

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



Abteilung für Nuklearmedizin
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Kommissarische//Leitung: PD Dr. Helmut Höffken

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

In vivo Glucagon-like Peptide 1 Rezeptorbildgebung mittels
radiometallmarkiertem Exendin-4.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin

dem Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Hower

aus

Bernkastel-Kues

Marburg, 2011

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Gotthardt, M., G. Lalyko, et al. (2006). "A new technique for in vivo imaging of specific GLP-1 binding sites: first results in small rodents." Regul Pept 137(3): 162-7.
- 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." JNucl Med 47(12): 2025-33.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg

am: 27.10.2011

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Gotthardt

Korreferent: Prof. Dr. Heufelder

Für meine Familie

1. Einleitung	7
1.1 Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1)	7
1.1.1 Entdeckung von GLP-1	7
1.1.2 Synthese und Sekretion	8
1.1.3 Physiologische Wirkungen und therapeutische Möglichkeiten	10
1.1.3.1 Pankreas	10
1.1.3.2 Magen	12
1.1.3.3 Lunge	12
1.1.3.4 Gehirn	13
1.1.3.5 Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe	13
1.1.3.6 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	14
1.1.3.7 Schilddrüse.....	14
1.1.3.8 Kardiovaskuläres System.....	15
1.1.4 Der GLP-1 Rezeptor.....	15
1.1.5 Stoffwechsel von GLP-1.....	16
1.1.6 GLP-1 assoziierte Erkrankungen.....	17
1.2 Diabetes mellitus	18
1.2.1 Einteilung	18
1.2.2 Klinik und Epidemiologie.....	19
1.2.3 Probleme der Diagnostik	22
1.2.4 GLP-1 als Therapeutikum bei Diabetes mellitus Typ	23
1.3 Neuroendokrine Tumoren (NET)	24
1.3.1 Neuroendokrine Tumoren des Gastroentero- Pankreatischen Systems (GEP)	26
1.3.1.1 Neuroendokrine Tumoren des Pankreas.....	26
1.3.1.2 Gastrinome	28
1.3.1.3 Karzinoide.....	29
1.3.1.4 Multiple endokrine Neoplasien (MEN).....	29
1.4 Diagnostik neuroendokriner Tumoren	30
1.4.1 Allgemeine Diagnostik	30
1.4.2 Spezielle Lokalisationsdiagnostik von neuroendokrinen Tumoren	31
1.5 Therapie von neuroendokrinen Tumoren, speziell von Insulinomen.. 34	
1.5.1 Medikamentöse Therapie.....	34
1.5.2 Chirurgische Therapie.....	34
1.6 Zielformulierung	35
2 Material und Methoden	37
2.1 Materialien	37
2.1.1 Materialien für die Tierhaltung:.....	37
2.1.2 Materialien Labor:	38
2.1.3 Chemikalien:.....	39
2.1.4 Radionuklide:	39
2.1.5 Peptide:.....	40
2.1.6 Geräte:	40
2.1.7 Gebrauchslösungen:.....	41
2.1.8 Software:.....	41
2.2 Versuchstiere:	42
2.2.1 Mäuse	42
2.2.2 Ratten.....	43
2.3 Methoden	43
2.3.1 Die Markierung von Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹ InCl ₃	43
2.3.2 Die Markierung von Exendin-4K40AhxHynic mit ^{99m} Tc	44
2.3.3 Qualitätskontrolle:	44
2.3.4 Diabetesinduktion bei Mäusen mit Alloxan.....	45

2.3.5	Diabetesinduktion bei Ratten mit Alloxan.....	45
2.3.6	Blutzuckermessung.....	45
2.3.7	i.v. Injektion der markierten Radiopharmaka	46
2.3.8	Narkose der Versuchstiere	46
2.3.8.1	Narkose der Ratten.....	46
2.3.8.2	Narkose der Mäuse.....	46
2.3.9	Schmerzlose Tötung	47
2.3.10	Bildgebende Verfahren.....	47
2.3.10.1	Single-Photon-Emmison-Computed-Tomography:.....	47
2.3.10.2	MRT-Studien:	48
2.3.10.3	Rekonstruktion der SPECT-Aufnahmen:	49
2.3.10.4	Fusion der MRT-Aufnahmen mit den SPECT-Aufnahmen:.....	50
3	Ergebnisteil.....	50
3.1	Qualitätskontrolle der Markierungen.....	51
3.2	GLP-1 Rezeptorimaging mit Multipinhole SPECT / MRT an C57Bl/6NCrI Mäusen.....	51
3.2.1	C57Bl/6NCrI 1 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹ In, Aufnahmen 4h nach Injektion	52
3.2.1.1	Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	52
3.2.1.2	Coronare Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).....	53
3.2.1.3	Sagittale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	55
3.3	Beurteilung des Pankreas bei C57Bl/6NCrI Mäusen.....	56
3.4	GLP-1 Rezeptorimaging mit Multipinhole SPECT / MRT an Wistar Unilever Ratten 57	
3.4.1	Wistar Unilever Ratte 1 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹ In, Aufnahmen 4h nach Injektion.....	58
3.4.1.1	Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	58
3.4.1.2	Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).....	59
3.4.1.3	Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).....	61
3.5	Beurteilung des Pankreas bei Wistar Unilever Ratten	62
3.6	GLP-1 Rezeptorimaging mit Multipinhole SPECT / MRT an Rip1Tag2 Mäusen 62	
3.6.1	Rip1Tag2 Maus 1 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹ In, Aufnahmen 4h nach Injektion	63
3.6.1.1	Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	63
3.6.1.2	Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	65
3.6.1.3	Coronare Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).....	66
3.6.1.4	Sagittale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	68
3.6.2	Rip1Tag2 Maus 2 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit ^{99m} Tc, Aufnahmen 4h nach Injektion	70
3.6.2.1	Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	70
3.6.2.2	Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).	71
3.6.2.3	Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).....	72
3.6.2.4	Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).....	74
3.6.2.5	Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).....	76
4	Diskussion.....	77
4.1	Nierenuptake	78
4.2	Tiermodelle.....	79
4.3	Ausblick	82
5	Schlussfolgerung	85
6	Zusammenfassung.....	85

7	Anhang	88
7.1	Literaturverzeichnis	88
7.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	112
7.3	Danksagung	113

1. Einleitung

1.1 Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1)

1.1.1 Entdeckung von GLP-1

Erstmals wurde die Existenz von GLP-1 von Moore et al. im Jahre 1906 beschrieben. Seine Arbeitsgruppe vermutete eine Substanz die eine ähnliche Wirkung auf das endokrine Pankreas haben musste, wie das damals schon bekannte Sekretin, welches den exokrinen Anteil des Pankreas stimuliert. In den 1920ern konnten La Barre und seine Arbeitsgruppe am Hund nachweisen, dass die intravenöse Injektion von unverarbeitetem Sekretin durch die Stimulation des endokrinen Pankreas zur Hypoglykämie führt. Sie vermuteten das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Wirksubstanzen, einem Inkretin, welches die endokrine Pankreassekretion stimuliert und einem Exkretin, welches auf das exokrine Pankreas wirkt. (Zunz 1929; La Barre 1930) In den 1960ern wurde durch die Entwicklung von Radioimmunassays durch Yalow und Berson das Interesse an der Suche nach Inkretinhormonen erneut geweckt. 1964 konnte McIntyre zeigen, dass die Wirkung der Blutglukose auf das Pankreas nicht die gesamte Insulinantwort erklärt (McIntyre 1964). Bei identischen Blutglukosespiegeln führt die intravenöse Glukosegabe zu einer deutlich geringeren Insulinantwort als die orale Glukoseaufnahme (Elrick 1964; Perley 1967). Dieses Phänomen wurde als „Inkretineffekt“ bezeichnet. Unger und Eisentraut vermuteten auf der Grundlage ihrer Untersuchungen, dass ca. die Hälfte der Insulinfreisetzung nach oraler Glukoseaufnahme über eine „entero-insulinäre Achse“ getriggert wird (Unger 1969). Ein wesentlicher Meilenstein bei der Inkretinsuche war die Entdeckung des GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide), einem Peptidhormon, dass in den K-Zellen der Duodenalschleimhaut gebildet und dessen ausgeprägte Insulinfreisetzung in vitro und in vivo nachgewiesen werden konnte (Brown 1969; Brown 1970; Brown 1971). GIP ist jedoch nicht allein für den Inkretineffekt verantwortlich. Ebert konnte 1983 zeigen, dass nach oraler Glukosebelastung von Ratten, bei denen eine in vivo-Immunneutralisation von GIP durchgeführt wurde, dies zu einer 30-50% Reduktion des gesamten Inkretineffekts führte (Ebert 1982; Ebert

1983; Lauritsen 1980). Diese Daten zeigten, dass insulinotrope Aktivität nur teilweise von GIP erklärt werden konnte. Zunächst blieb unklar, welches weitere Peptidhormon zum Inkretineffekt beiträgt. Im Jahre 1985 brachte der Nachweis der insulinotropen Wirkung von Glucagon-like Peptid den Durchbruch. Schmidt et al. beschrieben die wichtigste Wirkung von GLP-1, die glukoseabhängige Insulinfreisetzung (Schmidt et al., 1985). In den darauf folgenden Jahren konnte der insulinotrope Effekt von GLP-1 in zahlreichen weiteren Versuchen bestätigt werden (Holst et al., 1987; Clark et al., 1990; Suzuki et al., 1989; Göke et al., 1993).

1.1.2 Synthese und Sekretion

Das Glucagon-like-Peptid 1 ist ein Peptidhormon mit entscheidender Bedeutung für den Glukosestoffwechsel des menschlichen Körpers. Peptidhormone sind hydrophile biochemische Botenstoffe. GLP-1 entsteht durch die posttranslationale Prozessierung des Proglukagonmoleküls. Das humane Glukagon-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 2. Es ist 9,4 kb lang und enthält 5 Introns und 6 Exons und wird im Pankreas, Darm und Gehirn exprimiert. (Fehmann et al., 1995; Orskov, 1992; Tang-Christensen, 2001)

Die posttranslationale Prozessierung des Proglukagons unterscheidet sich gewebespezifisch. (Conlon, 1988)

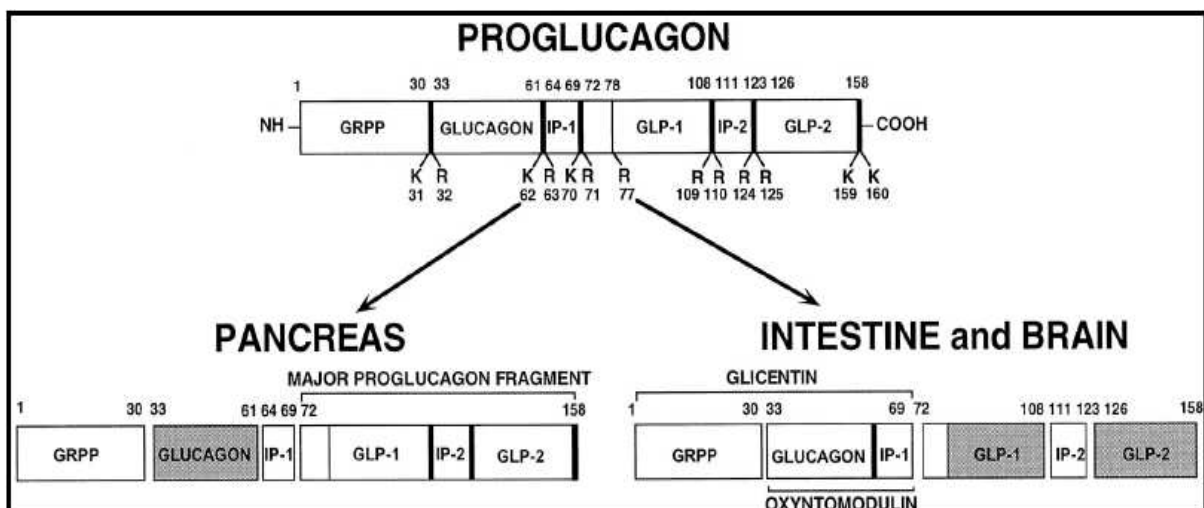


Abbildung a: Gewebsspezifische Prozessierung des Proglukagonmoleküls (entnommen aus Kieffer & Habener, 1999)

Auf diese Weise entstehen aus dem Prohormon das Glicentin-related Pankreatic Peptide (1-30) (GRPP), Glukagon (33-61), das Inverting Peptide-1 (IP-1) (64-69) und das Major Proglukagon Fragment (72-158) (MPGF), welches die Sequenz von GLP-1 und GLP-2 und des Inverting Peptide-2 (IP-2) enthält. Das MPGF wird im Pankreas nicht mehr weiter gespalten. (Thim et al. 1982; Yanaihara *et al.*, 1985; Paetzelt & Schiltz, 1984)

Glukagon ist das Hauptprodukt der Prozessierung des Proglukagonmoleküls, in den A-Zellen des Pankreas. GLP-1 dagegen wird nur in sehr geringen Mengen freigesetzt. (Holst, 1997).

Die Hauptmenge des GLP-1 wird von den L-Zellen des Dünndarmes freigesetzt. (Eissele et al, 1992) In den L-Zellen des Darmes und des Gehirns entstehen aus dem Proglukagon die Spaltprodukte Glicentin (Proglukagon 1-69), GLP-1 (Proglukagon 72-108), Inverting Peptide (Proglukagon 111-123) und GLP-2 (Proglukagon 126-158) (Thim et Moody, 1981; Bataille et al., 1982; Orskov et al., 1986). Aus Glicentin entstehen in einer weiteren Aufspaltung GRPP (Proglukagon 1-30) und Oxyntomodulin (Proglukagon 33-69).

Im weiteren Verlauf werden aus der biologisch inaktiven Form des GLP-1 (1-37) die 6 N-terminalen Aminosäuren abgespalten, so dass die biologisch aktive Form, das GLP (7-37) entsteht.

Rouille et al. konnten 1995 nachweisen, dass ein bestimmtes Enzym, die Proconvertase 2, in den pankreatischen A-Zellen bei der Prozessierung des Proglukagons involviert ist. (Rouille et al., 1995) Bei der Prozessierung in den L-Zellen wird über eine Beteiligung des Enzyms Proconvertase 3 (PC3) diskutiert.

Die GLP-1 Sekretion wird hauptsächlich durch die Nahrungsbestandteile stimuliert. (Creutzfeldt & Nauck, 1992; Elliott et al., 1993; Herrmann et al., 1995; Rocca & Brubaker, 1999). Dabei konnte eine Zunahme der GLP-1 Konzentration im Blut nach der Nahrungszufuhr innerhalb von 15 Minuten nachgewiesen werden, ebenfalls zeigte sich eine proportionale Abhängigkeit zur Zuckermenge. (Ahren et al., 1997) In L-Zellen von Ratten konnte eine Stimulierung der GLP-1 Freisetzung durch die Gabe von GIP (glucose dependent inhibitory polypeptide), GRP (gastrin-releasing peptide) und Bethanechol nachgewiesen werden. Eine Hemmung der GLP-1 Freisetzung

war nach Gabe von Somatostatin nachweisbar. (Brubaker, 1991, Hansen et al., 2000) Es wird über eine potentielle Rolle von Insulin als Inhibitor der GLP-1 Synthese und Sekretion diskutiert. Fischer et. al konnten nachweisen, dass es bei der Behandlung von diabetischen Ratten mit Insulin, zu einer Abnahme der im Blut zirkulierenden Proglucagon-derived-Peptides (GLP-1, GLP-2 und Glukagon) kommt (Fischer et al., 1997).

Die Plasmakonzentrationen von GLP-1, GLP-2 und den weiteren Spaltprodukten von Proglukagon besitzen sehr unterschiedliche Halbwertzeiten. Der basale Plasmaspiegel von GLP-1 beträgt 1,4-2,2 pmol/L (Herrmann et al., 1995). Dieser Wert steigt nach der Nahrungsaufnahme auf 20-30 pmol/L an (Miholic et al., 1991; Ahren et al., 1997).

GLP-1 zeigt eine grosse Homologie in der Aminosäuresequenz zu GLP-2 und Glukagon. Von den 31 Aminosäuren des GLP-1(7-37) sind 14 identisch mit der Sequenz des Glukagons. Die Aminosäuresequenz des GLP-1 ist in verschiedenen Säugetieren wie Mensch, Ratte, Schwein und Rind zu 100% identisch. Es zeigt sich weiter eine sehr hohe Homologie in der Aminosäuresequenz zu GLP-1 bei anderen niederen Vertebraten (Orskov, 1994). Diese strikte Konservierung einer Peptidsequenz im Verlauf der Evolution deutet auf eine wichtige biologische Funktion hin.

1.1.3 Physiologische Wirkungen und therapeutische Möglichkeiten

Die physiologische Wirkung von GLP-1 zeigt sich an Organen, die den spezifischen GLP-1 Rezeptor exprimieren, dies sind Inselzellen des Pankreas, Magen, Lunge, Gehirn, Nieren, Hypophyse, Herz und Dünndarm (Bullock et al. 1996; Campos et al. 1994). Obwohl in Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel kein spezifischer GLP-1 Rezeptor nachweisbar ist, scheint GLP-1 aber auch dort eine Wirkung zu haben (Bullock et al. 1996), diese Wirkung könnte über einen noch nicht identifizierten Rezeptor vermittelt zu werden.

1.1.3.1 Pankreas

Die erste biologische Wirkung die für GLP-1 nachgewiesen wurde, war die Stimulation der glukoseabhängigen Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas.

Dieser Mechanismus bewahrt den Organismus vor Hypoglykämien. (Göke et al., 1993). Diese Tatsache zeichnet GLP-1 als einen potentiellen Wirkstoff zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ II (Non-Insulin-Dependent-Diabetes-Mellitus) aus. Im Jahr 2000 konnten Lugari et al. zeigen, dass bei einigen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine verringerte Sekretion von GLP-1 im Vergleich zu Kontrollprobanden besteht. Dies lässt die mögliche Rolle von GLP-1 in der Pathogenese der Krankheit vermuten (Lugari et al., 2000). Das Peptid GLP-1 bewirkt auf der einen Seite eine direkte Verstärkung der Insulinausschüttung. Eine weitere Wirkung ist die Sensibilisierung der zum Teil glukoseunsensitiv vorliegenden β -Zellen für Glukose, bzw. die Induktion einer Proliferation der β -Zellen. Dies hat zur Folge, dass insgesamt mehr β -Zellen für die Insulinausschüttung zur Verfügung stehen (Fehmann et al., 1991; Holz et al., 1993). Dieser Effekt beruht auf einer direkten Erhöhung der Gentranskription des Proinsulins, was zu einer verstärkten Expression des Insulins in den β -Zellen führt (Fehmann et al., 1994). An isolierten Rattenpankreatata und isolierten Inselzellen konnte zudem eine verminderte Glukagonsekretion nachgewiesen werden (Holst et al. 1994).

Zusätzlich fällt die Insulinausschüttung glukosesensibler β -Zellen auf den Glukosereiz nach GLP-1 Exposition deutlich stärker aus (Göke et al., 2002). Im Tierversuch konnte bei Ratten die protektive Eigenschaft von GLP-1 bezüglich der Wirkung gegen eine altersbedingte β -Zellfunktionsminderung beobachtet werden (Wang et al., 1997; Xu et al., 1999). Zusätzlich wird GLP-1 als ein Differenzierungsfaktor für pankreatische Gangzellen beschrieben, dabei kommt es zu einer Umwandlung von pankreatischen Gangzellen in insulinproduzierende β -Zellen (Hui et al., 2001).

Im Gegensatz zu Sulfonylharnstoffen stimuliert GLP-1 die Genexpression und die Biosynthese von Proinsulin (Fehmann et al. 1992). Bei Individuen mit Diabetes mellitus Typ II verliert GIP seine Inkretinwirkung, während GLP-1 diese Fähigkeit behält, es verbessert sogar bei Patienten mit gestörter Glukosetoleranz die Sensibilität und Reaktionsfähigkeit der β -Zellen auf Glukose (Nauck et al. 1993; Byrne et al. 1998).

Auch auf den α - und δ -Zellen der Inseln konnten GLP-1 Rezeptoren nachgewiesen werden (Heller et al. 1995; Fehmann et al. 1991)

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Glukagon produzierenden α -Zellen des menschlichen Pankreas unter einer tonisch-inhibitorischen Kontrolle von GLP-1 stehen (Schirra et al. 1998) Obwohl GLP-1 in vivo an gesunden Probanden die Glukagonsekretion hemmt (Elahi et al. 1994), konnten Heller et al. zeigen, dass in vitro die Glukagonausschüttung aus den α -Zellen stimuliert wird (Heller et al. 1997).

Sie nehmen an, dass geringe Mengen biologisch aktiven GLP-1 bei nüchternen Probanden auf autokrin/parakrinem Weg über GLP-1 Rezeptoren an α -Zellen die Biosynthese von Glukagon fördern (Heller et al. 1997). Dieser Effekt wird jedoch nach der Nahrungsaufnahme unterdrückt, da die Spiegel für Insulin, Somatostatin und Glukose ansteigen. Diese hemmen kollektiv die Sekretion von Glukagon, die Hemmung der Glukagonsekretion durch GLP-1 in vivo ist wahrscheinlich indirekt auf eine intransulär-parakrin vermittelte Wirkung von Insulin und Somatostatin zurückzuführen.

Auch die Somatostatinfreisetzung am Schweine- und Rattenpankreas wird durch GLP-1 stimuliert (Fehmann et al. 1991; Schmid et al. 1990).

1.1.3.2 Magen

Neben dem endokrinen Pankreas hat GLP-1 einen hemmenden Einfluss auf die Magenentleerung, die Säuresekretion und die Motilität des oberen Dünndarms (Schirra et al. 1997; Wettergren et al. 1997; Schirra et al. 2000). Zusätzlich kommt es zu einer Verstärkung des Sättigungsgefühls (Flint et al. 1998) und zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme (Gutzwiller et al. 1999). Dies setzt voraus, dass GLP-1 in einer Größenordnung vorliegt, die dem postprandialen Plasmaspiegel entspricht (Schjoldager et al. 1989; Wishart et al. 1998). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung über zentrale Vaguskerne gesteuert wird (Wettergren et al. 1997; Schirra et al. 2000).

1.1.3.3 Lunge

Die Rezeptoren von GLP-1 werden in den Membranen von Rattenlungen (Richter et al. 1990; Campos 1994), sowie den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur in großer Dichte exprimiert (Richter et al. 1993). Weiterhin ist mRNA des GLP-1 Rezeptor in humanen Pneumozyten Typ2 nachweisbar

(Bullock et al 1996), dort stimuliert es die Sekretion von Surfactant (Benito et al 1998, Vara et al. 2001).

Die Behandlung von Tracheen und Pulmonalarterien von Ratten mit GLP-1 führte zur Relaxierung der glatten Muskulatur und zu einer Inhibierung der Schleimproduktion (Richter et al. 1993). Insgesamt ist die Funktion von GLP-1 in der Lunge aber noch unklar. Die Tatsache, dass der GLP-1 Rezeptor in der Lunge so stark vertreten ist, deutet jedoch auf eine wichtige physiologische Funktion hin. Körner et al. konnten 2007 zeigen, dass die GLP-1 Rezeptor Dichte in Pankreas, Darm, Lunge, Niere und Gehirn im menschlichen Körper niedriger zu sein scheint als bisher angenommen. In den Lymphknoten, Milz, Leber und Nebennieren konnten keine Rezeptoren nachgewiesen werden (Körner M. et al., 2007).

1.1.3.4 Gehirn

Im Gehirn von Ratten, Primaten und Menschen konnte GLP-1 in den Zellen der Medulla oblongata (Shimizu et al. 1987; Larsen et al. 1997), der Formatio reticularis, im Nucleus solitarius (Larsen et al. 1997; Rinaman 1999) und in der Hypophyse (Göke et al. 1995) nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde mit Hilfe der in situ Hybridisierung bei Ratten GLP-1 Rezeptor mRNA im Hypothalamus nachgewiesen (Bullock et al. 1996; Navaro et al. 1996). Eine Funktion ist die Inhibierung der Nahrungs- und Wasseraufnahme, sowie die Appetitminderung bei Säugern (Toft-Nielsen et al. 1999), diese Funktion ist auf die Anwesenheit des GLP-1 Rezeptors im Hypothalamus und die lokale Produktion und Prozessierung von Proglukagon zurückzuführen (Turton et al. 1996, Zander et al. 2001). Durch RT-PCR Klonierung konnten Wei et al. die Expression von GLP-1 Rezeptoren im menschlichen Gehirn nachweisen und zum anderen zeigten sie, dass diese Rezeptoren die identische Aminosäuresequenz wie der GLP-1 Rezeptor des Pankreas besitzen (Wei et al. 1995).

1.1.3.5 Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe

Umstritten ist die Existenz von GLP-1 Rezeptoren in Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe. Wheeler et al. zeigten 1993 an Northern Blot Analysen der

RNA von Ratten, dass GLP-1 Rezeptoren in geringem Ausmaß in diesen Organen exprimiert wird (Wheeler et al. 1993). Mit sensitiveren Methoden wie RNase protection assay und RT-PCR konnte die Rezeptor-mRNA von GLP-1 in Pankreasinseln, Lunge, Gehirn, Magen, Herz und Niere, nicht jedoch in Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe nachgewiesen werden (Wei 1995, Bullock et al. 1996). Obwohl in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, dass Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe keine GLP-1 Rezeptoren exprimieren, löst die Gabe von GLP in diesen Organen eine anabole Wirkung aus. In Myozyten und Adipozyten fördert es die Glukoseaufnahme in die Zellen (Hansen,-B-F et al. 1998). An Hepatozyten und Myozyten stimuliert es die Glykogensynthese (Lopez-Delgado et al. 1998). Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein noch unbekannter GLP-1 Rezeptor oder eine Isoform des schon bekannten Rezeptors sein.

1.1.3.6 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

GLP-1 spielt auch eine Rolle im Zusammenhang mit der körperlichen Stressantwort. Im Hypothalamus wirkt es inhibierend auf die stressinduzierte ACTH-Ausschüttung der Hypophyse (Nussdorfer et al. 2000, Göke et al. 1995). In den Zellen der Zona fasciculata und der Zona reticularis führt dies zum Inhibieren einer PKA-Kaskade. Ein Einfluss auf den basalen Corticosteron Spiegel wird nicht beobachtet.

1.1.3.7 Schilddrüse

Der GLP-1 Rezeptor konnte auch an α -TSH Zellen von thyreotropen Rattenzelllinien nachgewiesen werden (Beak et al. 1996). GLP-1 bewirkt an diesen Zellen einen Anstieg von cAMP. An isolierten Zellen des Hypophysenvorderlappens der Ratte bewirkt GLP-1 dosisabhängig die Sekretion von TSH (Beak et al. 1996).

