Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie der Philipps-Universität Marburg Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. J. Klose

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH Standort Marburg

# In vivo und in vitro Evaluation von radiometallmarkierten DTPA- und HYNIC-GLP-1-Analoga zur Detektion von Insulinomen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sebastian Huss aus Münster

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am: 3.07.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. T. Behr

Korreferent: Prof. Dr. S. Bien

Für meine Eltern

| 1 | Einleitur | ıg     |  | 7    |
|---|-----------|--------|--|------|
|   | 1.1 Neu   | uroend | dokrine Tumoren (NET)  | 7    |
|   | 1.1.1     | Neur   | oendokrine Tumoren im Gastroentero-pankreatischem System       | 8    |
|   | 1.1.1.1   | 1      | Neuroendokrine Tumoren des Pankreas                            | 8    |
|   | 1.1.1.2   | 2      | Karzinoide   | . 10 |
|   | 1.1.1.3   | 3      | Gastrinom  | . 10 |
|   | 1.1.1.4   | 4      | Multiple Endokrine Neoplasien (MEN)                            | . 10 |
|   | 1.1.2     | Allge  | emeine Diagnostik gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren r | nit  |
|   | Fokus a   | uf Ins | ulinomen   | . 11 |
|   | 1.1.3     | Loka   | lisationsdiagnostik gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren | mit  |
|   | Fokus a   | uf Ins | ulinomen   | . 12 |
|   | 1.1.4     | Ther   | apieoptionen gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren        | . 14 |
|   | 1.2 GLF   | ⊃-1    |  | . 16 |
|   | 1.2.1     | Inkre  | etin-Konzept   | . 16 |
|   | 1.2.2     | Synt   | hese des GLP-1   | . 16 |
|   | 1.2.3     | Der (  | GLP-1-Rezeptor   | . 20 |
|   | 1.2.4     | Stoff  | wechsel und GLP-1-Analoga                                      | . 21 |
|   | 1.2.5     | Phys   | siologische Effekte des GLP-1                                  | . 23 |
|   | 1.2.5.    | 1      | Pankreas   | . 24 |
|   | 1.2.5.2   | 2      | Magen  | . 24 |
|   | 1.2.5.3   | 3      | ZNS  | . 24 |
|   | 1.2.5.4   | 4      | Fettgewebe, Muskulatur   | . 25 |
|   | 1.2.5.    | 5      | Herz / Kreislauf   | . 25 |
|   | 1.2.5.0   | 6      | Lunge  | . 25 |
|   | 1.2.6     | GLP    | -1 als Medikament bei Diabetes Mellitus Typ 2                  | . 26 |
|   | 1.3 Fra   | gestel | llung und experimentelle Konzeption                            | . 28 |
| 2 | Material  | und M  | Methoden   | 30   |
|   | 2.1 Mat   | erial. |  | . 30 |
|   | 2.1.1     | Zellli | nien   | . 30 |
|   | 2.1.2     | Zellk  | ultur  | . 30 |
|   | 2.1.3     | Vers   | uchstiere  | . 31 |
|   | 2.1.4     | Verw   | vendete Peptide  | . 31 |
|   | 2.1.5     | Verw   | vendete Radionuklide   | . 32 |
|   | 2.1.6     | Weit   | ere Materialien  | . 33 |

|   | 2.2 N   | /lethod  | en  | 36 |
|---|---------|----------|---|----|
|   | 2.2.1   | Ма       | rkierung von DTPA-Peptiden mit <sup>111</sup> In        | 36 |
|   | 2.2.2   | Ма       | rkierung von Exendin-4K40AhxHYNIC mit <sup>99m</sup> Tc |    |
|   | 2.2     | .2.1     | EDDA- Markierung  |    |
|   | 2.2     | .2.2     | Tricin- Markierung                                      | 37 |
|   | 2.2     | .2.3     | Tricin/EDDA-Markierung                                  | 37 |
|   | 2.2.3   | Qu       | alitätskontrollen                                       | 37 |
|   | 2.2.4   | Zel      | Ibiologische Methoden                                   | 38 |
|   | 2.2     | .4.1     | Pflege der Zellen                                       | 38 |
|   | 2.2     | .4.2     | Aussähen der Zellen                                     | 38 |
|   | 2.2     | .4.3     | Hämozytometer   | 38 |
|   | 2.2     | .4.4     | Proteinbestimmung                                       | 39 |
|   | 2.2.5   | Inte     | ernalisierungen   | 39 |
|   | 2.2.6   | Ext      | ernalisierungen   | 40 |
|   | 2.2.7   | Bin      | dungsstudien  |    |
|   | 2.2.8   | Tie      | rversuche   | 42 |
|   | 2.2     | .8.1     | Implantation von Tumorzellen                            | 42 |
|   | 2.2     | .8.2     | Bioverteilungsstudie                                    |    |
|   | 2.2.9   | Sta      | tistik  |    |
|   | 3 Ergeb | onisse . |   | 45 |
|   | 3.1 0   | Qualität | skontrollen der Markierungen                            | 45 |
|   | 3.2 Z   | Zellvers | uche  | 46 |
|   | 3.2.1   | Inte     | ernalisierungen   | 46 |
|   | 3.2.2   | Ext      | ernalisierungen   | 48 |
|   | 3.2.3   | Bin      | dungsstudien  | 52 |
|   | 3.3 E   | Biodistr | ibution   | 55 |
| 2 | 4 Disku | ission   |   | 59 |
|   | 4.1 Z   | Zellvers | uche  | 60 |
|   | 4.1.1   | Inte     | ernalisierungen und Externalisierungen                  | 60 |
|   | 4.1.2   | Bin      | dungsstudien  | 62 |
|   | 4.2 E   | Biodistr | ibution   | 64 |
|   | 4.3 A   | Ausblick | ٢   | 65 |
| Ę | 5 Zusai | mmenf    | assung  | 69 |

| 6 An | Anhang70                               |    |  |
|------|--|----|--|
| 6.1  | Literaturverzeichnis                   | 70 |  |
| 6.2  | Verzeichnis meiner akademischen Lehrer | 88 |  |
| 6.3  | Danksagung                             | 89 |  |

# 1 Einleitung

## **1.1 Neuroendokrine Tumoren (NET)**

Neuroendokrine Tumoren (NET) leiten sich von peripheren endokrinen Anteilen des Nervensystems ab. Diese aus dem Neuroektoderm hervorgegangenen Anteile, fasst man auch als disseminiertes neuroendokrines System (DNES) zusammen. Pearse (1969) beschrieb neuroendokrine Zellen als Amine Precursor Uptake and Decarboxylation (APUD)-Zellen, da ihre Hormonproduktion auf den gleichen Mechanismen – der Aufnahme und Decarboxylierung von Aminvorstufen – beruht.

Aktuell werden alle neuronalen und endokrinen Zellen, die bestimmte Markerproteine exprimieren, zu den neuroendokrinen Zellen gerechnet. Zu solchen Proteinen zählen zell-spezifische Proteine (Insulin, Gastrin, Glukagon,...) und auch allgemeine zelluläre Markerproteine (z.B. Neuronen spezifische Enolase (NSE), Chromogranin A und B, Synaptophysin...) (Klöppel et al., 1996). Zur immunzytochemischen Standarddiagnostik werden Chromogranin A und Synaptophysin verwendet.

Etwa vierzig unterschiedliche Zellarten zählen zum DNES, unter anderem die hormonproduzierenden Zellen des Hypothalamus, der Pinealdrüsen, der C-Zellen der Schilddrüse, der Lunge, der Plazenta, des Nebennierenmarks und die neuroendokrinen Zellen im Gastroentero-pankreatischem System. NET, die sich aus letzterem System ableiten kann man je nach Lokalisation zusätzlich in NET des Vorder-, Mittel-, und Hinterdarms unterteilen. Man bezeichnet NET, die eine Symptomatik durch ihre Hormonsekretion aufweisen, als funktionelle Tumoren. Zirka 15-30% der NET weisen eine solche Symptomatik nicht auf und werden folglich als nicht-funktionelle Tumoren bezeichnet (Ramage et al., 2005). Die klinische Prävalenz neuroendokriner Tumore beträgt 3 / 100.000 pro Jahr, wobei ein leichter Frauenüberhang zu verzeichnen ist (Levi et al., 2000; Hemminki & Li, 2001a, 2001b). Interessanterweise ist die Prävalenz von NET im allgemeinen Autopsiematerial deutlich höher als die klinische Prävalenz (Berge & Linell, 1976; Kimura et al., 1999). Wynick et al. (1988) zeigten, dass neuroendokrine Tumoren mehrere Peptide produzieren können. Bemerkenswert ist, dass es trotz der zusätzlich sezernierten Peptide immer zu denselben spezifischen Symptomen eines bestimmten Tumors kommt.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass nur ein Hormon in ausreichender Menge synthetisiert wird und die Symptome verursacht, oder dass die nebenbei produzierten Hormone in biologisch inaktiver Form von den Tumorzellen hergestellt werden.

## 1.1.1 Neuroendokrine Tumoren im Gastroenteropankreatischem System

Man zählt das Insulinom, das Glukagonom, das Vipom und das pankreatische Polypedidom zu den NET des Pankreas. Diese NET sind sehr selten, ihre Prävalenz wird auf 0,5/100.000/Jahr geschätzt. Andere NET im Gastroenteropakreatischem System stellen Karzinoide und Gastrinome dar.

### 1.1.1.1 Neuroendokrine Tumoren des Pankreas

Die häufigste endokrine Neoplasie im Pankreas stellt mit einem Anteil von über 90% das aus den B-Zellen (= Betazellen) ableitende Insulinom dar (Röher et al., 1997). Insulinome sezernieren neben Insulin oft auch andere Hormone und Peptide. In 44% der Fälle werden Glukagon, in 18% Somatostatin, in 11% Gastrin, in 39% Pankreatisches Polypeptid und in 11% ACTH ähnliche Stoffe hergestellt (Heitz et al., 1982). Die Patienten sind in der Regel zwischen 30 und 60 Jahre alt (Delcore & Friesen, 1994; Vassilopoulou-Sellin & Ajani, 1994). Frauen sind mit einem Anteil von 60% häufiger betroffen als Männer (Delcore & Friesen, 1994).

In 90% handelt es sich um eine gutartige Neubildung, die oft sehr klein ist (< 1,5 cm). Die Insulinome treten meist solitär auf und fast immer liegt der Primärtumor im Pankreas. Nur in 10% der Fälle liegt das Insulinom multipel vor. Dann kann eine multiple endokrine Neoplasie (MEN) Typ 1 zugrunde liegen (s.a. Kapitel 1.1.1.4).

Das klinische Bild eines Insulinoms wird durch die Whipple-Trias beschrieben:

- 1. Spontanhypoglykämien
- 2. Autonome und neuroglukopenische Symptome
- 3. Prompte Besserung nach oraler oder i.v. Gabe von Glukose

Die Sponanhypoglykämien treten typischerweise bei Nahrungskarenz auf. Bemerkenswert ist, dass der hypoglykämisch bedingte Heißhunger oft zur Gewichtszunahme führt. Zu den autonomen Symptomen zählt man Schwitzen, Schwäche, Hitzewallungen, Tachykardien, Palpitationen, Tremor, Angst, Neuroglukopenische Übelkeit und Heißhunger. Symptome umfassen Schwindel, Kopfschmerzen, Verwirrtheit. Sehstörungen. Parästhesien. Hemiplegie, Aphasie, Verhaltensänderungen, Krämpfe und Koma. Therapie der Wahl stellt die operative Enukleation des Tumors dar. Gegebenfalls muss auch eine Pankreasteilresektion erfolgen. Das eröffnete Abdomen sollte immer auf weitere Tumoren untersucht werden, da 10% der Insulinome multifokal vorkommen (Thompson & Townsend, 2004).

Das Glukagonom entwickelt sich aus den A-Zellen des endokrinen Pankreas. Es ist eines der seltensten pankreatischen Tumorleiden. Der Altersgipfel liegt zwischen 40 und 60 Jahren, wobei Frauen und Männer gleichermaßen betroffen sind (Delcore & Friesen, 1994). Klinisch tritt durch die vermehrte Glukagonsynthese das sog. Glukagonom-Syndrom mit Diabetes mellitus, Gewichtsverlust, Diarrhoen und Depression auf. Ferner kann sich ein Erythema necrolyticum migrans im Gesicht und akral ausbilden. Therapeutisch kommt kurativ nur die chirurgische Therapie in Betracht (Thompson & Townsend, 2004).

Das Somatostatinom entsteht aus den somatostatinproduzierenden D-Zellen des endokrinen Pankreas. Es gilt generell als maligne. Man unterscheidet zwei Typen des Somatostatinoms, wobei der erste im Pankreas vorkommt und Diabetes mellitus und Diarrhoe als Symptome aufweist. Der zweite Typ kommt typischerweise im Dünndarm vor und ist mit einer Neurofibromatose vergesellschaftet (Perry et al. 1995).

Das pankreatische Polypeptidom leitet sich aus den PP-Zellen des endokrinen Pankreas ab. Es kommt allerdings durch die Produktion von pankreatischem Polypeptid zu keiner eindeutigen Symptomatik. Sehr selten können im Pankreas auch Vipome entstehen, die vasoaktives intestinales Peptid (VIP) produzieren. Klinisch entwickelt sich ein Verner-Morrison-Syndom (syn. WDHH-Syndrom), das durch wässrige Durchfälle, Hypokaliämie und Hypochlorhydrie gekennzeichnet ist (Thompson & Townsend, 2004).

#### 1.1.1.2 Karzinoide

Karzinoide sind Serotonin und Kallikrein produzierende Tumore. Histologisch leiten sie sich von enterochromaffinen Zellen (Kulchitsky-Zellen) ab. Embryologisch kann man sie in Tumoren des Vorder-, Mittel und Enddarm einteilen. Klinisch kann sich ein Karzinoid mit einer Flush-Symptomatik, Diarrhoen, Koliken und Asthma bronchiale manifestieren. Zu 75% liegen Karzinoide im Dünndarm oder Appendix. Zu 10% können sie auch extraintestinal, z.B. in der Lunge (embryologisch gesehen ein Teil des Vorderdarms) vorkommen (Evers, 2004).

#### 1.1.1.3 Gastrinom

Das Gastrinom – auch Zollinger-Ellison-Syndrom genannt – kennzeichnet sich durch eine übermäßige Gastrinproduktion. Die Hormonüberproduktion führt zur Überstimulation von salzsäureproduzierenden Belegzellen und kann therapieresistente, oft atypisch gelegene Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt hervorrufen. Zusätzlich kann es zum Auftreten von Übelkeit. Erbrechen und Diarrhoen kommen. Zur Symptomkontrolle können hochdosierten Protonenpumpeninhibitoren eingesetzt werden (Ramage et al., 2005).

### 1.1.1.4 Multiple Endokrine Neoplasien (MEN)

Neuroendokrine Tumoren können auch im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) auftreten. Die MEN-Syndrome werden autosomal-dominant vererbt. Das MEN-1-Syndrom, auch Wermer-Syndrom genannt, wird durch eine Mutation im Menin-Gen (11q13) verursacht. Zu den Organmanifestationen des MEN-1-Syndroms können zählen: endokriner Pankreastumor (als Leittumor), primärer Hyperparathoidismus und Hypophysentumore.

Neben dem MEN-1-Syndrom kommen auch MEN-2-Syndrome vor, die u.a. in MEN-2a und MEN-2b unterteilt werden. Das MEN-2a-Syndrom (Sipple-Syndrom) umfasst folgende Organmanifestationen: medulläres C-Zellkarzinom der Schilddrüse (Leittumor), Phäochromozytom und Primärer Hyperparathyreodismus. Das MEN-2b Syndrom (Gorlin-Syndrom) ist mit dem medullären C-Zellkarzinom der Schilddrüse (Leittumor), dem Phäochromozytom, einer Ganglionneuromatose der Schleimhäute und einem marfanoidem Habitus assoziiert. Bei Nachweis eines MEN-Syndroms sollten auf Grund der möglichen genetischen Prädisposition auch Familienmitglieder untersucht werden (Lairmore & Moley, 2004).

## 1.1.2 Allgemeine Diagnostik gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren mit Fokus auf Insulinomen

Der klinische Verdacht auf einen neuroendokrinen Tumor kann sich aus der durch die Hormonüberproduktion hervorgerufenen Symptomatik ergeben. Als Basisdiagnostik empfehlen die Leitlinien zur Behandlung gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren einen Chromogranin A Test (CgA) und einen 5-Hydroxyindolessigsäuretest (5-HIAA) (Ramage et al., 2005). Chromogranin A wird von allen Zellen produziert, die sich aus der Neuralleiste ableiten. Seine Funktion ist nicht bekannt, es wird aber in großen Mengen von neuroendokrinen Tumorzellen produziert (Giovanella et al., 1999; Tomassetti et al., 2001). 5-HIAA ist das Abbauprodukt von Serotonin und kann bei Karzinoiden erhöht sein. Es wird im Urin nachgewiesen.

Weiterhin empfehlen die Leitlinien, die zur Tumorverdachtsdiagnose passenden Blutuntersuchungen durchzuführen. Hierzu können zählen: Parathormon, Kalzium, Calcitonin, Prolaktin, α-Fetoprotein, CEA, β-HCG oder Pankreatisches Polypeptid. Man muss aber beachten, dass die Hormonproduktion eines NET auch pulsativ erfolgen kann, oder, falls der NET seine Hormone in den Pfortaderkreislauf drainiert, sie entsprechend in der Leber inaktiviert werden können. Somit darf ein negativer Hormontest nicht zu einem Ausschluss der Verdachtsdiagnose führen. Bei einer Tumormarkerbestimmung muss ebenfalls bedacht werden, dass die Marker nicht zwingend erhöht sein müssen. Bedeutung erlangen die Tumormarker insbesondere bei der Verlaufskontrolle der Erkrankung. Ein relativ sicheres Diagnostikum stellen Provokationsteste dar. Ein Beispiel stellt der Pentagastrintest zum Nachweis eines medullären Schilddrüsenkarzinoms dar. Bei der Durchführung wird Pentagastrin gewichtsadaptiert intravenös appliziert. Blutproben zur Bestimmung des Serum-Kalzitoninspiegels erfolgen nach 1,2,5 und 10 Minuten. Ein erhöhter Kalzitoninwert gilt als hoch verdächtig für das Vorliegen eines medullären Schilddrüsenkarzinoms (Hanks, 2004).

Bei klinischem Verdacht auf ein Insulinom wird ein "Fastentest" unter stationären Bedingungen durchgeführt. Engmaschig werden Insulin, Glukose, C-Peptid und Proinsulin bestimmt. Bei Insulinompatienten kommt es durch die autonome Insulinproduktion des Tumors nicht zu einer physiologischen Insulinsuppression bei Hypoglykämie (<45mg/dl). Insulin, C-Peptid sowie Proinsulin sind gegenüber einem Gesunden erhöht. Innerhalb von 24h fällt dieser Test bei zwei Dritteln, innerhalb von 48h bei fast allen Insulinompatienten positiv aus. Der Fastentest muss allerdings abgebrochen werden, wenn die Hypoglykämie symptomatisch wird. Differentialdiagnostisch muss man an Hypoglykämie facitia (mit allerdings erniedrigtem C-Peptid) denken.

## 1.1.3 Lokalisationsdiagnostik gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren mit Fokus auf Insulinomen

Es wird ein multimodaler Ansatz zur Lokalisationsdiagnostik des Primärtumors empfohlen (Ramage et al., 2005). Dieser kann transabdominellen Ultraschall, endoskopischen Ultraschall, CT, MRT, die Angiographie mit Calciumstimulation und die Somatostatinrezeptorszintigraphie umfassen. Zur Metastasensuche und zur Verlaufskontrolle wird die Somatostatinrezeptors-zintigraphie empfohlen, wobei für metastasierte Insulinome zu sehr wenig Daten vorhanden sind. Die Tabelle 1.1. zeigt die unterschiedlichen Sensitivitäten der bildgebenden diagnostischen Methoden. Es fällt auf, dass nichtinvasive Methoden beim Insulinom eine deutlich schlechtere Sensitivität als für den Patienten belastende Methoden aufweisen.

|                               | Sensitivität (%) |           |           |
|-------------------------------|------------------|-----------|-----------|
| Lokalisationsmethode          | Karzinoid        | Gastrinom | Insulinom |
| transabdomineller Ultraschall | 46               | 23        | 27        |
| endoskopischer Ultraschall    | 80               | 90-100    | 88        |
| CT                            | 64               | 38-75     | 30        |
| MRT                           | 56               | 22-90     | 10        |
| Angio & Ca-Stimulation        | *                | 93        | 91        |
| SRS                           | 80               | 72        | 25        |

Tabelle 1.1: Sensitivität unterschiedlicher Bildgebender diagnostischer Methoden zurLokalisation von Primärtumoren verschiedener neuroendokriner Tumoren (modifiziertnach Ramage et al., 2005)

Erläuterung: **CT** = Computertomographie, **MRT** = Magnetresonanz-tomographie, **SRS** = Somatostatinrezeptorszintigraphie, **Angio & Ca-Stimulation** = Angio-graphie mit Kalziumstimulation, \* = keine Daten vorhanden

Der transabdominelle Ultraschall hat wegen der oft sehr kleinen Tumoren nur eine vergleichsweise geringe Sensitivität. Er stellt jedoch neben dem MRT und dem CT eine günstige und nichtinvasive Standarddiagnostik dar. CT und MRT liefern ebenfalls keine zufrieden stellenden Ergebnisse in der präoperativen Lokalisationsdiagnostik.

