

Charakterisierung des Cholintransports in humane
Prostatakarzinomzellen
im Vergleich zu Kolonkarzinomzellen und zur
FDG-Aufnahme

Sebastian Andreas Müller

München 2007

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

**Charakterisierung des Cholintransports in humane
Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu Kolonkarzinomzellen
und zur FDG-Aufnahme**

Sebastian Andreas Müller

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. apl. Prof. Dr. B. J. Krause

Die Dissertation wurde am 23.11.2007 bei der technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2008 angenommen.

In Dankbarkeit
meinen sehr geliebten Eltern
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung.....</u>	<u>1</u>
<u>2. Zielsetzung.....</u>	<u>10</u>
<u>3. Material und Methoden.....</u>	<u>12</u>
3.1 Material.....	12
3.1.1 Zellen.....	12
3.1.2 Kulturmedien und Zusätze.....	13
3.1.3 Versuchspuffer.....	13
3.1.4 Radioaktive Substanzen.....	13
3.1.5 Hemmsubstanzen.....	14
3.1.6 Medikamente.....	14
3.1.7 Antikörper.....	14
3.1.8 Puffer für Gelelektrophorese und Western Blot.....	14
3.1.9 Chemikalien.....	15
3.1.10 Geräte.....	16
3.1.11 Gebrauchsmaterial.....	17
3.1.12 Software.....	17
3.2 Methoden.....	18
3.2.1 Zellkultivierung.....	18
3.2.1.1 Auftauen der Tumorzellen.....	18
3.2.1.2 Passagieren der Tumorzellen.....	20
3.2.1.3 Einfrieren der Tumorzellen.....	21
3.2.2 Charakterisierung der verwendeten Zellen.....	21
3.2.2.1 Proliferationstest.....	21
3.2.2.2 Bestimmung der Verdopplungszeit.....	21
3.2.3 Vorbereitung der Aufnahmeversuche.....	22
3.2.3.1 Überführen der Zellen in Versuchsmedium.....	22
3.2.3.2 Vitalitätsprüfung mit Trypanblau.....	22
3.2.3.3 Zellzahlbestimmung.....	22
3.2.3.4 Verdünnung des [³ H]Cholin auf die Versuchskonzentration.....	23
3.2.4 Durchführung der Aufnahmeversuche.....	23
3.2.4.1 [¹⁸ F]FDG Aufnahme-Versuche.....	24

3.2.4.2	[¹⁸ F]FDG-Efflux.....	25
3.2.4.3	[¹¹ C]Cholinaufnahme.....	25
3.2.4.4	[³ H]Cholinaufnahme.....	26
3.2.4.5	Zeitabhängige Aufnahme.....	27
3.2.4.6	NaCl-abhängige Cholinaufnahme.....	27
3.2.4.7	Auswirkung verschiedener (Hemm-) Substanzen auf die Aufnahme von [³ H]Cholin in LNCaP bzw. PC-3.....	28
3.2.4.8	Michalis-Menten-Kinetik.....	30
3.2.5	Behandlung der Zellen mit Bicalutamid bzw. Docetaxel.....	32
3.2.5.1	Herstellung der Bicalutamid- bzw. Docetaxellösung.....	32
3.2.5.2	Klonogener Proliferationsassay.....	32
3.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford.....	33
3.2.7	Nachweis des Cholintransporters mittels Western Blot.....	34
3.2.7.1	Theoretische Grundlagen.....	34
3.2.7.2	Herstellung der Gele.....	34
3.2.7.3	Lyse der Zellen.....	35
3.2.7.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page).....	36
3.2.7.5	Darstellung der Proteinmuster der Proben nach SDS-Page mittels Coomassie Blau Färbung.....	36
3.2.7.6	Blotting der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran.....	36
3.2.7.7	Nachweis von Cholintransportern auf der PVDF-Membran.....	37
4.	Ergebnisse.....	38
4.1	Charakteristika der verwendeten Tumorzelllinien.....	38
4.1.1	Größe der Zellen.....	38
4.1.2	Proliferationstest.....	38
4.1.3	Verdopplungszeit.....	40
4.2	Grundlagen der FDG-Aufnahme.....	41
4.2.1	FDG-Aufnahme in DU145.....	41
4.2.2	FDG-Efflux aus DU145.....	42
4.3	Bindung von [¹¹ C]Cholin in Eppendorfgläsern.....	43
4.4	Cholintransport in die Prostatakarzinomzelllinie DU145.....	44
4.5	Aufnahme von [¹⁸ F]FDG und [³ H]Cholin in die beiden Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 im Vergleich zur Kolonkarzinomzelllinie SW707.....	45
4.5.1	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707 in Abhängigkeit von der Zeit....	45
4.5.2	[³ H]Cholinaufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707 in Abhängigkeit von der Zeit....	47
4.6	[³ H]Cholinaufnahme in die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 in Abhängigkeit von der Zeit und von NaCl.....	48
4.7	Hemmung der Aufnahme von [³ H]Cholin.....	50
4.7.1	Hemmung der [³ H]Cholinaufnahme durch kaltes Cholin und HC-3 in LNCaP- und PC-3-Zellen.....	50
4.7.2	Beeinträchtigung der [³ H]Cholinaufnahme in LNCaP- und PC-3-Zellen durch kaltes Cholin, HC-3, TEA, Guanidin und Ouabain.....	51

4.8 Michaelis-Menten-Kinetik.....	52
4.9 Behandlung von LNCaP und PC-3 mit Bicalutamid und Docetaxel.....	56
4.9.1 Beeinträchtigung der Zellproliferation durch Bicalutamid und Docetaxel.....	56
4.9.2 Einfluss von Bicalutamid und Docetaxel auf die spezifische Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 (Michaelis-Menten-Kinetik).....	57
4.9.3 Einfluss von Bicalutamid und Docetaxel auf die Gesamtcholinaufnahme in LNCaP und PC-3.....	59
4.10 Western Blot.....	62
4.10.1 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinbanden nach SDS-Page.....	62
4.10.2 Darstellung der Proteinmuster der Zelllysate für den Western Blot nach SDS-Page.....	62
4.10.3 Nachweis des hochaffinen Cholintransporters (CHT1) im Western Blot.....	63
<u>5. Diskussion.....</u>	<u>65</u>
<u>6. Zusammenfassung.....</u>	<u>74</u>
<u>7. Literaturverzeichnis.....</u>	<u>76</u>
<u>8. Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>81</u>
<u>9. Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>85</u>
<u>10. Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>87</u>
<u>11. Danksagung.....</u>	<u>89</u>

1. Einleitung

Unter allen Tumorneuerkrankungen bei Männern ist das Prostatakarzinom mit ca. 20% in Deutschland am häufigsten. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 70 Jahre, wobei 90% der Betroffenen älter als 60 Jahre sind; bei unter 50-Jährigen werden praktisch keine Prostatakarzinomata beobachtet. Folglich handelt es sich beim Prostatakarzinom um eine Erkrankung des älteren und alten Mannes. Mit einer Mortalität von 10% liegt das Prostatakarzinom in Deutschland an dritter Stelle hinter dem Bronchial- und Kolonkarzinom (Rohde et al. 2007, S.7). Bei einem sehr langsamen Wachstum kommt das Prostatakarzinom allerdings viel häufiger vor, ohne Todesursache zu sein: Bei über 80% der 70- bis 80-Jährigen wurde in Autopsien ein zuvor klinisch nicht manifestes Prostatakarzinom bzw. eine intraepitheliale Neoplasie der Prostata entdeckt (Sanchez-Chapado et al. 2003, S.238). Dieses Phänomen lässt sich mit dem typischen Verlauf des Prostatakarzinoms erklären: Es entwickelt sich in der Regel aus mehreren kleinen, heterogenen, symptomlosen, androgenabhängigen, langsam wachsenden Neoplasien, die über mehrere Jahre schrittweise eine Progression zum aggressiv wachsenden androgenunabhängigen Karzinom erfahren können, wobei diese Progression nicht nach einem festen Schema abläuft und auch nicht stattfinden muss (Craft et al. 1999, S.5030; Chen et al. 2004, S.33). Das klinische Bild des Prostatakarzinoms ist weit gefächert: von langsam wachsenden, klinisch stummen bis aggressiven, metastasierenden Formen (Schöder et al. 2004, S.274).

Noch häufiger als bösartige Neuerkrankungen der Prostata tritt die benigne Prostatahyperplasie (BPH) auf. 50% der 60-Jährigen und 90% der über 80-Jährigen sind davon betroffen. Neben den Herz-Kreislaufkrankungen zählen die Prostataerkrankungen – sowohl BPH als auch Prostatakarzinom – zu den häufigsten Erkrankungen bei älteren Männern (Rohde et al. 2007, S.7).

Das statistische Bundesamt gab für 2002 als direkte Krankheitskosten in Deutschland allein durch bösartige Neubildungen der Prostata 1,2 Milliarden Euro an, was 0,5% aller direkten Krankheitskosten entsprach. Die genannten Zahlen verdeutlichen die großen medizinischen, gesellschaftlichen und ökonomischen Herausforderungen, die das Prostatakarzinom in einer immer älter werdenden Gesellschaft mit sich bringt.

Große Probleme stellen die Früherkennung des Prostatakarzinoms und die sichere Abgrenzung von der BPH dar. Im Falle der richtigen Diagnosestellung „Prostatakarzinom“ ist es bisher unmöglich vorherzusagen, ob es sich um ein eher langsam oder um ein aggressiv wachsendes und früh metastasierendes Karzinom handelt. Zwar sieht das gesetzliche Früherkennungsprogramm jährlich ab dem Alter von 45 Jahren neben einer Hautuntersuchung eine digitale rektale Untersuchung vor, im Jahr 2004 haben sich in Deutschland aber nur 18,3% der Männer daran beteiligt. Zudem ist die Rate der mit digitaler rektaler Untersuchung

diagnostizierten Karzinome mit 2-5%, wovon 50% bereits nicht mehr heilbar sind, außerordentlich gering (Ito et al. 2001, S.744).

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Diagnosestellung des Prostatakarzinoms ist der Tumormarker PSA (Prostata spezifisches Antigen). Zwar ist die Sensitivität mit über 90% recht hoch, doch die Spezifität von 40% sehr gering (Altwein et al. 2000, S.28). Fehlende Verlässlichkeit kommt durch falsch negative Ergebnisse unterhalb des Grenzwertes von 4 ng/ml (80 - 85% der Männer) und falsch positive Ergebnisse bei Werten darüber zustande. Mögliche Ursachen für erhöhte PSA-Werte ohne Vorliegen eines Karzinoms können BPH, Eingriffe am unteren Harntrakt, Harnwegsinfekte und Leberfunktionsstörungen sein (Fornara et al. 2004, S.1820). In der Grauzone zwischen 4 und 10 ng/ml (10 - 15% der Männer) fällt vor allem die Unterscheidung von BPH und Prostatakarzinom schwer. Insgesamt werden durch Bestimmung des PSA ca. 75% aller asymptomatischen Prostatakarzinomata entdeckt (Ito et al. 2001, S.744). Ziel dabei muss es sein, die Karzinomata in einem auf die Prostata begrenzten und damit noch heilbaren Stadium zu entdecken. Bei einem PSA-Wert unter 4 ng/ml sind 90%, bei einem Wert über 10 ng/ml aber nur noch 50% organbegrenzt (Rohde et al. 2007, S.12-13). In zwei großen randomisierten Studien mit je 74000 Teilnehmern („European randomized study of screening for prostate cancer“; „Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Screening Trial of the National Cancer Institute“) wird gegenwärtig der Einfluss des PSA-Screenings auf die Sterblichkeitsrate untersucht. Die Ergebnisse werden allerdings nicht vor 2008 erwartet (Schröder 2003, S.239).

Bei auffälligem Tastbefund oder suspektem PSA-Wert sollte im diagnostischen Procedere eine Biopsie zur histologischen Diagnosesicherung folgen. Diese erfolgt in der Regel Ultraschall gesteuert transrektal, wobei mindestens sechs Proben, drei aus jedem Lappen entnommen werden sollten. Die Trefferrate einer Biopsie ist abhängig von der Lokalisation des Karzinoms: Sie ist gut im Bereich der dorsalen Kapsel, von der eine Großzahl der Karzinomata ausgehen, aber im Bereich des Apex prostatae limitiert (Wefer et al. 2000, S.400).

Die zur Diagnostik ebenfalls eingesetzten bildgebenden Verfahren wie die transrektale Sonographie, die Computertomographie (CT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT) sind zwar in gewissem Maß geeignet, vor allem unspezifische Veränderungen auch an für die Biopsie schwer zugänglichen Arealen der Prostata darzustellen. Morphologisch können diese Veränderungen aber nicht immer klar einem Prostatakarzinom, einer BPH oder einem anderen zugrunde liegenden Prozess zugeordnet werden und spielen daher in der Routinediagnostik – abgesehen von der ultraschallgesteuerten Biopsie – eine untergeordnete Rolle (Scher et al. 2007, S.45).

Wird nun ein Prostatakarzinom diagnostiziert, ist die Frage der lokalen Tumorausdehnung und der eventuell schon stattgefundenen Metastasierung in Lymphknoten bzw. andere Organe, insbesondere Knochen von entscheidender Bedeutung für Therapie und Prognose des Patienten. Verfahren der Wahl für das so genannte Staging sind momentan die CT zur Beurteilung der pelvinalen Lymphknoten sowie die Knochenszintigraphie zur Beurteilung des Knochens auf Metastasen. Gerade bei der Abklärung eines Lymphknotenbefalls ist die Aussagekraft der CT jedoch gering, da lediglich eine pathologische Vergrößerung der Lymphknoten, die verschiedene Ursachen haben kann, beurteilt werden kann (Purohit et al. 2003, S.280), so dass zum Staging bisher eine Entfernung von verdächtig großen Lymphknoten zur histologischen Beurteilung nötig ist (Breeuwsma et al. 2005, S.668). Zwar können neue MRT-Kontrastmittel (monokristalline Eisenoxide) mit relativ hoher Sensitivität Lymphknotenmetastasen beim Prostatakarzinom nachweisen (Harisinghani et al. 2003,

S.2491). Diese Methode steht aber noch nicht flächendeckend zur Verfügung und lässt nicht gleichzeitig eine Beurteilung der Knochen zu.

Eine sichere Diagnose inklusive Staging bzw. eine verlässliche Verlaufskontrolle bei bereits therapierten Patienten ist von entscheidender Bedeutung für die Wahl der Therapie und die Prognose von Patienten mit Prostatakarzinom. Dabei ist es wichtig, ob das Karzinom auf die Prostata begrenzt oder bereits organüberschreitend ist. Bei einem organbegrenzten Karzinom und einer voraussichtlichen Lebenserwartung von mindestens zehn Jahren sollte primär eine operative radikale Prostatektomie in kurativer Absicht angestrebt werden. Bei Kontraindikationen für eine Operation kann alternativ ebenfalls in kurativer Absicht eine perkutane Bestrahlung oder Brachytherapie des Karzinoms erfolgen.

Vor dem Hintergrund des sehr langsamen Wachstums des Prostatakarzinoms wird vor allem in Skandinavien bei älteren Patienten nach der Methode des „kontrollierten Zuwartens“ („Watchful-Waiting“) vorgegangen: Unter regelmäßiger Kontrolle des PSA-Wertes und gegebenenfalls Biopsien der Prostata wird eine Therapie erst bei Auftreten von krankheitsspezifischen Symptomen bzw. plötzlicher signifikanter Veränderungen der Verlaufparameter begonnen (Rhode et al. 2007, S.13).

Hat das Karzinom die Organgrenzen der Prostata bereits überschritten bzw. ist es metastasiert, kann eine Hormontherapie durch operative oder medikamentöse Kastration bzw. durch medikamentöse Androgenrezeptorblockade (z.B. Bicalutamid) ggf. in Kombination mit einer palliativen Strahlentherapie begonnen werden. Zu Beginn einer antiandrogenen Therapie kann in 80% der Fälle ein Rückgang des Karzinoms beobachtet werden (Kotzerke et al. 2002, S.200). Durch den fehlenden Wachstumsstimulus des Testosterons auf das Karzinom kann das Fortschreiten der Erkrankung um zwei bis vier Jahre hinausgezögert werden. Allerdings werden die Tumorzellen im weiteren Verlauf der Erkrankung in der Regel androgenunabhängig, so dass die Hormontherapie mit der Zeit an Wirkung verliert. In vitro konnte durch eine intermittierende Behandlung von androgenabhängigen Prostatakarzinomzellen mit Antiandrogenen die Dauer bis zum Einsetzen des hormonrefraktären Stadiums zwar verdreifacht, aber auch nicht gänzlich verhindert werden (Sato et al. 1996, S.139).

Erst im hormonrefraktären Stadium ist der Einsatz einer Chemotherapie als ultima Ratio sinnvoll. Chemotherapeutika wirken im Allgemeinen gut auf sich schnell teilende Tumorgewebe. Da das Prostatakarzinom aber in den meisten Fällen ein langsam wachsendes Adenokarzinom ist, ist die Wirkung von Chemotherapeutika hier begrenzt. Ein früherer Einsatz verbessert die Prognose nicht. Verwendet werden moderne Substanzen aus der Gruppe der Taxane (z.B. Docetaxel) (Rohde et al. 2007, S.15).

Vor dem Hintergrund, dass nur 50% der Prostatakarzinomata im lokalisierten Stadium diagnostiziert werden (Kotzerke et al. 2002, S.200) und die herkömmlichen Methoden, wie bereits dargestellt, sowohl zur Diagnostik als auch zum Staging in ihrer Aussagekraft limitiert sind, bedarf es hierfür neuer Methoden mit dem Ziel einer sicheren Diagnose des Karzinoms in einem möglichst frühen und damit noch heilbaren Stadium.

Für die Beurteilung anderer Tumorentitäten als das Prostatakarzinom hat sich die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), ein dreidimensionales nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren, im klinischen Alltag etabliert. Der große Vorteil für onkologische Fragestellungen liegt in der Möglichkeit einer nicht invasiven Ganzkörperdarstellung. Im Gegensatz zu den Schnittbildverfahren CT und MRT, die die Morphologie von Körper und

Organen abbilden, stellt die PET als funktionelles Verfahren Stoffwechselvorgänge dar. Neuerdings können die Vorteile einer funktionellen Stoffwechseldarstellung durch die PET mit den Vorteilen einer hohen morphologischen Ortsauflösung durch die CT in einem Untersuchungsgang kombiniert werden, was zu einer höheren Aussagekraft der Ergebnisse führt und vermehrt in der Tumordiagnostik Verwendung findet. Allerdings stehen bisher weltweit nur etwa 800 PET/CTs zur Verfügung, so dass eine flächendeckende Nutzung noch nicht möglich ist (Blodgett et al. 2007, S.360).

Das Prinzip der PET beruht auf der Verwendung von Positronenstrahlern. Das sind Atomkerne mit Protonenüberschuss, die durch Übergang eines Protons in ein Neutron ein positiv geladenes Elektron (Positron = β^+) emittieren. Durch Vereinigung mit einem Elektron (β^-) in unmittelbarer Nähe zum Entstehungsort des Positrons wird die Masse beider Teilchen in Strahlungsenergie umgewandelt (Vernichtungsstrahlung). Dabei werden zwei γ -Quanten mit der Energie von je 511 keV frei, die sich in diametral entgegengesetzter Richtung vom Ursprungsort fortbewegen (Sauer 2001, S.13-14). Diese können von einem entsprechenden PET-Scanner gemessen und unter Berücksichtigung der Richtung und des zeitlichen Eintreffens genau einem Punkt in einem dreidimensionalen Raum zugeordnet werden. Aus vielen einzelnen registrierten Punkten entstehen dann die Schnittbilder.

Die β^+ -emittierende Radioisotope

^{11}C	20,3 min HWZ
^{13}N	10,0 min HWZ
^{15}O	2,0 min HWZ
^{18}F	109,7 min HWZ

lassen sich in Verbindungen einbauen, die im Metabolismus eine wichtige Rolle spielen. Dabei werden die entsprechenden Atome durch die jeweiligen Radioisotope ersetzt. Das Halogen ^{18}F wird anstelle von Wasserstoff eingebaut. Die synthetisierten Radionuklidverbindungen haben die gleiche Strukturformel wie die natürlichen Verbindungen, so dass sie bei den biochemischen Stoffwechselvorgängen gleichermaßen verwendet werden und der entsprechende Stoffwechselvorgang in der PET dargestellt werden kann.

Besondere Bedeutung kommt der ^{18}F markierten Desoxyglukose (DG) zu. [^{18}F]Fluorodeoxyglukose ([^{18}F]FDG) gibt als Glukoseanalogon Aufschlüsse über den Glukosestoffwechsel von Zellen und Organen. Glukose, DG wie auch [^{18}F]FDG werden in die Zellen über Glukosetransporter (GLUT) aufgenommen und intrazellulär durch die Hexokinase phosphoryliert (=erster Schritt der Glykolyse). Die Glukose wird weiter verstoffwechselt. Phosphorylierte DG bzw. [^{18}F]FDG werden nicht weiter verstoffwechselt, können die Zelle aber auch nicht mehr verlassen, so dass sich diese Verbindungen intrazellulär anreichern (metabolic trapping). Somit kann ein erhöhter Glukosebedarf, wie er in Tumoren, aber auch in Entzündungen vorkommt, mit [^{18}F]FDG-PET dargestellt werden (Moser 2001, S.529). Der erhöhte Glukosebedarf in entzündeten Geweben bzw. Tumoren spiegelt sich in einer Hochregulation des Glukosetransporters GLUT1 sowie einer erhöhten Aktivität der Hexokinase wider. Die [^{18}F]FDG-PET ermöglicht neben der Charakterisierung von Tumoren, insbesondere Staging, auch die Verlaufskontrolle maligner Tumoren nach Behandlung mit Chemo- bzw. Radiotherapie, so dass schon recht früh während der Behandlung Aussagen über das Ansprechen des Tumors auf die Therapie und deren Effektivität gemacht werden können (Weber et al. 2000, S.686-687).

Eine hohe natürliche [^{18}F]FDG-Aufnahme findet sich im Gehirn – besonders in der grauen Substanz – sowie in Herz, Niere und Blase, in letzteren aufgrund der renalen Ausscheidung von [^{18}F]FDG. Daher eignet sich die [^{18}F]FDG-PET schlecht zur Beurteilung von Entzündungen bzw. Tumoren in den genannten Organen (Hara 2002, S.267). Die Beurteilung der Prostata wird aufgrund der anatomischen Nähe durch das erhöhte Blasensignal erschwert. Außerdem zählt das Prostatakarzinom zu den wenigen Tumoren, die keine erhöhte [^{18}F]FDG-Aufnahme zeigen, so dass mit [^{18}F]FDG nicht zwischen BPH, Karzinom, postoperativer Narbe oder Karzinomrezidiv unterschieden werden kann (Hofer et al. 1999, S.31; Jager et al. 2005, S.28-29). Diese Tatsachen machen [^{18}F]FDG für die Darstellung des Prostatakarzinoms in der PET ungeeignet.

Für PET stehen noch weitere Tracer zur Verfügung, die neben dem Energiestoffwechsel ([^{18}F]FDG) unterschiedliche Stoffwechselfvorgänge darstellen, beispielsweise den Protein-Metabolismus mit Aminosäuren ([^{11}C]Methionin), den DNA-Metabolismus ([^{18}F]FLT), den Lipidmetabolismus von Zellmembranen ([^{11}C]Acetat, [^{11}C]Cholin) oder den Metabolismus biogener Amine ([^{18}F]DOPA) (Jager et al. 2005, S.27).

Der Nutzen von [^{11}C]Acetat für die Diagnostik des Prostatakarzinoms in der PET wird diskutiert. Acetat ist ein wichtiger Baustein für die Zellmembransynthese, dessen Bedarf beim Prostatakarzinom wegen der gesteigerten Proliferationsrate erhöht ist (Schöder et al. 2004, S.276). Es zeigte sich eine bessere Eignung von [^{11}C]Acetat verglichen mit [^{18}F]FDG für die Darstellung des Prostatakarzinoms in der PET (Oyama et al. 2002, S.185). Auf der anderen Seite stellte es sich als wenig tumorspezifisch heraus: Eine erhöhte Aufnahme wurde auch in gesundem Prostatagewebe bei Männern unter 50 Jahren sowie bei BPH beobachtet. Für eine abschließende Beurteilung fehlen allerdings noch umfangreichere Studien zur Verwendung von [^{11}C]Acetat beim Prostatakarzinom, die sich bis 2004 auf 150 Patienten beliefen (Schöder et al. 2004, S.277).

Wie Acetat ist Cholin ein wichtiger Baustein für die Phospholipide der Zellmembran. Außerdem wird Cholin für die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin benötigt. Durch Oxidation des Cholins entsteht Betain, ein wichtiger Methylgruppendonator. Cholinphospholipide sind an der Signaltransduktion über die Zellmembran beteiligt. Ferner ist Cholin Bestandteil des Plättchen-Aktivierungsfaktors (Platelet Activating Factor) (Zeisel et al. 1991, S.2093; Zeisel et al. 1994, S.270-277; Blusztajn 1998, S.794). Zudem spielt Cholin eine essentielle Rolle bei der pränatalen Entwicklung des Gehirns (Cermak et al. 1998, S.349). Cholin wird nach Aufnahme in die Zelle durch die Cholinkinase zum Phosphorylcholin phosphoryliert, das die Zelle nicht mehr verlassen kann (metabolic trapping). Aus Phosphorylcholin entsteht dann Phosphatidylcholin (Kennedy Pathway), das auch wieder zum Phosphorylcholin abgebaut werden kann. Phosphatidylcholin ist das in der menschlichen Zellmembran am häufigsten vertretene Phospholipid und bildet mit anderen Phospholipiden die charakteristische „Bilayer-Struktur“ der Zellmembranen (Cullis et al. 1991).

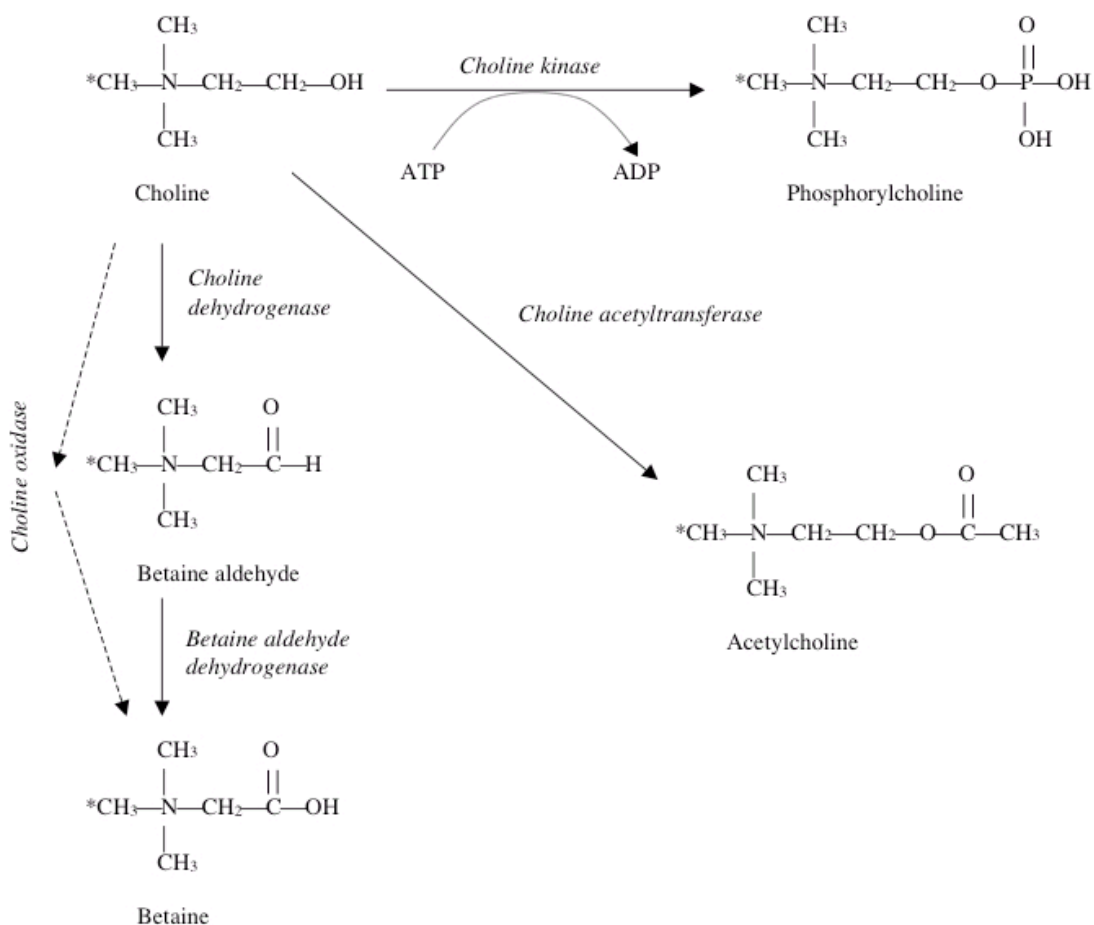


Abb. 1: Die drei Hauptstoffwechselwege des Cholin: Cholin kann zum Betain oxidiert, zum Acetylcholin acetyliert und zum Phosphorylcholin phosphoryliert werden. Phosphorylcholin wird für die Zellmembransynthese weiter zum Phosphatidylcholin verstoffwechselt (Kennedy Pathway).

* Position für die radioaktive Markierung mit ^{11}C bzw. ^3H ; bei der Markierung mit ^3H werden alle drei H-Atome am gekennzeichneten C-Atom durch ^3H ersetzt. (aus: Roivainen et al. 2000, S.26)

Cholin wird in der Regel sehr schnell aus dem Blut aufgenommen und in den Zellen metabolisiert. Im Rahmen einer PET-Untersuchung mit [^{11}C]Cholin konnten im arteriellen Plasma 1 min nach i.v.-Injektion noch 98%, nach 5 min 62% und nach 10 min nur noch 32% des applizierten [^{11}C]Cholin gemessen werden (Roivainen et al. 2000, S.29), wobei der Anteil des phosphorylierten Cholin innerhalb der ersten 15 min linear anstieg (DeGrado et al. 2001, S.1807). Die schnelle Aufnahme und die rasch einsetzende Verstoffwechslung von Cholin ermöglichen PET-Aufnahmen wenige Minuten nach Injektion des radioaktiv markierten Cholin.

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise die quartäre Ammoniumbase Cholin schnell in die Zellen aufgenommen wird. Cholin ist bei physiologischem pH einfach positiv geladen. Aufgrund ihrer Ladung können Kationen (wie auch die negativ geladenen Anionen) Zellmembranen nicht ohne weiteres durchdringen. In der Regel sind spezielle Transporter unter Verbrauch von Energie daran beteiligt, entweder selektiv eine Substanz oder unspezifisch eine Stoffgruppe über die Membran zu transportieren. Ein Beispiel für ein

Transportsystem, das unspezifisch Kationen über die Membran transportiert, ist die Familie der organischen Kationen Transporter (OCT).

Da jede Zelle für die Zellmembransynthese Cholin benötigt, ist davon auszugehen, dass auch jede Zelle – bei fehlender Cholinsynthesefähigkeit – über ein Transportsystem für Cholin verfügt. Bisher sind für verschiedene Gewebe Cholintransporter beschrieben worden. Im Wesentlichen werden zwei Gruppen von Cholintransportern (CHT) unterschieden: der hochaffine CHT1 und der niedrigaffine CHT2. Der niedrigaffine CHT2 kommt ubiquitär im Körper vor und ist für die Bereitstellung von Cholin für die Stoffwechselfvorgänge der Zelle verantwortlich. Der hochaffine CHT1 dient ausschließlich der Bereitstellung von Cholin zur Acetylcholinsynthese in der cholinergen Präsynapse (Lockman et al. 2002, S.753) und kommt bevorzugt im Zentralen Nervensystem vor (Kus et al. 2003, S.341). Inzwischen wurden noch weitere Cholintransportsysteme beschrieben, die von der Einteilung Lockmans (Tab. 1) abweichen. Z.B. entdeckten Friedrich et al. (2001, S.300) ein hochaffines, NaCl-unabhängiges Transportsystem für Cholin in Rattenkapillarendothelzellen. Hoffmann et al. (2002, S.118) fanden in Keratinozyten ebenfalls ein hochaffines, NaCl-unabhängiges Transportsystem.

Die Affinität eines Transporters (=Enzym) zu seinem Substrat lässt sich mit Hilfe der so genannten Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben. Wenn alle Transporter mit Substrat besetzt sind, wird pro Zeiteinheit ein Maximum an Substrat in die Zelle transportiert. Der Transport läuft also mit der maximalen Geschwindigkeit v_{\max} ab. Auch eine höhere Substratkonzentration kann die Aufnahme nicht beschleunigen. Als K_M -Wert oder Michaeliskonstante wird diejenige Substratkonzentration bezeichnet, die für die halbmaximale (Transport-) Geschwindigkeit benötigt wird. Je niedriger der K_M -Wert desto höher ist die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat und umgekehrt. Neben der Affinität spielen bei der Einteilung der beiden Transporter nach Lockman noch weitere Eigenschaften eine Rolle, die in Tab. 1 zusammengefasst sind.

Tab.1: Eigenschaften von CHT1 und CHT2 (nach Lockman et al. 2002, S.753)

Cholintransporter	CHT1	CHT2
Affinität	hoch	niedrig
K_M	<10 μ M	30-100 μ M
Vorkommen	Cholinerge Präsynapse	Ubiquitär
Bereitstellung von Cholin für	Acetylcholinsynthese	Phospholipidsynthese
Hemicholinium-3-Hemmbarkeit K_i	0,001-0,1 μ M	100 μ M
NaCl-Abhängigkeit	ja	Nein

Im Gegensatz zu Na^+ -abhängigen Glukosetransportern (Hediger et al. 1994, S.993) zeigt der hochaffine CHT1 sowohl Na^+ - als auch Cl^- -Abhängigkeit (Kuhar et al. 1978, S.251).

Michel et al. (2006, S.493) geben für die Cholinaufnahme drei sättigbare proteinvermittelte Transportsysteme an:

1. Ein diffusionsähnliches System mit K_M -Werten >100 μ M, wobei der Cholingradient treibende Kraft ist (OCT).
2. Ein hochaffines, NaCl-abhängiges System für die Acetylcholinsynthese mit einem K_M -Wert von 0,5-3 μ M und sehr guter Hemmbarkeit durch HC-3 (CHT1).
3. Ein intermediäraffines, NaCl-unabhängiges Transportsystem mit K_M -Werten von 20-200 μ M für die Phospholipidsynthese, das durch Cholintransporter ähnliche Proteine vermittelt wird (choline transporter-like (CTL1) proteins).

Diese Einteilung ist der von Lockman et al. (Tab.1) sehr ähnlich, wobei die unter 2. und 3. genannten Transportsysteme dem CHT1 und CHT2 entsprechen. Es wird zusätzlich noch der unspezifische Cholintransport über die OCT-Familie (1.) aufgenommen.

Tumoren besitzen eine erhöhte Proliferationsrate und damit einen erhöhten Bedarf an Bausteinen für die Zellmembran. Breeuwsma et al. (2005, S.668) konnten für das Prostatakarzinom zwar keinen direkten Zusammenhang zwischen [^{11}C]Cholinaufnahme und Zellproliferation nachweisen, dennoch sind die Cholinaufnahme, die Aktivität der Cholinkinase sowie der Spiegel an Phosphorylcholin im Prostatakarzinom erhöht (Ramirez de Molina et al. 2002, S.580; Schöder et al. 2004, S.277). Die Cholinkinase wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, chemische Karzinogene und Onkogene verstärkt aktiviert und exprimiert (Hernandez-Alcoceba et al. 1999, S.3112). Zudem wurden erhöhte Aktivitäten der Phospholipid spaltenden Enzyme Phospholipase A2 und D (Guthrie et al. 1994, S.11; Noh et al. 2000, S.207) und eine Erhöhung des Cholintransportrate in verschiedenen Tumorzellen beobachtet (Katz-Brull et al. 1996, S.1375).