Des Weiteren konnte an einer CA-77 Zelllinie aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom der Ratte gezeigt werden, dass GLP-1 über seinen Rezeptor die Calcitonin Sekretion stimuliert. An einem Perfusionsmodell mit Ratten bewirkt GLP-1 die kalziumabhängige Calcitoninsekretion der Schilddrüse (Crespel et al. 1996, Lamari et al. 1996).

1.1.3.8 Kardiovaskuläres System

Bojanowska et al. konnten an Wistar-Ratten zeigen, dass die systemische GLP-1 Gabe den arteriellen Blutdruck steigert, sowie den Vasopressin- und Oxytocinspiegel im Blut anhebt (Bojanowska et al. 2000). Barragan et al. zeigten am Rattenmodell, dass GLP-1 und Exendin-4 nach i.v.-Gabe einen dosisabhängigen, steigernden Effekt auf den systolischen und diastolischen Blutdruck sowie auf die Herzfrequenz haben. Dabei wirkt Exendin-4 länger als GLP-1 und Exendin-4 (9-39) antagonisiert diese Wirkung. Die alleinige Gabe von Exendin-4 (9-39) hat keine Wirkung. Barragan et al. 1996). Zueco et al. zeigten im Rattenmodell die Kollokalisierung der mRNA des GLP-1 Rezeptors und von Vasopressin und Oxytocin im Nucleus paraventricularis und im Hypothalamus (Zueco et al. 1999). GLP-1 stimuliert darüber hinaus im Hypothalamus die Arginin-Vasopressin-Ausschüttung (Nussdorfer et al. 2000). 1999 konnten Barragan et al. zeigen, dass GLP-1 verschiedene Kreislaufparameter stimuliert. Es wirkt über eine zentrale und eine periphere Steuerung, die über den Vagus miteinander in Kontakt stehen (Barragan et al. 1999). Bei gesunden Probanden konnte ein Blutdruckanstieg in Abhängigkeit zur Konzentration von i.v. verabreichtem GLP-1 beobachtet werden (Edwards et al. 1998).

1.1.4 Der GLP-1 Rezeptor

Der spezifische GLP-1 Rezeptor wurde 1988 erstmals auf der Ratteninsulinom-Zelllinie RINm5F und später auch auf weiteren Insulinom-Zelllinien und Plasmamembranen menschlicher Insulinomzellen nachgewiesen (Göke et al. 1988; Gallwitz et al. 1993; Lankat-Buttgereit et al. 1994). Die Expression des GLP-1 Rezeptors wurde in den darauffolgenden Jahren in verschiedenen Geweben des Magen-Darm-Traktes, im Hypothalamus, in Lunge, Leber, Muskelgewebe und in den Nieren nachgewiesen (Thorens et al. 1993; Alvarez et al. 1996, Göke et al. 1996). Das Gen für den humanen Rezeptor ist auf dem Chromosom 6p21 lokalisiert (Stoffel et al 1993). Dieser Rezeptor besitzt ein relatives Molekulargewicht von 63kDa (Göke et al. 1989). Die Klonierung des menschlichen GLP-1 Rezeptors zeigte, dass dieser aus 463 Aminosäuren mit

sieben hydrophoben Anteilen besteht, die jeweils eine transmembrane Domäne repräsentieren. Er gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR). GPCR sind Proteine, die mit Hilfe von trimerischen GTP-bindenden G-Proteinen Signale von der Zelloberfläche an das Zellinnere weitergeben. Durch die Aktivierung eines G-Proteins wird eine intrazelluläre Veränderung der Enzymkonzentration oder der Ionenpermeabilität der Zellmembran bewirkt. Dies wiederum löst eine Signalkaskade in der Zelle aus. (Alberts et al. 1994).

Die GLP-1 Rezeptoren von Mensch und Ratte sind zu 90% identisch. (Göke et al. 1988; Thorens 1992; Graziano et al. 1993; Dillon et al. 1993; Van Eyll et al. 1994).

Montrose-Rafizadeh et al. konnten Gs-, Gi- und Gq-Proteine für den GLP-1 Rezeptor nachweisen (Montrose-Rafizadeh et al. 1999). Gs aktiviert die Adenylatzyklase und Ca²⁺-Kanäle. Gi hemmt die Adenylatzyklase und aktiviert K⁺-Kanäle und Gq aktiviert die Phospholipase C-β (Alberts et al. 1994).

Die gewebespezifische Expression der GLP-1 Rezeptoren wird durch einen Promotor vermittelt, dessen Feinregulierung durch spezifische Transkriptionsfaktoren erreicht wird (Lankat-Buttgereit et al. 1997; Galehshahi et al. 1998; Wildhage 1999).

1.1.5 Stoffwechsel von GLP-1

GLP-1 wird über verschiedene Mechanismen im Organismus metabolisiert. Die Halbwertszeit von GLP-1 wird mit 5,3±0,4 Minuten für GLP-1 (7-37) und 6,1±0,8 Minuten für GLP-1 (7-36) angegeben (Osklov et al. 1993). Das bioaktive GLP-1 wird durch N-terminale Abspaltung der Aminosäuren Histidin und Alanin von DPP IV degradiert (Rahfeld et al. 1991). Als Spaltprodukte entstehen die biologisch inaktive Formen GLP-1(9-36)amid und GLP-1(9-37)amid (Kieffer et al., 1995; Deacon et al., 1995; Hansen et al., 1999). Dipeptidylpeptidase-IV wird im Magen-Darm-Trakt und im vaskulären Endothel gebildet und ist in Hepatozyten nachweisbar (Deacon 1996). Dies erklärt die Tatsache, warum ein großer Teil des GLP-1 im Blut, in der N-terminal abgespaltenen inaktiven Form vorliegt (Hansen et al. 1999). Im Tierversuch mit genetisch veränderten Mäusen, die einen Defekt in der Expression von DDP-IV haben, konnten höhere Konzentrationen an aktivem GLP-1 sowie eine erhöhte Glukoseverstoff-

wechselung beobachtet werden (Marguet et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Eliminierung von GLP-1, ist die Ausscheidung über die Nieren, durch glomeruläre Filtration und den tubulären Katabolismus (Ruiz-Grande 1993). So wurden bei niereninsuffizienten, urämischen Patienten höhere GLP-1 Spiegel im Blut nachgewiesen als bei nierengesunden Probanden (Orskov et al. 1992). GLP-1 wird auch nach der Bindung an den GLP-1 Rezeptor inaktiviert, genauere Untersuchungen zu diesem Vorgang stehen noch aus. Des Weiteren wird GLP-1 mit Hilfe der neutralen Endopeptidase 24.11 (NEP 24.11), einer membrangebundenen Ektopeptidase und durch die Aminopeptidase N inaktiviert (Hupe-Sodmann et al 1995, 1997).

1.1.6 GLP-1 assoziierte Erkrankungen

Die Rolle einer erhöhten GLP-1 Sekretion bei gastrektomierten Patienten mit Dumping-Syndrom wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Es konnte eine erhöhte Sekretion von GLP-1, 30 Minuten und Insulin, 60 Minuten nach oraler Glukosebelastung nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang von GLP-1 mit der reaktiven Hypoglykämie bei Patienten mit Dumping Syndrom wird vermutet (Gebhard et al. 2001; Yamamoto et al. 2005).

Die Auswirkungen der Unter- bzw. Überregulation der GLP-1-Sekretion auf die Entstehungsprozesse der Adipositas werden kontrovers diskutiert. Bei fettleibigen und bei diabetischen Probanden konnte eine herabgesetzte Sekretion von GLP-1 nach oraler Nahrungsaufnahme nachgewiesen werden (Ranganath et al. 1996; Vaag et al. 1996; Reinehr et al. 2007; Chanoine et al. 2008). Es gibt aber auch Publikationen, die bei fettleibigen und diabetischen Probanden erhöhte GLP-1-Konzentrationen nach einer Nahrungsaufnahme beschreiben. (Fukase et al. 1995; Rubio et al. 2008). Es bedarf weiterer Untersuchungen um den möglichen Zusammenhang zwischen der Dysregulation von GLP-1 und Adipositas und Diabetes nachzuweisen.

1.2 Diabetes mellitus

1.2.1 Einteilung

Gemäß der seit 1997 geltenden Nomenklatur der American Diabetes Association (ADA) wird Diabetes mellitus in 4 Kategorien eingeteilt.

Ein Diabetes vom Typ 1 ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet, hervorgerufen durch eine autoimmune Zerstörung der pankreatischen β -Zellen. Diese Form des Diabetes beginnt meist in der Jugend oder im frühen Erwachsenenalter. Typ 1-Diabetiker machen ca. 5-10 % aller Diabetiker aus.

Über 90 % der Diabetiker in den westlichen Industrienationen sind Typ 2-Diabetiker

Diese Form der Erkrankung beginnt meist nach dem 40. Lebensjahr, allerdings tritt Typ 2-Diabetes aufgrund geänderter Lebensgewohnheiten zunehmend auch schon in jüngeren Lebensjahren auf. Prädisponierend für die Entwicklung eines Typ 2-Diabetes ist das metabolische Syndrom, das durch Adipositas, Dyslipoproteinämie und Hypertonie definiert ist.

Kennzeichnend für Typ 2-Diabetes ist eine Insulinresistenz, die nicht mehr durch vermehrte Insulinsekretion kompensiert wird, dies bezeichnet man als relativen Insulinmangel.

Eine eigene Kategorie in der Diabetes-Einteilung stellen alle Formen des Gestationsdiabetes dar. Bedingt möglicherweise durch die hormonelle Belastungssituation entwickelt sich bei 6 % aller Schwangerschaften ein reversibler oder auch irreversibler Diabetes ähnlich dem eines Typ 2-Diabetes. Risikofaktoren sind höheres Alter und Adipositas der Mutter und Diabetes in der Familienanamnese. Unbehandelt nimmt das Risiko von Frühgeburten, erhöhtem Geburtsgewicht sowie gesteigerter perinataler Morbidität und Mortalität des Neugeborenen zu. Außerdem ist Typ 2-Diabetesrate bei den Kindern erhöht (Lang et Linn, 2001).

Die 4. Kategorie umfasst alle anderen spezifischen Formen des Diabetes mit bekannter Ursache. Hierzu zählt man MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), 2-3 % aller Diabetiker, eine Zusammenfassung verschiedener monogenetischer Erkrankungen (z.B. Mutation im Glucokinase-Gen auf

Chromosom 7), die autosomal-dominant vererbt werden und sich meist vor dem 25. Lebensjahr manifestieren. Zu den sekundär bedingten Diabetesformen gehören des Weiteren noch genetische

Defekte des Insulin-Rezeptors, endokrine Erkrankungen (Morbus Cushing, Hyperthyreose) oder Erkrankungen des Pankreas (Pankreatitis, Pankreatektomie, Mucoviszidose). Auch durch Pharmaka wie Glucocorticoide, β 2-Blocker oder Diazoxid kann ein sekundärer Diabetes ausgelöst werden.

1.2.2 Klinik und Epidemiologie

Diabetes mellitus ist nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft eine heterogene Stoffwechselstörung, mit dem Leitbefund der chronischen Hyperglykämie. Nach Definition der American Diabetes Association (ADA) liegt ein Diabetes mellitus vor, wenn die Glucosekonzentration im Plasma nüchtern ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) oder 2 Stunden nach oraler Belastung mit 75 g Glucose ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) ist.

Zu den Ursachen zählen eine gestörte Insulinsekretion, eine gestörte Insulinwirkung oder beides.

Weir et al. beschreiben fünf Stufen in der Entstehung des Diabetes, die jeweils von unterschiedlichen Veränderungen der Betazellmasse gekennzeichnet sind. Die erste Stufe ist die Stufe der Kompensation. Sie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Insulinsekretion um die Normoglykämie bei Insulinresistenz bzw. Abnahme der Betazellmasse aufrecht zu halten.

Stufe zwei tritt auf bei steigenden Blutzuckerspiegeln mit Werten zwischen 5.0–6.5 mmol/l. Die dritte Stufe ist relativ instabil. Sie ist gekennzeichnet durch eine frühe Dekompensation mit weiter ansteigenden Blutzuckerspiegeln. Diese Stufe geht rasch in die vierte Stufe des Diabetes über.

Die vierte Stufe des Diabetes wird als Phase der stabilen Dekompensation bezeichnet. In diesem Stadium lassen sich schwere Betazellendifferenzierungen nachweisen. Die fünfte Stufe ist durch einen weiteren Verlust von Betazellmasse charakterisiert. Typischerweise finden sich Blutzuckerspiegel von >22 mmol/l (350 mg/dl). Das Auftreten einer Ketose ist für diese Stufe charakteristisch.

Der Wechsel zwischen den verschiedenen Stufen des Diabetes ist von Stufe 1 – 4 in jeder Richtung möglich. Für gut therapierte Typ 1 Diabetiker kann eine Remission von Stufe 4 in Stufe 2 erreicht werden (Weir et al. 2004).

Der Diabetes mellitus ist in den westlichen Industrieländern die bedeutendste Stoffwechselerkrankung. In Deutschland betrug die Prävalenz von Diabetikern im Jahr 2006 nach Angaben der WHO ca. 2,6 Millionen. Diese Zahl wird bis zum Jahr 2030 auf ca. 3,7 Millionen ansteigen. Weltweit betrug die Zahl der Erkrankten im Jahr 2000 ca. 171 Millionen mit einer Prävalenz von 2,8%. Nach Schätzungen der WHO wird die Zahl der Diabetiker bis 2030 auf ca. 366 Millionen mit einer Prävalenz von 4,4% ansteigen (World Health Organization (WHO), 2007).

Bei einer weltweiten Inzidenz von ca. 7 Millionen Menschen, sterben pro Jahr ca. 3,2 Millionen Menschen an den Folgen der Erkrankung (World Health Organization (WHO), 2007).

Diabetes mellitus ist eine der teuersten chronischen Erkrankungen in Deutschland. Im Jahr 2001 beliefen sich die Gesamtkosten für die Behandlung von Diabetikern auf ca. 23 Milliarden Euro. Insgesamt entfallen 14,2% aller Ausgaben im Gesundheitssystem auf Patienten mit Diabetes (Koster et al. 2006).

Aufgrund der vielfältigen Wirkungen des Insulins im Kohlenhydrat-, Lipid-, Protein- und Elektrolytstoffwechsel kann es bei dieser Erkrankung zu lebensbedrohlichen akuten (ketoazidotisches und hyperosmolares Koma) und späten (Mikro- und Makroangiopathie) Komplikationen kommen, so dass Diabetiker neben einer Beeinträchtigung der Lebensqualität auch eine im Mittel um 5 Jahre verkürzte Lebenserwartung im Vergleich zu Nicht-Diabetikern aufweisen (Janka et al., 2000)

Mit einer Häufigkeit von 40 % ist der Herzinfarkt die an erster Stelle stehende Todesursache bei Diabetikern (Geiss et al., 1995).

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 ist eine so genannte Drei-Säulen Therapie, die sich aus Gewichtsreduktion, einer Steigerung der Insulinverfügbarkeit und einer Senkung des Insulinbedarfs zusammensetzt (Chehade et al. 2000). Die Maßnahmen zur Gewichtsreduktion reichen häufig

nicht aus, um eine ausgeglichene Glukosehomöostase zu erzielen. Eine Steigerung der Insulinverfügbarkeit ist durch Gabe von Insulin oder seiner Analoga zu erreichen. Eine indirekte Verbesserung der Insulinverfügbarkeit lässt sich durch die Gabe von Sulfonylharnstoffen oder Meglitiniden erreichen. Leider sprechen 10 – 15% der Patienten primär nicht auf die Therapie mit Sulfonylharnstoffen an, die Zahl der sekundären Therapieversager liegt bei 5 – 10 % (Groop et al. 1986).

Die dritte Säule, Senkung des Insulinbedarf, kann man durch eine gesteigerte Insulinsensitivität von Muskel-, Fett- und Leberzellen oder durch eine gehemmte Glukoseresorption im Darm erreichen. Die Insulinsensitivität erreicht man durch die Gabe von Biguaniden oder Thiazolidindionen. Aufgrund der Lebertoxizität und kardialer Nebenwirkungen sind Thiazolidindione in den letzten Jahren in die Diskussion gekommen (Dromandy et al. 2005). Das Thiazolidindion Troglitazon wurde aufgrund seiner Lebertoxizität vom Markt genommen (Gale et al. 2001).

Metformin ist das am besten untersuchte Biguanid. Unter Einnahme dieses Medikaments ist weder ein erhöhtes Hypoglykämierisiko zu beobachten, noch wird eine Gewichtszunahme beschrieben (Strack et al. 2008) Bei 9 von 100000 behandelten Patienten pro Jahr tritt die schwere Komplikation der Laktatazidose auf, die zu Nierenversagen und sogar zum Tod führen kann. (Stang et al. 1999).

α -Glukosidasehemmer wie Arcabose hemmen die Verdauung von Kohlenhydraten im Darm. Dadurch wird Glukoseaufnahme aus dem Darm verlangsamt und man erreicht eine Abflachung der postprandialen Spitze der Glukosekonzentration im Blut. Zusätzlich konnten Hanefeld et al. zeigen, dass die Einnahme von Arcabose bei Typ 2 Diabetikern die Cardiovasculären Ereignisse senkt (Hanefeld et al. 2008). Holman et al. zeigten im Jahr 1999, dass unter Arcabosetherapie das HbA1c nach 3 Jahren nur auf 8,1%, im Vergleich zu 8,6% bei Placebo gesenkt werden konnte (Holman et al. 1999).

Da es bisher keine optimale Therapie für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ II gibt, scheint das Inkretin GLP-1 eine vielversprechende Möglichkeit zu sein.

1.2.3 Probleme der Diagnostik

In den letzten Jahren ist es zu einem starken Anstieg der Inzidenz des Typ I Diabetes besonders bei Kindern unter 5 Jahren gekommen (EURODIAB ACE Study Group. (2000), Lancet, 355, 873). Der Autoimmun-Prozess beim Typ I führt dazu, dass spezifische Antikörper (IA-2, GAD, Inselzell-AK) gegen bestimmte Antigene der Inselzelle gerichtet werden. Diese treten gewöhnlich vor dem 5. Lebensjahr auf. (Pfützner et al. 1995). Die Latenz des ersten Auftretens von Antikörpern bis zum Auftreten klinischer Symptome schwankt zwischen Jahren bis Dekaden. In der prädiabetischen Phase nimmt die Insulinsekretionskapazität des Pankreas ab. In dieser Zeit werden jedoch keine erhöhten Blutzuckerwerte gemessen. Zur Frühdiagnose des Typ I Diabetes in der prädiabetischen Phase existiert bislang nur der intravenöse orale Glucosetoleranztest (ivGTT), der eine veränderte Insulinfreisetzungskinetik nachweist und selbst bei optimaler Standardisierung eine nur geringe Sensitivität besitzt (Mrena et al. 1999). Zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation besitzt der Pankreas in der Regel nur noch 10 - 20 % seiner ursprünglichen β -Zell-Masse. In der Literatur gibt es gute Evidenz, dass der Erhalt dieser residualen β -Zell-Masse erhebliche klinische Vorteile mit sich bringt und den Einsatz unterschiedlicher Interventionsstrategien rechtfertigt (Rasmussen et al. 2000; Kolb et al. 2001; Larsen et al. 2004) Die "Diabetes Control and Complication"-Studie belegt eindeutig, dass eine residuale Insulinsekretion mit einer besseren Glukosekontrolle, weniger Hypoglykämien und weniger Folgeerkrankungen einhergeht (Ann Intern Med (1998). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine residuale C-Peptid-Sekretion einen positiven Einfluss auf rheologische Parameter, wie z.B. die Erythrozytenverformbarkeit und den mikrovaskulären Blutfluss hat (Schneider et al. 1999; Forst et al. 2000). Obwohl also eine frühzeitige Intervention bzw. der Versuch der Toleranzinduktion dringend notwendig erscheinen, bleibt der Prädiabetes eine diagnostische Grauzone. Während die Bauchspeicheldrüse als Gesamtorgan in bildgebenden Verfahren wie Sonographie, MRT und Spiral-CT dargestellt werden kann, entzieht sich der endokrine Anteil des Pankreas bislang komplett der bildgebenden Diagnostik. Neue Verfahren zur Visualisierung der β -Zell-Masse und Erkennung der prädiabetischen Vorlaufphase werden daher

dringend benötigt.

Die nicht-invasive Darstellung der β -Zellen wäre somit von hoher wissenschaftlicher und diagnostisch-klinischer Relevanz und würde letztendlich für den klinischen Alltag einen erheblichen Beitrag leisten.

1.2.4 GLP-1 als Therapeutikum bei Diabetes mellitus Typ

In den vergangenen Jahren wurden vermehrt GLP-1 Rezeptor Agonisten als Therapeutikum in der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 (DM Typ 2) eingesetzt. GLP-1 Rezeptor Agonisten besitzen im Vergleich zu anderen Therapeutika zur Behandlung von DM Typ 2 viele Vorteile. So kommt es zu einer glukoseabhängigen Steigerung der Insulinsekretion, damit wird die Gefahr der Hypoglykämie bei einer Überdosierung gesenkt. Unterhalb eines Blutzuckerspiegels von 110mg/dl (6 mmol/l) wurde selbst bei supraphysiologischer GLP-1 Infusion keine Steigerung der Insulinfreisetzung beobachtet. Dies lässt vermuten, dass eine GLP-1 provozierte Hypoglykämie nicht zu befürchten ist (Göke et al. 1993).

Weitere Wirkungen sind die Hemmung der Glukagonausschüttung und die Verlangsamung der Magenentleerung (Holst et al. 1999, 2002). Neben diesen Eigenschaften stimuliert GLP-1 die β -Zellneogenese und hemmt die β -Zellapoptose (Gallwitz 2005; Farilla et al. 2002), reduziert den Appetit und die Nahrungsaufnahme (Naslund et al. 1999) und hat Auswirkungen auf die Insulinsensitivität und die Glukoseutilisation (D'Alessio et al. 1994).

Ein Problem in der Anwendung von GLP-1 als Therapeutikum ist die in Kapitel 1.1.5. erwähnte kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten, durch die rasche N-terminale Degradierung mittels DDP-IV (Rahfeld et al. 1991).

Um dem schnellen Abbau durch die DPP-IV entgegen zu wirken, wurden zwei neue Substanzklassen, die Inkretinmimetika und die Dipeptidylpeptidase-IV-Inhibitoren entwickelt. Dabei wirken die Inkretinmimetika ähnlich dem GLP-1, unterliegen aber wegen struktureller Unterschiede nicht dem Abbau durch die DPP IV. Die DPP-IV-Inhibitoren hemmen die Peptidase direkt (Ahren et al. 2005). Durch die Inhibition von DPP-IV mittels eines DPP-IV-Antagonisten kann die Halbwertszeit von GLP-1 gesteigert werden (Holst et al. 1998).

Ein weiteres GLP-1 Analogon ist Liraglutide, ein acetyliertes GLP-1 Analogon

mit einer nicht kovalenten Bindung an Albumin. Es besitzt ein besseres pharmakokinetisches Wirkprofil als GLP-1. Aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 14-18 Stunden, muss es nur einmal täglich subkutan injiziert werden (Knudsen et al. 2000; Elbrond et al. 2002; Sturis et al. 2003; Degn et al. 2004; Nauck et al. 2006; Raun et al. 2007).

Bei den Inkretinmimetika gilt es Exenatide zu erwähnen. Diese Substanz besteht aus Exendin-4, einem aktiven Peptid aus dem Speichel der Echse *Heloderma suspectum*, welches die antidiabetogenen Eigenschaften von GLP-1 besitzt. Exendin-4 ist ein Peptid aus 39 Aminosäuren mit einer 52 prozentigen Sequenzidentität gegenüber GLP-1. Es bindet als Agonist an den GLP-1 Rezeptor (Eng et al. 1992; Chen et al. 2006). Trotz bestehender Gemeinsamkeiten weisen Exendin-4 und GLP-1 Unterschiede in der Halbwertszeit und der glukoseabhängigen Insulinausschüttung auf. Nach subkutaner Injektion beträgt die metabolische HWZ von Exendin-4 2,4 Stunden. Die Bioverfügbarkeit liegt bei 65 - 70%. In aktuellen klinischen Studien konnte die antidiabetogene Wirkung von Exendin-4 bei Typ 2 Diabetikern belegt werden (Cvetkovic et al. 2007, Buse et al. 2007). Es wurde jedoch auch die Bildung von Antikörpern gegen Exendin-4 beschrieben, ob daraus eine Toleranzwirkung resultiert ist unklar (Buse et al. 2004; Kendall et al. 2005).

Im April 2005 erhielt Exenatide der Firma Amylin Pharmaceuticals unter dem Namen Byetta[®] die Zulassung der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Anwendung in Kombinationstherapie mit Metformin und/oder Sulfonylharnstoffen. Von der Europäische Arzneimittelagentur (EMA) wurde Exenatide durch die Firma Eli Lilly Nederland B.V. im November 2006 zugelassen. Seit April 2007 ist es in Deutschland verfügbar. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine dauerhafte Anwendung von Byetta[®] zu einer Pankreatitis führen kann.

1.3 Neuroendokrine Tumoren (NET)

Viele neuroendokrinen Tumoren exprimieren an ihrer Zelloberfläche GLP-1 Rezeptoren, aus diesem Grund sind sie für diese Arbeit von besonderem Interesse.

Neuroendokrine Tumoren leiten sich von speziellen Zellen ab, die den endokrinen Anteil des Nervensystems bilden und neuroektodermalen Ursprungs sind. In ihrer Gesamtheit nennt man sie disseminiertes neuroendokrines System (DNES).

Eine veraltete Bezeichnung dieser Zellen ist APUD-System (amine precursor uptake and decarboxylation – System), diese Bezeichnung hängt mit der Gemeinsamkeit dieser Zellen zusammen. APUD-Zellen sind in der Lage aufgenommene Substanzen zu Aminen zu dekarboxylieren. Die Bezeichnung APUD-Zellen wird heute nicht mehr verwendet, da sie sich nur auf histochemische und nicht auf funktionelle Eigenschaften bezieht.