Verfahren mit hoher Sensitivität zeichnen sich durch eine höhere Belastung für den Patienten aus. Kann et al. (2005) beschrieben den endoskopischen Ultraschall als beste Möglichkeit Insulinome nachzuweisen. Sie wiesen aber auch darauf hin, dass diese Methode sehr von der Erfahrung des Untersuchers abhängt. Kann et al. (2007) zeigten an einer retrospektiven Studie mit 29 Patienten, dass geringer Body-Mass-Index, weibliches Geschlecht und junges Alter als Risikofaktoren für einen falsch-negativen endoskopischen Ultraschall gesehen werden konnten. Kann (2007) beschrieb auch für Gastrinome den endoskopischen Ultraschall als gut geeignete Nachweismethode.

Chavan et al. (2000) konnten für die Angiographie mit Kalziumstimulation eine Sensitivität von 91% bei Insulinomen nachweisen. Bei dieser Methode wird jede, das Pankreas versorgende Arterie mit Kalziumgluconat infundiert und im Lebervenenblut die Insulinkonzentration bestimmt. Positiv wird der Test dann gewertet, wenn der Basalinsulinwert um 100% ansteigt. So kann aber nur relativ grob eine Region im Pankreas ermittelt werden, die dann intraoperativ genauer exploriert werden muss. Sowohl der endoskopische Ultraschall, als auch die Angiographie mit Kalziumstimulation stellen lokal begrenzte Untersuchungsmethoden dar. Für eine Metastasensuche im extrapankreatischen Gewebe erscheinen sie ungeeignet.

Die Somatostatinrezeptorszintigraphie (SRS) spielt eine zentrale Rolle bei der Detektion von primären gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren, denn viele NET exprimieren Somatostatinrezeptoren. Es gibt fünf Rezeptortypen, von denen die Subtypen 2 und 5 durch eine SRS entdeckt werden können. Allerdings eignet sich die SRS nicht gut für die Auffindung von Insulinomen, da diese nur in ca. 50% der Fälle den Somatostatinrezeptor Typ 2 exprimieren (Reubi et al., 1987; Krenning et al., 1993; Termanini et al., 1997; Lebtahi et al., 1997).

Die SRS wird zu den Peptidszintigraphien gezählt. Hierbei fungieren radioaktiv markierte Peptide als Rezeptorliganden. Die Peptide reichern sich spezifisch dort im Organismus an, wo die Rezeptoren exprimiert werden. Auf Grund ihrer Emission von Gamma-Strahlung können solche Bereiche dann mit einer speziellen Gamma-Kamera abgebildet werden. Bei der in Form eines kommerziellen Kits erhältlichen Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (Octreoscan) wird DTPA-D-Phe1-Octreotid mit <sup>111</sup>Indium markiert. Ein Vorteil ist, dass die Halbwertszeit von <sup>111</sup>Indium 2,8 Tage beträgt und somit Aufnahmen nach 24h möglich sind, die sich durch eine geringere Hintergrundaktivität auszeichnen. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass die Aktivität überwiegend renal und nur gering hepatobiliär ausgeschieden wird, und somit Aussagen über den Oberbauch gut möglich sind (Krenning et al., 1992; de Jong et al., 1993).

## 1.1.4 Therapieoptionen gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren

Für belastbare Patienten mit einem kleinen solitären Primärtumor stellt die chirurgische Entfernung des Tumormaterials die einzige potentiell kurative therapeutische Option dar (Rothmund & Kisker, 1994). Rothmund et al. (1990) zeigten, dass benigne Insulinome zu einem sehr hohen Prozentsatz durch chirurgische Therapie erfolgreich behandelt werden können. Fendrich et al. (2007) zeigten, dass eine Operation auch bei metastasierten neuroendokrinen Pankreastumoren die Überlebenszeit verlängern kann.

Eine symptomatische Behandlung ist bei vielen Tumoren möglich. So können zum Beispiel Somatostatin-Analoga verwendet werden. Somatostatin ist ein Hormon, welches die Freisetzung vieler Hormone im Gastrointestinaltrakt hemmt. Somatostatinlangzeitanaloga, die alle zwei bis vier Wochen gegeben werden müssen, können die Lebensqualität von Patienten entscheidend verbessern (Ruszniewski et al., 1996; Tomassetti et al., 2000; Garland et al., 2003).

Weitere Therapieoptionen für nicht-operable Tumoren stellen Chemotherapie, Radioablationstherapie und Radionuklidtherapie dar. Die Ansprechrate auf eine Chemotherapie hängt zum Großteil vom Tumortyp und seiner Differenzierung ab. Hohe Ansprechraten unter Cisplatin und Etoposide, wurden bei schlecht differenzierten und anaplastischen NETs beschrieben (Moertel et al., 1992; Mitry et al., 1999). Allerdings ist die Rolle der Chemotherapie bei der Behandlung von NET noch als unsicher zu bezeichnen. Die Radioablationstherapie kann transkutan oder laparoskopisch durchgeführt werden. Der transkutane Ansatz ist preislich günstig und nicht invasiv. Beim lapraskopischen Vorgehen kann aber intraoperativ endoskopisch nach kleineren Tumoren gesucht werden. Ein erfahrener Untersucher ist allerdings erforderlich. Die Radioablation kann dazu beitragen die Tumormasse und/oder die Hormonproduktion zu verringern. Randomisierte Studien zur Wirksamkeit fehlen allerdings. Die Radionuklidtherapie kann dann eingesetzt werden, wenn bei einem bildgebenden Verfahren der Tumor einen Uptake verzeichnet. Das bedeutet, dass der NET den Tracer aufnimmt. Vom Prinzip her wird das bildgebende Gamma-Strahlen emittierende Nuklid (z.B. <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I) durch ein therapeutisches Beta-Strahlen emittierendes Nuklid (z.B. <sup>90</sup>Y, <sup>131</sup>I) ersetzt. So ist <sup>131</sup>I-MIBG für die Therapie zugelassen, DOTATOC und DOTATATE befinden sich mit <sup>90</sup>Y und <sup>177</sup>Lu in der klinischen Erprobungsphase (Forrer et al., 2004; Frilling et al., 2006).

## 1.2 GLP-1

## 1.2.1 Inkretin-Konzept

Schon 1906 postulierten Moore et al. das Vorhandensein von Hormonen, die das Pankreas regulieren. In den 60er Jahren wurde festgestellt, dass die Insulinantwort auf eine orale Glucosegabe höher und schneller war als die Antwort auf eine parenterale Gabe (McIntyre et al., 1964; Perley et al., 1967). Creuzfeld (1979) definierte ein Inkretin als ein Hormon, dass im Gastrointestinaltrakt gebildet wird, durch orale Nahrungsaufnahme freigesetzt wird und die Glukose-induzierte Insulinsekretion der pankreatischen B-Zellen verstärkt. Zunächst konnte das GIP (gastrisch inhibitorisches Peptid) als Inkretin identifiziert werden. Heute gilt das 1986 entdeckte GLP-1 (glucagon-like-peptid-1) als stärkstes Inkretin (Göke et al., 1991; Fehmann et al., 1995). Mosjov et al. (1987) zeigten, dass man eine 100fach niedrigere GLP-1 Menge im Vergleich zum GIP braucht, um eine ähnliche Insulinsekretion zu erhalten.

## 1.2.2 Synthese des GLP-1

Lopez et al. (1984) zeigten in einer statistischen Genanalyse, dass GLP-1 ein hoch konserviertes Peptid ist. Das deutet auf eine immense physiologische Rolle des Peptids in der Evolution hin. GLP-1 konnte sowohl im Menschen, als auch in verschiedenen Tieren nachgewiesen werden. So finden sich GLP-1-produzierende Zellen mit abnehmender Dichte in der Ratte, im Schwein und im Menschen (Eissele et al., 1992). Das Glucagon-like-Peptid-1 ist ein Peptidhormon und zeigt eine große strukturelle Analogie mit dem Hormon Glukagon (ein Peptid aus 29 Aminosäuren, welches als Gegenspieler des Insulins den Kohlenhydrat-, und Lipidstoffwechsel beeinflusst). In Tabelle 1.2. werden die Aminosäuresequenzen von GLP-1(7-36)amid und Glukagon vergleichend dargestellt. Das GIP ist ebenfalls mit aufgeführt.

| GLP-1(7-36) | 6) HAEGTFTSD V SSYLEGQAA K EFIAWVKGR |             |            |               |        |
|-------------|--------------------------------------|-------------|------------|---------------|--------|
| Position    | 7                                    | 17          | 27         |               |        |
| Glukagon    | ON HSQGYFSDT S KTLDSRRAQ D FVQWLMNT  |             |            |               |        |
| Position    | 1                                    | 10          | 20         | 30            |        |
| GIP         | TAEGYFISDT                           | S IAMDKIHQQ | D FVWNWLLA | Q K GKKNDWKHN | I I TQ |
| Position    | 1                                    | 10          | 20         | 30            | 40     |

Tabelle 1.2: Aminosäuresequenzen von GLP-1(7-36)amid, Glukagon und GIPAbkürzungen: GLP-1(7-36) = "glucagon-like-pepdide(7-36)"; GIP = "gastric inhibitory peptide";Anmerkung:die homologen Aminosäuren (mindestens zweier) Peptide sind fett gedruckt

Die Hormone GLP-1(7-36) und Glukagon entstehen aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül – dem Präeproglukagon. Ausgangspunkt der GLP-1 Synthese stellt somit das Präproglukagon-Gen da (Lopez et al., 1983; Bell et al., 1986). Das Gen besteht aus sechs Exons und fünf Introns und liegt auf dem langen Arm des Chromosom 2 (White et al., 1986). Aus dessen Transkript entsteht das 179 Aminosäuren lange Präeproglukagon, welches in den A-Zellen des Pankreas und den L-Zellen des Darms synthetisiert wird. Im Darm kommen die L-Zellen vermehrt im distalen lleum und Colon vor, die höchste Zelldichte findet sich im Rektum (Eissele et al., 1992). Im Gehirn der Ratte wurde die Präprohormonbildung im Augapfel, Nucleus tractus solitarius, dorsalem und ventralem Rückenmark beschrieben (Merchenthaler et al., 1999).

In allen Zellen entsteht zunächst durch Abspaltung des Signalpeptids das Proglukagon, welches 160 Aminosäuren aufweist (Bell et al., 1983). Durch intrazelluläres Processing entsteht im nächsten Schritt das 69 Aminosäuren lange Glicentin und das 86 Aminosäuren lange major proglucagon fragment (MPGF) (Patzeld & Schug, 1981, Ørskov, 1991). In den L-Zellen des Darms aus Glicentin das Oxyntomodulin hergestellt. Aus MPFG entstehen wird GLP-1, GLP-2 und ein "inverting peptide" (IP-2). In den A-Zellen des Pankreas entsteht aus Glicentin das GRPP (Glicentin related pancreatic peptide), Glukagon, und ein "inverting peptide" (IP-1). Im Gegensatz zum Darm wird das MPGF im Pankreas nicht weiter prozessiert (Thim & Moody, 1981; Bataille et al., 1982; Mojsov et al., 1986; Ørskov et al., 1987). Mosjov et al. (1986) wiesen nach, dass die Preproglukagonhormon-mRNA in Pankreas und Darm dieselbe Daraus folgerten sie, dass der Grund für die unterschiedliche ist.

Hormonproduktion das unterschiedliche posttranslationale Processing ist. Rouille et al. (1994, 1995) zeigten, dass der Grund hierfür im gewebespezifischen Besatz mit den Subtilisin-like-Prohormonconvertasen 2 und 3 (PC2 und PC3) zu sehen ist. So vermittelt die PC 2 ein A-Zell spezifisches Hormonmuster mit Glukagonproduktion. Die PC 3 produziert ein L-Zell spezifisches Hormonmuster mit GLP-1-Produktion. Im Gehirn zeigten Yoshimoto et al. (1989), dass eine Prozessierung vom Präeproglukagon ähnlich wie in den L-Zellen stattfindet.

Das entstandene GLP-1(1-37) ist biologisch nur gering aktiv (Ørskov et al., 1989) und wird durch weitere posttranslationale Modifikationen in aktive Metaboliten umgewandelt. Die ersten sechs N-terminalen Aminosäuren werden abgespalten, es entsteht GLP-1(7-37). Durch Abspaltung der letzten C-terminalen Aminosäure und zusätzlicher Amidierung des C-terminalen Endes entsteht GLP-1(7-36)-amid (Holst et al., 1987; Kreymann et al., 1988; Ørskov et al., 1989). Alle besprochen Syntheseschritte sind in Abbildung 1.1 schematisch zusammengefasst.





Ørskov et al. (1993) wiesen nach, dass GLP-1(7-39)-amid gegenüber GLP-1(7-37) keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Effekte auf den endokrinen Pankreas und den Stoffwechsel aufweist. Jedoch liegen 80% des GLP-1 in der amidierten Form vor (Ørskov et al., 1994).

Im Gegensatz dazu scheint die N-terminale Aminosäure Histidin wichtig für die biologische Aktivität des GLP-1(7-37) zu sein. Sowohl eine Entfernung der Aminosäure (GLP-1(8-37) als auch eine "Maskierung" (GLP-1(6-37) machen das Peptid biologisch fast vollständig inaktiv (Suzuki et al., 1989; Gefel et al., 1990).

### 1.2.3 Der GLP-1-Rezeptor

Das Peptidhormon GLP-1 vermittelt seine Wirkung über einen spezifischen Rezeptor. Der GLP-1-Rezeptor (GLP-1-R) ist ein aus 463 Aminosäuren bestehender 7-Transmembran Rezeptor (Thorens, 1992; Dillon et al., 1993; Graziano et al., 1993).

An der intrazellulären Seite ist der Rezeptor an ein heterotrimeres G-Protein vom G<sub>s</sub>-Typ gekoppelt. Die Bindung von GLP-1 an den Rezeptor bewirkt über eine Konformitätsänderung den Austausch von GDP durch GTP am G-Protein. Hierdurch wird die Alpha Einheit des G<sub>s</sub>-Proteins abgespalten und bewirkt einen intrazellulären cAMP-Anstieg. Durch diesen Anstieg wird eine gewebsspezifische Antwort hervorgerufen (Fehmann & Habener, 1991; Wheeler et al., 1993; Fehmann et al., 1994). So kommt es in den B-Zellen des Pankreas über den cAMP-Anstieg letztlich zu einem intrazellulären Anstieg von Kalziumionen. Der Anstieg vermittelt eine Exozytose von Insulingranula (Lu et al., 1993; Yada et al., 1993).

Nach Ligandenbindung wird der Rezeptor-Ligand-Komplex in die Zelle internalisiert. Intrazellulär erfolgt die Dissoziation des Liganden vom Rezeptor. Der Ligand wird in den Lysosomen abgebaut (Göke et al., 1989; Widmann et al., 1995). Nachgewiesen wurde der Rezeptor an den B-Zellen und D-Zellen des endokrinen Pankreas (Fehmann & Habener, 1991; Thorens, 1993; Wei et al., 1995). An den A-Zellen des Pankreas wurde das Vorkommen des GLP-1-Rezeptors kontrovers diskutiert (Fehmann et al., 1991; Moens et al., 1996; Heller et al., 1997).

Auch an anderen Geweben wurde der GLP-1-Rezeptor nachgewiesen. So wird seine Existenz an der Lunge, dem Herzen, im ZNS und im Fettgewebe beschrieben (Shimizu et. al, 1987; Richter et al., 1990; Uttenthal et al., 1992; Merida et al., 1993; Richter et al., 1993; Campos et al., 1994; Göke et al., 1995; Wei et al., 1995; Bullock et al., 1996). Merchentaler et al. (1999) wiesen die GLP-1-mRNA an vielen Stellen im Gehirn der Ratte nach. Die fast ubiquitäre Verbreitung des GLP-1-R lässt eine Funktion von GLP-1 als Neurotransmitter vermuten. Spezifische Bindungsstellen für GLP-1 an Leber und Darm wurden

noch nicht nachgewiesen (Göke & Conolon, 1988; Göke et al., 1991). Hansen et al. (1988), Schmidtler et al. (1994), sowie Uttenthal & Blázquez (1990) berichten eine spezifische Bindung von GLP-1 am Magen, während Ørskov et al. (1991) keine Bindung feststellen konnten.

## 1.2.4 Stoffwechsel und GLP-1-Analoga

GLP-1 wird auf verschiedenen Wegen im Körper inaktiviert. Zum einen erfolgt eine Elimination aus dem Kreislauf durch Leber und Niere, wobei der Niere und insbesondere der glomerulären Filtration und dem tubulärem Katabolismus die Hauptwirkung zuzuschreiben ist. Ørskov et al. (1992) fanden bei urämischen Patienten höhere GLP-1-Spiegel als in einer Kontrollgruppe. Diese Daten legen nahe, dass GLP-1 renal eleminiert wird. Ruiz-Grande et al. (1993) fanden, dass GLP-1 zusätzlich durch bürsensaumständige Enzyme in den proximalen Nierentubuli degradiert wird. Zusätzlich wird das bioaktive GLP-1 im Plasma degradiert, hier zeigt sich die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4) hauptverantwortlich für den Abbau. Decon et al. (1995) konnten herausfinden, das GLP-1 in vitro mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten durch die DPP-4 abgebaut wird. In vivo beläuft sich diese Zeit auf fünf bis sechs Minuten (Ørskov et al., 1993). Die DPP-4 spaltet die beiden N-terminalen Aminosäuren Histidin und Alanin ab, das entstehende GLP-1(9-37) bzw. GLP-1(9-36)amid weist keine biologische Aktivität mehr auf (Mentlein et al., 1993). Den Abbau des GLP-1 durch andere Enzyme untersuchten Hupe-Sodmann et al. (1995, 1997), sie beschrieben eine Degradation durch die neurale Endopetidase 24.11. und die Aminopeptidase N.

Die beschriebene extrem kurze Halbwertszeit von GLP-1 in vivo stellt ein Problem bei einer möglichen klinischen Anwendung dar (s.a. Kapitel 1.2.6.) Ein Ansatz die Bioverfügbarkeit von GLP-1 zu erhöhen, ist die Blockierung der DPP-4 mit Hilfe eines Inhibitors (Pederson et al., 1998; Pauly et al., 1999). Ein anderer Ansatz ist, GLP-1 Analoga zu suchen oder zu synthetisieren, die eine längere Plasmahalbwertszeit aufweisen. Eng et al. (1990) isolierten Exendin-3 aus dem Sekret von Heloderma horridum (einer Krustenechsenart); 1992 isolierten sie Exendin-4 aus dem Gift von Heloderma suspectum (einer verwandten Krustenechsenart). Exendin-3 und Exendin-4 sind GLP-1 Agonisten und unterscheiden sich untereinander nur an Position zwei und drei. Tabelle 1.3 zeigt die Aminosäuresequenzen von GLP-1(7-36)amid, Exendin-3, Exendin-4 und Exendin-4(9-39), einem Exendin-4-Fragment.

| GLP-1(7-36)     | HAEGTFTSD         | V SSYLEGQAA | K EFIAWVKG            | ۲                    |
|-----------------|-------------------|-------------|-----------------------|----------------------|
| Position        | 7                 | 17          | 27                    |                      |
| Exendin-3       | HSDGTFTSD         | L SKQMEEEAV | R L <b>FIEWL</b> KN   | G PSSGAPPPS          |
| Position        | 1                 | 10          | 20                    | 30                   |
| Exendin-4       | HGE <b>GTFTSD</b> | L SKQMEEEAV | R L <b>FIEWL</b> KN   | G PSSGAPPPS          |
| Position        | 1                 | 10          | 20                    | 30                   |
| Exendin-4(9-39) | D                 | L SKQMEEEA  | / R L <b>FIEWL</b> KN | <b>G</b> G PSSGAPPPS |
| Position        | 9                 | 10          | 20                    | 30                   |

Tabelle 1.3: Aminosäuresequenzen von GLP-1(7-36)amid, Exendin-3, Exendin-4,Exendin-4(9-39)Anmerkung: Die homologen Aminosäuren sind fett gedruckt.

Exendin-3 und Exendin-4 lösen einen intrazellulären cAMP-Anstieg aus, erhöht. währenddessen Exendin-4(9-39) den cAMP-Level nicht Da Exendin-4(9-39) in Gegenwart von Exendin-3 oder Exendin-4 den cAMP-Anstieg verhindern kann, gilt es als Rezeptorantagonist (Raufman et al., 1991, Eng et al., 1992, Thorens et al., 1993). Auch beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass Exendin-4(9-39) einen potenten Antagonisten des GLP-1 Rezeptors darstellt. Es reduziert den Inkretineffekt und stimuliert die Glukagonfreisetzung (Schirra, 1998; Edwards, 1999). Hupe-Sodmann et al. (1997) untersuchten Exendin-4 und GLP(7-36) hinsichtlich der Plasmastabitlität und beschrieben, dass sich Exendin-4 wesentlich stabiler gegenüber der DPP-4 verhält. Neben den natürlichen Analoga wurden zahlreiche synthetische Analoga hergestellt und untersucht. Sing et al. (1994) synthetisierten ein modifiziertes Exendin-4, dessen C-terminales Serin durch ein Tyrosin ersetzt wurde. (Y39)Exendin-4 hat eine mit dem Exendin-4 vergleichbare biologische Aktivität und kann mit I<sup>123</sup> oder I<sup>125</sup> radioaktiv markiert werden. Xiao et al. (2001) untersuchten N-terminal und mittelkettig modifizierte Analoga und beschrieben Vorteile in vivo und in vitro gegenüber GLP1(7-36)amid. Ritzel et al. (1998) untersuchten das (Ser8)GLP-1(7-36)amid, das an der Stelle acht einen Ersatz von Alanin durch Serin aufweist. Durch diese Modifikation wird es ebenfalls nicht bedeutsam von der DPP-4 abgebaut.

