET* in Granulozyten

5.7.3 Vergleich der Aufnahmekinetiken für MET und FET

Für die Methioninaufnahme in Granulozyten ergab sich mit K_m 20 $\mu\text{mol/L}$ eine um den Faktor 5 bzw. 4,3 größere Affinität als bei den Gliom- und Lymphomzellen mit K_m 109 bzw. 86 $\mu\text{mol/L}$. Die größte Kapazität für die Aufnahme von Methionin hatten HS-683 Gliomzellen mit $V_{\max}$ 3,5 nmol/mg/min, gefolgt von Granulozyten mit $V_{\max}$ 2,3 nmol/mg/min und DHL-4 Lymphomzellen mit $V_{\max}$ 1,5 nmol/mg/min.

Bei der Aufnahme von FET* war die Affinität der Gliom- und Lymphomzellen mit K_m 61,5 bzw. 50 $\mu\text{mol/L}$ um den Faktor 1,6 bzw. 1,9 größer als bei Granulozyten mit K_m 95 $\mu\text{mol/L}$. Die Kapazitäten für die FET*-Aufnahme lagen bei den Gliom- und Lymphomzellen mit $V_{\max}$ 2,4 bzw. 2,5 nmol/mg/min im gleichen Bereich, und waren um den Faktor 25 größer als für die FET*-Aufnahme in Granulozyten mit $V_{\max}$ 0,1 nmol/mg/min. Tabelle 32 zeigt im Vergleich die Michaelis-Konstanten (K_m) und

maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten ($V_{\max}$) für die Aufnahme von Methionin und FET* in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten.

Tab. 32: K_m und $V_{\max}$ für die Aufnahme von Methionin und FET* in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten.

	Methionin		FET*	
	K_m [$\mu\text{mol/L}$]	$V_{\max}$ [nmol/min/mg Zellprotein]	K_m [$\mu\text{mol/L}$]	$V_{\max}$ [nmol/min/mg Zellprotein]
HS-683 Gliomzellen	109	3,5	61,5	2,4
DHL-4 Lymphomzellen	86	1,5	50	2,5
Granulozyten	20	2,3	95	0,1

6. DISKUSSION

Beim Vergleich der Aufnahme von MET und FET in Gliomzellen, Lymphomzellen und Granulozyten wurde FET auf zellulärer Ebene als geeigneter Tracer zur Differenzierung von Tumor und Entzündung bestätigt. Während bei Granulozyten die MET-Aufnahme sogar höher war als bei den untersuchten Tumorzellen, war die Aufnahme von FET um ein Vielfaches geringer als bei den untersuchten Tumorzellen. Die Charakterisierung der Aufnahmemechanismen ergab Unterschiede in der Aufnahme von MET und FET in Granulozyten und Tumorzellen, die auf eine unterschiedliche Beteiligung verschiedener Membrantransporter hinweisen und insbesondere einen Mangel spezifischer FET-Transporter bei Granulozyten nahelegen.

Die Differenzierung von neoplastischen und entzündlichen Veränderungen ist eine entscheidende Fragestellung in der Tumordiagnostik, die durch bildgebende Verfahren wie Ultraschall, CT und MRT oft nicht mit hinreichender Sicherheit geklärt werden kann. Auch bei der Tumordiagnostik mittels PET stellt die Anreicherung vieler Tracer in Entzündungsgewebe ein bekanntes Problem dar. Der am häufigsten verwendete PET-Tracer [^{18}F]Fluor-2-Deoxy-D-Glukose (FDG) wird in bestimmten Fragestellungen mit hoher Sensitivität zur Diagnostik maligner Erkrankungen eingesetzt, ist aber kein spezifischer Tumortracer. Insbesondere eignet sich FDG nicht zur Differenzierung von Neoplasie und Entzündung. Die FDG-Aufnahme maligner Tumore und entzündlicher Veränderungen kann im gleichen Bereich liegen, was zu falsch positiven PET-Befunden in der onkologischen Diagnostik führt. Eine Vielzahl klinischer Beispiele belegt diese Problematik (siehe Literaturübersicht).

Bereits seit langem ist bekannt, dass bei malignen Zellen nicht nur der Glukosemetabolismus, sondern auch die Aufnahme und Metabolisierung von Aminosäuren gesteigert sind [Warburg 1956]. In zahlreichen Studien konnte bereits der Nutzen von radioaktiv markierten Aminosäuren als PET Tracer gezeigt werden, insbesondere zur Diagnostik von Hirntumoren [Langen et al. 1997], aber auch von peripheren Tumoren wie Lymphomen, Lungentumoren und Brustkrebs [Nettelbladt et al. 1998], [Leskinen-Kallio et al. 1991a/b]. Einige Studien zeigten, dass manche Aminosäuretracer geringer in Entzündungsgewebe angereichert werden als FDG [Rau et al. 2002], [Jager et al. 2001], [Kubota et al. 1995], [Kubota et al. 1989].

Der zurzeit am häufigsten eingesetzte Aminosäure-Tracer ist L-[^{11}C]-Methionin (^{11}C -Met), dessen Eignung als hochsensitiver Tumortracer bereits in vielen Studien belegt ist. In bestimmten Fragestellungen wie z. B. der Diagnostik von Hirntumoren erwies sich ^{11}C -Met als vorteilhaft gegenüber FDG. Allerdings ist auch mit Hilfe von ^{11}C -Met keine sichere Differenzierung von Tumoren und entzündlichen Veränderungen möglich [Rau et al. 2002], [Yasukawa et al. 2000], [Yamada et al. 1998]. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ^{11}C von nur 20 Minuten ist der Einsatz zudem auf PET-Zentren mit eigenem Zyklotron beschränkt.

Da ^{18}F mit einer Halbwertszeit von 109 Minuten technische und logistische Vorteile bietet, wurden bereits mehrere ^{18}F -markierte Aminosäurederivate entwickelt und auf ihre Eignung als Tumortracer untersucht. Das Tyrosin-Derivat O-(2-[^{18}F]Fluorethyl-L-Tyrosin FET erwies sich als besonders viel versprechend: FET wird von malignen Tumoren und Tumorzellen stark angereichert bei zugleich fehlender oder geringer Anreicherung in nicht-maligne Gewebe und Zellen [Kaim et al. 2002a], [Rau et al. 2002], [Weber et al. 2000], [Wester et al. 1999]. FET könnte somit eine Differenzierung von malignen und entzündlichen Veränderungen ermöglichen [Rau et al. 2002].

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme von MET und FET auf zellulärer Ebene an HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und humanen Granulozyten untersucht und die beteiligten Transportmechanismen charakterisiert. Folgende Aspekte wurden dabei analysiert: Vergleich der aufgenommenen Tracermenge, Auswirkung einer Stimulation mit LPS auf die Aufnahme in Granulozyten, Hemmbarkeit der Traceraufnahme durch kompetitive Hemmstoffe, pH-Abhängigkeit, Sättigbarkeit und Aufnahmekinetik.

Aufgrund unserer Ergebnisse lässt nur FET, nicht aber Methionin eine eindeutige Unterscheidung von Granulozyten und Tumorzellen zu. Nach 15 Minuten Inkubationszeit betrug die Met-Aufnahme in Granulozyten $15,1 \mu\text{g}$ pro mg Zellprotein und war damit mehr als doppelt so groß wie bei DHL-4 Lymphomzellen mit $6,35 \mu\text{g}$ pro mg Zellprotein und fünfmal so groß wie bei HS-683 Gliomzellen mit $2,8 \mu\text{g}$ pro mg Zellprotein. Pro Zelle betrug die Aufnahme in HS-683 Gliomzellen $275 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}$, in Granulozyten $125 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}$ und in DHL-4 Lymphomzellen $90 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}$. Die unterschiedliche Reihenfolge beim Bezug der Methioninaufnahme pro mg Zellprotein oder pro Zelle kommt durch die unterschiedlichen Zellgrößen und den unterschiedlichen Proteingehalt der verschiedenen Zelllinien zustande. Bemerkenswert ist aber, dass Granulozyten trotz ihrer geringeren Größe mehr Methionin pro Zelle aufnahmen als DHL-4 Lymphomzellen. Stimulation der Granulozyten mit LPS führte zu

einer weiteren Steigerung der Methioninaufnahme um den Faktor 1,85 gegenüber unstimulierten Granulozyten.

Die Beobachtung, dass Granulozyten in hohem Maß Methionin anreichern, steht in Übereinstimmung mit zahlreichen experimentellen und klinischen Studien, die ebenfalls eine starke Methioninanreicherung in Entzündungsgewebe und –zellen beschreiben [Rau et al. 2002], [Yasukawa et al. 2000], [Yamada et al. 1998], [Kubota et al. 1990]. Eine vermehrte Methioninanreicherung wird unter anderem für Gehirn-, Mamma- und Lungenabszesse, Pneumonien, Lungengranulome und Aspergillome [Nettelbladt et al. 1998], [Dethy et al. 1995], [Ishii et al. 1993], [Kubota et al. 1990] beschrieben. Entzündlich veränderte Lymphknoten nahmen im Tierexperiment mehr Methionin auf als metastasierte Lymphknoten [Rau et al. 2002] und können zu falsch-positiven Ergebnissen beim Lymphknotenstaging mit Methionin führen. Experimentell erzeugte bakterielle Infektionen und in Folge dessen reaktiv veränderte Lymphknoten zeigten eine zwei- bis dreifach erhöhte Methionin-Anreicherung [Sugawara et al. 1999], [Wahl & Fisher 1993]. Im Kontrast dazu stehen einige Publikationen, in denen nur eine sehr niedrige Methioninanreicherung in Entzündungsgewebe [Kubota et al. 1989] und insbesondere keine vermehrte Anreicherung in makrophagen- und granulozytenreiche Gewebe [Reinhardt et al. 1997], [Kubota et al. 1995] beschrieben wird.

Das Ergebnis der starken Methioninaufnahme in Granulozyten erklärt die Anreicherung von Methionin in akute Entzündungen und Abszesse. Darüber hinaus wird aber auch eine starke Anreicherung von Methionin bei chronischen Entzündungsreaktionen wie z. B. in Sarkoidosegranulomen [Yamada et al. 1998] beschrieben. Rau et al. beobachteten bei chronischer Lymphadenitis sogar eine etwas stärkere Methioninanreicherung als bei akuter Lymphadenitis [Rau et al. 2002], was die Beteiligung weiterer Entzündungszellen wie Lymphozyten und Makrophagen an der Methioninaufnahme in Entzündungsgewebe annehmen lässt. Beim direkten Vergleich der Methioninaufnahme in Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen in unserer Arbeitsgruppe ergab sich die stärkste Methioninaufnahme für Granulozyten, gefolgt von Lymphozyten und Makrophagen. Auch die Methioninaufnahme in Lymphozyten und Makrophagen war dabei jedoch deutlich größer als bei den im Vergleich untersuchten Kolonkarzinom- und Lymphomzellen [Stöber et al. 2006].

FET wurde in dieser Arbeit von beiden untersuchten Tumorzelllinien erheblich stärker angereichert als von Granulozyten. Nach 15 Minuten Inkubationszeit hatten DHL-4 Lymphomzellen 3,18 µg FET pro mg Zellprotein und HS-683 Gliomzellen 0,67 µg FET

pro mg Zellprotein aufgenommen. Die FET-Aufnahme in Granulozyten betrug mit 0,12 µg/mg Zellprotein weniger als 1/5 der Aufnahme in HS-683 Gliomzellen und lediglich 1/26 der Aufnahme in DHL-4 Lymphomzellen. Wird die Traceraufnahme pro Zelle verglichen, so fällt der Unterschied noch deutlicher aus: Pro Zelle betrug die FET-Aufnahme $49 \cdot 10^{-8}$ µg bei den Lymphomzellen und $65 \cdot 10^{-8}$ µg bei den Gliomzellen. Die FET-Aufnahme in Granulozyten betrug $1 \cdot 10^{-8}$ µg pro Zelle. Im Vergleich dazu war die Aufnahme der Gliomzellen um den Faktor 65, die der Lymphomzellen um den Faktor 49 größer. Die Stimulation von Granulozyten mit LPS hatte im Unterschied zu Methionin keinen Einfluss auf die FET-Aufnahme.