Heute sind ca. 40 Zellarten bekannt, die zum DNES gezählt werden. Zu ihnen gehören die hormonproduzierenden Zellen des Hypothalamus, der Pinealdrüsen, der Lunge, des Nebennierenmarks, die C-Zellen der Schilddrüse, endokrin aktive Zellen der Plazenta und der Magen-Darm-Schleimhaut, Zellen des Sympathikus und Melanoblasten. Tumoren die aus diesem System entstehen werden als neuroendokrine Tumoren (NET) zusammengefasst. Die veraltete Bezeichnung ist APUDome (Klöppel et al. ,1995)

Das gemeinsame Merkmal der NET ist die ungehemmte Hormonsekretion, die zu spezifischen Krankheitssymptomen führen kann. Anhand dieser Hormonsekretion lassen sich die NET weiter unterteilen in funktionelle und nicht-funktionelle Tumoren.

Zu den funktionellen Tumoren werden solche gezählt, die durch ihre Hormonproduktion Symptome hervorrufen. Abhängig von der Hormonproduktion werden diese dann als Insulinome, Gastrinome usw. bezeichnet. Circa 15% - 30% der NET weisen eine solche Hormonproduktion nicht auf und werden deshalb zu den nicht-funktionellen NET gerechnet. (Ramage, 2005)

Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass die Prävalenz von NET im allgemeinen Autopsiematerial deutlich höher ist als die klinische Prävalenz. (Kimura et al. 1999 ; Berge & Linell, 1976)

Die klinische Prävalenz NET beträgt 3 / 100.000, es ist jedoch auffällig, dass Frauen häufiger betroffen sind. (Hemminki & Li, 2001a,2001b ; Levi et al. 2000)
Das neuroendokrine Tumoren des Pankreas in über 50% der Fälle mehr als ein

Hormon produzieren, konnten Wynick et al., bereits 1988 immunhistochemisch nachweisen. Dies warf nun die Frage auf, warum es trotz diverser synthetisierter Peptide eines Tumors immer zu denselben spezifischen Symptomen eines Tumors kommt. Insulinome z.B. produzieren neben Insulin auch Glucagon, Somatostatin, Gastrin, pankreatisches Polypeptid und ACTH-ähnliche Stoffe. (Heitz et al., 1982)

Ein Erklärungsversuch wäre, dass Hormone, die keine Symptome verursachen, in einer biologisch inaktiven Form sezerniert werden. Ein zweiter Erklärungsversuch liefern Jensen et Norton mit der These, dass nur ein Hormon in einer ausreichenden Konzentration sezerniert wird, welches in der Lage ist, Symptome zu verursachen (Jensen et Norton, 1999).

Neuroendokrine Tumoren sind generell langsam wachsende Karzinome, eine der wenigen Ausnahmen stellt das kleinzellige Bronchialkarzinom dar.

1.3.1 Neuroendokrine Tumoren des Gastroentero-Pankreatischen Systems (GEP)

In Abhängigkeit von der Lage des Primärtumors unterscheidet man nach den embryologischen und tumorbedingten Kriterien zwischen:

- Vorderdarntumoren
 - vom Ösophagus bis zum Treitz-Band
 - Pankreas, Magen, Duodenum
- Mitteldarntumoren
 - vom Treitz-Band bis zur rechten Kolonflexur
 - Jejunum, Ileum, Appendix, Zökum, Colon ascendens
- Hinterdarntumoren
 - distal der rechten Kolonflexur
 - Colon transversum bis Rektum

1.3.1.1 Neuroendokrine Tumoren des Pankreas

Zu den neuroendokrinen Tumoren des Pankreas zählen Insulinome, Gastrinome, VIPome, Karzinoide und Glukagonome.

Der häufigste neuroendokrine Pankreastumor ist mit über 90% das Insulinom (Roher et al., 1997). Er leitet sich aus den pankreatischen β -Zellen ab und ist in

mehr als 90% der Fälle benigne (Modlin et Tang, 1997). Zusammenfassend kann man sagen, dass 15 bis 30% der im Pankreas vorkommenden Neuroendokrinen Tumoren als endokrin nicht aktiv betrachtet werden (Modlin et Tang, 1997).

Insulinome treten in der Regel solitär im oder am Pankreas auf und sind in den meisten Fällen kleiner als 1,5cm. In seltenen Fällen sind Primärtumoren im Duodenum, Ileum und der Lunge beschrieben worden (Jensen et Norton, 1999). In ca. 10% der Fälle treten Insulinome multiple auf, sie werden dann zu den multiplen endokrinen Neoplasien (MEN) Typ 1 gezählt (Reubi et al., 2003).

Die klinische Symptomatik der Insulinome hängt in erster Linie mit der gesteigerten Insulinausschüttung zusammen und wird durch die Whipple Trias beschrieben. Diese äußert sich in folgenden drei Kardinalsymptomen:

- Spontanhypoglykämien (<30 mg/dl oder 1,65 mmol/l)
- autonome und neuroglukopenische Symptome
- schlagartige Besserung durch i.v. Glukosezufuhr

Die durch die Insulinausschüttung hervorgerufenen autonomen Symptome äußern sich in Reaktionen wie Zittern, Schweißausbruch, Tachykardie, Blutdruckanstieg, innerer Unruhe, Hyperventilation und Wärmegefühl. Die neuroglukopenischen Reaktionen zeigen sich in Symptomen wie Schwindel, Kopfschmerzen, Verwirrtheit, Denk- und Sprechstörungen, Konzentrationsschwäche, Hypothermie, Krämpfe bis hin zu Atem- und Kreislaufinsuffizienz. Aufgrund der neuroglukopenischen Symptome werden Insulinome häufig als neuropsychiatrische Erkrankungen fehldiagnostiziert. Der hypoglykämisch bedingte Heißhunger führt bei vielen Patienten zu einer Gewichtszunahme. Typisch ist die prompte Besserung der Symptome nach oraler oder intravenöser Gabe von Glukose.

Glukagonome treten häufig als solitäre Tumoren im Pankreas auf. Sie entstehen aus den α -Zellen des endokrinen Pankreas. Nur weniger als 15% aller Patienten sind jünger als 40 Jahre. Männer und Frauen sind von der Erkrankung in gleichem Maße betroffen (Delcore et al., 1994).

Im Gegensatz zu Insulinomen und Gastrinomen sind Glukagonome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oft schon sehr gross (ca. 5-10cm).

Glukagonome metastasieren sehr früh, bei ca. 66% der Neubildungen liegen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Metastasen vor. Die typische Symptome von Glukagonomen sind:

- Spezifische Dermatitis (nekrolytisch migrierendes Erythem)
- Gewichtsverlust
- Glukoseintoleranz
- Anämie

Therapeutisch kommt kurativ nur die chirurgische Therapie in Betracht (Thompson & Townsend, 2004). Sind die Tumoren inoperabel beschränkt sich die Behandlung auf die Kontrolle der Symptome.

Das Somatostatinom entsteht aus den somatostatinproduzierenden D-Zellen des endokrinen Pankreas. Bei diesen NET unterscheidet man zwei Typen. Der erste kommt vorwiegend im Pankreas vor, als Leitsymptome weist er Diabetes mellitus und Diarrhoen auf. Der zweite Typ der Somatostatinome kommt hauptsächlich 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 (Thompson et al., 2004).

Sehr selten können im Pankreas auch Vipome entstehen, die vasoaktives intestinales Peptid (VIP) produzieren. Klinisch entwickelt sich ein Verner-Morrison-Syndrom (syn. WDHH-Syndrom), das durch wässrige Durchfälle, Hypokaliämie und Hypochlorhydrie gekennzeichnet ist (Thompson et al., 2004).

1.3.1.2 Gastrinome

Das Gastrinom ist der häufigste MEN-assoziierte Inselzelltumor. Die vermehrte Gastrinproduktion führt zum Zöllinger-Ellison-Syndrom. Die Überproduktion an Gastrin führt zur Überstimulation der salzsäureproduzierenden Belegzellen und kann therapieresistente, oft atypisch gelegene Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt hervorrufen. Weitere Symptome von Gastrinomen sind das Auftreten von Übelkeit, Erbrechen, Ösophagitis und Diarrhoen (Thompson & Townsend, 2004). Zur Symptomkontrolle können hochdosierten Protonenpumpeninhibitoren eingesetzt werden (Ramage et al., 2005).

1.3.1.3 Karzinoide

Karzinoide können im gesamten Magen-Darm-Trakt von der Kardia bis zum Rektum, einschließlich der Gallenwege und des Pankreas auftreten. Die Mehrzahl der gastrointestinalen Karzinoide haben eine Primärlokalisierung im Bereich der Appendix und des terminalen Ileums (Kloppel, 1994). Die von Karzinoide produzierten Hormone sind Serotonin und Kallikrein (Levy, 2007). Histologisch leiten sie sich von enterochromaffinen Zellen (Kulchitsky-Zellen) ab. 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 vorkommen (Evers, 2004).

1.3.1.4 Multiple endokrine Neoplasien (MEN)

Die MEN I zeigt verschiedene Penetranz, zumeist sind die Hypophyse, die Nebenschilddrüsen und das Pankreas betroffen, es können aber auch die Nebennierenrinde und die Schilddrüse einbezogen sein. Des Weiteren können alle Arten von neuroendokrinen Tumoren multipel im gesamten gastroentero-pankreatischen System gleichzeitig, wie auch zeitlich versetzt auftreten. 30 - 80% aller MEN I Patienten entwickeln einen neuroendokrinen Tumor des Pankreas und 50-70% der Patienten entwickeln einen Hypophysentumoren (Schaaf et al., 1994). 30% aller gastrinproduzierenden neuroendokrinen gastrointestinalen Tumore sind MEN I assoziiert. Synonym wird die MEN-I auch als Wermer-Syndrom bezeichnet.

Die Symptomatik kann sehr unterschiedlich sein, da sie von der quantitativen Zusammensetzung der im Überschuss produzierten Hormone geprägt wird. Die MEN-I wird autosomal dominant vererbt, so dass im Falle einer Erkrankung auch die Familienmitglieder darauf untersucht werden müssen. (Chanson et al., 1997, Mignon et al., 1995) Bei 7,6% der multiple vorkommenden Insulinome liegt eine MEN-I vor (Grant, 1996).

Leittumor der MEN-II ist das medulläre Schilddrüsenkarzinom, das bei allen Subtypen vorkommt. Die Krankheitsprävalenz wird auf 30:100.000 geschätzt. Die Hälfte aller MEN-II Patienten entwickeln Phäochromozytome, aber nur 10-

20% eine Hyperplasie oder Adenome der Schilddrüse. Die MEN-II unterscheidet man MEN-IIa, auch Sippel-Syndrom genannt und MEN-IIb.

1.4 Diagnostik neuroendokriner Tumoren

1.4.1 Allgemeine Diagnostik

Der klinische Verdacht auf einen neuroendokrinen Tumor kann sich aus der durch die Hormonüberproduktion hervorgerufenen Symptomatik ergeben. Bei der allgemeinen Diagnostik stehen Laborparameter für die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung zur Verfügung, des Weiteren stehen spezielle funktionelle Tests, wie z.B. der Hungerversuch bei Insulinomen zur Verfügung.

Als Basisdiagnostik empfehlen die Leitlinien zur Diagnostik von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren, die Bestimmung sogenannter Markerhormonen.

Bei neuroendokrinen Tumoren hat sich die Bestimmung des Chromogranin A (CgA) bewährt (Ramage et al., 2005). Dabei handelt es sich um ein sekretionsassoziiertes Protein, das in neuroendokrinen Zellen vorkommt und in geringen Mengen im Blut nachweisbar ist (Tomassetti et al., 2001; Giovanella et al., 1999). Bei neuroendokrinen Tumoren sind die Serum-Chromogranin A-Spiegel in über 90% pathologisch erhöht, es gibt sogar Hinweise, dass die Höhe der Chromogranin A-Spiegel mit der Tumormasse und der Prognose der Erkrankung korreliert.

Chromogranin A ist sowohl bei funktionellen als auch bei funktionell nicht aktiven Tumoren als Tumormarker geeignet.

Ein weiterer Test ist die Bestimmung des Serotonin Abbauproduktes 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) im 24h Sammelurin, bei Karzinoid-Syndrom. (Ramage et al., 2005). Diese Untersuchung scheint der direkten Serotonin-Bestimmung im Blut überlegen zu sein.

Die Bestimmung des Gastrin-Spiegels ist beim Zöllinger-Ellison-Syndrom nützlich. Bei VIPomen kann vasoaktives intestinales Polypeptid und bei Glukagonomen Glukagon im Blut bestimmt werden.

Weiterhin empfehlen die Leitlinien weitere zur Verdachtsdiagnose passenden Blutuntersuchungen durchzuführen, wie z.B. Parathormon, Calcitonin, Prolaktin, α -Fetoprotein, CEA und β -HCG, um nur einige zu nennen.

Bei den Tumormarkern muss immer bedacht werden, dass diese nicht zwingend erhöht sein müssen. Ihre Bedeutung liegt meistens in der Verlaufskontrolle einer Erkrankung.

Die Durchführung von sogenannten Provokationstests ist ebenfalls ein sicheres Diagnostikum. Zur Diagnosesicherung eines Insulinoms kommt der Hungerversuch zum Einsatz. Bei dem die im Blut gemessenen Insulin- und C-Peptidwerte nicht adäquat zur hypoglykämischen Situation abfallen. Bei Insulinompatienten kommt es durch die autonome Insulinproduktion des Tumors nicht zu einer physiologischen Insulinsuppression bei der Hypoglykämie (<45mg/dl). Insulin, C-Peptid sowie Proinsulin sind gegenüber einem Gesunden erhöht.

Ein weiterer Provokationstest ist der Sekretintest beim Gastrinom. Hierbei wird durch die Applikation von Sekretin eine pathologisch hohe Gastrinfreisetzung ausgelöst. Die Gastrinspiegel werden hierbei im Serum vor und nach Stimulation durch eine definierte intravenöse Sekreteingabe bestimmt.

Der Pentagastrintest zum Nachweis eines medullären Schilddrüsenkarzinoms ist ebenfalls ein Provokationstest mit mehr als 90 % Sensitivität. Bei der Durchführung wird Pentagastrin gewichtsadaptiert intravenös appliziert. Danach wird in definierten Zeitabständen der Serum-Kalzitoninspiegel kontrolliert. Ein erhöhter Kalzitoninwert gilt als hoch verdächtig für das Vorliegen eines medullären Schilddrüsenkarzinoms (Hanks et al. 2004; Kann et al. 2006).

1.4.2 Spezielle Lokalisationsdiagnostik von neuroendokrinen Tumoren

Zur Lokalisationsdiagnostik neuroendokriner Tumoren stehen zum einen Computertomographie (CT), die Kernspintomographie (MRT) und die Endoskopie mit Bronchoskopie, Gastroskopie und Koloskopie zur Verfügung. Der Stellenwert neuerer endoskopischer Verfahren wie z.B. der Kapsel-Endoskopie ist derzeit noch nicht sicher abzuschätzen.

Die Endosonographie hat ihren festen Platz in der Lokalisationsdiagnostik

pankreatischer oder auch duodenaler Tumoren (Kann et al., 2005, 2006).

In den Leitlinien zur Behandlung von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren wird ein multimodaler Ansatz empfohlen. Zu diesen Untersuchungen gehören transabdominaler Ultraschall und endoskopischer Ultraschall, diese zählen aufgrund der weitverbreiteten Verfügbarkeit und der geringeren Invasivität als Basisdiagnostikum. Der transabdominale Ultraschall hat aber wegen der oft sehr kleinen Tumoren nur eine vergleichsweise geringe Sensitivität. Ergänzend kommen die Angiographie mit Calciumstimulation und die Somatostatinrezeptorzintigraphie, je nach Fragestellung zum Einsatz. Die Wahl der Methode ist oft von der Fragestellung abhängig. Eine generelle Überlegenheit einer Untersuchungsmethode gibt es derzeit noch nicht.

Eine spezifische Methode in der Lokalisationsdiagnostik von neuroendokrinen Tumoren stellt die Somatostatin-Rezeptorzintigraphie (SSRS) dar. Sie nutzt das Vorhandensein von Somatostatinrezeptoren der Subtypen 2 und 5 auf der Oberfläche neuroendokriner Tumoren aus (Reubi et al., 2003). Durch diese Rezeptorbindung können die Tumoren mit einer Gammakamera sichtbar gemacht werden. Durch die intravenöse Gabe eines in der Regel mit ^{111}In radioaktiv markierten Somatostatin-Analogons, (^{111}In -DTPA-D-Phe1-Octreotid) kommt es zu einer Anreicherung der Substanz im Tumorgewebe. Durch Ganzkörperaufnahmen kann so die Ausbreitung der Tumorerkrankung beurteilt werden. Mit Hilfe der Somatostatin-Rezeptorzintigraphie können Tumorformationen ab einer Größe von ca. 0,5cm sichtbar gemacht werden. Die SSRS stellt mit ihrer hohen Sensitivität für 80%-90% aller NET, incl. evtl. vorhandener Metastasen, eine der wichtigsten diagnostischen Maßnahmen dar. (Jensen et al. 1999; Oberg et al. 2004). Gerade bei der letztgenannten Metastasensuche ist sie aus diesem Grund mittlerweile das diagnostische Mittel der Wahl. (Ricke et al. 2001).

Die hohe Sensitivität der SSRS kann durch den zusätzlichen Einsatz eines SPECT-CTs (Single Positron Emission Computed Tomography and fusion imaging with CT) noch verbessert werden. (Schillaci, Corleto et al., 1999; Schillaci, Scopinaro et al., 1997; Schillaci, Scopinaro et al., 1996). Falls diese Möglichkeiten negativ ausfallen, ist ein Drei-Phasen CT des Thorax und des Abdomens eine weitere Option.

Leider eignet sich die Somatostatin-Rezeptorzintigraphie nur begrenzt für Insulinome, da bis zu 40% dieser Tumoren nur unzureichend Somatostatin-Rezeptoren des Subtypen 2 und 5 exprimieren. (Modlin et Tang, 1997)

Eine Szintigraphie sollte bei der Erstdiagnose eines neuroendokrinen Tumors aber in jedem Fall durchgeführt werden, da sie auch im Falle eines negativen Szintigramms wertvolle Informationen zum weiteren therapeutischen Vorgehen liefert.

	Sensitivität in %
Abdomineller Ultraschall	27 (10 – 39)
Intraoperativer Ultraschall	84 (67 – 90)
Endoskopischer Ultraschall	88 (77 – 93)
CT	30 (0 – 40)
MRT	10 (0 – 25)
selektive Angiographie	60 (35 – 90)
Perkutane transhepatische Pfortaderkatheterisierung mit selektiver Insulinbestimmung	80 (67 – 90)
Intraarterieller Calciumstimulationstest	94 (88 – 100)
Somatostatin (SMS) Rezeptorzintigraphie	25 (12 – 50)

Tabelle 1: Sensitivität verschiedener Diagnostischer Methoden zur speziellen Lokalisation von Insulinomen (Jensen, Norton, 1999)

1.5 Therapie von neuroendokrinen Tumoren, speziell von Insulinomen

1.5.1 Medikamentöse Therapie

Hauptsymptom der Insulinome sind Hypoglykämien, diese kann man in einigen Fällen diätisch durch häufige kohlenhydratreiche Mahlzeiten am Tag behandeln. Ein weiterer konservativer Ansatz ist medikamentös zum Beispiel mit Octreotid oder Diazoxid. Octreotid ist ein Somatostatinanalog, das die Freisetzung von Peptidhormonen unter anderem aus dem Gastrointestinaltrakt (Gastrin, Glucagon, Insulin, Vasoaktives-Intestinales-Peptid) hemmt und somit den Glukosespiegel im Plasma steigert (Scholz et al. 2005). Ein weiteres Medikament ist das Diazoxid. Es steigert die Glukosespiegel im Plasma indem es die Insulinsekretion der Betazellen des Pankreas hemmt (Scholz et al. 2005). Bei nichtoperablen Tumoren stellen Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und Streptozotozin eine Therapieoption dar. Ebenfalls kommen Möglichkeiten wie die Chemoembolisation, die Hochfrequenzthermotherapie und die laserinduzierte Thermotherapie in Betracht. In den Leitlinien zur Behandlung neuroendokriner Tumoren kommen Radioablationstherapie und Radionuklidtherapie als weitere Therapieoptionen in Frage (Ramage et al. 2005).

1.5.2 Chirurgische Therapie

Die Therapie der Wahl ist jedoch die chirurgische Enukleation des Tumors. 90% der Insulinome sind gutartige solitäre Tumoren, die durch eine chirurgische Resektion kurativ behandelt werden können. Wichtig ist das präoperativ eine genaue Lokalisationsdiagnostik durchgeführt wird. Intraoperativ kommen neben der Inspektion und Palpation, Ultraschall und selektive arterielle Stimulation mit Calcium zum Einsatz. Der intraoperative Ultraschall erlaubt eine Differenzierung zwischen Pankreasgewebe und Tumorgewebe und ist somit eine Hilfe bei der anzustrebenden Enukleation des Tumors. Lässt sich kein eindeutiger Tumor abgrenzen, so kann nur eine blinde distale Pankreatomie oder bei vermutetem Sitz im Pankreaskopf eine Pankreatikoduodenotomie durchgeführt werden, um eine Heilung zu erreichen. Zusätzlich muss immer die

Leber exploriert werden, sowie das gesamte Abdomen und das Restpankreas, um Metastasen auszuschließen, da Insulinome in bis zu 10% multifokal vorkommen. (Modlin et al., 1997). Intraoperativ muss die Blutglukose kontinuierlich gemessen und gegebenenfalls Glukose infundiert werden, da die Manipulation am Tumor mit einer massiven Insulinausschüttung einhergehen kann. Nach erfolgreicher Tumorektomie kommt es zunächst zu einer Hyperglykämie. Dies ist durch die Suppression der intakten Betazellen durch das Insulinom zu erklären.

1.6 Zielformulierung

Wie bereits oben erwähnt gibt es bei der Diagnostik des Diabetes mellitus Typ I eine prädiabetische Grauzone in der keine Aussage über den β -Zellstatus getroffen werden kann. In dieser prädiabetischen Phase nimmt jedoch schon die Insulinsekretionskapazität des Pankreas ab, ohne dass erhöhte Blutzuckerwerte gemessen werden. Zur Frühdiagnose des Typ I Diabetes in der prädiabetischen Phase existiert bislang nur der intravenöse orale Glucosetoleranztest (ivGTT), der eine veränderte Insulinfreisetzungskinetik nachweist und selbst bei optimaler Standardisierung eine nur geringe Sensitivität besitzt (Mrena et al. 1999). Zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation besitzt das Pankreas in der Regel nur noch 10 - 20 % seiner ursprünglichen β -Zell-Masse. In der Literatur gibt es gute Evidenz, dass der Erhalt dieser residualen β -Zell-Masse erhebliche klinische Vorteile mit sich bringt und den Einsatz unterschiedlicher Interventionsstrategien rechtfertigt (Rasmussen et al. 2000; Kolb et al. 2001; Larsen et al. 2004).

Während die Bauchspeicheldrüse als Gesamtorgan in bildgebenden Verfahren wie Sonographie, MRT und Spiral-CT dargestellt werden kann, entzieht sich der endokrine Anteil des Pankreas bislang komplett der bildgebenden Diagnostik. Neue Verfahren zur Visualisierung der β -Zell-Masse und Erkennung der prädiabetischen Vorlaufphase werden daher dringend benötigt. Die nicht-invasive Darstellung der β -Zellen wäre somit von hoher wissenschaftlicher und diagnostisch-klinischer Relevanz und würde letztendlich für den klinischen Alltag einen erheblichen Beitrag leisten. Mit einem nicht-invasiven

Bildgebungsverfahren würde es erstmals möglich werden, den Therapieeffekt einer spezifischen Interventionsstrategie direkt und nicht-invasiv zu quantifizieren. Dieses wichtige Ziel scheiterte bisher an der Nichtverfügbarkeit eines spezifischen β -Zell-Tracers für die molekulare Bildgebung.

Auch für die Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren (Insulinomen) wäre eine in vivo Methode zur Darstellung der GLP-Rezeptoren von großer Bedeutung. Das GLP-Analogon Exendin ist ein bekannter betazellspezifischer Marker. Er spielt eine wichtige Rolle in der Darstellung von Insulinomen im Tiermodell.

In dieser Arbeit soll mittels ^{111}In markiertem Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertem Exendin-4K40 HYNIC versucht werden, die GLP-1 Rezeptoren in betazelldefizitären Diabetesmodellen an Nagern sowie in neuroendokrinen Tumoren (Insulinom) an Rip1Tag2 Mäusen nachzuweisen und zu visualisieren.

Mit Hilfe der Betazellbildung könnten in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden, um die Entstehung des Diabetes mellitus im zeitlichen Verlauf besser zu verstehen. Ein weiterer Nutzen der Betazellbildung könnte in der Untersuchung der Betazellfunktion unter der Therapie mit Antidiabetika in klinischen Studien sein. Auch eine engmaschige Überwachung von Risikopatienten oder eine individuelle Therapieanpassung aufgrund der Betazellbildung sind denkbar.

Die Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren fordert nach den aktuellen Leitlinien einen multimodalen Ansatz mit zeitaufwendigen und invasiven Methoden. Aufgrund des großen GLP-1-Rezeptorenbesatzes von Insulinomen könnte ein Forschungsschwerpunkt auf der prä- und intraoperativen Detektion, sowie auf einer Radiopeptidtherapie von solchen Tumoren liegen. Die GLP-1-Rezeptorzintigraphie zeigt ein großes klinisches Potential für das Auffinden von Insulinomen und könnte so den Patienten in Zukunft präoperative invasive Diagnostik ersparen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

In diesem Kapitel werden alle für die Versuche verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte aufgeführt. Sonstige Chemikalien wurden, falls nicht erwähnt, von der Firma Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs bezogen.