Für das Prostatakarzinom konnten Kurhanewicz et al. (1996, S.795; 2000, S.166) mittels Magnetresonanztomographie einen signifikant höheren Cholinpiegel als in gesundem Prostatagewebe bzw. BPH nachweisen. Ackerstaff et al. (2001, S.3599; 2003, S.525) bestätigten in Magnetresonanztomographieuntersuchungen eine Erhöhung von Phosphorylcholin und anderen Cholinverbindungen in vielen Tumoren verglichen mit gesundem Gewebe, besonders ausgeprägt im Mamma- und Prostatakarzinom und in verschiedenen Hirntumoren.

Hara et al. (1996, S.995) setzten [^{11}C]Cholin erstmals erfolgreich zur Darstellung des Prostatakarzinoms mittels PET ein. Ein großer Vorteil dabei ist, dass [^{11}C]Cholin nicht renal ausgeschieden wird und es so nicht zu Überlagerungen von Prostata und Blase kommt. Vielmehr wird [^{11}C]Cholin aufgrund seiner chemisch identischen Struktur mit nicht radioaktiv markiertem Cholin gleichermaßen für die Synthese von Phospholipiden verwendet und in die Zellmembranen eingebaut (Jager et al. 2005, S.30). Eine physiologisch erhöhte [^{11}C]Cholinaufnahme zeigte sich in Niere, Lunge, Nebenniere, Leber, Pankreas und Speicheldrüsen, weshalb sich [^{11}C]Cholin nicht zur Darstellung und Beurteilung maligner Prozesse insbesondere der Oberbauchorgane eignet (Roivainen et al. 2000, S.28; Hara 2002, S.267). Weitere Studien belegen die gute Eignung und den hohen Stellenwert von [^{11}C]Cholin zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung des Prostatakarzinoms und dessen Metastasen im PET bzw. PET/CT (Hara et al. 1998, S.990; de Jong et al. 2003, S.37; Picchio et al. 2003, S.1337; Sutinen et al. 2004, S.322; Jager et al. 2005, S.30; Reske et al. 2006, S.1249; Scher et al. 2007, S.45).

Vergleichende Studien mit [^{11}C]Cholin und [^{18}F]FDG zeigten, dass Tumoren im Allgemeinen, wenn keine Überlagerung durch eine physiologisch erhöhte Aufnahme in die jeweilig genannten Organe vorliegt, im PET mit [^{11}C]Cholin bereits ab einem Durchmesser von 5 mm dargestellt werden können, wohingegen die Detektionsgrenze mit [^{18}F]FDG bei 10 mm liegt (Hara 2002, S.267). Hinsichtlich der Unterscheidung von malignen und benignen Tumoren verschiedener Gewebe im PET konnte eine Gleichwertigkeit beider Tracer beobachtet werden, wobei [^{11}C]Cholin in Gehirn-, Kopf-, Hals-, Knochen- und Weichteiltumoren ein höheres Kontrastverhalten zeigte (Tian et al. 2004, S.1064). Verglichen mit MRT-Untersuchungen eignet sich [^{11}C]Cholin signifikant besser zur Darstellung primärer Prostatakarzinomherde (Yamaguchi et al. 2005, S.742).

Neben [^{11}C]Cholin wurde auch [^{18}F]Cholin, das gleichermaßen in Phospholipide eingebaut wird, erfolgreich zur Darstellung des Prostatakarzinoms im PET eingesetzt, wobei die mit 110 Minuten deutlich längere HWZ von ^{18}F (s. S.4) bei der Handhabung von Vorteil ist. Beide markierte Cholinmoleküle eignen sich gleich gut zur Darstellung von Karzinomherden, wobei [^{18}F]Cholin etwas schärfere Bilder lieferte (Hara et al. 2002, S.198). [^{18}F]Cholin ist wie [^{11}C]Cholin dem [^{18}F]FDG bei der Darstellung von Prostatakarzinomherden im PET deutlich überlegen (Price et al. 2002, S.273). Ein Nachteil des [^{18}F]Cholin ist die renale Ausscheidung. Zwar erfolgt die Aufnahme durch das Karzinom sehr rasch nach Injektion, deutlich vor der Ausscheidung und ermöglicht somit frühe Aufnahmen. Zu späteren Zeitpunkten kann die Beurteilung der Prostata aber durch Überlagerungen der Blase, die durch Einlegen eines Blasenkatheters zur kontinuierlichen Spülung der Blase minimiert werden können, erschwert sein (DeGrado 2001, S.1813; Hara et al. 2002, S.198). In Biodistributionsstudien konnte zudem festgestellt werden, dass aufgrund der [^{18}F]Cholinaufnahme in die Niere applizierte Aktivitäten von 4 MBq/kg Körpergewicht nicht überschritten werden sollten, um Strahlenschäden an den Nieren zu vermeiden (DeGrado et al. 2002, S.96). Insgesamt scheinen bisher die Vorteile des [^{11}C]Cholin bei der überlagerungsfreien Beurteilbarkeit der Prostata und geringerer Nebeneffekte auf gesunde Organe zu überwiegen, so dass vornehmlich [^{11}C]Cholin zur Diagnostik des Prostatakarzinoms eingesetzt wird (Hara et al. 1997, S.44). Ob sich ein Tracer durchsetzen wird oder beide je nach Fragestellung und Verfügbarkeit eingesetzt werden, wird sich in der Zukunft zeigen.

2. Zielsetzung

In klinischen Studien konnte die gute Eignung von [^{11}C]Cholin für die Diagnostik und Therapie-Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms mittels PET gezeigt werden. Dabei sind die verstärkte Cholinaufnahme in Karzinomgewebe gegenüber gesundem Gewebe, die geringe renale Ausscheidung sowie die schnelle Aufnahme des Cholins in die Zellen über Cholintransporter wichtige Faktoren.

Da bisher noch keine Untersuchungen zum Cholintransport in Prostatagewebe bzw. in das Prostatakarzinom auf zellulärer Ebene vorliegen, war es Ziel dieser Arbeit, den Cholintransport in die Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC-3 in vitro zu charakterisieren. Dazu sollten zunächst die Wachstumseigenschaften der verwendeten Tumorzelllinien durch Bestimmung der Verdopplungszeit untersucht werden.

Der Befund, wonach Prostatakarzinomherde [^{18}F]FDG nur unzureichend anreichern, sollte durch die vergleichende Aufnahme von Cholin und FDG sowohl in die Prostatakarzinomzelllinien als auch in die Kolonkarzinomzelllinie SW707 überprüft werden. Dabei diene die Kolonkarzinomzelllinie als ein Beispiel für hohe FDG-Aufnahme.

Zur weiteren Charakterisierung des Cholintransports in Prostatakarzinomzellen und Einordnung in die Transportergruppen CHT1 und CHT2 sollte die Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit, von NaCl und spezifischen und unspezifischen Hemmstoffen untersucht werden. Zudem sollte mithilfe der Michaelis-Menten-Kinetik eine Zuordnung des Cholintransports in Prostatakarzinomzellen zum hochaffinen bzw. niedrigaffinen Transportsystem ermöglicht werden.

Da die [^{11}C]Cholin-PET zur Verlaufskontrolle bei therapierten Patienten eingesetzt wird, sollte der Einfluss des Antiandrogens Bicalutamid sowie des Zytostatikums Docetaxel auf die Cholinaufnahme untersucht werden. Dazu wurden die Prostatakarzinomzellen für mehrere Tage mit den genannten Medikamenten behandelt, anschließend die Cholinaufnahme gemessen, sowie K_M und v_{\max} mittels Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt. Ein möglicher Einfluss der Therapeutika auf die Cholinaufnahme – abgesehen von dem zytotoxischen, Volumen verkleinernden Effekt – müsste bei der Auswertung von PET-Befunden therapierter Patienten berücksichtigt werden.

Schließlich sollte mit einem polyklonalen Antikörper gegen den humanen hochaffinen CHT1 das Vorhandensein des Cholintransporters in DU145-, LNCaP- und PC-3-Zellen mittels Western Blot nachgewiesen werden. Die Kolonkarzinomzelllinie SW707 sollte dabei als Negativkontrolle dienen. Als Positivkontrolle wurden humane Erythrozyten, Phäochromozytom- und Neuroblastomzellen verwendet.

Das abschließende Ziel war die umfassende Charakterisierung des Cholintransports in Prostatakarzinomzellen, die eine Zuordnung zum hoch- bzw. niedrigaffinen Transportsystem erlaubt. Zudem sollten die in vitro Untersuchungen die klinische Eignung von Cholin-PET im Rahmen der Prostatakarzinomdiagnostik und -verlaufskontrolle bestätigen. Die Cholinaufnahme in Zellen nach Inkubation mit Zytostatika sollte Hinweise mit Hinblick auf die Bewertung von Cholin-PET-Befunden bei therapierten Patienten liefern.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Alle verwendeten Tumorzelllinien wachsen adhärent.

Humane Prostatakarzinomzelllinien:

DU145 (Gehirnmetastase)	Forschungslabor der Urologischen
LNCaP (Lymphknotenmetastase)	Klinik und Poloklinik der
PC-3 (Knochenmetastase)	Technischen Universität München

Die LNCaP Zellen sind androgenabhängig, d.h. Wachstum und Differenzierung sind auf die Anwesenheit von Androgenen abhängig, die in für das Wachstum ausreichender Menge im fetalen Kälberserum des Kulturmediums vorhanden waren. Sowohl die DU 145- wie auch die PC-3-Zellen sind nicht androgenabhängig (Mitchell et al. 2000; Sobel et al. 2005).

Humane Kolonkarzinomzelllinie:

SW707 (Adenokarzinom des Kolon)	DKFZ Heidelberg
---------------------------------	-----------------

Weitere Tumorzelllinien:

PC-12 (Phäochromozytom der Ratte)	Institut für Pathologie der Technischen Universität München
-----------------------------------	--

Kelly (humane Neuroblastomzelllinie)	Neurometabolisches Labor der
Sy5y (humane Neuroblastomzelllinie)	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Humane Erythrozyten	Blutbank, Klinikum rechts der Isar, München
---------------------	--

3.1.2 Kulturmedien und Zusätze

Für alle Zelllinien wurde RPMI 1640 verwendet und je nach Zelllinie folgende Substanzen ergänzt:

Fetales Kälberserum (FKS)
Pferdeserum
Penicillin/Streptomycin (P/S)
Non Essential Amino Acids (NEAS)
Natriumpyruvat

Kulturmedien für DU145 und LNCaP:

RPMI 1640, FKS (10%), P/S (1%), NEAS (1%)

Kulturmedium für PC-3:

RPMI 1640, FKS (10%), P/S (1%), NEAS (1%), Natriumpyruvat (1%)

Kulturmedium für SW707:

RPMI 1640, FKS (10%), P/S (1%)

Kulturmedium für PC-12:

RPMI 1640, Pferdeserum (10%), FKS (5%), P/S (1%)

Kulturmedien für Kelly und Sy5y:

RPMI 1640, FKS (5%)

3.1.3 Versuchspuffer

NaCl	140 mM
Glukose	5 mM
KCl	5,4 mM
MgSO ₄	0,8 mM
TRIS	25 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,8 mM

... gelöst in destilliertem Wasser, pH-Wert auf 7,4 eingestellt

Für Versuche in NaCl-freiem Medium wurde NaCl durch N-methyl-D-glucamin (NMDG) 140 mM ersetzt (Friedrich et al. 2001, S.301).

3.1.4 Radioaktive Substanzen

[¹⁸ F]FDG	Nuklearmedizinische Klinik, Technische Universität München ¹⁸ F-HWZ: 109,71 min
[¹¹ C]Cholin	Nuklearmedizinische Klinik, Technische Universität München; ¹¹ C-HWZ: 20,3 min

[Methyl- ³ H]Cholinchlorid	Amersham, Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland TRK593-37MBq ³ H-HWZ: 12,346 Jahre, spez. Aktivität 3,03 TBq/mmol
---------------------------------------	--

3.1.5 Hemmsubstanzen

Cholinchlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Guanidiniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hemicholinium-3 (HC-3)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ouabain	Fluka Bio-Chemika, Buchs, Schweiz
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.1.6 Medikamente

Bicalutamid	Astracenece, Brixham, UK
Docetaxel	Avensis, Frankfurt, Deutschland

3.1.7 Antikörper

Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen den humanen hochaffinen Cholintransporter (AB 5966)	Chemicon, Temecula, CA, USA
Anti-Kaninchen-IgG mit alkalischer Phosphatase gekoppelt (Sekundärantikörper) (A 9919)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.1.8 Puffer für Gelelektrophorese und Western Blot

AP-Puffer (alkalische Phosphatase)	100 mM TRIS/HCl; 100mM NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; pH 9,5
Blotting Puffer	25 mM TRIS; 192 mM Glycin; 20% Methanol
Coomassie Blau Lösung	45% Methanol; 10% Essigsäure; 0,25% Coomassie Blau
4xSammelgelpuffer	0,5 M TRIS/HCl; 0,4% SDS; 4% Polyacrylamid; pH 6,8
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3-8,4 (nicht eingestellt)
4xSDS-Probenpuffer (reduzierend)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4xTrenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl; 0,4% SDS; 8% bzw. 12,5% Polyacrylamid; pH 8,8

TRIS buffered saline (TBS)	100 mM TRIS/HCl; 0,9% NaCl; pH 7,5
TWEEN in TRIS buffered saline (TTBS)	0,1% TWEEN in TBS

3.1.9 Chemikalien

zur Vitalitätsbestimmung der Zellen:

Trypanblau-Lösung (0,5%) Sigma, Taufkirchen, Deutschland

zur Proteinbestimmung nach Bradford:

Bio-Rad Protein-Assay Bio-Rad, München, Deutschland
 BSA-Proteinstandard Bio-Rad, München, Deutschland
 Natronlauge (NaOH) 1 M Roth, Karlsruhe, Deutschland

zur pH-Einstellung des Versuchmediums:

Natronlauge (NaOH) 3 M Apotheke des Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
 Salzsäure (HCl), rauchend 37% Reinsubstanz Merck, Darmstadt, Deutschland

zur Zellzahlbestimmung:

Casi[®] ton, Verdünnungslösung für Zellkulturen Schärfe System, Reutlingen, Deutschland

Für den Western Blot:

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (BCIP) Sigma, Taufkirchen, Deutschland
 50mg/ml in 100% DMF

Calbiochem[®] PoteoExtract[™] Complete Merck, Darmstadt, Deutschland
 Mammalian Proteome Extraction Kit

Benzonase[®]
 Extraction Reagent
 Reducing Agent
 Resuspension Buffer
 Wash Buffer

Coomassie Blau Serva, Heidelberg, Deutschland
 Dimethylformamid (DMF) Merck, Darmstadt, Deutschland
 Essigsäure Merck, Darmstadt, Deutschland
 Full Range Rainbow PPN 800 Marker Amersham, Freiburg, Deutschland
 Magermilchpulver Merck, Darmstadt, Deutschland
 Methanol Merck, Darmstadt, Deutschland
 Nitro Blue Tetrazolium (NBT) Sigma, Taufkirchen, Deutschland
 50mg/ml in 70% DMF
 TWEEN Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Sonstige Chemikalien:

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl₂ 2H₂O) Merck, Darmstadt, Deutschland
 Cholinchlorid
 D-Glukose (Dextrose) Gibco, Karlsruhe, Deutschland
 Dimethylsulfoxid (DMSO) Apotheke des Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland

DMSO-Einfriermedium	Bio Veris Corporation, Gaithersburg, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1% in PBS o. Ca & Mg	c.c. pro., Neustadt/W., Deutschland
Ethanol 70%	Apotheke des Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Ethanol 96%	Apotheke des Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Non essential amino acids (NEAS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
N-methyl-D-glucamin (NMDG)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
PBS (Dulbecco [1x] w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; 10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Bio-Rad, München, Deutschland
Szintillationscocktail (LUMASAFE PLUS)	LUMAC LSC B.V., Groningen, Niederlande
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

3.1.10 Geräte

Absaugpumpe Eppendorf 4151	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Analysewaage, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Beta-Counter Liquid Scintillation, counter 1414	Wallac, Turku, Finnland
Brutschrank Typ 6000	Heraeus, Berlin, Deutschland
Casy-1-Zellzählgerät	Schärfe, Reutlingen, Deutschland
Gamma-Counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac, Turku, Finnland
Kamera Minolta X-300 S	Minolta, Osaka, Japan
Laminair Flow HB 2472	Heraeus, Berlin, Deutschland
Mikroskop, Aktiovert 10	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Milli-Q UF Plus	Millipore S.A. Molsheim, Frankreich
Neubauer Zählkammer	MD-Kova, Madaus Diagnostika Köln, Deutschland
pH-Meter, pH 522	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetus [®] -akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Stickstoffbehälter ARPEGE 70	Deutsche Air Liquid Anlagebau GmbH, Wiesbaden, Deutschland
UV/VIS Spektrometer Uvikon 931 Plus	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Vortex-Genie	Bender&Hobei AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1,0 R	Heraeus, Berlin, Deutschland

3.1.11 Gebrauchsmaterial

24-Wellplatte	Greiner, Solingen, Deutschland
Casy Probenröhrchen	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Cryo Tubes 1,8 ml	Nunc Inter Med, Dänemark
Einmalphotometerküvetten halbmikro (1,5 ml) PLASTIKBRAND PS 759015	Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf-Safe-Lock-Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf „DNA lo binding Cup“ (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf „Protein lo binding Cup“ (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kulturflaschen mit Filter (25, 75, 175 cm ²)	Greiner, Solingen, Deutschland
Kulturflaschen mit Gittereinteilung (25 cm ²)	Greiner, Solingen, Deutschland
Kulturflasche mit Kollagen- Bodenbeschichtung für PC-12 (75 cm ²)	Greiner, Solingen, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polyvials, Szintilationsgefäße (20 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Messpipetten (5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Corning, Bodenheim, Deutschland

3.1.12 Software

GraphPad Prism 4	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2004 für Mac	Microsoft, Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung ist für alle Tumorzelllinien gemeinsam beschrieben, da die Unterschiede im Umgang mit den einzelnen Zelllinien nur sehr gering waren. Auf Besonderheiten der jeweiligen Zelllinien wird hingewiesen.

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminair-Flow-Arbeitsbank durchgeführt. Die dazu verwendeten Medien wurden im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

3.2.1.1 Auftauen der Tumorzellen

Für die Langzeitaufbewahrung lagerten die Zellen in DMSO-Einfriermedium in 1,8 ml Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Röhrchen solange unter fließendes Wasser gehalten, bis sich der Inhalt gerade von der Wand löste. Dieser wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen zu 40 ml des jeweiligen vorgewärmten Zellmediums gegeben, wobei der Inhalt vollends auftaute. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen für 5 min bei 1000 U/min und 25 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit Kulturmedium resuspendiert und je nach Bedarf auf ein bis drei Zellkulturflaschen, in die zuvor 25 ml Kulturmedium gegeben worden war, verteilt. Die Flaschen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Wasserdampf inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellkulturflaschen unter dem Mikroskop betrachtet, ob die Zellen angewachsen waren, und gegebenenfalls ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt.

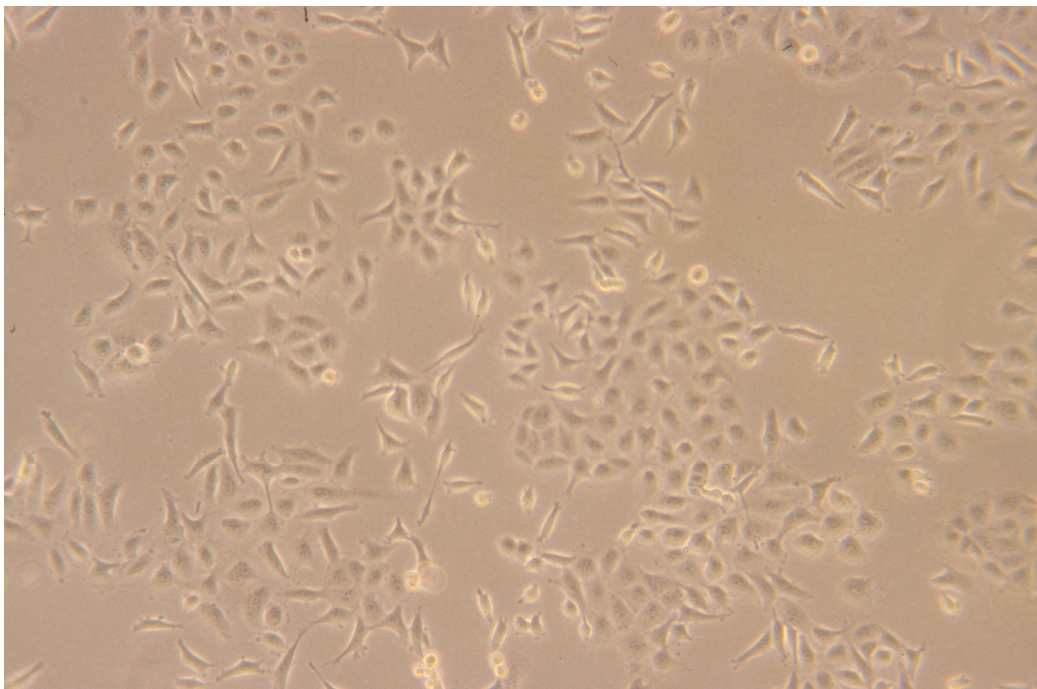


Abb. 2: Nativaufnahme von DU145-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular)

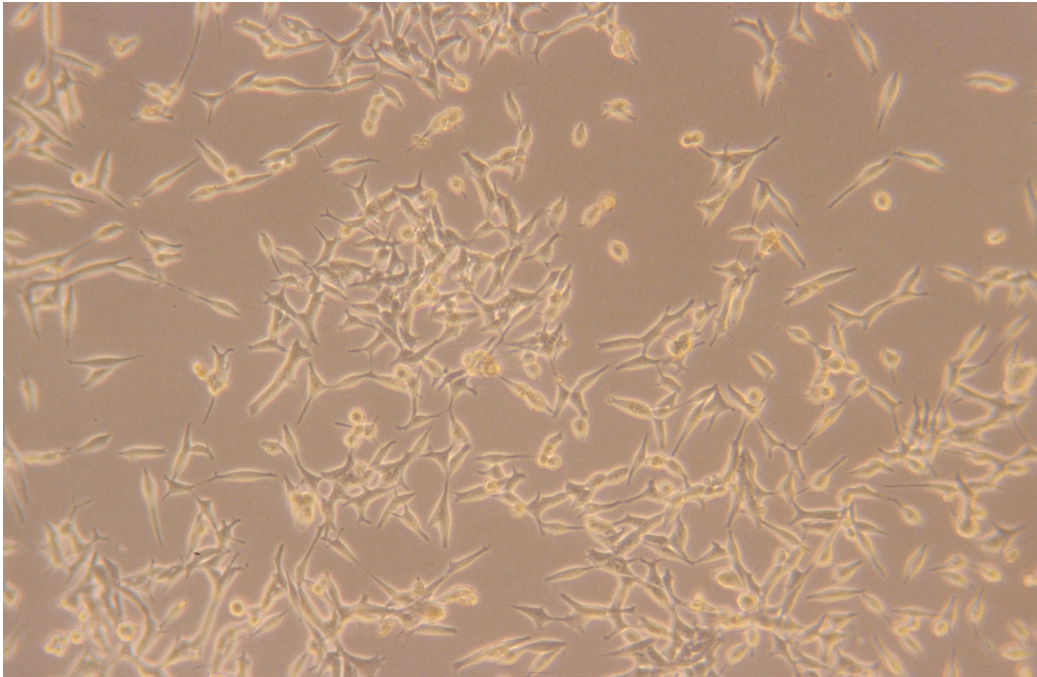


Abb. 3: Nativaufnahme von LNCaP-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular)

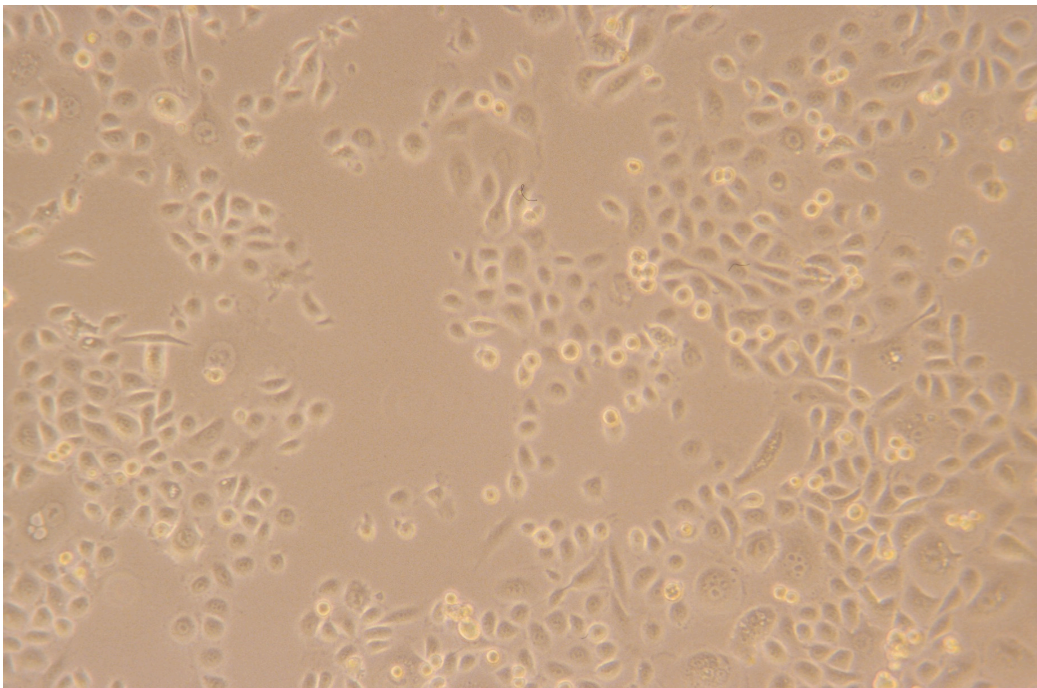


Abb. 4: Nativaufnahme von PC-3-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular)

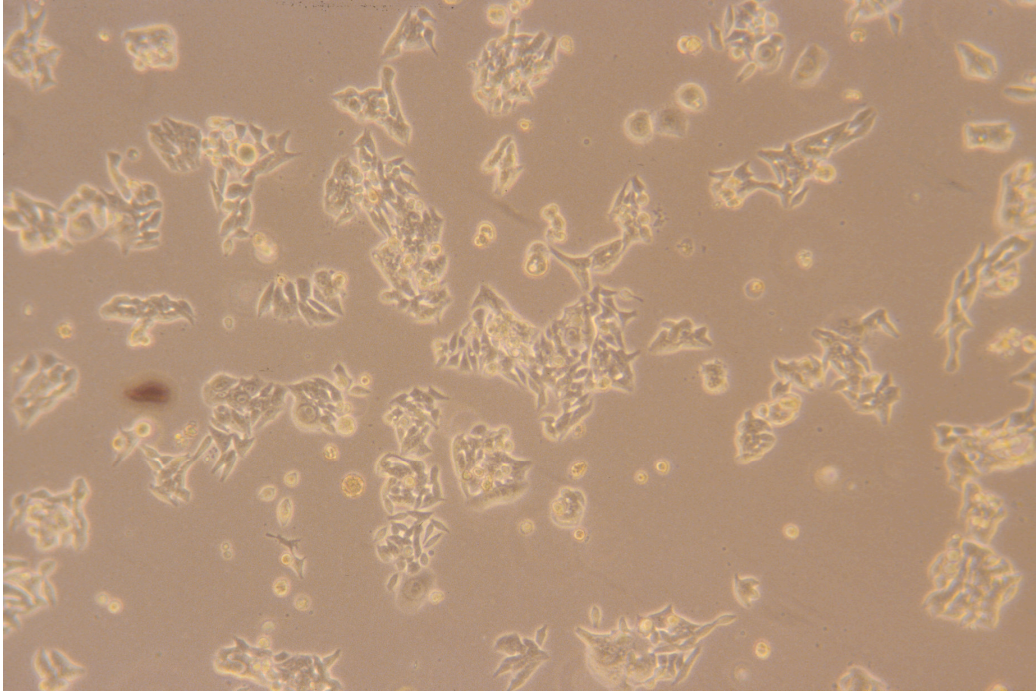


Abb. 5: Nativaufnahme von SW707-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular)

3.2.1.2 Passagieren der Tumorzellen

Die Zellen wurden passagiert, sobald sie gerade zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen waren, also am Ende der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen.

Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit 10 ml PBS gespült, um Zelltrümmer und Mediumreste zu entfernen. Dabei war bei den LNCaP und PC-12 besondere Vorsicht geboten, da diese nur sehr schwach an der Flasche hafteten und somit schon beim Spülvorgang leicht abgelöst werden konnten. Das PBS wurde vollständig mit einer Pasteurpipette entfernt, bevor 7 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Kulturflaschen für 10 min in den Brutschrank gestellt, um den Ablösevorgang zu beschleunigen. Durch leichtes Beklopfen der Zellkulturflaschen lösten sich die Zellen vollends ab. Zur Verdünnung der Zellsuspension in Trypsin/EDTA wurden 7 ml PBS in die Zellkulturflasche gegeben. Der gesamte Inhalt wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen für 3 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit dem jeweiligem Kulturmedium resuspendiert und auf die neuen, bereits mit 25 ml Medium gefüllten Zellkulturflaschen (175 cm²) verteilt. Für die PC-12-Zellen wurden spezielle mit Kollagen beschichtete Kulturflaschen verwendet.

Je nach Zelllinie wurden die Zellen 1:2 bis 1:20 ausgesät, so dass die Zellen einmal wöchentlich passagiert werden konnten. Nach drei bis vier Tagen wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, wobei der Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb als Indikator saurer Metabolite diente.

3.2.1.3 Einfrieren der Tumorzellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA und Zugabe von PBS wurden die Zellen abzentrifugiert (1300 U/min, 3 min) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit DMSO-Einfriermedium resuspendiert (ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) und auf entsprechend viele 1,8 ml Kryoröhrchen verteilt. Nach 5 bis 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 4 bis 24 Stunden bei -70°C , anschließend dann im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

3.2.2 Charakterisierung der verwendeten Zellen

3.2.2.1 Proliferationstest

Alle Zellversuche sollten während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen durchgeführt werden. Zur Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden je 25000, 50000 und 75000 Zellen der drei verwendeten Prostatakarzinomzelllinien DU 145, LNCaP und PC-3 und der Kolonkarzinomzelllinie SW707 in jeweils sieben 25 cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Alle zwei bis drei Tage wurden von jeder Reihe die Zellen einer Zellkulturflasche abgelöst und im Zellzählgerät gemessen bis eine Plateau-Phase erreicht war.

3.2.2.2 Bestimmung der Verdopplungszeit

Neben der Darstellung des exponentiellen Wachstums sollte die Verdopplungszeit, ebenfalls ein wichtiges Charakteristikum im Wachstumsverhalten von Tumorzellen, bestimmt werden. Dazu wurden je 5000 Zellen der drei Prostatakarzinomzelllinien und der Kolonkarzinomzelllinie SW707 in 25 cm^2 Kulturflaschen mit Gitterboden ausgesät. Pro Kulturflasche wurden 12 Quadrate markiert und die jeweilige Zellzahl in diesen markierten Quadraten zu zwei Zeitpunkten im Abstand von 24 Stunden (DU 145, PC-3, SW707) bzw. wegen des langsameren Wachstums der LNCaP Zellen im Abstand von 48 Stunden unter dem Mikroskop ausgezählt.

Da die Tumorzellen sich wie oben schon beschrieben exponentiell vermehren, wurde die Verdopplungszeit nach folgender Formel bestimmt:

$$y_1 = e^{k \cdot t_1}$$

Die Konstante k errechnet sich dabei wie folgt:

$$k = (\ln y_2 - \ln y_1) / (t_2 - t_1)$$

wobei t für einen Zeitpunkt und y für die Zellzahl zu dem jeweiligen Zeitpunkt steht. Nach Auszählung der Zellen zu mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten t_1 und t_2 in einer Zellkulturflasche mit Gitterbodeneinteilung erhält man also für jedes Quadrat die dazugehörige Anzahl an Zellen, y_1 und y_2 .

Gesucht ist die Verdopplungszeit t_{doppel} . Daher wird die erste Formel nach t_{doppel} aufgelöst:

$$t_{\text{doppel}} = [\ln(2 y_1) / k] - t_1$$

3.2.3 Vorbereitung der Aufnahmeversuche

3.2.3.1 Überführen der Zellen in Versuchsmedium

Für die Versuche wurden die Zellen wie in 3.2.1.2 beschrieben von den Zellkulturflaschen abgelöst. Nach vorsichtiger Kontrolle des Ablösevorgangs gegen das Licht wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in das zuvor ca. 10 ml des jeweiligen Versuchspuffers vorgelegt worden war. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1300 U/min für 3 min wurde der Überstand vorsichtig mit der Pasteurpipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit dem jeweiligen Versuchspuffer unter Berücksichtigung des jeweilig benötigten Volumens und der benötigten Zellzahl resuspendiert. Je nach Versuch wurden die Zellsuspensionen im Zentrifugenröhrchen oder nach Überführen in Eppendorf Cups zur Inkubation in den Brutschrank gestellt.

3.2.3.2 Vitalitätsprüfung mit Trypanblau

Das Vorhandensein von mindestens 80% vitaler Zellen war Voraussetzung für die Versuche. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension und 100 µl Trypanblau Lösung in einem Eppendorfgefäß gemischt. Nach fünf Minuten wurde ein Tropfen des Gemisches auf eine Neubauer Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf und lassen sich somit auch nicht anfärben. Bei abgestorbenen Zellen hingegen dringt der Farbstoff durch Zellmembrandefekte in die Zellen ein und färbt diese blau.

3.2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Casy-1-Zellzählgerätes bestimmt. Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension zu 10 ml CASYton-Lösung in ein CASY-1-Probenröhrchen pipettiert, was einer Verdünnung von 1:200 entspricht. Anschließend wurde die Zellzahl dieser Verdünnung im CASY-1-Zellzählgerät bestimmt. Von jeder Zellsuspension wurden zwei Proben gemessen und deren Mittelwert verwendet.

Neben der Zellzahl liefert das CASY-1-Zellzahlgerät Informationen zum mittleren Durchmesser und Volumen der Zellen. Um den Messbereich auf vitale Zellen zu beschränken und Zelldetritus und Zellkerne abgestorbener Zellen aus der Zellzahlbestimmung auszuschließen, wurden in Vorversuchen Zellen aller verwendeten Zelllinien 5 min in 96%-igem Ethanol lysiert. Dabei ist davon auszugehen, dass alle Zellmembranen zerstört wurden. Im CASY-1-Zellzählgerät wurde der mittlere Durchmesser der Zellfragmente im Lysat bestimmt.

Für die Versuche wurde die Zellsuspension auf 10^6 Zellen/ml verdünnt. Jede Probe sollte 10^5 Zellen enthalten, so dass je 100 µl Zellsuspension verwendet wurden.

3.2.3.4 Verdünnung des [³H]Cholin auf die Versuchskonzentration

Die [³H]Cholinaufnahmeversuche sollten mit einer Aktivität von je 1,85 kBq (0,05 μCi) pro Probe durchgeführt werden. Dazu musste das [³H]Cholin entsprechend verdünnt werden, da es mit einer Ausgangsaktivität von 37 MBq/ml (1 mCi/ml Ethanol) geliefert wurde.

Zunächst wurde eine 1:10 Verdünnung in 96%-igem Ethanol hergestellt. Dazu wurden 50 μl des [³H]Cholin (1,85 MBq = 50 μCi) zu 450 μl 96%-igem Ethanol gegeben. Diese Verdünnung wurde bei -20 °C aufbewahrt und erst unmittelbar vor dem jeweiligen Versuch weiter verdünnt, da das [³H]Cholin in Ethanol relativ stabil ist.

Für die Versuche wurde die 1:10-Stammlösung nochmals 1:20 im Versuchspuffer bzw. im NaCl-freien NMDG-Puffer verdünnt. Dazu wurden in der Regel 50 μl der Stammlösung mit 950 μl Versuchspuffer gemischt. Die erhaltene Verdünnung hatte somit eine Aktivität von 185 kBq (5 μCi). Für die Aufnahmeversuche wurden von dieser Verdünnung 10 μl (1,85 kBq = 0,05 μCi) zu jeder Probe gegeben.