Der direkte Vergleich mit weiteren Entzündungszellen ergab eine stärkere FET-Anreicherung in stimulierte Lymphozyten und Makrophagen als in Granulozyten. Dennoch war die FET-Aufnahme aller Entzündungszellen im Vergleich zu Kolonkarzinom- und Lymphomzellen deutlich geringer [Stöber et al. 2006]. Verschiedene Studien zeigen für FET eine bessere Spezifität bei der Differenzierung von Tumor und Entzündung als für FDG und Methionin [Tang et al. 2003], [Rau et al. 2002], [Kaim et al. 2002], [Weber et al. 2000]. Während die starke FDG-Anreicherung in bakteriellen Abszessen mit dem Auftreten aktivierter Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten korreliert, ist die FET-Aufnahme in der Abszesswand sogar geringer als im gesunden Kontrollgewebe (kontralateraler Muskel) [Kaim et al. 2002]. Auch im makrophagenreichen Gewebe zerebraler Strahlennekrosen wird FET im Gegensatz zu FDG nicht angereichert [Spaeth et al. 2004]. Die FET-Aufnahme wird offenbar durch die Aktivierung von Entzündungszellen nicht beeinflusst, während die Glukoseaufnahme auf das bis zu 50-fache ansteigt [Kaim et al. 2002]. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen für die Stimulation von Granulozyten mit LPS. Im Unterschied zu FDG und Methionin, die sich sowohl in akut, als auch in chronisch entzündlich veränderten Lymphknoten anreichern, soll mit Hilfe von FET eine sichere Differenzierung neoplastisch und entzündlich veränderter Lymphknoten möglich sein [Rau et al. 2002]. Bis auf eine Studie von Floeth et al, die eine FET-Anreicherung in zerebrale Abszesse beschreibt [Floeth et al. 2006] bestätigen alle bisherigen Studien die fehlende FET-Anreicherung in Entzündungszellen und -gewebe. Allerdings kann möglicherweise eine Störung der Blut-Hirn-Schranke zu einer FET-Anreicherung in nicht-maligne Hirnläsionen führen [Spaeth et al. 2004]. Spaeth beschreibt eine geringe FET-Anreicherung in experimentellen Strahlennekrosen, die ausschließlich durch die Schrankenstörung bedingt ist. Im Gegensatz dazu werden andere Tracer wie FDG zusätzlich von Entzündungszellen angereichert [Spaeth et al. 2004]. Auch bei Hirntumor-Patienten zeigen posttherapeutische benigne Veränderungen

eine leicht gesteigerte Aufnahme von FET, die auf die passive Aufnahme bei gestörter Blut-Hirn-Schranke zurückgeführt wird [Pöpperl et al. 2004]. Die Akkumulation von FET in Hirntumoren liegt jedoch in erheblich höheren Bereichen [Langen et al. 2003], [Pauleit et al. 2003], [Weber et al. 2000] als die durch die Schrankenstörung bedingte Anreicherung, sodass eine quantitative Bewertung der FET-Aufnahme dennoch eine sichere Differenzierung erlauben kann. Weckesser sieht hingegen eine eingeschränkte Spezifität bei Hirnläsionen mit mäßiger FET-Anreicherung, da eine Überlappung der FET-Aufnahme von niedrig-malignen Tumoren und entzündlichen Veränderungen wie Enzephalitis bestehen könne [Weckesser et al. 2005].

Die fehlende FET-Anreicherung in Entzündungszellen, die in dieser Arbeit für Granulozyten bestätigt wurde, spricht für eine Eignung von FET zur Differenzierung von malignen und entzündlichen Veränderungen. Ob sich FET tatsächlich als spezifischer Tumortracer im klinischen Einsatz bewährt, hängt von vielen weiteren Faktoren, insbesondere von der Sensitivität für maligne Tumoren ab. Mehrere Studien beschreiben eine starke Anreicherung und hohe diagnostische Genauigkeit von FET bei malignen Hirntumoren [Weckesser et al. 2005], [Pauleit et al. 2004], [Messing-Jünger et al. 2002], [Pauleit et al. 2002], [Weber et al. 2000]. Bei Patienten mit suspekten primären oder rezidivierenden Hirntumoren zeigt sich eine enge Korrelation zwischen der FET- und ^{11}C -Met-Aufnahme [Weber et al. 2000]. Autoradiographische Untersuchungen an experimentellen Rattengliomen und Gliomzellen bestätigen dies [Langen et al. 2003], sodass FET eine geeignete Alternative zu Methionin bei der Untersuchung von Hirntumoren darstellen könnte. Auch im direkten Vergleich von FET-PET und SPECT mit 3- ^{123}I -Jod- α -Methyl-L-Tyrosin (IMT) bei der Primärdiagnostik von Hirntumoren zeigt sich eine starke Korrelation [Pauleit et al. 2004]. Der Kontrast zwischen Tumor und gesundem Gehirn, sowie die Darstellung anatomischer Strukturen sind in der FET-PET besser als in der IMT-SPECT. FET-PET ist der SPECT insbesondere bei der Detektion von niedrig malignen Hirntumoren überlegen [Pauleit et al. 2004]. Allerdings werden für beide Tracer übereinstimmende falsch-negative und falsch-positive Resultate beschrieben [Pauleit et al. 2004]. Bei zerebralen Gliomen werden für die FET-PET Sensitivitäten von 93%-100% und Spezifitäten von 88%-94% angegeben. Die diagnostische Genauigkeit erhöht sich durch die Kombination von FET-PET und MRT bzw. Magnet-Resonanz-Spektroskopie (MRS) auf 97%-98% gegenüber MRT allein (68%-80%) [Floeth et al. 2005], [Pauleit et al. 2005b]. FET-PET ist bei der Planung stereotaktischer Biopsien bei suspekten Astrozytomen der MRT überlegen [Messing-Jünger et al. 2002].

Obgleich eine Korrelation der FET-Aufnahme mit dem histologischen Grading maligner Hirntumore beschrieben wird, reicht diese nicht aus, um anhand der FET-PET Aussagen über das Grading machen zu können [Pöpperl et al. 2004], [Weckesser et al. 2005]. FDG und MET, aber auch die Beurteilung der Kontrastmittelanreicherung in CT und MRT scheinen diesbezüglich überlegen zu sein. Da Unterschiede in der Kinetik von niedrig- und hochmalignen Gliomen festzustellen sind, die auf die unterschiedlich starke Schrankenstörung zurückgeführt werden, könnte eine Analyse der Aufnahmekinetik jedoch zusätzliche Informationen zur Differenzierung suspekter Befunde liefern [Pöpperl et al. 2006a], [Weckesser et al. 2005].

Zum Einsatz von FET in der Diagnostik peripherer Tumoren gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Eine starke FET-Aufnahme wird in xenotransplantierten humanen Mammakarzinomen und SW707 Kolon-Karzinomen beschrieben [Wester et al. 1999], [Heiss et al. 1999]. Ebenso konnten murine T-Zell-Lymphommetastasen mit hoher Sensitivität dargestellt werden [Rau et al. 2002]. Auch in dieser Arbeit reicherten beide untersuchten Tumor-Zelllinien FET stark an. Eine klinische Studie an Patienten mit verschiedenen peripheren Tumoren ergab hingegen, dass sich FET nicht zur allgemeinen Diagnostik peripherer Tumoren eignet, da lediglich Plattenepithelkarzinome mit guter Sensitivität dargestellt werden können [Pauleit et al. 2005a]. Hochmaligne Non-Hodgkin Lymphome, Kolorektale Karzinome, Pankreaskarzinome, Ovarialkarzinome und Prostata-Karzinome reicherten FET im Gegensatz zu FDG nicht verstärkt an [Pauleit et al. 2005a]. Bei Plattenepithel-Karzinomen soll die Sensitivität von FET und FDG jedoch gleich gut sein, mit dem Unterschied, dass FET eine Differenzierung zwischen Plattenepitheltumoren und entzündlichen Veränderungen erlaubt [Pauleit et al. 2005a]. Ob sich FET zur Diagnostik peripherer Tumoren eignet, erfordert somit weiterer Abklärung sowohl auf zellulärer Ebene als auch in der klinischen Nutzung.

Die absolute Aufnahme von FET ist sowohl in neoplastischen als auch in nicht-neoplastischen Veränderungen kleiner als die Aufnahme von FDG und Methionin [Pauleit et al. 2005a], [Weber et al. 2000]. Während Weber den Tumor/Gehirn-Kontrast mit FET als gleichwertig mit Methionin bezeichnet [Weber et al. 2000], macht Pauleit den im Vergleich zu FDG schlechteren Kontrast zum Hintergrund verantwortlich für die geringere Sensitivität von FET bei kleinen Läsionen [Pauleit et al. 2005a]. Auch in den von uns untersuchten Tumorzellen war die absolute Menge an zellulär aufgenommenem FET nach 15-minütiger Inkubation geringer als die Anreicherung von MET. HS-683 Gliomzellen reicherten viermal so viel, DHL-4 Lymphomzellen doppelt

sowie MET wie FET an. Im Unterschied zu Methionin wird zellulär aufgenommenes FET nicht in Proteine oder andere Makromoleküle eingebaut [Heiss et al. 1999], sodass ein stärkerer Auswärtstransport mit verantwortlich für die geringere FET-Akkumulation sein könnte.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Anreicherung von MET und FET in Tumorzellen und Granulozyten ist die unterschiedliche Beteiligung verschiedener Aminosäuretransporter. Aminosäuren werden über spezifische Transportsysteme zellulär aufgenommen. Traditionell werden diese anhand ihrer Substratspezifität und anderer physiologischer Eigenschaften eingeteilt. Neuere Klassifikationen orientieren sich hingegen an genetischen und molekularen Strukturen. Die wichtigsten Transportsysteme für neutrale Aminosäuren sind das A-, das L- und das ASC-System. Die Transportsysteme A und ASC sind sekundär aktive, natriumabhängige Transporter für neutrale Aminosäuren mit kurzen linearen und polaren Seitenketten. Über das ASC-System werden bevorzugt kleine Aminosäuren wie Alanin, Serin und Cystein transportiert. N-monomethylierte Aminosäurederivate wie MeAIB haben im Unterschied zu System A keinen Einfluss auf System ASC. Verzweigte und aromatische, aber auch langkettige Aminosäuren werden über System L zellulär aufgenommen. Durch den Einsatz kompetitiver Inhibitoren wurde der jeweilige Anteil der drei Transportsysteme an der zellulären Aufnahme von MET und FET bestimmt. Als Hemmstoffe wurden MeAIB als spezifischer Hemmstoff für System A, BCH als Hemmstoff für System L und L-Serin als Hemmstoff für System ASC eingesetzt.

Die Methionin-Aufnahme wurde bei allen Zellen am stärksten durch BCH gehemmt, und zwar um 58% bei HS-683 Gliomzellen, um 68% bei DHL-4 Lymphomzellen und um 36% bei Granulozyten. Auch in Anwesenheit von L-Serin verringerte sich die Methionin-Aufnahme um 46% bei HS-683 Gliomzellen, um 60% bei DHL-4 Lymphomzellen und um 20% bei Granulozyten, während MeAIB weder bei den Tumorzellen noch bei Granulozyten einen Einfluss auf die Met-Aufnahme hatte.

Unsere Ergebnisse stimmen weitgehend überein mit den Resultaten von Langen et al. zur Methionin-Aufnahme in F98 Rattengliomzellen [Langen et al. 2003]. Auch dort wird eine starke Hemmwirkung sowohl durch BCH als auch durch Serin beschrieben. Während viele Autoren BCH als spezifischen Hemmstoff für das L-System beschreiben, weist Langen darauf hin, dass BCH auch das natriumabhängige Transportsystem B⁰⁺ inhibiert [Langen et al. 2003], [Sloan & Mager 1999], sodass BCH nur in Abwesenheit von Natrium als spezifisch für das L-System gelten kann. Der Anteil

der BCH-hemmbaren Methioninaufnahme kann demnach durch Transporter vom L-Typ aber auch vom $B^{0,+}$ -Typ zustande kommen. Eine Unterscheidung könnte durch die Untersuchung der Natriumabhängigkeit erfolgen. Ebenso muss die Hemmwirkung von L-Serin nicht zwingend eine Beteiligung des ASC-Systems bedeuten, da auch L-Serin andere Transportsysteme wie das L-, das $B^{0,+}$ -, und das asc-System beeinflussen kann [Langen et al. 2003], [Young et al. 1988]. Im Gegensatz zum L-System Subtyp LAT1, der bevorzugt langkettige und aromatische Aminosäuren transportiert, ist LAT2 gekennzeichnet durch eine breitere Substratspezifität, die sowohl große Aminosäuren wie Methionin und Tyrosin, als auch kleine Aminosäuren wie Serin umfasst [Segawa et al. 1999]. Der Einfluss von L-Serin auf die Methioninaufnahme kann also durch eine Beteiligung von ASC-Transportern, möglicherweise aber auch durch eine Beteiligung von LAT2-, $B^{0,+}$ - oder asc-Transportern bedingt sein. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Methioninaufnahme in Granulozyten weniger Serin-empfindlich war als die Aufnahme in Tumorzellen.