2.1.1 Materialien für die Tierhaltung:

Blutzuckerlanzetten	BD Micro Fine + 0,30 mm 30G BD Consumer Healthcare Europe Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ 07417 USA
Blutzuckermessgerät	Glucometer Elite XL Bayer Diagnostics GmbH (München)
Blutzuckermess-Sensoren	Ascensia Elite Sensor Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Einmalkittel	PANEP Brnenska Czesch Republic
Einstreu	GLP Aspen Bedding Tapvei FIN-73620 Kortteinen
Handschuhe	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co.KG (Wetter)
Käfig	EHRET P.B. 1230 (Emmendingen)
Mundschutz	Barrier High Filtration Face Mask, green Mölnlycke Health Care Göteborg / Sweden
Ohrzange	Aesculap DF401R, Stainless

OP-Haube	Surgine Flott Mölnlycke Health Care Inc. Newtown, PA 18940 USA
Tierfutter	Altromin 1434 Altromin GmbH 32791 Lage
Überschuhe	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co.KG (Wetter)

2.1.2 Materialien Labor:

Eppendorf Gefäße	2ml Safe Lock Tubes Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Gefäße	1,5ml Reaktionsgefäße 3810 Eppendorf AG, Hamburg
Papier/Kunststoffdecken	Hartmann, Heidenheim
Pipetten	Finnpipette Thermo Labsystems
Pipetten 0,1-2µl / 2-20µl / 20-200µl / 200-1000µl	Thermo Labsystems Egelsbach
Pipettenspitzen	Thermo Labsystems Egelsbach
Sep-Pak Catridges	Waters, Milford, Massachusetts, USA)
Sterile Nadeln: BD Microlance 3	0,45mm x 13mm BD Drogheda Ireland
Sterile Nadeln: BD Microlance 3	0,9mm x 40 mm Fraga (Huesca) Spain
Sterile Spritzen; 1ml BD	Becton Dickinson GmbH 69126 Heidelberg
Sterile Spritzen; 2ml Luer	Braun Melsung AG 34209 Melsungen

2.1.3 Chemikalien:

Alloxan tetrahydrate	Sigma Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim
BSA	Albumin from bovine serum Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs
Chloralhydrate	Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs
Formalin Solution 10%	J.T. Baker Mallinckrodt Baker B.V. 7400 AA Deventer Holland
Isopropanol	Acros Organics New Jersey USA (Geel, Belgium)
Methanol	Acros Organics New Jersey USA (Geel, Belgium)
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	J.T. Baker Mallinckrodt Baker B.V. 7400 AA Deventer Holland
Salzsäure 37/38%	Carl Roth GmbH u. Co, Karlsruhe

2.1.4 Radionuklide:

¹¹¹ In	Tyco Healthcare Deutschland GmbH 93333 Neustadt / Donau
^{99m} Tc	Generator Eluati III 16 Schering Deutschland GmbH 13342 Berlin

2.1.5 Peptide:

Folgende Peptide wurden verwendet:

Exendin-4K40 Ahx Hynic	Peptide Specialty Laboratorie GmbH Heidelberg
Exendin-4K40 Ahx DTPA	Peptide Specialty Laboratorie GmbH Heidelberg

2.1.6 Geräte:

Bohrlochdetektor	Berthold Nuclear Spectrometer LB 2040
Gamma-Counter Cobra III	Packard Instrument Co. Inc.,USA
Inkubator	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer Heidolph MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
MRT, Siemens Magnetom Expert	Siemens AG Healthcare Sector, Erlangen
PH-Messgerät Mettler Delta 350	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Präzisionswaage: Kern 770	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen
Präzisionswaage: Kern 474	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen
Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) Siemens e.cam ^{duet}	Siemens Aktiengesellschaft, Bereich Medizinische Technik, Erlangen
Vortex (Typ Reax 1)	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Wasserbad Wasserbad WB 14	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach

2.1.7 Gebrauchslösungen:

Folgende Gebrauchslösungen wurden benötigt und mit Hilfe der oben angegebenen Chemikalien angefertigt.

2facher Sörensenpuffer:

Zur Herstellung des 2fachen Sörensenpuffers benötigt man 14,3 g Dinatriumhydrogenphosphat x H₂O und 3,08 g Natriumdihydrogenphosphat x H₂O.

Beide Chemikalien werden in 500ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert stellt sich automatisch zwischen 7,3 – 7,4 ein. Zur Kontrolle überprüft man ihn am pH-Meter.

Isopropanol 50% und 70%:

Isopropanol 50% & 70% erhält man durch verdünnen des reinen Isopropanol p.a.

Natriumacetat-Puffer 0,5M pH:5,4:

Zur Herstellung des Natriumacetatpuffers benötigt man 4,1g Natriumacetat (C₂H₃NaO₂) M82,04g/mol.

Dieses löst man in 100 ml Aqua dest. und stellt den pH Wert 5,4 mit konzentrierter Salzsäure am pH-Meter ein.

2.1.8 Software:

Zur Rekonstruktion der SPECT Aufnahmen wurde die Software Hispect der Firma Scivis wissenschaftliche Bildverarbeitung GmbH, Göttingen benutzt. Die Fusion der MRT Aufnahmen mit den SPECT Aufnahmen wurde mit Hilfe der Software Hermes, MultiModality von der Firma Nuclear Diagnostics, Stockholm Schweden durchgeführt. Das Programm Volume Fusion Display der Firma Nuclear Diagnostics, Stockholm Schweden, wurde zum betrachten der fusionierten Aufnahmen benutzt.

Sonstige Software:

Computerprogramme: Microsoft Excel, Copyright 1985 – 2003 Microsoft Corporation. Volume Fusion Display der Firma Nuclear Diagnostics, Stockholm Schweden.

2.2 Versuchstiere:

2.2.1 Mäuse

Für die Versuche wurden ca. 12 Wochen alte, weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57Bl/6NCrI von der Firma Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld) bezogen. Weiterhin wurden ca. 20 Wochen alte, weibliche Mäuse des Inzuchtstammes Rip1Tag2 bezogen, die freundlicherweise durch die Universität Basel zur Verfügung gestellt wurden. Das Haupteinsatzgebiet für den Einsatz von C57/BL6NCrI Mäuse sind immunologische, pharmakologische, toxikologische, mikrobiologische, physiologische und neurologische Versuche.

Die Rip1Tag2 Mäuse sind genetisch so verändert, dass sie ab der 6. Lebenswoche atypische, hyperplastische Inselzellen im Pankreas entwickeln und ab der 13 - 20 Lebenswoche multiple Adenome. Ab dieser Zeit werden die Tiere hypoglykämisch (Hanahan et al. 1985; Lyman et al. 2005, Crabtree et al. 2003). Dieser Mausstamm eignet sich sehr gut für die Versuche, da die Insulinome eine hohe GLP1-Rezeptordichte an ihrer Oberfläche besitzen. Die Tiere erhielten wir von der Arbeitsgruppe Christophori aus Basel (Schweiz).

Alle Tiere hatten nach Lieferung eine Woche Zeit sich zu akklimatisieren bevor sie für die Experimente eingesetzt wurden. Während der gesamten Versuchszeit wurden die Tiere zu maximal 5 Tieren in Standardkäfigen (EHRET P.B. 1230, Emmerdingen) gehalten. Die Tiere erhielten ein pelliertes Alleinfuttermittel (Altromin 1434) und Wasser ad libitum.

Das Einstreu wurde von der Firma Tapvei bezogen, es handelt sich um staubfreies Plättchenstreu.

Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten. (20 °C, 70% Luftfeuchtigkeit, max. 0,2m/sec, 12h Licht und 12h Dunkelheit). Alle Experimente wurden unter Aufsicht und in Einklang mit den Richtlinien der Ethikkommission für Tierversuche vorgenommen.

2.2.2 Ratten

Für die Versuche wurden weibliche Ratten des Inzuchtstammes Wistar Unilever Ratten der Firma Charles-River Wiga GmbH (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere waren ca. 6 Monate alt und hatten nach Lieferung eine Woche Zeit sich zu akklimatisieren, bevor sie für die Experimente eingesetzt wurden. Während der gesamten Versuchszeit wurden die Tiere zu maximal 3 Tieren in Standardkäfigen (EHRET P.B. 1230, Emmerdingen) gehalten. Die Ratten erhielten ebenfalls das Alleinfuttermittel Altromin 1434 und Wasser ad libitum. Das Einstreu wurde von der Firma Tapvei bezogen, es handelt sich um staubfreies Plättchenstreu.

Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten. (20 °C, 70% Luftfeuchtigkeit, max. 0,2m/sec, 12h Licht und 12h Dunkelheit). Alle Experimente wurden unter Aufsicht und in Einklang mit den Richtlinien der Ethikkommission für Tierversuche vorgenommen.

2.3 Methoden

2.3.1 Die Markierung von Exendin-4K40 DTPA mit $^{111}\text{InCl}_3$

Die Peptidmarkierung wurde so hergestellt, dass jedem Tier eine Aktivitätsmenge von 37MBq (1mCi) $^{111}\text{InCl}_3$ injiziert werden konnte.

Zunächst wurde ein 1,5ml Eppendorfgefäß mit 0,5 M Natriumacetatpuffer vorgelegt. Die Menge an Natriumacetat entspricht der Volumenmenge von 37MBq $^{111}\text{InCl}_3$.

Zu diesem Puffer gibt man 5µl einer $2,2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ Lösung ($2,2 \cdot 10^{-10}$ mol Exendin-4K40 DTPA hinzu. Im „heißen Lager“ pipettiert man diesem Ansatz die berechnete Volumenmenge $^{111}\text{InCl}_3$ hinzu. Das beschriftete Eppendorfgefäß wird nun in einen Bleicontainer gegeben und anschließend 30 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgt die Qualitätskontrolle.

2.3.2 Die Markierung von Exendin-4K40AhxHynic mit ^{99m}Tc

Exendin-4K40AhxHynic wurde mit Tricin-EDDA markiert. Diese Markierung wird im folgenden vorgestellt.

Um die Tricin-EDDA Markierung herzustellen benötigt man mehrer Arbeitsschritte.

Zunächst werden 11 mg Tricin in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben. Dazu werden 250-300 MBq ^{99m}Tc in 300µl 0,5M Acetatpuffer (pH5,4) gegeben. Anschließend gibt man 5µl einer 1,1*10⁻³M (5,5*10⁻⁹ mol) Exendin-4K40AhxHynic hinzu und startet die Reaktion mit einer frisch hergestellten SnCl₂-Lösung (16,5 mg SnCl₂ in 10ml 0,1M HCl). Nun erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dann erfolgt die Zugabe von 0,5ml EDDA-Lösung (10mg EDDA / ml A.dest) und der Ansatz wird erneut für 30 Minuten bei 90 °C im Wasserbad inkubiert.

Zur Überprüfung der Markierung erfolgt nun eine Qualitätskontrolle.

2.3.3 Qualitätskontrolle:

Die Qualitätskontrolle erfolgt zur Überprüfung der Peptidmarkierung mittels einer Sep-Pak C18 Kartusche. Die Kartusche wurde durch Spülung mit 2ml Methanol und 2ml 0,5 M Natriumacetat (pH 5,4) aktiviert. Nach der Aktivierung entnimmt man 1µl der frischen Peptid-Indium Markierung und inkubiert diesen auf die mit Methanol und Natriumacetat vorbereitete Sep-Pak C-18 Kartusche. Nun wird die Sep-Pak Kartusche erneut mit 2ml Natriumacetat und 2ml Methanol gespült. Die gewonnenen Fraktionen werden getrennt aufgefangen und im Bohrlochmessplatz gemessen.

Die Aktivität in der Methanolfraktion und im Filter stellt den Anteil des markierten Peptids dar.

Die Qualität der Markierung wurde durch zwei Faktoren überprüft. Die Gesamtaktivität im Filter sollte < 33% sein.

Die Qualitätskontrolle wurde nach folgender Rechnung in Prozent angegeben.

$$\text{Qualitätskontrolle: } \frac{\text{Aktivität(Alkohol + Filter)}}{\text{Aktivität(Puffer + Alkohol + Filter)}} * 100 \text{ (in \%)}$$

In der Ethanolfraktion sollte die Aktivität > 90% sein.

2.3.4 Diabetesinduktion bei Mäusen mit Alloxan

Die Versuchstiergruppe bestand aus 3 C57Bl/6 Mäusen. Jeder Versuchsabschnitt wurde zweimal wiederholt. Im Alter von 8 Wochen erhielten die Mäuse ohne vorheriges Fasten, zur Induktion eines Diabetes mellitus eine einmalige intravenöse (i.v.) Injektion von 200mg/kg KG Alloxan (ALX). Das ALX wurde in 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung unmittelbar vor der Injektion gelöst und innerhalb von 5 min. in die Schwanzvene injiziert.

Der Tag der Injektion wurde als Tag 0 bezeichnet. Der Blutzucker wurde unmittelbar vor der Injektion und im Anschluss nach 4h und nach 24h gemessen.

Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Mäuse. Zur Individualisierung wurde jede Maus am Ohr markiert.

2.3.5 Diabetesinduktion bei Ratten mit Alloxan

Die Versuchsgruppe bestand aus 3 Wistar Unilever Ratten, im Alter von ca. 8 Wochen.

Die Tiere erhielten ohne vorheriges Fasten, zur Induktion eines Diabetes mellitus einmalige intravenöse (i.v.) Injektion von ALX von 200mg/kg KG. Das ALX wurde in 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung unmittelbar vor der Injektion gelöst und innerhalb von 5 min. in die Schwanzvene injiziert.

Der Tag der Injektion wurde als Tag 0 bezeichnet. Der Blutzucker wurde unmittelbar vor der Injektion und im Anschluss nach 4h und nach 24h gemessen. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Ratten. Zur Individualisierung wurde jedes Tier am Ohr markiert.

2.3.6 Blutzuckermessung

Die Blutzuckermessungen der Ratten wurden jeweils unmittelbar vor der Injektion des ALX, sowie nach 4h und 24h durchgeführt. Zur Messung des Blutzuckers wurde den Tieren mit einer Lanzette nach vorheriger Desinfektion in das letzte 1/3 des Schwanzes gestochen. Aus dem so gewonnen Blut wurde mit dem Glucometer Elite XL die Blutglukose bestimmt. Die Normalwerte für Unilever Wistar Ratten schwanken zwischen 50 und 115 mg/dl. 24h nach der

Injektion von ALX lagen die Blutzuckerwerte über 200mg/dl, so dass die Tiere als diabetisch angesehen wurden.

Die Blutzuckermessung der Mäuse wurde ebenfalls unmittelbar vor der Injektion des ALX durchgeführt. Im Anschluss an die Injektion jedoch alle 4 Tage. Die Normalwerte der Mäuse liegen zwischen 50 und 115 mg/dl. 24 h nach der Injektion lagen die Blutzuckerwerte der Mäuse über 200mg/dl, so dass die Tiere als diabetisch galten.

2.3.7 i.v. Injektion der markierten Radiopharmaka

Die i.v. Injektion der markierten Radiopharmaka erfolgte in die Schwanzvene. Die Tiere wurden dazu in eine ca. 30cm lange Pappröhre mit einem Durchmesser von ca.10cm so fixiert, dass der Schwanz frei zugänglich war. Das Radiopharmakon konnte nun stammnah in eine Schwanzvene injiziert werden. Das Injektionsvolumen betrug 200µl pro Tier, jedes Tier erhielt 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹In, bzw. 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit ^{99m}Tc. 4 Stunden nach der Injektion wurden SPECT-Aufnahmen durchgeführt.

2.3.8 Narkose der Versuchstiere

Zur Durchführung der SPECT-Aufnahmen und der MRT-Aufnahmen war Bewegungslosigkeit eine unbedingte Voraussetzung. Aus diesem Grund mussten die Tiere narkotisiert werden.

2.3.8.1 Narkose der Ratten

Die Unilever Wistar Ratten wurden mittels 2,5ml 4%iger Chloralhydrat i.p. narkotisiert. Chloralhydrat führt bei den Nagetieren in oben angegebener Konzentration zu einem tiefen Schlafzustand. Die Tiere atmen während der Narkose mit Chloralhydrat suffizient und müssen nicht beatmet werden. Eine Analgesie wird mit Chloralhydrat nicht erreicht, dies ist für die Durchführung der SPECT- und MRT-Aufnahmen auch nicht erforderlich.

2.3.8.2 Narkose der Mäuse

Die Mäuse wurden mittels 250µl 4%iger Chloralhydratlösung i.p. narkotisiert in gleicher Weise wie die Ratten. Siehe 2.3.8.1.

2.3.9 Schmerzlose Tötung

Am Ende der Versuchsreihe erfolgte die schmerzlose Tötung der Versuchstiere mit CO₂ Gas.

2.3.10 Bildgebende Verfahren

2.3.10.1 Single-Photon-Emmison-Computed-Tomography:

Zur Verwendung kam eine E.CAM Gammakamera (Siemens Aktiengesellschaft, Bereich Medizinische Technik, Erlangen), die auf dem Prinzip der um das Objekt rotierenden Detektoren beruht. Die E.CAM ist als Doppelkopfkamera ausgeführt.

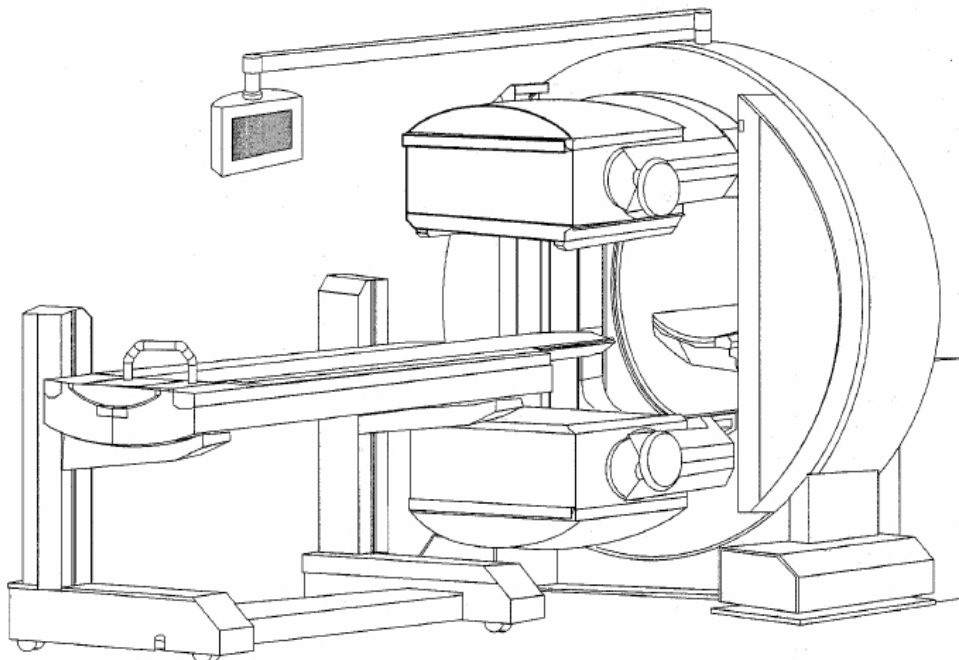


Abbildung b: Die Doppelkopfkamera Siemens E.CAM (Schurrat)

Sie besitzt zwei großflächige ortsempfindliche Szintillationsdetektoren.

Die sogenannten HD3-Detektoren ("high definition digital detector") bestehen aus einem 9,5 mm dicken Thallium dotierten Natriumiodidkristall.

Sobald die Tiere narkotisiert sind, werden sie auf einer Haltevorrichtung fixiert. Die Haltevorrichtung besteht aus einem Segment einer Plexiglasröhre von ca. 100mm Durchmesser und ca. 2mm Wanddicke. Die Haltevorrichtung wird so

auf der abgedeckten Patientenliege platziert, dass die Tiere in das FOV (Field of view) hineinragen. (Abb.c)

Die Gamma Kamera wurde mit einem Multi Pinhole Kollimator ausgerüstet, um die Kleintierspect-Aufnahmen durchzuführen.

Die Aufnahmezeit der einzelnen Bilder richtet sich nach der Zahl der gemessenen Counts per second (cps) je 1 MBq im Objekt vorhandener Aktivität. In der Regel betrug die Aufnahmezeit 60 sec. pro Einzelbild. Insgesamt werden 60 Einzelbilder pro Tier aufgenommen.

Bei den SPECT-Aufnahmen der Rip1Tag2 Mäuse wurde eine Dualisotop-Bildgebung durchgeführt. Bei dieser Bildgebung ist es möglich, durch Energiediskriminierung Aufnahmen eines Tieres zu durchzuführen, welches zeitgleich mit ^{99m}Tc (140keV +- 15%) markiertes Exendin4 und mit ^{111}In (245keV +-15%) markiertes Exendin4 erhalten hat. Man ist dadurch in der Lage unterschiedlich markierte Exendine zeitgleich zu untersuchen.



Abbildung c: Narkotisierte Ratte auf Tierhalter in der e.cam

2.3.10.2 MRT-Studien:

Im Anschluss an die SPECT Aufnahmen wird ein MRT durchgeführt.

Die Aufnahmen werden mit einem 1 Tesla MRT (Siemens Magnetom Expert) gemacht. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) wurde eine spezielle Kleintier-Imaging-Spule angefertigt, mit deren Hilfe es möglich ist

Kleintier-MRT-Aufnahmen durchzuführen. (Abb.d) Es handelte sich hierbei um eine modifizierte Sattelspule mit einer Länge von 10 cm mit einem Innendurchmesser von 4,2 cm.

Da normale Klinik-MRT-Geräte von ihrer Auflösung her für Kleintiere nicht ausreichen, werden für die Forschung besondere MRT-Geräte vorgehalten. In Ergänzung zu normalen Klinikgeräten werden spezielle Kleintierspulen hergestellt (Alfke et al. 2004), in die man Mäuse narkotisiert einbringen kann und die eine gute Auflösung von 312,5 μm x 312,5 μm bieten. Die Akquisitionszeiten liegen bei 8 bis 20 Minuten (Heverhagen et al. 2004).

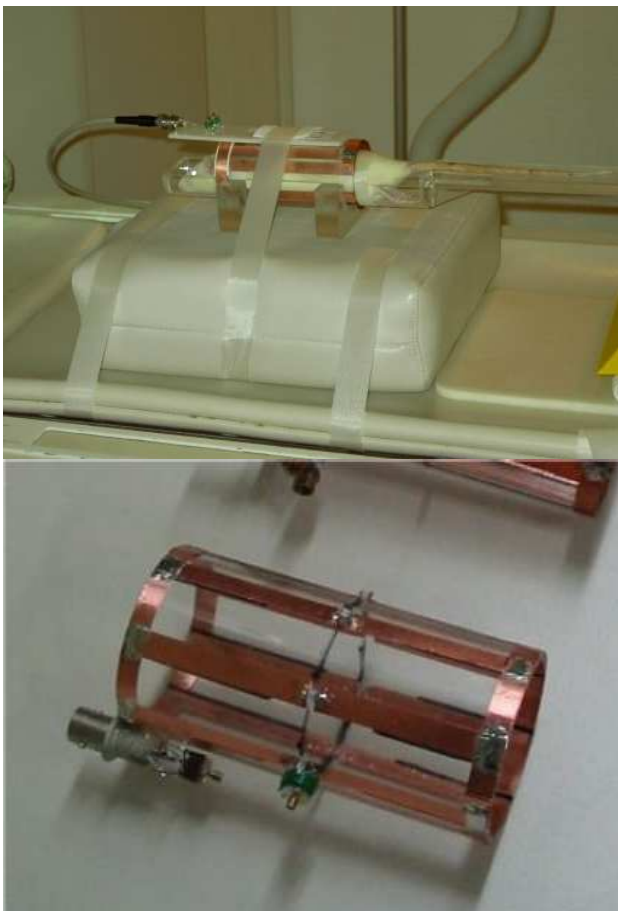


Abbildung d: Empfängerspule für Kleintier-MRT

2.3.10.3 Rekonstruktion der SPECT-Aufnahmen:

Die Bildakquisition der SPECT-Aufnahmen wird mit Hilfe der Software HiSPECT der Firma Scivis wissenschaftliche Bildverarbeitung GmbH, Göttingen durchgeführt.

2.3.10.4 Fusion der MRT-Aufnahmen mit den SPECT-Aufnahmen:

Die Fusion der MRT Aufnahmen mit den SPECT Aufnahmen wurde mit Hilfe der Software Hermes, MultiModality von der Firma Nuclear Diagnostics, Stockholm Schweden durchgeführt. Diese Software ist in der Lage, den MRT-Datensatz mit dem dazugehörigen SPECT-Datensatz zu einem Gesamtbild zu fusionieren. Dazu werden die rekonstruierten transversalen Datensätze von MRT und Multipinhole-SPECT zunächst mittels DICOM Kommunikation auf einen Hermes Auswertungsrechner transferiert und im Anschluss daran werden die Datensätze auf gleiche Voxelgröße gebracht. Nun werden die verschiedenen Datensätze anhand der vorhandenen anatomischen Informationen dreidimensional ausgerichtet, Der verwendete Algorithmus maximiert die gemeinsamen Informationen zweier Datensätze (Wells et al.1996, Maes et al. 1999). Die auf diese Weise coregistrierten Datensätze können dann überlagert und mit unterschiedlichen Farbskalen dargestellt werden. Hierzu werden je nach Fragestellung die Programme "multi modality" oder "volume display" (Hermes Medical Solutions, Stockholm, Schweden) benutzt.

3 Ergebnisteil

Es wurde eine Bindungsstudie mit In^{111} markiertem Exendin-4K40 DTPA bei C57Bl/6NCrl Mäusen (n=6), Unilever Wistar Ratten (n=3) und Rip1Tag2 Mäusen (n=4) durchgeführt. Zusätzlich zu diesen Versuchen wurde eine Bindungsstudie mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertem Exendin-4K40 HYNIC an Rip1Tag2 Mäusen (n=4) durchgeführt. 4h nach der Injektion des Radiopharmakons wurden die Tiere narkotisiert und sicher fixiert, um eine absolute Immobilität für eine erfolgreiche Fusion von MRT- und SPECT-Aufnahmen zu gewährleisten.

3.1 Qualitätskontrolle der Markierungen

Substanz	Gebundenes Nuklid (%)	SD (%)	Freies Nuklid (%)
Exendin-4K40DTPA- ¹¹¹ In in C57Bl/6NCrI Mäusen	97,12	2,43	2,88
Exendin-4K40DTPA- ¹¹¹ In in Unilever Wistar Ratten	96,97	0,76	3,03
Exendin-4K40DTPA- ¹¹¹ In in Rip1Tag2 Mäusen	96,50	1,89	3,50
Exendin-4K40HYNIC- ^{99m} Tc in Rip1Tag2 Mäusen	94,69	1,17	5,31

Alle Markierungsergebnisse liegen über den für einen Therapie- oder Diagnostikbereich geforderten 90%. Die Standardabweichungen der einzelnen Markierungen liegen zwischen 0,76% und 2,43%.

3.2 GLP-1 Rezeptorimaging mit Multipinhole SPECT / MRT an C57Bl/6NCrI Mäusen

In diesen Studien wurden die C57Bl/6NCrI Mäuse (n=6) mit Exendin-4K40 DTPA und ¹¹¹In markiert. Die Aufnahmen erfolgten jeweils 4h nach der Injektion des Radiopharmakons in die Schwanzvene. Exemplarisch wird jeweils eine C57Bl/6NCrI Maus in transversaler, coronarer und sagittaler Ebene für Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹In ausgeführt.