## 1.2.5 Physiologische Effekte des GLP-1

Die orale Zufuhr von Glukose stellt den stärksten Stimulus für die GLP-1 Freisetzung dar. Der Plasmaspiegel kann schnell auf das 6-8fache des Basalwertes ansteigen. Galaktose und Aminosäuren können ebenfalls eine GLP-1-Sekretion bewirken. Die intravenöse Applikation von Glukose löst hingegen keinen GLP-1-Anstieg aus (Elliot et al., 1993; Herrmann et al., 1995). Der Hauptwirkort des GLP-1 ist das endokrine Pankreas, aber auch in anderen Geweben wurde der GLP-1-Rezeptor gefunden und vermittelt dort extrapankreatische Wirkungen. Tabelle 1.4 fasst die Hauptwirkungen des GLP-1 systematisch zusammen. Sie werden in den folgenden Unterkapiteln näher besprochen.

| Wirkort        | Wirkung  |
|----------------|--|
| Pankreas       | Insulinsekretion ↑                                       |
|                | <ul> <li>Glukagonsekretion ↓</li> </ul>                  |
|                | <ul> <li>Somatostatinsekretion ↑</li> </ul>              |
| Magen          | <ul> <li>Säurebildung ↓</li> </ul>                       |
|                | <ul> <li>Magenentleerung verlangsamt</li> </ul>          |
| ZNS            | <ul> <li>Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme ↓</li> </ul> |
| Fettgewebe     | <ul> <li>Lipogenese ↑</li> </ul>                         |
| Muskel         | <ul> <li>Glycogensynthese ↑</li> </ul>                   |
| Herz/Kreislauf | Blutdruck ↑  |
|                | <ul> <li>Herzfrequenz ↑</li> </ul>                       |
| Lunge          | Schleimsekretion ↑                                       |
|                | Relaxation der glatten Muskulatur                        |

 Tabelle 1.4: Zusammenfassung der physiologischen Effekte des GLP-1

#### 1.2.5.1 Pankreas

Die Stimulation der Insulinausschüttung der B-Zellen stellt die Hauptwirkung von GLP-1 am endokrinen Pankreas dar (Fehmann et al., 1995, Baggio et al., 2000). Diese Wirkung ist allerdings vom Blutzuckerspiegel abhängig: Die Insulinausschüttung wird nur bei erhöhten Blutzuckerspiegeln vermittelt (Shima et al., 1988; Göke et al., 1993). GLP-1 wirkt auf unterschiedliche Arten auch langfristig. So wird zum einen die Genexpression von Insulin gesteigert (Drucker et al., 1987; Bode et al., 1999; Skoglund et al., 2000). Zum anderen wird die Proliferation und die Differenzierung von B-Zellen gesteigert und ein Schutz vor Apoptose für die B-Zellen erzeugt (Holz. et al., 1993; Hui et al., 2005). An den D-Zellen des endokrinen Pankreas vermittelt GLP-1 blutzuckerunabhängig eine Erhöhung der Somatostatinsekretion (Fehmann et al., 1995; Heller at al., 1995). GLP-1 hemmt auch die Glucagonfreisetzung aus den A-Zellen (Kreymann et al., 1987; Komatsu et al., 1989; Kawai et al., 1989; Matsumura et al., 1992). Dieser hemmende Effekt von GLP-1 auf die A-Zellen des Pankreas konnte bisher nicht geklärt werden. Das Vorkommen des GLP-1-Rezeptors auf den A-Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (s.a. Kapitel 1.2.3). Ob GLP-1 Einfluss auf das exokrine Pankreas nimmt, ist bisher nicht bekannt (Fehmann et al., 1990, Göke et al., 1991).

#### 1.2.5.2 Magen

GLP-1 hemmt die Pentagastrin-vermittelte Magensäuresekretion. Ferner wird die Magenentleerung verlangsamt und somit der postprandiale Blutzuckeranstieg abgeflacht (Schjoldager et al., 1989; Hansen et al., 1988; O'Halloran et al., 1990; Göke et al., 1991; Ørskov et al., 1992; Wettergren et al., 1993; Nauck et al., 1997).

#### 1.2.5.3 ZNS

Die mRNA für GLP-1-Rezeptoren kommt fast ubiquitär im ZNS vor (s.a. Kapitel 1.2.3). Kastin et al. (2002) fanden, dass peripheres GLP-1 jedoch auch per Diffusion durch die Blut-Hirnschranke in das Gehirn von Ratten gelangen kann. Am Hypothalamus hat GLP-1 eine Bedeutung bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. Bei Ratten führte eine intracerebroventrikuläre Gabe von GLP-1 zu einer Reduktion des Fress- und Trinkverhaltens (Tang-Christensen et al., 1996; Turton et al., 1996). Gutzwiller et al. (1999) konnten einen solchen Effekt von GLP-1 auf das Nahrungsverhalten des Menschen bestätigen.

#### 1.2.5.4 Fettgewebe, Muskulatur

Anabole Wirkungen des GLP-1 konnten in der Peripherie nachgewiesen werden. So kommt es im Fettgewebe zur Lipogenese und in der Muskulatur zur Glykogensynthese. Zusätzliche wird die Konzentration an freien Fettsäuren deutlich gesenkt (Ruiz-Grande et al., 1992; Ørskov et al., 1993; Villanueva-Penacarrillo et al., 1994; Perea et al., 1997; Sandhu et al., 1999; Luque et al., 2002 ; Acitores et al., 2004).

#### 1.2.5.5 Herz / Kreislauf

Intravenöse oder intracerebroventriculäre GLP-1-Injektion erhöhte bei Wistar-Ratten die Herzfrequenz und den Blutdruck. Diese Effekte waren katecholaminunabhängig (Barragan et al., 1994, 1996). Am Menschen sind solche Effekte noch nicht nachgewiesen.

### 1.2.5.6 Lunge

Richter et al. (1990, 1993) untersuchten die Effekte von GLP-1 auf Lungengewebe. GLP-1 bewirkt hier eine Zunahme der Mukusproduktion durch das respiratorische Epithel und eine Relaxation der glatten Muskulatur der Pulmonalarterien.

#### 1.2.6 GLP-1 als Medikament bei Diabetes Mellitus Typ 2

Die im Kapitel 1.2.5. beschriebenen Effekte legen nahe, dass das Inkretin GLP-1 in der Behandlung des Diabetes Mellitus Typ 2 wirksam sein kann. Die Stoffwechsellage verbessert sich durch die verstärkte Insulinfreisetzung durch erhöhte Ansprechbarkeit der B-Zellen auf Glukose (Fehmann et al., 1995; Baggio et al., 2000). Zusätzlich führt die Hemmung der Glukagonausschüttung zu einer Hemmung der Glukoneogenese (Kreymann et al., 1987; Ørskov et al., 1988; Komatsu et al., 1989; Kawai et al., 1989; Matsumura et al., 1992; Schirra et al., 1998). Ferner kommt es zu einer verlangsamten Magenentleerung und zu einer Reduzierung des Hungergefühls mit Reduzierung der Nahrungsaufnahme (Schjoldager et al., 1989; Wettergren et al., 1993; Nauck et al., 1997; Gutzwill et al., 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass intravenös oder subkutan zugeführtes GLP-1 in der Lage ist, bei Typ 2-Diabetikern den Glukosespiegel signifikant zu senken (Rachmann et al., 1997; Nauck et al., 1998; Todd et al., 1998). Ein großer Vorteil der Behandlung des Diabetes Mellitus Typ 2 mit GLP-1 stellt die Glukoseabhängigkeit der GLP-1-Wirkung dar. Ørskov et al. (1993) zeigten, dass selbst eine kontinuierliche supraphysiologische Zufuhr von GLP-1 keine Hypoglykämien verursacht.

Ein Problem der Behandlung des Diabetes Mellitus Typ 2 mit GLP-1 stellt die geringe Halbwertszeit des GLP-1 in vivo dar, da es durch die Dipeptidylpedidase IV rasch degradiert wird (s.a. Kapitel 1.3). Eine Langzeitinfusion über einen Venenverweil-katheter ist nicht praktikabel. Subkutane Injektionen müssten zwei-stündlich erfolgen, um das therapeutische Potential von GLP-1 auszuschöpfen (Nauck et al., 1996). Um diesen Anwendungsproblemen zu entkommen, wurden zwei Wirkstoffklassen erforscht: Erstens GLP-1-Analoga, die gegenüber einer Degradation stabiler sind und zweitens Hemmstoffe der Dipeptidylpedidase IV (Ahren, 2003).

In Europa ist seit November 2006 das natürliche GLP-1 Analogon Exendin-4 als "add-on" Therapie mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen zugelassen (Byetta<sup>®</sup>, Lilly). In Deutschland ist das Präparat seit dem 18. April 2007 zugelassen. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass mit einer zweimal täglichen subkutanen Applikation der HBA<sub>1c</sub>-Wert um 1% gesenkt werden kann.

Zusätzlich führt das Medikament zu einer prognostisch günstigen Reduktion des Körpergewichts, innerhalb eines halben Jahres um ca. 3kg, nach zwei Jahren um ca. 6kg. Die Hypoglykämie tritt in Kombination mit Metformin nicht auf. Sehr wohl können Patienten über gastrointestinale Beschwerden klagen, die aber selten zum Therapieabbruch führen (Zander et al., 2002; Nauck & Meier, 2005; Gallwitz, 2005a,b). Im Oktober 2007 wurde allerdings von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) berichtet, dass im Zusammenhang mit Byetta<sup>®</sup> 30 Fälle einer akuten Pankreatitis dokumentiert wurden. Der genaue Zusammenhang bleibt jedoch unklar, denn bei 27 der 30 Patienten bestünden auch andere Möglichkeiten für die Ursache einer Pankreatitis. Trotzdem wurde die Pankreatitis von der Herstellerfirma in die Liste der Risiken und Nebenwirkungen übernommen.

Derzeit befindet sich das künstliche GLP-1-Analogon Liraglutide in Phase drei der Arzneimitteltestung. Es handelt sich um nur minimal verändertes GLP-1, an das eine Fettsäure angehängt wurde. Dadurch wird das Peptid lipophil und kann ein Depot im subkutanen Fettgewebe bilden. Das führt zu der Möglichkeit der einmal täglichen Injektion (Feinglos et al., 2005). Beim Exenadine LAR (long-acting release) wurde die Galenik so weit verbessert, dass eine einmal wöchentliche Injektion ausreichen sollte, um den HBA<sub>1c</sub> und das Gewicht signifikant zu senken (Kim et al., 2007). Als erster Dipeptidylpeptidase IV Inhibitor wurde das Sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>, Merck & Co.) zugelassen und ein weiteres, das Vildagliptin (Galvus<sup>®</sup>, Novartis) steht vor der Zulassung (Drucker & Nauck, 2006).

Einen weiteren Ansatz zur Diabetestherapie stellt die Möglichkeit dar, den endogenen GLP-1 "Pool", der in den L-Zellen des tieferen Ileums und Kolons vorhanden ist, zu aktivieren. Nauck et al. (1997) untersuchten diese Möglichkeit, indem sie Alpha-Glukosidase-Hemmer benutzen. Durch die Hemmung der membranständigen Alpha-Glukosidase erreichen Nahrungsbestandteile vermehrt die tieferen Darmabschnitte und führen so zur Freisetzung von GLP-1 aus den L-Zellen. Prostaglandin E<sub>2</sub> bewirkt ebenfalls eine Erhöhung der GLP-1-Ausschüttung (Nauck et al., 1997).

## **1.3 Fragestellung und experimentelle Konzeption**

In der Einführung wurde auf neuroendokrine Tumoren und das Inkretin GLP-1 eingegangen. Es wurde erläutert, dass Insulinome mittels der klassischen Somatostatinrezeptorszintigraphie aufgrund der mangelhaften Ausstattung mit Rezeptoren nur unzureichend detektiert werden können. Insulinome exprimieren aber in über 90% der Fälle GLP-1 Rezeptoren.

In dieser Arbeit sollen unterschiedliche radiometallmarkierte GLP-1 Analoga in vitro und in vivo untersucht werden. Hierzu zählen drei DTPA-Peptide sowie ein HYNIC-Peptid, wobei letzteres mit unterschiedlichen Coliganden markiert wird (Tabelle 1.5). Es werden radiometallmarkierte Peptide verwendet, da diese ein besseres Uptake-Ergebnis versprechen als radiojodierte.

| Peptid                 | Aminosäuresequenz   |
|------------------------|---|
| Exendin-3K40AhxDTPA    | HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSK B (6-Aminocapronsäure an K40; DTPA an dieser Aminosäure)  |
| Exendin-4K40DTPA       | HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSK B (DTPA an K40)   |
| Exendin-4(9-39)AhxDTPA | DL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSK B (6-Aminocapronsäure an K40; DTPA an dieser Aminosäure)          |
| Exendin-4K40AhxHYNIC   | HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSK B (6-Aminocapronsäure an K40; HYNIC an dieser Aminosäure) |

Tabelle 1.5 Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide

Im Einzelnen sollen folgende Untersuchungen an GLP-1-Rezeptortransfizierten CHL-Zellen und an einem Maus-Tumormodel durchgeführt werden:

- in vitro Internalisierungsstudien
  - o der <sup>111</sup>In-DTPA-Peptide
  - des <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Peptids mit den Coliganden EDDA und/oder Tricin
- in vitro Externalisierungsstudien
  - der <sup>111</sup>In-DTPA-Peptide
  - des <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Peptids mit den Coliganden EDDA und/oder Tricin
- in vitro Rezeptorbindungsstudien der <sup>111</sup>In-DTPA-Peptide
- in vivo Biodistributionstudien der <sup>111</sup>In-DTPA-Peptide

Bei den Internalisierungsversuchen wird davon ausgegangen, dass sich ein gutes Radiopharmakon sowohl schnell als auch hochgradig in den Zellen anreichern sollte. Eine Externalisierung sollte hingegen nur langsam von statten gehen, da ein Radiopharmakon idealerweise lange in der Zelle nachweisbar sein sollte. Bei den Bindungsstudien werden K<sub>d</sub>-Werte im nanomolaren Bereich erwartet: Je geringer ein K<sub>d</sub>-Wert ausfällt, desto besser scheint ein GLP-Analogon im Vergleich zu einem Anderen.

Mit den Bioverteilungsstudien soll das Verhalten der einzelnen Substanzen in Mäusen mit einem induzierten Tumor beobachtet werden. Für einen diagnostischen Einsatz eines idealen Radiopharmakons ist eine hohe Anreicherung im Tumor nötig. Ferner sollte eine geringe Restaktivität in den rezeptornegativen Organen (Milz, Niere, Leber,...) im Körper verbleiben um ein hohes Tumor zu Background Verhältnis zu erreichen.

Die Zielsetzung der Arbeit ist, mittels der erläuterten Kriterien herauszufinden, welche der untersuchten GLP-1-Analoga hinsichtlich ihrer diagnostischen Potenz am aussichtsreichsten sind.

# 2 Material und Methoden

In diesem Teil der Arbeit werden die für die Versuche verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte aufgeführt. Weiterhin werden die Versuche und Methoden beschrieben.

## 2.1 Material

## 2.1.1 Zelllinien

Es wurden zwei unterschiedliche adhärente Zelllinien verwendet. Hierbei handelte es sich zum einen um Zellen, die aus der Lunge des chinesischen Hamsters isoliert wurden (im Folgenden als CHL-Wildtyp Zellen bezeichnet). Zum anderen kamen CHL-Zellen, die von van Eyll et al. (1994) stabil mit einem menschlichem Insulinomzell-GLP-1 Rezeptor transfiziert worden sind (im Folgenden als CHL-GLP-1 positive Zellen bezeichnet) zum Einsatz. Beide Zelllinen wurden uns freundlicherweise von der Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsklinikum Marburg, zur Verfügung gestellt.

## 2.1.2 Zellkultur

Beide Zelllinien werden in 250 ml Flaschen der Firma Greiner Bio One, Frickenhausen, in Kultur gehalten. Als Inkubator dient der HERAcell Inkubator der Firma Kendro Laboratory Products, Hanau. Dieser garantierte eine sterile Atmosphäre, eine Temperatur von 37°C und einen Anteil von 5% CO<sub>2</sub> in der Inkubationsluft. Die verwendeten Kulturmedien sind in Tabelle 2.1. aufgeführt. Für die Arbeit mit den Zellen wurde die Sicherheitswerkbank Herasafe HS 12 der Firma Kendro Laboratory Products, Hanau, verwendet.

| CHL-Wildtyp                        | CHL-GLP-positiv                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| RMPI 1640 Medium mit den Zusätzen: | RMPI 1640 Medium mit den Zusätzen: |
| 10% FCS                            | 10% FCS                            |
| 1% Penicillin/Streptomycin         | 1% Penicillin/Streptomycin         |
| 1% Natriumpyruvat                  | 1% Natriumpyruvat                  |
| 1% Non-Essential-Aminoacids        | 1% Non-Essential-Aminoacids        |
|                                    | 1% Geneticin G418                  |

Tabelle 2.1: Verwendete Kulturmedien

## 2.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Nacktmäuse vom Typ Athymic Nude-Nu/Nu der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borchen. Die Tiere wurden im Alter von 4-5 Wochen geliefert. Diese Mäuse sind Träger einer Mutation im nude-Gen und zeichnen sich durch Haarlosigkeit und eine Thymusaplasie aus. Aufgrund des resultierenden Immundefekts eignen sich diese Tiere für Allo- und Xenotransplantate (Pantelouris, 1968,1973; Povlsen et al., 1973; Gershwin et al., 1975).

Die Haltung der Tiere erfolgte in Standard-Käfigen (Ehret, Emmerdingen) auf GLP Aspen Bedding Streu (Tapvei, Kortteinen, Finnland). Die Mäuse wurden mit dem pelletiertem Standardfutter Altromin 1434 (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum versorgt. Die Belichtung erfolgte 12 Stunden pro Tag. Die Raumtemperatur betrug 26°C, die relative Luftfeuchtigkeit 60%.

## 2.1.4 Verwendete Peptide

Folgende Peptide (alle hergestellt durch die Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg) wurden verwendet:

| Exendin-3K40AhxDTPA       | (M= 4816,3) |
|---------------------------|-------------|
| Exendin-4K40DTPA          | (M= 4687,3) |
| Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA | (M= 3984,0) |
| Exendin-4K40AhxHYNIC      | (M= 4561,3) |

Die Aminosäurestruktur der Exendine ist aus Tabelle 1.4 ersichtlich. Die Strukturformeln der Chelatoren DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) und HYNIC (Hydrazinnikotinsäure) sind in der Abbildung 2.1 dargestellt.



Abbildung 2.1: Strukturformeln von DTPA (a), HYNIC(b)

Die Peptide wurden in lyophilisierter Form geliefert. Für die Versuche wurden Exendin-3-K40AhxDTPA, Exendin-4K40DTPA, Exendin-4K40AhxHynic und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA in 0,5M Natriumacetatpuffer (pH 5,4) gelöst (1mg/1ml) ("Ahx" bezeichnet hier eine 6-Aminocapronsäure, welche als Spacer dient. Diese ist am Lysin (K40) befestigt).

Weiterhin wurde Exendin-4 (M= 4816,6) der Firma Bachem, Biochemica GmbH, Heidelberg, verwendet. Dieses wurde mit 0,5M NaAc-Puffer (pH 5,4) auf eine Konzentration von 10<sup>-6</sup>M verdünnt. Die Lagerung aller Peptide erfolgte bei -20°C.

## 2.1.5 Verwendete Radionuklide

<sup>111</sup>In wurde von der Firma Tyco Healthcare Deutschland GmbH, Neustadt/Donau geliefert. <sup>99m</sup>Tc wurde durch Eluieren eines Molybdän-Generators der Firma Schering Deutschland GmbH, Berlin, gewonnen.