Somit wurde die ursprüngliche 96%-ige Ethanol-Lösung 400-fach verdünnt, so dass der Ethanolgehalt nur noch 0,24% betrug, was bezüglich Zelltoxizität als tolerabel hingenommen wurde.

3.2.4 Durchführung der Aufnahmeversuche

Alle Aufnahmeversuche wurden in Eppendorfcups durchgeführt. Pro Probe wurden jeweils 10⁵ Zellen im jeweiligen Versuchspuffer verwendet. Um die Aufnahmeversuche bei möglichst physiologischen Temperaturen durchzuführen, wurden die Zellsuspensionen und Puffer bis zum Versuchstart im Brutschrank bzw. Wasserbad bei 37 °C gelagert. Aufnahmen bis 10 min wurden direkt am Versuchsort bei Raumtemperatur durchgeführt. Aufnahmen länger als 10 min wurden im Brutschrank bei 37 °C durchgeführt. Um hierbei die Sedimentation der Zellen zu vermeiden, wurden die Eppendorfcups auf einer Wippe stetig bewegt.

Die Aufnahme wurde durch Zugabe des jeweiligen Tracers gestartet. Das Gesamtvolumen jeder Versuchseinheit betrug 200 μl, wobei die Zellsuspension in der Regel in 100 μl Versuchspuffer im Eppendorfcup vorgelegt worden war und 100 μl Lösung aus Tracer mit der gewünschten Aktivität (s. 3.2.3.4) und Versuchspuffer zugegeben wurden.

Abgestoppt wurden die Versuche durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Hierzu wurde eine große Styroporbox mit Eis gefüllt und ein Metallständer für Eppendorfcups zur besseren Leitung der Temperatur verwendet. In kurzen Versuchspausen z.B. während der Waschschriffe wurde stets der Deckel geschlossen. In Vorversuchen wurde die Lufttemperatur direkt oberhalb des Ständers gemessen. Dabei wurde eine Lufttemperatur von 5 °C gemessen. Durch Befüllen des Metallständers mit Eis konnte ein Temperaturbereich von 0 bis 3 °C erreicht werden. Das war zur Hemmung der aktiven Transportvorgänge ausreichend.

Nach dem Abstoppen mit PBS wurden die Zellen bei 5000 U/min und 0 °C für 5 min zentrifugiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen durch jeweils Absaugen des Überstands, Spülen mit je 1 ml eiskaltem PBS und Zentrifugieren bei 5000 U/min und 0 °C für 5 min, wobei die Proben zwischen den Zentrifugierschritten permanent auf Eis gelagert waren. Das Absaugen des Überstands erfolgte mit einem eigens für die Eppendorfcups hergestellten Absaugstutzen. Dieser ermöglicht ein rasches und sauberes Absaugen des

Überstands ohne Gefahr, das Pellet aufzusaugen. Vorversuche hatten ergeben, dass sich nach drei Waschschrinen praktisch keine Restaktivität mehr im Überstand befand.

Bei den Versuchen wurde jede Probe vierfach bestimmt, woraus Mittelwert und Standardfehler (SEM) errechnet wurden. Zudem wurden bei jedem Versuch mindestens vier Standards bestehend aus der zugeführten Menge an radioaktivem Tracer in 200 µl Versuchspuffer, aber ohne Zellen mitgeführt. Diese dienten dazu, die ursprünglich eingesetzte Menge an Tracer im jeweiligen Counter (s.u.) zu quantifizieren. Die eingesetzte Menge war für den jeweiligen Tracer immer gleich und betrug 5,8 fmol [¹⁸F]FDG (370 kBq; 10 µCi), 1,1 fmol [¹¹C]Cholin (370 kBq; 10 µCi) bzw. 0,61 pmol [³H]Cholin (1,85 kBq; 0,05 µCi) (s. 3.2.4.4). Wurde also beispielsweise unter Berücksichtigung des Leerwerts (s.u.) eine Aktivität von 10% des Standards gemessen, entspricht dies einer Aufnahme von 0,58 fmol [¹⁸F]FDG, 0,11 fmol [¹¹C]Cholin bzw. 0,061 pmol [³H]Cholin. Die absolut aufgenommene Substratmenge wurde nach Bestimmung des Proteingehalts pro mg Zellprotein berechnet (s. 3.2.6).

Neben den Standards wurden bei jedem Versuch nochmals mindesten vier „Leerwerte“ mitgeführt. Diese wurden nach Zugabe des jeweiligen Tracers in 200 µl Versuchspuffer ebenfalls ohne Zugabe von Zellen genau gleich wie die Versuchsproben behandelt: nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die „Restaktivität“ im Eppendorfcup gemessen, die dann von jeder Probe abgezogen wurde.

Nach dem dritten Waschvorgang konnte die aufgenommene Radioaktivität der ¹¹C bzw. ¹⁸F-markierten Tracer direkt in den Eppendorfcups im γ-Counter als counts per minute (cpm = Zählrate pro Minute) gemessen werden. Es war darauf zu achten, dass die Messungen im linearen Messbereich zwischen 10³ und 10⁶ cpm lagen, was bei einer eingesetzten Aktivität von je 370 kBq gegeben war. Die Messung der kurzlebigen Nuklide ¹¹C und ¹⁸F im γ-Counter erfolgte zerfallskorrigiert.

Bei Versuchen mit ³H mussten die Zellen für die Messung im β-Counter erst noch aufbereitet werden. (s. 3.2.4.4)

3.2.4.1 [¹⁸F]FDG Aufnahme-Versuche

Das [¹⁸F]FDG wurde im Zyklotron der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München hergestellt. Für jede Probe wurde eine Aktivität 370 kBq (10µCi) verwendet. Aus der Aktivität A lässt sich die Menge des eingesetzten [¹⁸F]FDG (Teilchenzahl N) unter Berücksichtigung der Zerfallskonstante λ nach folgender Formel errechnen:

$$A = N \lambda$$

Die Zerfallskonstante λ lässt sich mithilfe der Halbwertszeit $t_{1/2} = 109,71 \text{ min} = 6582,6 \text{ s}$ wie folgt errechnen:

$$\lambda = \ln 2 / t_{1/2}$$
$$\lambda = 1,05 \cdot 10^{-4} \text{ 1/s}$$

Aufgelöst nach der gesuchten Teilchenzahl erhält man:

$$N = A/\lambda$$

$$N = 370000 \text{ Bq}/1,05 \cdot 10^{-4} \text{ 1/s}$$

$$N = 3,5 \cdot 10^9 \text{ Teilchen}$$

Mit Hilfe der Avogadro Konstante lässt sich die Menge an eingesetztem FDG ausrechnen:

$$1 \text{ mol} = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ Teilchen} \quad \text{Avogadro Konstante}$$

$$3,5 \cdot 10^9 / 6,022 \cdot 10^{23} = \underline{5,8 \cdot 10^{-15} \text{ mol}} = \underline{5,8 \text{ fmol}}$$

5,8 fmol [¹⁸F]FDG haben also eine Aktivität von 370 kBq [¹⁸F]FDG.

In der Regel wurden die Versuche durch Zugabe kalter Glukose 10 min vor Tracergabe bei der physiologischen Glukosekonzentration von 5 mM (d.h. 1 μmol/200 μl) durchgeführt. Das entspricht der 1,7 · 10⁸-fachen Menge des eingesetzten [¹⁸F]FDG, was das „Tracer-Prinzip“ verdeutlicht.

Zunächst wurde die Aufnahme in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration (Tab.2) bestimmt. Zudem wurde die Aufnahme über Zeiträume von 1 bis 240 min beobachtet.

Tab.2: Glukosekonzentrationen für die Aufnahmeversuche (* physiologische Glukosekonzentration)

Kalte Glukose									
mM	0	0,1	0,5	1	2,5	5*	7,5	10	15
mg/l	0	18	90	180	450	900*	1350	1800	2700

3.2.4.2 [¹⁸F]FDG-Efflux

Um den Efflux des aufgenommenen [¹⁸F]FDG aus den Zellen zu untersuchen, wurde ein Standard Aufnahmeversuch mit [¹⁸F]FDG über 10 min bzw. 30 min durchgeführt. Nach Abstoppen und dreimaligem Spülen wurden die Zellen erneut bei 37 °C in Glukose freiem Versuchspuffer für 0, 1, 3, 5, 10 und 20 min inkubiert und wieder mit eiskaltem PBS abgestoppt. Nach dreimaligem Spülen erfolgte die Messung der in den Zellen noch vorhandenen [¹⁸F]FDG-Menge im γ-Counter.

3.2.4.3 [¹¹C]Cholin Aufnahme-Versuche

Die Vorversuche zur Cholinaufnahme wurden mit [¹¹C]Cholin durchgeführt, das in der Nuklearmedizinischen Klinik der Technischen Universität München hergestellt worden war.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob das Kation Cholin aufgrund seiner positiven Ladung an der Kunststoffwand der Eppendorfgefäße haftet und somit falsch hohe Cholinaufnahmen vortäuschen könnte. Hierzu wurden die Standard-eppendorfcups mit den speziell beschichteten „Protein lo binding“ und „DNA lo binding“ Eppendorf Cups

verglichen. Je 370 kBq (10 μ Ci) [^{11}C]Cholin wurden in das jeweilige Eppendorfcup gegeben und für 5, 15, 30, 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit komplett abgesaugt und das Gefäß dreimal mit PBS gewaschen. Nach vollständigem Absaugen wurde es im γ -Counter gemessen. Da es zu keinem nennenswerten Haften des Cholins an der Wand der verschiedenen Cups kam, wurden für alle folgenden Versuche die normalen Eppendorfcups verwendet.

Mit [^{11}C]Cholin wurden zunächst Versuche mit ansteigenden Konzentrationen an kaltem Cholin (0, 1, 5, 10, 20, 100 μM) und über unterschiedliche Zeiträume (5, 15, 30, 60 min) durchgeführt. Das Abstoppen der Aufnahme und Waschen der Proben erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei den Versuchen zur [^{18}F]FDG-Aufnahme.

3.2.4.4 [^3H]Cholin Aufnahme-Versuche

Aufgrund der langen HWZ (s. 3.1.4) wurde für die eigentliche Charakterisierung des Cholintransporters [^3H]Cholin verwendet, so dass auch Studien über längere Zeiträume möglich waren.

Für jede Probe wurde jeweils eine Aktivität von 1,85 kBq (0,05 μCi) verwendet. Die spezifische Aktivität des eingesetzten ^3H -Cholins betrug $3,03 \cdot 10^{15}$ Bq/mol. Damit werden 0,61 pmol [^3H]Cholin für eine Aktivität von 1,85 kBq benötigt. Mit der Formel $A = N \cdot \lambda$ lässt sich der Frage nachgehen, wie hoch die Verunreinigung durch kaltes Cholin in diesem Fall ist:

$$A = N \cdot \lambda$$

Die Zerfallskonstante λ ergibt sich bei einer Halbwertszeit $t_{1/2} = 12,3$ Jahre = $3,89 \cdot 10^8$ s wie folgt:

$$\begin{aligned}\lambda &= \ln 2 / t_{1/2} \\ \lambda &= 1,78 \cdot 10^{-9} \text{ 1/s}\end{aligned}$$

Jedes ^3H -Cholinmolekül besitzt 3 ^3H -Atome, so dass sich pro mol = $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen (Avogadro Konstante) bei reinem [^3H]Cholin eine Aktivität von ergibt:

$$\begin{aligned}A &= 3 \cdot 6,022 \cdot 10^{23} / \text{mol} \cdot 1,78 \cdot 10^{-9} \cdot 1/\text{s} \\ A &= 3,22 \cdot 10^{15} \text{ Bq/mol} = 3,22 \text{ PBq/mol}\end{aligned}$$

[^3H]Cholin ohne Verunreinigung durch kaltes Cholin hätte folglich eine Aktivität von $3,22 \cdot 10^{15}$ Bq/mol. Die vom Hersteller angegebene Aktivität von $3,03 \cdot 10^{15}$ Bq/mol entspricht somit einem Anteil von 94,1% an ^3H markiertem Cholin.

Demnach setzten sich die verwendeten 0,61 pmol Cholin aus 0,57 pmol [^3H]Cholin und 0,04 pmol kaltem Cholin zusammen.

Abgesehen von den Versuchen zur Erstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik wurden die Aufnahmeversuche durch Zugabe kalten Cholins bei physiologischer Cholinkonzentration von 10 μM durchgeführt. Dabei war die Konzentration an kaltem Cholin $3,5 \cdot 10^3$ -fach höher als die eingesetzte [^3H]Cholinkonzentration, was ebenfalls dem „Tracerprinzip“ entspricht. (s. 3.2.4.1)

Die Quantifizierung der aufgenommenen [³H]Cholinmengen erfolgte durch Messung im β-Counter. Aufgrund der relativ geringen Reichweite und Durchdringbarkeit von Materie der β-Strahlen im Vergleich zu γ-Strahlen können β-Strahler nur in direkter Gegenwart einer Szintillationsflüssigkeit gemessen werden. Dabei erzeugen die β-Strahlen in der Szintillationsflüssigkeit Lichtblitze, welche im β-Counter quantifiziert werden. Die Aktivität wird im β-Counter als disintegration per minute (dpm = Zerfallserscheinung pro Minute) gemessen. Jede Probe wurde fünf Minuten gemessen, wobei auf eine Zerfallskorrektur aufgrund der langen Halbwertszeit von 12,3 Jahren verzichtet werden konnte.

Für die Messung mussten die Zellen nach der Aufnahme des [³H]Cholin und den drei Waschschritten lysiert werden: Der Überstand wurde abgenommen. Zu jeder Probe wurden 0,5 ml 2% SDS-Lösung pipettiert und die Eppendorfcups kräftig gevortext. Nach wenigstens sechs Stunden Lyse bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut gevortext und in Szintillationsröhrchen überführt, in die 2 ml Szintillationscocktail vorgelegt worden war. Eventuelle Rückstände in den Eppendorfcups wurden mit 0,5 ml PBS aus den Cups gespült und in die Szintillationsröhrchen pipettiert. Die Proben wurden in der Regel über Nacht im Dunkeln aufbewahrt, ehe sie am nächsten Tag im β-Counter gemessen wurden. 5 Standardproben mit 100% der zugegebenen Aktivität, sowie 5 Leerwerte wurden ebenfalls gemessen.

3.2.4.5 Zeitabhängige Aufnahme

Sowohl die [¹⁸F]FDG- als auch die [³H]Cholinaufnahme in die beiden Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 sowie die Kolonkarzinomzelllinie SW707 wurden über unterschiedlich lange Zeitintervalle bis zu 4 Stunden durchgeführt (Tab.3). Für die [³H]Cholinaufnahme wurden mehr Zeitpunkte betrachtet als für die [¹⁸F]FDG-Aufnahme, um für bei der Michaelis-Menten-Kinetik ausreichend Daten bezüglich des zeitlichen Verlaufs zu erhalten.

Tab.3: Zeitintervalle für die Analyse der [¹⁸F]FDG- bzw. [³H]Cholinaufnahme

FDG [min]				10			30	60		120		240
Cholin [min]	1	3	5	10	15	20	30	60	90	120	180	240

3.2.4.6 NaCl-abhängige Cholinaufnahme

Der Cholintransport sollte auch auf seine Abhängigkeit von NaCl untersucht werden. Hierzu wurden zeitabhängige Versuchsreihen (s. 3.2.4.5) in NaCl-haltigem (140 mM), sowie in NaCl-freiem Versuchspuffer durchgeführt. Als NaCl-Ersatz diente N-methyl-D-glucamin (NMDG, 140 mM) (Friedrich et al. 2001, S.301). Nach Ablösen wurden die Zellen in den jeweiligen Versuchspuffer überführt und für 15 min im Brutschrank inkubiert.

3.2.4.7 Auswirkung verschiedener (Hemm-) Substanzen auf die Aufnahme von [³H]Cholin in LNCaP bzw. PC-3

Das Kation Cholin kann theoretisch sowohl durch unspezifische Kationentransporter (Organic Cation Transporter; OCT) als auch durch spezifische Cholintransporter in die Zelle aufgenommen werden. Um Rückschlüsse auf das vorherrschende Transportsystem für Cholin in Prostatakarzinomzellen zu ermöglichen, sollte die Hemmung der Aufnahme von [³H]Cholin in die beiden Zelllinien LNCaP und PC-3 durch folgende Substanzen untersucht werden:

Hemicholinium-3 (HC-3) gilt als spezifischer kompetitiver Inhibitor des hochaffinen Cholintransporters (CHT1) (Lockman et al. 2002, S.753).

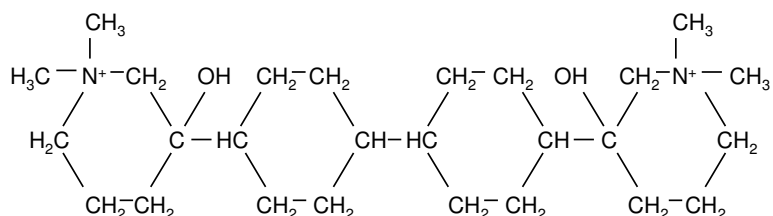


Abb. 6: Strukturformel von Hemicholinium-3

Cholin konkurriert mit [³H]Cholin um den Cholintransport und kann die Aufnahme von [³H]Cholin bei entsprechender Konzentration kompetitiv inhibieren.

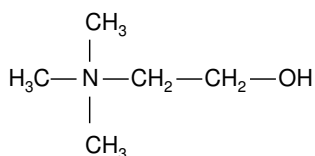


Abb. 7: Strukturformel von Cholin

Tetraethylammonium (TEA) hemmt sämtliche Enzyme aus der Familie der OCT-Transporter (Organic Cation Transporter), einer Gruppe niedrigaffiner unspezifischer Kationentransporter (Hoffmann et al. 2002).

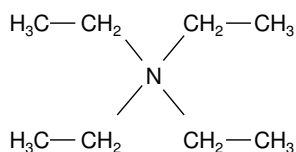


Abb. 8: Strukturformel von Tetraethylammonium (TEA)

Guanidin gilt als mittelstarker Inhibitor des Cholintransports (Hoffmann et al. 2002, S118).

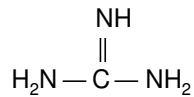


Abb. 9: Strukturformel von Guanidin

Ouabain ist kein Inhibitor eines Cholintransporters, sondern der Na^+/K^+ -ATPase. Durch Blockade der Na^+/K^+ -ATPase kann der Na^+ -Gradient über die Zellmembran, der treibenden Kraft für den selektiven, hochaffinen Cholintransport (CHT1) (Lockman et al. 2002, S.753), nicht mehr aufrecht gehalten werden. Mit Ouabain sollte somit die Na^+ -Abhängigkeit des Cholintransports untersucht werden.

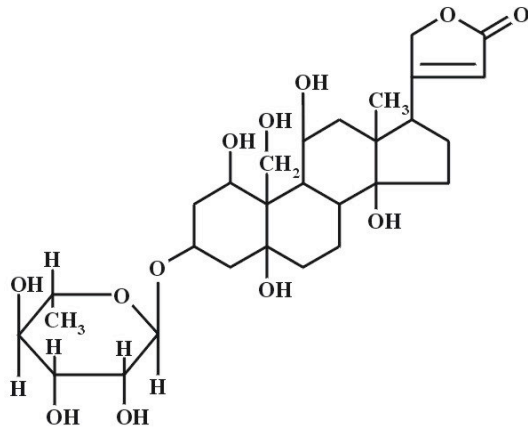


Abb. 10: Strukturformel von Ouabain

Zunächst wurde die Hemmbarkeit der Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ durch HC-3 bzw. kaltes Cholin in ansteigenden Konzentrationen von 0,01 bis 10.000 μM untersucht. Dafür wurden Verdünnungsreihen von beiden Substanzen hergestellt (Tab.4). Je 10^5 Zellen wurden pro Eppendorfcup in 50 μl Versuchspuffer vorgelegt. Dazu wurden 100 μl der jeweiligen Hemmstoffverdünnung gegeben. Nach Inkubation im Brutschrank für 15 min wurde der Versuch durch Zugabe von 0,61 pmol $[^3\text{H}]\text{Cholin}$ (1,85 kBq; 0,05 μCi) in 50 μl Versuchspuffer gestartet. Nach 10 min wurde die Aufnahme mit eiskaltem PBS gestoppt. Es folgten drei Waschschritte und Messung im β -Counter (s. 3.2.4, 3.2.4.4).

Tab.4: Verdünnungsreihen für Hemicholinium-3 (HC-3) bzw. kaltes Cholin

Stoffmenge [³ H]Cholin[pmol]	Stoffmenge von HC-3 bzw. Cholin [pmol]	HC-3- bzw. Cholin-Endkonzentration [μM]
0,61	2	0,01
	20	0,1
	200	1
	2000	10
	20000	100
	200000	1000
	2000000	10000

Für die Versuche mit den übrigen Hemmstoffen wurden Konzentrationen von 1 mM gewählt. Zum einen sollten die Ergebnisse mit der Literatur, die für vergleichbare Hemmstoffstudien Werte zwischen 100 μM und 2 mM angibt, verglichen werden können (Friedrich et al. 2001, S.299; Kamath et al. 2003, S.2607), Zum anderen ergaben die Versuche mit HC-3 und Cholin eine starke Hemmung des Cholintransports bei je 1 mM.

Die Zellsuspensionen wurden für 15 min mit dem jeweiligen Hemmstoff im Brutschrank inkubiert, ehe der Versuch durch Gabe des [³H]Cholins gestartet und nach 10 min wieder gestoppt wurde. Es folgten die drei Waschschrte und Messung im β-Counter (s. 3.2.4, 3.2.4.4).

3.2.4.8 Michalis-Menten-Kinetik

Für den Cholintransport in die Tumorzelllinien LNCaP und PC-3 sollten mithilfe der Michaelis-Menten-Kinetik der jeweilige K_M -Wert und die v_{max} ermittelt werden.

Um die unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu erreichen (Tab.5), wurden ansteigende Konzentrationen an kaltem Cholin verwendet. Je 50 μl der vierfachen Konzentration an kaltem Cholin wurden mit je 0,61 pmol [³H]Cholin (1,85 kBq; 0,05 μCi) in 50 μl Versuchspuffer versetzt. Nach Inkubation der Zellen im Versuchspuffer für 15 min im Brutschrank wurde je 100 μl Zellsuspension (10⁶ Zellen/ml) in die Versuchsgefäße überführt, womit die Kinetik gestartet wurde. Die Aufnahme wurde nach 10 min mit eiskaltem PBS gestoppt. Es folgten die bekannten drei Waschschrte, Vorbereitung für die Messung und schließlich Messung im β-Counter.

Die Aufnahmedauer von 10 min wurde aus zweierlei Gründen gewählt: Zum einen wird die Michaelis-Menten-Kinetik in der Literatur in der Regel über 10 min durchgeführt, zum anderen sollten die Kinetiken in einem Bereich der linearen Zunahme der Aufnahme durchgeführt werden, was für den Bereich von 10 min in Vorversuchen bestätigt werden konnte (s. 4.6.1).

Da heißes und kaltes Substrat identisch in der Struktur sind, ist davon auszugehen, dass beide von demselben spezifischen Transporter prozentual zu gleichen Teilen in die Zelle transportiert werden. Wenn also beispielsweise 1% des eingesetzten heißen Substrats

aufgenommen wird, so wird auch 1% des angebotenen kalten Substrats aufgenommen. Bei den Berechnungen wurden allerdings die geringen Mengen an heißem Substrat (0,61pmol [³H]Cholin) nicht berücksichtigt, sondern nur der aufgenommene Anteil des kalten Substrats.

Trotz der sehr hohen Substratmengen konnte keine Absättigung der Cholinaufnahme beobachtet werden, was auf eine unspezifische diffusionsähnliche Aufnahme schließen lässt. Entsprechend des Gradienten über die Membran nahm diese unspezifische Aufnahme linear mit der Substratmenge zu. Der Anteil der unspezifischen Komponente am gesamten Transport überwog, je mehr Substrat angeboten wurde, da der spezifische enzymvermittelte Transport sättigbar war.

Bei einer Konzentration von 10 mM – ungefähr der 1000-fachen physiologischen Konzentration – kann davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme nahezu komplett über die unspezifische, diffusionsähnliche Komponente vermittelt wird. Durch den 10 mM Wert konnte mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism eine Ursprungsgerade mit der Gleichung

$$v = [S] \cdot K_D$$

v: Aufnahmegeschwindigkeit
[S]: Substratkonzentration
K_D: Diffusionskonstante

erstellt werden. Durch Subtraktion der Diffusionsgeraden von der Gesamtaufnahme erhielt man die Werte der spezifischen, transportervermittelten Cholinaufnahme. Das Computerprogramm GraphPad Prism legte eine Annäherungskurve durch die Einzelpunkte und errechnete den K_M-Wert und die v_{max} der spezifischen Aufnahme nach der Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = v_{\max} [S] / (K_M + [S]).$$

Fasst man mathematisch die unspezifische und spezifische Aufnahme in einer Gleichung zusammen erhält man die Formel der Gesamtaufnahme:

$$v = [v_{\max} [S] / (K_M + [S])] + [S] \cdot K_D$$

Tab.5: Cholinkonzentrationen bzw. Cholinmengen für die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik (* physiologische Cholinkonzentration)

Cholinkonzentration [µM]	Cholinmenge [nmol]
0	0
1	0,2
5	1
10*	2
20	4
50	10
100	20
200	40
500	100
1000	200
10000	2000

3.2.5 Behandlung der Zellen mit Bicalutamid bzw. Docetaxel

Um den Einfluss des Antiandrogens Bicalutamid bzw. des Chemotherapeutikums Docetaxel auf die Cholinaufnahme zu untersuchen, wurden die Zellen 24 Stunden nach Aussaat in 175 cm² Kulturflaschen (18 ml Kulturmedium) mit 2 ml des jeweiligen Medikaments behandelt. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage mit der halbletalen Dosis (IC₅₀) des jeweiligen Medikaments (Tab.6). Zur anschließenden Durchführung der Aufnahmeversuche wurden die Zellen wie in 3.2.3.1 beschrieben in das Versuchsmedium überführt.

Für jede Versuchreihe wurden je zwei weitere Kulturflaschen als Kontrollen ausgesät: In eine wurden 2 ml Kulturmedium anstelle des Therapeutikums gegeben. In die andere wurde diejenige Menge an DMSO gegeben, die bei der Inkubation der Zellen mit Bicalutamid eingebracht wurde. Da Bicalutamid wasserunlöslich ist, wurde DMSO als Solvens verwendet.

Tab.6: IC₅₀-Werte von Bicalutamid (inkl. DMSO-Konzentration) und Docetaxel für LNCaP und PC-3 (ermittelt durch die Forschungsgruppe der Urologischen Klinik der TU München)

Medikament	Bicalutamid		Docetaxel	
	LNCaP	PC-3	LNCaP	PC-3
IC ₅₀	243 µM	227 µM	0,75 ng/ml	1,2 ng/ml
DMSO	0,73%	0,68%	-	-

3.2.5.1 Herstellung der Bicalutamid- bzw. Docetaxellösung

Von Bicalutamid wurde eine 25 mM Stammlösung in DMSO hergestellt, die bei -20 °C gelagert wurde. Vor Therapiebeginn wurden aus der Stammlösung durch Verdünnung mit Kulturmedium die benötigten Therapielösungen hergestellt.

Docetaxel (7,5 ng/ml LNCaP; 12 ng/ml PC-3) und DMSO (7,3% LNCaP; 6,8% PC-3) wurden für die Versuche in Kulturmedium gelöst (Tab.6).

3.2.5.2 Klonogener Proliferationsassay

Der klonogene Proliferationsassay diente zur Überprüfung des durch die Inkubation mit den Medikamenten induzierten Zelltod. Hierzu wurden 10.000 LNCaP- bzw. 100 PC-3-Zellen pro Well in 24-Wellplatten ausgesät. Diese Zellzahlen waren in Vorversuchen ermittelt worden. 24 h Stunden später wurden die Zellen wie unter 3.2.5 beschrieben behandelt. Für jeden Ansatz (Bicalutamid, Docetaxel, DMSO-Kontrolle und Kontrolle) wurden je eine 24-Wellplatte eingesetzt. Nach 5 Tagen wurden die gewachsenen Zellklone in den einzelnen Wells unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Mittelwert der Kontrolle wurde als 100%-Wert genommen und die anderen Gruppen dazu in Relation gestellt.

3.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Ergebnisse der Aufnahmeversuche sowohl untereinander als auch mit den Ergebnissen aus der Literatur vergleichen zu können, wurde die aufgenommene Menge an [³H]Cholin bzw. [¹⁸F]FDG pro mg Zellprotein angegeben. Das ist auch deshalb sinnvoll, da die verwendeten Tumorzellen sich in Volumen und Proteingehalt zum Teil erheblich unterschieden. Der Proteingehalt der Zellen wurde photometrisch nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford 1976, S.248-256).

Bei jedem Aufnahmeversuch wurden in der Regel 10 Proben ausschließlich zur Proteinbestimmung mitgeführt. Um eventuelle Zellverluste bei den Waschvorgängen zu berücksichtigen, wurden die Zellen für die Proteinbestimmung genauso behandelt wie diejenigen für die Aufnahmeversuche. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet für mindestens eine Stunde in 200 µl NaOH (1 M) nach kräftigem Vortexen lysiert. Die Bestimmung des Proteingehalts der Zellen erfolgte mithilfe zweier Standard-Protein-Messreihen (Tab.7).

Tab.7: Standard-Protein-Messreihe (Angaben in ml)

	Leerwert	1 µg Protein	2 µg Protein	4 µg Protein	8 µg Protein	12 µg Protein
PBS	0,7					
BSA-Standard (2 mg/ml):PBS (1:10)	0	0,005	0,01	0,02	0,04	0,06
H ₂ O:PBS (1:10)	0,1	0,095	0,09	0,08	0,06	0,04
Farbstofflsg.	0,2					

Fünf Minuten nach Zugabe der Farbstofflösung wurde die Extinktion der Proteinproben gegen den Leerwert im Photometer bei 595 nm für 10 s gemessen. Es war darauf zu achten, dass das Photometer mindestens 1 Stunde vor der ersten Messung eingeschaltet worden war, damit sich die Lampe erwärmen konnte und so Messungenauigkeiten vermieden wurden. Durch Auftragen der Mittelwerte der Extinktion gegen die bekannten Proteinmengen der Standardreihe ergibt sich die Standardgerade.

Zur Proteinbestimmung der unbekanntenen Proben wurden je 20 µl des Zelllysats in ein Eppendorfcup zu 700 µl PBS und 80 µl H₂O:PBS (1:10) gegeben. Zu jeder Probe wurden 200 µl Farbstofflösung pipettiert und die Proben gevortext, um die Einlagerung des Chromophors in die Proteinstruktur zu erleichtern. Anschließend wurden die Proben in Extinctionsküvetten überführt und 5 min (bis maximal 60min) nach Farbstoffzugabe im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Anhand der vom Computerprogramm Excel errechneten Gleichung der Standardgeraden konnten die Proteinmengen der einzelnen Proben ermittelt werden.

3.2.7 Nachweis des Cholintransporters mittels Western Blot

Zum Nachweis des Cholintransporters in den Tumorzellen mittels Western Blot wurde der einzig kommerziell erhältliche Antikörper gegen einen Cholintransporter verwendet. Es handelt sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen den humanen hochaffinen Cholintransporter (CHT1) mit Kreuzreaktivität gegen den CHT1 aus Maus und Ratte, der sich im Western Blot als ~70 kDa Bande aus dem Rückenmark der Maus und als ~70-75 kDa Bande aus dem Striatum der Maus darstellt.

Die Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC-3 und die Kolonkarzinomzelllinie SW707 sollten im Western Blot auf das Vorhandensein des CHT1 untersucht und mit Erythrozyten, der Phäochromozytomzelllinie PC-12 und den Neuroblastenzelllinien Kelly und Sy5y, für die das Vorhandensein des hochaffinen Cholintransporters beschrieben ist, verglichen werden (Lockmann et al. 2002, S.755-756).

3.2.7.1 Theoretische Grundlagen

Zum Nachweis eines einzelnen Proteins im Western Blot müssen Zellen zunächst lysiert und die Zellproteine denaturieren werden. Durch Lösen der Proteine im anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine einheitlich negativ geladen. SDS bindet dabei mit seinem Fettsäureanteil hydrophobe Bereiche des Proteins, so dass sich das Molekül auffaltet und Interaktionen mit anderen Molekülen aufgehoben werden. Durch Zugabe eines reduzierenden Stoffes wie z.B. Mercaptoethanol werden zusätzlich Disulfidbrückenbindungen gespalten.

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) lassen sich die denaturierten und negativ geladenen Proteine auftrennen, wobei ein Polyacrylamidgel als Matrix dient. Je kleiner die Moleküle sind, desto schneller wandern diese durch das Polyacrylamidnetz, wodurch sich eine Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht ergibt. Die Porengröße des Gels kann durch den Anteil an Polyacrylamid im Gel variiert werden. Durch Verwendung von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht als Marker lassen sich Molekulargewichte unbekannter Proteine abschätzen (Petrides, 1998, S.53-54).

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Gel werden die Proteine auf eine geeignete Membran (Nitrozellulose oder PVDF) mittels Tankblotting transferriert. Der Nachweis des gesuchten Proteins erfolgt mit einem Primärantikörper und einem Enzymgekoppelten Sekundärantikörper durch Umsetzung geeigneter Substrate mittels Farb- bzw. Chemolumineszenzreaktion.

3.2.7.2 Herstellung der Gele

Die Polyacrylamidgele wurden einen Tag vor Durchführung der SDS-Page folgendermaßen gegossen. Zunächst wurde die Trenngellösung (8% bzw. 12,5% Polyacrylamid) bis zur Markierung zwischen die Glasplatten (Abstand zwischen den Glasplatten 0,75mm) gegossen und bei beginnender Polymerisation mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überschichtet. Zum einen erhält man

dadurch eine gerade Kante, zum anderen wird so ein Abfangen freier Radikale, die für die Polymerisation notwendig sind, durch Luftsauerstoff verhindert.

Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels und vollständigem Entfernen des $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit Filterpapier wurde die Sammelgellösung (4% Polyacrylamid) bis ca. 1cm unter den Glasplattenunterrand gegossen. Zur Ausformung von je 10 Sammelaschen wurden Kunststoffkämme (Dicke 0,75mm) in die noch flüssige Sammelgellösung gesteckt, wodurch auch ein Abschluss gegen Luftsauerstoff erzielt wurde. Beim Einbringen der Käme ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zurückbleiben. Nach ca. einer Stunde ist das Gel vollständig polymerisiert. Die Aufbewahrung der Gele bis zur Verwendung am nächsten Tag erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

3.2.7.3 Lyse der Zellen

Neben den Erythrozyten wurden subkonfluente Tumorzellen ($10^7 - 10^8$ Zellen pro Kulturflasche) verwendet. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Nach Absaugen des PBS erfolgte das Ablösen der Zellen mit 7 ml EDTA (1 mM in PBS) für ca. 10 min im Brutschrank. In diesem Fall wurde auch die Verwendung von Trypsin verzichtet, um einen Abbau der Proteine zu vermeiden. Unter dem Mikroskop wurde der Ablösevorgang überprüft. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml PBS verdünnt und in einem 15ml Zentrifugenröhrchen für 3 min bei 1300 U/min, 25 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5 ml, 4 °C kaltem Calbiochem® Wash Buffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 1300 U/min, 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Proben bei -80 °C eingefroren.

100 µl Erythrozytenkonzentrat (ca. $4 \cdot 10^8$ Zellen) wurden zu 2 ml Calbiochem® Wash Buffer gegeben. Anschließend wurden die Erythrozyten ebenfalls 10 min bei 1300 U/min, 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Proben bei -80 °C eingefroren.