3.2.1 C57Bl/6NCrl 1 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In , Aufnahmen 4h nach Injektion

3.2.1.1 Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

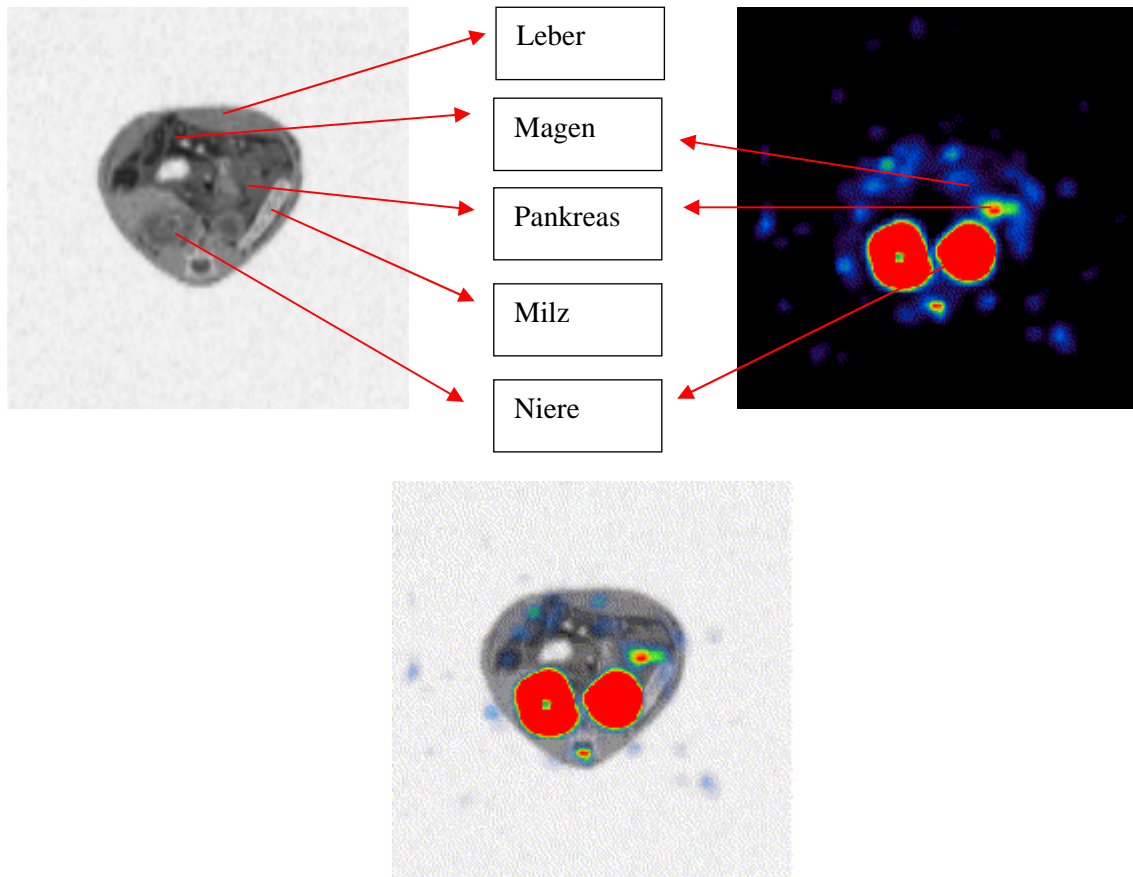


Abb. 1: Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 1 sieht man den transversalen Schnitt einer MRT-Aufnahme, den transversalen Schnitt einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In . Im MRT erkennt man sehr gut die Milz, das Pankreas und die Nieren. Auch Magen und Leber lassen sich ventral im Bild identifizieren. Im SPECT erkennt man eine hohe Aktivität in beiden Nieren. In der unmittelbaren Umgebung der Nieren ist es zu einem Auslöschungsartefakt gekommen. Es findet sich eine starke Aktivitätsanreicherung im Pankreas. In der Fusion erkennt man, dass die Pankreasregion mit einer vermehrten Aktivität ein Korrelat im MRT besitzt. Das Pankreas wird jedoch von dem Auslöschungsartefakt der Nieren teilweise überlagert, so dass es in der SPECT-Aufnahme nicht komplett darstellbar ist. Der Magen ist ebenfalls gut im MRT zu erkennen. Im SPECT ist hier eine erhöhte Aktivität nachweisbar.

3.2.1.2 Coronare Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

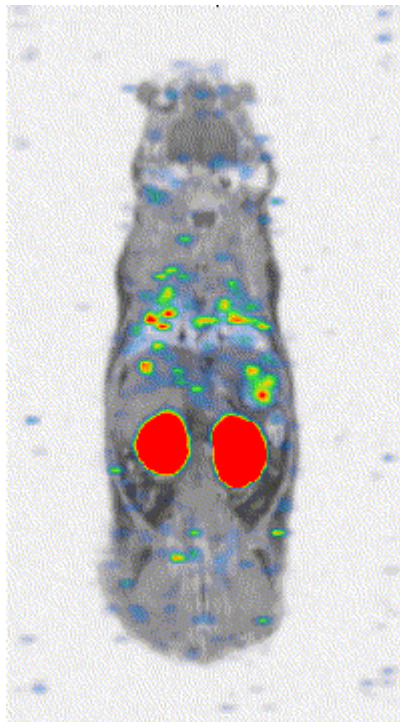
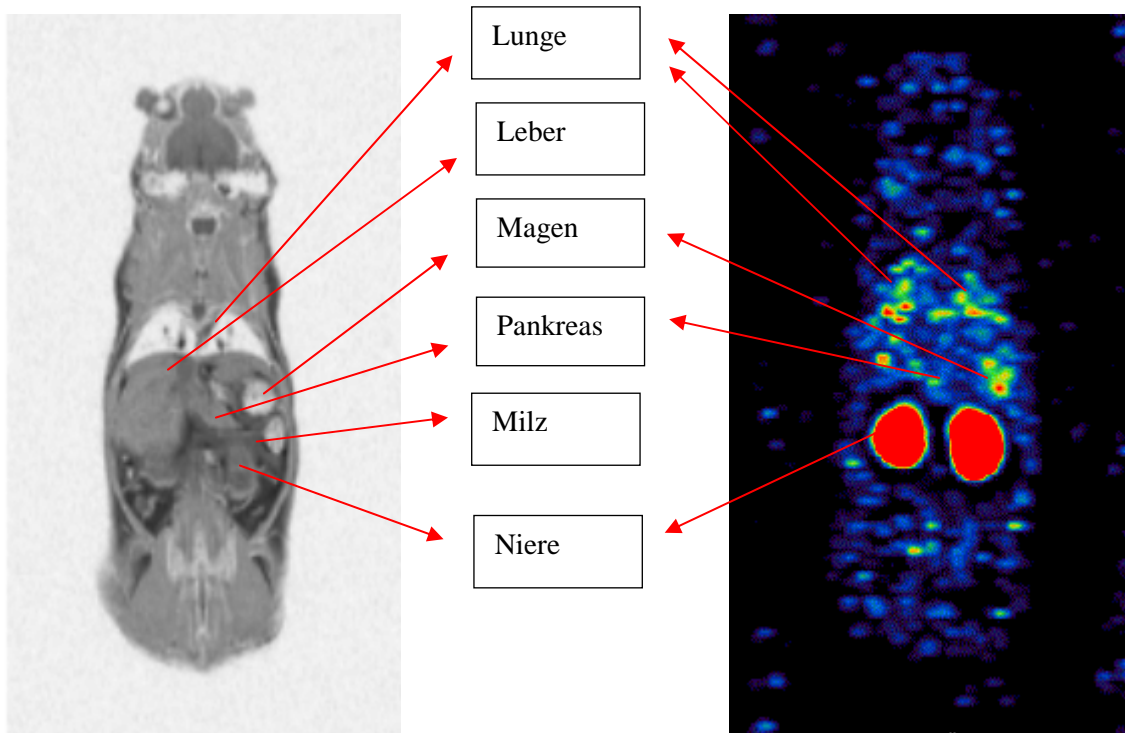


Abb.2: Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 2 sieht man den coronaren Schnitt einer MRT-Aufnahme, den coronaren Schnitt einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In . Im MRT erkennt man sehr gut die Lunge. In der SPECT-Aufnahme erkennt man die

Lunge ebenfalls sehr gut anhand der Aktivitätsanreicherung in beiden Lungenflügeln. Der Magen ist ebenfalls gut im MRT zu erkennen. Im SPECT ist hier eine erhöhte Aktivität nachweisbar. Das Pankreas ist im MRT deutlich zu erkennen. Im SPECT erkennt man, dass große Teile des Pankreas im Bereich des Auslöschungsartefaktes liegen. Es wird sehr stark von der hohen Nierenaktivität überlagert, so dass das Pankreas nicht beurteilbar ist.

3.2.1.3 Sagittale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

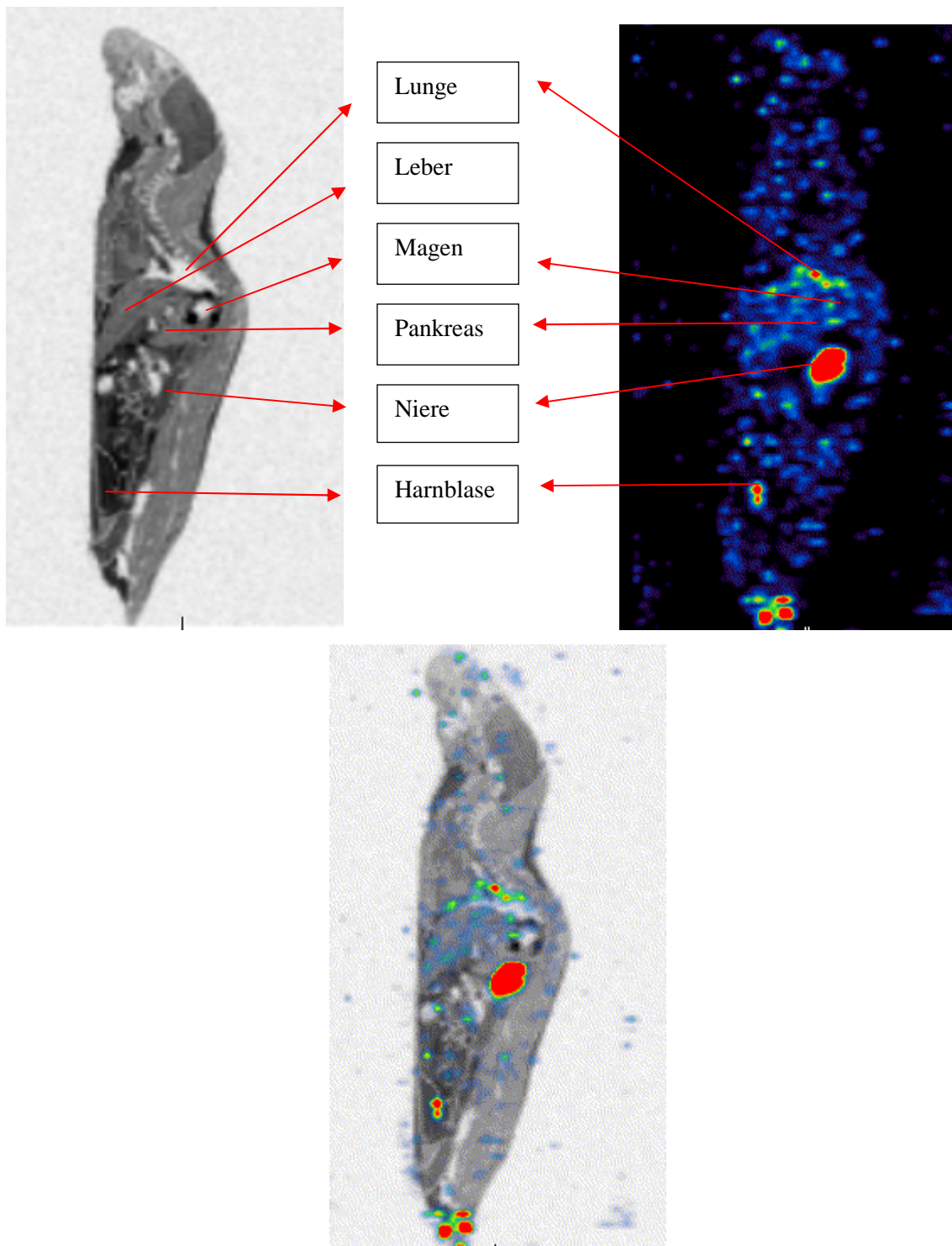


Abb.3: Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 3 sieht man den sagittalen Schnitt einer MRT-Aufnahme, den sagittalen Schnitt einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In . Im MRT ist die Lunge sehr gut zu erkennen. Sie ist auch im SPECT stark signalgebend. Die

Magenregion zeigt ebenfalls eine erhöhte Aktivität im SPECT.

Die linke Niere ist im MRT teilweise zu erkennen. Man erkennt im SPECT die hohe Aktivität der Niere, mit dem Auslöschungsartefakt in der Umgebung.

Das Pankreas ist in der MRT-Aufnahme gut darstellbar, in der SPECT-Aufnahme zeigt sich wieder der störende Einfluss des Auslöschungsartefaktes der um die Nieren herum entsteht. Große Teile des Pankreas werden von dem Auslöschungsartefakt überlagert und sind somit nicht darstellbar. Die Harnblase kommt zur Darstellung, da Exendin-4K40 DTPA mit dem Urin ausgeschieden wird.

3.3 Beurteilung des Pankreas bei C57Bl/6NCrI Mäusen

In der Bildgebung war kein Unterschied zwischen diabetischen und nicht diabetischen Tieren zu erkennen. Dies lag an der Überstahlung des Pankreas durch die hohe Nierenaktivität. Große Teile des Pankreas werden von dem Auslöschungsartefakt überlagert und sind somit nicht darstellbar. Die Betazellmasse des Pankreas von diabetischen und nicht diabetischen Mäusen ist aufgrund des Auslöschungsartefaktes nicht quantifizierbar.

3.4 GLP-1 Rezeptorimaging mit Multipinhole SPECT / MRT an Wistar Unilever Ratten

In diesen Studien wurden die Wistar Unilever Ratten (n=4) mit Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹In markiert. Die Aufnahmen erfolgten jeweils 4h nach der Injektion Radiopharmakons in die Schwanzvene. Die Wistar Unilever Ratten kamen zum Einsatz, da es bei den C57Bl/6NCrl Mäusen zu massiven Auslöschungsartefakten gekommen war, so dass wir das Pankreas nicht beurteilen konnten. Wir erhofften uns, durch den Einsatz der Wistar Unilever Ratten, eine bessere Aussage über das Pankreas treffen zu können. Aufgrund der anatomischen Verhältnisse erhofften wir uns bei den größeren Ratten keine Überstrahlung des Pankreas durch das Auslöschungsartefakt der Niere zu erhalten.

Um die Darstellung der Ergebnisse zu vereinfachen wird exemplarisch jeweils eine Wistar Unilever Ratte in transversaler, coronarer und sagittaler Ebene für Exendin-4K40 DTPA mit ¹¹¹In ausgeführt.

3.4.1 Wistar Unilever Ratte 1 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In , Aufnahmen 4h nach Injektion

3.4.1.1 Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

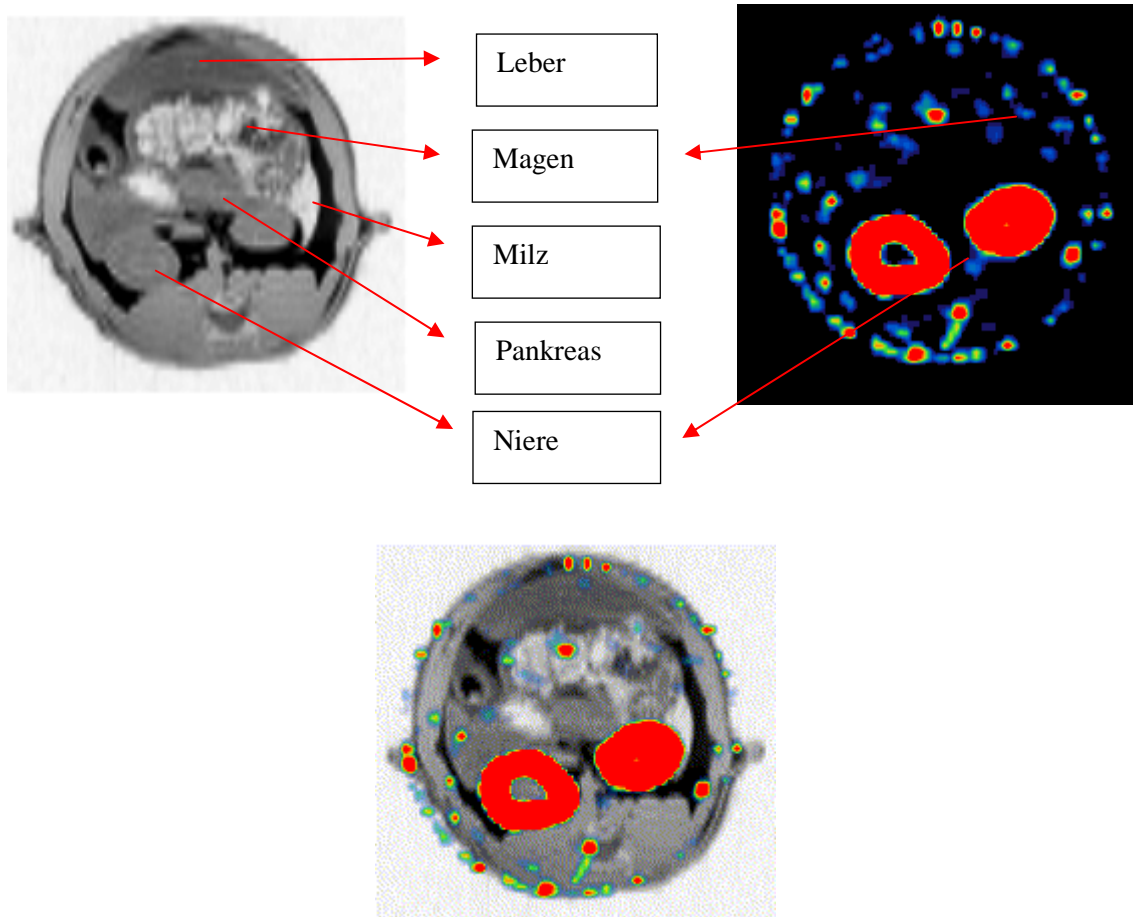


Abb.4: Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 4. sieht man den transversalen Schnitt einer MRT-Aufnahme, den transversalen Schnitt einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In . Im MRT erkennt man sehr gut die Milz, das Pankreas und die Nieren. Auch Magen und Leber lassen sich ventral im Bild identifizieren. Im SPECT-Scan erkennt man eine inhomogen verteilte Aktivität im Magen. Die Nieren zeigen eine hohe Aktivität, mit dem Auslöschungsartefakt der Umgebung. Das Pankreas wird von den Nieren überstrahlt und ist nicht einsehbar. Die SPECT-Aufnahmen sind durch die hohe Aktivitätsanreicherung in den Nieren mit einem daraus resultierenden Auslöschungsartefakt eingeschränkt beurteilbar.

3.4.1.2 Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

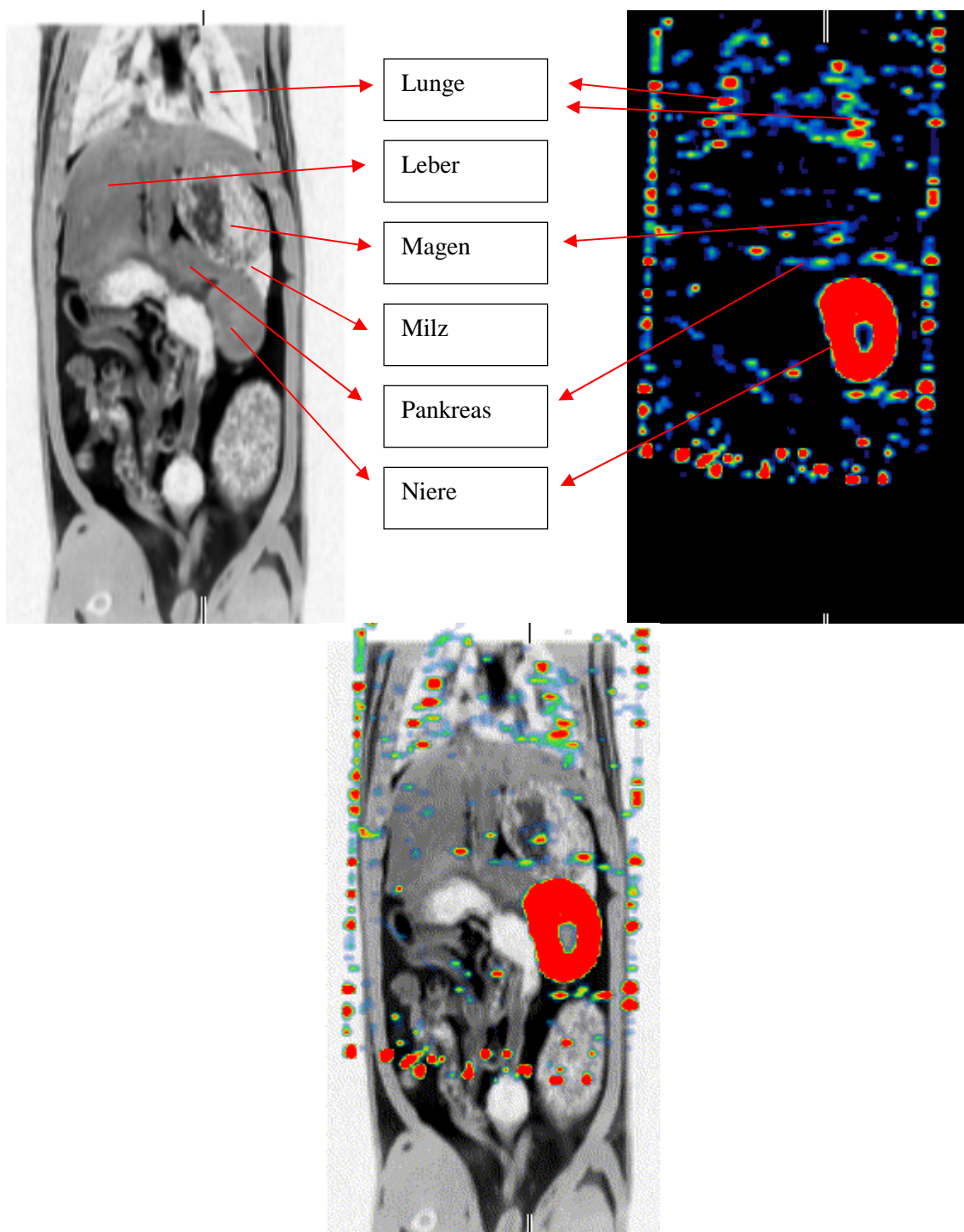


Abb.5: Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 5 sieht man den coronaren Schnitt einer MRT-Aufnahme, den coronaren Schnitt einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq ^{111}In -Exendin-4. Im MRT sind die Lunge, Leber, Magen Milz, Niere und Pankreas deutlich zu erkennen. Die Lungen

besitzen im SPECT-Scan eine hohe Aktivität und lassen sich gut darstellen. Ebenfalls ist die Niere aufgrund der hohen Aktivität deutlich abgebildet. Wie schon in den oben beschriebenen Abbildungen entsteht um die Niere herum ein Auslöschungsartefakt, welches das Pankreas teilweise überlagert. Das Pankreas ist somit nur eingeschränkt beurteilbar. Im Magen ist eine erhöhte Aktivität nachweisbar, die allerdings nicht homogen verteilt ist.

3.4.1.3 Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

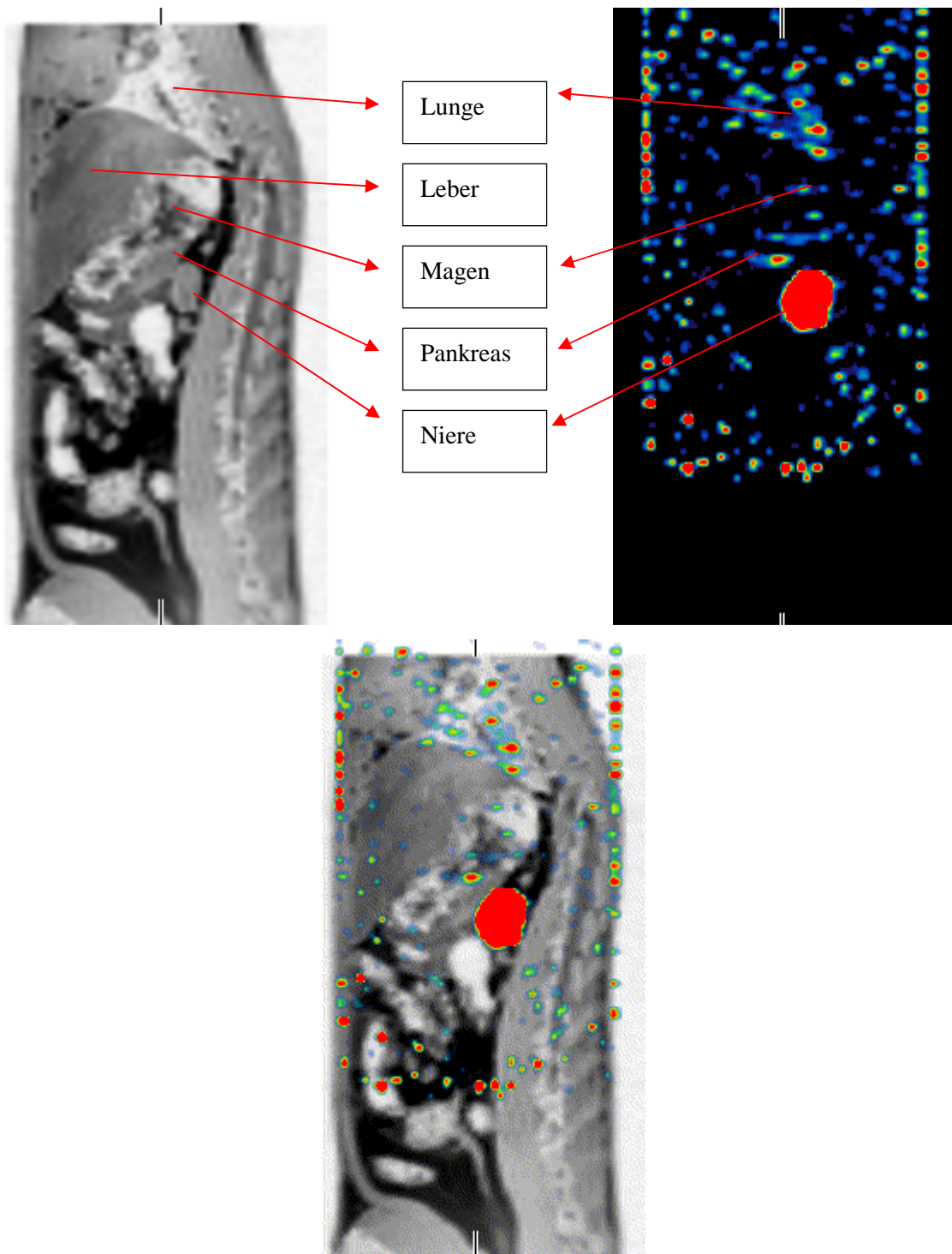


Abb.6: Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 6 sieht man die sagittalen Schnitte einer MRT-Aufnahme, einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In . Im MRT sind die Lunge, Leber, Magen,

Niere und Pankreas deutlich zu erkennen. Die Lunge besitzt in den SPECT-Aufnahmen eine hohe Aktivität und lässt sich gut darstellen. Die Niere ist aufgrund der hohen Aktivität deutlich abgebildet. Wie schon in den oben beschriebenen Abbildungen entsteht um die Niere herum ein Auslöschungsartefakt, welches das Pankreas teilweise überlagert. Man erkennt in der MRT Aufnahme deutlich wie nah das Pankreas an die Niere heranreicht. Im Magen ist eine erhöhte Aktivität nachweisbar, die allerdings nicht homogen in den Organen verteilt ist.