## 2.1.6 Weitere Materialien

Tabelle 2.2, 2.3 und 2.4 zeigen die verwendeten Gebrauchslösungen und Puffer, Chemikalien, Materialien und Geräte. Für die Fertigung von Puffern und Stammlösungen wurde A. bidest benutzt.

| PBS-Stammlösung     | 80g NaCl, 2g KCl, 11,5g Na <sub>2</sub> HPO4, 11g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , |
|---------------------|---|
| (10fach)            | auf 1000ml A.bidest   |
|                     | pH auf 7,4 einstellen   |
| PBS                 | Aus Stammlösung herstellen:   |
| (1fach)             | 1/10 mit A.bidest verdünnen   |
| 0,05M Glycin-Puffer | 0,375g Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ) auf 100ml A.bidest   |
| (pH 2,8-3)          | pH mit HCI einstellen   |
| Reaktionsmedium     | RMPI-Medium mit 1% BSA Zusatz.  |
|                     | z.B. 0,40g BSA auf 40ml RMPI Medium   |
|                     | Bei 37°C inkubieren   |
| MOPS-Triton         | 0,21g Mops MOPS (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> S)                  |
| (pH 7,5)            | auf 50ml A.bidest,  |
|                     | pH mit NaOH auf 7,5 einstellen  |
|                     | 50µl Triton beigeben  |
| 0,5M NaAC-Puffer    | 4,1g Natriumactetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )               |
| (pH 5,4)            | auf 100ml A.bidest  |
|                     | pH mit HCl auf 5,4 einstellen   |
| Bradfordreagenz     | 1:5 verdünnt aus der BIORAD-Stammlösung   |

#### Tabelle 2.2 Gebrauchslösungen und Puffer

| Ammoniumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ) | Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs    |
|---|-------------------------------------|
| BSA (Albumin from bovine serum)                                 | Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs    |
| EDDA  | Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs    |
| (Ethylendiamin-N,N'-diessigsäure)                               |                                     |
| Essigsäure (99%)  | SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, Seelze   |
| FCS (Foetal Bovine Serum)                                       | GIBCO, Paisley (UK)                 |
| Geneticin G418  | PAA Laboratories GmbH, Pasching (A) |

| Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )          | SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH,          |
|--|-------------------------------------|
|  | Steinheim                           |
| Isotone Natrium Chlorid Lsg. 0,9%                                | B. Braun Melsungen AG, Melsungen    |
| MOPS (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> S)          | Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs    |
| (3-morpholinopropanesulfonic acid)                               |                                     |
| Natriumactetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> ) | Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs    |
| Natrium-Pyruvat-Lösung   | PAA Laboratories GmbH, Pasching (A) |
| Non-Essential-Aminoacids-Lösung                                  | PAA Laboratories GmbH, Pasching (A) |
| Penicillin/Streptomycin  | PAA Laboratories GmbH, Pasching (A) |
| (10,000Units/10mg/ml)  |                                     |
| Salzsäure (37/38%)   | Carl Roth GmbH u. Co, Karlsruhe     |
| Triton X 100   | SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH,          |
| (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)                                | Steinheim                           |
| Trypsin/EDTA-Lösung  | PAA Laboratories GmbH, Pasching (A) |

#### Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

| 6-Well-Platte                        | Greiner Bio-One, Frickenhausen      |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| A.dest-Anlage                        | Kobe, Marburg                       |
| Absaugpumpe 4151                     | Eppendorf AG, Hamburg               |
| Binokular-Mikroskop Olympus          | Olympus Deutschland GmbH, Hamburg   |
| LH50 A                               |                                     |
| Bio-rad Protein Assay, Färbelösung   | Firma Biorad, München               |
| C 18 Counter Nuclear Spectrometer    | Berthold Technologies GmbH & Co KG, |
| LB 2040                              | Bad Wildbad                         |
| Cellstar® Pipetten (2,5,10,25,50 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen      |
| Elektrische Präzisionswaage Kern     | Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen   |
| 474                                  |                                     |
| Elektrische Präzisionswaage Kern     | Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen   |
| 770                                  |                                     |
| Falcon Röhrchen (50ml)               | Falcon, Heidelberg                  |
| Falcon Röhrchen 15ml, 50 ml          | Greiner Bio-One, Frickenhausen      |
| Gamma-Counter Cobra III              | Packard Instrument Co. Inc., USA    |
| Hämozytometer                        | Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg |

| Inkubator                                    | Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach     |
|--|-------------------------------------|
| Kanülen 0,45*13mm                            | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg   |
| Magnetrührer Heidolph MR 3001 K              | Heidolph Instruments GmbH & Co KG,  |
|  | Schwabach                           |
| PH-Messgerät Mettler Delta 350               | Mettler Toledo GmbH, Giessen        |
| Photometer Ultrospect 1000                   | Amersham. Pharmacia Biotech,        |
|  | Uppsala, Sweden                     |
| Pipetten 0,1-2µl / 2-20µl / 20-200µl /       | Thermo Labsystems, Egelsbach        |
| 200-1000µl                                   |                                     |
| Pipettenspitzen                              | Thermo Labsystems, Egelsbach        |
| Pipettierhilfe Pipetus-akku®                 | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt   |
| Plastipak, 1ml BD                            | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg   |
| Reaktionsgefäße (1,5ml)                      | Eppendorf AG, Hamburg               |
| Röhrchen (5ml,10ml)                          | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen |
| Spritzen 1,0 ml                              | B. Braun Melsungen AG, Melsungen    |
| Terralin <sup>®</sup> Liquid                 | Schülke & Mayr (S&M), Norderstedt   |
| Vortex (Typ Reax 1)                          | Heidolph Instruments GmbH & Co KG,  |
|  | Schwabach                           |
| Wasserbad Wasserbad WB 14                    | Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach     |
| Zellkulturflasche, 250ml, 75 cm <sup>2</sup> | Greiner Bio-One, Frickenhausen      |

Tabelle 2.4 Geräte und Gebrauchsmaterialien

## 2.2 Methoden

## 2.2.1 Markierung von DTPA-Peptiden mit <sup>111</sup>In

Exendin-3K40AhxDTPA, Exendin-4K40DTPA und Exendin-4(9-39) K40AhxDTPA wurden auf die gleiche Art markiert: In ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde als Reaktionsmedium 50µl frisch angesetzter 0,5M NaAc-Puffer (pH 5,4) hineinpipetiert. Daraufhin wurde 1µl einer 2.2\*10<sup>-4</sup>M Lösung (2.2\*10<sup>-10</sup> mol) des beigemischt. Für Internalisierungsjeweiligen Peptids die und <sup>111</sup>In zugegeben. Für die Externalisierungsversuche wurden 0.37MBg Bindungsstudien wurde 1,11MBq<sup>111</sup>In verwendet. Nach Zugabe der Aktivität wurde der Ansatz gut gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

## 2.2.2 Markierung von Exendin-4K40AhxHYNIC mit <sup>99m</sup>Tc

Exendin-4K40AhxHYNIC wurde mit den Coliganden Tricin ((N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin) und EDDA (Ethylendiamin-N,N'-diessigsäure) auf drei unterschiedliche Arten markiert. Da HYNIC nur eine Bindungsstelle für das Radiometall frei hat, werden auf diese Weise die restlichen Bindungsstellen mit den Coliganen besetzt (s.a. Abbildung 2.2a&b).



Abbildung 2.2a&b: Strukturformeln von Tricin(a) und EDDA(b)

#### 2.2.2.1 EDDA- Markierung

Zunächst wurde 250-300MBq <sup>99m</sup>Technetiumpertechnetat in 400µl physiologische Kochsalzlösung (NaCl) in einem 1,5ml Eppendorfgefäß vorgelegt. Zu diesem Ansatz wurde 0,5ml EDDA-Lösung (10mg EDDA in
1ml A.dest) und 5 $\mu$ l einer 1,1\*10<sup>-3</sup>M (5,5\*10<sup>-9</sup>mol) Lösung mit Exendin-4K40AhxHYNIC hinzugegeben. Die Reaktion wurde dann mit der Zugabe von 7,5 $\mu$ l einer frisch präparierten SnCl<sub>2</sub> – Lösung (8,5mg SnCl<sub>2</sub> in 10ml 1M HCl) gestartet. Nun erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei 90°C im Wasserbad.

### 2.2.2.2 Tricin- Markierung

Es wurden 11mg Tricin in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben. Dazu wurden 250-300MBq <sup>99m</sup>Technetiumpertechnetat in 300µl 0,5M Acetatpuffer (pH 5,4) gegeben. 5µl einer 1,1\*10<sup>-3</sup>M(5,5\*10<sup>-9</sup>mol)Lösung mit Exendin-4K40AhxHYNIC wurden zugegeben und die Reaktion mit einer frisch hergestellten SnCl<sub>2</sub>– Lösung (16,5mg SnCl<sub>2</sub> in 10ml 0,1M HCl) gestartet. Nun erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

## 2.2.2.3 Tricin/EDDA-Markierung

Zunächst wurde eine Tricin-Markierung wie oben beschrieben hergestellt. Nun wurden 0,5ml EDDA-Lösung (10mg EDDA in 1ml A.dest) zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten bei 90 °C im Wasserbad inkubiert.

# 2.2.3 Qualitätskontrollen

An jede Markierung schloss sich eine Qualitätskontrolle mittels Sep-Pak C-18 Kartuschen der Firma Waters an. Die Kartuschen wurden hierzu durch Spülung mit 2ml Methanol und 2ml 0,5M Natriumacetat (pH 5,4) vorbereitet. Nach Zugabe von 1µl Radiopeptid-Lösung auf die Kartusche wurde mit 2ml 0,5M Natriumacetat (pH 5,4) gefolgt von 2ml Methanol gespült, die Fraktionen aufgefangen und ebenso wie die verwendete Kartusche ausgemessen. So wurde das unmarkierte Nuklid (im Natriumacetatpuffer) vom markierten Peptid (im Methanol) getrennt. Eine Qualitätskontrolle entsprach den Vorgaben, wenn der Anteil der gebundenen Aktivität über 90% war:

 $\frac{Aktivität (Alkohol + Kartusche)}{Aktivität (Puffer + Alkohol + Kartusche)}*100\% = Aktivität (gebunden)\%$ 

## 2.2.4 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.4.1 Pflege der Zellen

Drei mal pro Woche wurden die Zellen gesplittet. Das alte Medium wurde abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit 7ml sterilem 1fach PBS (pH 7,4; Gibco) gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS-Puffers wurden die Zellen ca. 3-5 Minuten mit 2ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nun wurde der Zellrasen durch leichtes Klopfen gelöst und in 8ml Medium gründlich resuspendiert. Je nach gewünschter Konzentration wurden unterschiedliche Mengen an Medium in sterile Zellkulturflaschen vorgelegt und die gewünschte Menge an Zellen aus der resuspendierten Flasche zugegeben. Das Zielvolumen betrug grundsätzlich 13ml.

#### 2.2.4.2 Aussähen der Zellen

Es wurden 6-Well-Platten der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen) mit 2ml frischem Medium je Well versehen. Anschließend wurden pro Well ca. 10<sup>5</sup> CHL-GLP+ Zellen ausgesät und für vierundzwanzig Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.4.3 Hämozytometer

Die Oberfläche der Zählkammer sowie das Deckglas wurden mit 99%igem Ethanol gereinigt. Das angefeuchtete Deckglas wurde aufgelegt und auf das korrekte Erscheinen der Newtonringe geachtet. Nach dem Befüllen der Zellkammer wurden vier große Quadrate (Q1, Q2, Q3, Q4) ausgezählt. Nur vitale Zellen fanden Berücksichtigung. Die Zellzahl/ml wurde aufgrund der Geometrie der verwendeten Zählkammer mit folgender Formel berechnet:

$$MW(Q1,Q2,Q3,Q4)*10^4 = \frac{Zellen}{ml}$$

#### 2.2.4.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BioRad<sup>®</sup> Protein Assay (Firma Biorad, München) nach Bradford. Durch Bindung an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G250 von 465nm nach 595nm (Bradford, 1976).

In 940µl NaCl wurden 10µl der zu quantifizierenden Zellsuspension gelöst. Anschließend wurden 50µl der Bradfordreagenz beigegeben. Der Ansatz wurde 5min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm gegen einen Nullwert (950µl NaCl und 50µl der Bradfordreagenz) ausgemessen. Zusätzlich wurden 10 Standardlösungen (100, 200, 300,...1000 mg/ml) nach dem gleichen Prinzip ausgemessen. Aus diesen zehn Standardwerten wurde mit Microsoft Excel<sup>®</sup> eine Standardkurve (y=mx+b) errechnet. Durch Umformen der Gleichung konnte aus den Exstinktionen der zu quantifizierenden Zellsuspensionen der Proteingehalt in mg/ml errechnet werden.

### 2.2.5 Internalisierungen

Nach der beschrieben Inkubationszeit wurde das Medium durch Reaktionsmedium ersetzt. Durch den Zusatz von BSA sollte vermieden werden, dass sich Radiopeptid am Plastik absetzt. Nun wurden die Zellen auf verschiedene Art und Weise weiterbehandelt (Tabelle 2.5).

| Gruppe            | Α   | В    | С             | D             |
|-------------------|-----|------|---------------|---------------|
| Rezeptorblockung  | Ja  | nein | Ja            | Nein          |
| Inkubationslösung | PBS | PBS  | Glycin-Puffer | Glycin-Puffer |

Tabelle 2.5: Versuchsgruppen bei den Internalisierungen

Gruppe A und Gruppe C wurden mit 10µl 10<sup>-6</sup>M Exendin-4 (Firma Bachem, Heidelberg) versehen. Durch die Zugabe des kalten Exendins im Überschuss wurden die GLP-1-Rezeptoren geblockt. Dann wurden zu jeder Gruppe je 100.000 cpm des entsprechenden Radiopeptids gegeben. Die vier Gruppen wurden für t = (30, 60, 120 und 180 Minuten) bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt, und die Zellen mit 4°C kaltem 1fach PBS-Puffer gewaschen. Gruppe A und Gruppe B wurden mit PBS, Gruppe C und Gruppe D mit 0,05M Glycin-Puffer (pH 2,8-3) weitere sechs Minuten bei 4°C inkubiert. Der PBS-Puffer sollte nicht-rezeptorgebundene Aktivität von den Zellen lösen, der saure 0,05M Glycin-Puffer (pH 2,8-3) diente dazu, die nicht internalisierten Ligand-Rezeptor-Strukturen abzulösen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C, da bei dieser Temperatur der Zellstoffwechsel stoppt und so ein weiteres Fortschreiten der Internalisierung verhindert werden konnte. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Zum Lysieren der Zellen erfolgte die Zugabe von 1ml MOPS-Triton (pH 7,5). Nach 15-20 Minuten wurden die gelösten Zellen in Röhrchen pipetiert und die Aktivität im Gamma Counter gemessen. Zusätzlich wurde eine Proteinbestimmung mit einem Assay (BioRad<sup>®</sup>) durchgeführt und die Absorptionen bei 595nm Wellenlänge protokolliert. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel<sup>®</sup>, wobei sich die Internalisierung in Prozent nach folgender Formel berechnen lässt:

 $\frac{(M(GruppeD) - M(GruppeC))}{(M(GruppeB) - M(GruppeA))} * 100\% = Internalisierung\%$ 

### 2.2.6 Externalisierungen

Zunächst wurde das Medium in den 6-Well-Platten durch 1ml Reaktionsmedium ausgetauscht. 1.000.000 cpm eines zu testenden Radiopeptids wurden beigegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1fach PBS-Puffer zweimal gewaschen. Nun startete die Externalisierungsphase: Es wurde 1ml Medium auf die Zellen gegeben und nach einer Minute in vorbereitete Röhrchen abpipettiert. Sogleich wurde neues Medium aufgegeben und nach 5 Minuten abpipettiert und ausgetauscht. Die gleiche Prozedur wurde bei den Zeitpunkten

10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120, 240 und 1440 Minuten nach Versuchsstart wiederholt. Nach der letzten Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1ml MOPS-Triton (pH 7,5) lysiert. Alle Proben und die Lysate wurden im Gamma-Counter gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel<sup>®</sup>, wobei für jedes Well die Externalisierung über die Zeit errechnet wurde.

## 2.2.7 Bindungsstudien

Nach der Qualitätskontrolle der Radiopeptide wurde 1µl einer 2\*10<sup>-4</sup>M (2\*10<sup>-10</sup>mol) kalten Indiumchloridlösung beigegeben um sicherzustellen, dass alle Peptide für die Bindungsstudie mit Indium besetzt sind. Ohne eine solche Zugabe würde es eine unkontrollierbare Mischung von Indium-Peptiden und freien Peptiden geben.

Der Ansatz wurde nochmals für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Medium in den 6-Well Platten durch Reaktionsmedium ersetzt. Die Wells 4 bis 6 jeder Platte wurden mit 10µl einer 10<sup>-6</sup>M (1\*10<sup>-11</sup>mol) Exendin-4 Lösung versehen. Durch die Zugabe des kalten Exendins im Überschuß wurden die GLP-1-Rezeptoren geblockt. Nun wurden unterschiedliche Konzentrationen (1\*10<sup>-11</sup>M bis 1\*10<sup>-7</sup>M) von markiertem Peptid in die Wells 1 bis 6 jeder Platte gegeben. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 4°C inkubiert um eine Internalisierung zu vermeiden. Nach dieser Zeitspanne wurden die Zellen dreimal mit 1ml 4°C kaltem PBS Puffer gewaschen und darauf hin mit 1ml MOPS/Triton lysiert. Die Aktivität der einzelnen Wells wurde im Gamma Counter gemessen. Gleichzeitig wurde für jedes Well eine Proteinbestimmung mit dem BioRad<sup>®</sup>Assay durchgeführt. Mittels Microsoft Excel<sup>®</sup> wurde der cpm/mg Protein Quotient jedes Wells berechnet. Ferner wurde die spezifische Bindung ermittelt, indem die unspezifische Bindung (Wells 4 bis 6, mit Blocksubstanz) von der totalen Bindung (Wells 1 bis 3, ohne Blocksubstanz) abgezogen wurde. Dabei wurde eine paarweise Zuordnung verwendet. In der Folge konnte die spezifisch gebundene Peptidmenge (M) errechnet werden. Die Spezifisch gebundenen Peptidmengen (M) wurden nun in das Programm GraphPad Prism 4<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc. San Diego, USA) übertragen und mittels nicht linearer Regression ausgewertet.

# 2.2.8 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden unter Beachtung ethischer Aspekte und dem geltenden Tierschutzgesetz durchgeführt.

#### 2.2.8.1 Implantation von Tumorzellen

Zunächst wurden die CHL-Zellen (Wildtyp und mit transfiziertem GLP-1-Rezeptor) für eine subkutane Injektion vorbereitet. Mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen gelöst und nach dem Lösen mit 9ml Medium resuspendiert. 10µl der Suspension wurden mittels Hämozytometer ausgezählt. Daraus wurde die Zellkonzentration der gesamten Suspension errechnet.

Es wurden 1,5\*10<sup>7</sup> Zellen im entsprechenden Volumen entnommen und in einem 50ml Falcontube für 3min bei 1200U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 0,75ml Medium resuspendiert und in eine 1ml-Spritze aufgezogen. 0,25ml (entsprechend 5\*10<sup>6</sup> Zellen) der CHL-Zellen wurden subkutan in die rechte (GHL-GLP positive Zellen) und in die linke (CHL-Wildtyp Zellen) Flanke der Nacktmaus gespritzt.

### 2.2.8.2 Bioverteilungsstudie

Ca. vier Wochen nach Tumorinduktion erfolgte die Applikation der zu testenden Radiopeptide. 0,37MBq der Radiopeptide wurden in 0,1ml NaCl verdünnt und in die Schwanzvene injiziert. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt der Injektion dreimalig 0,037MBq als Standard der injizierten Aktivität abgenommen. Durch Bildung des Mittelwertes und Multiplikation mit dem Faktor 10 erhielt man somit zum Auswertezeitpunkt einen halbwertszeitkorrigierten Standard der insgesamt injizierten Aktivität.

Nach vier Stunden erfolgte die Tötung von je vier Versuchstieren durch zervikale Dislokation. Folgende Organe wurden entnommen, gewogen und mit den drei Standardabnahmen der injizierten Aktivität zusammen im Gamma-Counter gemessen: Milz, Pankreas, Leber, Nieren, Herz, Lungen, Magen, Duodenum, Dünndarm, Dickdarm, Muskel, Knochen, 75µl Blut, GLP-positiver Tumor und GLP-negativer Tumor.

Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel<sup>®</sup>, wobei zunächst die Organuptakewerte durch den Mittelwert der Standardwerte der injizierten Aktivität dividiert wurden, um die prozentual injizierte Dosis pro Organ zu errechnen. In einem zweiten Schritt wurde unter Einbezug des Organgewichtes die prozentual injizierte Dosis pro Gramm Organ errechnet. Diese wurde mittels GraphPad Prism 4<sup>®</sup> graphisch dargestellt.

## 2.2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden Microsoft Excel<sup>®</sup> und GraphPad Prism 4<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc. San Diego, USA) verwendet. Mittelwert und Standardabweichung wurden für alle Messpunkte der Zell- und Tierversuche bestimmt. Das Vorhandensein von Gruppenunterschieden wurde mit Hilfe paarweiser Vergleiche zwischen den einzelnen Peptiden zu den einzelnen Messzeitpunkten statistisch getestet. Hierzu wurde der T-Test herangezogen. Da diese Arbeit die Exploration von Gruppenunterschieden zur Aufgabe hat, wurde keine vorspezifizierte Rangordnung von statistischen Hypothesen festgelegt. Die im Folgenden berichteten p-Werte sind daher als Maß für die Eignung zur Diskriminierung zu verstehen. Kleine p-Werte weisen statistisch größere Gruppenunterschiede nach (Hartung et al., 2002).

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

- Nicht signifikant (ns) entspricht p > 0,05
- Signifikant (\*) entspricht p < 0,05
- Signifikant (\*\*) entspricht p < 0,01
- Signifikant (\*\*\*) entspricht p < 0,001

Für die Rezeptorbindungsstudien wird eine one-site binding (hyperbola) Analyse gewählt, um die K<sub>d</sub>- und B<sub>max</sub>-Werte der getesteten Peptide zu errechnen. Zur besseren Visualisierung werden die K<sub>d</sub>- und B<sub>max</sub> Werte auch mittels scatchered plot dargestellt. Hierzu wird der y-Achsenschnittpunkt als Quotient von B<sub>max</sub> und K<sub>d</sub> errechnet und der x-Achsenschnittpunkt als B<sub>max</sub> angegeben. Eine Gerade wird durch beide Punkte gezogen und es gilt für die Steigung der Geraden: m=-1/K<sub>d</sub> (Stryer et al., 2007). Bei den Tierversuchen reicht eine Fallzahl von vier Untersuchungseinheiten pro Gruppe aus, um unter Normalverteilungsannahmen im Falle des Vergleichs von Mittelwerten unabhängiger Stichproben Unterschiede von ca. 2,4 Standardabweichungen mit 80% Power zum Signifikanzniveau alpha=5% (zweiseitig) statistisch abzusichern (Dupont & Plummer, 1990).

# 3 Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der einzelnen Experimente dargelegt. Dabei werden im Text die einzelnen getesteten Proteine abgekürzt um eine bessere Lesbarkeit zu erzielen.

Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39) K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In werden DTPA-Exendin-3, DTPA-Exendin-4 und DTPA-Exendin-4(9-39) genannt.

Exendin-4K40AhxHYNIC-EDDA-<sup>99m</sup>Tc, Exendin-4K40AhxHYNIC-Tricin-<sup>99m</sup>Tc und Exendin-4K40AhxHYNIC-TricinEDDA-<sup>99m</sup>Tc werden EDDA-Exendin-4, Tricin-Exendin-4 und EDDATricin-Exendin-4 genannt. In den Tabellen und Graphen wird die korrekte Bezeichnung gewählt.