Während die Kombination aller drei Hemmstoffe bei den Tumorzellen zu einer Reduktion der Methioninaufnahme um mehr als 85% führte, fiel bei den Granulozyten ein sehr hoher Anteil unspezifischer Methioninaufnahme von 47% auf. Dahinter können mit den verwendeten Hemmstoffen nicht hemmbare Transportsysteme stehen wie z. B. das γ^+L -System, dem ebenfalls eine hohe Affinität für Methionin zugeschrieben wird [Devés et al. 1998] (siehe Literaturübersicht) oder auch unspezifische Aufnahmemechanismen wie Endozytose oder Diffusion.

In der Literatur werden unterschiedliche Transportsysteme für den Methionin-Transport angegeben, wobei sowohl natriumabhängige als auch natriumunabhängige Mechanismen beteiligt sind. Je nach Gewebe sollen die Transportsysteme L und A zu unterschiedlichen Anteilen an der Methioninaufnahme beteiligt sein [Christensen 1990], [Oxender & Christensen 1963]. Auf das ASC-System soll Methionin inhibitorisch wirken, ohne jedoch selbst in größerem Umfang transportiert zu werden [Christensen et al. 1967]. Auch die Systeme γ^+L und $B^{0,+}$ zeigen unter anderem eine hohe Affinität für Methionin [Devés et al. 1998], [Sloan & Mager 1999]. Im Allgemeinen gilt jedoch System L als wichtigstes Transportsystem für Methionin [Verrey 2003], [Christensen 1990], [Derlon et al. 1989]. Auch in humanen Gliomzellen wird Methionin vorwiegend über das natriumunabhängige L-System aufgenommen [Langen et al. 2000]. Die natriumabhängige Methioninaufnahme in Gliomzellen schreibt Langen vorwiegend dem $B^{0,+}$ -System zu [Langen et al. 2003]. Nicht aktivierte Lymphozyten sollen Methionin vorwiegend natriumunabhängig über System L aufnehmen [Scanlon et al. 1983],

mitogen aktivierte Lymphozyten zeigen hingegen eine 4-8-fach erhöhte natriumabhängige Methioninaufnahme [Walls et al. 1984], die dem A-System zugeschrieben wird.

Die FET-Aufnahme von HS-683 Gliomzellen und DHL-4 Lymphomzellen wurde sowohl durch BCH als auch durch Serin im Vergleich zur ungehemmten Aufnahme um über 90% gesenkt, während MeAIB keinen Einfluss auf die FET-Aufnahme hatte. Der starke Einfluss von BCH weist auf eine wichtige Rolle von L-Transportern an der FET-Aufnahme hin. Es gelten allerdings dieselben Einschränkungen für die Spezifität von BCH wie bereits im Zusammenhang mit Methionin erwähnt. Die langkettige, aromatische Struktur von FET lässt eine hohe Affinität zu L-Typ Transportern erwarten. Unerwartet ist hingegen der starke Einfluss von L-Serin auf die FET-Aufnahme. Eine größere Beteiligung des ASC-Systems am FET-Transport erscheint eher unwahrscheinlich, da FET als langkettige aromatische Aminosäure nicht zu den bevorzugten Substraten dieses Systems für kurze aliphatische Aminosäuren zählt.

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Langen et al. zur FET-Aufnahme in F98 Rattengliomzellen weitgehend überein. Wie bei MET wird dort der starke Einfluss von Serin mit einer möglichen Beteiligung des natriumabhängigen Systems B⁰⁺ begründet, das sowohl durch BCH als auch durch Serin inhibiert wird [Langen et al. 2003]. Der gleichermaßen starke Einfluss von BCH und Serin kann jedoch auch mit einer maßgeblichen Rolle von LAT2-Transportern an der FET-Aufnahme der Tumorzellen begründet werden, deren Substratspektrum sowohl BCH und aromatische Aminosäuren, als auch kurzkettige Aminosäuren wie Serin umfasst [Segawa et al. 1999]. Die FET-Aufnahme in Granulozyten wurde durch BCH um 40% reduziert, die Hemmwirkung von Serin betrug lediglich 20%.

Verschiedene Studien zeigen, dass aromatische Aminosäuren wie Tyrosin und seine Derivate hauptsächlich natriumunabhängig über System L aufgenommen werden [Verrey 2003], [Lahoutte et al. 2001], [Langen et al. 2000], [Heiss et al. 1999]. Die Tyrosinaufnahme in Melanomzellen wird zu 63% durch BCH gehemmt [Pankovich et al. 1991], die Aufnahme von FET in SW707 Kolonkarzinomzellen wird durch BCH zu 80% inhibiert [Heiss et al. 1999]. Auch System T als Transportsystem für Tyrosin und andere aromatische Aminosäuren [Rosenberg et al. 1980] könnte theoretisch an der Aufnahme von FET beteiligt sein. Es zeigt jedoch eine limitierte Gewebeverteilung und ist unempfindlich gegenüber BCH, sodass eine größere Bedeutung für die FET-Aufnahme der untersuchten Tumorzellen unwahrscheinlich ist.

Im Gegensatz zu den Tumorzellen machte die unspezifische FET-Aufnahme bei den Granulozyten 63% aus und war damit noch höher als für Methionin. Wie bereits erwähnt können sich dahinter Transportsysteme verbergen, die durch die verwendeten Hemmstoffe nicht beeinflusst werden. Angesichts der geringen FET-Aufnahme in Granulozyten kann die geringe Wirkung der Hemmstoffe aber auch bedeuten, dass Granulozyten nur in geringem Maß über spezifische Transportsysteme für FET verfügen und die Aufnahme vor allem über unspezifische Mechanismen wie Diffusion erfolgt.

Untersuchung der pH-Abhängigkeit

Für verschiedene Aminosäure-Transportsysteme ist eine Abhängigkeit vom pH-Wert bekannt und wird als Merkmal zur funktionellen Charakterisierung herangezogen. Angesichts der sowohl bei Entzündungen als auch bei Tumoren vorkommenden pH-Veränderungen ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Tracer-Aufnahme aber auch von klinischem Interesse. Sowohl die Methionin- als auch die FET-Aufnahme erwies sich in unseren Versuchen als pH-abhängig. Beide Tracer wurden von allen Zellen am stärksten im Bereich physiologischer pH-Werte angereichert. Alkalische Werte von pH 7,6 – 8,2 verringerten die Aufnahme stärker als saure Werte von pH 6,8 - 6,2. Beide Tracer werden somit zumindest teilweise über pH-abhängige Mechanismen transportiert. Die Methioninaufnahme in Granulozyten verringerte sich bei alkalischen pH-Werte stärker, bei sauren pH-Werten hingegen geringer als bei den Tumorzellen. Praktische Bedeutung könnte dies bei einer Gewebsazidose im Bereich von Tumoren und Entzündungen haben, die die Methioninaufnahme in Granulozyten zusätzlich begünstigen könnte. Während die pH-Abhängigkeit der MET- und FET-Aufnahme in Tumorzellen nahezu gleich war, erwies sich die FET-Aufnahme in Granulozyten als deutlich weniger pH-abhängig als die MET-Aufnahme. Dies kann, wie auch der hohe Anteil der unspezifischen FET-Aufnahme, mit dem Mangel spezifischer FET-Transporter erklärt werden.

Untersuchung der Sättigung

Um die Sättigbarkeit der Transportsysteme für MET und FET zu untersuchen, wurde die Tracer-Aufnahme bei Methioninkonzentrationen von 0,011-176 mg/L (0,074-1180 µmol/L) bzw. FET*-Konzentrationen von 0,01-180 mg/L (0,055-990 µmol/L) bestimmt. Beide Tracer wurden vorwiegend über sättigbare Transportmechanismen aufgenommen. Der nicht-sättigbare Anteil der MET-Aufnahme bei einer Met-Konzentration von 176 mg/L betrug bei Granulozyten lediglich 4% und bei den Gliom-

bzw. Lymphomzellen 7,7% bzw. 12% der maximalen MET-Aufnahme. Der geringe nicht-sättigbare Anteil der Aufnahme spricht dafür, dass die oben erwähnte „unspezifische“ Methioninaufnahme in Granulozyten von 47% möglicherweise zu einem großen Teil durch weitere spezifische Transportsysteme zustande kommt, die lediglich durch die verwendeten Hemmstoffe nicht beeinflusst werden.

Bei allen Zelllinien fiel auf, dass die MET-Aufnahme bei Methioninkonzentrationen unterhalb der Sättigungskonzentration mit steigenden Met-Konzentrationen zunahm. Bei niedrigen Konzentrationen scheint sich also eine Konzentrationssteigerung positiv auf die Aktivität der Transportsysteme auszuwirken. Möglicherweise führt eine sehr niedrige Methioninkonzentration zur Inaktivierung von Transportern, die bei steigender Konzentration wieder aktiviert werden. Auch die intrazelluläre Methioninkonzentration könnte eine Rolle spielen im Sinne einer Transstimulation der Methionintransporter. Die Sättigung der Met-Transporter trat bei HS-683 Gliomzellen und DHL-4 Lymphomzellen bei einer Met-Konzentration von 2,2 mg/L ein, bei Granulozyten bei 8,8 mg/L. Die maximale sättigbare Met-Aufnahme in Granulozyten war mit 37 nmol/mg Zellprotein etwa 3,7 mal so groß wie bei den Tumorzellen mit 9,9 (HS-683 Gliomzellen) bzw. 9,8 nmol/mg Zellprotein (DHL-4 Lymphomzellen).

Der nicht-sättigbare Anteil der FET-Aufnahme war mit 20-35% bei allen untersuchten Zellen größer als bei Methionin. Unterhalb der Sättigungskonzentration hatte die Konzentration von kaltem FET* keinen Einfluss auf die FET-Aufnahme. Die Sättigung trat bei HS-683 Gliomzellen bei einer FET*-Konzentration von 18 mg/L ein, bei DHL-4 Lymphomzellen bei 1 mg/L und bei Granulozyten bei 3 mg/L. Die maximale sättigbare FET*-Aufnahme in HS-683 Gliomzellen und DHL-4 Lymphomzellen war um die Faktoren 8,3 bzw. 15 höher als die maximale sättigbare FET*-Aufnahme in Granulozyten mit 0,36 nmol/mg Zellprotein.

Dass sich Methionin in niedrigen Konzentrationen stimulierend auf die Aufnahme von MET auswirkte ist insofern interessant, als die L-Transporter LAT1 und LAT2 obligatorische Austauscher mit 1:1 Stöchiometrie sind [Meier et al. 2002], deren Aktivität von der Verfügbarkeit intrazellulärer Austauschsubstrate abhängt. In Frage kommen dazu Aminosäuren, die über unidirektionale Transporter zellulär aufgenommen werden und überlappend auch intrazelluläre Substrate der L-Transporter sind. Methionin wird als mögliches Austauschsubstrat diskutiert, da es eine vergleichsweise geringe Influxrate bei hoher Effluxrate über LAT1 zeigt und zugleich eine hohe Affinität zum A-Transport-System haben soll [Verrey 2003], [Christensen et

al. 1990]. Die intrazelluläre Konzentration von Austauschsubstraten ist limitierender Faktor für die Aminosäureaufnahme über LAT1 [Meier et al. 2002]. Interessant wäre deshalb auch, den Einfluss steigender Methionin-Konzentrationen auf die FET-Aufnahme zu untersuchen, was in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Es wird jedoch ein starker transstimulierender Effekt von Methionin auf die Aufnahme von Tyrosin und [123 I]-2-Iodtyrosin (2IT) durch LAT1 beschrieben [Lahoutte et al. 2004]. Der Transport von FET ist bidirektional [Heiss et al. 1999], dennoch ist die Akkumulation von FET auch gegen einen Konzentrationsgradienten möglich [Heiss et al. 1999], obgleich FET im Unterschied zu Methionin nicht in Proteine oder andere Makromoleküle eingebaut wird [Langen et al. 2003], [Wester et al. 1999]. Der Austausch gegen intrazelluläre Aminosäuren könnte die Akkumulation ermöglichen.