3.5 Beurteilung des Pankreas bei Wistar Unilever Ratten

In der Bildgebung war kein Unterschied zwischen diabetischen und nicht diabetischen Tieren zu erkennen. Dies lag an der Überstahlung des Pankreas durch die hohe Nierenaktivität. Große Teile des Pankreas werden von dem Auslöschungsartefakt überlagert und sind somit nicht darstellbar. Die Betazellmasse des Pankreas von diabetischen und nicht diabetischen Ratten ist aufgrund des Auslöschungsartefaktes nicht quantifizierbar.

3.6 GLP-1 Rezeptorimaging mit Multipinhole SPECT / MRT an Rip1Tag2 Mäusen

In diesen Studien wurden die Rip1Tag2 Mäuse (n=4) mit Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In sowie Exendin-4K40 DTPA mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiert. Die Aufnahmen erfolgten jeweils 4h nach der Injektion des jeweiligen Radiopharmakons in die Schwanzvene.

Der verwendete Rip1Tag2 Mausstamm entwickelt nach ca. 13-20 Wochen multiple Adenome des endokrinen Pankreas (Insulinome) und eignet sich daher gut für unsere bildgebende Diagnostik zur Darstellung GLP-1 exprimierender Tumoren.

Bei den SPECT-Aufnahmen der Rip1Tag2 Mäuse wurde die Dualisotop-Bildgebung durchgeführt. Bei dieser Bildgebung ist es möglich, durch Energiediskriminierung Aufnahmen eines Tieres zu durchzuführen, welches

zeitgleich mit ^{99m}Tc (140keV +- 15%) markiertes Exendin4 und mit ^{111}In (245keV +-15%) markiertes Exendin4 erhalten hat. Man ist dadurch in der Lage unterschiedlich markierte Exendine zeitgleich zu untersuchen.

Um die Darstellung der Ergebnisse zu vereinfachen wird exemplarisch jeweils eine Rip1Tag2 Maus in transversaler, coronarer und sagittaler Ebene für Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In und Exendin-4K40 HYNIC mit ^{99m}Tc ausgeführt.

3.6.1 Rip1Tag2 Maus 1 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In , Aufnahmen 4h nach Injektion

3.6.1.1 Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

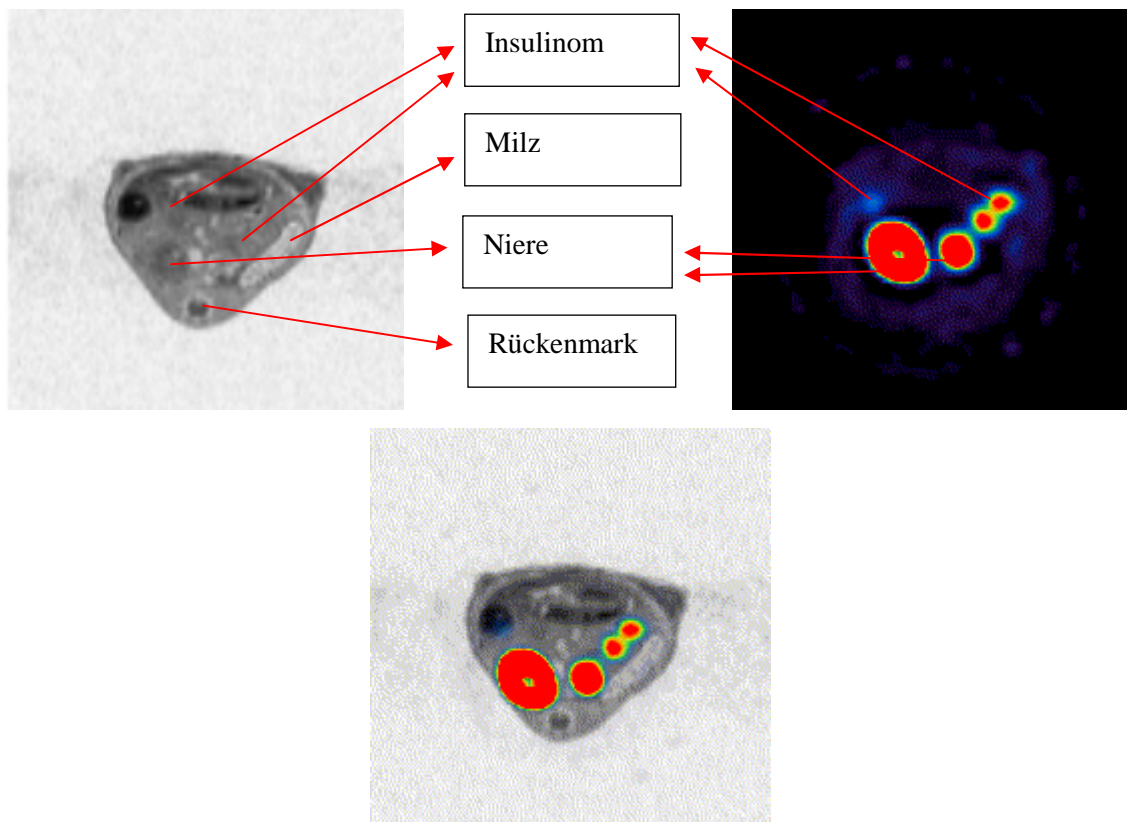


Abb.7: Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

In Abbildung 7 sieht man die transversalen Schnitte einer MRT-Aufnahme, einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In .

Im MRT erkennt man sehr gut die Milz, das Pankreas, das Rückenmark und die Nieren. In der SPECT-Aufnahme erkennt man die hohe Aktivität im Bereich der

Nieren. Aufgrund dieser hohen Aktivität ist es zu einem Auslöschungsartefakt in der direkten Umgebung der Nieren gekommen. Diese Region ist dadurch nur bedingt beurteilbar. Ventral der linken Niere sind zwei deutliche Mehranreicherung im Pankreas zu erkennen. In der Fusion erkennt man, dass die Regionen vermehrter Aktivität im Pankreas ein Korrelat im MRT besitzen. Dies entspricht den Insulinomen, die bei den Rip1Tag2 Mäusen ab der 13. Woche entstehen. Die Insulinome besitzen an ihre Oberfläche eine hohe Dichte von GLP-1 Rezeptoren an die das verwendete Exendin-4K40 DTPA bindet. Ventrolateral der rechten Niere befindet sich eine Mehranreicherung, im MRT entspricht dieser Bereich der Leber, so dass hier von einer Metastase des Insulinoms ausgegangen werden kann.

3.6.1.2 Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

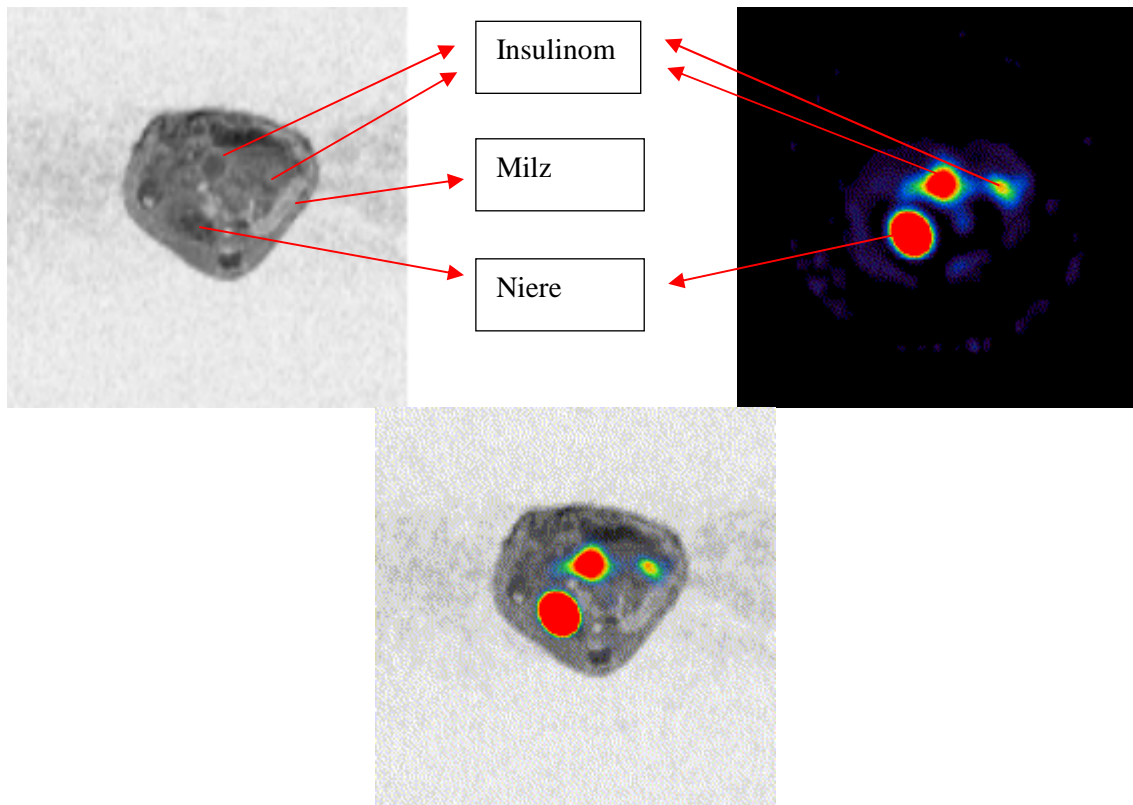


Abb.8: Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

Wie Abbildung 8 nur mit einer guten Darstellung eines Insulinoms im zentralen Pankreas, sowie im Pankreasschwanzbereich. Das Pankreas erscheint im MRT durch die Tumorerkrankung vergrößert und verdickt. Die Raumforderung die im MRT gut vom Pankreas abgrenzbar ist, ist auch im SPECT stark aktivitätsanreichernd. In der Fusion zeigt sich eine Überlagerung.

3.6.1.3 Coronare Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

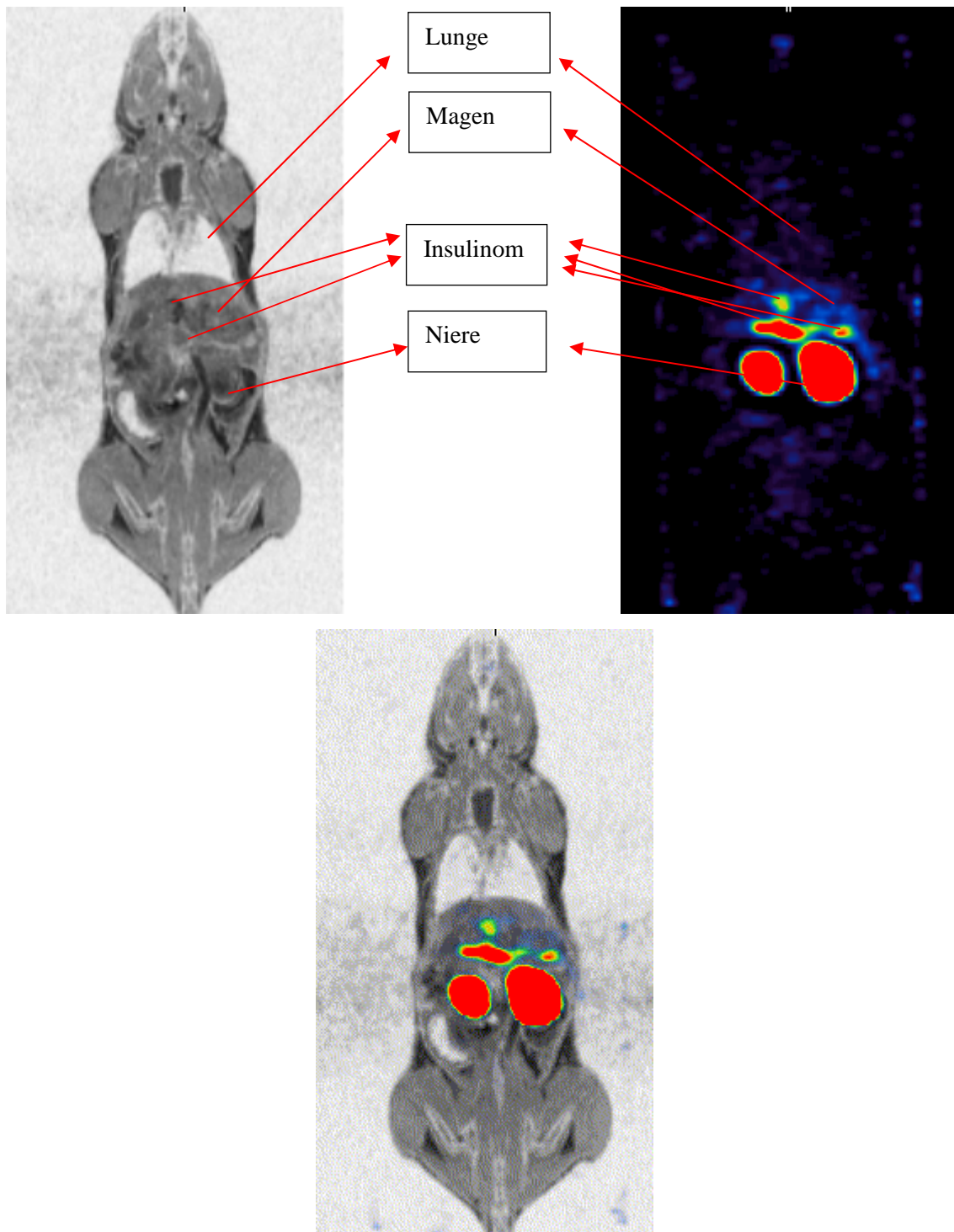


Abb.9: Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 9 sieht man die coronaren Schnitte einer MRT-Aufnahme, einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von

18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In . Im MRT erkennt man die Nieren, kranial der Nieren das Pankreas mit zwei auffälligen Regionen. Im SPECT sind diese beiden Regionen ebenfalls signalgebend. Dies spricht für multiple Adenome (Insulinome) der Rip1Tag2 Maus. Im Bereich des rechten Leberlappens erkennt man im MRT ebenfalls eine auffällige Struktur, die ebenfalls im SPECT eine vermehrte Aktivität zeigt. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine Lebermetastase des bekannten Insulinoms. Weiterhin sind die Lungenflügel im MRT gut zu erkennen und auch im SPECT zeigen diese eine leichte Signalverstärkung. Der Magen ist im MRT im linken Oberbauch zu erkennen, in der SPECT-Aufnahme sieht man in diesem Bereich ebenfalls eine erhöhte Aktivität. In der SPECT-Aufnahme wird die sehr hohe Aktivität im Bereich der Nieren deutlich, die so hoch ist, dass es in der unmittelbaren Umgebung zu einem Auslöschungsartefakt gekommen ist. Diese Region ist dadurch nur bedingt beurteilbar.

3.6.1.4 Sagittale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

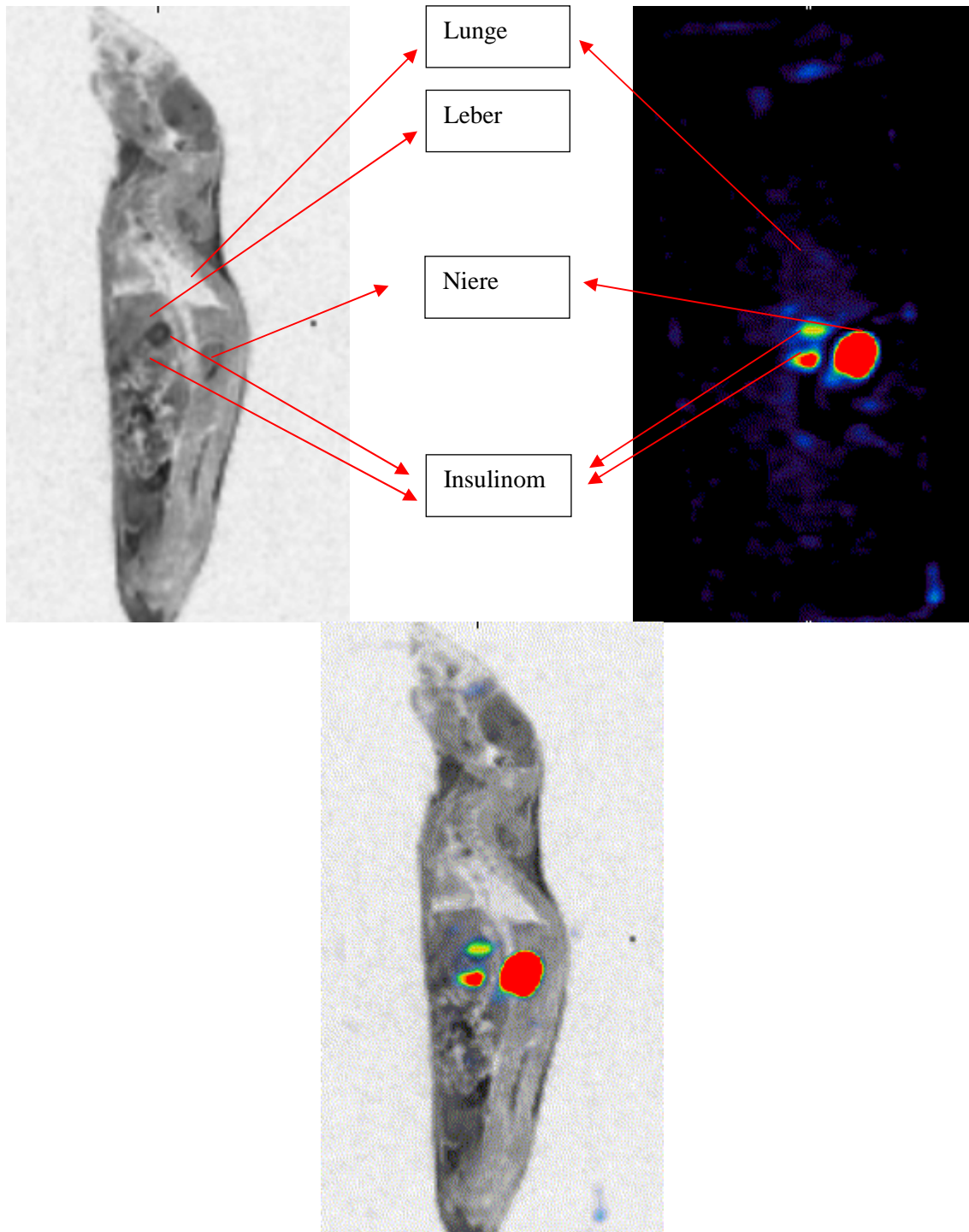


Abb.10: Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 10 sieht man die sagittalen Schnitte einer MRT-Aufnahme, einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In . Im MRT erkennt man angedeutet die linke Niere. Ventral der linken Niere ist das Insulinom im Pankreas als

Raumforderung deutlich zu erkennen. In der SPECT-Aufnahme kommt es auch in diesem Bereich zu einer deutlichen Signalaktivität, die das Insulinom aufgrund seiner hohen GLP-1 Rezeptordichte bestätigt. Kranial des Insulinoms ist eine weiter im SPECT stark signalgebende Struktur erkennbar. Im MRT fällt in diesem Bereich eine Raumforderung auf, die am ehesten einer Metastase des bekannten Insulinoms entspricht.

Im Bereich der linken Niere erkennt man eine sehr hohe Aktivität. Teile des Pankreas werden von dem Auslöschungsartefakt überlagert und sind somit nicht darstellbar.

Die Lunge ist auch in dieser Ebene mit einer erhöhten Aktivität gut darstellbar.

3.6.2 Rip1Tag2 Maus 2 markiert mit 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit ^{99m}Tc , Aufnahmen 4h nach Injektion

3.6.2.1 Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

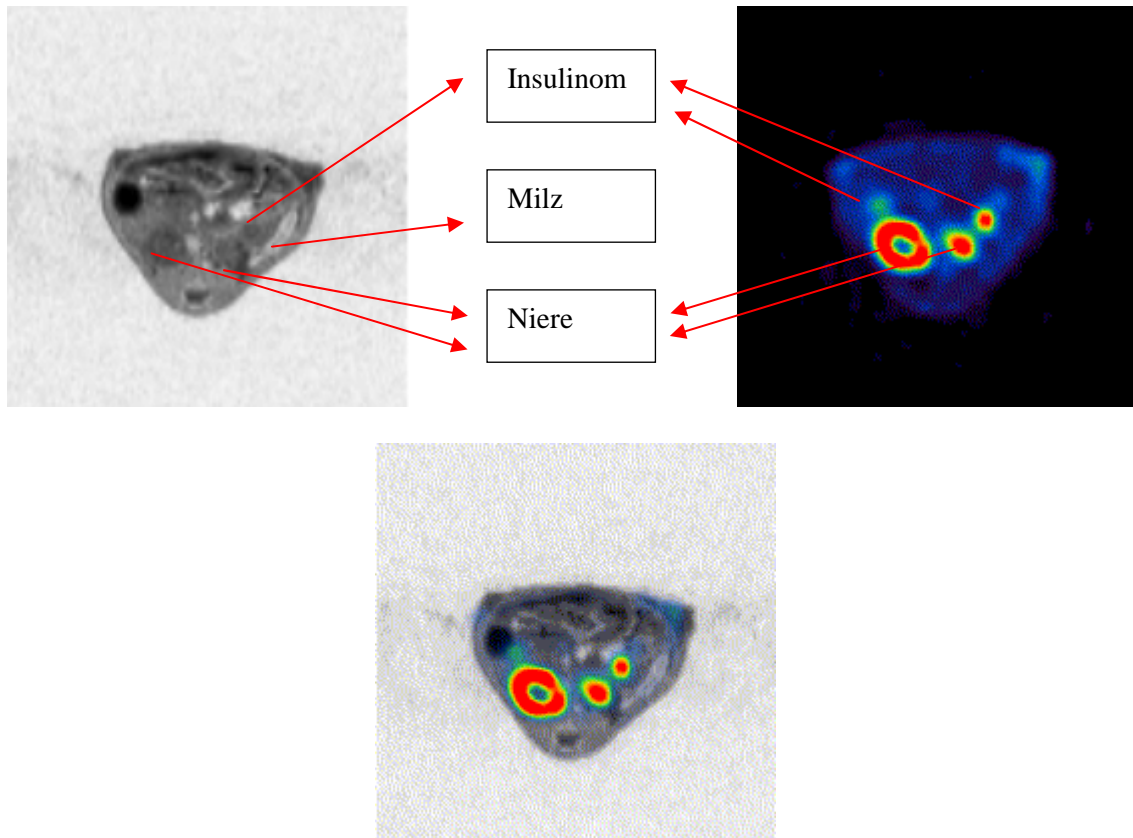


Abb. 11: Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 11 sieht man die transversalen Schnitt einer MRT-Aufnahme, einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit ^{99m}Tc . Im MRT erkennt man deutlich die beiden Nieren. Diese sind auch im SPECT stark signalgebend, wie oben bereits erwähnt. Ventrolateral der linken Niere zeigt sich deutlich die Raumforderung im Pankreas, bei der es sich um ein Insulinom handelt. Deutlich wird dies auch durch die hohe Aktivität im SPECT in diesem Bereich.

Ventrolateral der rechten Niere kommt es ebenfalls zu einer Signalanreicherung im SPECT, hierbei handelt es sich um eine Filialisierung des Insulinoms, das Korrelat ist im MRT nicht sicher abzugrenzen.

In dieser Abbildung erkennt man deutlich die hohe Aktivität im Bereich der Nieren. Auffallend ist bei den Aufnahmen mit ^{99m}Tc , dass es nicht zu einem Auslöschungsartefakt im Bereich der Nieren kommt und somit das Pankreas

besser zu beurteilen ist. Ein Nachteil der ^{99m}Tc -Markierung ist allerdings eine erhöhte Hintergrundaktivität, was insgesamt zu einer vermehrten Unschärfe der Aufnahmen führt.