# 3.1 Qualitätskontrollen der Markierungen

Eine Qualitätskontrolle mittels Sep-Pak C-18 Kartuschen erfolgte nach jeder Markierung (s.a. Kap. 2.2.3). Die folgende Tabelle 3.1 zeigt die Ergebnisse der verwendeten Markierungen.

| Substanz                                       | Gebundenes<br>Nuklid (%) | SD<br>(%) | Freies Nuklid<br>(%) |
|--|--------------------------|-----------|----------------------|
| Exendin-3K40AhxDTPA-111In                      | 95,45                    | 0,98      | 4,55                 |
| Exendin-4K40DTPA- <sup>111</sup> In            | 97,41                    | 0,05      | 2,59                 |
| Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA- <sup>111</sup> In   | 96,00                    | 1,07      | 4,00                 |
| Exendin-4K40AhxHYNIC-EDDA- <sup>99m</sup> Tc   | 93,22                    | 3,49      | 6,78                 |
| Exendin-4K40AhxHYNIC-Tricin- <sup>99m</sup> Tc | 94,72                    | 3,44      | 5,28                 |
| Exendin-4K40AhxHYNIC-TricinEDDA 99mTc          | 94,77                    | 1,99      | 5,23                 |

#### Tabelle 3.1: Qualitätskontrolle der Markierungen

Alle Markierungsergebnisse liegen über den für einen Therapie- oder Diagnostikbereich geforderten 90%. Die Standardabweichungen der einzelnen Markierungen liegen zwischen 0,05% und 3,49%.

# 3.2 Zellversuche

## 3.2.1 Internalisierungen

Abbildung 3.1 und 3.2 zeigen die Internalisierungskurven der einzelnen Peptide in Prozent. Die Standardabweichung ist ebenfalls in Prozent angegeben. Tabellen 3.2 und 3.3 geben die Zahlenwerte der Internalisierungsraten und deren Standardabweichungen in Prozent an.



Abbildung 3.1: Internalisierungsraten (%) von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In (t= 30,60,120 und 240 min)

| Zei | Exendin-3K40AhxDTPA<br>Zeit - <sup>111</sup> In |       |   | n-3K40AhxDTPA Exendin-4K40DTPA<br>- <sup>111</sup> In - <sup>111</sup> In |      |    | Exendin-4(9-39)K40Ahx<br>DTPA- <sup>111</sup> In |      |   |  |  |
|-----|---|-------|---|---|------|----|--|------|---|--|--|
| (t) | %Internalisierung                               | SD    | n | %Internalisierung   | SD   | n  | %Internalisierung                                | SD   | n |  |  |
| 0   | 0,00  | 0,00  | 6 | 0,00  | 0,00 | 15 | 0,00   | 0,00 | 6 |  |  |
| 30  | 78,58   | 11,74 | 6 | 64,33   | 3,64 | 15 | 46,67  | 7,00 | 6 |  |  |
| 60  | 84,08   | 9,24  | 6 | 71,23   | 3,40 | 15 | 49,78  | 5,81 | 6 |  |  |
| 120 | 76,61   | 7,99  | 6 | 77,95   | 9,51 | 15 | 52,32  | 3,55 | 6 |  |  |
| 240 | 74,67   | 7,79  | 6 | 78,76   | 5,65 | 15 | 59,40  | 4,43 | 6 |  |  |

Tabelle 3.2.: Internalisierungsraten (%) von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In

(t= 30,60,120 und 240 min)

DTPA-Exendin-3 wird nach 30 Minuten zu 78,58% in die Zellen internalisiert. Bis zum 240-Minutenwert bewegt sich die Internalisierungsrate zwischen 74,67% und 84,08%. Bei DTPA-Exendin-4 beträgt die Internalisierung nach 30 Minuten 64,33%. Sie steigt bis zum 240-Minutenwert bis auf 78,76% an. DTPA-Exendin(9-39) wird nach einer halben Stunde zu 46,67% in die Zellen aufgenommen. Die Internalisierungsrate steigt bis zum Vier-Stundenwert auf 59,40%. EDDA-Exendin-4 wird nach 30 Minuten zu 68,27% internalisiert. Bis zum Vier-Stundenwert von 66,23% schwankt die Internalisierung, bei 120 Minuten erreicht sie 53,99%. Tricin-Exendin-4 wird nach einer halben Stunde zu 65,60% aufgenommen. Die Internalisierung steigt im Laufe von vier Stunden auf 83,89%. TricinEDDA-Exendin-4 wird nach 30 Minuten zu 56,18% in die Zellen aufgenommen. Die Internalisierungsraten bewegen sich bis zum 240-Minutenwert von 53,78% zwischen 56,06% und 64,89%. Bei den DTPA-Peptiden unterscheiden sich DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 bei 30 Minuten mit \*\*\*, bei 60 Minuten mit \*\* statistisch signifikant. Danach gleichen sich die Kurven an, die Unterschiede sind nicht mehr statistisch signifikant (p > 0,05). Die Internalisierungskurve von DTPA-Exendin-4(9-39) unterscheidet sich in allen Messzeitpunkten statistisch signifikant (\*\* bis \*\*\*) von DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4.



Abbildung 3.2 : Internalisierungsraten (%) von Exendin-4K40AhxHYNIC-EDDA-<sup>99m</sup>Tc, Exendin-4K40AhxHYNIC-Tricin-<sup>99m</sup>Tc und Exendin-4K40AhxHYNIC-TricinEDDA-<sup>99m</sup>Tc (t= 30,60,120 und 240 min)

| Zeit | Zeit Exendin-4K40AhxHYNIC- |      |   | endin-4K40AhxHYNIC-<br>EDDA- <sup>99m</sup> Tc Exendin-4K40AhxHYNIC-<br>Tricin- <sup>99m</sup> Tc |      |   |                   | Exendin-4K40AhxHYNIC-<br>TricinEDDA- <sup>99m</sup> Tc |   |  |
|------|----------------------------|------|---|---|------|---|-------------------|--|---|--|
| (t)  | %Internalisierung          | SD   | n | %Internalisierung   | SD   | n | %Internalisierung | SD   | n |  |
| 0    | 0,00                       | 0,00 | 6 | 0,00  | 0,00 | 9 | 0,00              | 0,00   | 6 |  |
| 30   | 68,27                      | 5,85 | 6 | 65,60   | 4,29 | 9 | 56,18             | 5,03   | 6 |  |
| 60   | 63,62                      | 8,72 | 6 | 68,91   | 8,26 | 9 | 56,06             | 3,83   | 6 |  |
| 120  | 53,99                      | 6,02 | 6 | 79,93   | 9,13 | 9 | 64,89             | 5,56   | 6 |  |
| 240  | 66,25                      | 7,98 | 6 | 83,89   | 4,48 | 9 | 53,78             | 6,24   | 6 |  |

Tabelle 3.3.: Internalisierungsraten (%) von Exendin-4K40AhxHYNIC-EDDA-<sup>99m</sup>Tc, Exendin-4K40AhxHYNIC-Tricin-<sup>99m</sup>Tc und Exendin-4K40AhxHYNIC-TricinEDDA-<sup>99m</sup>Tc (t= 30,60,120 und 240 min)

Bei den HYNIC-Peptiden unterscheiden sich EDDA-Exendin-4 und Tricin-Exendin-4 nur bei den 120- und 240-Minutenwerten statistisch signifikant (\*\*\*). EDDA-Exendin-4 und TricinEDDA-Exendin-4 unterscheiden sich beim 30-Minutenwert statistisch signifikant (\*), bei den restlichen Werten ist der Unterschied nicht signifikant. Tricin-Exendin-4 und TricinEDDA-Exendin-4 unterscheiden sich beim 30-Minutenwert nicht signifikant, bei 60 Minuten mit \*\*, bei 120 Minuten mit \* und bei 240 Minuten mit \*\*\*. Tricin-Exendin-4 internalisiert am besten.

DTPA-Exendin-4 und Tricin-Exendin-4 weisen über den gesamten Verlauf keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. DTPA-Exendin-4(9-39) und TricinEDDA-Exendin-4 unterscheiden sich ebenfalls nicht statistisch signifikant.

### 3.2.2 Externalisierungen

Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen die Externalisierungskurven der einzelnen Peptide in Prozent. Die Standardabweichung ist ebenfalls in Prozent angegeben. Tabelle 3.4 und 3.5 geben die Zahlenwerte der Externalisierungsraten und deren Standardabweichung in Prozent an.



| Abbildung 3.3 Externalisierungsraten (%) von Exendin-3K40AhxDTPA- <sup>111</sup> In, |
|--|
| Exendin-4K40DTPA- <sup>111</sup> In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA- <sup>111</sup> In |
| (t= 1,5,10,20,30,45,60,120,240 und 1440 min)   |

| t     | Exendin-3K40AhxDTPA- <sup>111</sup> In |       |    | Exendin-4K4<br><sup>111</sup> In | Exendin-4K40DTPA- <sup>111</sup> In |    |        | Exendin-4(939)K40Ahx<br>DTPA- <sup>111</sup> In |    |  |
|-------|--|-------|----|----------------------------------|-------------------------------------|----|--------|---|----|--|
| (min) | % Ext.                                 | SD    | n  | %Ext.                            | SD                                  | n  | %Ext.  | SD  | n  |  |
| 0     | 100,00                                 | 0,00  | 24 | 100,00                           | 0,00                                | 24 | 100,00 | 0,00  | 12 |  |
| 1     | 99,24                                  | 0,56  | 24 | 99,13                            | 0,62                                | 24 | 93,58  | 2,58  | 12 |  |
| 5     | 98,25                                  | 0,70  | 24 | 97,89                            | 0,77                                | 24 | 64,45  | 8,12  | 12 |  |
| 10    | 97,68                                  | 0,77  | 24 | 96,91                            | 0,73                                | 24 | 46,16  | 8,08  | 12 |  |
| 20    | 96,89                                  | 0,78  | 24 | 95,41                            | 0,71                                | 24 | 31,93  | 8,46  | 12 |  |
| 30    | 96,24                                  | 0,85  | 24 | 94,35                            | 0,79                                | 24 | 23,51  | 5,57  | 12 |  |
| 45    | 95,48                                  | 0,87  | 24 | 92,54                            | 0,83                                | 24 | 17,20  | 3,44  | 12 |  |
| 60    | 94,84                                  | 0,89  | 24 | 90,52                            | 1,22                                | 24 | 13,82  | 2,35  | 12 |  |
| 120   | 93,02                                  | 1,07  | 24 | 85,72                            | 1,24                                | 24 | 10,21  | 1,33  | 12 |  |
| 240   | 90,51                                  | 1,51  | 24 | 80,94                            | 2,27                                | 24 | 8,43   | 1,05  | 12 |  |
| 1440  | 43,56                                  | 11,43 | 24 | 39,15                            | 13,91                               | 24 | 4,68   | 0,93  | 12 |  |

Tabelle 3.4.: Externalisierungsraten (%) Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In (t= 1,5,10,20,30,45,60,120,240 und 1440 min)

DTPA-Exendin-3 weist nach einer Minute eine geringe Externalisierung von 99,42% auf. Bei zehn Minuten beträgt die Externalisierung 97,68%, nach einer Stunde 94,84%. Der Vier-Stundenwert beträgt 90,51%, dieser fällt nach 24 Stunden auf 43,36% ab. Das DTPA-Exendin-4 weist ebenfalls eine geringe

Externalisierung auf: 99,13% nach einer Minute, 96,91% nach zehn Minuten, 90,52% nach einer Stunde, 80,94% nach vier Stunden und 39,15% nach einem Tag. DTPA-Exendin-4(9-39) hingegen weist eine hohe Externalisierungstendenz auf. 93,58% nach einer Minute, 46,16% nach 10 Minuten, 13,82% nach einer Stunde und 8,43% nach vier Stunden. Dieser Wert fällt nach 24 Stunden auf 4,68% ab.

DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 unterscheiden sich vom Ein-Minutenwert bis zum 45-Minutenwert, sowie beim 1440-Minutenwert nicht statistisch signifikant. Bei 60 Minuten (\*\*) sowie bei den 120- und 240-Minutenwerten (\*\*\*) wird der Unterschied statistisch signifikant. Die Werte von DTPA-Exendin-4(9-39) unterscheiden sich zu jedem Zeitpunkt von den Werten von DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 signifikant (\*\*\*).



Abbildung 3.4 : Externalisierungsraten (%) von Exendin-4K40AhxHYNIC-EDDA-<sup>99m</sup>Tc, Exendin-4K40AhxHYNIC-Tricin-<sup>99m</sup>Tc und Exendin-4K40AhxHYNIC-TricinEDDA-<sup>99m</sup>Tc (t= 1,5,10,20,30, 45,60,120,240 und 1440 min)

| t     | Exendin-4K40AhxHYNIC-<br>EDDA- <sup>99m</sup> Tc |       |    | Exendin-4K40AhxHYNIC-<br>Tricin- <sup>99m</sup> Tc |       |    | Exendin-4K40AhxHYNIC-<br>TricinEDDA- <sup>99m</sup> Tc |      |    |
|-------|--|-------|----|--|-------|----|--|------|----|
| (min) | % Ext.   | SD    | n  | %Ext.  | SD    | n  | %Ext.  | SD   | n  |
| 0     | 100,00   | 0,00  | 24 | 100,00   | 0,00  | 18 | 100,00   | 0,00 | 12 |
| 1     | 97,73  | 0,96  | 24 | 96,50  | 1,43  | 18 | 94,58  | 3,87 | 12 |
| 5     | 93,23  | 1,48  | 24 | 90,84  | 3,28  | 18 | 88,48  | 4,17 | 12 |
| 10    | 91,11  | 1,79  | 24 | 87,45  | 4,10  | 18 | 86,09  | 4,73 | 12 |
| 20    | 88,20  | 2,56  | 24 | 83,45  | 6,06  | 18 | 83,30  | 5,53 | 12 |
| 30    | 86,26  | 3,05  | 24 | 81,25  | 6,83  | 18 | 81,63  | 5,85 | 12 |
| 45    | 83,20  | 3,54  | 24 | 78,05  | 7,31  | 18 | 78,86  | 5,83 | 12 |
| 60    | 80,76  | 3,65  | 24 | 75,15  | 7,54  | 18 | 75,88  | 6,31 | 12 |
| 120   | 74,70  | 4,64  | 24 | 68,45  | 8,08  | 18 | 68,58  | 6,41 | 12 |
| 240   | 70,32  | 5,82  | 24 | 63,12  | 8,43  | 18 | 63,97  | 6,57 | 12 |
| 1440  | 31,85  | 15,84 | 24 | 31,25  | 12,56 | 18 | 30,28  | 6,95 | 12 |

Tabelle 3.5.: Externalisierungsraten (%) von Exendin-4K40AhxHYNIC-EDDA-<sup>99m</sup>Tc, Exendin-4K40AhxHYNIC-Tricin-<sup>99m</sup>Tc und Exendin-4K40AhxHYNIC-TricinEDDA-<sup>99m</sup>Tc (t= 1,5,10,20,30, 45,60,120,240 und 1440 min)

EDDA-Exendin-4 weist nach einer Minute noch 97,73% Aktivität auf. Nach zehn Minuten fällt der Wert auf 91,11%, nach einer Stunde auf 80,76%. Der Vier-Stundenwert beträgt 70,70%, der 24-Stundenwert 31,85%. Tricin-Exendin-4 weist nach einer Minute eine Externalisierung von 96,50% auf. Nach zehn Minuten beträgt der Wert 87,45%, nach einer Stunde 75,15%, nach vier Stunden 63,12% und am nächsten Tag 31,25%. Die Externalisierung von 94,58%, fällt nach zehn Minuten auf 86,09%, nach 60 Minuten auf 75,88%, nach 240 Minuten auf 63,97% und nach 24 Stunden auf 30,28%.

EDDA-Exendin-4 weist einen nicht signifikanten Unterschied zum Ein- und Fünf-Minutenwert, sowie zum 24-Stundenwert gegenüber Tricin-Exendin-4 auf. Der Zehn-Minutenwert unterscheidet sich signifikant (\*), die 20-, 30-, und 45-Minutenwerte sind mit \*\*, die restlichen Werte mit \*\*\* statistisch signifikant unterschiedlich. EDDA-Exendin-4 unterscheidet sich von TricinEDDA-Exendin-4 lediglich beim 24-Stundenwert nicht statistisch signifikant. Die anderen Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich (mindestens \*), wobei EDDA-Exendin-4 langsamer externalisiert. Tricin-Exendin-4 und TricinEDDA-Exendin-4 signifikanten Unterschied auf (\*), ansonsten sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant.

## 3.2.3 Bindungsstudien

Im Folgenden werden die Bindungsstudien graphisch analysiert und tabellarisch zusammengefasst. Abbildung 3.5, 3.6 und 3.7 zeigen die Rezeptoranalysen der einzelnen DTPA-Peptide. Hierbei wird das gebundene Exendin (M) gegen das freie Exendin (M) aufgetragen. Mittels GraphPad Prism 4<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc. San Diego, USA) wurde eine one-site binding (hyperbola) Analyse durchgeführt, um die K<sub>d</sub>- und B<sub>max</sub>-Werte der getesteten Peptide zu errechnen.



Abbildung 3.5: Rezeptoranalyse von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In



Abbildung 3.6: Rezeptoranalyse von Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In



Abbildung 3.7 Rezeptoranalyse von Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In

Abbildung 3.8 ist eine scatchered plot Analyse der einzelnen Peptide. Sie wurde gewählt um die Ergebnisse linear zu visualisieren (s.a. Kapitel 2.3).



Abbildung 3.8 Scatchered plot von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In

Anmerkung: m= -1/K<sub>d</sub>; bei X-Achsenschnitt (x=0) gilt: y = B<sub>max</sub>

Die B<sub>max</sub>-Werte der einzelnen DTPA-Peptide liegen bei 2,46\*10<sup>-09</sup>M für DTPA-Exendin-3, bei 2,51\*10<sup>-09</sup>M für DTPA-Exendin-4 und bei 3,61\*10<sup>-09</sup>M für DTPA-Exendin-4(9-39). Diese gemessenen Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

Der K<sub>d</sub>-Wert von DTPA-Exendin-4 ist mit  $8,76*10^{-09}$ M am kleinsten. DTPA-Exendin-3 weist mit  $2,26*10^{-08}$ M den nächst höheren K<sub>d</sub>-Wert auf, gefolgt von DTPA-Exendin-4(9-39) mit  $2,94*10^{-08}$ M (s. a. Tabelle 3.6).

Der K<sub>d</sub>-Wert von DTPA-Exendin-3 unterscheidet sich von dem von DTPA-Exendin-4 signifikant (\*\*\*) und von dem von DTPA-Exendin(9-39) ebenfalls signifikant (\*). Der K<sub>d</sub>-Wert von DTPA-Exendin-4 unterscheidet sich signifikant (\*\*\*) vom K<sub>d</sub>-Wert von DTPA-Exendin-4(9-39).

|                  | Exendin-3K40AhxDTPA-<br><sup>111</sup> In |                        |   | Exendin-4K40DTPA-<br><sup>111</sup> In |                        |    | Exendin-4(939)K40Ahx<br>DTPA- <sup>111</sup> In |                        |   |
|------------------|---|------------------------|---|--|------------------------|----|---|------------------------|---|
|                  | M SD n                                    |                        | М | SD                                     | n                      | М  | SD  | n                      |   |
| B <sub>max</sub> | 2,46*10 <sup>-09</sup>                    | 1,23*10 <sup>-10</sup> | 6 | 2,51*10 <sup>-09</sup>                 | 4,20*10 <sup>-10</sup> | 12 | 3,61*10 <sup>-09</sup>                          | 3,27*10 <sup>-10</sup> | 6 |
| K <sub>d</sub>   | 2,26*10 <sup>-08</sup>                    | 3,41*10 <sup>-09</sup> | 6 | 8,76*10 <sup>-09</sup>                 | 6,19*10 <sup>-09</sup> | 12 | 2,94*10 <sup>-08</sup>                          | 7,89*10 <sup>-09</sup> | 6 |

Tabelle 3.6: B<sub>max</sub>- und K<sub>d</sub>-Werte der getesteten Exendinpeptide

# 3.3 Biodistribution

Die Ergebnisse der Bioverteilungsstudien werden im Folgenden graphisch dargestellt. Es handelt sich um die Vier-Stundenwerte von DTPA-Exendin-3, DTPA-Exendin-4 und DTPA-Exendin-4(9-39). Je vier Mäuse wurden pro Peptid eingesetzt.

Abbildung 3.9 und Tabelle 3.7 zeigen die prozentual injizierte Dosis pro Gramm Gewebe oder Flüssigkeit (%i.D./g). Der Fehler ist als Standardabweichung (SD) angegeben.



Abbildung 3.9: Bioverteilung von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In (t= 4h)

| Ligand     | Exendin-3K40Ahx<br>DTPA- <sup>111</sup> In |       | Exendin-4K4<br><sup>111</sup> In | ODTPA- | Exendin-4(9-39)K40Ahx<br>DTPA- <sup>111</sup> In |       |  |
|------------|--|-------|----------------------------------|--------|--|-------|--|
| Organ      | % i.D./g                                   | SD    | % i.D./g                         | SD     | % i.D./g   | SD    |  |
| Milz       | 0,17                                       | 0,02  | 0,22                             | 0,17   | 0,14   | 0,03  |  |
| Pankreas   | 11,05                                      | 5,46  | 8,85                             | 3,94   | 0,45   | 0,12  |  |
| Leber      | 0,34                                       | 0,07  | 0,33                             | 0,16   | 0,24   | 0,06  |  |
| Nieren     | 128,77                                     | 43,81 | 103,80                           | 59,09  | 60,03  | 16,45 |  |
| Herz       | 0,36                                       | 0,09  | 0,23                             | 0,07   | 0,16   | 0,06  |  |
| Lunge      | 23,20                                      | 8,60  | 9,71                             | 5,69   | 0,75   | 0,26  |  |
| Magen      | 1,87                                       | 1,47  | 5,93                             | 8,47   | 0,21   | 0,04  |  |
| Duodenum   | 4,39                                       | 4,46  | 8,62                             | 7,29   | 1,96   | 1,36  |  |
| Dünndarm   | 0,99                                       | 0,62  | 1,07                             | 0,50   | 0,18   | 0,05  |  |
| Dickdarm   | 0,55                                       | 0,11  | 0,60                             | 0,22   | 0,16   | 0,05  |  |
| Muskel     | 0,13                                       | 0,09  | 0,08                             | 0,04   | 0,16   | 0,06  |  |
| Knochen    | 0,49                                       | 0,12  | 0,33                             | 0,11   | 0,69   | 0,48  |  |
| Blut       | 0,07                                       | 0,01  | 0,07                             | 0,07   | 0,14   | 0,07  |  |
| Tumor GLP+ | 26,34                                      | 12,53 | 23,28                            | 19,88  | 7,50   | 3,49  |  |
| Tumor GLP- | 1,23                                       | 1,39  | 0,70                             | 0,92   | 0,30   | 0,05  |  |

Tabelle 3.7: Bioverteilung von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In (t= 4h)

Bei allen getesteten Substanzen war die Aktivitätsanreicherung in den Nieren am höchsten. DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 weisen mit 128,77%i.D./g und 103.80%i.D./g jeweils eine höhere Anreicherung als DTPA-Exendin(9-39) mit 60.03%i.D./g auf. Bei den GLP-positiven Tumoren weist DTPA-Exendin-3 eine Anreicherung von 26,34%i.D./g auf, DTPA-Exendin-4 von 23,28%i.D./g und DTPA-Exendin-4(9-39) von 7,50%i.D./g. Die GLP-negativen Tumoren zeigen demgegenüber nur eine geringe Aktivitätsspeicherung.

DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 zeigen eine stärkere Aktivitätsanreicherungstendenz gegenüber DTPA-Exendin-4(9-39). Die gemessenen Unterschiede sind jedoch weder bei der Niere, noch beim GLP-positiven Tumor statistisch signifikant (ns).

Die Peptidanreicherung unterscheidet sich deutlich im Pankreas: DTPA-Exendin-3 (11,05%i.D./g) und DTPA-Exendin-4 (8,85%i.D./g) werden im Gegensatz zum DTPA-Exendin-4(9-39) (0,45%i.D./g) signifikant höher gespeichert (\* bzw. \*\*). DTPA-Exendin-3 (23,20%i.D./g) und DTPA-Exendin-4 (9,71%i.D./g) unterscheiden sich im Lungenuptake signifikant (\*\*). DTPA-Exendin-4(9-39) hat mit 0,75%i.D./g ebenfalls einen signifikant geringeren Lungenuptake als DTPA-Exendin-4 (\*). Die Organe Milz, Leber, Herz, Dünndarm, Dickdarm, Muskel, Knochen und Blut zeigen keine erhöhte Anreicherung. Im Magen und Duodenum findet sich ein leicht erhöhter Uptake. Die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. Insgesamt beträgt der kumulative Uptake der Peptide 199,05%i.D./g beim DTPA-Exendin-3, 163,28%i.D./g beim DTPA-Exendin-4 und 73,07%i.D./g beim DTPA-Exendin-4(9-39).

Die folgende Abbildung 3.10 und die Tabelle 3.8 geben die Ratio Organ/Tumor GLP+ wieder. Diese kann zur Visualisierung der Effekte bei den Organen/Flüssigkeiten mit geringem Uptake nützlich sein. Beispielsweise wird sichtbar, dass je nach verwendetem Radiopeptid im rezeptornegativen Tumor 24,94 bis 64,69mal weniger Aktivität als im rezeptorpositiven Tumorgewebe gemessen wurde. Auf eine Beschreibung aller Organ/Tumor-Verhältnisse wird an dieser Stelle verzichtet, da weiter oben schon eine Analyse der % injizierte Dosis pro Gramm Gewebe oder Flüssigkeit (%i.D./g) durchgeführt wurde.



Abbildung 3.10: Ratio Organ/ Tumor GLP+ von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In, Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In (t= 4h)

| Ligand     | Exendin-31<br>DTPA- | K40Ahx<br><sup>111</sup> In | Exendin-4K4<br><sup>111</sup> In | ODTPA- | Exendin-4(9-39)K40Ahx<br>DTPA- <sup>111</sup> In |       |  |
|------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------|--|-------|--|
| Organ      | Ratio               | SD                          | Ratio                            | SD     | Ratio  | SD    |  |
| Milz       | 157,64              | 70,65                       | 101,83                           | 17,75  | 52,11  | 16,73 |  |
| Pankreas   | 2,67                | 1,37                        | 2,40                             | 1,20   | 17,19  | 7,60  |  |
| Leber      | 75,61               | 22,21                       | 65,04                            | 34,61  | 30,48  | 9,30  |  |
| Nieren     | 0,21                | 0,09                        | 0,29                             | 0,32   | 0,12   | 0,03  |  |
| Herz       | 75,94               | 38,34                       | 111,79                           | 84,09  | 47,61  | 12,74 |  |
| Lunge      | 1,40                | 0,99                        | 2,63                             | 1,80   | 10,03  | 3,06  |  |
| Magen      | 18,19               | 8,80                        | 11,76                            | 10,39  | 36,02  | 18,13 |  |
| Duodenum   | 8,65                | 5,53                        | 3,82                             | 2,23   | 8,53   | 10,49 |  |
| Dünndarm   | 47,56               | 50,97                       | 21,80                            | 15,09  | 42,07  | 16,01 |  |
| Dickdarm   | 46,13               | 14,38                       | 34,43                            | 20,07  | 46,18  | 13,08 |  |
| Muskel     | 253,77              | 162,45                      | 260,76                           | 123,90 | 51,10  | 25,59 |  |
| Knochen    | 54,86               | 26,05                       | 83,63                            | 90,34  | 12,57  | 4,35  |  |
| Blut       | 388,06              | 233,23                      | 455,08                           | 348,18 | 56,83  | 23,78 |  |
| Tumor GLP+ | 1,00                |                             | 1,00                             |        | 1,00   |       |  |
| Tumor GLP- | 64,69               | 65,62                       | 62,92                            | 44,63  | 24,94  | 9,53  |  |

Tabelle 3.8: Ratio Organ/ Tumor GLP+ von Exendin-3K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In,

Exendin-4K40DTPA-<sup>111</sup>In und Exendin-4(9-39)K40AhxDTPA-<sup>111</sup>In (t=4 h)

# 4 Diskussion

Insulinome können bisher mit der etablierten Somatostatinrezeptorszintigraphie nur unzureichend detektiert werden, denn sie exprimieren in nur ca. 50% der Fälle den Somatostatinrezeptor Typ 2. Die Sensitivität der Untersuchung beträgt lediglich 25% (Krenning et al., 1993; Lebtahi et al., 1997; Termanini et al., 1997). Gotthardt et al. (2002) zeigten erste Ergebnisse mit Nagetieren bei einer Peptidszintigraphie auf der Basis von GLP-1-Analoga, da auch GLP-1-Rezeptoren auf Insulinomen beschrieben wurden (Göke et al., 1988; Wild et al., 2006). Gotthard et al. (2002) verwendeten radiojodiertes GLP-1 und Exendin-3. Bei zusätzlich durchgeführten Zellversuchen wiesen die Autoren bei Internalisierungsversuchen an RINm5F-Zellen einen Uptake von 10,9% +/-4,3% für jodiertes GLP-1(7-36)amid und 12,1% +/-3,6% für jodiertes Exendin-3 nach. Da eine andere Zelllinie und eine andere Internalisierungsmethode verwendet wurden, können diese Zahlen aber nicht direkt mit den in dieser Arbeit vorliegenden Daten verglichen werden.

Behr et al. (2001) beschrieben zwei Methoden, um ein Peptid mit einem radioaktiven Isotop zu koppeln: Zum einen die Radiojodierung, zum anderen die Radiometallmarkierung. Bei der direkten Radiojodierung wird ein Histidin oder Thyrosin in der Peptidsequenz gebraucht und die entsprechende Aminosäure jodiert. Ein Lysin in der Primärsequenz erlaubt eine indirekte Radiojodierung über eine aktivierte jodierte Substanz (Behr et al., 2002). Eine Radiojodierung wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht als Markierungsart gewählt, da mit radiometallmarkierten Peptiden ein besseres Uptake-Ergebnis zu erwarten ist. Der Grund hierfür ist im unterschiedlichen Metabolismus der Peptide zu sehen. Radiojodierte Peptide werden nach Aufnahme in die Zelle abgebaut, dabei wird radioaktives Jod-Thyrosin frei und kann die Zelle wieder verlassen. Das radioaktive Jod-Thyrosin wird im Anschluss in der Leber dekonjugiert. Ein radiometallmarkiertes Peptid wird ebenfalls intrazellulär degradiert, der freiwerdende Radioisotop-Chelat-Komplex wird aber mangels Transporter nicht aus der Zelle freigesetzt. Dieses Phänomen wird als "metabolic trapping" bezeichnet.

Eine Radiometallmarkierung ist allerdings technisch aufwendiger, da zunächst ein Chelat an ein geeignetes Peptid synthetisiert werden muss. Gebräuchliche Chelate stellen zum Beispiel DTPA, HYNIC oder DOTA dar (siehe auch Abbildung 2.1). Über ein derartiges Chelat können dann eine Vielzahl von Radiometallen gebunden werden: An DTPA kann <sup>111</sup>In binden, HYNIC bindet <sup>99m</sup>Tc und DOTA kann <sup>90</sup>Y, <sup>68</sup>Ga, <sup>177</sup>Lu oder <sup>111</sup>In binden (Meares et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurden Exendin-3, Exendin-4 und Exendin-4(9-39) mit DTPA gekoppelt, um sie einer <sup>111</sup>In-Markierung zugänglich zu machen. Vorteile vom <sup>111</sup>In sind in der relativ langen Halbwertszeit von 2,8d, die szintigraphisch späte Aufnahmen erlaubt, sowie in der einschrittigen Markierung zu sehen. Allerdings ist <sup>111</sup>In relativ teuer.

Zusätzlich wurde Exendin-4 mit HYNIC gekoppelt, um das Peptid mit <sup>99m</sup>Tc markieren zu können. Da HYNIC, im Gegensatz zu DTPA oder DOTA, nur eine Bindungsstelle für das Radiometall bereithält, wurden die anderen noch freien Bindungsstellen mit den Coliganden Tricin und/oder EDDA (s.a. Abbildung 2.1 a&b) besetzt. <sup>99m</sup>Tc ist in der nuklearmedizinischen Praxis weit verbreitet und preisgünstig. Die Markierung ist aber mehrschrittig und aufwendig. <sup>99m</sup>Tc hat mit sechs Stunden eine sehr kurze Halbwertszeit. Aus Strahlenschutzgründen kann das als Vorteil erscheinen, aber aus diesem Grund ist auch eine schlechtere Backgroundclearance zu erwarten. Daher liegt in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf den Indiummarkierungen, mit der oben beschriebenen längeren Halbwertszeit.

# 4.1 Zellversuche

### 4.1.1 Internalisierungen und Externalisierungen

Die Versuche wurden an GLP-1 transfizierten CHL-Zellen durchgeführt um den Uptake der einzelnen GLP-1-Analoga quantitativ zu bewerten. Bei den Internalisierungsversuchen wurde bei allen getesteten Radiopharmaka die Internalisierung nach 30 Minuten zum größten Teil abgeschlossen und ein Plateau im Sinne eines "steady state" erreicht. Anzumerken ist, dass im jeweiligen Inkubationsintervall der Internalisierungsversuche eine Externalisierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Beim jeweiligen Inkubationsintervall der Externalisierungsversuche konnte hingegen eine Internalisierung nicht ausgeschlossen werden. Beide Effekte wurden jedoch systematisch mitgemessen.

Beim Vergleich der Internalisierungs- und Externalisierungsergebnisse der DTPA-Peptide mit dem HYNIC-Exendin-4 wiesen DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 Vorteile auf. So internalisierten die beiden DTPA-Peptide auf höherem Niveau, und externalisierten langsamer als die HYNIC-Exendin-4-Varianten. Beim HYNIC-Exendin-4 zeigte keine Markierung einen eindeutigen Vorteil in vitro. Alle drei Markierungsarten wiesen im Vergleich untereinander gute Internalisierungsraten auf, wobei die Markierung mit Tricin am besten internalisierte. Die drei Markierungsvarianten externalisierten auf fast gleichem Niveau.

Beim Vergleich der DTPA-Peptide untereinander wurde DTPA-Exendin-3 nach 30 Minuten signifikant besser in die Zellen aufgenommen als DTPA-Exendin-4. Bis zu den Vier-Stundenwerten glich sich der Uptake der beiden Peptide auf hohem Niveau an. DTPA-Exendin-4(9-39) wurde insgesamt signifikant schlechter in die Zellen aufgenommen als DTPA-Exendin-3 oder DTPA-Exendin-4. Bei den Externalisierungsversuchen wurde DTPA-Exendin-3 am langsamsten externalisiert, gefolgt von DTPA-Exendin-4. Beide Peptide unterschieden sich signifikant von DTPA-Exendin-4(9-39), welches sehr schnell externalisierte. Insgesamt hatten DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 damit einen deutlichen Vorteil gegenüber DTPA-Exendin-4(9-39).

Die extrem schnelle Externalisierung von DTPA-Exendin-4(9-39) erscheint auf den ersten Blick verwunderlich. Erklärbar wird dies vor dem Hintergrund, dass Exendin-4(9-39) als Rezeptorantagonist beschrieben wurde: Ein cAMP-Anstieg oder ein Ca<sup>2+</sup>-Ionen Anstieg, der für eine Aktivierung einer intrazellulären Kaskade sprechen würde, findet bei Exendin-4(9-39) nicht statt (Raufman et al., 1991; Eng et al. 1992; Thorens et al., 1993). Es unterbleibt nach der Bindung des Exendin-4(9-39) an den GLP-1-Rezeptor wahrscheinlich eine spezifische Internalisierung des GLP-1-Rezeptor-Exendin-4(9-39)Komplexes, da die

Rezeptoren nicht aktiviert werden und somit der rezeptorvermittelte Reiz auch nicht durch eine solche zelluläre Internalisierung inaktiviert werden muss.

Nach den vorliegenden Daten wurde jedoch trotzdem DTPA-Exendin-4(9-39) in die Zellen aufgenommen (vgl. Internalisierungsstudien). Die Werte waren jedoch wie oben beschrieben signifikant niedriger als die von den Rezeptoragonisten DTPA-Exendin-3 oder DTPA-Exendin-4. Dieses Phänomen könnte durch eine Aufnahme über andere nicht-selektive Rezeptoren erklärbar werden. Ginj et al. (2006) beschrieben interessanterweise (allerdings bei Somatostatinantagonisten und -agonisten am Somatostatinzereptor Typ 2 und Typ 3) einen gegenteiligen Effekt. Sie fanden hier bei in vivo-Versuchen an Ratten für Antagonisten einen höheren Uptake als für Agonisten. So bleibt zumindest festzuhalten, dass bei diesen Somatostatinrezeptoren und beim GLP-1-Rezeptor wahrscheinlich unterschiedliche Mechanismen zum Tragen kommen.

# 4.1.2 Bindungsstudien

Beim GLP-1-Rezeptor (GLP-1-R) handelt es sich um einen 7-Transmembranrezeptor mit einer integralen Kernregion und einer N-terminalen Extrazellulardomäne. Drei unterschiedliche Bindungsregionen zwischen GLP-1 bzw. Exendin-4 und dem Rezeptor wurden von Al-Sabah & Donnelly (2003b) postuliert:

- N ist die Interaktion zwischen dem N-terminalen Ende der Analoga und der core-Region des GLP-1-R. Al-Sabah & Donnelly (2003a) zeigten, dass auf Rezeptorseite die positive Ladung des Lys-288 für die Nterminale Bindung der Peptide an den Rezeptor wichtig ist.
- H ist die Bindungsregion zwischen der N-terminalen Region des GLP-1-R und einer helicalen Domäne der GLP-1-Analoga. Durch eine NMR-Analyse konnte gezeigt werden, dass Exendin-4 eine helicale Domäne hat (Neidigh et al., 2001). Acht Aminosäuren von Exendin-4 und GLP-1 sind in dieser α-Helix identisch, sie liegen alle auf einer Seite der α-Helix. Das legt nahe, dass diese Seite der α-Helix mit der Bindungsstelle des Rezeptors interagiert. Die sechs Aminosäuren an Position 11 (Ser), 15 (Glu), 18 (Ala), 22 (Phe), 25 (Trp) und 26 (Leu)

zeigten sich besonders verantwortlich für die Bindung (Al-Sabah & Donnelly, 2003b; 2004).

Für Exendin-4 wurde noch eine zusätzliche Bindungsstelle (Ex) beschrieben. Diese kann über die, im Vergleich zum GLP-1, zusätzlichen neun C-terminalen Aminosäuren erklärt werden. Durch eine NMR-Analyse konnte gezeigt werden, dass sich diese in einer kompakt gefalteten dreidimensionalen Einheit, einem "Trp-Cage" anordnen (Neidigh et al., 2002). Diese Baueinheit interagiert ebenfalls mit dem N-terminalen Ende des GLP1-R.

Al-Sabah & Donnelly (2003b) ermittelten auch Bindungsenergien für GLP-1 und Exendin-4 für dieses Modell. Sie zeigten, dass der Hauptanteil der Bindungsenergie zwischen der  $\alpha$ -Helix-Region der Peptide und dem N-terminalen Ende des GLP-1-R vermittelt wird. Diese Bindungsenergie H machte beim GLP-1 82% und beim Exendin-4 79% aus. Die Bindungsenergie N betrug beim GLP-1 18%, beim Exendin-4 5%. Die Bindungsstelle Ex machte beim Exendin-4 16% der Bindungsenergie aus.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Bindungsstudien wurden mit den DTPA-Peptiden durchgeführt. Eine Bindungsstudie mit den HYNIC-Exendin-4-Varianten konnte aus physikalisch-technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Die sich signifikant unterscheidenden K<sub>d</sub>-Werte waren beim DTPA-Exendin-4 am geringsten, gefolgt vom DTPA-Exendin-3. Der K<sub>d</sub>-Wert von DTPA-Exendin-4(9-39) war am höchsten. Die gleich bleibende Versuchsanordnung lieferte konstante B<sub>max</sub>-Werte. Somit war die Bindung von DTPA-Exendin-4 an den GLP-1-Rezeptor am stärksten, gefolgt von der Bindung von DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4(9-39). Die K<sub>d</sub>-Werte der DTPA-Exendine lagen alle in einem nanomolaren Bereich und zeigten eine gute Bindung der Peptide an den Rezeptor.

Alle drei DTPA-Peptide verfügen prinzipiell über dieselben oben beschriebenen Bindungsstellen N, H und Ex. Aufgrund der Analogie der Peptide kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungsstellen H und Ex bei allen drei Peptiden gleich sind. Bei DTPA-Exendin-3 sind im Vergleich zum DTPA- Exendin-4 nur die Aminosäuren an den Stellen zwei und drei ausgetauscht (s. Tabelle 1.2). Diese Veränderung an der Bindungsstelle N könnte den höheren  $K_d$ -Wert erklären. Somit erscheint DTPA-Exendin-3 dem DTPA-Exendin-4 unterlegen. DTPA-Exendin-4(9-39) verfügt nicht über die Bindungsstelle N, so dass der  $K_d$ -Wert erwartungsgemäß am höchsten ausfiel. Interessant ist, dass sich durch den Komplettausfall einer Bindungsstelle der  $K_d$ -Wert von DTPA-Exendin-4(9-39) nicht stärker von DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 unterschied. Erklärbar ist dies vor dem Hintergrund, dass Al-Sabah & Donnelly (2003b) die Bindungsenergie der N-Bindungsstelle für Exendin-4 nur mit 5% angaben.

# 4.2 Biodistribution

Die Ergebnisse aus den hier durchgeführten Zellversuchen korrelieren gut mit denen der Bioverteilungsstudien. DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 wiesen gegenüber DTPA-Exendin-4(9-39) bessere Internalisierungsergebnisse, eine langsamere Externalisierung, sowie niedrigere K<sub>d</sub>-Werte in vitro auf. Erwartungsgemäß zeigte sich auch eine höhere Biodistribution der beiden Peptide. In vivo zeigten DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 sehr gute Anreicherungen im rezeptorpositiven Gewebe und im implantierten GLP-1-transfizierten Tumor. Der nicht transfizierte Tumor blieb ohne signifikanten Uptake. DTPA-Exendin-4(9-39) zeigte ebenfalls gute Anreicherungen, da es aber, wie oben beschrieben, als Rezeptorantagonist wirkt, wird der insgesamt geringere kumulative Uptake, sowie der geringere Nieren-, Pankreas-, Lungen- und GLP-1-positive-Tumoruptake erklärbar.

Die Aktivitätsanreicherung war bei allen Substanzen in den Nieren am höchsten. Rezeptoren für GLP-1 wurden in den Tubuli der Niere beschrieben (Hassan et al., 1999). Für den exzessiven Uptake werden sie aber nicht alleine verantwortlich sein. Gotthardt et al. (2006) zeigten, dass ein Überschuss an kaltem Exendin-4 keine Veränderungen im Nierenuptake erkennen lässt, wohl aber einen Abfall bei den rezeptorpositiven Organen. Somit verbleibt die Möglichkeit eines spezifischen renalen Rezeptors zumindest fraglich. Möglich wäre die Aufnahme von GLP-1 über den Megalin-Rezeptor, wie er auch bei dem Somatostatinanalogon Octreotide beschrieben wurde (De Jong et al., 2005; Melis et al., 2005). Mit den Aminosäuren Lysin oder Arginin kann hier eine wirksame Nephroprotektion durchgeführt werden, indem man den Rezeptor blockt. Gotthardt et al. (2007) konnten bei Wistar-Ratten zeigen, dass eine solche Nephroprotektion mit Lysin bei <sup>111</sup>In-markiertem Exendin unwirksam ist, bei Octreotide aber erwartungsgemäß funktioniert. Sie konnten weiterhin nachweisen, dass Polyglutaminsäure den Nierenuptake von Exendin, nicht aber von Octreotide, senkt. Somit scheint es zumindest zwei unterschiedliche Uptake-Mechanismen für Octreotide und Exendin in der Niere zu geben. Eine Blockierung beider Mechanismen gelang dieser Arbeitsgruppe mit dem Plasmaexpander Gelofusin.