24 Stunden vor Durchführung des Western Blots wurden zu den Zellpellets je 150 µl eiskalter Calbiochem® Resuspension Buffer gegeben und die Proben auf Eis für ca. 30 min aufgetaut. Anschließend wurde jedes Pellet mit einer 200 µl Pipette 15-mal resuspendiert und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß umgefüllt. Zu jeder Probe wurden 800 µl Calbiochem® Extraction Reagent (RT) und 50 µl Calbiochem® Reducing Agent (RT) gegeben. Die Eppendorfcups wurden fünfmal vorsichtig invertiert, wobei die Lösung viskös wurde. Je 1,5 µl Benzonase® wurde zugegeben und die Proben mit einer 1 ml Pipette gemischt. Benzonase® verringert die Viskosität der Lösung durch den Abbau sämtlicher Nukleinsäuren, v.a. der hochmolekularen DNA. Die Proben wurden dazu für 30 min in einen Thermoblock bei 25 °C mit 1000 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile der Proben 30 min bei 20000 U/min (~48000 g), 10 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfcup pipettiert und auf Eis gestellt. Je 18 µl bzw. 24 µl (Erythrozyten- und Sy5y-Probe) daraus wurden zu 6 µl bzw. 8 µl 4xSDS-Probenpuffer in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Zusätzlich wurden je 5 µl Full Range Rainbow PPN 800 Marker in vier Eppendorfcups abgefüllt. Alle Proben wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren.

Am Versuchstag wurden die Proben aufgetaut, 6 min im Thermoblock bei 95 °C erhitzt und anschließend 2 min bei 9000 U/min zentrifugiert.

3.2.7.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zwei Gele wurden in ihren Gießformen in der Elektrophoreseapparatur befestigt und diese in den Elektrophoresetank eingesetzt. In beide Elektrophoresekammern wurde der SDS-Laufpuffer eingefüllt. An der Unterseite der Gele sitzende Luftbläschen wurden durch leichtes Schütteln entfernt.

In die beiden äußeren Geltaschen wurden die Molekulargewichtsmarker, in die restlichen acht Geltaschen die Zellproben pipettiert. Die SDS-Page erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA, wobei die Spannung von ca. 100 V zu Beginn auf ca. 300 V gegen Ende der SDS-Page anstieg. Die Kühlung erfolgte mit einem Thermostat, so dass die Temperatur konstant auf 10 °C gehalten wurde. Nach ca. 70 min wurde die SDS-Page gestoppt, sobald die Farbstofffront gerade aus dem Gel herausgelaufen war.

3.2.7.5 Darstellung der Proteinmuster der Proben nach SDS-Page mittels Coomassie Blau Färbung

Zum Vergleich der Proteinmuster bzw. der Proteinmengen der Proben aus den einzelnen Zelllinien wurden die Gele nach der SDS-Page 20 min in Coomassie Blau Lösung gefärbt. Es folgten zwei Waschschrte zur Entfärbung der Gele mit einem Methanol-Essigsäure-Gemisch (30%:10%) zunächst für 30 min und dann für 60 min. Anschließend wurden die Gele kurz in H₂O gewaschen und in Folie eingeschweißt, bevor sie zur Dokumentation eingescannt wurden.

3.2.7.6 Blotting der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran

Nach Ende der Elektrophorese wurde das Sammelgel mit einer Rasierklinge vorsichtig vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Die Trenngele wurden für 10-15 min im Blottingpuffer äquilibriert. Währenddessen wurden zwei PVDF-Membranen (9 · 6,5 cm) kurz in Methanol, für je 5 min in H₂O_{bidest} und Blottingpuffer eingelegt.

Die PVDF-Membran wurde vorsichtig auf das Gel in die Blottingkassette gelegt, wobei darauf zu achten war, dass keine Luftblasen zwischen Blotpapier und Gel eingeschlossen wurden. Die Blottingkassette wurde geschlossen und in den Blottingtank – gefüllt mit vorgekühltem Blottingpuffer – eingehängt. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 200 V wurde der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran mit einer Stromstärke von 80-90 mA gestartet und nach zwei Stunden unter ständigem Rühren bei 10 °C gestoppt (Abb. 11).

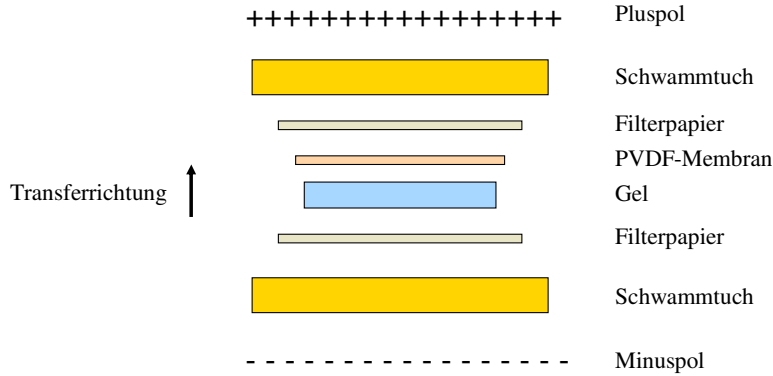


Abb. 11: Schematischer Aufbau des „Blotsandwich“

3.2.7.7 Nachweis von Cholintransportern auf der PVDF-Membran

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen des eingesetzten Primärantikörpers gegen den hochaffinen Cholintransporter wurde die PVDF-Membran zunächst für eine Stunde auf dem Schüttler mit 5% Magermilchpulver (MMP) in TTBS abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper – 1:1000 in 0,1% MMP/TTBS verdünnt – für 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Dazu wurde die Membran luftblasenfrei mit 10 ml Lösung in eine Plastikfolie eingeschweißt. Zeitgleich wurde der Kontrollblot in 0,1% MMP/TTBS ohne Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden beide Blot-Membranen dreimal in 0,1% MMP/TTBS für je 15 min auf dem Schüttler gewaschen.

Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde in weiteren Versuchen der Primärantikörper in TTBS mit 1% bzw. 5% Magermilchpulver verdünnt.

Die Inkubation der Membranen mit dem Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-IgG) – 1:5000 in 0,1% MMP/TTBS verdünnt – erfolgte ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Membranen wurden anschließend wieder dreimal je 15 min mit TTBS gewaschen. Schließlich wurden die Blots 3 min in AP-Puffer (pH 9,5) äquilibriert.

Die Substratlösung für die alkalische Phosphatase (AP) wurden unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Dazu wurden 33 µl BCIP-Lösung und 66 µl NBT-Lösung in 10 ml AP-Puffer pipettiert. Die Blots wurden mit dieser Substratlösung in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Farbreaktion erfolgte über Nacht im Dunkeln. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Western Blots eingescannt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakteristika der verwendeten Tumorzelllinien

4.1.1 Größe der Zellen

Um nur die lebenden Zellen bei der Zählung zu berücksichtigen, wurde im Zellzählgerät stets der Bereich zwischen 7,5 und 30 μm erfasst. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass Fragmente kleiner 7,5 μm auf Zelltrümmer und tote Zellbestandteile zurückzuführen sind.

Für konfluente Zellen wurden im Fall der Prostatakarzinom- und Kolonkarzinomzellen folgende Zellzahlen/175 cm^2 Flasche, mittlere Volumina und Durchmesser ermittelt (Tab.8).

Tab.8: Zellzahl/175 cm^2 Zellkulturflasche, mittlerer Durchmesser und mittleres Volumen konfluenter Zellen

Zelllinie	Zellzahl/Flasche	Mittlerer Durchmesser [μm]	Mittleres Volumen [fl]
DU145	$1,2 \cdot 10^7$	16,3	$2,8 \cdot 10^3$
LNCaP	$1,2 \cdot 10^7$	15,0	$2,3 \cdot 10^3$
PC-3	$1,1 \cdot 10^7$	17,9	$3,6 \cdot 10^3$
SW707	$2,6 \cdot 10^7$	12,8	$1,4 \cdot 10^3$

4.1.2 Proliferationstest

Für die Aufnahmeversuche wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Daher wurden für jede Zelllinie Proliferationscharakteristika ermittelt (Abb. 12-15).

Das Plateau wurde von den untersuchten Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht (Tab.9). Es stellte sich bei den Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC-3 zwischen $1,2$ und $2 \cdot 10^6$, bei der Kolonkarzinomzelllinie SW707 bei $1 \cdot 10^7$ Zellen ein.

4. Ergebnisse

Tab.9: Dauer [h] bis zum Erreichen der jeweiligen Plateauphase in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl

Zelllinie	Zeit [h] bis zum Erreichen des Plateaus nach Aussaat von		
	25000 Zellen	50000 Zellen	75000 Zellen
DU145	238	238	238
LNCaP	497	326	326
PC-3	234	234	166
SW707	211	211	211

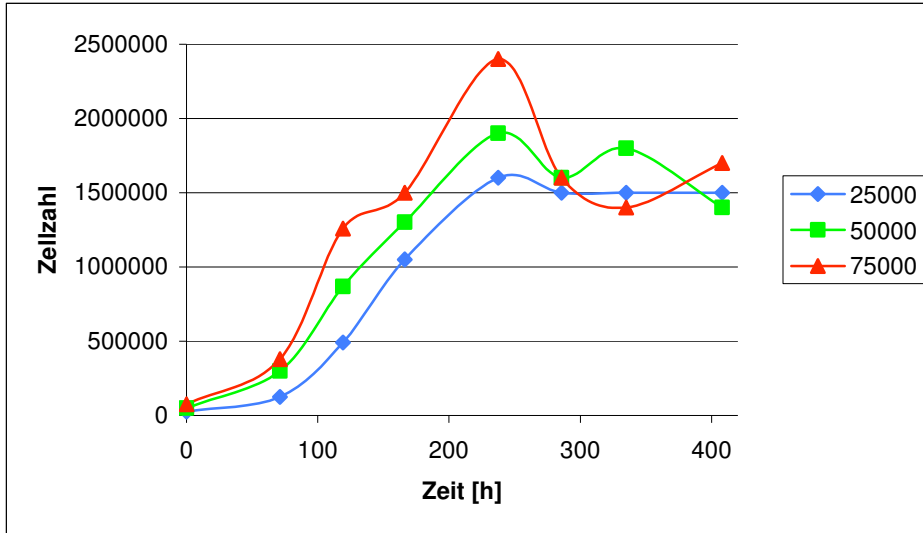


Abb. 12: Proliferationstest DU145. Zum Zeitpunkt 0h wurden je 25000, 50000 und 75000 Zellen ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat (x-Achse) wurde jeweils die Zellzahl (y-Achse) bestimmt. Der Kurvenverlauf zeigt eine erste, exponentielle Wachstumsphase und eine zweite gleich bleibende Phase nach Erreichen des Plateaus nach 238 h, in der keine Proliferation mehr stattfindet.

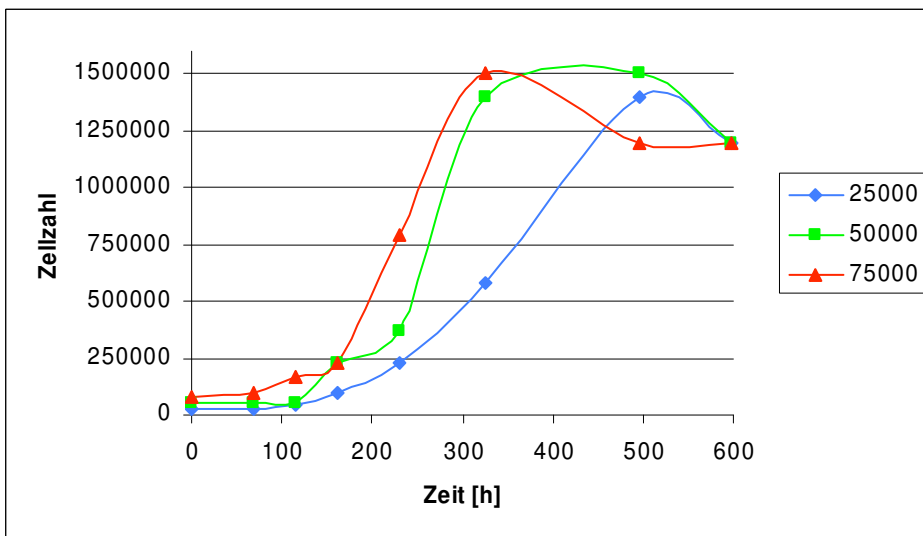


Abb. 13: Proliferationstest LNCaP (s. Abb. 12). Erreichen des Plateaus nach 497 h (25000) bzw. 326 h (50000, 75000)

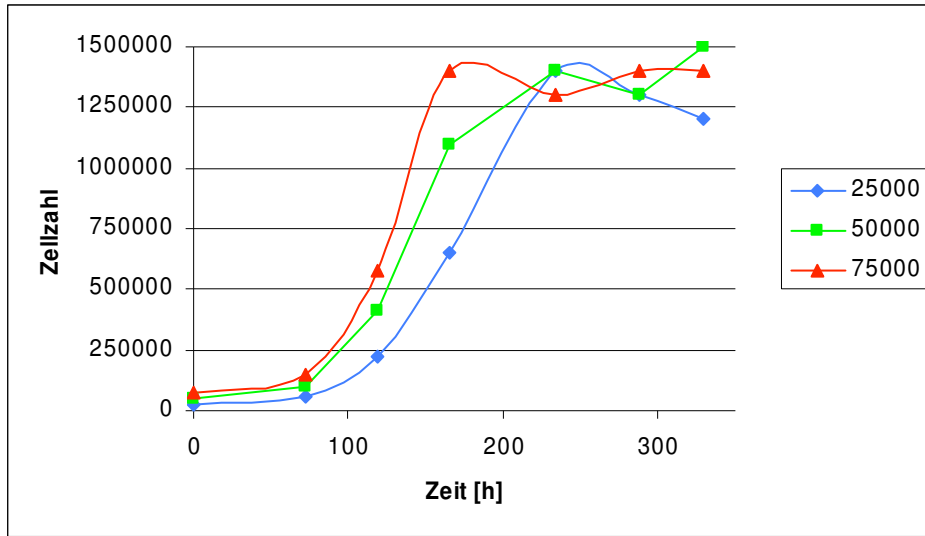


Abb. 14: Proliferationstest PC-3 (s. Abb. 12). Erreichen des Plateaus nach 234 h (25000, 50000) bzw. 166 h (75000)

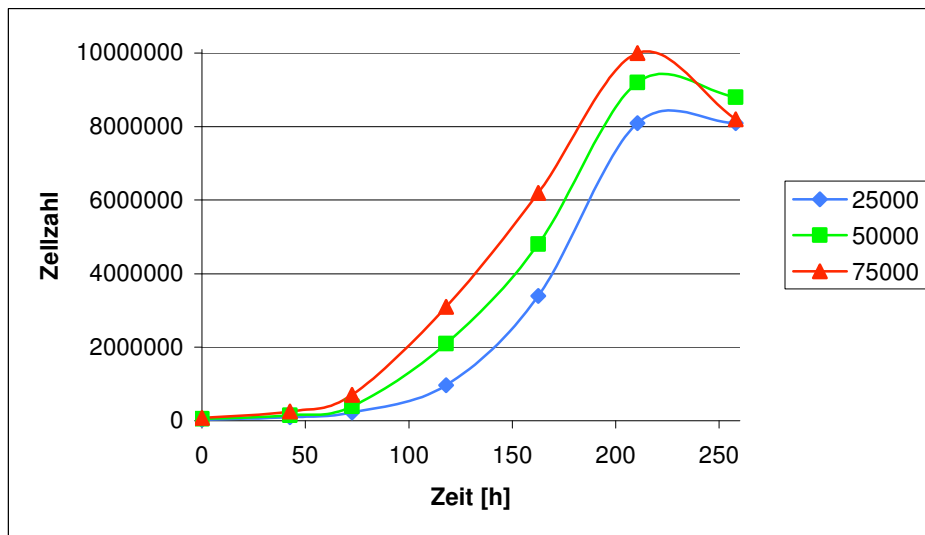


Abb. 15: Proliferationstest SW707 (s. Abb. 12). Erreichen des Plateaus nach 211 h

4.1.3. Verdopplungszeit

Wie die Ergebnisse aus den Proliferationstests zeigen, proliferieren die Zelllinien DU145, PC-3 und SW707 deutlich schneller als die LNCaP-Zellen (Tab.10).

Tab.10: Verdopplungszeiten [h] der untersuchten Zelllinien (n=12)

Zelllinie	t_{doppel} [h] \pm SEM [h]
DU145	$21,9 \pm 0,8$
LNCaP	$71,4 \pm 4,9$
PC-3	$27,0 \pm 1,1$
SW707	$25,8 \pm 2,5$

4.2 Grundlagen der FDG-Aufnahme

4.2.1 FDG-Aufnahme in DU145

Zur Etablierung der Methodik wurde zunächst die Aufnahme des Glukoseanalogons [^{18}F]FDG in die Prostatakarzinomzelllinie DU145 bei ansteigenden Konzentrationen kalter Glukose untersucht. Dabei zeigte sich mit zunehmender Konzentration an kalter Glukose eine Abnahme der [^{18}F]FDG-Aufnahme. Die Aufnahme wurde nach 5, 15, 30 oder 60 min abgestoppt. Je länger die Aufnahme dauerte, desto mehr FDG wurde aufgenommen, v.a. bei den niedrigen Konzentrationen kalter Glukose. Bei allen vier Zeitpunkten nahm die Aufnahme bis zu einer Glukosekonzentration von 1 mM stark ab und erreichte ab 5 mM (physiologischer Glukosespiegel) ein gleichbleibendes Plateau. Bei 5 bzw. 15 min wurden die höchsten Aufnahmen an FDG ohne Zugabe von kalter Glukose erzielt. Bei 30 bzw. 60 min war die FDG-Aufnahme bei einer Konzentration von 0,1 mM an kalter Glukose am größten (Abb. 16).

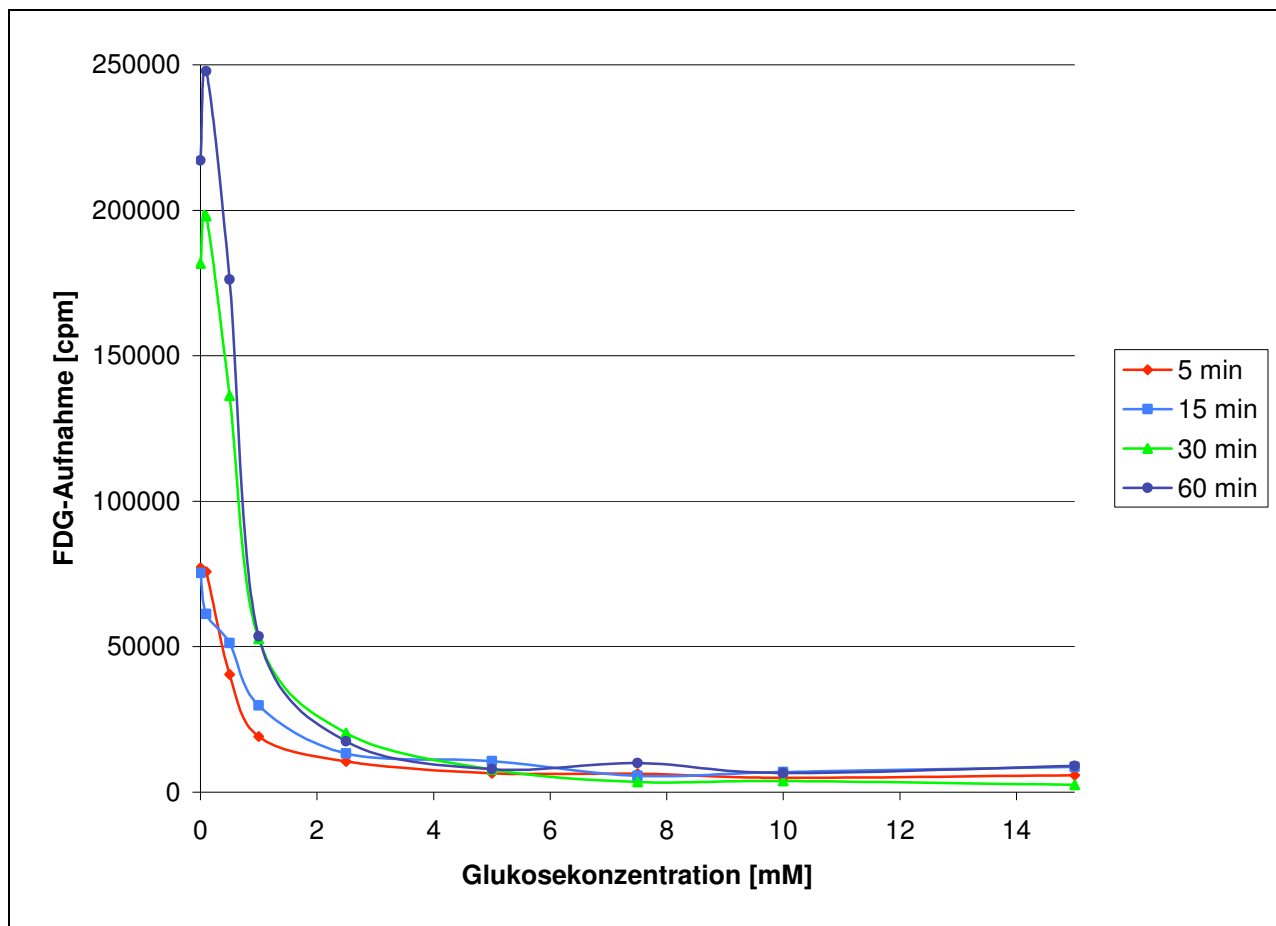


Abb. 16: [^{18}F]FDG-Aufnahme in DU145 über 5, 15, 30 und 60 min. Die Aufnahme wurde in Abhängigkeit der Glukosekonzentration untersucht (0 bis 15 mM). Die FDG-Aufnahme ist in counts per minute (cpm) angegeben.

4.2.2 FDG-Efflux aus DU145

Etwa die Hälfte des von den Zellen über 10 min bzw. 30 min aufgenommenen FDGs wurde nach Abstoppen und erneuter Inkubation für 0, 1, 3, 5, 10 und 20 min bei 37 °C in glukosefreiem Versuchspuffer wieder aus den Zellen ausgeschieden. Dabei fand der Efflux vor allem innerhalb der ersten drei Minuten statt (Abb.17).

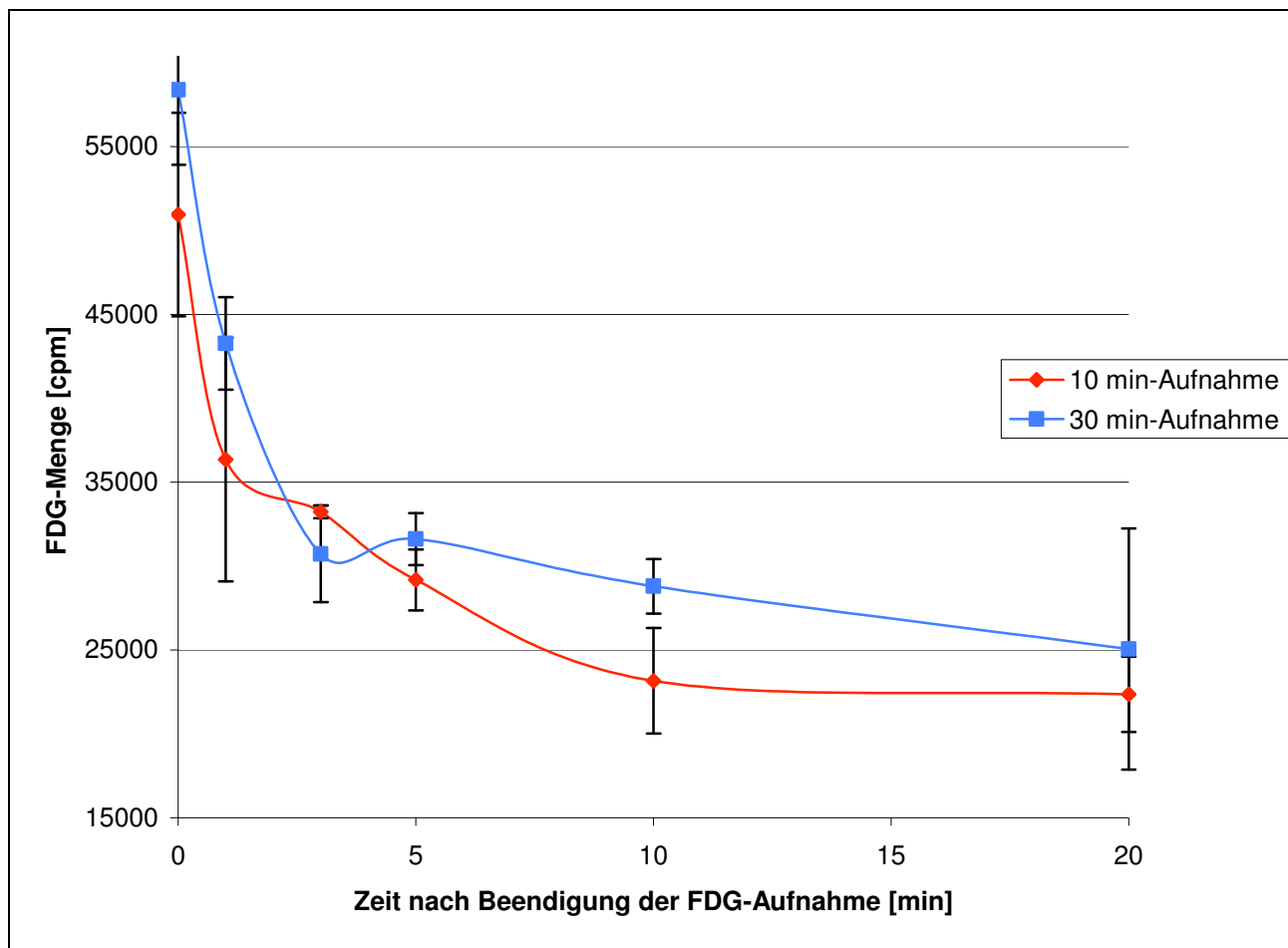


Abb. 17: $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Efflux aus DU145. Die Werte zum Zeitpunkt 0 min geben die $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Aufnahme nach 10 min bzw. 30 min wieder. Der Efflux wurde 1, 3, 5, 10 und 20 min nach der Aufnahmeperiode (10 min bzw. 30 min) ermittelt und in cpm angegeben.

4.3 Bindung von $[^{11}\text{C}]\text{Cholin}$ in Eppendorfgefäßen

Um der Frage nachzugehen, ob das kationische Cholin aufgrund seiner positiven Ladung an der Kunststoffwand der Eppendorfgefäße haftet und somit die Ergebnisse der Cholinaufnahme beeinträchtigen könnte, wurden Standardependorcups mit „DNA lo bind“ und „Protein lo bind“ Gefäßen verglichen.

Dazu wurden die Gefäße mit 200 ml $[^{11}\text{C}]\text{Cholin}$ (370 kBq; $10\mu\text{Ci}$) in Versuchspuffer für 10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde in allen Cups nur zwischen 0,013% und 0,017% der eingesetzten Aktivität gemessen (Tab. 11). Für alle weiteren Versuche wurden daher Standardependorcups verwendet.

4. Ergebnisse

Tab.11: ^{11}C -Aktivität nach Inkubation mit 200 ml ^{11}C Cholin (370 kBq; 10 μCi) in Versuchspuffer für 10 min und dreimaligem Waschen.

cpm	Mittelwert \pm SEM	% der eingesetzten Aktivität
Kontrolle	3049880 \pm 48637	100
Standardeppendorf	422 \pm 24	0,014
Eppendorf DNA lo bind	396 \pm 41	0,013
Eppendorf Protein lo bind	526 \pm 27	0,017

4.4 Cholintransport in die Prostatakarzinomzelllinie DU145

Bei ansteigender Konzentration an kaltem Cholin (0, 1, 5, 10, 20, 100 μM) wurde eine deutliche Abnahme der ^{11}C Cholinaufnahme beobachtet (Abb. 18). Je länger die Aufnahme dauerte, desto mehr Cholin wurde aufgenommen (Abb. 19). Das bei der FDG-Aufnahme beobachtete gleich bleibend niedrige Plateau bei Glukosekonzentrationen ab ca. 3 mM konnte mit den eingesetzten Cholinkonzentrationen nicht beobachtet werden. Grund dafür könnte sein, dass die Cholinkonzentrationen zu niedrig gewählt worden waren. Aus diesem Grund wurden für die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik höhere Konzentrationen an kaltem Cholin verwendet (s. Tab.5).

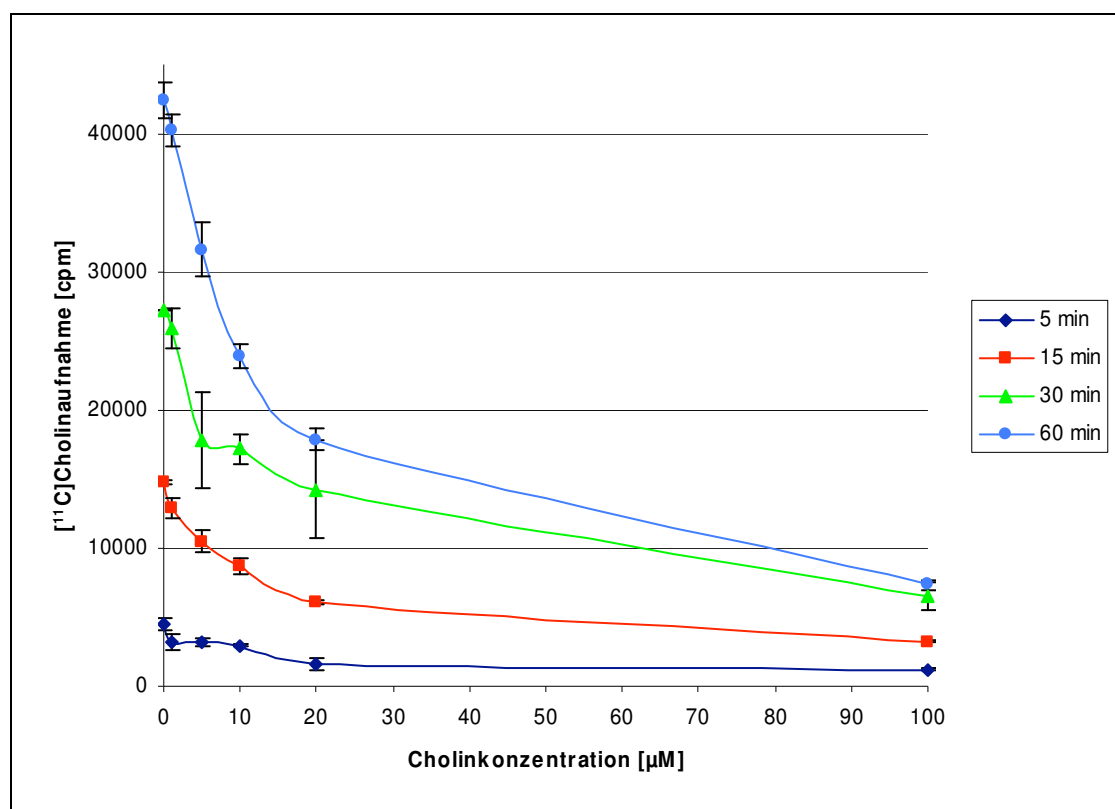


Abb. 18: ^{11}C Cholinaufnahme in DU145 über 5, 15, 30 und 60 min. Die Aufnahme wurde in Abhängigkeit der Cholinkonzentration untersucht (0 bis 100 μM). Die Cholinaufnahme ist in counts per minute (cpm) angegeben.

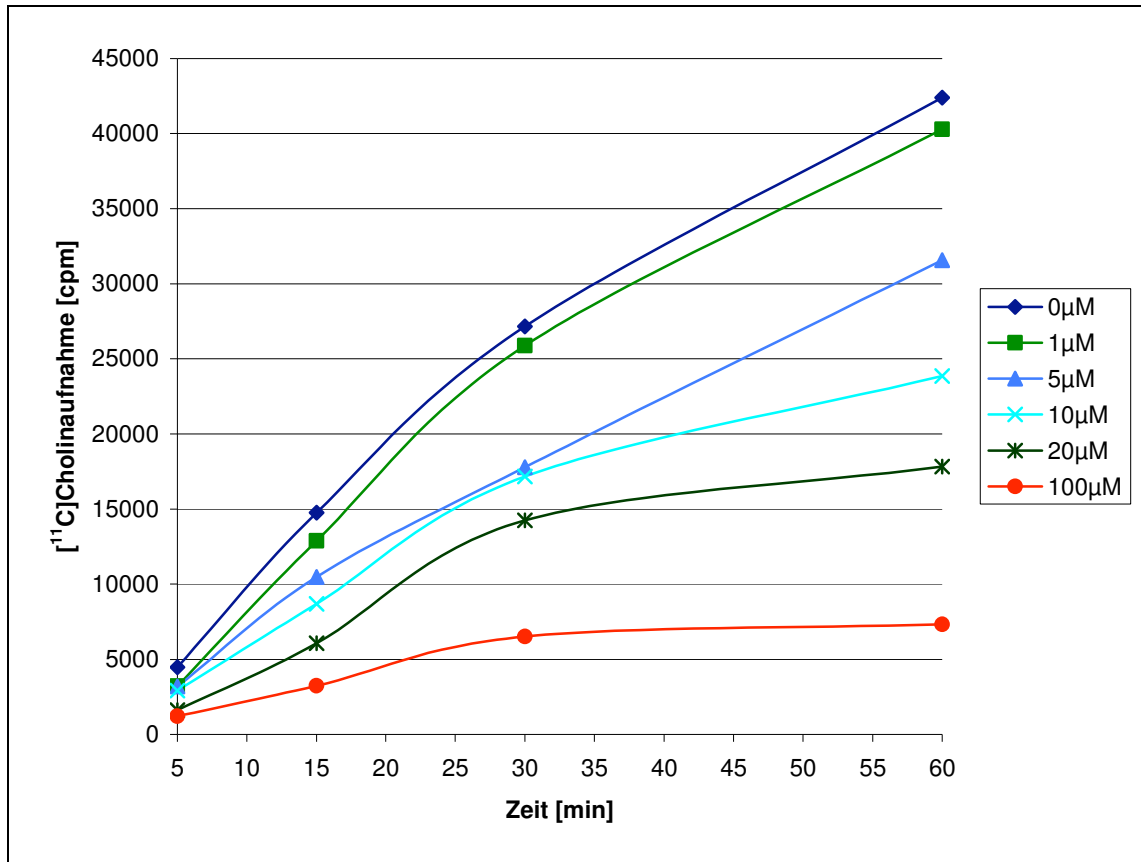


Abb. 19: $[^{11}\text{C}]$ Cholinaufnahme in DU145 bei unterschiedlichen Konzentrationen an kaltem Cholin (0 bis $100\mu\text{M}$). Die Aufnahme wurde nach 5, 15, 30 und 60 min gemessen und in counts per minute (cpm) angegeben.

4.5 Aufnahme von $[^{18}\text{F}]$ FDG und $[^3\text{H}]$ Cholin in die beiden Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 im Vergleich zur Kolonkarzinomzelllinie SW707

4.5.1 $[^{18}\text{F}]$ FDG-Aufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707 in Abhängigkeit von der Zeit

In den Kolonkarzinomzellen SW707 war die FDG-Aufnahme über vier Stunden deutlich höher als in den Prostatakarzinomzellen LNCaP und PC-3. Bei allen Zelllinien zeigte die FDG-Aufnahme innerhalb der ersten Stunde die stärkste Zunahme. Im weiteren Verlauf über drei Stunden war die Zunahme geringer (Tab.12, Abb. 20).