3.6.2.2 Transversale Schnittführung von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

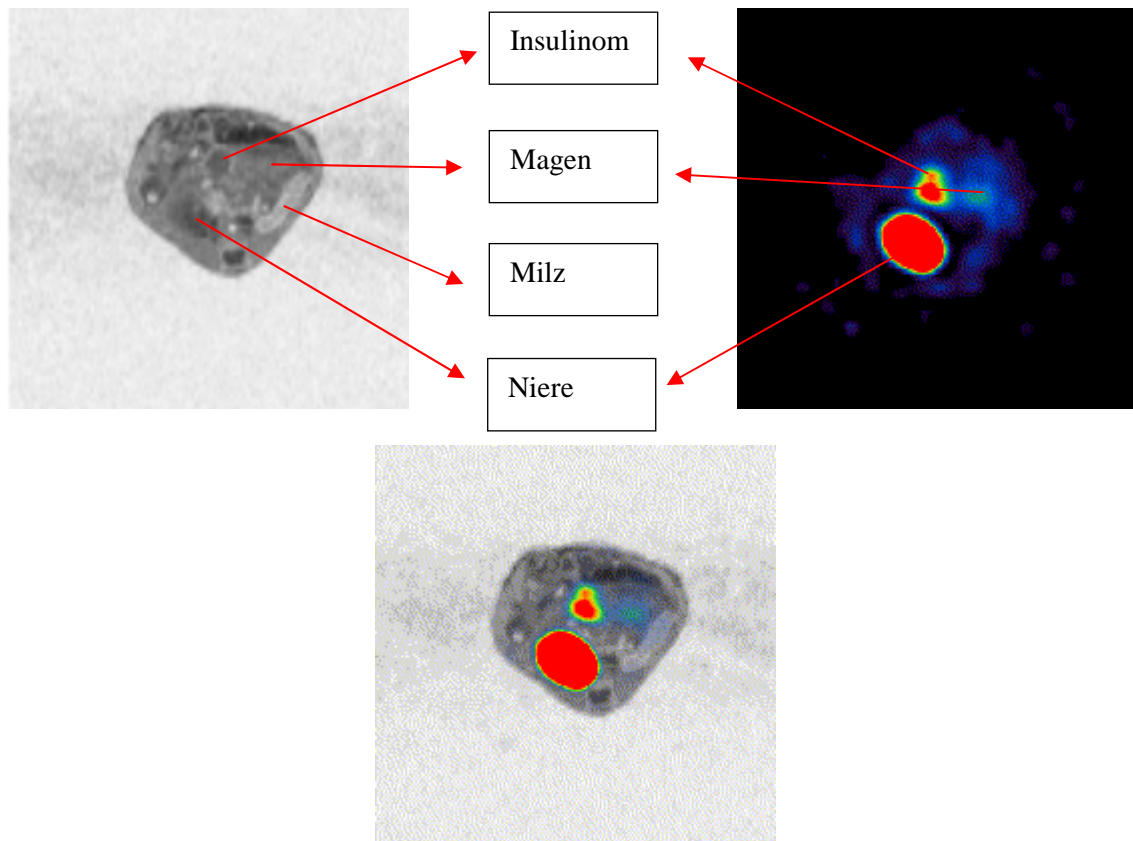


Abb. 12: Transversale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

Wie Abbildung 11 nur mit einer guten Darstellung eines Insulinoms im zentralen Pankreas. Das Pankreas erscheint im MRT durch die Tumorerkrankung vergrößert und verdickt. Die Raumforderung, die im MRT gut vom Pankreas abgrenzbar ist, ist auch im SPECT stark aktivitätsanreichernd. In der Fusion zeigt sich dann die Übereinstimmung. Wie auch schon in den Aufnahmen mit Indium ist das Insulinom auch in der Markierung mit Technetium stark aktivitätsanreichernd. Die erhöhte Aktivität im Magen lässt sich im SPECT-Scan ebenfalls gut darstellen.

3.6.2.3 Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

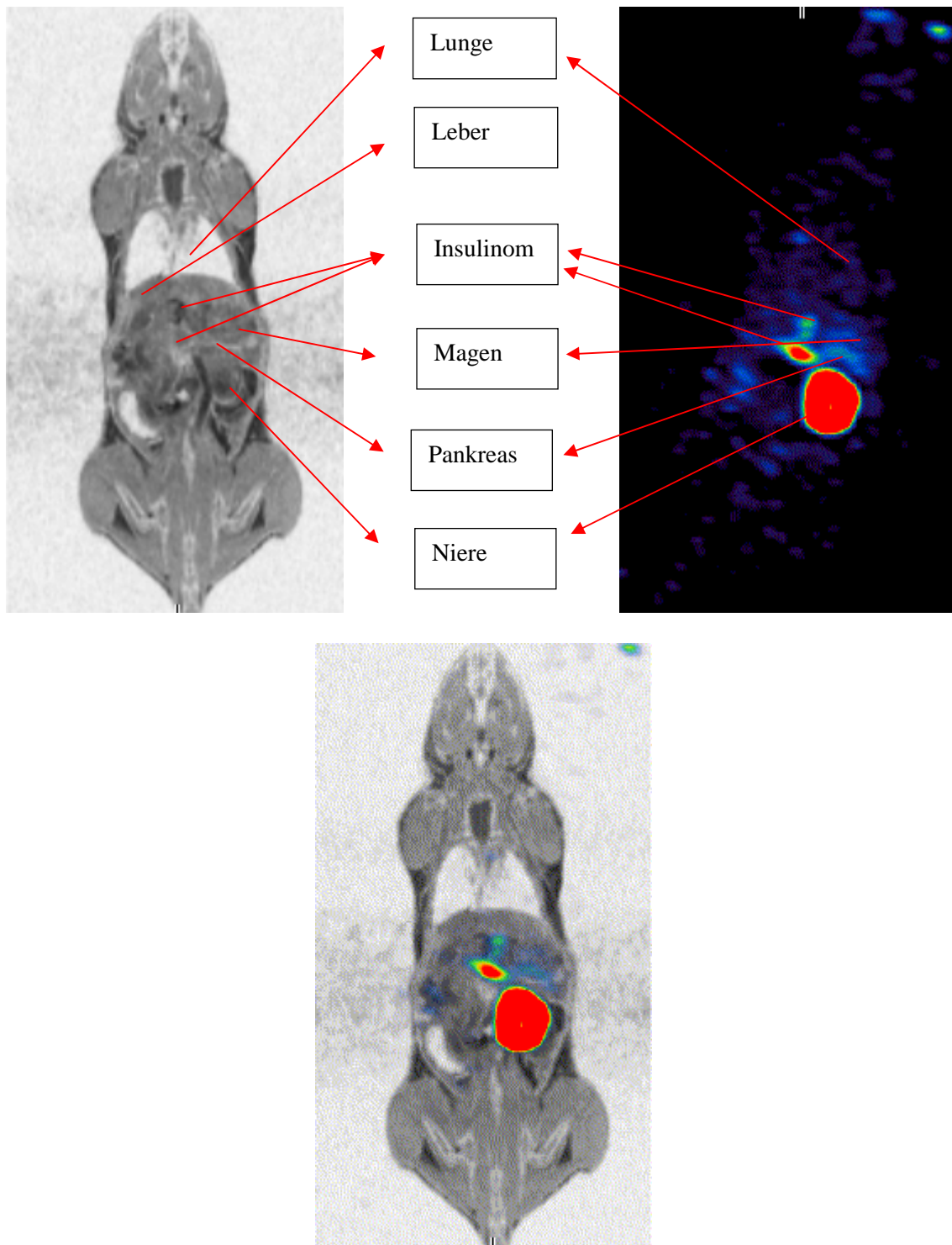


Abb. 13: Coronare Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 13 sieht man die transversalen Schnitte einer MRT-Aufnahme, einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit ^{99m}Tc . Im MRT erkennt man

deutlich die linke Niere. Diese ist auch im SPECT stark signalgebend. Kranial der linken Niere erkennt man im MRT eine Raumforderung im Pankreas. Diese Raumforderung ist auch im SPECT signalgebend, so dass hier von dem bekannten Insulinom der Rip1Tag2 Maus ausgegangen werden kann. Weiter kranial des Insulinoms erkennt man im SPECT zwei weitere etwas kleinere signalreiche Strukturen, die als Metastasen gewertet werden können.

Auch bei diesen Aufnahmen erkennt man im SPECT ein Auslöschungsartefakt um die Nieren herum, allerdings ist es nicht so stark ausgeprägt wie bei den Aufnahmen mit ^{111}In .

Des Weiteren erkennt man im SPECT-Scan eine Anreicherung im Bereich der Lunge und des Magens.

3.6.2.4 Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h).

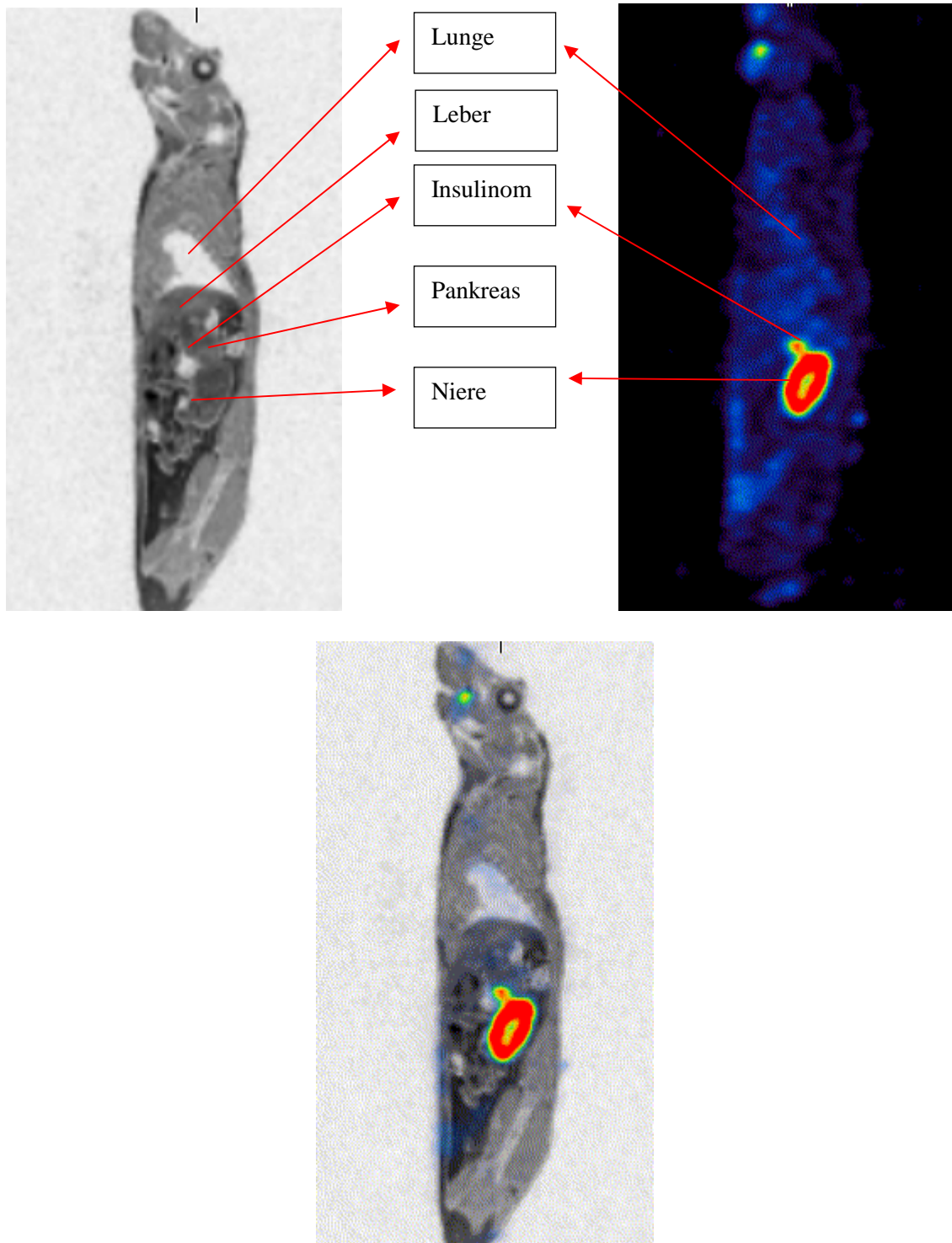


Abb. 14: Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

In Abbildung 14 sieht man die transversalen Schnitte einer MRT-Aufnahme, einer SPECT-Aufnahme und die Fusion beider Aufnahmen, 4h nach der Injektion von 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit ^{99m}Tc . Im MRT erkennt man

deutlich die linke Niere. Diese ist auch im SPECT stark signalgebend. Im sagittalen Schnittbild ist das Insulinom des Pankreas im MRT sehr gut zu erkennen. Im SPECT-Scan zeigt es eine erhöhte Aktivität. Die Lunge ist im MRT ebenfalls gut zu erkennen und auch im SPECT ist sie signalgebend. Auch bei diesen Aufnahmen ist es nur zu einem geringen Auslöschungsartefakt der Niere gekommen.

3.6.2.5 Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

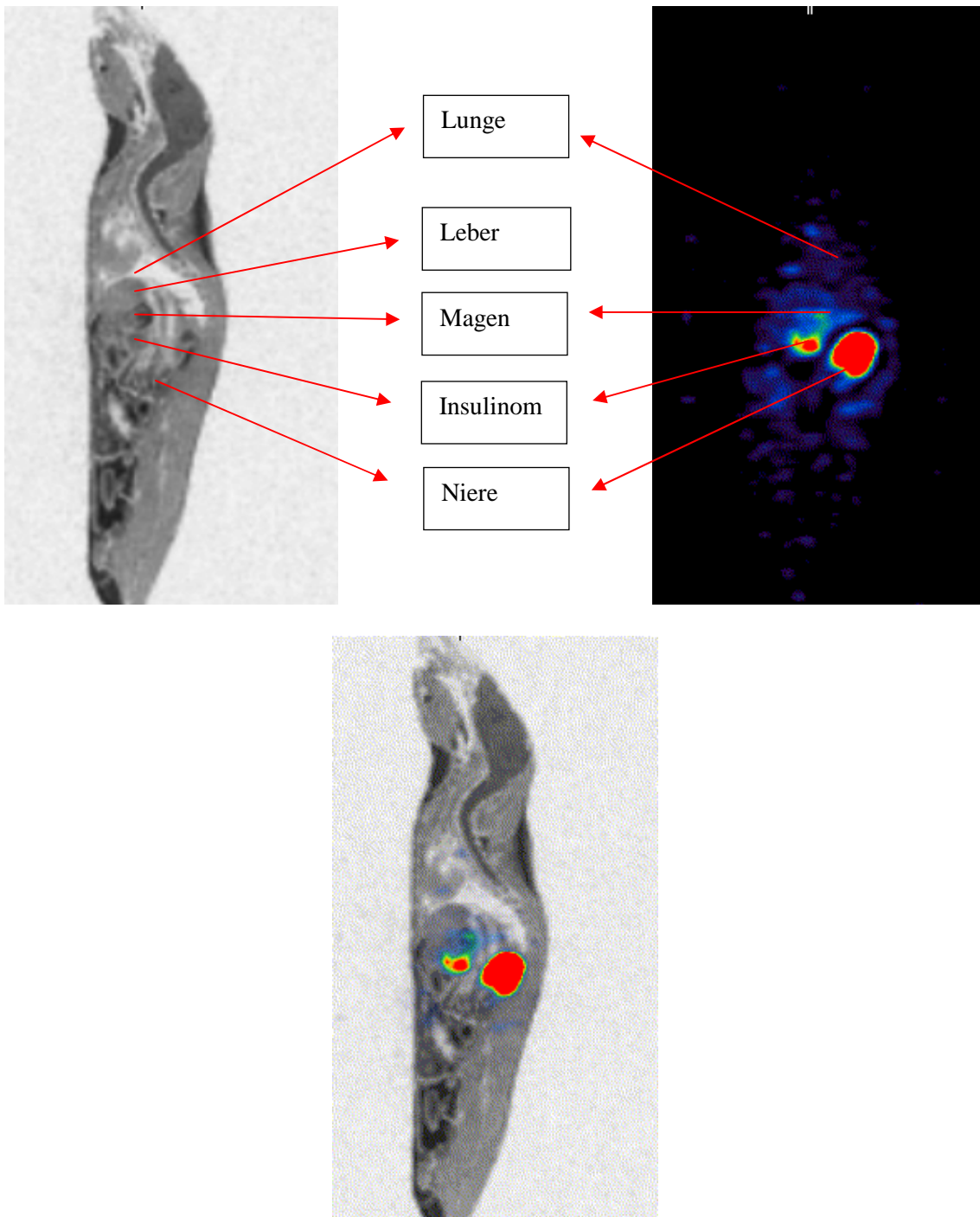


Abb. 15: Sagittale Schnittführungen von MRT, SPECT, Fusion (t= 4h)

Wie Abbildung 14 nur mit einer guten Darstellung eines Insulinoms im zentralen Pankreas. Kranial des Pankreas ist eine Aktivitätsanreicherung im Bereich des Magens zu erkennen.

4 Diskussion

Bei der Bildgebung mittels ^{111}In markiertem Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertem Exendin-4K40 HYNIC nutzt man das Prinzip des „metabolic trapping“. Nach der Internalisierung des Radiopeptides in die Zelle, kann das Radiometall in der Zelle nur sehr limitiert weiter verstoffwechselt werden. Der Radioisotop-Chelat-Komplex wird mangels Transporter sehr langsam aus der Zelle freigesetzt. Das ^{111}In markierte Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markierte Exendin-4K40 HYNIC verbleiben zum größten Teil in der Zelle und können mit Hilfe von SPECT sichtbar gemacht werden. Dies führt zu einer hohen target-to-background ratio und einer hohen in vivo Sensitivität der Markierung (Gotthardt et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde Exendin-4 mit DTPA gekoppelt, um es einer ^{111}In -Markierung zugänglich zu machen. Die Vorteile von ^{111}In bestehen in der relativ langen Halbwertszeit von 2,8 Tagen, sowie in der Markierung in einem Schritt. Die lange Halbwertszeit erlaubt die Durchführung von Spätaufnahmen. Ein Nachteil des ^{111}In besteht in den höheren Kosten und in der komplizierten Logistik.

Zusätzlich wurde Exendin-4 mit HYNIC gekoppelt, um es mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markieren zu können. Da HYNIC nur eine Bindungsstelle für das Radiometall bereithält, wurden die weiteren freien Bindungsstellen mit den Coliganden Tricin oder EDDA besetzt. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ist ein in der Nuklearmedizin weit verbreitetes Nuklid, da es eine kurze Halbwertszeit von 6 Stunden besitzt. Ein weiterer Vorteil ist die kostengünstige Herstellung sowie die besseren physikalischen Eigenschaften. Ein Nachteil in der Verwendung von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ die mehrschrittige und aufwendige Markierung. Aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit ist bei $^{99\text{m}}\text{Tc}$ eine schlechtere Backgroundclearance zu erwarten. Aus diesem Grund liegt in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf der Indiummarkierung.

Ziel dieser Arbeit war die in vivo Darstellung von GLP-1 Rezeptoren von Nagetieren, mittels Fusion von SPECT-Aufnahmen von radiometallmarkierten Nukliden mit MRT Bildern. Im Einzelnen wurden ^{111}In markiertes Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertes Exendin-4K40 HYNIC eingesetzt. Unser Hauptziel

war die Visualisierung von GLP-1 Rezeptor exprimierenden Geweben. Wir versuchten daher mit dem GLP-1 Analogon Exedin-4, welches eine hohe spezifische Bindung an GLP-1 Rezeptoren besitzt, Strukturen zu visualisieren, die an ihrer Oberfläche GLP-1 Rezeptoren besitzen. Dazu gehört unter anderem das endokrine Pankreas. Ein weiteres Ziel war die Darstellung von Insulinomen, die an ihrer Oberfläche GLP-1 exprimieren. Des Weiteren versuchten wir in unserer Arbeitsgruppe die Abnahme der Betazellmasse bei diabetischen Tieren visuell sichtbar und messbar zu machen. Eine Aussage über die absolute Betazellmasse in vivo ist zurzeit noch nicht möglich, da es bisher keinen spezifischen β -Zell-Tracer für die molekulare Bildgebung gibt.

Bei allen Aufnahmen kam es zu einer sehr hohen Aktivität im Bereich der Nieren. Dies liegt daran, dass Exendin-4K40 DTPA über die Niere ausgeschieden wird und nach der Filtration über die Bowman-Kapsel eine Rückresorption im Bereich des Tubulussystems erfolgt. Diese Rückresorption führt dazu, dass Exendin-4K40 DTPA in der Niere eingelagert wird (Melis et al. 2005; Kwekkeboom et al. 2005; Vegt et al. 2008). Dieser sehr hohe Uptake in den Niere ließ sich bei Gotthardt et al. in der Bioverteilung nachweisen (Gotthardt et al. 2006).

4.1 Nierenuptake

Das größte Problem dieser Arbeit war das bereits mehrfach erwähnte Auslöschungsartefakt. Dieses entstand aufgrund der erhöhten Nierenaktivität durch die vermehrte Aufnahme von In-111 Exendin-4K40 DTPA und ^{99m}Tc markierte Exendin-4K40 HYNIC. Die Aktivität in der Niere war mit ^{111}In so hoch, dass es bei allen Aufnahmen zu einem Auslöschungsartefakte in der unmittelbaren Umgebung der Nieren gekommen ist. Diese Tatsache vermindert die Auswertbarkeit bezüglich des Pankreas, denn das Pankreas ist anatomisch nahe an der Niere lokalisiert. Durch diese Überlagerung ist es nur noch eingeschränkt beurteilbar. Es fällt auf, dass das Auslöschungsartefakt in den Aufnahmen bei denen ^{99m}Tc verwendet wurde nicht so stark ausgeprägt ist. Dies liegt an den besseren physikalischen Eigenschaften von ^{99m}Tc , dafür weist ^{99m}Tc aber eine höhere unspezifische Anreicherung im Gewebe auf. Diese unspezifische Anreicherung führt zu einer gewissen Unschärfe der Bilder.

Hassan et al. beschrieben bereits 1999 Rezeptoren für GLP-1 in den Tubuli der Niere (Hassan et al., 1999). Doch die GLP-1 Rezeptoren können für diesen starken Uptake nicht alleine verantwortlich gemacht werden. Im Jahr 2006 konnten Gotthardt et al. zeigen, dass ein Überschuss an kaltem Exendin-4 keine Veränderung im Nierenuptake erkennen lässt. Es kommt aber zu einem Abfall des Uptakes bei den Rezeptorpositiven Organen (Gotthardt et al., 2006). Der spezifische Uptake über den Rezeptor wird wahrscheinlich durch den Uptake des reabsorbativen Mechanismus überlagert. Eine weitere Möglichkeit, wie die hohe Aktivität in den Nieren zu erklären wäre, ist die Aufnahme von Exendin-4 über den Megalin-Rezeptor. Dieser Mechanismus wurde bereits bei dem Somatostationanalogon Octreotide beschrieben (De Jong et al., 2005; Melis et al., 2005). Mit den Aminosäuren Lysin und Arginin kann bei Octreotid eine wirksame Nephroprotektion durchgeführt werden. Gotthardt et al. konnten 2007 an Wistar Ratten zeigen, dass die Nephroprotektion mit Lysin bei ^{111}In markiertem Exendin unwirksam ist (Gotthardt et al., 2007). Gotthardt et al. konnten weiterhin nachweisen, dass Polyglutaminsäure den Nierenuptake von Exendin gering senkt, jedoch keine Auswirkung auf den Uptake von Octreotide hat. Es scheint also zwei unterschiedliche Uptake-Mechanismen in der Niere für Octreotide und Exendin zu geben. Eine Blockierung beider Uptake-Mechanismen gelang dieser Arbeitsgruppe mit Hilfe des Plasmaexpanders Gelofusin.

4.2 Tiermodelle

Zur Durchführung der SPECT und MRT Aufnahmen wurden die Tiere, 4 Stunden nach der Injektion der radiometallmarkierten Nuklide in die Schwanzvene, narkotisiert und anschließend auf einer speziellen Vorrichtung fixiert, um die absolute Immobilität zu gewährleisten. Die SPECT Aufnahmen wurden auf einer Siemens e.cam durchgeführt und die MRT Aufnahmen wurden mit einem 1,0 Tesla Scanner Magnetom Expert der Firma Siemens durchgeführt. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) wurde eine spezielle Kleintiermagnetspule benutzt. Die Fusion der MRT Daten mit den SPECT Daten erfolgte an einer HERMES work station.

Wir untersuchten mit ^{111}In markiertem Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$

markiertem Exendin-4K40 HYNIC C57Bl/6NCrl Mäuse, Wistar Unilever Ratten und Rip1Tag2 Mäuse. Die Abnahme der Betazellmasse bei diabetischen Tieren konnte mit dieser Methode visuell nicht sichtbar und messbar gemacht werden. Dies lag an der Überstrahlung des Pankreas durch die hohe Aktivität in den Nieren. Das Pankreasgewebe konnte somit nicht mehr in seiner Gesamtheit dargestellt werden und entzog sich dadurch der Auswertbarkeit. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Pankreas von Wistar Unilever Ratten schlechter darstellbar ist als das Pankreas von Mäusen. Als Ursache kann eine geringere Betazellmasse bei Ratten angenommen werden. Gotthardt et al. zeigten 2006, dass der relative Uptake pro Gramm Pankreasgewebe bei Mäusen höher ist als bei Ratten. Dies lässt auf eine höhere Betazellmasse bei Mäusen schließen (Bock et al., 1999; Gotthardt et al., 2006). Prinzipiell ist es möglich mit Hilfe von radiometallmarkierten Nukliden die Betazellmasse des Pankreas in Kleintieren zu visualisieren, allerdings muss dazu die Nierenaktivität vermindert werden um die Überstrahlung des Pankreas zu reduzieren. Weitere Untersuchungen müssen hierzu in Zukunft durchgeführt werden und die Radiopharmaka müssen optimiert werden, um die Methode zu verbessern.

Die Lungenflügel waren bei den Ratten deutlicher zu erkennen. Gotthardt et al. konnten zeigen, dass die Lunge von Ratten einen höheren Uptake pro Gramm Lungengewebe besitzt. (Gotthardt et al. 2006). Körner et al. konnten 2007 zeigen, dass die GLP-1 Dichte in der Lunge des menschlichen Körpers niedriger zu sein scheint als bisher immer angenommen.

Die untersuchten Rip1Tag2 Mäuse sind ein Inzuchtstamm, der nach ca. 6 Wochen Veränderungen an der Beta-Zelle des Pankreas zeigt und nach ca. 13-20 Wochen aufgrund der multiplen Adenome (Insulinome) hypoglykämisch wird (Hanahan et al. 1985, Lyman et al. 2005, Crabtree et al. 2003). Dieser Inzuchtstamm eignet sich sehr gut für unsere Studien, da die Insulinome an ihrer Oberfläche eine sehr hohe Dichte an GLP-1 Rezeptoren besitzen. Diese Rezeptorendichte ist besonders für die SPECT Untersuchungen von besonderem Interesse, da Exendin-4K40 DTPA spezifisch an den GLP-Rezeptor bindet. Diese Tumoren konnten mit unserer Methode im Multipinhole SPECT/MRT gut dargestellt werden. (Siehe Ergebnisse)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Organe mit einem spezifischen Uptake in der Biodistribution wie Pankreas, Lunge und Nieren, im SPECT ebenfalls gut sichtbar sind (Gotthardt et al. 2006).

Nach den Daten der vorliegenden Arbeit erscheint eine Szintigraphie mit ^{111}In markiertem Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertem Exendin-4K40 HYNIC als aussichtsreich zur Detektion von Tumoren die an ihrer Oberfläche GLP-1 Rezeptoren exprimieren, wie Insulinome. Rezeptorexprimierende Organe und Tumoren wurden von unserer Arbeitsgruppe erfolgreich in Ratten und Mäusen szintigraphisch nachgewiesen.