# 4.3 Ausblick

Prinzipiell sind mehrere klinische Anwendungsgebiete von GLP-1-Analoga denkbar: Aufgrund des großen GLP-1-Rezeptorenbesatzes von Insulinomen könnte hier ein Fokus erstens auf der prä- und intraoperativen Detektion und zweitens auf einer Radiopeptidtherapie von solchen Tumoren liegen (Wild et al., 2006). Als dritte Möglichkeit ist eine Betazellbildgebung mit GLP-1-Analoga denkbar.

**Prä- und intraoperative Detektion.** Bei der Detektion von Insulinomen erscheint die Entwicklung einer sensitiven peptidszintigraphischen Nachweismethode für Insulinome klinisch sehr sinnvoll, denn der aktuelle leitlinienkonforme multimodale Ansatz zum Nachweis von Insulinomen ist sehr zeitaufwändig und invasiv (Ramage et al., 2005). Da auch in anderen Tumor-Zelllinien GLP-1-Rezeptoren entdeckt wurden, könnte eine solche Methode auch für die Detektion von anderen Tumoren geeignet sein. GLP-1- Rezeptoren wurden von Gotthardt et al. (2002) auch auf einer Zelllinie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (H69) beschrieben.

Nach den Daten der vorliegenden Arbeit erscheint eine Szintigraphie mit DTPA-Exendin-3 oder DTPA-Exendin-4 als sehr aussichtsreich. Rezeptorexprimierende Organe und Tumoren wurden von unserer

Arbeitsgruppe bereits erfolgreich in Ratten und Mäusen mit <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin-4 und <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Exendin-4 szintigraphisch nachgewiesen. Gotthardt et al. (2006) konnten mit DTPA-Exendin-4 Bindungsstellen in Ratten und Mäusen auch im SPECT nachweisen. Die Ergebnisse wiesen eine hohe Sensitivität auf, so dass eine Phase 1 Studie an gesunden menschlichen Probanden von den Autoren für möglich gehalten wurde. In den vorliegenden Biodistributionsdaten dieser Arbeit war der Anteil der renalen Aktivität sehr hoch. Da der Nierenuptake, wie oben erläutert, nicht durch Lysin oder Arginin verringert werden kann, sollte hier nach neuen Möglichkeiten einer Nierenprotektion geforscht werden.

Um die unterschiedlichen Markierungen mit <sup>99m</sup>Tc und <sup>111</sup>In weiter zu untersuchen, erscheint eine weiterführende Biodistribution der unterschiedlich <sup>99m</sup>Tc-markierten Exendine sinnvoll. Bei vorsichtiger Interpretation der in vitro Daten und auf Grund der kurzen Halbwertszeit von sechs Stunden, lassen sich jedoch schlechtere Ergebnisse als bei den DTPA-Peptiden erwarten. Allerdings liegt die von Technetium emittierte Gamma-Strahlung in einem für Messzwecke günstigem Bereich von 140keV.

Neben der Einführung einer reinen Peptidszintigrapie sind auch andere Detektionsverfahren denkbar. Man könnte intraoperativ mit einem i.v.appliziertem radioaktiven GLP-1-Analogon das Insulinom markieren. Daraufhin könnte man nach erfolgter chirurgischer Tumorentfernung mittels einer Sonde klären, ob noch Tumorrestgewebe vorhanden ist und ggf. direkt nachresizieren. Auch eine Kombination einer solchen Sonde mit einem endoskopischen Ultraschallgerät wäre möglich. Ein Problem bei der präoperativen Diagnostik mittels endoskopischen Ultraschalls besteht in isodensen Raumforderungen, die nicht dargestellt werden können. Kann et al. (2005) gaben den Anteil solcher Raumforderungen mit ca. 10% an. Diese könnten mit einer solchen Kombinationstechnik vermutlich besser erfasst werden.

Radiopeptidtherapie. Ein weiterer klinischer Ansatz ist in einer Radioligandtherapie zu sehen. Daher sollten als weitere Markierungsvarianten Exendin-3 und Exendin-4 an DOTA gekoppelt werden, um sie einer <sup>177</sup>Lu- und <sup>90</sup>Y-Markierung zugänglich zu machen. Diese Nuklide emittieren therapeutisch nutzbare ß-Strahlung mit einer Reichweite von 12mm (<sup>90</sup>Y) bzw. 2mm (<sup>177</sup>Lu) im Gewebe.<sup>111</sup>In hingegen emittiert an therapeutisch nutzbarer Strahlung Auger-Elektronen mit einer Gewebereichweite von < 10  $\mu$ m. <sup>177</sup>Lu- und <sup>90</sup>Y besitzen somit ein größeres therapeutisches Potential, da Ihre Reichweite den Durchmesser von Tumorzellen übersteigt (O'Donoghue et al. 1995; Krenning et al. 1999; Smith et al. 2000).

Bei entsprechender Biodistribution ist ein Einsatz der so modifizierten Peptide auch in der Radioligandtherapie, analog zur Therapie mit <sup>90</sup>Y-DOTATOC denkbar. Da das endokrine Pankreas jedoch ebenfalls einen hohen GLP-1-Rezeptorbesatz aufweist, scheint eine diabetogene Wirkung einer solchen Radiotherapie möglich. Doch auch andere Nebenwirkungen scheinen bei einer Radiopeptidtherapie mit GLP-1-Analoga wahrscheinlich. Bei der Radiopeptidtherapie mit <sup>90</sup>Y-DOTATOC wurde eine Toxizität besonders im Bereich der Niere beschrieben, Knochenmarksdepression und Lymphopenie sind ebenfalls wahrscheinlich (Cybulla et al, 2001).

Der in dieser Arbeit nachgewiesene hohe Nierenuptake von DTPA-Exendin-3 und DTPA-Exendin-4 lässt bei einer solchen Anwendung ebenfalls eine Nierentoxizität vermuten. Sicher kann auch die Möglichkeit einer Knochenmarksschädigung nicht ausgeschlossen werden. Die Nephrotoxizität kann bei der Therapie mit <sup>90</sup>Y-DOTATOC durch vorherige Infusionen mit D-Lysin abgeschwächt werden, da die Aminosäure die tubuläre Bindung des Pharmakons reduziert (Boerman et al., 2001). Wie oben beschrieben ist eine wirksame Nephroprotektion bei GLP-1-Analoga noch nicht bekannt. Eventuell ware die Verwendung von <sup>177</sup>Lu als therapeutisches Nuklid günstiger als <sup>90</sup>Y, denn die Reichweite des <sup>177</sup>Lu ist geringer und somit ist anzunehmen, dass die Nierenschädigung am Glomerulum auch geringer ausfällt (Valkema et al., 2005).

**Betazellbildgebung.** Simpson et al. (2006) beschreiben eine Betazellbildgebung mit <sup>11</sup>C-DTBZ (Dihydrotetrabenazine). Dieses Radiopharmakon bindet an den vesikulären monaminärgen Transporter 2 (VMAT 2), der auf Betazellen exprimiert wird. Die Arbeitsgruppe konnte bei Ratten, bei denen sie mittels Streptozytozin einen Diabetes induziert hatte, gegenüber Kontrolltieren einen verminderten Uptake im Pankreas nachweisen. Mit <sup>18</sup>F-DOPA konnte mittels PET ebenfalls bereits erfolgreich ein Betazellimaging durchgeführt werden (Ribeiro et al., 2005; Otonkosi et al., 2006).

Auch mit GLP-1-Analoga kommt eine Betazellbildgebung aufgrund der GLP-1-Rezeptoren auf den Betazellen in Betracht. Damit könnten longitudinale Studien durchgeführt werden, um die Genese des Diabetes mellitus besser zu verstehen. Der Nachweis der Betazellfunktion könnte bei der Untersuchung von Antidiabetika in klinischen Studien zum Tragen kommen. Auch eine spezielle Überwachung von Risikopatienten oder eine individuelle Therapieanpassung aufgrund der Betazellbildgebung wäre denkbar. Die Betazellbildgebung könnte ebenfalls eine wichtige Aussagekraft bei einer adäquaten Therapiekontrolle von Inselzelltransplantationen bekommen. Hier könnte man Aussagen über das Anwachsen oder Absterben von Betazellen machen.

# 5 Zusammenfassung

Insulinome sind meist gutartige solitär vorkommende neuroendokrine Tumoren, die sich von den pankreatischen Betazellen ableiten. Der aktuelle leitlinienkonforme multimodale Ansatz zum Nachweis von Insulinomen fordert zeitaufwendige und invasive Methoden. Aus diesem Grund würden Patienten von einer neuen, sensitiven und nicht-invasiven Nachweismethode enorm profitieren. Die bei anderen neuroendokrinen Tumoren etablierte Somatostatinrezeptorszintigraphie zeichnet sich bei Insulinomen durch eine geringe Sensitivität aus, da 50% dieser Tumoren keine Somatostatinrezeptoren der Subtypen 2 und 5 exprimieren. Insulinome exprimieren aber zu einem hohen Prozentsatz GLP-1-Rezeptoren, daraus erschließt sich die Möglichkeit sie mit GLP-1 oder GLP-1-Analoga zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die GLP-1 Analoga Exendin-3, Exendin-4 und Exendin(9-39) mit <sup>111</sup>Indium und <sup>99m</sup>Technetium markiert. Als Chelator wurde DTPA für die <sup>111</sup>In-Markierungen und HYNIC für die <sup>99m</sup>Tc-Markierungen benutzt. Es wurde eine Radiometallmarkierung gewählt, weil diese im Gegensatz zur Radiojodierung eine höhere Stabilität besitzt und damit ein besseres Uptake-Ergebnis verspricht. Bei den Zellversuchen wurden <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin-3 und <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin-4 am besten internalisiert und zeigten eine langsame Externalisierung. <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin(9-39) wurde weniger gut internalisiert und externalisierte schnell. Das <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Exendin-4 internalisierte gut und externalisierte langsam, jeweils weitgehend unabhängig vom Coliganden. Weiterhin wurden Bindungsstudien und eine Biodistributionsstudie mit den <sup>111</sup>In-DTPA-Peptiden durchgeführt. Alle gemessenen K<sub>d</sub>-Werte lagen im nanomolaren Bereich. Bei der Biodistributionsanalyse zeigten <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin-3 und <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin-4 die besten Ergebnisse: Es zeigte sich ein hoher Tumoruptake und eine gute Aufnahme in die in der Literatur beschrieben rezeptorpositiven Organe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin-3 und <sup>111</sup>In-DTPA-Exendin-4 sehr aussichtsreiche Kandidaten für eine klinische Anwendung von GLP-1-Analoga zur Detektion von Insulinomen sind.

# 6 Anhang

# 6.1 Literaturverzeichnis

- Acitores, A., N. Gonzalez, et al. (2004). "Cell signalling of glucagon-like peptide-1 action in rat skeletal muscle." Journal of Endocrinology 180(3): 389-98.
- Ahren, B. (2003). "Gut peptides and type 2 diabetes mellitus treatment." Current Diabetes Reports 3(5): 365-72.
- Al-Sabah, S. and D. Donnelly (2003a). "The positive charge at Lys-288 of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor is important for binding the N-terminus of peptide agonists." FEBS Letters 553(3): 342-6.
- Al-Sabah, S. and D. Donnelly (2003b). "A model for receptor-peptide binding at the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor through the analysis of truncated ligands and receptors." British Journal of Pharmacology 140(2): 339-46.
- Al-Sabah, S. and D. Donnelly (2004). "The primary ligand-binding interaction at the GLP-1 receptor is via the putative helix of the peptide agonists." Protein & Peptide Letters 11(1): 9-14.
- Baggio, L., T. J. Kieffer, et al. (2000). "Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, regulates fasting glycemia and nonenteral glucose clearance in mice." Endocrinology 141(10): 3703-9.
- Barragan, J. M., R. E. Rodriguez, et al. (1994). "Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats." American Journal of Physiology 266(3 Pt 1): E459-66.
- Barragan, J. M., R. E. Rodriguez, et al. (1996). "Interactions of exendin-(9-39) with the effects of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and of exendin-4 on arterial blood pressure and heart rate in rats." Regulatory Peptides 67(1): 63-8.
- Bataille, D., A. M. Coudray, et al. (1982). "Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejuno-ileum. Isolation of the peptide." FEBS Letters 146(1): 73-8.

- Behr, T. M., M. Gotthardt, et al. (2001). "Imaging tumors with peptidebased radioligands." Quarterly Journal of Nuclear Medicine 45(2): 189-200.
- Behr, T. M., M. Gotthardt, et al. (2002). "Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. A review of standardized, reliable and safe procedures for clinical grade levels kBq to GBq in the Gottingen/Marburg experience." Nuclear-Medizin 41(2): 71-9.
- Bell, G. I. (1986). "The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization." Peptides 7 Suppl 1: 27-36.
- Bell, G. I., R. Sanchez-Pescador, et al. (1983). "Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene." Nature 304(5924): 368-71.
- Berge, T. and F. Linell (1976). "Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period." Acta Pathol Microbiol Scand 84(4): 322-30.
- Bode, H. P., B. Moormann, et al. (1999). "Glucagon-like peptide 1 elevates cytosolic calcium in pancreatic beta-cells independently of protein kinase A." Endocrinology 140(9): 3919-27.
- Boerman, O. C., W. J. Oyen, et al. (2001). "Between the Scylla and Charybdis of peptide radionuclide therapy: hitting the tumor and saving the kidney." European Journal of Nuclear Medicine 28(10): 1447-9.
- Bojanowska, E. (2005). "Physiology and pathophysiology of glucagonlike peptide-1 (GLP-1): the role of GLP-1 in the pathogenesis of diabetes mellitus, obesity, and stress." Medical Science Monitor 11(8): RA271-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry 72: 248-54.
- Chavan, A., T. D. Kirchhoff, et al. (2000). "Role of the intra-arterial calcium stimulation test in the preoperative localization of insulinomas." European Radiology 10(10): 1582-6.
- Creutzfeldt, W. (1979). "The incretin concept today." Diabetologia 16(2): 75-85.

- Cybulla, M., S. M. Weiner, et al. (2001). "End-stage renal disease after treatment with 90Y-DOTATOC." European Journal of Nuclear Medicine 28(10): 1552-4.
- de Jong, M., W. H. Bakker, et al. (1993). "Hepatobiliary handling of iodine-125-Tyr3-octreotide and indium-111-DTPA-D-Phe1-octreotide by isolated perfused rat liver." Journal of Nuclear Medicine 34(11): 2025-30.
- de Jong, M., R. Barone, et al. (2005). "Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide." Journal of Nuclear Medicine 46(10): 1696-700.
- Deacon, C. F., A. H. Johnsen, et al. (1995). "Degradation of glucagonlike peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 80(3): 952-7.
- Delcore, R. and S. R. Friesen (1994). "Gastrointestinal neuroendocrine tumors." Journal of the American College of Surgeons 178(2): 187-211.
- Dillon, J. S., Y. Tanizawa, et al. (1993). "Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor." Endocrinology 133(4): 1907-10.
- Drucker, D. J., J. Philippe, et al. (1987). "Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84(10): 3434-8.
- Drucker, D.J. and M.A. Nauck, (2006) "The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes." Lancet 368(9548): p. 1696-705.
- Dupont WD, Plummer WD (1990). "Power and Sample Size Calculations: A Review and Computer Program", Controlled Clinical Trials; 11:116-28.
- Edwards, C. M., J. F. Todd, et al. (1999). "Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39." Diabetes 48(1): 86-93.
- Eissele, R., R. Goke, et al. (1992). "Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man." European Journal of Clinical Investigation 22(4): 283-91.
- Elliott, R. M., L. M. Morgan, et al. (1993). "Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns." Journal of Endocrinology 138(1): 159-66.
- Eng, J., P. C. Andrews, et al. (1990). "Purification and structure of exendin-3, a new pancreatic secretagogue isolated from Heloderma horridum venom." Journal of Biological Chemistry 265(33): 20259-62.
- Eng, J., W. A. Kleinman, et al. (1992). "Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas." Journal of Biological Chemistry 267(11): 7402-5.
- Evers, B. M. (2004). "Small Intestine." Townsend C.M. et al.: Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practise (17th edition). Elsevier Saunders, Philadelphia: 1323-80.
- Fehmann, H. C., B. Goke, et al. (1990). "Interaction of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and cholecystokinin-8 in the endocrine and exocrine rat pancreas." Pancreas 5(3): 361-5.
- Fehmann, H. C. and J. F. Habener (1991). "Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line." FEBS Letters 279(2): 335-40.
- Fehmann, H. C., B. J. Hering, et al. (1995). "The effects of glucagon-like peptide-I (GLP-I) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets." Pancreas 11(2): 196-200.
- Fehmann, H. C., J. Jiang, et al. (1994). "Ligand-specificity of the rat GLP-I receptor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary (CHO-) cells." Zeitschrift fur Gastroenterologie 32(4): 203-7.
- Feinglos, M. N., M. F. Saad, et al. (2005). "Effects of liraglutide (NN2211), a long-acting GLP-1 analogue, on glycaemic control and bodyweight in subjects with Type 2 diabetes." Diabetic Medicine 22(8): 1016-23.
- Fendrich, V., N. Habbe, et al. (2007). "Operative Therapie und Langzeituberleben bei neuroendokrinen Pankreastumoren--Erfahrungen bei 144 Patienten." Deutsche Medizinische Wochenschrift 132(5): 195-200.

- Forrer, F., H. Uusijarvi, et al. (2004). "A comparison of (111)In-DOTATOC and (111)In-DOTATATE: biodistribution and dosimetry in the same patients with metastatic neuroendocrine tumours." European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging 31(9): 1257-62.
- Frilling, A., F. Weber, et al. (2006). "Treatment with (90)Y- and (177)Lu-DOTATOC in patients with metastatic neuroendocrine tumors." Surgery 140(6): 968-76; discussion 976-7.
- Gallwitz, B. (2005)a. "Glucagon-like peptide-1-based therapies for the treatment of type 2 diabetes mellitus." Treatments in Endocrinology 4(6): 361-70.
- Gallwitz, B. (2005)b. "Glucagon-like peptide-1 as a treatment option for type 2 diabetes and its role in restoring beta-cell mass." Diabetes Technology & Therapeutics 7(4): 651-7.
- Garland, J., J. R. Buscombe, et al. (2003). "Sandostatin LAR (long-acting octreotide acetate) for malignant carcinoid syndrome: a 3-year experience." Alimentary Pharmacology & Therapeutics 17(3): 437-44.
- Gefel, D., G. K. Hendrick, et al. (1990). "Glucagon-like peptide-I analogs: effects on insulin secretion and adenosine 3',5'-monophosphate formation." Endocrinology 126(4): 2164-8.
- Gershwin, M. E., B. Merchant, et al. (1975). "The natural history and immunopathology of outbred athymic (nude) mice." Clinical Immunology & Immunopathology 4(3): 324-40.
- Ginj, M., H. Zhang, et al. (2006). "Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(44): 16436-41.
- Giovanella, L., S. La Rosa, et al. (1999). "Chromogranin-A as a serum marker for neuroendocrine tumors: comparison with neuron-specific enolase and correlation with immunohistochemical findings." Int J Biol Markers 14(3): 160-6.
- Goke, R. and J. M. Conlon (1988). "Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells." Journal of Endocrinology 116(3): 357-62.

- Goke, R., H. C. Fehmann, et al. (1991). "Glucagon-like peptide-1(7-36) amide is a new incretin/enterogastrone candidate." European Journal of Clinical Investigation 21(2): 135-44.
- Goke, R., P. J. Larsen, et al. (1995). "Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites." European Journal of Neuroscience 7(11): 2294-300.
- Goke, R., M. E. Trautmann, et al. (1989). "Signal transmission after GLP-1(7-36)amide binding in RINm5F cells." American Journal of Physiology 257(3 Pt 1): G397-401.
- Goke, R., B. Wagner, et al. (1993). "Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on the rat pancreas." Research in Experimental Medicine 193(2): 97-103.
- Gotthardt, M., M. Fischer, et al. (2002). "Use of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) for the detection of insulinomas: initial experimental results." Eur J Nucl Med Mol Imaging 29(5): 597-606.
- Gotthardt, M., M. Lalyko, et al. (2006). "A new technique for in vivo imaging of spezific GLP-1 binding sites: First results in small rodents." Regulatory Peptides: 137(3): 162-167
- Gotthardt, M., J. van Eerd-Vismale, et al. (2007). "Indication for Different Mechanisms of Kidney Uptake of Radiolabeled Peptides." J Nucl Med 48(4): 596-601.
- GraphPad Prism 4<sup>®</sup> for Windows (GraphPad Software Inc. San Diego, USA).
- Graziano, M. P., P. J. Hey, et al. (1993). "Cloning and functional expression of a human glucagon-like peptide-1 receptor." Biochemical & Biophysical Research Communications 196(1): 141-6.
- Guru, S. C., S. E. Olufemi, et al. (1997). "A 2.8-Mb clone contig of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) region at 11q13." Genomics 42(3): 436-45.
- Gutzwiller, J. P., B. Goke, et al. (1999). "Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans." Gut 44(1): 81-6.
- Hanks, J. B. (2004). "Thyroid." Townsend C.M. et al.: Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practise (17th edition). Elsevier Saunders, Philadelphia: 947-84.