Aufnahmekinetik

Die Aufnahme von MET und FET wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 90 Minuten bestimmt und die durchschnittliche Aufnahmegeschwindigkeit in den verschiedenen Zeitabschnitten berechnet. Die Aufnahmegeschwindigkeit für beide Tracer war bei allen Zelllinien in der ersten Minute der Inkubationszeit am höchsten und nahm innerhalb weniger Minuten stark ab. Die höchste initiale Aufnahmegeschwindigkeit für MET hatten Granulozyten, gefolgt von HS-683 Gliomzellen und DHL-4 Lymphomzellen. Die höchste initiale Aufnahmegeschwindigkeit für FET hatten DHL-4 Lymphomzellen, gefolgt von HS-683 Gliomzellen und Granulozyten. Die Verlangsamung der Aufnahme mit Verlängerung der Inkubationszeit kann durch bidirektionalen Aminosäuretransport erklärt werden: Bei entsprechend hoher intrazellulärer Konzentration stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Auswärtstransport ein und der Nettotransport verringert sich.

Auch andere Autoren beschreiben eine initial hohe Aufnahmegeschwindigkeit für FET, die sich nach wenigen Minuten deutlich verringert: Langen et al. beschreiben eine steile Anfangsphase der Aufnahme bis zu fünf Minuten, bevor Rückdiffusion oder Auswärtstransport zunehmend an Bedeutung gewinnen [Langen et al. 2003]. In SW707 Kolon-Karzinom-Zellen wurde FET ebenfalls in den ersten 6 Minuten schnell aufgenommen, danach blieb die Tracer-Konzentration konstant [Heiss et al. 1999]. Unter in vivo Bedingungen stellt sich für die FET-Aufnahme in Tumoren nach 20 Minuten ein Plateau ein und die Tracer-Anreicherung im Tumor bleibt zwischen 20 und 40 Minuten post injectionem annähernd konstant [Weber et al. 2000].

Michaelis-Menten-Kinetik

Um $V_{\max}$ und K_m für die Aufnahme von Met und FET in HS-683 Gliomzellen, DHL-4 Lymphomzellen und Granulozyten zu ermitteln, wurde die Aufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt. Die Michaelis-Konstante betrug für die Methioninaufnahme in Granulozyten 20 $\mu\text{mol/L}$, in DHL-4 Lymphomzellen 86 $\mu\text{mol/L}$ und in HS-683 Gliomzellen 109 $\mu\text{mol/L}$. Die größte Kapazität für die Aufnahme von Methionin ergab sich für HS-683 Gliomzellen mit $V_{\max} = 3,5 \text{ nmol/mg/min}$, gefolgt von Granulozyten mit $V_{\max} = 2,3 \text{ nmol/mg/min}$ und DHL-4 Lymphomzellen mit $V_{\max} = 1,5 \text{ nmol/mg/min}$. Bei beiden Tumorzelllinien liegen die Affinitäten der Methioninaufnahme somit in einem ähnlichen Bereich. Dies spricht dafür, dass gleichartige Methionin-Transporter exprimiert werden, wobei HS-683 Gliomzellen vermutlich über eine größere Anzahl aktiver Transporter verfügen als DHL-4 Lymphomzellen, was zu der höheren Kapazität führt. Die Methionintransporter der Granulozyten unterscheiden sich hingegen durch eine rund fünfmal so große Affinität.

Bei der Aufnahme von FET war die Affinität der Gliom- und Lymphomzellen mit $K_m = 61,5$ bzw. 50 $\mu\text{mol/L}$ um den Faktor 1,5 bzw. 2 größer als bei den Granulozyten mit $K_m = 95 \mu\text{mol/L}$. $V_{\max}$ betrug für HS-683 Gliomzellen 2,4 nmol/mg/min und für DHL-4 Lymphomzellen 2,5 nmol/mg/min . Die Kapazität für die FET-Aufnahme in Granulozyten war im Vergleich dazu mit $V_{\max} = 0,1 \text{ nmol/mg/min}$ um den Faktor 25 geringer. Die Expression unterschiedlicher Transporter-Subtypen oder deren unterschiedliche Verteilung bei den Tumorzellen einerseits und den Granulozyten andererseits könnte die unterschiedlichen Affinitäten erklären. Ausschlaggebend für die geringe FET-Anreicherung in Granulozyten scheint jedoch nicht in erster Linie die geringere Affinität der Transporter zu sein, sondern vor allem die um den Faktor 25 geringere Kapazität. Dies bedeutet, dass Granulozyten nur über eine sehr geringe Zahl an FET-Transportern verfügen.

Bisher wurden drei Subtypen des L-Transporters identifiziert und geklont: LAT1, LAT2 und LAT3 [Kanai et al. 1998], [Pineda et al. 1999], [Babu et al. 2003]. LAT1 wurde in fast allen humanen Geweben einschließlich Leukozyten, nicht aber im Dünndarm, nachgewiesen [Prasad et al. 1999] und soll dem Zellwachstum dienen. LAT-1 gilt als pH-unabhängig und transportiert vor allem mittlere bis lange, verzweigte und aromatische Aminosäuren wie L-Tyrosin, D- und L-Methionin. Bei Mäusen wurde er nachgewiesen in Gehirn, Milz, Plazenta, Hoden, aktivierten Lymphozyten, C6-Gliomzellen, Hepatomzellen und Hepatokarzinomzellen [Kanai et al. 1998]. LAT1 wird von vielen malignen Zellen überexprimiert und die Expression korreliert mit dem Tumorwachstum [Yanagida et al. 2001], [Shennan et al. 2003], [Ohkame et al. 2001].

Es wird daher angenommen, dass die starke Aufnahme vieler aromatischer Aminosäure-Tracer in Tumoren LAT-1 vermittelt ist [Lahoutte et al. 2004]. Mehrere Tumorzelllinien haben eine defekte 4F2hc Expression bei erhaltener hLAT1 Expression [Yanagida et al. 2001]. Diese Zelllinien verfügen nicht über funktionierende LAT1-Transporter. Einige Studien ergaben bereits Hinweise, dass diese Tumoren ein geringeres Wachstum und keine Anreicherung von aromatischen Aminosäuren zeigen [Ohkame et al. 2001].

Im Unterschied zu LAT-1 wird LAT-2 als pH-abhängig beschrieben mit einem Maximum im sauren Bereich bei pH 6,25 [Segawa et al. 1999]. Er verfügt über ein breiteres Substratspektrum und transportiert alle neutralen, auch kurze Aminosäuren wie Serin und Cystein. Die Affinität zu Tyrosin ist mit $K_m = 35 \mu\text{mol/L}$ größer als zu Methionin mit $K_m = 204 \mu\text{mol/L}$ [Segawa et al. 1999]. LAT2 wurde vor allem auf den basolateralen Membranen von Transportepithelien in Niere, Dünndarm, Plazenta, Gehirn, Leber, aber auch in Skelett- und Herzmuskelzellen nachgewiesen [Pineda et al. 1999], [Segawa et al. 1999] und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei transepithelialen (re)absorptiven Vorgängen. Auf molekularer Ebene sind LAT1 und LAT2 Heterodimere aus h4F2hc und den light chains hLAT1lc bzw. hLAT2lc, die kovalent durch eine Disulfidbrücke verbunden sind [Wagner et al. 2001]. LAT3 hingegen benötigt keine schwere Glykoprotein-Untereinheit und ermöglicht Influx und Efflux durch erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten ohne obligatorischen Austausch-Mechanismus [Babu et al. 2003]. Im Gegensatz zu LAT1 und LAT2, deren Affinitäten im mikromolaren Bereich liegen (hohe Affinität), liegt die Affinität von LAT3 zu seinen Substraten im millimolaren Bereich (niedrige Affinität).

Die selektive Expression bestimmter Transportermoleküle auf *Xenopus laevis* Oozyten lieferte neue Erkenntnisse zu den verschiedenen Transporter-Subtypen. Während natürliches L-Tyrosin eine hohe Affinität zu beiden L-Subtypen hat, sind LAT1 und LAT2 unterschiedlich am Transport verschiedener Tyrosinderivate beteiligt [Lahoutte et al. 2004]. So ist der Transport von IMT über LAT1 um den Faktor sechs größer als über LAT2 [Shikano et al. 2003]. Der SPECT-Tracer [^{123}I]-2-Iod-Tyrosin (2IT), der wie FET eine sehr geringe Anreicherung in Entzündungsgewebe zeigt [Lahoutte et al. 2003], wird wie L-Tyrosin über LAT1 transportiert, bezüglich LAT2 oder weiteren Transportern fehlen Studien [Lahoutte et al. 2004]. Auch 2FT wird in hohem Maß über LAT1 transportiert [Lahoutte et al. 2004]. Der Transport von FET über LAT1 soll hingegen gering sein [Lahoutte et al. 2004], [Langen & Broer 2004], sodass FET möglicherweise ausschließlich über andere L-Subtypen zellulär aufgenommen wird.

Lahoutte vermutet, dass die verschiedenen Substituenten der Tyrosinderivate den Transportvorgang beeinflussen, sodass Derivate mit großen Substituenten wie die Fluorethyl-Gruppe bei FET eine geringere Transportrate über LAT1 zeigen.

Weber et al. stellten fest, dass trotz ähnlicher intrazerebraler Kinetiken und der starken Korrelation der MET- und FET-Aufnahme in zerebrale Tumoren, deutliche Unterschiede bei der Aufnahme in extrazerebrale Gewebe bestehen [Weber et al. 2000]. Leber, Pankreas und andere Speicheldrüsen, für die eine hohe physiologische Methioninaufnahme bekannt ist, reichern kaum FET an, was vorteilhaft bei der Diagnostik abdominaler Tumoren sein könnte. Im Vergleich zu Methionin wird FET langsamer vom Blut in die Organe aufgenommen [Weber et al. 2000]. Auch im Vergleich mit IMT ergaben sich erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Biodistribution in Ganzkörper-Untersuchungen [Pauleit et al. 2003], [Schmidt et al. 1997]. FET akkumuliert stärker als andere Tracer in Muskelgewebe und zeigt eine hohe Konzentration im Blut-Pool und im Harntrakt [Pauleit et al. 2003]. Auffallend ist die langsame renale Ausscheidung von nur 22% nach 5 Stunden [Pauleit et al. 2003], im Vergleich dazu wird IMT nach 5 Stunden zu 75% eliminiert [Schmidt et al. 1997].

Möglicherweise wird FET hauptsächlich über den Transporter-Subtyp LAT2 zellulär aufgenommen. Sowohl Methionin als auch Tyrosin werden über beide L-System Subtypen LAT1 und LAT2 transportiert, die Affinität von LAT2 zu Tyrosin ist dabei größer als zu Methionin [Segawa et al. 1999]. FET soll hingegen nicht über LAT1, jedoch über LAT2 transportiert werden [Langen & Broer 2004], [Lahoutte et al. 2004]. LAT1 konnte auf den meisten Geweben, einschließlich Lymphozyten nachgewiesen werden, während LAT2 nur in bestimmten Geweben, darunter Skelettmuskulatur, Niere, Plazenta und Dünndarm exprimiert wird [Segawa et al. 1999]. Die Gewebeverteilung von LAT2 stimmt somit zumindest teilweise mit der Biodistribution von FET überein. LAT1 soll vor allem für den Aminosäuretransport in wachsende Zellen und über endotheliale und epitheliale Schranken verantwortlich sein, LAT2 hingegen an transepithelialen (re)absorptiven Transportvorgängen beteiligt sein. Eine Reabsorption von FET über renale LAT2 könnte somit unter Umständen die langsame Ausscheidung, die lange Plateauphase der Blut-Radioaktivität und die starke Anreicherung im Harntrakt erklären.

Sollte FET tatsächlich vorwiegend oder sogar ausschließlich über einen bestimmten Transporter-Subtyp zellulär aufgenommen werden, könnte die geringe FET-Aufnahme in Granulozyten, die aufgrund unserer Ergebnisse durch eine geringe

Transportkapazität für FET bedingt ist, durch einen Mangel an diesem bestimmten Transporter bei Granulozyten erklärt werden. Ebenso würden aber auch Tumorzellen ohne den entsprechenden Transporter-Subtyp FET nicht anreichern, was eine eingeschränkte Sensitivität zur Folge hätte. Die von Pauleit et al. beschriebene eingeschränkte Sensitivität bei peripheren Tumoren [Pauleit et al. 2005] könnte daraus resultieren.