4. Ergebnisse

Tab.12: [^{18}F]FDG-Aufnahme in SW707 verglichen mit LNCaP bzw. PC-3

[^{18}F]FDG-Aufnahme in	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
SW707 verglichen mit LNCaP	9,0-fach	8,3-fach	6,3-fach	4,1-fach	3,7-fach
SW707 verglichen mit PC-3	3,1-fach	3,0-fach	3,3-fach	3,1-fach	3,8-fach

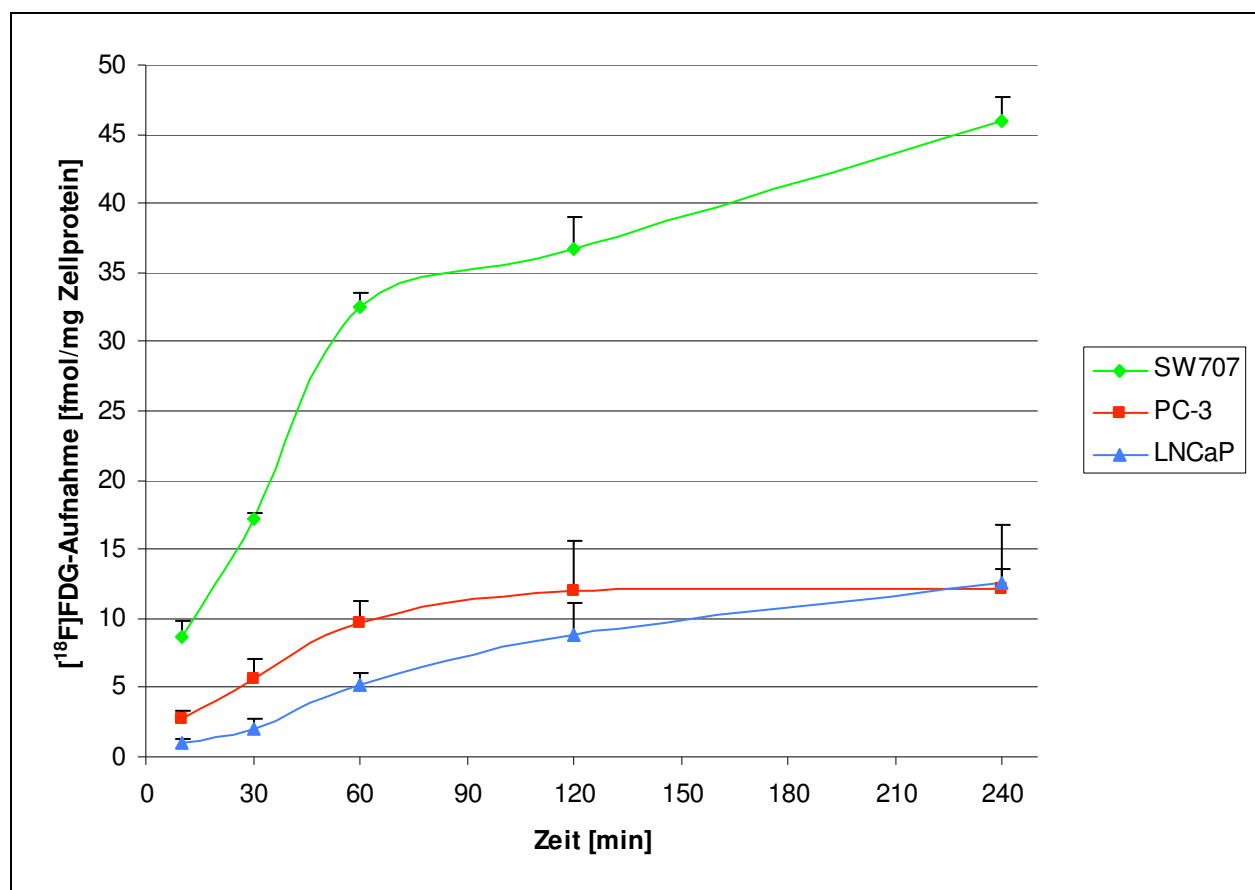


Abb. 20: [^{18}F]FDG-Aufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707. Zu verschiedenen Zeitpunkten (10, 30, 60, 120, 240 min) nach Zugabe von [^{18}F]FDG (je 370 kBq zu 10^5 Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als fmol/mg Zellprotein dargestellt.

4.5.2. [³H]Cholinaufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707 in Abhängigkeit von der Zeit

Von den untersuchten Zelllinien zeigten die LNCaP-Zellen die höchste und die PC-3-Zellen die geringste Aufnahme von [³H]Cholin über den gesamten Beobachtungszeitraum von 240 min (Tab.13, Abb.21).

Tab.13: [³H]Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 im Vergleich zu SW707.

[³ H]Cholinaufnahme in	1 min	10 min	20 min	60 min	120 min	240 min
LNCaP verglichen mit SW707	2,8-fach	1,6-fach	2,9-fach	2,5-fach	2,1-fach	1,7-fach
PC-3 verglichen mit SW707	1,2-fach	0,9-fach	0,7-fach	0,6-fach	0,5-fach	0,4-fach

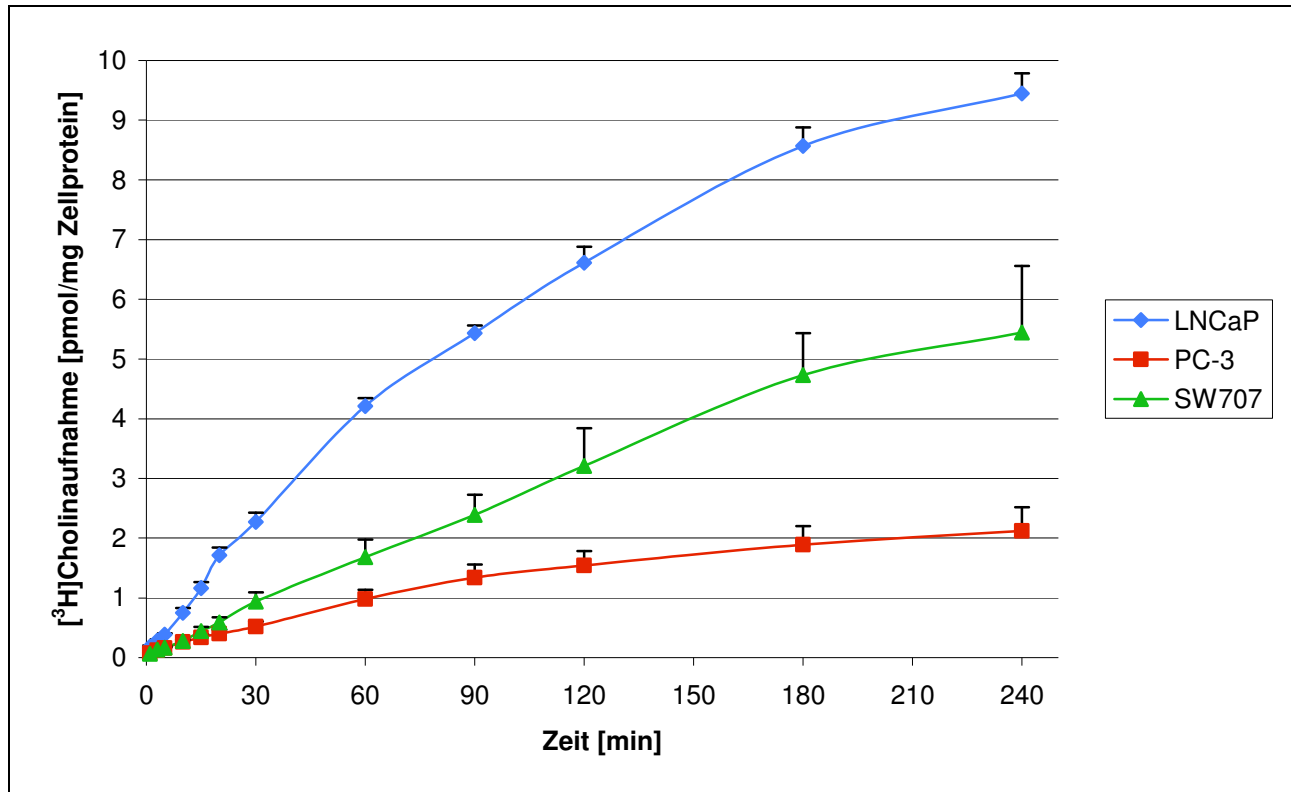


Abb. 21: [³H]Cholinaufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [³H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10⁵ Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als pmol/mg Zellprotein dargestellt.

4.6 [^3H]Cholinaufnahme in die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 in Abhängigkeit von der Zeit und von NaCl

In NaCl-haltigem Puffer stieg die [^3H]Cholinaufnahme in beide Prostatakarzinomzelllinien über vier Stunden stetig auf den ca. 1,8-fachen (LNCaP) bzw. 2,5-fachen Wert (PC-3) im Vergleich zu NaCl-freiem Medium an, ohne ein Sättigung zu erreichen (Abb. 22-24). Der Anstieg der Aufnahme war jeweils innerhalb der ersten Stunde nahezu linear (3.2.4.8).

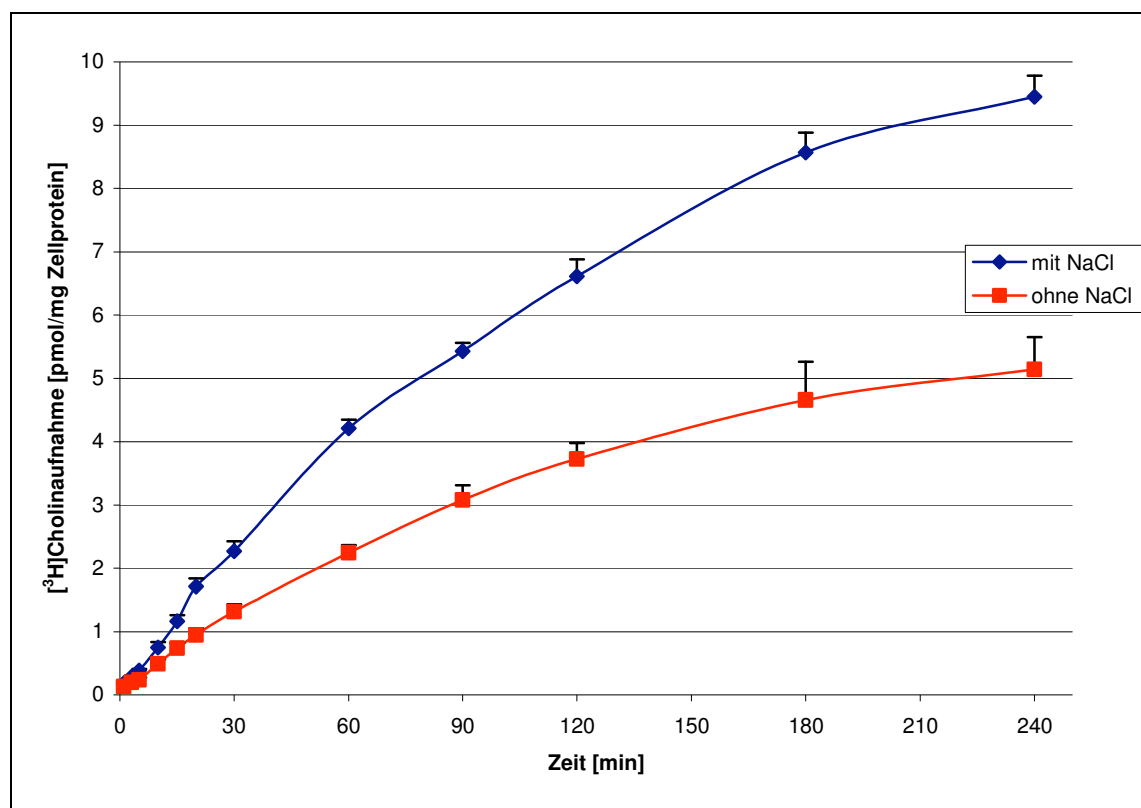


Abb. 22: [^3H]Cholinaufnahme in LNCaP in NaCl-haltigem und -freiem Versuchspuffer. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [^3H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10^5 Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als pmol/mg Zellprotein dargestellt.

4. Ergebnisse

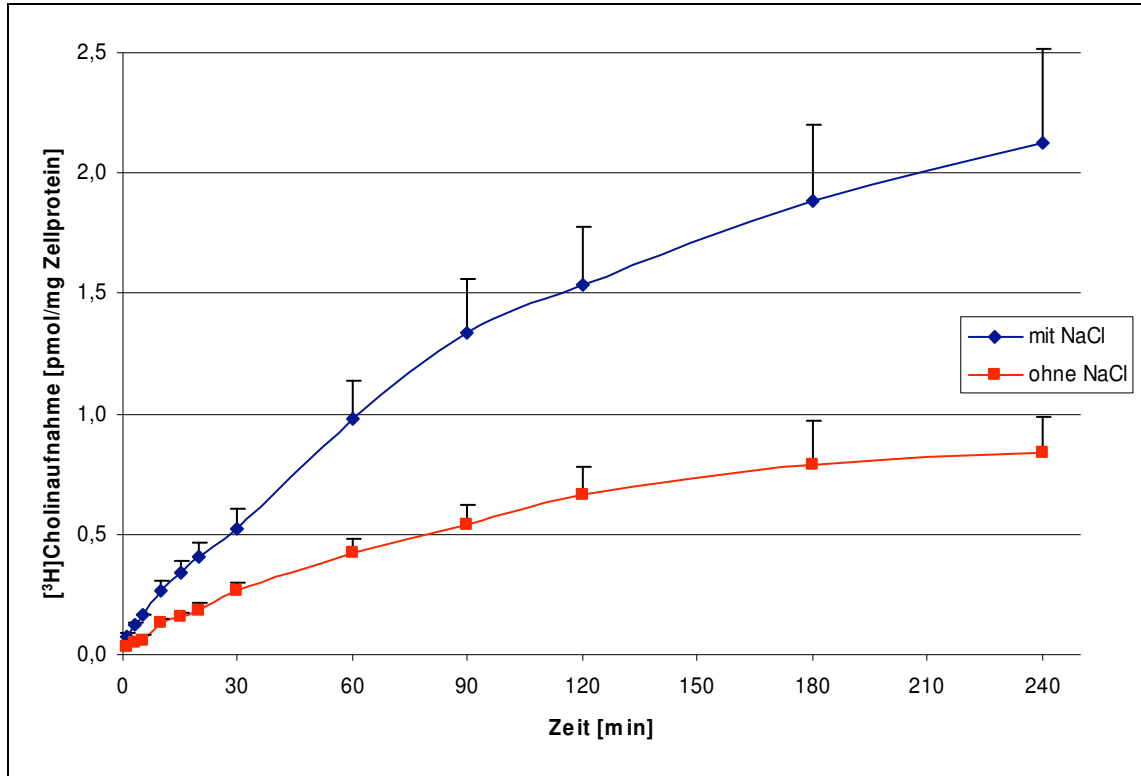


Abb. 23: [^3H]Cholinaufnahme in PC-3 in NaCl-haltigem und -freiem Versuchspuffer. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [^3H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10^5 Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als pmol/mg Zellprotein dargestellt.

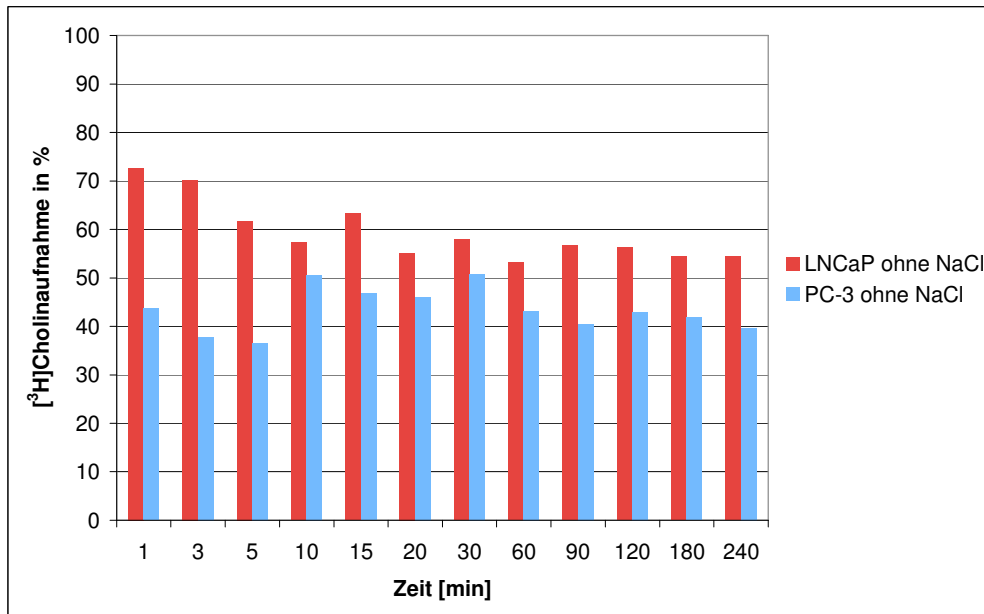


Abb. 24: [^3H]Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [^3H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10^5 Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen. Gezeigt ist das Verhältnis der Aufnahme in NaCl-freiem zu NaCl-haltigem Versuchspuffer (=100%).

4.7 Hemmung der Aufnahme von [³H]Cholin

4.7.1 Hemmung der [³H]Cholinaufnahme durch kaltes Cholin und HC-3 in LNCaP- und PC-3-Zellen

Die Aufnahme von [³H]Cholin wurde in Gegenwart von 0,01 bis 10000 μM an kaltem Cholin bzw. Hemicholinium-3 (HC-3) untersucht. Für beide Substanzen ergab sich für beide Zelllinien eine sehr ähnliche Hemmwirkung, wobei kaltes Cholin jeweils eine geringfügig stärkere Hemmung bewirkte. Im Bereich zwischen 1 μM und 100 μM war die größte Wirkung auf die Cholinaufnahme zu sehen. Ab 1.000 μM war die Aufnahme nahezu komplett gehemmt (Abb. 25, 26).

Mithilfe von GraphPad Prism wurden folgende IC_{50} -Werte berechnet:

LNCaP:	6,7 μM kaltes Cholin bzw. 24,5 μM HC-3
PC-3:	7,3 μM kaltes Cholin bzw. 17,3 μM HC-3

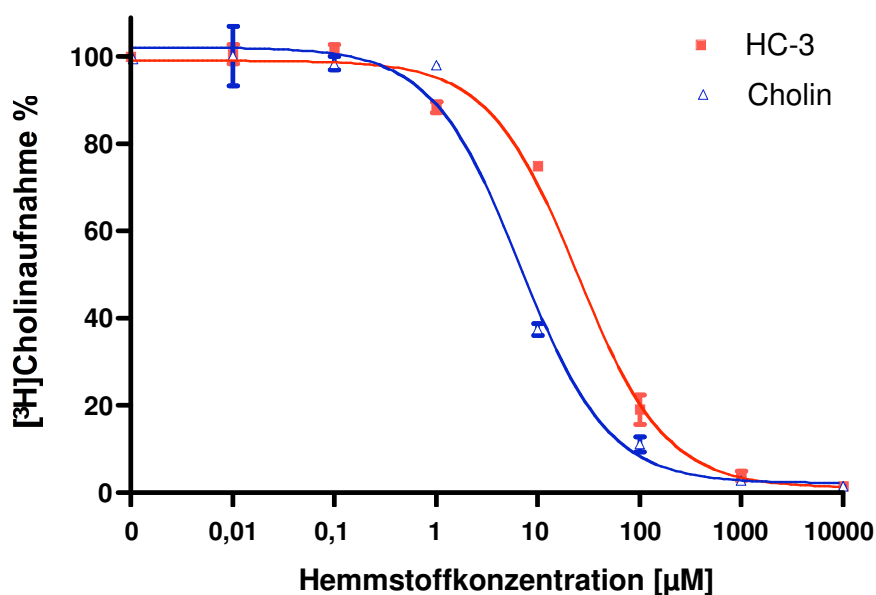


Abb. 25: Konzentrationsabhängige Hemmung der [³H]Cholinaufnahme in LNCaP durch kaltes Cholin bzw. HC-3 (100% = Kontrolle ohne Hemmstoffgabe; logarithmische Darstellung der Abszisse).

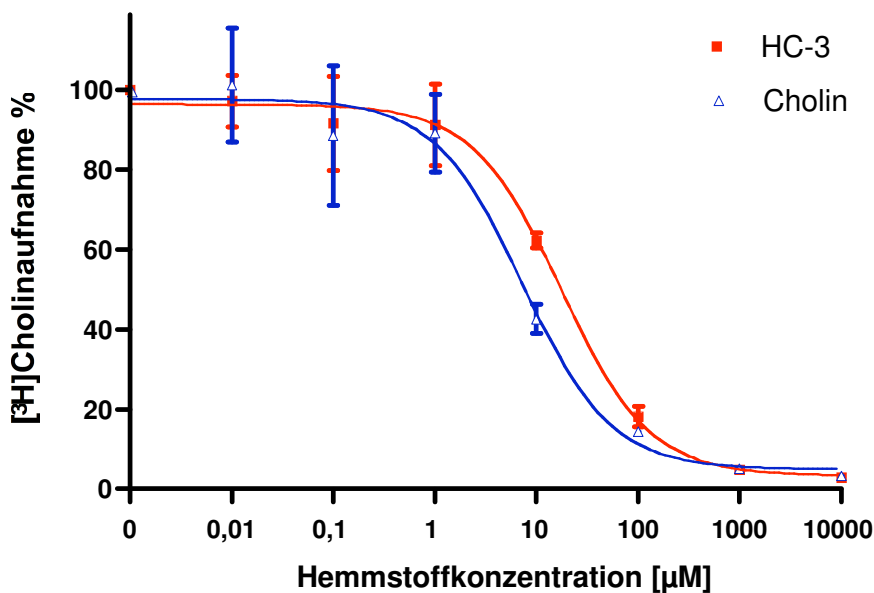


Abb. 26: Konzentrationsabhängige Hemmung der [³H]Cholinaufnahme in PC-3 durch kaltes Cholin bzw. HC-3 (100% = Kontrolle ohne Hemmstoffgabe; logarithmische Darstellung der Abszisse).

4.7.2 Beeinträchtigung der [³H]Cholinaufnahme in LNCaP- und PC-3-Zellen durch kaltes Cholin, HC-3, TEA, Guanidin und Ouabain

Kaltes Cholin, HC-3, TEA, Guanidin bzw. Ouabain (je 1 mM) bewirkten eine unterschiedlich starke Hemmung der [³H]Cholinaufnahme bei LNCaP- und PC-3-Zellen. Während kaltes Cholin und HC-3 die Aufnahme nahezu komplett unterdrückten, verursachten TEA und Ouabain nur eine vergleichsweise geringe Hemmung. Für Guanidin lagen die Werte dazwischen (Tab.14, Abb. 27).

Tab.14: [³H]Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 in Gegenwart von kaltem Cholin, HC-3, TEA, Guanidin und Ouabain (je 1 mM) in % der Kontrolle (100%).

	LNCaP	PC-3
Kontrolle	100	100
Cholin	8,0 ± 1,1	4,3 ± 0,1
HC-3	7,9 ± 1,1	3,8 ± 0,4
TEA	80,1 ± 3,9	79,5 ± 1,6
Guanidin	36,9 ± 0,1	31,3 ± 8,1
Ouabain	82,8 ± 3,1	94,8 ± 6,7

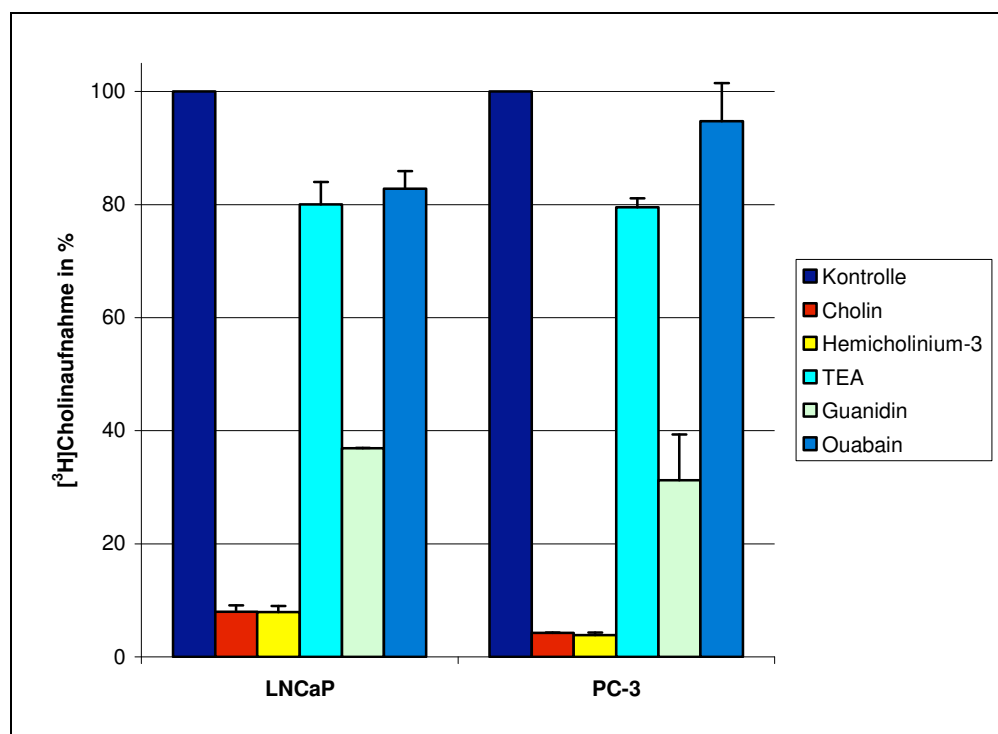


Abb. 27: $[^3\text{H}]$ Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 in Gegenwart von kaltem Cholin, HC-3, TEA, Guanidin und Ouabain (je 1 mM) in % der Kontrolle (100%).

4.8 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Aufnahmekinetiken von $[^3\text{H}]$ Cholin für LNCaP- und PC-3-Zellen zeigen einen steilen Anstieg der Cholinaufnahme bis 10 μM , gefolgt von einem flacheren Anstieg, der selbst bei einer CholinKonzentration von 10 mM keine Sättigung und damit keine Maximalgeschwindigkeit (v_{max}) erkennen lässt. Die Aufnahmekinetik deutet auf eine Diffusion hin: je mehr Cholin angeboten wird, desto mehr wird auch aufgenommen (Abb. 28).

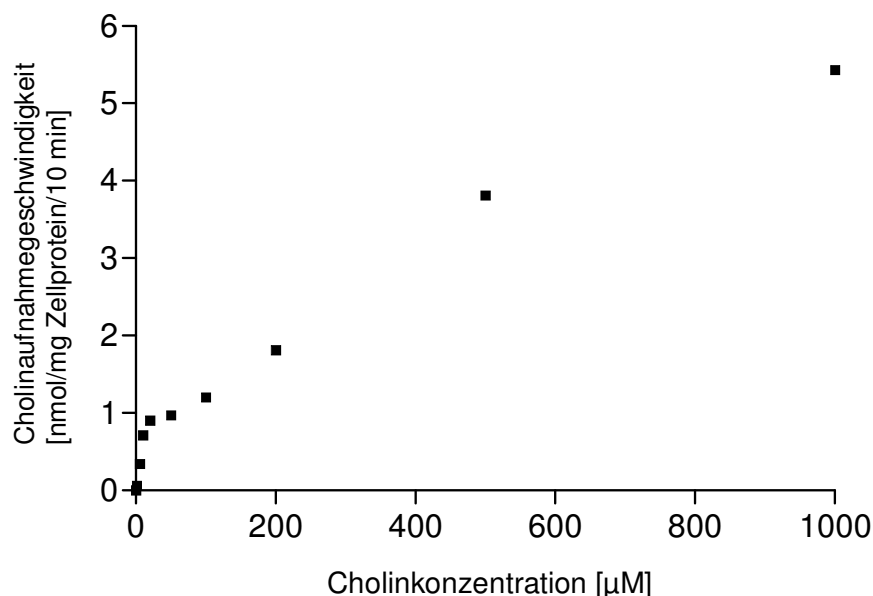


Abb. 28: Cholinaufnahmegeschwindigkeit der PC-3-Zellen (nmol/mg Zellprotein/10 min) in Abhängigkeit von der Cholinkonzentration (0-1000 µM). Für LNCaP-Zellen wurde ein ähnlicher Kurvenverlauf ermittelt.

Wie die Ergebnisse der NaCl-abhängigen [³H]Cholinaufnahme belegen, wird der Cholintransport in die Prostatakarzinomzellen LNCaP bzw. PC.3 durch eine NaCl-abhängige und eine NaCl-unabhängige Komponente vermittelt (Abb. 22-24). Mittels Michaelis-Menten-Kinetik sollte die Transporter vermittelte Komponente, die per definitionem sättigbar ist, betrachtet werden. Dazu wurde durch den Wert für die Cholinaufnahme bei 10 mM eine Gerade durch den Ursprung (Ursprungsgerade) erstellt. Die entsprechenden Werte der Ursprungsgerade wurden von der Gesamtaufnahme subtrahiert. Die resultierenden Werte entsprechen der spezifischen Aufnahme (Abb. 29). Zur übersichtlicheren Darstellung wurden in den folgenden Abbildungen nur die Werte bis 200 µM – entsprechend der 20-fachen physiologischen Cholinkonzentration – berücksichtigt.

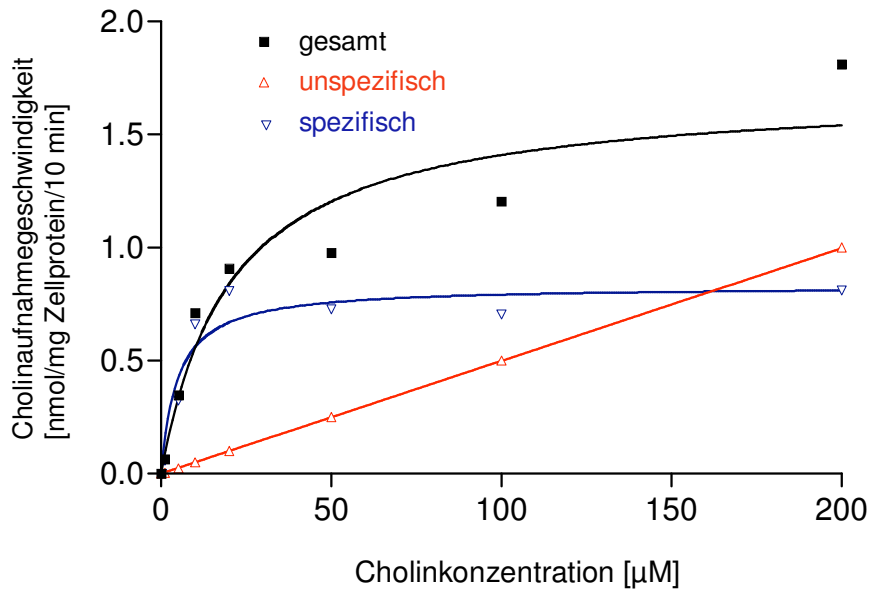


Abb. 29: Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik für Cholin (hier für PC-3-Zellen gezeigt). Dazu wurden die Konzentrationen an kaltem Cholin (0-200µM) gegen die Aufnahmegeschwindigkeiten (nmol/mg Zellprotein/10 min) aufgetragen. Die Ursprungsgerade durch den 10000 µM-Wert repräsentiert die unspezifische Cholinaufnahme. Durch Subtraktion entsprechender Werte der Ursprungsgeraden (unspezifische Aufnahme) von der nicht sättigbaren Gesamtholinaufnahme erhält man die sättigbare, spezifische Cholinaufnahme. Aus der spezifischen Cholinaufnahme lassen sich K_M - und v_{max} -Werte bestimmen (s. Abb. 30-31 und 33-36).

Sämtliche K_M und v_{max} -Werte wurden nach der in Abb. 29 dargestellten Methode errechnet. Für beide Zelllinien wurden hochaffine Cholintransporter mit K_M -Werten von 3,8 µM (LNCaP) bzw. 7 µM (PC-3) sowie v_{max} -Werten von 1,6 (LNCaP) bzw. 0,9 (PC-3) nmol/mg Zellprotein/10 min ermittelt (Tab. 16; Abb. 30, 31).

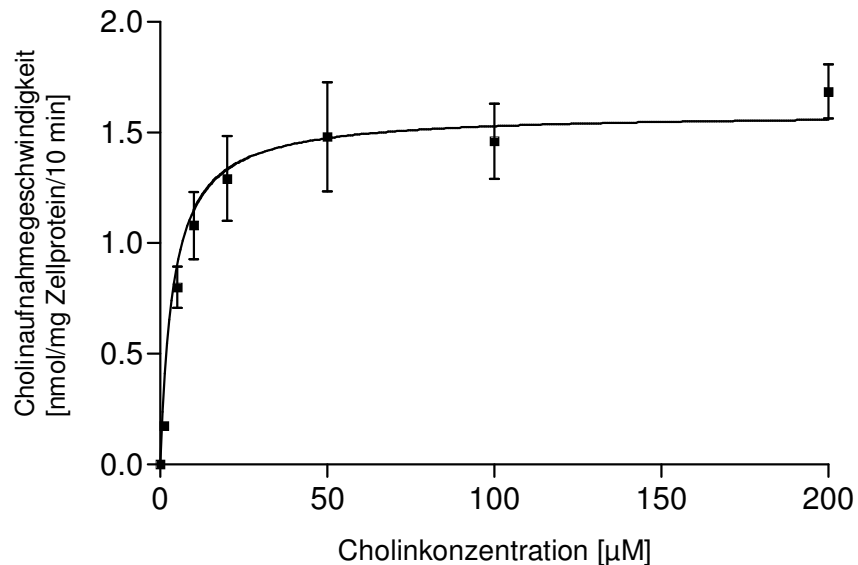


Abb. 30: Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in LNCaP. Dazu wurden die Konzentrationen an kaltem Cholin (0-200µM) gegen die Aufnahmegeschwindigkeiten (nmol/mg Zellprotein/10 min) aufgetragen. Durch Subtraktion der unspezifischen von der Gesamtholinaufnahme (s. Abb. 29) wurden für LNCaP-Zellen folgende Werte der spezifischen Cholinaufnahme berechnet: $K_M=3,8\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\max}=1,6\text{nmol/mg Zellprotein/10 min}$.

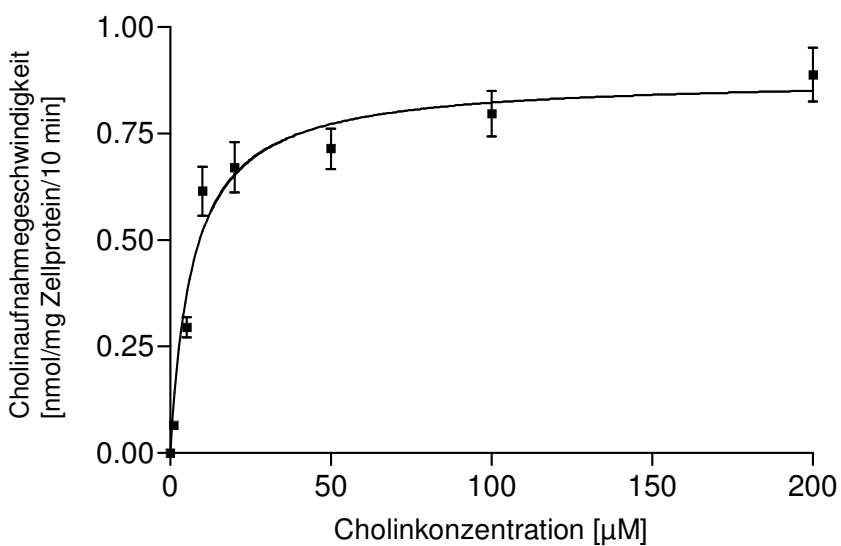


Abb. 31: Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in PC-3 (s.a. Abb.30). $K_M=7\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\max}=0,9\text{nmol/mg Zellprotein/10 min}$.

4.9 Behandlung von LNCaP und PC-3 mit Bicalutamid und Docetaxel

4.9.1 Beeinträchtigung der Zellproliferation durch Bicalutamid und Docetaxel

Mithilfe des klonogenen Tests wurden die Beeinträchtigung der Zellproliferation ermittelt sowie die IC_{50} -Dosen überprüft. Da Bicalutamid in DMSO gelöst wurde, sollte zudem der Einfluss der entsprechenden DMSO-Konzentration auf das Wachstum untersucht werden. Wie in Tab.15 und Abb. 32 gezeigt reduziert Bicalutamid und Docetaxel das Überleben bei LNCaP-Zellen auf 48% bzw. 61% und bei PC-3-Zellen auf 57% bzw. 53%. DMSO zeigte keinen zytotoxischen Effekt.

Tab.15: Überleben von LNCaP und PC-3 nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC_{50} -Dosis) bzw. DMSO über 5 Tage (s. Tab.6).