- Hansen, A. B., C. P. Gespach, et al. (1988). "Effect of truncated glucagon-like peptide 1 on cAMP in rat gastric glands and HGT-1 human gastric cancer cells." FEBS Letters 236(1): 119-22.
- Hassan, M., A. Eskilsson, et al. (1999). "In vivo dynamic distribution of 131I-glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat studied by gamma camera." Nuclear Medicine & Biology 26(4): 413-20.
- Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H. (2002). "Vergleich zweier Messreihen (Stichproben)" Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik (13. Ausgabe) Oldenbourg, München: 505-13
- Heitz, P. U., M. Kasper, et al. (1982). "Pancreatic endocrine tumors." Human Pathology 13(3): 263-71.
- Heller, R. S. and G. W. Aponte (1995). "Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7--36) amide." American Journal of Physiology 269(6 Pt 1): G852-60.
- Heller, R. S., T. J. Kieffer, et al. (1997). "Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas." Diabetes 46(5): 785-91.
- Hemminki, K. and X. Li (2001). "Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden." Cancer 92(8): 2204-10.
- Hemminki, K. and X. Li (2001). "Familial carcinoid tumors and subsequent cancers: a nation-wide epidemiologic study from Sweden." Int J Cancer 94(3): 444-8.
- Herrmann, C., R. Goke, et al. (1995). "Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients." Digestion 56(2): 117-26.
- Holst, J. J., C. Ørskov, et al. (1987). "Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut." FEBS Letters 211(2): 169-74.
- Holz, G. G. t., W. M. Kuhtreiber, et al. (1993). "Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37)." Nature 361(6410): 362-5.

- Hui, H., X. Zhao, et al. (2005). "Structure and function studies of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): the designing of novel а pharmacological for the treatment of diabetes." agent Diabetes/Metabolism Research Reviews 21(4): 313-31.
- Hupe-Sodmann, K., R. Goke, et al. (1997). "Endoproteolysis of glucagonlike peptide (GLP)-1 (7-36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells." Peptides 18(5): 625-32.
- Hupe-Sodmann, K., G. P. McGregor, et al. (1995). "Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides." Regulatory Peptides 58(3): 149-56.
- Kann, P. H., M. Rothmund, et al. (2005). "Endoscopic ultrasound imaging of insulinomas: limitations and clinical relevance." Experimental & Clinical Endocrinology & Diabetes 113(8): 471-4.
- Kann, P. H., D. Ivan, et al. (2007). "Preoperative diagnosis of insulinoma: low body mass index, young age, and female gender are associated with negative imaging by endoscopic ultrasound." European Journal of Endocrinology 157(2): 209-13.
- Kann, P. H. (2007). "The value of endoscopic ultrasound in localizing gastrinoma." Wein Klin Wochenschr 119(19-20): 585-587.
- Kastin, A. J., V. Akerstrom, et al. (2002). "Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier." J Mol Neurosci 18(1-2): 7-14.
- Kawai, K., S. Suzuki, et al. (1989). "Comparison of the effects of glucagon-like peptide-1-(1-37) and -(7-37) and glucagon on islet hormone release from isolated perfused canine and rat pancreases." Endocrinology 124(4): 1768-73.
- Kim, D., L. MacConell, et al. (2007). "Effects of once-weekly dosing of a long-acting release formulation of exenatide on glucose control and body weight in subjects with type 2 diabetes." Diabetes Care 30(6): 1487-93.
- Kimura, W., A. Kuroda, et al. (1991). "Clinical pathology of endocrine tumors of the pancreas. Analysis of autopsy cases." Dig Dis Sci 36(7): 933-42.

- Kloppel, G., P. U. Heitz, et al. (1996). "Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions." World Journal of Surgery 20(2): 132-41.
- Komatsu, R., T. Matsuyama, et al. (1989). "Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide." Diabetes 38(7): 902-5.
- Krenning, E. P., W. H. Bakker, et al. (1992). "Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in man: metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr-3-octreotide." Journal of Nuclear Medicine 33(5): 652-8.
- Krenning, E. P., M. de Jong, et al. (1999). "Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy." Ann Oncol 10 Suppl 2: S23-9.
- Krenning, E. P., D. J. Kwekkeboom, et al. (1993). "Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients." European Journal of Nuclear Medicine 20(8): 716-31.
- Kreymann, B., G. Williams, et al. (1987). "Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man." Lancet 2(8571): 1300-4.
- Lairmore, T. C. and J. F. Moley (2004). "The multiple Endocrine Neoplasia Syndromes." Townsend C.M. et al.: Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practise (17th edition). Elsevier Saunders, Philadelphia: 1071-90.
- Lebtahi, R., G. Cadiot, et al. (1997). "Clinical impact of somatostatin receptor scintigraphy in the management of patients with neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors." Journal of Nuclear Medicine 38(6): 853-8.
- Levi, F., V. C. Te, et al. (2000). "Epidemiology of carcinoid neoplasms in Vaud, Switzerland, 1974-97." British Journal of Cancer 83(7): 952-5.
- Lopez, L. C., W. H. Li, et al. (1984). "Evolution of glucagon genes." Molecular Biology & Evolution 1(4): 335-44.

- Lu, M., M. B. Wheeler, et al. (1993). "The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide I(7-37)." Endocrinology 132(1): 94-100.
- Luque, M. A., N. Gonzalez, et al. (2002). "Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes." Journal of Endocrinology 173(3): 465-73.
- Matsumura, T., H. Itoh, et al. (1992). "Glucagonlike peptide-1(7-36)amide suppresses glucagon secretion and decreases cyclic AMP concentration in cultured In-R1-G9 cells." Biochemical & Biophysical Research Communications 186(1): 503-8.
- McIntyre, N., Holdsworth, C.D., Turner, D.S (1964). "New interpretation of oral glucose tolerance." Lancet II: 20-21.
- Meares, C. F., M. K. Moi, et al. (1990). "Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy." British Journal of Cancer -Supplement 10: 21-6.
- Melis, M., E. P. Krenning, et al. (2005). "Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues." European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging 32(10): 1136-43.
- Mentlein, R., B. Gallwitz, et al. (1993). "Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum." European Journal of Biochemistry 214(3): 829-35.
- Merchenthaler, I., M. Lane, et al. (1999). "Distribution of pre-proglucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system." Journal of Comparative Neurology 403(2): 261-80.
- Microsoft, Excel<sup>®</sup>, Version 2003.
- Mitry E, Baudin E, Ducreux M, et al. (1999) "Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin." Br J Cancer 81:1351–5.

- Moens, K., H. Heimberg, et al. (1996). "Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells." Diabetes 45(2): 257-61.
- Moertel CG, Lefkopoulo M, Lipsitz S, et al. (1992) "Streptozocindoxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced isletcell carcinoma." N Engl J Med 326: 519–23.
- Mojsov, S., G. Heinrich, et al. (1986). "Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing." Journal of Biological Chemistry 261(25): 11880-9.
- Mojsov, S., G. C. Weir, et al. (1987). "Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas." Journal of Clinical Investigation 79(2): 616-9.
- Moore, B., Edie, E.S., Abram, J.H. (1906). "On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane." Biochem. J. 1: 28-38.
- Nauck, M. A. and J. J. Meier (2005). "Glucagon-like peptide 1 and its derivatives in the treatment of diabetes." Regulatory Peptides 128(2): 135-48.
- Nauck, M. A., U. Niedereichholz, et al. (1997). "Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans." American Journal of Physiology 273(5 Pt 1): E981-8.
- Nauck, M. A., I. Weber, et al. (1998). "Normalization of fasting glycaemia by intravenous GLP-1 ([7-36 amide] or [7-37]) in type 2 diabetic patients." Diabetic Medicine 15(11): 937-45.
- Nauck, M. A., D. Wollschlager, et al. (1996). "Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM." Diabetologia 39(12): 1546-53.
- Neidigh, J. W. and N. H. Andersen (2002). "Peptide conformational changes induced by tryptophan-phosphocholine interactions in a micelle." Biopolymers 65(5): 354-61.

- Neidigh, J. W., R. M. Fesinmeyer, et al. (2001). "Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states." Biochemistry 40(44): 13188-200.
- O'Donoghue, J. A., M. Bardies, et al. (1995). "Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides." J Nucl Med 36(10): 1902-9.
- O'Halloran, D. J., G. C. Nikou, et al. (1990). "Glucagon-like peptide-1 (7-36)-NH2: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man." Journal of Endocrinology 126(1): 169-73.
- Ørskov, C., J. Andreasen, et al. (1992). "All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 74(2): 379-84.
- Ørskov, C., M. Bersani, et al. (1989). "Complete sequences of glucagonlike peptide-1 from human and pig small intestine." Journal of Biological Chemistry 264(22): 12826-9.
- Ørskov, C., J. J. Holst, et al. (1988). "Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach." Endocrinology 123(4): 2009 13.
- Ørskov, C., J. J. Holst, et al. (1987). "Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man." Diabetologia 30(11): 874-81.
- Ørskov, C., J. Jeppesen, et al. (1991). "Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine." Journal of Clinical Investigation 87(2): 415-23.
- Ørskov, C., L. Rabenhoj, et al. (1994). "Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans." Diabetes 43(4): 535-9.
- Ørskov, C., A. Wettergren, et al. (1993). "Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable." Diabetes 42(5): 658-61.
- Otonkoski, T., K. Nanto-Salonen, et al. (2006). "Noninvasive diagnosis of focal hyperinsulinism of infancy with [18F]-DOPA positron emission tomography." Diabetes 55(1): 13-8.

- Pantelouris, E. M. (1968). "Absence of thymus in a mouse mutant." Nature 217(126): 370-1.
- Pantelouris, E. M. (1973). "Athymic development in the mouse." Differentiation 1(6): 437-50.
- Patzelt, C. and G. Schug (1981). "The major proglucagon fragment: an abundant islet protein and secretory product." FEBS Letters 129(1): 127-30.
- Pauly, R. P., H. U. Demuth, et al. (1999). "Improved glucose tolerance in rats treated with the dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibitor lle-thiazolidide." Metabolism: Clinical & Experimental 48(3): 385-9.
- Pearse, A. G. (1969). "The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept." Journal of Histochemistry & Cytochemistry 17(5): 303-13.
- Pederson, R. A., H. A. White, et al. (1998). "Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide." Diabetes 47(8): 1253-8.
- Perea, A., C. Vinambres, et al. (1997). "GLP-1 (7-36) amide: effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue." Hormone & Metabolic Research 29(9): 417-21.
- Perley, M. J. and D. M. Kipnis (1967). "Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic sujbjects." Journal of Clinical Investigation 46(12): 1954-62.
- Perry, R. R. and A. I. Vinik (1995). "Clinical review 72: diagnosis and management of functioning islet cell tumors." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 80(8): 2273-8.
- Povlsen, C. O., P. J. Fialkow, et al. (1973). "Growth and antigenic properties of a biopsy-derived Burkitt's lymphoma in thymus-less (nude) mice." International Journal of Cancer 11(1): 30-9.
- Povlsen, C. O., J. Visfeldt, et al. (1975). "Growth patterns and chromosome constitutions of human malignant tumours after long-term serial transplantation in nude mice." Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section A, Pathology 83(6): 709-16.

- Rachman, J., B. A. Barrow, et al. (1997). "Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM." Diabetologia 40(2): 205-11.
- Ramage, J. K., A. H. Davies, et al. (2005). "Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours." Gut 54 Suppl 4: iv1-16.
- Raufman, J. P., L. Singh, et al. (1991). "Exendin-3, a novel peptide from Heloderma horridum venom, interacts with vasoactive intestinal peptide receptors and a newly described receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. Description of exendin-3(9-39) amide, a specific exendin receptor antagonist." Journal of Biological Chemistry 266(5): 2897-902.
- Reubi, J. C., R. Maurer, et al. (1987). "Somatostatin receptors in human endocrine tumors." Cancer Res 47(2): 551-8.
- Ribeiro, M. J., P. De Lonlay, et al. (2005). "Characterization of hyperinsulinism in infancy assessed with PET and 18F-fluoro-L-DOPA." J Nucl Med 46(4): 560-6.
- Richter, G., O. Feddersen, et al. (1993). "GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery." American Journal of Physiology 265(4 Pt 1): L374-81.
- Richter, G., R. Goke, et al. (1990). "Characterization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat lung membranes." FEBS Letters 267(1): 78-80.
- Richter, G., R. Goke, et al. (1991). "Characterization of glucagon-like peptide-I(7-36)amide receptors of rat lung membranes by covalent crosslinking." FEBS Letters 280(2): 247-50.
- Ritzel, U., U. Leonhardt, et al. (1998). "A synthetic glucagon-like peptide-1 analog with improved plasma stability." Journal of Endocrinology 159(1): 93-102.
- Roher, H. D., D. Simon, et al. (1997). "Spezielle diagnostische und therapeutische Aspekte beim Insulinom." Chirurg 68(2): 116-21.
- Rothmund, M., L. Angelini, et al. (1990). "Surgery for benign insulinoma: an international review." World Journal of Surgery 14(3): 393-8; discussion 398-9.

- Rothmund, M. and O. Kisker (1994). "Surgical treatment of carcinoid tumors of the small bowel, appendix, colon and rectum." Digestion 55 Suppl 3: 86-91.
- Rouille, Y., S. Martin, et al. (1995). "Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide." Journal of Biological Chemistry 270(44): 26488-96.
- Rouille, Y., G. Westermark, et al. (1994). "Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91(8): 3242-6.
- Ruiz-Grande, C., C. Alarcon, et al. (1993). "Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide 1." Hormone & Metabolic Research 25(12): 612-6.
- Ruiz-Grande, C., C. Alarcon, et al. (1992). "Lipolytic action of glucagonlike peptides in isolated rat adipocytes." Peptides 13(1): 13-6.
- Ruszniewski, P., M. Ducreux, et al. (1996). "Treatment of the carcinoid syndrome with the longacting somatostatin analogue lanreotide: a prospective study in 39 patients." Gut 39(2): 279-83.
- Sandhu, H., S. R. Wiesenthal, et al. (1999). "Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs." Diabetes 48(5): 1045-53.
- Schirra, J., K. Sturm, et al. (1998). "Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans." Journal of Clinical Investigation 101(7): 1421-30.
- Schjoldager, B. T., P. E. Mortensen, et al. (1989). "GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans." Digestive Diseases & Sciences 34(5): 703-8.
- Shima, K., M. Hirota, et al. (1988). "Effect of glucagon-like peptide-1 on insulin secretion." Regulatory Peptides 22(3): 245-52.
- Simpson, N. R., F. Souza, et al. (2006). "Visualizing pancreatic beta-cell mass with [11C]DTBZ." Nucl Med Biol 33(7): 855-64.

- Singh, G., J. Eng, et al. (1994). "Use of 125I-[Y39]exendin-4 to characterize exendin receptors on dispersed pancreatic acini and gastric chief cells from guinea pig." Regulatory Peptides 53(1): 47-59.
- Skoglund, G., M. A. Hussain, et al. (2000). "Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element." Diabetes 49(7): 1156-64.
- Smith, M. C., J. Liu, et al. (2000). "OctreoTher: ongoing early clinical development of a somatostatin-receptor-targeted radionuclide antineoplastic therapy." Digestion 62 Suppl 1: 69-72.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (2007). "Enzyme: Grundlegende Konzepte und Kinetik" Biochemie (deutsche Ausgabe) Elsevier-Verlag, Heidelberg (6. Ausgabe): 228-267
- Suzuki, S., K. Kawai, et al. (1989). "Comparison of the effects of various C-terminal and N-terminal fragment peptides of glucagon-like peptide-1 on insulin and glucagon release from the isolated perfused rat pancreas." Endocrinology 125(6): 3109-14.
- Tang-Christensen, M., P. J. Larsen, et al. (1996). "Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats." American Journal of Physiology 271(4 Pt 2): R848-56.
- Termanini, B., F. Gibril, et al. (1997). "Value of somatostatin receptor scintigraphy: a prospective study in gastrinoma of its effect on clinical management." Gastroenterology 112(2): 335-47.
- Thim, L. and A. J. Moody (1981). "The primary structure of porcine glicentin (proglucagon)." Regulatory Peptides 2(2): 139-50.
- Thompson, J. C. and C. M. Townsend (2004). "Endocrine Pancreas." Townsend C.M. et al.: Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practice (17th edition). Elsevier Saunders, Philadelphia: 1001-22.
- Thorens, B. (1992). "Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(18): 8641-5.

- Thorens, B., A. Porret, et al. (1993). "Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor." Diabetes 42(11): 1678-82.
- Todd, J. F., C. M. Edwards, et al. (1998). "Subcutaneous glucagon-like peptide-1 improves postprandial glycaemic control over a 3-week period in patients with early type 2 diabetes." Clinical Science 95(3): 325-9.
- Tomassetti, P., M. Migliori, et al. (2000). "Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours with octreotide LAR." Alimentary Pharmacology & Therapeutics 14(5): 557-60.
- Tomassetti, P., M. Migliori, et al. (2001). "Diagnostic value of plasma chromogranin A in neuroendocrine tumours." Eur J Gastroenterol Hepatol 13(1): 55-8.
- Turton, M. D., D. O'Shea, et al. (1996). "A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding." Nature 379(6560): 69-72.
- Valkema, R., S. A. Pauwels, et al. (2005). "Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with (90)Y-DOTA(0),Tyr(3)-octreotide and (177)Lu-DOTA(0), Tyr(3)-octreotate." J Nucl Med 46 Suppl 1: 83S-91S.
- van Eyll, B., B. Lankat-Buttgereit, et al. (1994). "Signal transduction of the GLP-1-receptor cloned from a human insulinoma." FEBS Letters 348(1): 7-13.
- Vassilopoulou-Sellin, R. and J. Ajani (1994). "Islet cell tumors of the pancreas." Endocrinology & Metabolism Clinics of North America 23(1): 53-65.
- Villanueva-Penacarrillo, M. L., A. I. Alcantara, et al. (1994). "Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in rat skeletal muscle." Diabetologia 37(11): 1163-6.
- Wei, Y. and S. Mojsov (1995). "Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences." FEBS Letters 358(3): 219-24.

- Wettergren, A., B. Schjoldager, et al. (1993). "Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man." Digestive Diseases & Sciences 38(4): 665-73.
- Wheeler, M. B., R. W. Gelling, et al. (1995). "Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties." Endocrinology 136(10): 4629-39.
- White, J. W. and G. F. Saunders (1986). "Structure of the human glucagon gene." Nucleic Acids Research 14(12): 4719-30.
- Widmann, C., W. Dolci, et al. (1995). "Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas." Biochemical Journal 310(Pt 1): 203-14.
- Wild, D., M. Behe, et al. (2006). "[Lys40(Ahx-DTPA-111In)NH2]exendin-4, a very promising ligand for glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor targeting." Journal of Nuclear Medicine 47(12): 2025-33.
- Wynick, D., S. J. Williams, et al. (1988). "Symptomatic secondary hormone syndromes in patients with established malignant pancreatic endocrine tumors." New England Journal of Medicine 319(10): 605-7.
- Xiao, Q., J. Giguere, et al. (2001). "Biological activities of glucagon-like peptide-1 analogues in vitro and in vivo." Biochemistry 40(9): 2860-9.
- Yada, T., K. Itoh, et al. (1993). "Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide and a rise in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increase cytosolic free Ca2+ in rat pancreatic beta-cells by enhancing Ca2+ channel activity." Endocrinology 133(4): 1685-92.
- Yoshimoto, S., M. Hirota, et al. (1989). "Identification of glucagon-like peptide-1(7-36) amide in rat brain." Annals of Clinical Biochemistry 26 (Pt 2): 169-71.
- Zander, M., S. Madsbad, et al. (2002). "Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study." Lancet 359(9309): 824-30.

## 6.2 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren (in alphabetischer Reihenfolge):

Marburg: Albert, Arnold, Aumüller, Aziz, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behe, Behr, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Bien, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Effendy, Eilers, Eisele, Elsässer, Engenhart-Cabillic, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fuchs, Fuchs-Winkelmann, Fuhrmann, Garten, Gemsa, Gerdes, Geus, Gotzen, Golenhofen, Göke, Görg, Gotthardt, Graul, Gress, Grimm, Griss, Grundner, Gudermann, Hackenberg, Happle, Hadewig, Hadji, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Heidenreich, Hellwig, Hertl, Herzum, Hess, Heverhagen, Hilgermann, Höfken, Hofmann, Hörsch, Huffmann, Jacob, Jungclas, Kälble, Kalinowski, Kaffarnik, Kann, Kern, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Klaus, Knoll, Koch, Köhler, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Lang, Lange, Lehmann, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Maier, Maisch, Mann, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Noll, Nüsing, Oertel, Pagenstecher, Pfeiffer, Pieper, Pohlen, Prinz, Radsak, Ramaswamy, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Röhm, Rothmund, Rupp, Schäfer. Schmid. Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider. Schreiber, Schuermann, Schumacher, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sommer, Steiniger, Stiletto, Stinner, Strempel, Sturm, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Walthers, Weber, Weihe, Wennemuth, Werner, Wesemann, Westermann, Wiegandt, Wilke, Wirth, Wulf, Zielke

Bern: Candinas, Dutly, Egger, Gloor, Hoksch, Schmid, Schmidt, Seiler, Wagner

*Toronto:* Bandarchi-Chamkhaleh, Bilbao, Ghorab, Hanna, Hsieh, Ismiil, Kahn, Khalifa, Raphael, Rasty, Rowsell, Sherman, Sugar, Treger, Wong, Zbieranowski, Zubovits

## 6.3 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Behr und PD Dr. med. Martin Gotthart möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dem Laborleiter Dr. rer. nat. Martin Behe, der mir mit seiner stets vorhandenen Diskussionsbereitschaft und praktischem Rat viele Türen geöffnet hat.

Gudrun Höhn, Ulla Kramer und Trientje Mennenga möchte ich für die unbezahlbaren praktischen Tipps während der Laborarbeit und für die Einarbeitung in die Techniken der Zellkultur und Zellversuche danken. Michael Hower, Tobias Topp und Philipp Baumeister standen mir mit kollegialer Hilfe, fachlichen Disskussionen und Anregungen stets zur Seite.

Insbesondere gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Schwester Muriel, meinem Onkel Hermann, meinen Freunden und meiner Freundin Jennifer. Sie haben mich, wo sie konnten, unterstützt und diese Arbeit erst ermöglicht.