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden erlauben nur eine funktionelle Beschreibung der Transportmechanismen von Met und FET bei den untersuchten Zelllinien. Definitive Erkenntnisse zur Beteiligung bestimmter Transporter-Subtypen, deren Funktionsweise, molekularer Struktur und Gewebeverteilung können nur weiterführende Untersuchungen mit Hilfe spezifischerer Methoden liefern. Ob und unter welchen Voraussetzungen sich FET als Tracer zur Differenzierung von Tumor- und Entzündungsgewebe eignet und im klinischen Einsatz bewährt, müssen weitere klinischen Studien zeigen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit lässt nur FET, nicht aber MET eine eindeutige Unterscheidung von Granulozyten und Tumorzellen zu und könnte sich als Tracer zur Differenzierung von Tumor und Entzündungsgewebe eignen. Die hohe Tumorspezifität von FET bestätigte sich in dieser Arbeit auf zellulärer Ebene: Die FET-Aufnahme in beide untersuchten Tumorzelllinien war um ein Vielfaches höher als die FET-Aufnahme in Granulozyten. Granulozyten reicherten hingegen mehr Methionin pro mg Zellprotein an als beide untersuchten Tumorzelllinien. Eine Stimulation der Granulozyten mit LPS verstärkte die Methioninaufnahme zusätzlich, die FET-Aufnahme blieb hingegen unbeeinflusst.

Beide Tracer wurden vorwiegend über sättigbare Transportmechanismen aufgenommen. Die Aufnahme war pH-abhängig, wobei ein leicht alkalisches Milieu von pH 7,6 – 8,2 die Aufnahme stärker verringerte als eine Ansäuerung auf pH 6,8 - 6,2. Das pH Optimum lag für alle Zellen bei pH 7,2-7,4.

Die Methioninaufnahme in Granulozyten unterscheidet sich durch eine rund fünfmal so große Affinität von der Aufnahme in Tumorzellen. Die Michaelis-Konstante K_m betrug für die Methioninaufnahme in Granulozyten 20 $\mu\text{mol/L}$, in DHL-4 Lymphomzellen 86 $\mu\text{mol/L}$ und in HS-683 Gliomzellen 109 $\mu\text{mol/L}$. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$ war für HS-683 Gliomzellen mit 3,5 nmol/mg/min am größten, gefolgt von Granulozyten mit 2,3 nmol/mg/min und DHL-4 Lymphomzellen mit 1,5 nmol/mg/min. Ausschlaggebend für die geringe FET-Aufnahme in Granulozyten scheint in erster Linie die im Vergleich zu den Tumorzellen um den Faktor 25 geringere Transportkapazität zu sein. $V_{\max}$ betrug für die Gliom- und Lymphomzellen 2,4 bzw. 2,5 nmol/mg/min, für Granulozyten hingegen nur 0,1 nmol/mg/min, was dafür spricht, dass Granulozyten nur eine sehr geringe Zahl an FET-Transportern exprimieren. Die Affinität für die FET-Aufnahme in Gliom- und Lymphomzellen war darüber hinaus mit K_m -Werten von 61,5 bzw. 50 $\mu\text{mol/L}$ um die Faktoren 1,5 bzw. 2 größer als bei den Granulozyten mit einem K_m -Wert von 95 $\mu\text{mol/L}$.

Die Methioninaufnahme wurde bei allen Zellen am stärksten durch BCH gehemmt, in geringerem Maß auch durch L-Serin. MeAIB zeigte keine Hemmwirkung. Der starke Einfluss von BCH spricht für eine hauptsächliche Beteiligung von L-Typ Transportern an der Methioninaufnahme der untersuchten Zelllinien. Die Beteiligung

natriumabhängiger BCH-hemmbarer Transporter vom $B^{0,+}$ -Typ müsste durch eine weiterführende Untersuchung der Natriumabhängigkeit geklärt werden. Der Einfluss von L-Serin kann auf eine Beteiligung des ASC-Systems hinweisen, aber auch mit der Beteiligung von LAT2-Transportern an der Methioninaufnahme begründet werden. LAT2 ist bekannt für sein breites Substratspektrum, das fast alle neutralen Aminosäuren umfasst, darunter sowohl große und aromatische als auch kurzkettige Aminosäuren. Die Affinität für Tyrosin und Serin soll höher sein als für Methionin [Segawa et al. 1999]. Die in Anwesenheit aller drei Hemmstoffe nicht hemmbare „unspezifische“ Methioninaufnahme betrug bei den Tumorzelllinien unter 15%, bei Granulozyten hingegen 47%. Dahinter können weitere, durch die verwendeten Hemmstoffe nicht hemmbare, Transportsysteme oder unspezifische Mechanismen wie Endozytose oder freie Diffusion stehen.

Die FET-Aufnahme der untersuchten Gliom- und Lymphomzellen wurde sowohl durch BCH als auch durch Serin fast vollständig inhibiert, MeAIB hatte keinen Einfluss auf die FET-Aufnahme. Der gleichermaßen starke Einfluss von BCH und Serin könnte durch einen hauptsächlichen Transport über LAT2-Transporter zustande kommen. Die Hemmwirkung von BCH auf die FET-Aufnahme in Granulozyten war mit 40% geringer als bei den Tumorzellen, die Wirkung von L-Serin betrug lediglich 20%. Die unspezifische FET-Aufnahme in Granulozyten war mit 63% sehr hoch. Möglicherweise verfügen Granulozyten nur in geringem Maß über spezifische Transportsysteme für FET, sodass die geringe FET-Aufnahme vor allem über unspezifische Mechanismen zustande kommt.

Eine mögliche Begründung für die unterschiedliche Anreicherung von Methionin und FET in Granulozyten und Tumorzellen ist die unterschiedliche Beteiligung verschiedener Transportersubtypen an der zellulären Aufnahme der beiden Tracer sowie deren unterschiedliche Expression bei Granulozyten und Tumorzellen. Gezielte Untersuchungen auf molekularer Ebene sind jedoch erforderlich um definitive Aussagen über beteiligte Transportproteine und -mechanismen machen zu können.

Die geringe FET-Aufnahme in Granulozyten spricht für eine Eignung von FET als Tracer zur Differenzierung von malignen und entzündlichen Gewebeveränderungen, ob sich FET jedoch als Tumortracer im klinischen Einsatz bewährt, hängt von vielen weiteren Faktoren ab, die in entsprechenden klinischen und experimentellen Studien untersucht werden müssen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams S, Baum R, 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.
- Ahmed N, Kansara M, Berridge MV. Acute regulation of glucose transport in a monocyte-macrophage cell line: Glut-3 affinity for glucose is enhanced during the respiratory burst. *Biochem J* 1997;327:369-75.
- Albes JM, Dohmen BM, Schott U, Schulen E, Wehrmann M, Ziemer G. Value of positron emission tomography for lung cancer staging. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:55-62.
- Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG. Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* 1993;268:15329-32.
- Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Iribe Y, Tangtrongsup S, Jutabha P, Li Y, Ahmed N, Sakamoto S, Anzai N, Nagamori S, Endou H. Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J Biol Chem* 2003;278:43838-45.
- Bading JR, Kan-Mitchell JK, Conti S. System A amino acid transport in cultured human tumor cells: implications for tumor imaging with PET. *Nucl Med Biol* 1996;23:779-786.
- Bakheet SM, Powe J, Ezzat A, Rostom A. F-18-FDG uptake in tuberculosis. *Clin Nucl Med* 1998;23:739-42.
- Bakheet SM, Powe J, Kandil A, Ezzat A, Rostom A, Amartei J. F-18 FDG uptake in breast infection and inflammation. *Clin Nucl Med* 2000b;25:100-3.
- Bakheet SM, Saleem M, Powe J, Al-Amro A, Larsson SG, Mahassin Z. F-18 fluorodeoxyglucose chest uptake in lung inflammation and infection. *Clin Nucl Med* 2000a;25:273-8.
- Barker GA, Wilkins RJ, Golding S, Ellory JC. Neutral amino acid transport in bovine articular chondrocytes. *J Physiol* 1999;514:795-808.
- Bergström M, Collins VP, Ehrin E, Ericson K, Erikson L, Greitz T, Halledin C, von Holst, Langstrom B, Lilja A. 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;7:1062-66.
- Biersack HJ, Coenen HH, Stocklin G, Reichmann K, Bockisch A, Oehr P, Kashab M, Rollmann O. Imaging of brain tumors with L-3-[123I]iodo-alpha-methyl tyrosine and SPECT. *J Nucl Med* 1989;30:110-112.
- Boerman OC, Rennen H, Oyen WJ, Corstens FH. Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Semin Nucl Med* 2001;31:286-95.
- Bonventre PF, Straus D, Braughn RE, Imhoff J. Enhancement of carrier-mediated transport after immunologic activation of peritoneal macrophages. *J Immunol* 1977;118:1827-35.
- Borbely K, Nyary I, Toth M, Ericson K, Gulyas B. Optimization of semi-quantification in metabolic PET studies with (18)F-fluorodeoxyglucose and (11)C-methionine in the determination of malignancy of gliomas. *J Neurol Sci* 2006; 246:85-94.

- Borghetti AF, Tramacere M, Ghiringhelli P, Severini A, Kay JE. Amino acid transport in pig lymphocytes. Enhanced activity of transport system asc following mitogenic stimulation. *Biochim Biophys Acta* 1981;646:218-30.
- Broer A, Wagner CA, Lang F, Broer S. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J* 2000;349 Pt 3:787-95.
- Broer S and Wagner CA. Structure-function relationships of heterodimeric amino acid transporters. *Cell Biochem Biophys* 2002;36:155-68.
- Broer S, Broer A, Hamprecht B. The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system L-like neutral amino acid-transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 1995;312:863-70.
- Chairoungdua A, Kanai Y, Matsuo H, Inatomi J, Kim DK, Endou H. Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J Biol Chem*. 2001;276:49390-9.
- Chairoungdua A, Segawa H, Kim JY, Miyamoto K, Haga H, Fukui Y, Mizoguchi K, Ito H, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 1999;274:28845-8.
- Christensen HN, Antonioli JA. Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport. *J Biol Chem* 1969;244:1497-504.
- Christensen HN, Handlogten ME, Lam I, Tager HS, Zand R. A bicyclic amino acid to improve discrimination among transport systems. *Journal of Biological Chemistry* 1969;244:1510-20.
- Christensen HN, Kilberg M. Hepatic amino acid transport primary to the urea cycle in regulation of biologic neutrality. *Nutr Rev*. 1995 Mar;53(3):74-6.
- Christensen HN, Liang M, Archer EG. A distinct Na⁺-requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids. *J Biol Chem* 1967;242:5237-46.
- Christensen HN, Liang M. Transport of diamino acids into the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 1966;241:5542-51.
- Christensen HN. Distinguishing amino acid transport systems of a given cell or tissue. *Methods in Enzymology* 1989;173:576-616
- Christensen HN. Relations in the transport of beta-alanine and the alpha-amino acids in the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 1964;239:3584-9.
- Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*. 1990;70:43-77.
- Coenen HH, Kling P, Stocklin G. Cerebral metabolism of L-[2-18F]fluorotyrosine, a new PET tracer of protein synthesis. *J Nucl Med* 1989;30:1367-72.
- Coleman RE. Single photon emission computed tomography and positron emission tomography in cancer imaging. *Cancer* 1991;67:1261-70.
- Comar D, Cartron JC, Maziere M, Marazano. Labelling and metabolism of methionine-methyl-11C. *Eur J Nucl Med* 1976;1:11-4.
- Czech N, Brenner W, Kampen WU, Henze E. Die diagnostische Wertigkeit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in der klinischen Onkologie. *Dtsch Med Wochenschr* 2000;125:565-7.