	LNCaP (%) \pm SEM	PC-3 (%) \pm SEM
Kontrolle	100	100
Bicalutamid	48 \pm 2,0	57 \pm 2,2
Docetaxel	61 \pm 2,0	53 \pm 1,9
DMSO	98 \pm 2,2	101 \pm 2,5

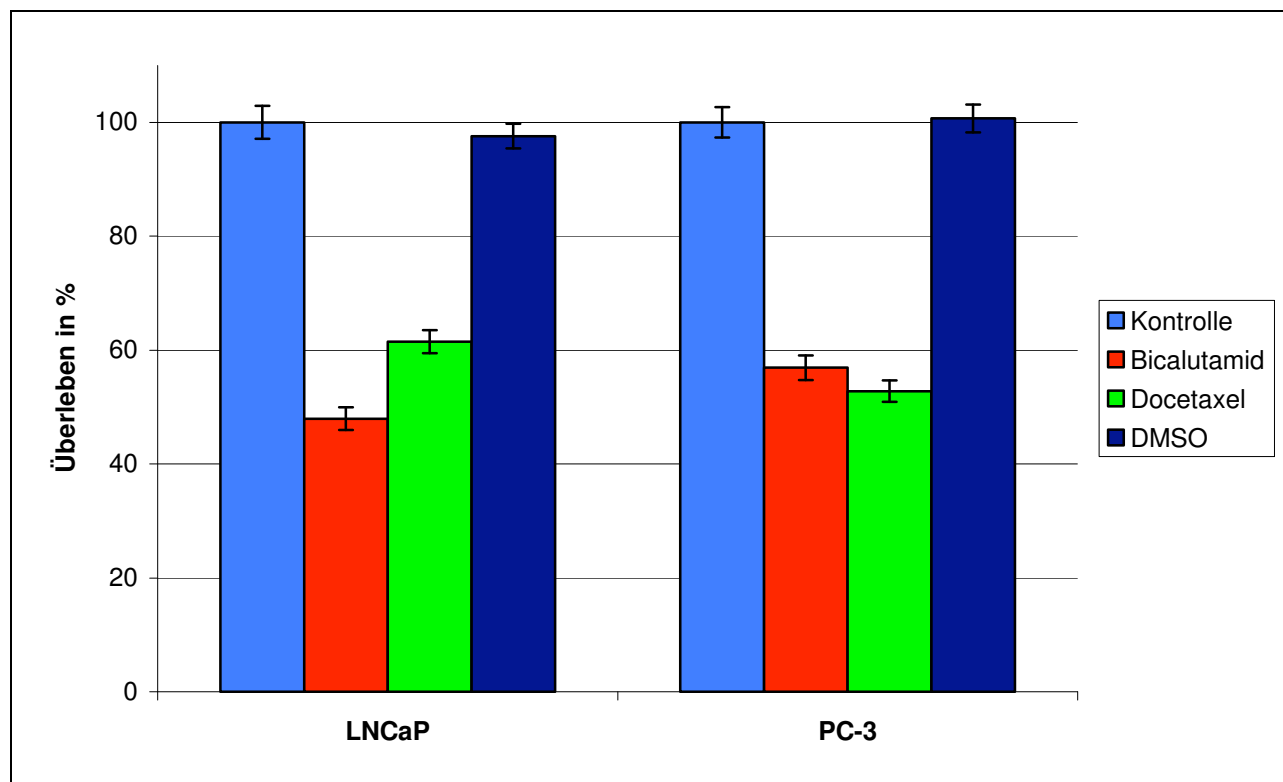


Abb. 32: Überleben von LNCaP und PC-3 nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC_{50} -Dosis) bzw. DMSO über 5 Tage (s. Tab.6).

4.9.2 Einfluss von Bicalutamid und Docetaxel auf die spezifische Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 (Michaelis-Menten-Kinetik)

Die Behandlung der beiden Prostatakarzinomzelllinien mit Bicalutamid und Docetaxel veränderte die K_M - bzw. v_{max} -Werte nur unbedeutend: Die K_M -Werte blieben im hochaffinen Bereich kleiner 10 μM und die Werte für v_{max} waren im Bereich zwischen 1,0 und 2,4 nmol/mg Zellprotein/10 min, was jeweils im Bereich der Kontrollgruppe lag (Tab.16, Abb. 33-36). DMSO zeigte keinerlei Einfluss auf K_M - oder v_{max} -Werte.

Tab.16: K_M - und v_{max} -Werte mit Bicalutamid (n=8) bzw. Docetaxel (n=8) behandelter LNCaP und PC-3-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=16).

Zelllinie	Behandlung	K_M [μM]	v_{max} [nmol/mg Zellprotein/10 min]
LNCaP	Kontrolle	3,8	1,6
	Bicalutamid	9,5	1,4
	Docetaxel	8,8	2,8
PC-3	Kontrolle	7,0	0,9
	Bicalutamid	5,9	1,0
	Docetaxel	6,0	1,1

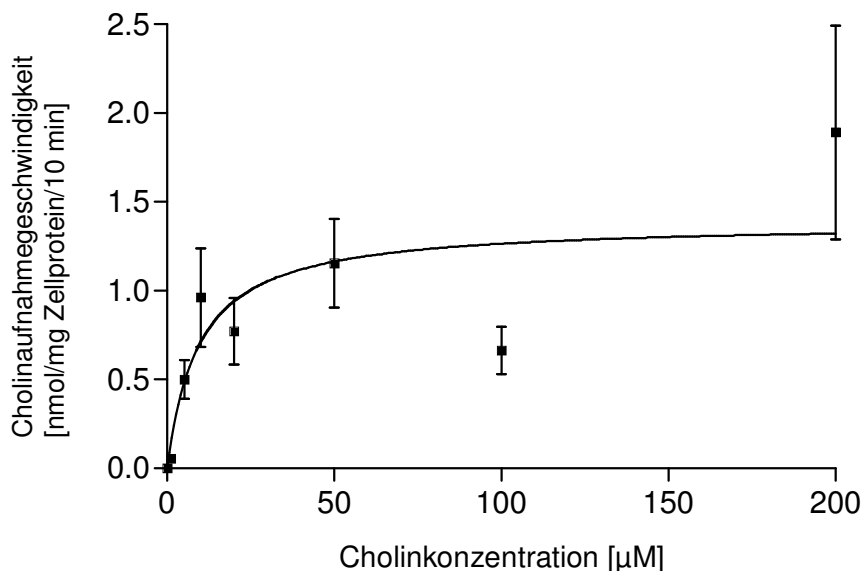


Abb. 33: Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in LNCaP nach Behandlung mit Bicalutamid (s.a. Abb. 30). $K_M=9,5\mu\text{M}$ Cholin; $v_{max}=1,4\text{nmol/mg Zellprotein/10 min}$.

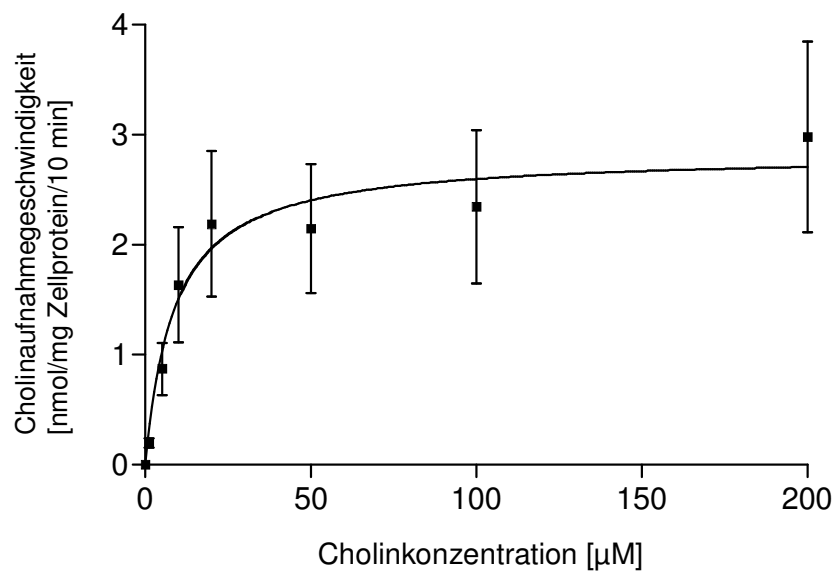


Abb. 34: Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in LNCaP nach Behandlung mit Docetaxel (s.a. Abb. 30). $K_M=8,8\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\text{max}}=2,8\text{nmol/mg Zellprotein/10 min}$.

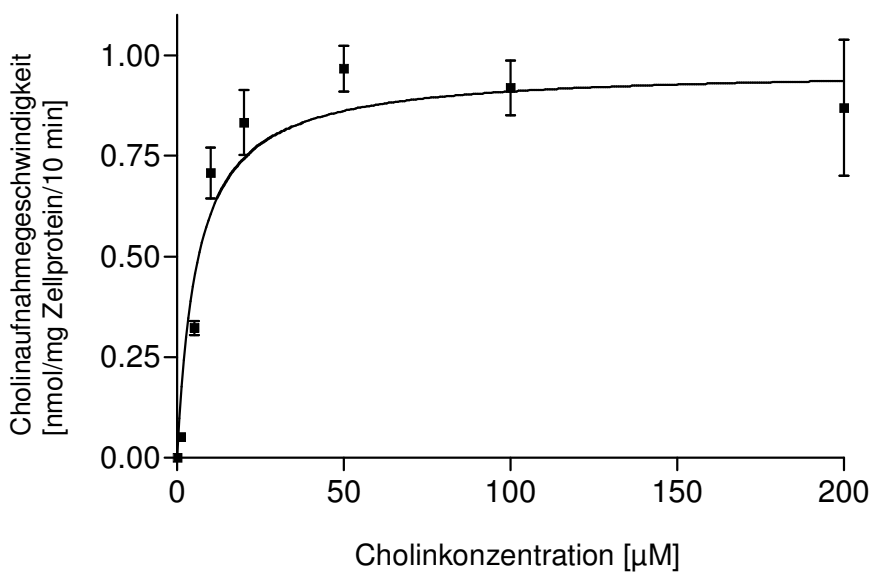


Abb. 35: Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in PC-3 nach Behandlung mit Bicalutamid (s.a. Abb. 30). $K_M=5,9\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\text{max}}=1\text{nmol/mg Zellprotein/10 min}$.

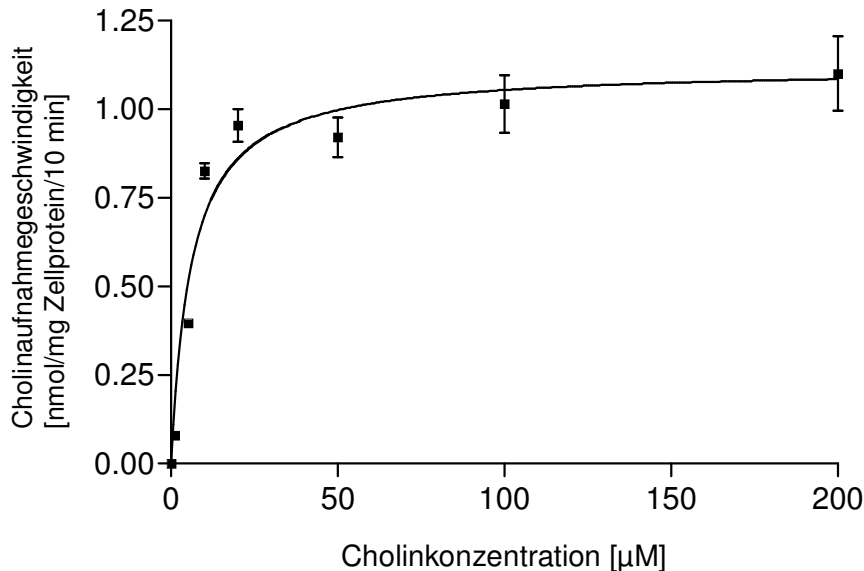


Abb. 36: Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in PC-3 nach Behandlung mit Docetaxel (s.a. Abb. 30). $K_M=6\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\text{max}}=1,1\text{nmol/mg Zellprotein/10 min}$.

4.9.3 Einfluss von Bicalutamid und Docetaxel auf die Gesamtcholinaufnahme in LNCaP und PC-3

Wie gezeigt (s. 4.9.2) hatte die Behandlung der Zellen mit Bicalutamid und Docetaxel zwar keinen bedeutenden Einfluss auf die spezifische, d.h. Transporter vermittelte Cholinaufnahme, wohl aber auf die Gesamtcholinaufnahme. In beiden Zelllinien stieg die Gesamtcholinaufnahme nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel in Abhängigkeit von der Cholinkonzentration deutlich an (Tab.17, Abb. 38, 39).

In LNCaP-Zellen war die Cholinaufnahme nach Behandlung mit Bicalutamid im Bereich der physiologischen Cholinkonzentration von 10 µM nicht verändert (99%), bei 5 µM (87%) und bei 20 µM (89%) allerdings leicht erniedrigt. Erst ab der Cholinkonzentration von 50 µM steigerte sich die Cholinaufnahme signifikant und erreichte bei 10 mM 324% der Kontrolle.

Die Aufnahme der mit Docetaxel behandelten LNCaP-Zellen bewegte sich zwischen 108% und 174% der Kontrolle. Die Erhöhung zeigte sich bereits im Bereich physiologischen Cholinkonzentration: 126% bei 5 µM, 141% bei 10 µM und 163% bei 20 µM Cholin.

Nach Behandlung von PC-3-Zellen mit Bicalutamid war die Aufnahme im Bereich der physiologischen Cholinkonzentration zwischen 5 µM und 20 µM leicht erhöht (116% - 118%). Ab 50 µM stieg die Cholinaufnahme deutlich an und erreichte bei 10 mM 296% der Kontrolle.

4. Ergebnisse

Nach Behandlung der PC-3-Zellen mit Docetaxel war die Cholinaufnahme ebenfalls durchweg höher (112% - 150%) als in den Kontrollen. Zwischen 5 μM und 20 μM stieg die Aufnahme 112% bis 128% der Kontrolle. Ein deutlicher Anstieg bei den höheren Cholinkonzentrationen ab 50 μM war jedoch nicht zu beobachten.

Tab.17: Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 in % der Kontrolle (100%) nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC_{50}) über 5 Tage in Abhängigkeit von der Konzentration an kaltem Cholin (0-10000 μM). Der Bereich um die physiologische Cholinkonzentration (10 μM) ist hervorgehoben.

Cholin [μM]	Kontrolle (%)	Bicalutamid (IC_{50})		Docetaxel (IC_{50})	
		LNCaP (%)	PC-3 (%)	LNCaP (%)	PC-3 (%)
0	100 \pm 0	37 \pm 0	94 \pm 0	108 \pm 0	120 \pm 0
1	100 \pm 6	44 \pm 2	98 \pm 7	112 \pm 24	127 \pm 4
5	100 \pm 8	87 \pm 21	118 \pm 5	126 \pm 34	128 \pm 3
10	100 \pm 12	99 \pm 29	118 \pm 8	141 \pm 45	121 \pm 3
20	100 \pm 12	89 \pm 24	116 \pm 17	163 \pm 49	112 \pm 5
50	100 \pm 12	137 \pm 37	159 \pm 5	138 \pm 39	118 \pm 5
100	100 \pm 11	152 \pm 41	176 \pm 5	158 \pm 47	124 \pm 6
200	100 \pm 11	235 \pm 73	194 \pm 9	174 \pm 51	127 \pm 6
500	100 \pm 17	251 \pm 83	197 \pm 15	136 \pm 41	127 \pm 9
1000	100 \pm 15	285 \pm 95	292 \pm 24	137 \pm 41	151 \pm 5
10000	100 \pm 19	324 \pm 106	296 \pm 20	150 \pm 45	133 \pm 5

4. Ergebnisse

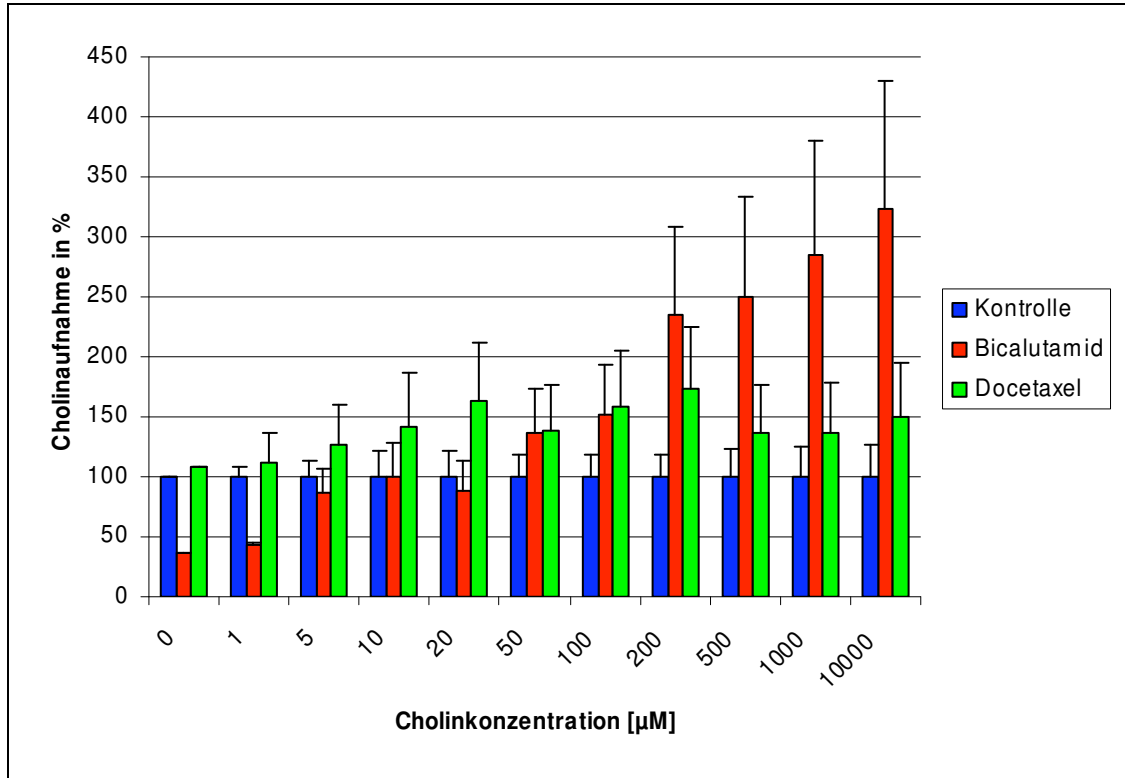


Abb. 37: Cholinaufnahme in LNCaP in % der Kontrolle (100%) nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC₅₀) über 5 Tage in Abhängigkeit von der Konzentration an kaltem Cholin (0-10000 µM).

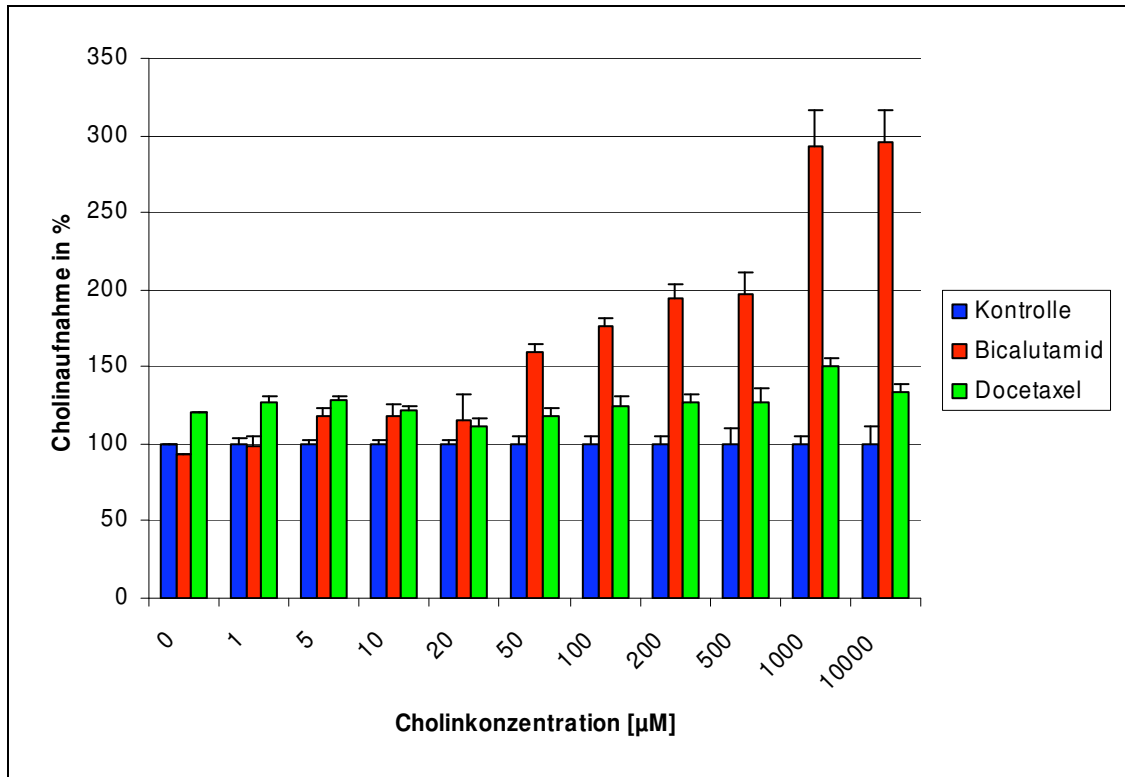


Abb. 38: Cholinaufnahme in PC-3 in % der Kontrolle (100%) nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC₅₀) über 5 Tage in Abhängigkeit von der Konzentration an kaltem Cholin (0-10000 µM).

4.10 Western Blot

4.10.1 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinbanden nach SDS-Page

Dazu wurde zunächst die Laufstrecken der Markerproteine (in mm) abgemessen und gegen den dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte der Markerproteine (160000, 105000, 75000, 50000, 35000 Da) aufgetragen. Mithilfe der resultierenden Standardgeraden wurden die Molekulargewichte unbekannter Proteine anhand ihrer Laufstrecke ermittelt (Abb. 39)

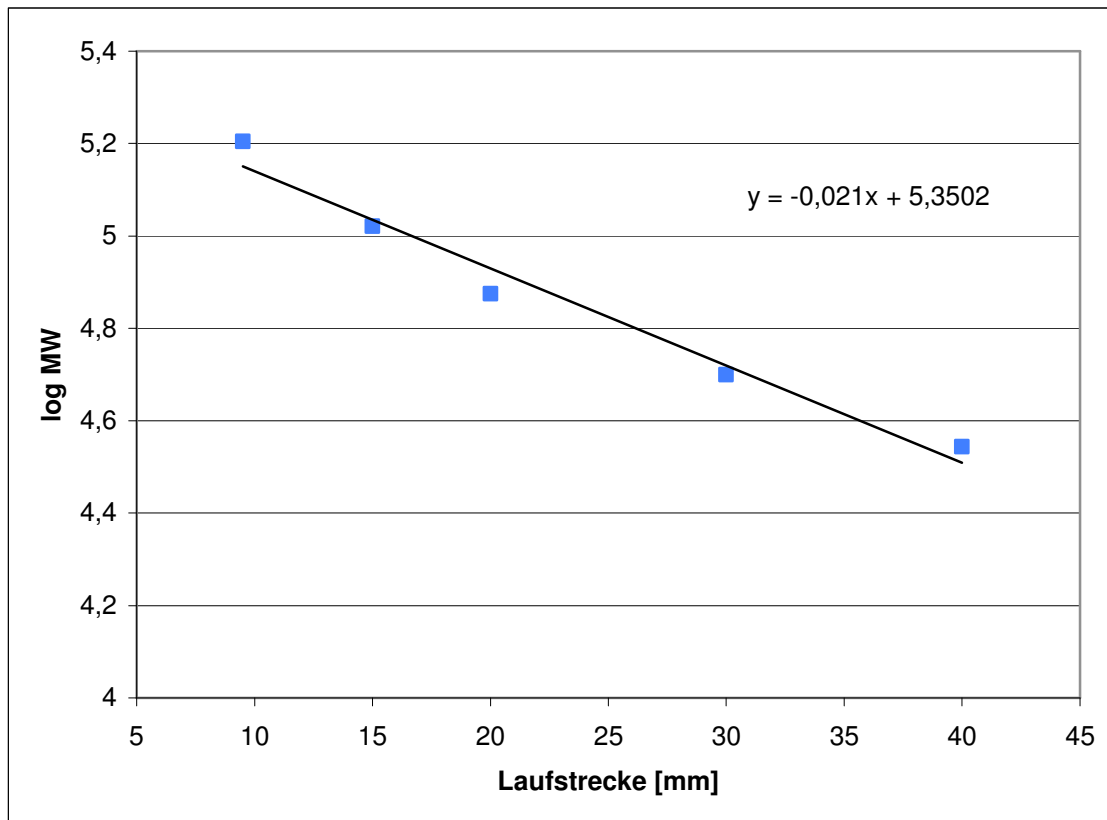


Abb. 39: Standardgerade zur Molekulargewichtsbestimmung. Die Laufstrecken der Markerproteine in mm wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte der Markerproteine in Da aufgetragen. Mithilfe der Geradengleichung lassen sich die Molekulargewichte unbekannter Banden anhand ihrer Laufstrecke abschätzen.

4.10.2 Darstellung der Proteinmuster der Zelllysate für den Western Blot nach SDS-Page

Bei der Darstellung der Proteinmuster der Zelllysate (s. 3.2.7.3) für den Western Blot nach SDS-Page zeigte sich, dass die Proteinkonzentrationen sowohl im Erythrozytenlysat als auch im Lysat der Neuroblastomellinie Sy5y am geringsten waren (Abb. 40). Auffallend bei den Erythrozyten

ist, dass vergleichsweise sehr wenige Proteine zu sehen sind, darunter eine kräftige Bande bei ca. 19 kDa, eine Bande bei ca. 60 kDa und eine eine Doppelbande mit sehr hohem Molekulargewicht (192 bzw. 206 kDa) Abb 40B: 1, 2, 3). Hämoglobin besteht aus vier identischen Untereinheiten und besitzt ein Molekulargewicht von 64,5 kDa (Thews 1997, S.604). Die vier Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht von je ca. 17 kDa (Petrides 1998, S.894). Die im Erythrozytenlysate vorhandene massive Bande bei ca. 19 kDa bzw. die Bande bei ca. 60 kDa sollten daher die Untereinheiten bzw. intaktes (nicht reduziertes) Hämoglobin darstellen (Abb. 40B: 2, 3).

Die Proteinkonzentrationen der Lysate der drei Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC-3, der Kolonkarzinomzelllinie SW707 und der Phäochromozytomzelllinie PC-12 waren annähernd gleich, jeweils etwas geringer als in der Neuroblastomzelllinie Kelly.

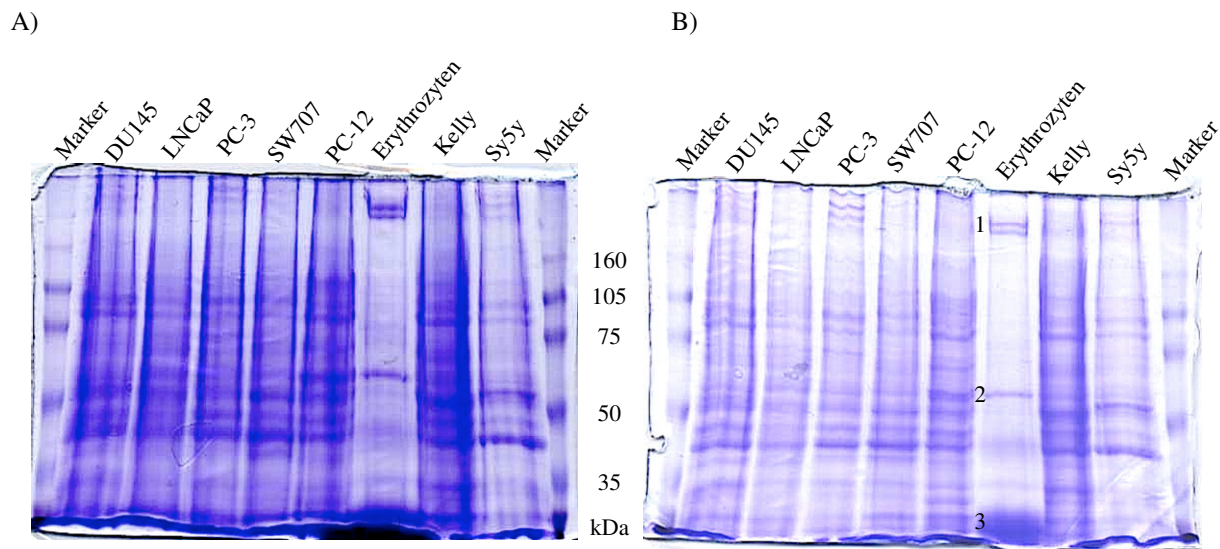


Abb. 40: Darstellung der Proteinmuster der Zelllysate für den Western Blot nach SDS-Page (8% Polyacrylamid; Coomassie Blau Färbung).

A) 100% Protein. Vom Marker wurden je 5 μ l, von den Lysaten der DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 und Kelly-Zellen je 6 μ l und von den Lysaten der Erythrozyten und der Sy5y-Zellen je 8 μ l aufgetragen. Die Proteinkonzentrationen in DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 waren etwa gleich, in Kelly etwas höher und in den Erythrozyten und Sy5y niedriger.

B) 50% Protein. Vom Marker wurden je 2,5 μ l, von den Lysaten der DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 und Kelly-Zellen je 3 μ l und von den Lysaten der Erythrozyten und der Sy5y-Zellen je 4 μ l aufgetragen. Auffallend ist die geringe Anzahl an Banden im Erythrozytenlysate: 1, Doppelbande bei ca. 192 bzw. 206 kDa; 2, Hämoglobinbande bei ca. 60 kDa; 3, Bande der Hämoglobinuntereinheiten bei ca. 19 kDa.

4.10.3 Nachweis des hochaffinen Cholintransporters (CHT1) im Western Blot

Bei allen verwendeten Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten zeigte sich eine deutliche Doppelbande im Bereich von ca. 94 und 98 kDa (Abb. 41A), die in der Kontrolle nicht

4. Ergebnisse

vorhanden war (Abb. 41B). Die Kelly-Zelllinie zeigte eine zusätzliche Bande bei ca. 72 kDa (Abb. 41A: 4) und die PC-12-Zellen eine scharfe, kräftige Bande bei ca. 44 kDa (Abb. 41A: 1). Dagegen zeigten sich bei den Erythrozyten drei Banden, eine bei ca. 62 kDa und eine Doppelbande ca. 186 und 200 kDa (Abb. 41A: 2, 3). Die genannten Banden ließen sich unabhängig von der eingesetzten Magermilchkonzentration (0,1%, 1%, 5%), in der der Primärantikörper gelöst war, darstellen, nicht aber in der Kontrolle ohne Primärantikörper (Abb. 41B). Bei diesen Banden handelt es sich demnach um hochaffine Cholintransporter oder Fragmente davon bzw. um Proteine, die eine Kreuzreaktion mit dem Antikörper gegen den hochaffinen Cholintransporter zeigen (siehe Diskussion).

A)

B)

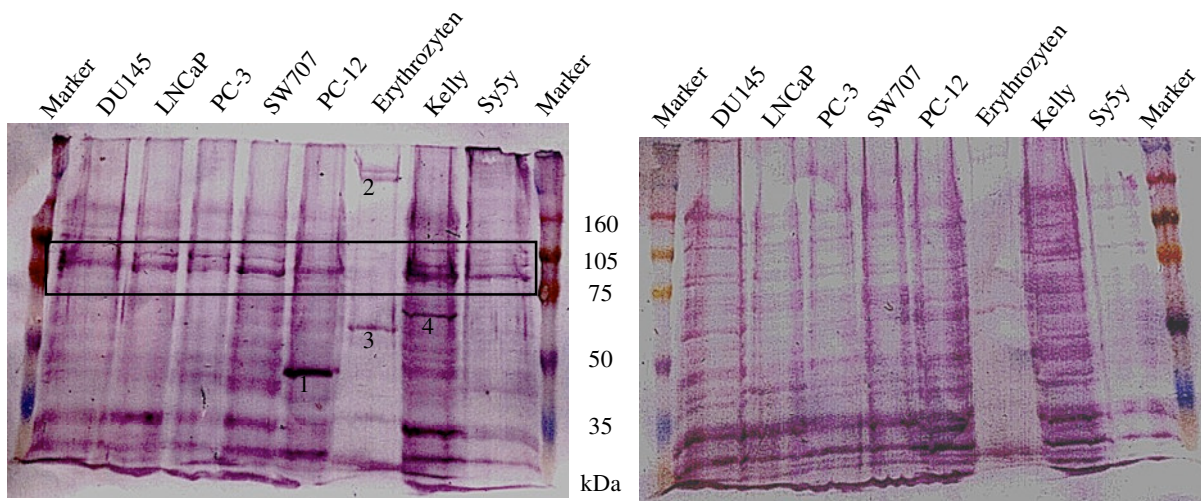


Abb. 41: Western Blot nach SDS-Page im 8%-igen Polyacrylamidgel. Vom Marker wurden je 5 μ l, von den Lysaten der DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 und Kelly-Zellen je 6 μ l und von den Lysaten der Erythrozyten und der Sy5y-Zellen je 8 μ l aufgetragen.

A) Western Blot (nach Inkubation mit Primärantikörper gegen CHT1 in 0,1% MMP). Mit Ausnahme der Erythrozyten zeigt sich in allen Zellen eine Doppelbande bei ca. 94 kDa und ca. 98 kDa (Rahmen). 1, zusätzliche Bande bei ca. 44 kDa in PC-12; 2 und 3, Banden bei ca. 62 kDa bzw. ca. 186/200 kDa in Erythrozyten. 4, zusätzliche Bande bei ca. 72 kDa in Kelly.

B) Kontrolle (Inkubation nur mit Sekundärantikörper). Die in A hervorgehobenen Banden zeigten sich hier nicht.

5. Diskussion

Die Frühdiagnostik des Prostatakarzinoms basiert auf der digitalen, rektalen Untersuchung, transrektaler Sonographie und Bestimmung der Serinprotease PSA. Diese Methoden sind zum Teil aber unzuverlässig. Der positiv prädiktive Wert eines suspekten Tastbefundes bei einem PSA-Wert zwischen 3 und 10 ng/ml liegt bei 33% bis 83%, bei einem PSA-Wert unter 3 ng/ml beträgt er lediglich 4% bis 11% (Hammerer et al. 2002, S.1072). Tumoren, die getastet werden können, sind folglich schon fortgeschrittener in ihrem Stadium. Die transrektale Sonographie findet auf Grund ihrer geringen Sensitivität und Spezifität – nur 60% der Karzinomata können dargestellt werden (Schöder et al. 2004, S.275) – bei der Diagnostik des Prostatakarzinoms hauptsächlich zur Steuerung der transrektalen Biopsie Verwendung. Ein PSA-Wert über dem Grenzwert von 4 ng/ml hat für den Nachweis des Prostatakarzinoms eine Sensitivität von 80-85% und eine Spezifität von 54-75%, bei PSA-Werten unter 4 ng/ml liegt die Aussagekraft noch deutlich darunter (Hammerer et al. 2002, S.1072-1075). Mit den beschriebenen Methoden werden im Rahmen der Frühdiagnostik insgesamt nur 50% der Prostatakarzinomata im lokalisierten, auf die Prostata beschränkten Stadium diagnostiziert (Kotzerke et al. 2002, S.200).

Auffälligkeiten in mindestens einer der drei genannten Untersuchungen zur Frühdiagnostik erfordern bei mangelnder Darstellbarkeit des Prostatakarzinoms in bildgebenden Verfahren wie der angesprochenen Sonographie oder der CT bzw. MRT eine Biopsie zur Diagnosesicherung. Bestätigt sich ein Karzinom in der histologischen Aufarbeitung der Biopsieproben, stellt sich die Frage nach der Ausbreitung des Karzinoms (Staging), den davon abhängigen Therapiemöglichkeiten und der Prognose für den Patienten. Gerade im Hinblick auf eine kurative, operative Therapie ist ein genaues Staging unabdingbar. Zur Beurteilung eines möglichen pelvinen Lymphknotenbefalls muss derzeit eine pelvine Lymphadenektomie mit histologischer Beurteilung erfolgen. Weiter sollten zum Ausschluss von Fernmetastasen eine abdominelle Sonographie, eine Thoraxröntgenaufnahme und bei einem PSA-Wert über 10 ng/ml eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden (Miller et al. 1999, S.390).