- Daley JM, Shearer MA, Mastrofrancesco B, Caldwell MD. Glucose metabolism in injured tissue: a longitudinal study. *Surgery* 1990;107:187-92.
- Dall'Asta V, Rossi PA, Bussolati O, Gazzola GC. Response of human fibroblasts to hypertonic stress. Cell shrinkage is counteracted by an enhanced active transport of neutral amino acids. *J Biol Chem*. 1994;269:10485-91.
- Damian D, Fulham M, Thompson E, Thompson J. Positron emission tomography in the detection and management of metastatic melanoma. *Melanoma Res* 1996;6:325-329.
- De Witte O, Goldberg I, Wikler D, Rorive S, Damhaut P, Monclus M, Salmon I, Brotschi J, Goldman S. Positron emission tomography with injection of methionine as a prognostic factor in glioma. *J Neurosurg* 2001;95:746-50.
- Derlon JM, Bourdet C, Bustany P, Chatel M, Theron J, Darcel F, Syrota A. [11C]L-methionine uptake in gliomas. *Neurosurgery* 1989;25:720-728.
- Derlon JM, Chapon F, Noe MH, Khouri S, Benali K, Petit-Taboue MC, Houtteville JP, Chajari MH, Bouvard G. Non-invasive grading of oligodendrogliomas: correlation between in vivo metabolic pattern and histopathology. *Eur J Nucl Med* 2000;27:778-87.
- Desforges M, Lacey HA, Glazier JD, Greenwood SL, Mynett KJ, Speake PF, Sibley CP. SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C305-12.
- Dethy S, Manto M, Kentos A, Konopnicki D, Pirotte B, Goldman S, Hildebrand J. PET findings in a brain abscess associated with a silent atrial septal defect. *Clin Neurol Neurosurg* 1995;97:349-353.
- Devés R and Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiological Reviews* 1998;78:487-546
- Devés R, Angelo S, Rojas AM. System y⁺L: the broad scope and cation modulated amino acid transporter. *Exp Physiol* 1998;83:211-20.
- Devés R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system (y⁺L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol* 1992;454:491-501.
- Diederichs CG, Staib L, Glasbrenner B, Guhlmann A, Glatting G, Pauls S, Beger HG, Reske SN. F- 18 Fluorodeoxyglucose (FDG) and C-Reactive Protein (CRP). *Clin Positron Imaging* 1999;2:131-136.
- Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss L. Quantitative studies using positron emission tomography (PET) for the diagnosis and therapy planning of oncological patients. *Hell J Nucl Med* 2006; 9:10-21.
- Eleno N, Deves R, Boyd CA. Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta. *J Physiol* 1994;479:291-300.
- Fei YJ, Sugawara M, Nakanishi T, Huang W, Wang H, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. Primary structure, genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N 1, a Na⁺- and H⁺-coupled glutamine transporter. *J Biol Chem* 2000;275:23707-17.
- Fischer BM, Mortensen J. The future in diagnosis and staging of lung cancer: positron emission tomography. *Respiration* 2006;73:267-76.
- Floeth FW, Pauleit D, Sabel M, Reifenberger G, Stoffels G, Stummer W, Rommel F, Hamacher K, Langen KJ. 18F-FET PET differentiation of ring-enhancing brain lesions. *J Nucl Med* 2006;47:776-82.

- Floeth FW, Pauleit D, Wittsack HJ, Langen KJ, Reifenberger G, Hamacher K, Messing-Junger M, Zilles K, Weber F, Stummer W, Steiger HJ, Woebker G, Muller HW, Coenen H, Sabel M. Multimodal metabolic imaging of cerebral gliomas: positron emission tomography with [18F]fluoroethyl-L-tyrosine and magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 2005;102:318-27.
- Franchi-Gazzola R, Dall'Asta V, Sala R, Visigalli R, Bevilacqua E, Gaccioli F, Gazzola GC, Bussolati O. The role of the neutral amino acid transporter SNAT2 in cell volume regulation. *Acta Physiol* 2006;187:273-83.
- Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y. Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* 2000;275:9690-8.
- Gaccioli F, Huang CC, Wang C, Bevilacqua E, Franchi-Gazzola R, Gazzola GC, Bussolati O, Snider MD, Hatzoglou M. Amino acid starvation induces the SNAT2 neutral amino acid transporter by a mechanism that involves eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation and cap-independent translation. *J Biol Chem*. 2006;281:17929-40.
- Gu S, Adan-Rice D, Leach RJ, Jiang JX. A novel human amino acid transporter, hNAT3: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics* 2001;74:262-72.
- Guhlmann A, Brecht-Krauss D, Suger G, Glatting G, Kotzerke J, Kinzl L, Reske SN. Fluorine-18-FDG PET and Technetium-99m antigranulocyte antibody scintigraphy in chronic osteomyelitis. *J Nucl Med* 1998;39:1244-2152.
- Halter G, Storck M, Guhlmann A, Frank J, Grosse S, Liewald F. FDG positron emission tomography in the diagnosis of peripheral pulmonary focal lesions. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;48:97-101.
- Hatanaka T, Huang W, Ling R, Prasad PD, Sugawara M, Leibach FH, Ganapathy V. Evidence for the transport of neutral as well as cationic amino acids by ATA3, a novel and liver-specific subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 2001;1510:10-7.
- 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;40:1367-1373
- Herholz K, Holzer T, Bauer B, Schroder R, Voges J, Ernestus RI, Mendoza G, Weber-Luxemburger G, Lottgen J, Thiel A, Wienhard K, Heiss WD. 11C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas. *Neurology*. 1998;50:1316-1322.
- Hoffman RM. Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. *Anticancer Research* 1985;5:1-30.
- Hoffmann R. Information hyperlinked over proteins. (<http://www.ihop-net.org/uni-pub/iHOP/>). Stand: 10.10.2006.
- Hubner KF, Purvis JT, Mahaley SM Jr, Robertson JT, Rogers S, Gibbs WD, King P, Partain CL. Brain tumor imaging by positron emission computed tomography using 11C-labeled amino acids. *J Comput Assist Tomogr*. 1982;6:544-50.
- Inoue T, Tomiyoshi K, Higuichi T, Ahmed K, Sarwar M, Aoyagi K, Armano S, Alyafei S, Zhang H, Endo K. Biodistribution studies on L-3-[fluorine-18]fluoro-alpha-methyl tyrosine: a potential tumor-detecting agent. *J Nucl Med* 1998;39:663-667.
- Ishii K, Ogawa T, Hatazawa J, Kanno I, Imugami A, Fujita H, Murakami M, Okudura T, Kemura K. High L-methyl[C11]methionine uptake in brain abscess: a PET study. *J Comput Assist Tomogr* 1993;17:660-661.

- Ishiwata K, Kubota K, Murakami M, Kubota R, Sasaki T, Ishii S, Senda M. Re-evaluation of amino acid PET studies: can the protein synthesis rates in brain and tumor tissues be measured in vivo? *J Nucl Med* 1993;34:1936-1943.
- Ito K, Kato T, Tadokoro M, Ishiguchi T, Oshima M, Ishigaki T, Sakuma S. Recurrent rectal cancer and scar: differentiation with PET and MR imaging. *Radiology* 1992;182:549-52.
- Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, de Vries EG, Langen KJ, Piers DA. Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med* 2001;42:432-445.
- Johnstone RM, Scholefield PG. Amino acid transport in tumor cells. *Adv Cancer Res.* 1965;9:143-226.
- Jones HA, Cadwallader KA, White JF, Uddin M, Peters AM, Chilvers ER. Dissociation between respiratory burst activity and deoxyglucose uptake in human neutrophil granulocytes: implications for interpretation of (18)F-FDG PET images. *J Nucl Med* 2002;43:652-7.
- Kaim AH, Weber B, Kurrer MO, Gottschalk J, von Schulthess GK, Buck A. Autoradiographic quantification of 18F-FDG uptake in experimental soft-tissue abscesses in rats. *Radiology* 2002b;223:446-51.
- Kaim AH, Weber B, Kurrer MO, Westera G, Schweitzer A, Gottschalk J, von Schulthess GK, Buck A. 18F-FDG and 18F-FET uptake in experimental soft tissue infection. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002a;29:648-654.
- Kanai Y, Endou H. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Crug Metab* 2001;2:339-54.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto KI, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression, cloning and characterization for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 Antigen (CD98). *J Biol Chem* 1998;273:23629-32.
- Kapucu LO, Meltzer CC, Townsend DW, Keenan RJ, Luketich JD. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake in pneumonia. *J Nucl Med* 1998;39:1267-9.
- Kaschten B, Stevenaert A, Sadzot B, Deprez M, Degueldre C, Del Fiore G, Luxen A, Reznik M. Preoperative evaluation of 54 gliomas by PET with fluorine-18-Fluorodeoxyglucose and/or Carbon-11-Methionine. *J Nucl Med* 1998;39:778-785.
- Kavanaugh MP. Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y⁺ basic amino acid transporter. *Biochemistry* 1993;32:5781-5.
- Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN. Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine and closely related analogs. *Journal of Biological Chemistry* 1980;253:4011-4019.
- Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H. Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 2001;276:17221-8.
- Koh WJ, Griffin TW, Rasey JS, Laramore GE. Positron emission tomography. A new tool for characterization of malignant disease and selection of therapy. *Acta Oncologica* 1994;33:323-7.
- Kole AC, Nieweg OE, Pruim J, Paans AM, Plukker JT, Hoekstra HJ, Schraffordt-Koops H, Vaalburg W. Standardized uptake value and quantification of metabolism for breast cancer imaging with FDG and L-[1-11C]-tyrosine PET. *J Nucl Med* 1997;38:692-696.
- 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;40:381-386.

- Kubota K, Ishiwata K, Kubota K, Yamada S, Takahashi J, Abe Y, Fukuda H. Feasibility of fluorine-18-fluorophenylalanine for tumor imaging with carbon-11-L-methionine. *J Nucl Med* 1996;37:320-5.
- Kubota K, Matsuzawa T, Fujiwara T, Sato T, Tada M, Ido T, Ishiwata K. Differential diagnosis of AH 109 A tumor and inflammation by radioscintigraphy with L-[methyl-11C]methionine. *Jpn J Cancer Res* 1989;39:1244-2152.
- Kubota K, Matsuzawa T, Fumiwata T. Differential diagnosis of lung tumor with positron emission tomography: a prospective study. *J Nucl Med* 1990;31:1927-1933.
- 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;36:484-492.
- Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J Nucl Med* 1992;33:1972-1980.
- Kumar R, Nadig MR, Chauhan A. Positron emission tomography: clinical applications in oncology. Part 1. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005 ;5:1079-94.
- Lahoutte T, Caveliers V, Camargo S, Franca R, ramadan T, Veljkovic E, Mertens J, Bossuyt A, Verrey F. SPECT and PET amino acid tracer influx via system L (h4F2hc-hLAT1) and its transstimulation. *J Nucl Med* 2004;45:1591-1596.
- Lahoutte T, Caveliers V, Dierickx L, Vekeman M, Everaert H, Mertens J, Bossuyt A. In vitro characterization of the influx of 3-[125I]iodo-L-alpha-methyltyrosine and 2-[125I]iodo-L-tyrosine into U266 human myeloma cells: evidence for system T transport. *Nucl Med Biol* 2001;28:129-134.
- Lahoutte T, Mertens J, Caveliers V, Franken PR, Everaert H, Bossuyt A. Comparative biodistribution of iodinated amino acids in rats. Selection of the optimal analog for oncologic imaging outside the brain. *J Nucl Med* 2003;44:1489-1494.
- Langen KJ and Broer S. Molecular transport mechanisms of radiolabeled amino acids for PET and SPECT. *J Nucl Med* 2004;45:1435-1436.
- Langen KJ, Börner AR, Müller-Mattheis V, Hamacher K, Herzog H, Ackermann R, Coenen H. Uptake of cis-4-[18F]fluoro-L-proline in urologic tumors. *J Nucl Med* 2001;42:752-754.
- Langen KJ, Hamacher K, Weckesser M, Floeth F, Stoffels G, Bauer D, Coenen HH, Pauleit D. O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine: uptake mechanisms and clinical applications. *Nucl Med Biol*. 2006;33:287-94.
- Langen KJ, Jarosch M, Muhlensiepen H, Hamacher K, Broer S, Jansen P, Zilles K, Coenen HH. Comparison of fluorotyrosines and methionine uptake in F98 rat gliomas. *Nucl Med Biol* 2003;30:501-508.
- Langen KJ, Muhlensiepen H, Hoschbach M, Hautzel H, Jansen P, Coenen HH. Transport mechanisms of 3-[123I]iodo-alpha-methyl-L-tyrosine in a human glioma cell line: comparison with [3H-methyl]-L-methionine. *J Nucl Med* 2000;41:1250-1255.
- Langen KJ, Ziemons K, Kiwit CW, Herzog H, Kuwert T, Bock WJ, Stocklin G, Feindegen LE, Muller-Gartner HW. 3-[123I]iodo-alpha-methyltyrosine and [methyl-11C]-L-methionine uptake in cerebral gliomas: a comparative study using SPECT and PET. *J Nucl Med* 1997;38:517-522.
- Laverman P, Boerman OC, Corstens FH, Oyen WJ. Fluorinated amino acids for tumour imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:681-690.