Im Krankheitsverlauf, insbesondere nach radikaler Prostatektomie, ist ein PSA-Anstieg ein verlässliches Zeichen für eine Progression der Erkrankung bzw. ein Karzinomrezidiv, das immerhin bei bis zu 33% der Patienten nach radikaler Prostatektomie oder Bestrahlungstherapie auftritt. Der bildgebende Beweis, ob es sich dabei um ein Lokalrezidiv oder eine Metastase handelt, ist abgesehen von speziellen MR-Untersuchungen bei Lymphknoten- bzw. Knochenmarksmetastasen mit den gängigen Verfahren nicht möglich (Harisinghani et al. 2003, S.2491). Für die angesprochene (Skelett-) Metastasensuche mithilfe der MRT ist eine Ganzkörperaufnahme notwendig, die aufgrund der langen Untersuchungsdauer und den sehr hohen Kosten wenig praktikabel ist (Schöder et al. 2004, S.280).

Das invasive Vorgehen bei der Biopsie verbunden mit der limitierten Trefferrate im Bereich des Apex prostatae (Wefer et al. 2000, S.400), die Fülle aufwendiger Untersuchungen zum Staging des Prostatakarzinoms sowie die Probleme bei der Verlaufskontrolle (Hara et al. 1998, S.990) erfordern die Suche nach neuen Möglichkeiten zur nicht invasiven, visuellen Darstellung und zum Staging des Prostatakarzinoms.

Der Einsatz der [¹¹C]Cholin-PET eröffnet sowohl für die Diagnostik, die Beurteilung der lokalen und fernen Ausbreitung als auch für die Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms neue Möglichkeiten. Das Ziel dieser Arbeit war es, die gute klinische Eignung von [¹¹C]Cholin im Rahmen der Prostatakarzinomdiagnostik mittels PET in vitro zu bestätigen und den Cholintransport in die verwendeten Prostatakarzinomzelllinien näher zu charakterisieren. Zudem sollte der Einfluss einer Antiandrogenbehandlung mit Bicalutamid und einer Chemotherapie mit Docetaxel auf die Cholinaufnahme untersucht werden. Im Western Blot sollte der hochaffine Cholintransporter (CHT1) in den Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden.

Proliferationskinetik der verwendeten Tumorzelllinien

Im Proliferationstest zeigten sich für die verwendeten Zelllinien in Abhängigkeit von der Anzahl der ausgesäten Zellen exponentielle Wachstumsphasen von 166 (PC-3; 75000 Zellen) bis 497 Stunden (LNCaP; 25000 Zellen) (4.1.2). Die Verdopplungszeiten variierten zwischen 22 und 27 Stunden für DU145, PC-3 und SW707. Die LNCaP-Zelllinie zeigte eine deutlich längere Verdopplungszeit von 71 Stunden (4.1.3). Die ermittelten Werte stimmen weitestgehend mit den Angaben aus der Literatur überein, so dass von regulären Wachstumsbedingungen bei den eigenen Zellkulturen ausgegangen werden kann (Sobel et al. 2005, S.344, 346, 350). Die ermittelten Werte aus den Proliferationstests gaben die maximale Zeitspanne vom Aussäen bis zur Versuchsdurchführung vor, da alle Versuche während der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt werden sollten. Die vergleichsweise langsame Proliferation der LNCaP-Zellen wurde durch Aussäen entsprechend höherer Zellzahlen kompensiert.

Vergleich der Cholin- bzw. FDG-Aufnahme in Kolon- und Prostatakarzinomzellen

Entsprechend den klinischen Erkenntnissen zur Darstellbarkeit des Prostatakarzinoms mit FDG bzw. Cholin in der PET war zu vermuten, dass die Cholinaufnahme in Prostatakarzinomzellen verhältnismäßig höher sein würde als die FDG-Aufnahme. Als Referenz für die Aufnahme der beiden Tracer diente die Kolonkarzinomzelllinie SW707 als „Prototyp“ für eine Tumorentität, bei der die FDG-PET gute Ergebnisse liefert (Dobos 2002, S.875). Erwartungsgemäß war die FDG-Aufnahme in den Kolonkarzinomzellen deutlich höher (Abb. 20). Innerhalb der Prostatakarzinomzellen lässt sich die höhere FDG-Aufnahme der PC-3-Zellen gegenüber den LNCaP-Zellen mit dem schnelleren und aggressiveren Wachstum der PC-3-Zellen und dem damit verbundenen erhöhten Energiebedarf durch Glykolyse erklären (Schöder et al. 2004, S.275).

Wie erwartet war die Cholinaufnahme in LNCaP-Zellen deutlich höher als in SW707-Kolonkarzinomzellen. Überraschenderweise zeigten jedoch die PC-3-Prostatakarzinomzellen eine deutlich geringere Cholinaufnahme als die SW707-Kolonkarzinomzellen. Da es sich bei allen drei Zelllinien um Karzinomzellen handelt, ist anzunehmen, dass der Cholinbedarf aufgrund der gesteigerten Zellmembransynthese jeweils erhöht ist. Nakagami et al. (1999, S.419) konnten erhöhte Aktivitäten der Cholinase verbunden mit erhöhten Werten für Phosphorylcholin in Kolonadenom- und Kolonkarzinomgewebe nachweisen. Diese Befunde stimmen mit der erhöhten Cholinaufnahme der SW707-Zellen in den eigenen Versuchen überein.

Hinsichtlich der Prostatakarzinomzellen hätte man allerdings analog der FDG-Aufnahme erwartet, dass der Cholinbedarf der androgenunabhängigen PC-3-Zellen aufgrund der schnelleren Teilungsrate höher sein müsste als der Bedarf der androgenabhängigen LNCaP-Zellen. Ohne dieses Phänomen erklären zu können, beobachteten auch andere Autoren eine erhöhte Cholinaufnahme in LNCaP gegenüber PC-3 (Price et al. 2002, S.276).

Aufgrund der Heterogenität des Prostatakarzinoms mit androgenabhängigen und -unabhängigen Arealen scheint die in vitro beobachtete unterschiedliche Cholinaufnahme in die androgenabhängigen LNCaP- und die androgenunabhängigen PC-Zellen keinen Einfluss auf die gute Darstellbarkeit des Prostatakarzinoms in der PET zu haben (Kekeeva et al. 2007, S.79).

Cholinaufnahme in Prostatakarzinomzellen in Abhängigkeit von der Aufnahmedauer und von NaCl

Über einen Zeitraum von vier Stunden zeigte sich eine kontinuierliche Steigerung der Cholinaufnahme sowohl in die LNCaP- als auch in die PC-3-Zellen, wobei die Zunahme innerhalb der ersten Stunde bei beiden Zelllinien linear war. Für alle weiteren Versuche wurde ein Aufnahmezeitraum von 10 min gewählt. Insbesondere für die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik war es wichtig, die Versuche im linearen Aufnahmebereich durchzuführen, da die Geschwindigkeit der Aufnahme ermittelt werden sollte. In Übereinstimmung damit beträgt die Aufnahmedauer der Michaelis-Menten-Kinetik in der Literatur in der Regel 10 min. Ein weiterer Grund für die gewählte Aufnahmedauer von 10 min ist die Tatsache, dass in vivo nach 10 min bereits ein Großteil des i.v. injizierten Cholins aus dem Blutkreislauf in die Zellen aufgenommen ist (Roivainen et al. 2000, S.25).

In Gegenwart von NaCl war die Cholinaufnahme in LNCaP-Zellen 1,4- bis 1,9-fach, in PC-3-Zellen sogar 2,0- bis 2,7-fach höher als ohne NaCl, wobei N-methyl-D-glucamin (NMDG) als NaCl-Ersatz diente (Friedrich et al. 2001, S.301). Die deutlich höhere Aufnahme mit NaCl spricht für eine NaCl-Abhängigkeit des Cholintransports in Prostatakarzinomzellen. Allerdings erfolgte auch ohne NaCl eine Cholinaufnahme (ca. 50%). Um den Cholintransport in Prostatakarzinomzellen eindeutig einer Kategorie – entweder NaCl-abhängig oder -unabhängig – zuordnen zu können, sollte ohne NaCl entweder keine Aufnahme oder die Aufnahme wie in Gegenwart von NaCl stattfinden. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen daher die Annahme nahe, dass sich der Cholintransport in Prostatakarzinomzellen aus zwei Komponenten zusammensetzt: einer NaCl-abhängigen und einer NaCl-unabhängigen Komponente.

Hemmung des Cholintransports

Als organisches Kation kann Cholin sowohl über die selektiven Cholintransporter CHT1 (hochaffin) und CHT2 (niedrigaffin) (Lockman et al. 2002, S.753) als auch über die Familie der nicht selektiven „organic cation transporter“ (OCT1, OCT2) in die Zelle aufgenommen werden (Gründemann et al. 1994, S.549). Durch selektive Hemmung des Cholintransports mit Hemmstoffen bzw. organischen Kationen sollte eine Zuordnung zu dem vorherrschenden Transporter bzw. Transportsystem ermöglicht werden. Hemicholinium-3 (HC-3) – ein Strukturanalogon des Cholins – gilt als spezifischer Inhibitor von CHT1 (K_i 0,001-0,1 μM) und CHT2 (K_i \sim 100 μM) (Lockman et al. 2002, S.753). Daneben sollte der kompetitive Effekt von kaltem Cholin auf die [^3H]Cholinaufnahme untersucht werden. Guanidin gilt als ebenfalls starker Inhibitor des Cholintransports, wenn auch schwächer als HC-3 (Hoffmann et al. 2002, S.120). Die Beteiligung von OCT-Transportern an der Cholinaufnahme sollte mithilfe von Tetraethylammonium (TEA) untersucht werden. TEA interagiert als organisches Kation mit hoher Affinität mit der Gruppe der OCT-Transporter und vermag diese zu hemmen (Hoffmann et al. 2002, S.120). Schließlich wurde der Einfluss von Ouabain auf die Cholinaufnahme untersucht. Ouabain ist kein Hemmstoff für Enzyme des Cholintransports, hemmt aber die Na^+/K^+ -ATPase, die den Na^+ -Gradienten über die Membran aufrechterhält (Dudel 1997, S.9). Der Na^+ -Gradient wird als treibende Kraft für den CHT1 angenommen (Lockman et al. 2002, S.753), so dass die Störung des Gradienten eine selektive Verlangsamung bzw. Hemmung des CHT1-vermittelten Transports bewirken sollte.

Die Versuche zur Hemmung der [^3H]Cholinaufnahme mit HC-3 und kaltem Cholin ergaben eine sigmoidale Hemmung mit IC_{50} -Werten von 24,5 μM HC-3 und 6,7 μM Cholin für die LNCaP-Zellen und 17,3 μM HC-3 und 7,3 μM Cholin für die PC-3-Zellen. Die IC_{50} -Werte liegen damit im Bereich der in der Literatur angegebenen IC_{50} -Werte für die Cholinaufnahme in andere Zellen: Rattenhirnendothelzellen (53 μM HC-3 und 12,1 μM Cholin; Friedrich et al. 2001, S.303) humanen Keratinozyten (9,7 μM Cholin; Hoffmann et al. 2002, S.120). Die [^3H]Cholinaufnahme konnte mit je 1 mM HC-3 bzw. Cholin in beiden Zelllinien nahezu komplett gehemmt werden. Die vollständige Hemmung durch HC-3 zeigt, dass die Cholinaufnahme durch einen spezifischen Cholintransporter vermittelt wird. Die ermittelten IC_{50} -Werte (24,5 μM bzw. 17,3 μM) liegen eher im Bereich des niedrigaffinen Transporters (CHT2; $\text{IC}_{50}\sim$ 100 μM). Für hochaffine Transporter (CHT1) liegen die IC_{50} -Werte zwischen 0,001 und 0,1 μM (Lockman et al. 2002, S.753).

Der kompetitive Effekt des kalten Cholins auf die [^3H]Cholinaufnahme bestätigt, dass sowohl das kalte Cholin als auch das heiße [^3H]Cholin von demselben Transportsystem aufgenommen werden. Je höher die Konzentration an kaltem Cholin ist, desto mehr Transporter werden von kaltem Cholin besetzt und desto weniger heißes [^3H]Cholin kann von den Zellen aufgenommen werden. Diese Tatsache wurde im Vorfeld der Versuche zur Durchführung der konzentrationsabhängigen Hemmung der Cholinaufnahme und der Michaelis-Menten-Kinetik vorausgesetzt und konnte somit bestätigt werden (s. 3.2.8).

Die anderen Hemmstoffe der Cholinaufnahme (je 1 mM) zeigten eine geringere Effizienz. Der spezifische Hemmstoff des Cholintransports Guanidin bewirkte eine Reduktion der Cholinaufnahme um 63,1% (LNCaP) bzw. 68,7% (PC-3) und lag damit im Bereich der für humane Keratinozyten beschriebenen Hemmung (Hoffmann et al. 2002, S.120). Tetraethylammonium (TEA), ein Inhibitor des OCT-vermittelten Transports, reduzierte die

Aufnahme in beiden Zelllinien nur um 20%. Eine rein OCT-vermittelte Cholinaufnahme kann daher für die untersuchten Prostatakarzinomzelllinien ausgeschlossen werden. Ouabain, ein Hemmstoff der Na^+/K^+ -ATPase, reduzierte die Cholinaufnahme nur geringfügig um 17,2% (LNCaP) bzw. 5,2% (PC-3). Daraus könnte man eine NaCl-Unabhängigkeit des Cholintransports in Prostatakarzinomzellen ableiten. Allerdings wurde die Cholinaufnahme in NaCl-freiem Medium um ca. 50% reduziert (4.6), was für das Vorhandensein einer NaCl-abhängigen Komponente spricht. Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Hemmung der Cholinaufnahme durch Ouabain ist daher eine zu geringe Konzentration des Hemmstoffs der Na^+/K^+ -ATPase. Nach Haeffner (1975, S.219) könnten extrazelluläre Na^+ -Ionen auch unabhängig vom Na^+ -Gradienten über die Membran die Cholinaufnahme steuern. Er fand in Ehrlich-Lettrè-Ascites Tumorzellen zwei Cholintransportkomponenten, wovon die eine NaCl-abhängig ist. Trotz der NaCl-Abhängigkeit konnte auch hier die Cholinaufnahme durch Ouabain kaum gehemmt werden.

Michaelis-Menten-Kinetik

Aufgrund der effizienten Hemmung der [^3H]Cholinaufnahme durch HC-3, kaltes Cholin und auch Guanidin sowie der geringen Hemmung durch TEA sollte der Transport über einen spezifischen Cholintransporter und nicht OCT-vermittelt erfolgen. Die gezeigte NaCl-Abhängigkeit spricht für CHT1. Für CHT2 sprechen die Tatsache, dass CHT2 auch in Geweben außerhalb des Nervensystems vorhanden ist, sowie die IC_{50} -Werte nach HC-3-Hemmung (s. Tab.1). Die beiden Cholintransporter CHT1 und CHT2 unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Cholinaffinität: CHT1, hochaffin ($K_M \sim <10\mu\text{M}$) und CHT2, niedrigaffin ($K_M \sim 30-100\mu\text{M}$) (Lockman et al. 2002, S.753).

Beim Erstellen der Michaelis-Menten-Kinetik für die Gesamtcholinaufnahme ergaben sich stetig ansteigende, nicht sättigbare Kurven, die auch bei extrem hohen Cholinkonzentrationen keine asymptotische Näherung an v_{max} erkennen ließen und somit auch keine Möglichkeit für die Bestimmung eines K_M -Wertes boten (s. 4.8). Da aber ein Enzym vermitteltes Transportsystem bei hohem Substratangebot gesättigt ist, sich die Aufnahme also nicht weiter erhöht, liegt die Vermutung nahe, dass eine der am Cholintransport in Prostatakarzinomzellen beteiligten Komponenten einen niedrigaffinen, unspezifischen und diffusionsähnlichen Cholintransport vermittelt.

Zur Bestimmung der Transporter vermittelten Komponente wurde bei der Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik eine sehr hohe Cholinkonzentration von 10 mM eingesetzt unter der Annahme, dass in diesem Bereich die Cholinaufnahme nahezu komplett durch die unspezifische diffusionsähnliche Komponente vermittelt wird. Die Zunahme der unspezifischen Cholinaufnahme mit zunehmender Cholinkonzentration wird als linear betrachtet. Die unspezifische Aufnahme wurde durch eine Gerade durch den Nullpunkt und die aufgenommene Cholinmenge bei 10 mM Substratangebot bestimmt. Von der Gesamtaufnahme wurden entsprechende Werte aus der Geraden subtrahiert und so die Werte für die spezifische Aufnahme, die eine sättigbare Kurve beschreiben, ermittelt (s. 4.8). Dieses Verfahren zur Ermittlung der sättigbaren, spezifischen Cholinaufnahme wird von einer Reihe anderer Autoren bestätigt (Haeffner 1975, S.219; Okuda et al. 2000, S.120; Allen et al. 2001, S.1037; Friedrich et al. 2001, S.303; Katz-Brull et al. 2002, S.1966).

Für den spezifischen Cholintransport ergaben sich K_M -Werte von $3,8 \mu\text{M}$ für LNCaP und $7,0 \mu\text{M}$ für PC-3 (s. 4.8), was für beide Zelllinien einem hochaffinen Transport durch den CHT1 entspricht. Nach Lockman et al. (2002, S.753) vermittelt der CHT1 einen NaCl-abhängigen hochaffinen Cholintransport ($K_M < 10 \mu\text{M}$) in der cholinergen Präsynapse zur Bereitstellung von Cholin für die Acetylcholinsynthese. Demgegenüber vermittelt der niedrigaffine CHT2 (K_M 30-100 μM) einen NaCl-unabhängigen Cholintransport für die Phospholipidsynthese und kommt ubiquitär im Körper vor. Abweichend von der Einteilung Lockmans lässt sich festhalten, dass sich der Cholintransport in Prostatakarzinomzellen aus einer hochaffinen, sättigbaren, NaCl-abhängigen, Transporter vermittelten Komponente und einer nicht sättigbaren, NaCl-unabhängigen, diffusionsähnlichen, niederaffinen Komponente zusammensetzt.

Auch andere Autoren beschreiben Cholintransporter, die von der Einteilung Lockmans abweichen. Schloss et al. (1994, S.1320) fanden in Fibroblasten ebenfalls einen hochaffinen, NaCl-abhängigen Cholintransport außerhalb cholinergen Gewebes. Ein hochaffines aber NaCl-unabhängiges Transportsystem für Cholin wurde sowohl an der Blut-Hirn-Schranke als auch in humanen Keratinozyten gefunden (Friedrich et al. 2001, S.299; Hoffmann et al. 2002, S.118).

Behandlung der Prostatakarzinomzellen mit dem Antiandrogen Bicalutamid und dem Chemotherapeutikum Docetaxel

Wie bereits erwähnt hat sich die [^{11}C]Cholin-PET im klinischen Alltag nicht nur zur Diagnostik und zum Staging, sondern auch zur Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms bewährt (Hara et al. 1998, S.995; Schöder et al. 2004, S.280; Reske et al. 2006, S.1249). Bei lokal begrenzten Tumoren ist die radikale Prostatektomie die Therapie der Wahl. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien oder Rezidiv nach radikaler Prostatektomie wird in der Regel eine antiandrogene Therapie, z.B. mit Bicalutamid, durchgeführt. Erst bei beginnender Androgenresistenz kommt eine Chemotherapie, z.B. mit Docetaxel, zum Einsatz.

Daher stellte sich die Frage, ob die Therapie des Prostatakarzinoms mit Bicalutamid oder Docetaxel die Cholinaufnahme beeinflusst und somit bei [^{11}C]Cholin-PET zu berücksichtigen ist. Dazu sollte der Effekt der beiden Substanzen auf die Cholinaufnahme in Prostatakarzinomzellen in vitro untersucht werden.

Nach Behandlung mit Bicalutamid bzw. Docetaxel konnten keine nennenswerten Änderungen der K_M - bzw. v_{max} -Werte festgestellt werden. Die K_M -Werte blieben mit $8,8 \mu\text{M}$ und $9,5 \mu\text{M}$ (LNCaP) bzw. $5,9 \mu\text{M}$ und $6,0 \mu\text{M}$ (PC-3) im hochaffinen Bereich der jeweiligen Kontrolle ($3,8 \mu\text{M}$ für LNCaP bzw. $7,0 \mu\text{M}$ für PC-3). Auch die Schwankungsbreite für die v_{max} war mit 1,4 und 2,8 nmol/mg Zellprotein/10 min (LNCaP) bzw. 1,0 und 1,1 nmol/mg Zellprotein/10 min (PC-3) im Vergleich der Kontrolle sehr gering (s. 4.9.2). Für die Aufnahmeversuche nach Behandlung wurden ausschließlich vitale Zellen verwendet. Veränderungen der Affinität oder der Maximalgeschwindigkeit von vitalen Prostatakarzinomzellen hätten bedeutet, dass das jeweilige Medikament im Sinne eines Hemmstoffes die Aufnahme behindert hätte bzw. dass das Transporterprotein selbst durch die Therapie verändert worden wäre.

Demgegenüber fand sich nach Behandlung der Zellen mehrheitlich eine deutliche Zunahme der Gesamtcholinaufnahme (spezifische, Transporter vermittelte und unspezifische,

diffusionsähnliche Aufnahme). Am ausgeprägtesten war dieser Effekt nach Behandlung mit Bicalutamid und einem hohen Angebot an Cholin, also in dem Bereich, in dem die unspezifische Komponente den Großteil an der Gesamtaufnahme ausmacht. Aber auch im Bereich der physiologischen Cholinkonzentration konnten Änderungen der Cholinaufnahme beobachtet werden. Bei den PC-3-Zellen (Bicalutamid und Docetaxel) und nach Behandlung der LNCaP-Zellen mit Docetaxel war die Aufnahme im Bereich zwischen 5 μ M und 20 μ M Cholin mit 112% bis 163% der Kontrolle durchweg erhöht. Lediglich für die LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Bicalutamid wurden in diesem Cholinbereich geringfügig niedrigere Werte als in der Kontrolle ermittelt. Zwischen 50 μ M und 10 mM Cholin betrug die Aufnahme nach Bicalutamidtherapie in beiden Zelllinien 137% bis 324% und nach Therapie mit Doxetaxel 118% bis 174%.

Die gesteigerte Cholinaufnahme nach Behandlung mit Bicalutamid bzw. Docetaxel lässt sich zum einen aus einer „Stressreaktion“ der Zellen auf die Substanzen mit einem erhöhten Zellumsatz und einem damit verbundenen erhöhten Cholinbedarf für die gesteigerte Zellmembransynthese erklären (Haber Korn et al. 1992, S.1981; Haber Korn et al. 1994, S.1842). Eine weitere Möglichkeit für die Mehraufnahme der Zellen ist eine direkte Schädigung der Zellmembranen durch die Therapie, die die Diffusion von Cholin über die Zellmembran erleichtert, so dass diese – gerade bei sehr hohen Gradienten über die Membran – stark ansteigt.

Eine erhöhte Aufnahme verschiedener Tracer in überlebende Tumorzellen nach Bestrahlung bzw. Zytostatikatherapie wurde in verschiedenen Studien beschrieben und mit einem erhöhten, stressbedingtem Metabolismus (^{18}F FDG, ^{11}C Methionin) bzw. mit einem erhöhten Bedarf an Nukleotidbausteinen infolge von DNA-Reparatur (^{11}C Thymidin) als Reaktion auf die Therapie erklärt. Dieser Effekt trat zum Teil trotz der fehlenden Aufnahme der nach Therapie nekrotischen Gewebeareale durch Überwiegen der Mehraufnahme in den überlebenden Tumorarealen auf (Haber Korn et al. 1992, S.1981; Higashi et al. 1993, S.773; Haber Korn et al. 1994, S.1842; Schaidler et al. 1996, S.55; Senekowitsch-Schmidtke et al. 1998, S.1762, S.1768; Savas et al. 2001, S.669; Riemann et al. 2004, S.434). In einer weiteren Studie wurde die Hochregulation von Aminosäuretransportern in Gliomzellen unter ungünstigen Wachstumsbedingungen in Form von Nährstoffmangel beschrieben (Sasajima et al. 2004, S.1244). In der vorliegenden Arbeit kann die Mehraufnahme direkt den behandelten vitalen Zellen zugeschrieben werden, da wie erwähnt nur vitale Zellen für die Versuche verwendet wurden.

Die genaue Ursache für die beobachtete erhöhte Cholinaufnahme nach Behandlung mit Bicalutamid bzw. Docetaxel ließ sich nicht feststellen. Sollten sich diese Ergebnisse jedoch in vivo bestätigen, ist die erhöhte Cholinaufnahme beim klinischen Einsatz der ^{11}C Cholin-PET im Rahmen der Verlaufskontrolle des mit Antiandrogenen oder Chemotherapeutika therapierten Prostatakarzinoms zu berücksichtigen. Dementsprechend könnte ein gleich bleibend starkes Signal eines Karzinomherdes nach Therapie nicht auf einem Misserfolg der Therapie beruhen, sondern darauf, dass die überlebenden Zellen mehr Cholin aufnehmen.

Umgekehrt könnte das auch bedeuten, dass im Rahmen der Verlaufskontrolle bereits kleinere Tumorherde, die unter der Nachweisgrenze von 5 mm liegen, in der PET nachgewiesen werden können und damit wohlmöglich die Sensitivität der PET bei therapierten Prostatakarzinomata erhöht wäre.

Nachweis des Cholintransporters CHT1 im Western Blot

Die Ergebnisse der Kinetikstudien zur Cholinaufnahme legen die Existenz eines hochaffinen Transportsystems nahe. Mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen den humanen hochaffinen Cholintransporter (CHT1) sollte dieser in den drei Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC-3 im Vergleich zu den Kolonkarzinomzellen SW707 mittels Western Blot dargestellt werden. Als Positivkontrollen dienten humane Erythrozyten, die Phäochromozytomzelllinie PC-12 sowie die Neuroblastomzelllinien Kelly und Sy5y, für die ein hochaffiner Cholintransporter zur Bereitstellung von Cholin für die Acetylcholinsynthese beschrieben ist (Apparsundaram 2000, S.862; Lockman et al. 2002, S.756; Gates et al. 2004, S.536; Sarter et al. 2005, S.48).

Mit dem Antikörper gegen den CHT1 konnten in allen Zelllinien unterschiedliche Proteinbanden markiert werden, die sich auch nach mehrmaligem Wiederholen mit Erhöhung der Konzentrationen des Blockierreagens (Magermilchpulver) reproduzieren ließen (s. 4.4.10.3). In den sieben Tumorzelllinien wurde eine Doppelbande bei 94 und 98 kDa gefunden. Bei der Kelly-Zelllinie zeigte sich neben der Doppelbande eine zusätzliche Bande bei 72 kDa, bei den PC-Zellen eine zusätzliche, markante Bande bei 44 kDa.

Der Hersteller des Antikörpers gibt für den hochaffinen Cholintransporter eine molekulare Masse von 70-75 kDa an. Michel et al (2006, S.490) beschreiben den humanen CHT1 als ein 63 kDa großes Membranprotein, das auch in nicht neuronalen Zellen vorkommt. Somit würde einzig die 72 kDa Bande der Kelly-Zelllinie im gesuchten Bereich liegen. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass alle in den Tumorzellen gefundenen Banden den hochaffinen Cholintransporter CHT1 darstellen. Da es sich bei demselben um ein hydrophobes Membranprotein handelt, lässt sich die Doppelbande, die in allen Tumorzellen markiert werden konnte, durch mangelnde Entfaltung des Membrantransporters durch SDS erklären. Demgegenüber ist anzunehmen, dass es sich bei der 44 kDa Bande trotz der Verwendung von Protease-Inhibitoren um ein Fragment des Cholintransporters handelt.

In den Erythrozyten ließ sich die angesprochene Doppelbande nicht nachweisen. Hier wurde eine Doppelbande bei 186 und 200 kDa sowie eine Bande bei 62 kDa gefunden. Inwieweit es sich hierbei um den hochaffinen Cholintransporter handelt kann nicht abschließend geklärt werden. Die Doppelbande bei 186 und 200 kDa scheint zu groß für das gesuchte Membranprotein von ca. 63 bis 75 kDa (Michel et al. 2006, S.490; Angaben des Herstellers). Durchaus denkbar wäre jedoch, dass es sich hierbei um Oligomere bei mangelnder Dissoziation im SDS handelt.

Die 62 kDa Bande würde genau im erwarteten Bereich für den CHT1 liegen. Allerdings zeigten sich in der Coomassie Blau Färbung nur sehr wenige Banden, was entweder auf den relativ geringen Proteingehalt von Erythrozyten oder auf eine relativ starke Proteolyse hindeutet. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei der 62 kDa Bande um Hämoglobin handelt und dass bei dem verwendeten Antikörper eine Kreuzreaktion mit dem Hämoglobin vorliegt.

Zusammenfassend sprechen sowohl der Western Blot als auch in die Kinetik Studien dafür, dass der hochaffine Cholintransporter CHT1 in Prostatakarzinomzellen vorhanden ist. Auch nach Behandlung der Zellen mit Bicalutamid bzw. Docetaxel waren K_M - und v_{max} -Werte unverändert. Allerdings wurde nach Behandlung eine Zunahme der Cholingesamtaufnahme aus CHT1 und unspezifischer, NaCl-unabhängiger, niedrigaffiner Cholinaufnahme beobachtet. Für die

abschließenden Beurteilung, inwieweit dieser Effekt zur Bewertung des Therapieerfolges bei Patienten mit Prostatakarzinom eine unter Umständen sehr wichtige Rolle spielt, bedarf es noch weiterer in vivo Studien.

6. Zusammenfassung

Die Genauigkeit von Diagnostik, Staging und Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms hat sich durch den Einsatz der Cholin-PET deutlich verbessert. Die bisherigen Erfahrungen zur Cholin-PET basieren dabei vor allem auf klinischen Untersuchungen. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Cholintransport in Prostatakarzinomzellen *in vitro* charakterisiert und die Eignung von Cholin zur Darstellung des Prostatakarzinoms mittels PET bestätigt werden. Zudem sollte untersucht werden, wie sich die Inkubation von Prostatakarzinomzellen mit dem Antiandrogen Bicalutamid sowie dem Chemotherapeutikum Docetaxel, die beide in der Therapie des Prostatakarzinoms eingesetzt werden, auf die Cholinaufnahme auswirkt.

Die Studien zur Aufnahme von [^{18}F]FDG ergaben eine deutlich höhere [^{18}F]FDG-Aufnahme in die Kolonkarzinomzelllinie SW707 als in die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3. Dieser Befund bestätigt die eingeschränkte Eignung von [^{18}F]FDG im Rahmen der Prostatakarzinomdiagnostik. Die Aufnahme von [^3H]Cholin dagegen war am höchsten in der androgenabhängigen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP und am geringsten in der androgenunabhängigen Prostatakarzinomzelllinie PC-3. Für die SW707 Kolonkarzinomzellen lagen die Werte der [^3H]Cholinaufnahme zwischen den beiden Prostatakarzinomzelllinien.

Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Aufnahme von [^3H]Cholin in den Prostatakarzinomzellen LNCaP bzw. PC-3 zu. Dabei stieg die Aufnahme in beiden Zelllinien innerhalb der ersten Stunde linear an, so dass sämtliche Versuche zur Charakterisierung der Cholinaufnahme über einen Zeitraum von 10 min durchgeführt werden konnten.

In NaCl-haltigem Versuchspuffer erhöhte sich die Aufnahme von [^3H]Cholin im Vergleich zu NaCl-freiem Versuchspuffer um den Faktor zwei in beiden Prostatakarzinomzelllinien. Da auch in NaCl-freiem Versuchspuffer eine nennenswerte Aufnahme von [^3H]Cholin erfolgte, ist der Transport weder als eindeutig NaCl-unabhängig noch als eindeutig NaCl-abhängig einzustufen. Diese Befunde deuten vielmehr auf ein Transportsystem hin, das sich aus mehreren Komponenten – NaCl-abhängig bzw. -unabhängig – zusammensetzt.

Untersuchungen zur Hemmbarkeit der Aufnahme von [^3H]Cholin ergaben IC_{50} -Werte für kaltes Cholin von 6,7 μM (LNCaP-Zellen) bzw. 7,3 μM (PC-3-Zellen). Für Hemicholinium-3 (HC-3) wurden IC_{50} -Werte von 24,5 μM (LNCaP) bzw. 17,3 μM (PC-3) ermittelt. Die IC_{50} -Werte für HC-3 sprechen für die Beteiligung eines niedrigaffinen ($K_i \sim 100 \mu\text{M}$) Transportsystems an der Cholingesamtaufnahme. Sowohl HC-3 als auch kaltes Cholin hemmten die Aufnahme von [^3H]Cholin nahezu vollständig bei einer Konzentration von 1 mM. Der spezifische Hemmstoff des Cholintransporters Guanidin (1 mM) bewirkte eine Hemmung der Cholinaufnahme um 63,1% (LNCaP) bzw. 68,7% (PC-3). Dagegen verursachten sowohl Tetraethylammonium (TEA), ein Hemmstoff des OCT (organic cation

transporter) vermittelten Transports, als auch Ouabain, ein Hemmstoff der Na^+/K^+ -ATPase, nur eine vergleichsweise geringfügige Hemmung des Cholintransports. Die starke Hemmung der Cholinaufnahme durch die spezifischen Hemmstoffe sowie der geringe Effekt von TEA sprechen für einen Cholin-selektiven Transporter und gegen einen Transporter aus der OCT-Familie. Die nur schwache Inhibition der Cholinaufnahme durch Ouabain lässt vermuten, dass nicht der Na^+ -Gradient allein die Cholinaufnahme positiv beeinflusst.

Mit zunehmender Cholinkonzentration ergab sich für beide Prostatakarzinomzelllinien eine stetig steigende, auch bei sehr hohen Cholinkonzentrationen von 10 mM nicht sättigbare Cholingesamtaufnahme. Die Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme ergab sowohl für LNCaP (3,8 μM) als auch für PC-3 (7,0 μM) einen hochaffinen K_M -Wert kleiner 10 μM . Die v_{max} -Werte lagen bei 1,6 (LNCaP) bzw. 0,9 (PC-3) nmol/mg Zellprotein/10 min. Diese Ergebnisse legen ebenfalls nahe, dass sich der Cholintransport in Prostatakarzinomzellen aus einer hochaffinen, sättigbaren, NaCl-abhängigen, Transporter vermittelten Komponente und einer niedrigaffinen, nicht sättigbaren, NaCl-unabhängigen, auf Diffusion basierenden Komponente zusammensetzt.

Nach Inkubation mit dem Antiandrogen Bicalutamid bzw. dem Chemotherapeutikum Docetaxel änderten sich weder K_M - noch v_{max} -Werte für die spezifische Cholinaufnahme in beiden Prostatakarzinomzelllinien. Die Behandlung verursachte jedoch eine Erhöhung der Gesamtaufnahme an Cholin, demzufolge beruhend auf einem Anstieg der unspezifischen Cholinaufnahme.

Mittels Western Blot sollte der hochaffine Cholintransporter CHT1 in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien (DU145, LNCaP, PC-3) und der Kolonkarzinomzelllinie SW707 sowie in verschiedenen Zelllinien (PC-12 Phäochromozytom; Kelly, Sy5y Neuroblastom), für die ein hochaffines Cholintransportsystem beschrieben ist, nachgewiesen werden. In allen Zellen wurde eine Doppelbande bei 94/98 kDa durch den Anti-CHT1 Antikörper markiert, die dementsprechend CHT1 repräsentieren sollte. Daher wird in den Prostatakarzinomzellen die hochaffine, NaCl-abhängige und sättigbare Komponente des Cholintransports sehr wahrscheinlich durch den hochaffinen Cholintransporter CHT1 vermittelt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Cholintransportsystem in Prostatakarzinomzellen aus zwei Komponenten besteht: dem hochaffinen CHT1 und einer niedrigaffinen, NaCl-unabhängigen, auf Diffusion basierenden Komponente. Die Inkubation der Prostatakarzinomzellen mit Antiandrogen bzw. Chemotherapeutikum bewirkte eine deutliche Erhöhung der Gesamtcholinaufnahme. Sollte sich dieses Resultat auch in vivo bestätigen, würden PET-Befunde bei therapierten Patienten nicht in jedem Fall den Therapieeffekt widerspiegeln.

7. Literaturverzeichnis

- Ackerstaff E., Pflug B.R., Nelson J.B., Bhujwalla Z.M. Detection of increased choline compounds with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy subsequent to malignant transformation of human prostatic epithelial cells. *Cancer Research* 61 (2001) 3599-3603
- Ackerstaff E., Glunde K., Bhujwalla Z.M. Choline Phospholipid Metabolism: A Target in Cancer Cells? *J Cell Biochem* 90 (2003) 525-533
- Allen D.D., Smith Q.R. Charakterization of the blood-brain barrier choline transporter using the in situ rat brain perfusion technique. *J. Neurochem.* 76 (2001) 1032-1041
- Altwein J.E., Mohandessi B. Early detection of prostate carcinoma. What diagnosis is of value when? *MMW Fortschr Med.* 142 (2000) 28-31
- Apparsundaram A., Ferguson S.M., George A.L., Blakely R.D. Molecular Cloning of a Human, Hemicholinium-3-Sensitive Choline Transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276 (2000) 862-867
- Blodgett T.M., Meltzer C.C., Townsend D.W. PET/CT: Form and Function. *Radiology* 242 (2007) 360-385
- Blusztajn J.K. Choline, a vital amine. *Science (Wash. DC)* 281 (1998) 794-795
- Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254
- Breeuwsma A.J., Pruijm J., Jongen M.M., Suurmeijer A.J., Vaalburg W., Nijman R.J., de Jong I.J. In vivo uptake of [11C]choline does not correlate with cell proliferation in human prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 (2005) 668-673
- Cermak J.M., Holler T., Jackson D.A., Blusztajn J.K. Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system. *FASEB J* 12 (1998) 349-357
- Chen C.D., Welsbie D.S., Tran C., Baek S.H., Chen R., Vessella R., Rosenfeld M.G., Sawyers C.L. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10 (2004) 33-39
- Craft N., Chhor C., Tran C., Belldegrün A., DeKernion J., Witte O.N., Said J., Reiter R.E., Sawyers C.L. Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. *Cancer Res* 59 (1999) 5030-5036
- Cullis P.R., Hope M.J. Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In "Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes", Vance D.E., Vance J. (Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991, 1-41
- DeGrado T.R., Baldwin S.W., Wang S., Orr M.D., Liao R.P., Friedman H.S., Reiman R., Price D.T., Coleman R.E. Synthesis and Evaluation of [¹⁸F]-Labeled Choline Analogs as Oncologic PET Tracers. *J Nucl Med* 42 (2001) 1805-1814
- DeGrado T.R., Reiman R., Price D.T., Wang S., Coleman R.E. Pharmacokinetics and Radiation Dosimetry of [¹⁸F]Fluorocholine. *J Nucl Med* 43 (2002) 92-96

- Dobos N., Rubesin S.E. Radiologic imaging modalities in the diagnosis and management of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 16 (2002) 875-895
- Dudel J. Stoffaustausch der Zelle mit Ihrer Umgebung. In: „Physiologie des Menschen“, Schmidt R.F., Thews G. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1997, 27. Auflage, 5-12
- Fornara P., Fischer K., Luboldt H.-J., Doehn C., Semjonow A. Einfluss von Praanalytik und Analytik auf die Aussagekraft des prostataspezifischen Antigens. *Deutsches Ärzteblatt*, Heft 25 (2004) 1820-1823
- Friedrich A., George R.L., Bridges C.C., Prasad P.D., Ganapathy V. Transport of choline and its relationship to the expression of the organic cation transporters in a rat brain microvessel endothelial cell line (RBE4). *Biochemica et Biophysica Acta* 1512 (2001) 299-307
- Gates J., Ferguson S.M., Blakely R.D. Apparsundaram S. Regulation of Choline Transporter Surface Expression and Phosphorylation by Protein Kinase C and Protein Phosphatase 1/2A. *JPET* 310 (2004) 536-545
- Gründemann D., Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M., Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372 (1994) 549-552
- Guthridge C.J., Stampfer M.R., Clark M.A., Steiner M.R. Phospholipase A2 in ras-transformed and immortalized human mammary epithelial cells. *Cancer Lett* 86 (1994) 11-21
- Haberkorn U., Reinhardt M., Stauss L.G. Metabolic design of combination therapy: use of enhanced fluorodeoxyglucose uptake caused by chemotherapy. *J Nucl Med* 33 (1992) 1981-1987
- Haberkorn U., Morr I., Oberdorfer F., Bellemann M.E., Blatter J., Altmann A., Kahn B., van Kaick G. Fluorodeoxyglucose uptake in vitro: aspects of method and effects of treatment with gemcitabine. *J Nucl Med* 35 (1994) 1842-1850
- Haeflner E.W. Studies on Choline Permeation through the Plasma Membrane and Its Incorporation into Phosphatidyl Choline of Ehrlich-Lettre-Ascites Tumor Cells in vitro. *Eur. J. Biochem.* 51 (1975) 219-228
- Hammerer P., Augustin H., Palisaar J., Noldus J., Graefen M., Huland H. Prostatakarzinom-Screening. *Onkologie* 8 (2002) 1072-1079
- Hara T., Yuasa M., Yoshida H. Automated synthesis of fluorine-18 labeled choline analogue: 2-fluoroethyl-dimethyl-2-oxyethylammonium. *J Nucl Med* 38 (1997) 44
- Hara T., Kosaka N., Kishi H. PET Imaging of Prostate Cancer Using Carbon-11-Choline. *J Nucl Med* 39 (1998) 990-995
- Hara T. [¹¹C]Cholin and 2-Deoxy-2-[¹⁸F]Fluoro-D-Glucose in Tumor Imaging with Positron Emission Tomography. *Mol Imag Biol* 4 (2002) 267-273
- Hara T., Kosaka N., Kishi H. Development of [¹⁸F]FFluoroethylcholine for Cancer Imaging with PET: Synthesis, Biochemistry, and Prostate Cancer Imaging. *J Nucl Med* 43 (2002) 187-199
- Harisinghani M.G., Barentsz J., Hahn P.F., Deserno W.M., Tabatabaei S., van de Kaa C.H., de la Rosette J., Weissleder R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med* 348 (2003) 2491-2499
- Hediger M.A., Rhoads D.B. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* 74 (1994) 993-1026
- Hernandez-Alcoceba R., Fernandez F., Lacal J.C. In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer Res* 59 (1999) 3112-3118
- Higashi K., Clavo A.C., Wahl R.L. In vitro assessment of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, L-methionine and thymidine as agents to monitor the early response of a human adenocarcinoma cell line to radiotherapy. *J Nucl Med* 34 (1993) 773-779

- Hofer C., Laubenbacher C., Block T., Breul J., Hartung R., Schwaiger M. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography is useless for the detection of local recurrence after radical prostatectomy. *Eur Urol* 36 (1999) 31-35
- Hoffmann K., Grafe F., Wohlrab W., Neubert R.H., Brandsch M. Functional characterization of a high-affinity choline transport system in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002) 118-121
- Ito K., Kubota Y., Yamamoto T., Suzuki K., Fukabori Y., Kurokawa K., Yamanaka H. Long term follow-up of mass screening for prostate carcinoma in men with initial prostate specific antigen levels of 4.0 ng/ml or less. *Cancer* 15 (2001) 744-751
- Jager P.L., de Korte M.A., Lub-de Hooge M.N., van Waarde A., Koopmans K.P., Perik P.J., de Vries E.G.E. Molecular imaging: what can be used today. *Cancer Imaging* 5 (2005) 27-32
- De Jong I.J., Pruijm J., Elsinga P.H., Vaalburg W., Mensink H.J.A. [¹¹C]Cholin Positron Emission Tomography for the Evaluation after Treatment of Localized Prostate Cancer. *Eur Urol* 44 (2003) 32-39
- Kamath A.V., Darling I.M., Morris M.E. Choline Uptake in Human Intestinal Caco-2 Cells Is Carrier-Mediated. *J. Nztr.* 133 (2003) 2607-2611
- Katz-Brull R., Degani H. Kinetics of choline transport and phosphorylation in human breast cancer cells; NMR application of the zero trans method. *Anticancer Res* 16 (1996) 1375-1380
- Katz-Brull R., Seger D., Rivenson-Segal D., Rushkin E., Degani H. Metabolic Markers of Breast Cancer: Enhanced Choline Metabolism and Reduced Choline-Ether-Phospholipid Synthesis. *Cancer Research* 62 (2002) 1966-1970
- Kekeeva T.V., Popova O.P., Shegaï P.V., Alekseev B.I., Adnreeva I.I., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V. Abberantmethylation of p16, HIC1, N33 and GSTP1 genes in tumor epithelium and tumor-associated stromal cells of prostate cancer. *Mol Biol (Mosk).* 41 (2007) 79-85
- Kotzerke J., Gschwend J.E., Neumaier B. PET for Prostate Cancer Imaging: Still a Quandary or the Ultimate Solution? *J Nucl Med.* 43 (2002) 200-202
- Kuhar M.J., Zarbin M.A. Synaptosomal transport: a chloride dependence for choline, GABA, glycine and several other compounds. *J. Neurochem.* 31 (1978) 251-156
- Kurhanewicz J., Vigneron D.B., Hricak H., Narayan P., Carroll P., Nelson S.J. Three-dimensional H-1 MR spectroscopic imaging of the in situ human prostate with high (0.24-0.7-cm³) spatial resolution. *Radiology* 198 (1996) 795-805
- Kurhanewicz J., Vigneron D.B., Nelson S.J. Three-dimensional magnetic resonance spectroscopic imaging of brain and prostate cancer. *Neoplasia* 2 (2000) 166-189
- Kus L., Borys E., Chu Y.P., Ferguson S.M., Blakely R.D., Emborg M.E., Kordower J.H., Levey A.I., Mufson E.J. Distribution of High Affinity Choline Transporter Immunoreactivity in the Primate Central Nervous System. *J comp Neur* 463 (2003) 341-357
- Lips K.S., Pfeil U., Reiners K., Rimasch C., Kuchelmeister K., Braun-Dullaeus R.C., Haberberger R.V., Schmidt R., Kummer W. Expression of the High-affinity Choline Transporter CHT1 in Rat and Human Arteries. *J Histochem Cytochem.* 51 (2003) 1645-1654
- Lockman P.R., Allen D.D. TheTransport of Choline. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28 (2002) 749-771
- Michel V., Yuan Z., Ramsuvar S., Bakovic M. Choline Transport for Phospholipid Synthesis. *Exp Biol Med* 231 (2006) 490-504
- Miller K., Weißbach L. Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Urologe [A]* 38 (1999) 388-401
- Mitchell S., Abel P., Ware M., Stamp G., Lalani E. Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. *BJU Int.* 85 (2000) 932-944

- Moser E. Klinische Anwendungen von PET. In „Radiologie“, Kauffmann G., Moser E., Sauer R. (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München Jena, 2001, 2. Auflage, 529-533
- Nakagami K., Uchida T., Ohwada S., Koibuchi Y., Suda Y., Sekine R., Morishita Y. Increased Choline Kinase Activity and Elevated Phosphocholine Levels in Human Colon Cancer. *Jpn. J Cancer Res.* 90 (1999) 419-424
- Noh D.Y., Ahn S.J., Lee R.A., Park I.A., Kim J.H., Suh P.G., Ryu S.H., Lee K.H., Han J.S. Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues. *Cancer Lett* 161 (2000) 207-214
- Okuda T., Haga T., Kanai Y., Endou H., Ishihara T., Katsura I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature neuroscience* 3 (2000) 120-125
- Oyama N., Akino H., Kanamaru H., Suzuki Y., Muramoto S., Yonekura Y., Sadato N., Yamamoto K., Okada K. [¹¹C]Acetate PET Imaging of Prostate Cancer. *J Nucl Med* 43 (2002) 181-186
- Petrides, P.E. Charakterisierung von Proteinen. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Löffler G., Petrides P.E. (Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1998, 6. Auflage, 53-54
- Petrides, P.E. Hämoglobin. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Löffler G., Petrides P.E. (Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1998, 6. Auflage, 893-902
- Picchio M., Messa C., Landoni C., Gianolli L., Sironi S., Brioso M., Matarrese M., Matei D.V., De Cobelli F., Del Maschio A., Rocca F., Rigatti P., Fazio F. Value of [¹¹C]cholin positron emission tomography for re-staging prostate-cancer: a comparison with [¹⁸F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Urol* 169 (2003) 1337-1340
- Price T.P., Coleman R.E., Liao R.P., Robertson C.N., Polascik T.J., DeGrado T.R. Comparison of [¹⁸F]Fluorocholin and [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose for Positron Emission Tomography of Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer. *J Urol* 168 (2002) 273-280
- Purohit R.S., Shinohara K., Meng M.V., Carroll P.R. Imaging clinically localized prostate cancer. *Urol Clin North Am* 30 (2003) 279-293
- Ramirez de Molina A., Rodriguez-Gonzalez A., Gutierrez R., Martinez-Pineiro L., Sanchez J., Bonilla F., Rosell R., Lacal J. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 296 (2002) 580-583
- Reske S.N., Blumstein N.M., Neumaier B., Gottfried H.-W., Finsterbusch F., Kocot D., Möller P., Glatting G., Perner S. Imaging Prostate Cancer with 11C-Choline PET/CT *J Nucl Med* 47 (2006) 1249-1254
- Riemann B., Könemann S., Pöpping D., Kopka K., Weckesser M., Willich N., Schober O. Early effects of irradiation on [(123)I]-IMT and [(18)F]-FDG uptake in rat C6 glioma cells. *Strahlenther Onkol.* 180 (2004) 434-441
- Rohde V., Katalinic A., Wasem J., Aidelsburger P., Prostataerkrankungen, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch Instituts (2007) Heft 36
- Roivainen A., Forsback S., Grönroos T., Lehtikoinen P., Kähkönen M., Sutinen E., Minn H. Blood metabolism of [methyl-11C]choline; implications for in vivo imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 27 (2000) 25-32
- Sanchez-Chapado M., Olmedilla G., Cabeza M., Donat E., Ruiz A. Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate* 54 (2003) 238-247
- Sarter M., Parikh V. Choline Transporters, cholinergic Transmission and Cognition. *Nature Reviews Neuroscience* 6 (2005) 48-56
- Sasajima T., Miyagawa T., Oku T., Gelovani J.G., Finn R., Blasberg R. Proliferation-dependent changes in amino acid transport and glucose metabolism in glioma cell lines. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 (2004) 1244-1256

- Sato N., Gleave M.E., Bruchovsky N., Rennie P.S., Goldenberg S.L., Lange P.H., Sullivan L.D. Intermittent androgen suppression delays progression to androgen-independent regulation of prostate-specific antigen gene in the LNCaP prostate tumour model. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58 (1996) 139-146
- Sauer R. Wechselwirkung von Strahlung und Materie. In „Radiologie“, Kauffmann G., Moser E. Sauer R. (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München Jena, 2001, 2. Auflage, 13-14
- Savas A., Warnke P.C., Ginap T., Feuerstein T.J., Ostertag C.B. The effects of continuous and single-dose radiation on choline uptake in organotypic tissue slice cultures of rabbit hippocampus. *Neurol Res.* 23 (2001) 669-675
- Schaider H., Haberkorn U., Berger M.R., Oberdorfer F., Morr I., vKaick G. Application of alpha-aminoisobutyric acid, L-methionine, thymidine and 2-fluoro-2-D-glucose to monitor effects of chemotherapy in a human colon carcinoma cell line. *Eur J Nucl Med* 23 (1996) 55-60
- Scher B., Seitz M., Albinger W., Tiling R., Scherr M., Becker H.-C., Souvatzoglou M., Gildehaus F.-J., Wester H.-J., Dresel S. Value of ¹¹C-choline PET and PET/CT in patients with suspected prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (2007) 45-53
- Schloss P., Mayser W., Niehuis A., Betz H. Na⁺-dependent high-affinity uptake of choline into cultured fibroblasts. *Bioch a Biophys Res Comm* 199 (1994) 1320-1325
- Schöder H., Larson S.M., Positron Emission Tomography for Prostate, Bladder, and Renal Cancer. *Semin Nucl Med.* 34 (2004) 274-92
- Schröder F.H. Screening for prostate cancer. *Urol Clin North Am* 30 (2003) 239–251
- Senekowitsch-Schmidtke R., Matzen K., Truckenbrodt R., Mattes J., Heiss P., Schwaiger M. Tumor Cell Spheroids as a Model for Evaluation of Metabolic Changes After Irradiation. *J Nucl Med* 39 (1998) 1762-1768
- Sobel R.E., Sadar M.D. Cell Lines used in Prostate Cancer Research: a Compendium of new and old Lines-Part 1. *J Urol* 173 (2005) 342-259
- Sutinen E., Nurmi M., Roivainen A., Varpula M., Tolvanen T., Lehtikoinen P., Minn H. Kinetics of [¹¹C]choline uptake in prostate cancer: a PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 (2004) 317–324
- Thews G. Aufbau und Eigenschaften von Hämoglobin. In: „Physiologie des Menschen“, Schmidt R.F., Thews G. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1997, 27. Auflage, 604-608
- Tian M., Zhang H., Oriuchi N., Higuchi T., Endo K. Comparison of [¹¹C]Cholin PET and FDG PET for the differential diagnosis of malignant tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 (2004) 1064-1072
- Weber W.A., Schwaiger M., Avril N. Quantitative Assessment of Tumor Metabolism Using FDG-PET Imaging. *Nucl Med Biol* 27 (2000) 683-687
- Wefer A.E., Hricak H., Vigneron D.B., Coakley F.V., Lu Y., Wefer J., Mueller-Lisse U., Carroll P.R., Kurhanewicz J. Sextant localization of prostate cancer: comparison of sextant biopsy, magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopic imaging with step section histology. *J Urol.* 164 (2000) 400-404
- Yamaguchi T., Lee J., Uemura H., Sasaki T., Takahashi N., Oka T., Shizukuishi K., Endou H., Kubota Y., Inoue T. Prostate cancer: a comparative study of ¹¹C-choline PET and MR imaging combined with proton MR spectroscopy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 32 (2005) 742-748
- Zeisel S.H., Costa K.A.D., Franklin P.D., Alexander E.A., Lamont J.T., Sheard N.F., Beiser A. Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J* 5 (1991) 2093-2098
- Zeisel S.H., Blusztajn J.K. Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 14 (1994) 269-296

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die drei Hauptstoffwechselwege des Cholins: Cholin kann zum Betain oxidiert, zum Acetylcholin acetyliert und zum Phosphorylcholin phosphoryliert werden. Phosphorylcholin wird für die Zellmembransynthese weiter zum Phosphatidylcholin verstoffwechselt (Kennedy Pathway). * Position für die radioaktive Markierung mit ^{11}C bzw. ^3H ; bei der Markierung mit ^3H werden alle drei H-Atome am gekennzeichneten C-Atom durch ^3H ersetzt. (aus: Roivainen et al. 2000, S.26)	6
Abb. 2:	Nativaufnahme von DU145-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular)	18
Abb. 3:	Nativaufnahme von LNCaP-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular)	19
Abb. 4:	Nativaufnahme von PC-3-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular).....	19
Abb. 5:	Nativaufnahme von SW707-Zellen, 100fache Vergrößerung (Objektiv x Okular)	20
Abb. 6:	Strukturformel von Hemicholinium-3	28
Abb. 7:	Strukturformel von Cholin	28
Abb. 8:	Strukturformel von Tetraethylammonium (TEA)	28
Abb. 9:	Strukturformel von Guanidin	29
Abb. 10:	Strukturformel von Ouabain	29
Abb. 11:	Schematischer Aufbau des „Blotsandwich“	37
Abb. 12:	Proliferationstest DU145. Zum Zeitpunkt 0h wurden je 25000, 50000 und 75000 Zellen ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat (x-Achse) wurde jeweils die Zellzahl (y-Achse) bestimmt. Der Kurvenverlauf zeigt eine erste, exponentielle Wachstumsphase und eine zweite gleich bleibende Phase	

	nach Erreichen des Plateaus nach 238 h, in der keine Proliferation mehr stattfindet.	39
Abb. 13:	Proliferationstest LNCaP (s. Abb. 12). Erreichen des Plateaus nach 497 h (25000) bzw. 326 h (50000, 75000).	39
Abb. 14:	Proliferationstest PC-3 (s. Abb. 12). Erreichen des Plateaus nach 234 h (25000, 50000) bzw. 166 h (75000).	40
Abb. 15:	Proliferationstest SW707 (s. Abb. 12). Erreichen des Plateaus nach 211 h.	40
Abb. 16:	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme in DU145 über 5, 15, 30 und 60 min. Die Aufnahme wurde in Abhängigkeit der Glukosekonzentration untersucht (0 bis 15 mM). Die FDG-Aufnahme ist in counts per minute (cpm) angegeben.	42
Abb. 17:	[¹⁸ F]FDG-Efflux aus DU145. Die Werte zum Zeitpunkt 0 min geben die [¹⁸ F]FDG-Aufnahme nach 10 min bzw. 30 min wider. Der Efflux wurde 1, 3, 5, 10 und 20 min nach der Aufnahmeperiode (10 min bzw. 30 min) ermittelt und in cpm angegeben.	43
Abb. 18:	[¹¹ C]Cholinaufnahme in DU145 über 5, 15, 30 und 60 min. Die Aufnahme wurde in Abhängigkeit der Cholinkonzentration untersucht (0 bis 100 µM). Die Cholinaufnahme ist in counts per minute (cpm) angegeben.	44
Abb. 19:	[¹¹ C]Cholinaufnahme in DU145 bei unterschiedlichen Konzentrationen an kaltem Cholin (0 bis 100µM). Die Aufnahme wurde nach 5, 15, 30 und 60 min gemessen und in counts per minute (cpm) angegeben.	45
Abb. 20:	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707. Zu verschiedenen Zeitpunkten (10, 30, 60, 120, 240 min) nach Zugabe von [¹⁸ F]FDG (je 370 kBq zu 10 ⁵ Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als fmol/mg Zellprotein dargestellt.	46
Abb. 21:	[³ H]Cholinaufnahme in LNCaP, PC-3 und SW707. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [³ H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10 ⁵ Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als pmol/mg Zellprotein dargestellt.	47
Abb. 22:	[³ H]Cholinaufnahme in LNCaP in NaCl-haltigem und -freiem Versuchspuffer. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [³ H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10 ⁵ Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als pmol/mg Zellprotein dargestellt.	48
Abb. 23:	[³ H]Cholinaufnahme in PC-3 in NaCl-haltigem und -freiem Versuchspuffer. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [³ H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10 ⁵ Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen und die Aufnahme als pmol/mg Zellprotein dargestellt.	49

Abb. 24:	[³ H]Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min) nach Zugabe von [³ H]Cholin (je 1,85 kBq zu 10 ⁵ Zellen) wurde die Aktivität nach dreimaligem Waschen gemessen. Gezeigt ist das Verhältnis der Aufnahme in NaCl-freiem zu NaCl-haltigem Versuchspuffer (=100%).49
Abb. 25:	Konzentrationsabhängige Hemmung der [³ H]Cholinaufnahme in LNCaP durch kaltes Cholin bzw. HC-3 (100% = Kontrolle ohne Hemmstoffgabe; logarithmische Darstellung der Abszisse).50
Abb. 26:	Konzentrationsabhängige Hemmung der [³ H]Cholinaufnahme in PC-3 durch kaltes Cholin bzw. HC-3 (100% = Kontrolle ohne Hemmstoffgabe; logarithmische Darstellung der Abszisse).51
Abb. 27:	[³ H]Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 in Gegenwart von kaltem Cholin, HC-3, TEA, Guanidin und Ouabain (je 1 mM) in % der Kontrolle (100%). ..52
Abb. 28:	Cholinaufnahmegeschwindigkeit der PC-3-Zellen (nmol/mg Zellprotein/10 min) in Abhängigkeit von der Cholinkonzentration (0-1000 µM). Für LNCaP-Zellen wurde ein ähnlicher Kurvenverlauf ermittelt.53
Abb. 29:	Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik für Cholin (hier für PC-3-Zellen gezeigt). Dazu wurden die Konzentrationen an kaltem Cholin (0-200µM) gegen die Aufnahmegeschwindigkeiten (nmol/mg Zellprotein/10 min) aufgetragen. Die Ursprungsgerade durch den 10000 µM-Wert repräsentiert die unspezifische Cholinaufnahme. Durch Subtraktion entsprechender Werte der Ursprungsgeraden (unspezifische Aufnahme) von der nicht sättigbaren Gesamtcholinaufnahme erhält man die sättigbare, spezifische Cholinaufnahme. Aus der spezifischen Cholinaufnahme lassen sich K _M - und v _{max} -Werte bestimmen (s. Abb. 30-31 und 33-36).54
Abb. 30:	Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in LNCaP. Dazu wurden die Konzentrationen an kaltem Cholin (0-200µM) gegen die Aufnahmegeschwindigkeiten (nmol/mg Zellprotein/10 min) aufgetragen. Durch Subtraktion der unspezifischen von der Gesamtcholinaufnahme (s. Abb. 29) wurden für LNCaP-Zellen folgende Werte der spezifischen Cholinaufnahme berechnet: K _M =3,8µM Cholin; v _{max} =1,6nmol/mg Zellprotein/10 min.55
Abb. 31:	Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in PC-3 (s.a. Abb.30). K _M =7µM Cholin; v _{max} =0,9nmol/mg Zellprotein/10 min..55
Abb. 32:	Überleben von LNCaP und PC-3 nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC ₅₀ -Dosis) bzw. DMSO über 5 Tage (s. Tab.6).56
Abb. 33:	Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in LNCaP nach Behandlung mit Bicalutamid (s.a. Abb. 30). K _M =9,5µM Cholin; v _{max} =1,4nmol/mg Zellprotein/10 min.57

Abb. 34:	Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in LNCaP nach Behandlung mit Docetaxel (s.a. Abb. 30). $K_M=8,8\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\text{max}}=2,8\text{nmol/mg Zellprotein/10 min.}$58
Abb. 35:	Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in PC-3 nach Behandlung mit Bicalutamid (s.a. Abb. 30). $K_M=5,9\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\text{max}}=1\text{nmol/mg Zellprotein/10 min.}$58
Abb. 36:	Michaelis-Menten-Kinetik der spezifischen Cholinaufnahme in PC-3 nach Behandlung mit Docetaxel (s.a. Abb. 30). $K_M=6\mu\text{M}$ Cholin; $v_{\text{max}}=1,1\text{nmol/mg Zellprotein/10 min.}$59
Abb. 37:	Cholinaufnahme in LNCaP in % der Kontrolle (100%) nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC_{50}) über 5 Tage in Abhängigkeit von der Konzentration an kaltem Cholin (0-10000 μM).61
Abb. 38:	Cholinaufnahme in PC-3 in % der Kontrolle (100%) nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC_{50}) über 5 Tage in Abhängigkeit von der Konzentration an kaltem Cholin (0-10000 μM).61
Abb. 39:	Standardgerade zur Molekulargewichtsbestimmung. Die Laufstrecken der Markerproteine in mm wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte der Markerproteine in Da aufgetragen. Mithilfe der Geradengleichung lassen sich die Molekulargewichte unbekannter Banden anhand ihrer Laufstrecke abschätzen.62
Abb. 40:	Darstellung der Proteinmuster der Zelllysate für den Western Blot nach SDS-Page (8% Polyacrylamid; Coomassie Blau Färbung). A) 100% Protein. Vom Marker wurden je 5 μl , von den Lysaten der DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 und Kelly-Zellen je 6 μl und von den Lysaten der Erythrozyten und der Sy5y-Zellen je 8 μl aufgetragen. Die Proteinkonzentrationen in DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 waren etwa gleich, in Kelly etwas höher und in den Erythrozyten und Sy5y niedriger. B) 50% Protein. Vom Marker wurden je 2,5 μl , von den Lysaten der DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 und Kelly-Zellen je 3 μl und von den Lysaten der Erythrozyten und der Sy5y-Zellen je 4 μl aufgetragen. Auffallend ist die geringe Anzahl an Banden im Erythrozytenlysat: 1, Doppelbande bei ca. 192 bzw. 206 kDa; 2, Hämoglobinbande bei ca. 60 kDa; 3, Bande der Hämoglobinuntereinheiten bei ca. 19 kDa.63
Abb. 41:	Western Blot nach SDS-Page im 8%-igen Polyacrylamidgel. Vom Marker wurden je 5 μl , von den Lysaten der DU145, LNCaP, PC-3, SW707, PC-12 und Kelly-Zellen je 6 μl und von den Lysaten der Erythrozyten und der Sy5y-Zellen je 8 μl aufgetragen. A) Western Blot (nach Inkubation mit Primärantikörper gegen CHT1 in 0,1% MMP). Mit Ausnahme der Erythrozyten zeigt sich in allen Zellen eine Doppelbande bei ca. 94 kDa und ca. 98 kDa (Rahmen). 1, zusätzliche Bande bei ca. 44 kDa in PC-12; 2 und 3, Banden bei ca. 62 kDa bzw. ca. 186/200 kDa in Erythrozyten. 4, zusätzliche Bande bei ca. 72 kDa in Kelly. B) Kontrolle (Inkubation nur mit Sekundärantikörper). Die in A hervorgehobenen Banden zeigten sich hier nicht.64

9. Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Eigenschaften von CHT1 und CHT2 (nach Lockman et al. 2002, S.753)	7
Tab.2:	Glukosekonzentrationen für die Aufnahmeversuche (* physiologische Glukosekonzentration)	25
Tab.3:	Zeitintervalle für die Analyse der [¹⁸ F]FDG- bzw. [³ H]Cholinaufnahme	27
Tab.4:	Verdünnungsreihen für Hemicholinium-3 (HC-3) bzw. kaltes Cholin	30
Tab.5:	Cholinkonzentrationen bzw. Cholinmengen für die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik (* physiologische Cholinkonzentration)	31
Tab.6:	IC50-Werte von Bicalutamid (inkl. DMSO-Konzentration) und Docetaxel für LNCaP und PC-3 (ermittelt durch die Forschungsgruppe der Urologischen Klinik der TU München).	32
Tab.7:	Standard-Protein-Messreihe (Angaben in ml)	33
Tab.8:	Zellzahl/175 cm ² Zellkulturflasche, mittlerer Durchmesser und mittleres Volumen konfluenten Zellen	38
Tab.9:	Dauer [h] bis zum Erreichen der jeweiligen Plateauphase in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl	39
Tab.10:	Verdopplungszeiten [h] der untersuchten Zelllinien (n=12)	41
Tab.11:	¹¹ C-Aktivität nach Inkubation mit 200 ml [¹¹ C]Cholin (370 kBq; 10µCi) in Versuchspuffer für 10 min und dreimaligem Waschen.	44
Tab.12:	[¹⁸ F]FDG-Aufnahme in SW 707 verglichen mit LNCaP bzw. PC-3.	46
Tab.13:	[³ H]Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 im Vergleich zu SW707.	47
Tab.14:	[³ H]Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 in Gegenwart von kaltem Cholin, HC-3, TEA, Guanidin und Ouabain (je 1 mM) in % der Kontrolle (100%). ...	51
Tab.15:	Überleben von LNCaP und PC-3 nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC ₅₀ -Dosis) bzw. DMSO über 5 Tage (s. Tab.6).	56

Tab.16:	K_M - und v_{max} -Werte mit Bicalutamid (n=8) bzw. Docetaxel (n=8) behandelte LNCaP und PC-3-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=16).57
Tab.17:	Cholinaufnahme in LNCaP und PC-3 in % der Kontrolle (100%) nach Behandlung mit Bicalutamid und Docetaxel (je IC_{50}) über 5 Tage in Abhängigkeit von der Konzentration an kaltem Cholin (0-10000 μM). Der Bereich um die physiologische CholinKonzentration (10 μM) ist hervorgehoben.....60

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹¹ C	¹¹ Kohlenstoff
¹³ N	¹³ Stickstoff
¹⁵ O	¹⁵ Sauerstoff
¹⁸ F	¹⁸ Fluor
[¹⁸ F]FDG	[¹⁸ F]Fluordeoxyglukose
β ⁺	Positron
β ⁻	Elektron
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
BPH	benigne Prostatahyperplasie
Bq	Becquerel (1 Bq = 1 radioaktiver Zerfall pro Sekunde)
CaCl 2H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat
CHT1	(hochaffiner) Cholintransporter 1
CHT2	(niedrigaffiner) Cholintransporter 2
CIDG	Chlordeoxyglukose
cpm	Counts per minute (= Zählrate pro Minute)
CT	Computertomographie
CTL	choline transporter like protein (Cholintransporter ähnliches Protein)
DG	Deoxyglukose
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	desintegration per minute (= Zerfallserscheinung pro Minute)
DU 145	Prostatakarzinomzelllinie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (lateinisch: und andere)
FDG	Fluordeoxyglucose
FKS	fetales Kälberserum
fmol	Femtomol
g	Gravität
GLUT	Glukosetransporter
HC-3	Hemicholinium-3
HCl	Salzsäure
HWZ	Halbwertszeit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

Kelly	Neuroblastomzelllinie
keV	Kilo-Elektronenvolt
kg	Kilogramm
K_M -Wert	Michaelis-Menten-Konstante
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
MBq	Mega-Becquerel
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
M	molar
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MMP	Magermilchpulver
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molekulargewicht (engl. Molecular weight)
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NEAS	Non essential Amino acids
NMDG	N-methyl-D-glucamine
OCT	organic cation transporter (organischer Kationentransporter)
PBq	Petabecquerel
PC-3	Prostatakarzinomzelllinie
PC-12	Pheochromozytomzelllinie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pmol	Pikomol
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PSA	Prostata spezifisches Antigen
rpm	Rounds per minute
RPMI 1640	Name des verwendeten Kulturmediums
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat (bzw. deutsch: Natriumdodecylsulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	standard error of sample mean (Standardfehler)
SW707	Kolonkarzinomzelllinie
Sy5y	Neuroblastomzelllinie
Tab.	Tabelle
TBq	Terabecquerel
TBS	TRIS buffered saline
t_{doppel}	Verdopplungszeit
TEA	Tetraethylammonium
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	TWEEN TRIS buffered saline
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit

11. Danksagung

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Dissertationsthemas, die intensive Betreuung meiner Arbeit verbunden mit ihrer steten Motivationsfähigkeit, sowie die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf internationalen Kongressen zu präsentieren.

Herrn Dr. Christof Seidl danke ich für die Hilfestellung bei allen theoretischen und praktischen Fragen, insbesondere beim Durchführen des Western Blots, sowie für die ausführlichen Korrekturen schriftlicher Arbeiten.

Frau Agnes Mühlfeldner und Frau Dr. Maria Picchio danke ich für das Einführen in den Umgang mit Zellkulturen und der Hilfestellung bei den anfänglichen Problemen des Laboralltags.

Frau Dr. Antonie Lehmer und den Mitarbeiterinnen des Urologischen Forschungslabors der Technischen Universität München danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und das Versorgen mit Zellen.

Herrn Korbinian Holzapfel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen über unsere Arbeit.

Herrn Michael Herz danke ich für die Beantwortung aller Fragen zu den verwendeten radioaktiven Substanzen.

Herrn Wolfgang Kloiber danke ich für die Unterstützung beim Umgang mit den radioaktiven Substanzen und für die Herstellung der Absaugvorrichtung für die Aufnahmeversuche.

Den Mitgliedern des Labors danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und den stets guten Umgangston.

Meinem Vorbild und Großvater Dr. Eberhard Ahrem danke ich für seine Begeisterungsfähigkeit für die Medizin und das große Interesse an dieser Arbeit, deren Fertigstellung er leider nicht mehr miterleben konnte.

Abschließend danke ich ganz herzlich meiner Freundin Julia und meiner Familie, die mich während der ganzen Zeit in jeder Hinsicht unterstützt, mich immer wieder motiviert haben und durch fruchtbare Diskussionen und Ideen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.