- Leskinen-Kallio S, Nagren K, Lehtikainen P, Ruotsalainen U, Joensuu H. Uptake of ¹¹C-methionine in breast cancer studied by PET. An association with the size of S-phase fraction. *Br J Cancer* 1991b;64:1121-24.
- Leskinen-Kallio S, Nagren K, Lehtikainen 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;33:691-695.
- Leskinen-Kallio S, Ruotsalainen U, Nagren K, Teras M, Joensuu H. Uptake of carbon-11-methionine and fluorodeoxyglucose in non-Hodgkin's lymphoma: a PET study. *J Nucl Med* 1991a;32:1211-1218.
- Liewald F, Grosse S, Storck M, Gohlmann A, Halter G, Reske S, Sunder-Plassmann L. How useful is positron emission tomography for lymphnode staging in non-small-cell lung cancer? *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;48:93-6.
- Löffler G. Die Plasmamembran. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Löffler G, Petrides P (Hrsg.), 1998, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 6. Auflage, S. 178-187.
- Lowe VJ and Naunheim KS. Positron emission tomography in lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1998;65:1821-1829.
- Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch.* 2004 ;447:784-95.
- Mackenzie B, Schafer MK, Erickson JD, Hediger MA, Weihe E, Varoqui H. Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J Biol Chem* 2003;278:23720-30.
- Malandro MS, Kilberg MS. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem* 1996;65:305-36.
- 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.
- Meier C, Ristic Z, Klauser S, Verrey F. Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J* 2002;21:580-9.
- Meller J and Becker W. Nuclear medicine diagnosis of patients with fever of unknown origin (FUO). *Nuklearmedizin* 2001;40:59-70.
- Messing-Jünger AM, Floeth FW, Pauleit D, Reifenberger G, Willing R, Gartner J, Coenen HH, Langen KJ. Multimodal target point assessment for stereotactic biopsy in children with diffuse bithalamic astrocytomas. *Child's Nerv Syst* 2002;18:445-449.
- Meyer MA, Frey KA, Schwaiger M. Discordance between F-18 fluorodeoxyglucose uptake and contrast enhancement in a brain abscess. *Clin Nucl Med* 1993;18:682-684.
- Nakanishi T, Sugawara M, Huang W, Martindale RG, Leibach FH, Ganapathy ME, Prasad PD, Ganapathy V. Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:1343-8.
- Narayanan TK, Said S, Mukherjee J, Christian B, Satter M, Dunigan K, Shi B, Jacobs M, Bernstein T, Padma M, Mantil J. A comparative study on the uptake and incorporation of radiolabeled methionine, choline and fluorodeoxyglucose in human astrocytoma. *Mol Imaging Biol* 2002;4:147-56.
- Nettelbladt OS, Sundin AE, Valind SO, Gustafsson GR, Lamberg K, Lagström B, Björnsson EH. Combined fluorine-18-FDG and carbon-11-methionine PET for diagnosis of tumors in lung and mediastinum. *J Nucl Med* 1998;39:640-647.

- Neurath MF, Vehling D, Schunk K, Holtmann M, Brockmann H, Helisch A, Orth T, Schreckenberger M, Galle PR, Bartenstein P. Noninvasive assessment of Crohn's disease activity: a comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography, hydromagnetic resonance imaging, and granulocyte scintigraphy with labeled antibodies. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1978-85.
- Nuutinen J, Leskinen S, Lindholm P, Söderström KO, Någren K, Huhtala S, Minn H. Use of carbon- 11 methionine positron emission tomography to assess malignancy grade and predict survival in patients with lymphomas. *Eur J Nucl Med* 1998;25:729–735.
- Ogawa T, Shishido F, Kanno I, Inugami A, Fujita H, Murakami M, Shimosegawa E, Ito H, Hatazawa J, Okudera T. Cerebral glioma: evaluation with methionine PET. *Radiology* 1993;186:45-53.
- Ohkame H, Masuda H, Ishii Y, Kanai Y. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol* 2001;78:265-71
- Oxender DL, Christensen HN. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 1963;238:3686–3699.
- Padma MV, Said S, Jacobs M, Hwang DR, Cunigan K, Satter M, Christian B, Ruppert J, Bernstein T, Kraus G, Mantil JC. Prediction of pathology and survival by FDG PET in gliomas. *J Neurooncol* 2003;64:227-37.
- Paik JY, Lee KH, Choe YS, Choi Y, Kim BT. Augmented 18F-FDG uptake in activated monocytes occurs during the priming process and involves tyrosine kinases and protein kinase C. *J Nucl Med* 2004; 45:124-8.
- Palacin M, Fernandez E, Chillaron J, Zorzano A. The amino acid transport system b(0,+) and cystinuria. *Mol Membr Biol*. 2001;18:21-6.
- Palacin M, Kanai Y. The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 2004;447:490-4.
- Pauleit D, Floeth F, Hamacher K, Riemenschneider MJ, Reifenberger G, Muller HW, Zilles K, Coenen HH, Langen KJ. O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET combined with MRI improves the diagnostic assessment of cerebral gliomas. *Brain* 2005b;128:678-87.
- Pauleit D, Floeth F, Herzog H, Hamacher K, Tellmann L, Müller HW, Coenen HH, Langen KJ. Whole-body distribution and dosimetry of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:519-524.
- Pauleit D, Floeth F, Tellmann L, Hamacher K, Hautzel H, Müller HW, Coenen H, 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;45:374-381.
- Pauleit D, Langen KJ, Floeth F, Sabel M, Felsberg J, Reifenberger G, Hamacher K, Coenen HH. Improved delineation of the tumor extension using O-(2-18F-fluoroethyl)-L-tyrosine PET compared with MRI in cerebral gliomas. *J Nucl Med* 2002;43(suppl):112. [abstract]
- Pauleit D, Stoffels G, Schaden W, Hamacher K, Bauer D, Tellmann L, Herzog H, Bröer S, Coenen H, Langen KJ. PET with O-(2-18F-fluoroethyl)-L-tyrosine in peripheral tumors: first clinical results. *J Nucl Med* 2005a;46:411-416.
- Pauleit D, Zimmermann A, Stoffels G, Bauer D, Risse J, Fluss MO, Hamacher K, Coenen HH, Langen KJ. 18F-FET PET Compared with 18F-FDG PET and CT in Patients with Head and Neck Cancer. *J Nucl Med*. 2006;47:256-261.

- Pelosi E, Pennone M, Deandreis D, Douroukas A, Mancini M, Bisi G. Role of whole body positron emission tomography/computed tomography scan with 18F-fluorodeoxyglucose in patients with biopsy proven tumor metastases from unknown primary site. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 ;50:15-22.
- Petrides P. Stoffwechsel der essentiellen Aminosäuren. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Löffler G, Petrides P (Hrsg.), 1998, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 6. Auflage, S. 541-566.
- Pfeiffer R, Löffing J, Rossier G, Bauch C, Meier C, Eggermann T, Löffing-Cueni D, Kuhn LC, Verrey F. Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 1999;10:4135-47.
- Phelps ME. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med* 2000;41:661-81.
- Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999;274:19738-44.
- Pirotte B, Goldman S, Salzberg S, Wiler D, David P, Vandesteene A, Van Bogaert P, Salmon I, Brotchi JK, Levivier M. Combined positron emission tomography and magnetic resonance imaging for the planning of stereotactic brain biopsies in children: experience in 9 cases. *Pediatr Neurosurg* 2003;38:146-55.
- Plotkin M, Gneveckow U, Meier-Hauff K, Amthauer H, Feussner A, Denecke T, Gutberlet M, Jordan A, Felix R, Wust P. 18F-FET PET for planning of thermotherapy using magnetic nanoparticles in recurrent glioblastoma. *Int J Hyperthermia* 2006;22:319-325.
- Pöpperl G, Goldbrunner R, Gildehaus FJ, Kreth FW, Tanner P, Holtmannspotter M, Tonn JC, Tatsch K. O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET for monitoring the effects of convection-enhanced delivery of paclitaxel in patients with recurrent glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:1018-25.
- Pöpperl G, Götz C, Rachinger W, Gildehaus FJ, Tonn JC, Tatsch K. Value of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET for the diagnosis of recurrent glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:1464-1470.
- Pöpperl G, Götz C, Rachinger W, Schnell O, Gildehaus FJ, Tonn JC, Tatsch K. Serial O-(2-[(18F)]fluoroethyl)-L-tyrosine PET for monitoring the effects of intracavitary radioimmunotherapy in patients with malignant glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006b;33:792-800.
- Pöpperl G, Kreth FW, Herms J, Koch W, Mehrkens JH, Gildehaus FJ, Kretschmar HA, Tonn JC, Tatsch K. Analysis of 18F-FET PET for grading of recurrent gliomas: is evaluation of uptake kinetics superior to standard methods? *J Nucl Med* 2006a;47:806
- Pöpperl G, Lang S, Dagdelen O, Jager L, Tiling R, Hahn K, Tatsch K. Correlation of FDG-PET and MRI/CT with histopathology in primary diagnosis, lymph node staging and diagnosis of recurrency of head and neck cancer. *Rofo* 2002;174:714-20
- 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 Biophys Res Commun* 1999;255:283-288.
- Price P and Jones T. Can Positron Emission Tomography be used to detect subclinical response to cancer therapy? *Eur J Cancer* 1995 ;31A:1924-7.
- Pruim J, Willemsen AT, Molenaar WM, van Waarde A, Paans AM, Heesters MA, Go KG, Visser GM, Franssen EJ, Vaalburg W. Brain tumors: L-[1-C-11]tyrosine PET for visualization and quantification of protein synthesis rate. *Radiology* 1995;197:221–226.

- Rachinger W, Goetz C, Pöpperl G, Gildehaus FJ, Kreth FW, Holtmannspotter M, Herms J, Koch W, Tatsch K, Tonn JC. Positron emission tomography with O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine versus magnetic resonance imaging in the diagnosis of recurrent gliomas. *Neurosurgery* 2005 ;57:505-11.
- Rau FC, Weber WA, Wester HJ, Herz M, Becker I, Krüger A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. O-(2-[18F]Fluoroethyl)-L-tyrosine (FET): a tracer for differentiation of tumour from inflammation in murine lymph nodes. *Eur J Nucl Med* 2002;29:1039-1046.
- Reinhardt MJ, Kubota K, Yamada S, Iwata R, Yaegashi H. Assessment of cancer recurrence in residual tumors after fractionated radiotherapy: a comparison of fluorodeoxyglucose, L-methionine and thymidine. *J Nucl Med* 1997;38:280-287.
- Reske SN, Bares R, Bull U, Guhlmann A, Moser E, Wannenmacher MF. Klinische Wertigkeit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bei onkologischen Fragestellungen: Ergebnisse einer interdisziplinären Konsensuskonferenz. *Nuklearmedizin* 1996;35:42-52.
- Rodriguez M, Rehn S, Ahlström H, Sundström C, Glimelius B. Predicting malignancy grade with PET in Non-Hodgkin`s lymphoma. *J Nucl Med* 1995;36:1790-1796.
- Römer W and Schwaiger M. Positron emission tomography in diagnosis and therapy monitoring of patients with lymphoma. *Clin Positron Imaging* 1998;1:101-110.
- Römer W, Hanauske AR, Ziegler S, Thodtmann R, Weber W, Fuchs C, Enne W, Herz M, Nerl C, Garbrecht M, Schwaiger M. Positron emission tomography in non-Hodgkin's lymphoma: assessment of chemotherapy with fluorodeoxyglucose. *Blood* 1998;91:4464-71.
- Rosenberg R, Young JD, Ellory JC. L-Tryptophan transport in human red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980;598:375-384.
- Ruhlmann J, Oehr P, Bender H, Kozak B, Willkomm P, Schrader M, Biersack HJ. PET scan in general practice for diagnosis of breast carcinoma. *Acta Med Austriaca* 1997;24:63-7.
- Ruiz Hernandez G, Romero de Avila Y Avalos C, Carreras Delgado JL. The value of 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (18F-FDG PET) in diagnosis of neoplastic diseases. *Med Clin (Barc)*. 2005;124:229-36.
- Saier MH, 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.
- Sasaki M, Ichiya Y, Kubwabara Y, Otsuka M, Tahara T, Fukumura T, Masuda K. Ringlike uptake of FDG in brain abscess: a PET study. *J Comp Assist Tomog* 1990;14:486-487.
- Scanlon KJ, Berkowitz K, Pallai ME, Waxman S. Inhibition of methionine transport by methotrexate in mitogen-stimulated human lymphocytes. *Cancer Treat Rep*. 1983;67:631-9.
- Schaller B. Usefulness of positron emission tomography in diagnosis and treatment follow-up of brain tumors. *Neurobiol Dis* 2004;15:437-48.
- Schmidt D, Langen KJ, Herzog H, Wirths J, Holschbach M, Kiwit JCW, Ziemons K, Coenen H, Müller-Gärtner HW. Whole-body kinetics and dosimetry of L-3-[123I]iodo-alpha-methyltyrosine. *Eur J Nucl Med* 1997;24:1162-1166.
- Schneider K, Hrasky A, Aschoff P, Bihl H, Hagen R. Significance of PET and Integrated PET/CT in the Diagnostics of Occult Primary Tumors. *Laryngorhinootologie*. 2006;85:819-23

- Schuster DP, Kozlowski J, Hogue L. Imaging lung inflammation in a murine model of *Pseudomonas* infection: a positron emission tomography study. *Exp Lung Res* 2003;29:45-57.
- Seemann MD, Meisetschlaeger G, Gaa J, Rummeny EJ. Assessment of the extent of metastases of gastrointestinal carcinoid tumors using whole-body PET, CT, MRI, PET/CT and PET/MRI. *Eur J Med Res* 2006;11:58-65.
- 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. *Biol Chem* 1999;28:19745-51.
- Shennan DB, Thomson J, Barber MC, Travers MT. Functional and molecular characteristics of system L in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1611:81-90.
- Shikano N, Kanai Y, Kawai K, Inatomi J, Kim DK, Ishikawa N, Endou H. Isoform selectivity of 3-125I-iodo-alpha-methyl-L-tyrosine membrane transport in human L-type amino acid transporters. *J Nucl Med* 2003;44:244-246.
- Sloan JL and Mager S. Cloning and functional expression of a human Na⁽⁺⁾ and Cl⁽⁻⁾-dependent neutral and cationic amino acid transporter B⁽⁰⁺⁾. *J Biol Chem*. 1999;274:23740-23745.
- Sonoda Y, Kumabe T, Takahashi T, Shirane R, Yoshimoto T. Clinical usefulness of 11C-MET PET and 201Tl SPECT for differentiation of recurrent glioma from radiation necrosis. *Neurol Med Chir* 1998;38:342-347.
- Souba WW and Pacitti AJ. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus and mediators. *J Parenter Enteral Nutr* 1992;16:569-578.
- Spaeth N, Wyss MT, Weber B, Scheidegger S, Lutz A, Verwey J, Radovanovic I, Pahnke J, Wild D, Westera G, Weishaupt D, Hermann DM, Kaser-Hotz B, Aguzzi A, Buck A. Uptake of 18F-fluorocholine, 18F-fluoroethyl-L-tyrosine, and 18F-FDG in acute cerebral radiation injury in the rat: implications for separation of radiation necrosis from tumor recurrence. *J Nucl Med* 2004;45:1931-1938.
- Strauss LG. Sensitivity and specificity of positron emission tomography (PET) for the diagnosis of lymph node metastases. *Recent Results Cancer Res*. 2000;157:12-19.
- Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Martindale RG, Ganapathy ME, Leibach FH, Ganapathy V. Structure and function of ATA3, a new subtype of amino acid transport system A, primarily expressed in the liver and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2000;1509:7-13.
- Sugawara Y, Braun DK, Kison PV, Russo JE, Zasadny KR, Wahl RL. Rapid detection of human infections with fluorine-18-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: preliminary results. *Eur J Nucl Med* 1998;25:1238-1243.
- Sugawara Y, Gutowski TD, Fisher SJ, Brown RS, Wahl RL. Uptake of positron emission tomography tracers in experimental bacterial infections: a comparative biodistribution study of radiolabeled FDG, thymidine, L-methionine, 67Ga-citrate, and 125I-HSA. *Eur J Nucl Med* 1999; 26:333-341.
- Sutinen E, Jyrkkio S, Varpula M, Lindholm P, Gronroos T, Lehtikoinen P, Teras M, Minn H. Nodal staging of lymphoma with whole-body PET: comparison of. *J Nucl Med* 2000; 41:1980-1988.
- Tahara T, Ichiya Y, Kuwabara Y, Otsuka M, Miyake Y, Gunasekera R, Masuda K. High [18F]-fluorodeoxyglucose uptake in abdominal abscesses: a PET study. *J Comp Assist Tomogr* 1989;13:829-831.

- Tamarappoo BK, McDonald KK, Kilberg MS. Expressed human hippocampal ASCT1 amino acid transporter exhibits a pH-dependent change in substrate specificity. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1279:131-6.
- Tan AS, Ahmed N, Berridge MV. Acute regulation of glucose transport after activation of human peripheral blood neutrophils by phorbol myristate acetate, fMLP, and granulocyte-macrophage colony-stimulation factor. *Blood* 1998; 15:649-55.
- Tanaka K, Yamamoto A, Fujita T. Functional expression and adaptive regulation of Na⁺ - dependent neutral amino acid transporter SNAT2/ATA2 in normal human astrocytes under amino acid starved condition. *Neurosci Lett*. 2005;378:70-5
- Tang G, Wang M, Tang X, Luo L, Gan M. Pharmacokinetics and radiation dosimetry estimation of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine as oncologic PET tracer. *Appl Radiat Isot* 2003;58:219-25.
- Thongsong B, Subramanian RK, Ganapathy V, Prasad PD. Inhibition of amino acid transport system a by interleukin-1 β in trophoblasts. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:495-503.
- Torrents D, Estevez R, Pineda M, Fernandez E, Lloberas J, Shi YB, Zorzano A, Palacin M. Identification and characterization of a membrane protein (y⁺L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y⁺L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* 1998;273:32437-45.
- Townsend DW, Carney JP, Yap JT, Hall NC. PET/CT today and tomorrow. *J Nucl Med* 2004;45, Suppl 1:4S-14S.
- Uchida Y, Minoshima S, Kawata T, Motoori K, Nakano K, Kazama T, Uno T, Okamoto Y, Ito H. Diagnostic value of FDG PET and salivary gland scintigraphy for parotid tumors. *Clin Nucl Med* 2005;30:170-6.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 1996;271:14883-90.
- Vadgama JV, Christensen HN. Wide distribution of pH-dependent service of transport system ASC for both anionic and zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1984;259:3648-52.
- Van Waarde A, Jager PL, Ishiwata K, Dierckx RA, Elsinga PH. Comparison of Sigma-Ligands and Metabolic PET Tracers for Differentiating Tumor from Inflammation. *J Nucl Med*. 2006;47:150-4.
- Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM. Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 1988;263:3150-63.
- Van Winkle LJ, Christensen HN, Campione AL. Na⁺-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J Biol Chem* 1985;260:12118-23.
- Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 2004;447:532-542.
- Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier MH, Pfeiffer R. New glycoprotein-associated amino acid transporters. *Membr Biol* 1999;172:181-192.
- Verrey F. System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch* 2003;445:529-533.
- Voth M, Opfermann T, Gottschild D. The value of fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) in differentiation of pancreatic lesions. *Zentralbl Chir* 2003;128:375-8.

- Wagner CA, Lang F, Broer S. Function and structure of heterodimeric aminoacid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1077-93.
- Wahl RL and Fisher SJ. A comparison of FDG, L-methionine and thymidine accumulation into experimental infections and reactive lymph nodes. *J Nucl Med* 1993;34:104.
- Walls EV, Borghetti AF, Benzie CR, Kay JE. Early events during activation of human lymphocytes by the mitogenic monoclonal antibody OKT3. *Cell Immunol* 1984;89:30-38.
- Wang H, Huang W, Sugawara M, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V. Cloning and functional expression of ATA1, a subtype of amino acid transporter A, from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273:1175-9.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-314.
- Weber W, Bartenstein P, Groß M, Kinzel D, Daschner M, Feldman HJ, Reidel G, Ziegler SI, Lumenta C, Rolls M, Schwaiger M. Fluorine-18-FDG PET and Iodine-123-IMT SPECT in the evaluation of Brain Tumors. *J Nucl Med* 1997;38:802-808.
- Weber WA, Wester HJ, Grosu AL, Herz M, Dzewas B, Feldmann HJ, Molls M, Stocklin 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 Mol Imaging* 2000; 27:542-549.
- Weckesser M, Langen KJ, Rickert CH, Kloska S, Straeter R, Hamacher K, Kurlmann G, Wassmann H, Coenen HH, Schober O. O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET in the clinical evaluation of primary brain tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:422-429.
- 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;40:205-212.
- White MF and Christensen HN. Simultaneous Regulation of Amino Acid Influx and Efflux by System A in the Hepatoma Cell HTC. *J Biol Chem* 1983; 258:8028-38.
- Wienhard K, Herholz K, Coenen HH, Rudolf J, Kling P, Stocklin G, Heiss WD. Increased amino acid transport into brain tumors measured by PET of L-(2-18F)fluorotyrosine. *J Nucl Med* 1991;32:1338-1346.
- Wilson CB. PET scanning in oncology. *Eur J Cancer* 1992;28:508-10.
- Wurker M, Herholz K, Voges J, Pietrzyk U, Treuer H, Bauer B, Sturm V, Heiss WD. Glucose consumption and methionine uptake in low-grade gliomas after iodine-125 brachytherapy. *Eur J Nucl Med* 1996;23:583-586.
- Yamada S, Kubota K, Kubota R, Ido T, Tamahashi N. High accumulation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in turpentine-induced inflammatory tissue. *J Nucl Med* 1995;36:1301-6.
- Yamada Y, Uchida Y, Tatsumi K, Yamaguchi T, Kumura H, Kitahara H, Kuriyama T. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose and carbon-11-methionine evaluation of lymphadenopathy in sarcoidosis. *J Nucl Med* 1998; 39:1160-1166.
- Yamaura G, Yoshioka T, Fukuda H, Yamaguchi K, Suzuki M, Furumoto S, Iwata R, Ishioka C. O-[(18F)fluoromethyl-L: -tyrosine is a potential tracer for monitoring tumour response to chemotherapy using PET: an initial comparative in vivo study with deoxyglucose and thymidine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006; 33:1134-9.

- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514:291-302
- Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA, Erickson JD. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem* 2000;275:22790-7.
- Yasukawa T, Yoshikawa K, Aoyagi H, Yamamoto N, Tamura K, Suzuki K, Tsujii H, Murata H, Sasaki Y, Fujisawa T. Usefulness of PET with ¹¹C-Methionine for the detection of hilar and mediastinal lymph node metastasis in lung cancer. *J Nucl Med* 2000;41:283-290.
- Young JD, Mason DK, Fincham DA. Topographical similarities between harmaline inhibition sites on Na⁺-dependent amino acid transport system ASC in human erythrocytes and Na⁺-independent system asc in horse erythrocytes. *J Biol Chem*. 1988 Jan 5;263:140-3.
- Zhang Z, Machac J, Helft G, Worthley S, Tang C, Zaman A, Rodriguez O, Buchsbaum M, Fuster V, Badimon J. Non-invasive imaging of atherosclerotic plaque macrophage in a rabbit model with F-18 FDG PET: A histopathological correlation. *BMC Nucl Med* 2006;6:3.

VERÖFFENTLICHUNG

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Stöber B., Tanase U., Herz M., Seidl C., Schwaiger M., Senekowitsch-Schmidtke R.
Differentiation of tumour and inflammation: characterisation of [methyl-3H]methionine (MET) and O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET) uptake in human tumour and inflammatory cells. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2006;33:932-9.

DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. phil. Dr. med. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die geduldige und motivierende Betreuung dieser Arbeit, ihre Unterstützung bei der Durchführung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München. Besonders danke ich ihr für die Möglichkeit der Teilnahme an nuklearmedizinischen Fachkongressen und die Unterstützung bei der Publikation von Ergebnissen.

Frau Barbara Stöber danke ich für viele praktische Tipps, ihren Schwung und die Energie bei der gemeinsamen Suche nach Lösungen und nicht zuletzt für ihre fröhliche Ausstrahlung. Danke für die erfolgreiche Zusammenarbeit, die sich im Lauf der Zeit zu einer guten Freundschaft entwickelt hat.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München, die mich während des experimentellen Teils dieser Arbeit hilfreich mit Rat und Tat unterstützt haben. Besonders danke ich Frau Dr. Harriet Philippi für die Einführung in die Techniken.

Herrn Michael Herz und der Arbeitsgruppe Radiochemie danke ich für die Synthese und Bereitstellung der verwendeten Tracer.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir ein liebevolles Zuhause geschenkt haben, mir das Medizinstudium ermöglichten und mir auf meinem ganzen bisherigen Lebensweg in allen Lagen zur Seite standen.