In der Zukunft kann diese neue Technologie zur Detektion und ggfs. Therapie von Insulinomen, die eine hohe GLP-1 Rezeptordichte besitzen, genutzt werden. Weiter präklinische Studien müssen jedoch noch durchgeführt werden, um die Methode im Bezug auf den Nierenuptake zu verbessern und den möglichen Nutzen für den Menschen zu untersuchen. Bei der Peptidrezeptorvermittelten Radiotherapie (PRRT) neuroendokriner Tumoren ist ein niedriger Nierenuptake unerlässlich. Die Nephrotoxizität ist das bisher bedeutsamste Risiko der Behandlung und die Niere ist das dosislimitierende Organ der PRRT.

Eine aus dieser Methode resultierende Therapie von Insulinomen z.B. durch Radioligandentherapie wäre für die Zukunft wünschenswert, aufgrund des hohen Nierenuptakes und der daraus resultierenden möglichen Nierenschädigung, ist dies zur Zeit noch nicht möglich.

Ein großer Vorteil der in vivo SPECT Untersuchung im Gegensatz zur Biodistribution besteht darin, dass die Labortiere mehrfach hintereinander eingesetzt werden können. Sie müssen für die Datenerhebung nicht getötet werden. So ist es möglich longitudinale Studien über einen längeren Zeitraum zu erstellen und den Verlauf einer Erkrankung an ein und demselben Tier über einen längeren Zeitraum zu erforschen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Tiere auch unter differierenden Bedingungen untersucht werden können. In den Biodistributionsdaten dieser Arbeit, die von einer anderen Arbeitsgruppe genutzt wurden, 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.

4.3 Ausblick

Insulinome sind meist gutartige, solitär vorkommende, neuroendokrine Tumoren. Sie leiten sich von den pankreatischen Betazellen ab. Die Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren fordert nach den aktuellen Leitlinien einen multimodalen Ansatz mit zeitaufwendigen und invasiven Methoden.

Prinzipiell sind mehrere klinische Anwendungsgebiete von GLP-1-Analoga denkbar. Aufgrund des großen GLP-1-Rezeptorenbesatzes von Insulinomen könnte ein Forschungsschwerpunkt auf der prä- und intraoperativen Detektion, sowie auf einer Radiopeptidtherapie von solchen Tumoren liegen.

GLP-1-Rezeptorszintigraphie

Im August 2008 konnten Wild et. al mit Hilfe der GLP-1-Rezeptorszintigraphie okkulte Insulinome in zwei Patienten nachweisen. Diese Insulinome konnten vorher durch konventionelle Methoden aufgrund ihrer geringen Größe nicht oder nur unzureichend lokalisiert werden (Wild et al. 2008). Dies zeigt, dass die GLP-1-Rezeptor-Szintigraphie eine neue, diagnostische Möglichkeit darstellt um kleine Insulinome mit einem maximalen Durchmesser von 1mm zu lokalisieren, die sich der konventionellen Diagnostik entziehen. In Zukunft könnten Patienten von einer neuen, sensitiven und nicht-invasiven Methode zur Diagnostik von Insulinomen profitieren. Die bei anderen neuroendokrinen Tumorerkrankungen etablierte Somatostatin-Rezeptorszintigraphie besitzt für die Diagnose von Insulinomen nur eine geringe Sensitivität, da ca. 50% der Insulinome keine Somatostatinrezeptoren der Subtypen 2 und 5 exprimieren. Insulinome exprimieren jedoch zu einem hohen Prozentsatz GLP-1 Rezeptoren. Dies kann man nutzen um die Insulinome mit Hilfe von GLP-1 bzw. GLP-1-Analoga zu detektieren (Wild et al. 2006). Die Anforderungen für eine klinische Anwendung zur szintigraphischen Darstellung von Insulinomen, nämlich hohe Rezeptordichte auf der Zielstruktur, eine hohe Affinität des Liganden für die Rezeptorbindung, eine kurze bis mittlere Plasmahalbwertszeit, ein maximales Tumor-to-background Verhältnis und die Möglichkeit der radioaktiven

Markierung werden von Exendin-4K40 DTPA und Exendin-4K40 HYNIC erfüllt (Mariani et al. 2006). Die GLP-1-Rezeptorszintigraphie mit diesen Peptiden zeigt ein großes klinisches Potential für das Auffinden von Insulinomen und könnte so den Patienten präoperative, invasive Diagnostik ersparen und den Chirurgen bei der genauen präoperativen Lokalisation unterstützen (Wild et al. 2006). Vielleicht sind auch andere Tumoren neuroendokriner Abstammung der GLP-1-Rezeptorszintigraphie zugänglich.

Es ist zurzeit noch wenig bekannt über die Tumorarten, die GLP-1-Rezeptoren exprimieren. Man könnte ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei den Somatostatinrezeptoren erwarten (Wild et al., 2006; Mariani et al. 2006).

Im Jahr 2003 konnten Reubi et al. zeigen, dass Insulinome und Gastrinome GLP-1-Rezeptoren stark exprimieren. Aber auch eine große Anzahl von der Dünndarm- und Bronchialkarzinoiden zeigten eine GLP-1-Rezeptor Expression. Etwa ein Drittel aller Dünndarmkarzinome und mehr als ein Drittel aller Bronchialkarzinome exprimieren an ihrer Oberfläche GLP-1-Rezeptoren (Reubi et al., 2003). Neben den GLP-1-Rezeptoren werden von den verschiedenen neuroendokrinen Tumoren unter anderem auch VIP-Rezeptoren, Somatostatin-Rezeptoren, Bombesin-Rezeptoren und CCK-Rezeptoren exprimiert. In der Zukunft wäre ein Multirezeptortargeting mit der Kombination von z.B. GLP-1 und CCK₂-Rezeptoren zum besseren Nachweis von Insulinomen oder GLP-1, sst₂, und GRP-Rezeptoren zum besseren Nachweis von Gastrinomen denkbar (Reubi et al., 2003).

Betazellbildung

Als weitere Möglichkeit ist eine Betazellbildung mit GLP-1-Analoga denkbar. Zur Bestimmung der Beta-Zellmasse des Pankreas war diese Methode in der vorliegenden Arbeit aufgrund der hohen Nierenaktivität und der daraus resultierenden Überstrahlung des Pankreas, nicht geeignet. Erst wenn die Problematik des hohen Nierenuptake gelöst sein wird, wird es möglich sein, die Methode im Kleintier zur Bestimmung der Betazellmasse anzuwenden.

Mit Hilfe der Betazellbildung könnten weitere Studien durchgeführt werden, um die Entstehung des Diabetes mellitus im zeitlichen Verlauf besser zu verstehen. Ein weiterer Nutzen der Betazellbildung könnte in der

Untersuchung der Betazellfunktion unter der Therapie mit Antidiabetika in klinischen Studien sein. Auch eine engmaschige Überwachung von Risikopatienten oder eine individuelle Therapieanpassung aufgrund der Betazellbildung sind denkbar. Die Betazellbildung könnte auch eine wichtige Methode zur adäquaten Therapieüberwachung nach einer Inselzelltransplantation werden. Hier könnte man eine Aussage über das Anwachsen oder Absterben der Betazellen erwarten.

Simpson et al. beschrieben eine Betazellbildung mittels des Radiopharmakons ^{11}C -DTBZ (Dihydrotetrabenazine). Diese Radiopharmakon bindet an den vesikulären, monaminärgen Transporter 2 (VMAT-2). Dieser Transporter wird auf der Betazelle exprimiert. Die Arbeitsgruppe um Simpson konnte bei betadefizitären Ratten gegenüber den Kontrolltieren einen verminderten Uptake im Pankreas nachweisen (Simpson et al. 2006).

Mit Hilfe von ^{11}F -DOPA konnte mittels PET erfolgreich ein Betazellimaging bei der fokalen Form der Betazellhyperplasie durchgeführt werden, für die diffuse Form der Betazellhyperplasie ist diese Methode noch nicht geeignet (Otonkosi et al. 2006; Ribeiro et al. 2005).

Radioligandentherapie

Bisher ist nur die chirurgische Therapie in der Insulinomtherapie kurativ. Ein weiteres therapeutisches Konzept ist in der Radioligandentherapie zu sehen. Als Markierungsvariante kann Exendin-4 an DOTA gekoppelt werden, um es einer ^{177}Lu - und ^{90}Y -Markierung zugänglich zu machen. Diese Nuklide emittieren therapeutisch nutzbare β -Strahlung mit einer Reichweite von 12mm (^{90}Y) bzw. 2mm (^{177}Lu) im Gewebe.

Eine Radioligandentherapie analog zur Therapie mit ^{90}Y - bzw. ^{177}Lu -DOTATOC ist denkbar (Kwekkeboom et al., 2005). Da das endokrine Pankreas jedoch ebenfalls eine hohe GLP-1-Rezeptordichte 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 ^{90}Y -DOTATOC wurde eine Nephrotoxizität beschrieben. Eine Knochenmarksdepression und eine Lymphopenie sind ebenfalls aufgetreten (Cybulla et al, 2001). Der in dieser

Arbeit nachgewiesene hohe Nierenuptake von Exendin-4K40 DTPA und Exendin-4K40 HYNIC lässt bei einer Radioligandentherapie auch eine Nierentoxizität vermuten. Sicher kann auch die Möglichkeit einer Knochenmarksschädigung nicht ausgeschlossen werden. Die Nephrotoxizität kann bei der Therapie mit ^{90}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 in ausreichendem Maße bekannt.

5 Schlussfolgerung

Im Kleinterversuch an Mäusen und Ratten ist eine quantitative Bildgebung aufgrund des hohen Nierenuptake noch nicht möglich. Ob eine quantitative Bildgebung beim Menschen möglich ist wird sich in Zukunft zeigen. Aufgrund der anatomisch bedingten größeren Abstände zwischen Nieren und Pankreas besteht hier die Möglichkeit, dass die Niere das Pankreas nicht so stark überstrahlt. Bei der Insulinombildgebung haben Wild et al. bereits gezeigt, dass diese Methode einsetzbar ist und es möglich ist okkulte Insulinome, die sich bisher der Bildgebung entziehen, zu detektieren (Wild et al. 2008). Eine aus dieser Methode resultierende Therapie von Insulinomen z.B. durch Radioligandentherapie wäre für die Zukunft wünschenswert, aufgrund des hohen Nierenuptakes und der daraus resultierenden möglichen Nierenschädigung, ist dies zur Zeit noch nicht möglich.

6 Zusammenfassung

Die Bauchspeicheldrüse ist als Gesamtorgan mit bildgebenden Verfahren wie Sonographie, MRT und Spiral-CT gut darstellbar. Der endokrine Anteil des Pankreas entzieht sich allerdings der bildgebenden Diagnostik. Die nicht-invasive Darstellung der β -Zellen ist somit von hoher wissenschaftlicher und diagnostisch-klinischer Relevanz. Mit Hilfe der nicht-invasiven Bildgebung könnte

man u. a. die Frage klären, ob die Betazellmasse im frühen Stadium eines Diabetes mellitus reduziert ist, kompensatorisch zunimmt und in welchem Verhältnis die Betzellfunktion zur Betazellmasse steht.

Die nicht invasive Darstellung scheiterte bisher vorrangig an der Verfügbarkeit eines spezifischen β -Zell-Tracers für die molekulare Bildgebung.

Auch für die Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren (z.B. Insulinomen) wäre eine in vivo Methode von großer Bedeutung. Insulinome sind meist gutartige, solitär vorkommende neuroendokrine Tumoren, die sich von den β -Zellen des Pankreas ableiten. Der 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 profitieren. Die Somatostatinrezeptorszintigraphie, die bei anderen neuroendokrinen Tumoren etabliert ist, zeichnet sich bei Insulinomen durch eine geringe Sensitivität aus, da 50% der Insulinome keine Somatostatin-Rezeptoren der Subtypen 2 und 5 exprimieren. Insulinome besitzen 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 wurde mittels ^{111}In markiertem Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertem Exendin-4K40 HYNIC versucht, die GLP-1 Rezeptoren in betazelldefizitären Diabetesmodellen an Nagern sowie in neuroendokrinen Insulinomen in Rip1Tag2 Mäusen nachzuweisen und zu visualisieren. Desweiteren versuchten wir in unserer Arbeitsgruppe die Abnahme der Betazellmasse bei diabetischen Tieren visuell sichtbar und messbar zu machen.

Wir untersuchten C57Bl/6NCrl Mäuse, Wistar Unilever Ratten und Rip1Tag2 Mäuse. Die ersten beiden von uns untersuchten Tiermodelle (C57Bl/6NCrl Mäuse und Wistar Unilever Ratten) erhielten zur Induktion eines Diabetes mellitus eine einmalige intravenöse (i.v.) Injektion von 200mg/kg KG Alloxan (ALX). 24h nach der Injektion von ALX lagen die Blutzuckerwerte über 200mg/dl, so dass die Tiere als diabetisch angesehen wurden. Dann erhielt jedes Tier 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In , bzw. 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$. 4 Stunden nach der Injektion wurden die SPECT-

Aufnahmen und die MRT-Aufnahmen durchgeführt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Organe mit einem spezifischen Uptake in der Biodistribution wie Pankreas, Lunge und Nieren, im SPECT ebenfalls gut sichtbar sind. Die Abnahme der Betazellmasse sowohl bei diabetischen C57Bl/6NCrl Mäusen als auch bei Wistar Unilever Ratten konnte mit dieser Methode nicht visuell sichtbar und messbar gemacht werden. Dies lag in beiden Tiermodellen vor allem an der Überstrahlung des Pankreas durch die hohe Aktivität in den Nieren. Das Pankreasgewebe konnte somit nicht mehr in seiner Gesamtheit dargestellt werden und entzog sich dadurch der Auswertbarkeit.

Das dritte von uns untersuchte Tiermodell sind Rip1Tag2 Mäuse, ein Inzuchtstamm, der nach ca. 13-20 Wochen multiple Insulinome ausbildet. Jedes Tier erhielt 18,5 MBq Exendin-4K40 DTPA mit ^{111}In , bzw. 18,5 MBq Exendin-4K40 HYNIC mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$. 4 Stunden nach der Injektion wurden die SPECT-Aufnahmen und die MRT-Aufnahmen durchgeführt.

Die Insulinome konnten mit unserer Methode im Multipinhole SPECT/MRT gut dargestellt werden. Nach den Daten der vorliegenden Arbeit erscheint eine Szintigraphie mit ^{111}In markiertem Exendin-4K40 DTPA und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertem Exendin-4K40 HYNIC als aussichtsreich zur Detektion von Tumoren die an ihrer Oberfläche GLP-1 Rezeptoren exprimieren.

Weitere präklinische Studien müssen jedoch durchgeführt werden, um die Methode im Bezug auf den Nierenuptake zu verbessern und den möglichen Nutzen für den Menschen zu untersuchen. Eine aus dieser Methode resultierende Therapie von Insulinomen z.B. durch Radioligandentherapie wäre für die Zukunft denkbar. Ein weiterer Nutzen der Betazellbildung könnte in der Untersuchung der Betazellfunktion bei diabetischen Patienten unter der Therapie mit Antidiabetika in klinischen Studien sein. Auch eine engmaschige Überwachung von Risikopatienten oder eine individuelle Therapieanpassung aufgrund der Betazellbildung sind in Zukunft denkbar, wenn die Problematik des hohen Nierenuptake (z.B. durch Applikation geeigneter Pharmaka) gelöst ist.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Ahren, B. (2005). "[New strategy in type 2 diabetes tested in clinical trials. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) affects basic caused of the disease]." *Lakartidningen* 102(8): 545-9.
- Ahren, B., H. Larsson, et al. (1997). "Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* 82(2): 473-8.
- Ahren, B., H. Larsson, et al. (1997). "Reduced gastric inhibitory polypeptide but normal glucagon-like peptide 1 response to oral glucose in postmenopausal women with impaired glucose tolerance." *Eur J Endocrinol* 137(2): 127-31.
- Alberts, -. B. B., -D; Lewis,-J; Raff,-M; Roberts,-K; Watson,-J (1994). "Molecular biology of the cell. 3rd ed. pp." Garland Publishing, Inc.. New York: pp. 731-759.
- Alfke, H., S. Kohle, et al. (2004). "Analysis of mice tumor models using dynamic MRI data and a dedicated software platform*." *Rofo* 176(9): 1226-31.
- Aloj, L., M. Panico, et al. (2004). "In vitro and in vivo characterization of Indium-111 and Technetium-99m labeled CCK-8 derivatives for CCK-B receptor imaging." *Cancer Biother Radiopharm* 19(1): 93-8.
- Alvarez, E., I. Roncero, et al. (1996). "Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain." *J Neurochem* 66(3): 920-7.
- Ann-Intern-Med (1998). "The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial: a randomized, controlled trial." *Ann Intern Med* 128: 517-523.
- Arnold, C. (2007). "[Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract]." *Schweiz Rundsch Med Prax* 96(1-2): 19-28.
- Barragan, J. M., J. Eng, et al. (1999). "Neural contribution to the effect of

- glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on arterial blood pressure in rats." *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): E784-91.
- 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." *Regul Pept* 67(1): 63-8.
 - Bataille, D., K. Tatemoto, et al. (1982). "Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Characterization of the peptide." *FEBS Lett* 146(1): 79-86.
 - Behe, M., W. Becker, et al. (2003). "Improved kinetic stability of DTPA-dGlu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30(8): 1140-6.
 - Behe, M., B. Keil, et al. (2007). "[Combination of radiological and nuclear medical imaging in animals: an overview about today's possibilities]." *Rofo* 179(8): 796-803.
 - Behr, T. M., M. Behe, et al. (1999). "Diagnostic applications of radiolabeled peptides in nuclear endocrinology." *Q J Nucl Med* 43(3): 268-80.
 - Behr, T. M., M. Gotthardt, et al. (2001). "Imaging tumors with peptide-based radioligands." *Q J Nucl Med* 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." *Nuklearmedizin* 41(2): 71-9.
 - Benito, E., E. Blazquez, et al. (1998). "Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide increases pulmonary surfactant secretion through a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase mechanism in rat type II pneumocytes." *Endocrinology* 139(5): 2363-8.
 - Blouw, B., H. Song, et al. (2003). "The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment." *Cancer Cell* 4(2): 133-46.
 - Bock, T., K. Svenstrup, et al. (1999). "Unbiased estimation of total beta-

- cell number and mean beta-cell volume in rodent pancreas." *Apmis* 107(8): 791-9.
- 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." *Eur J Nucl Med* 28(10): 1447-9.
 - Bojanowska, E. and B. Stempniak (2000). "Effects of centrally or systemically injected glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on release of neurohypophysial hormones and blood pressure in the rat." *Regul Pept* 91(1-3): 75-81.
 - Brown, J. C. (1971). "A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides." *Can J Biochem* 49(2): 255-61.
 - Brown, J. C. and J. R. Dryburgh (1971). "A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence." *Can J Biochem* 49(8): 867-72.
 - Brown, J. C., V. Mutt, et al. (1970). "Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity." *J Physiol* 209(1): 57-64.
 - Brubaker, P. L. (1991). "Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides." *Endocrinology* 128(6): 3175-82.
 - Bullock, B. P., R. S. Heller, et al. (1996). "Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor." *Endocrinology* 137(7): 2968-78.
 - Buse, J. B., R. R. Henry, et al. (2004). "Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes." *Diabetes Care* 27(11): 2628-35.
 - Buse, J. B., D. C. Klonoff, et al. (2007). "Metabolic effects of two years of exenatide treatment on diabetes, obesity, and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes: an interim analysis of data from the open-label, uncontrolled extension of three double-blind, placebo-controlled trials." *Clin Ther* 29(1): 139-53.
 - Byrne, M. M., K. Gliem, et al. (1998). "Glucagon-like peptide 1 improves the ability of the beta-cell to sense and respond to glucose in subjects with impaired glucose tolerance." *Diabetes* 47(8): 1259-65.
 - Campos, R. V., Y. C. Lee, et al. (1994). "Divergent tissue-specific and

- developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse." *Endocrinology* 134(5): 2156-64.
- Chanoine, J. P., K. J. Mackelvie, et al. (2008). "GLP-1 and appetite responses to a meal in lean and overweight adolescents following exercise." *Obesity (Silver Spring)* 16(1): 202-4.
 - Chanson, P., G. Cadiot, et al. (1997). "Management of patients and subjects at risk for multiple endocrine neoplasia type 1: MEN 1. GENEM 1. Groupe d'Etude des Neoplasies Endocriniennes Multiples de type 1." *Horm Res* 47(4-6): 211-20.
 - Chehade, J. M. and A. D. Mooradian (2000). "A rational approach to drug therapy of type 2 diabetes mellitus." *Drugs* 60(1): 95-113.
 - Chen, T., H. Kwok, et al. (2006). "Isolation and cloning of exendin precursor cDNAs from single samples of venom from the Mexican beaded lizard (*Heloderma horridum*) and the Gila monster (*Heloderma suspectum*)." *Toxicon* 47(3): 288-95.
 - Conlon, J. M. (1988). "Proglucagon-derived peptides: nomenclature, biosynthetic relationships and physiological roles." *Diabetologia* 31(8): 563-6.
 - Crabtree, J. S., P. C. Scacheri, et al. (2001). "A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 1118-23.
 - Crabtree, J. S., P. C. Scacheri, et al. (2003). "Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout." *Mol Cell Biol* 23(17): 6075-85.
 - Crespel, A., F. De Boisvilliers, et al. (1996). "Effects of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on C cells from rat thyroid and medullary thyroid carcinoma CA-77 cell line." *Endocrinology* 137(9): 3674-80.
 - Creutzfeldt, W. and R. Lamberts (1992). "Inter-relationship between serum gastrin levels, gastric mucosal histology and gastric endocrine cell growth." *Digestion* 51 Suppl 1: 76-81.
 - Creutzfeldt, W. O., N. Kleine, et al. (1996). "Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide

- l(7-36) amide in type I diabetic patients." *Diabetes Care* 19(6): 580-6.
- Cvetkovic, R. S. and G. L. Plosker (2007). "Exenatide: a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus (as an adjunct to metformin and/or a sulfonylurea)." *Drugs* 67(6): 935-54.
 - Cybulla, M., S. M. Weiner, et al. (2001). "End-stage renal disease after treatment with 90Y-DOTATOC." *Eur J Nucl Med* 28(10): 1552-4.
 - D'Alessio, D. A., S. E. Kahn, et al. (1994). "Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal." *J Clin Invest* 93(5): 2263-6.
 - 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." *J Nucl Med* 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." *J Nucl Med* 46(10): 1696-700.
 - Deacon, C. F., A. H. Johnsen, et al. (1995). "Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo." *J Clin Endocrinol Metab* 80(3): 952-7.
 - Delcore, R. and S. R. Friesen (1994). "Gastrointestinal neuroendocrine tumors." *J Am Coll Surg* 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.
 - Dormandy, J. A., B. Charbonnel, et al. (2005). "Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial." *Lancet* 366(9493): 1279-89.
 - Ebert, R. and W. Creutzfeldt (1982). "Influence of gastric inhibitory polypeptide antiserum on glucose-induced insulin secretion in rats." *Endocrinology* 111(5): 1601-6.
 - Ebert, R., H. Unger, et al. (1983). "Preservation of incretin activity after

- removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoabsorption." *Diabetologia* 24(6): 449-54.
- Edwards, C. M., J. F. Todd, et al. (1998). "Subcutaneous glucagon-like peptide-1 (7-36) amide is insulinotropic and can cause hypoglycaemia in fasted healthy subjects." *Clin Sci (Lond)* 95(6): 719-24.
 - Eissele, R., R. Goke, et al. (1992). "Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man." *Eur J Clin Invest* 22(4): 283-91.
 - Elahi, D., M. McAloon-Dyke, et al. (1994). "The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects." *Regul Pept* 51(1): 63-74.
 - Elbrond, B., G. Jakobsen, et al. (2002). "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects." *Diabetes Care* 25(8): 1398-404.
 - 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." *J Endocrinol* 138(1): 159-66.
 - Elrick, H., L. Stimmler, et al. (1964). "Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration." *J Clin Endocrinol Metab* 24: 1076-82.
 - Eng, J. (1992). "Exendin peptides." *Mt Sinai J Med* 59(2): 147-9.
 - Farilla, L., H. Hui, et al. (2002). "Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats." *Endocrinology* 143(11): 4397-408.
 - Fehmann, H. C., R. Goke, et al. (1995). "Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide." *Endocr Rev* 16(3): 390-410.
 - 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 Lett* 279(2): 335-40.

- Fehmann, H. C. and J. F. Habener (1992). "Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells." *Endocrinology* 130(1): 159-66.
- Ferdaoussi, M., S. Abdelli, et al. (2008). "Exendin-4 protects β -cells from interleukin 1 β -induced apoptosis by interfering with the c-Jun N-terminal kinases pathway." *Diabetes*.
- Fischer, K. D., S. Dhanvantari, et al. (1997). "Intestinal growth is associated with elevated levels of glucagon-like peptide 2 in diabetic rats." *Am J Physiol* 273(4 Pt 1): E815-20.
- Flint, A., A. Raben, et al. (1998). "Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans." *J Clin Invest* 101(3): 515-20.
- Folkman, J., K. Watson, et al. (1989). "Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia." *Nature* 339(6219): 58-61.
- Forst, T. D. L. T., D. D.; Kunt, T.; Pfutzner, A.; Goitom, K.; Pohlmann, T.; B. L. S. Johansson, S.; Wahren, J.; Lobig, M.; Engelbach, M.; Beyer, et al. (2000). *Clin.Sci.(Colch.)* 98: 28.
- Fukase, N., H. Manaka, et al. (1995). "Response of truncated glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide to glucose ingestion in non-insulin dependent diabetes mellitus. Effect of sulfonylurea therapy." *Acta Diabetol* 32(3): 165-9.
- Gale, E. A. (2001). "Lessons from the glitazones: a story of drug development." *Lancet* 357(9271): 1870-5.
- Galehshahi, F. S., B. Goke, et al. (1998). "Contribution of a PS1-like element to the tissue- and cell-specific expression of the human GLP-1 receptor gene." *FEBS Lett* 436(2): 163-8.
- Gallwitz, B. (2005). "Glucagon-like peptide-1 as a treatment option for type 2 diabetes and its role in restoring beta-cell mass." *Diabetes Technol Ther* 7(4): 651-7.
- Gallwitz, B., M. Witt, et al. (1993). "Binding specificity and signal transduction of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide and gastric inhibitory polypeptide on RINm5F insulinoma cells." *J Mol*

Endocrinol 10(3): 259-68.

- Ganss, R. and D. Hanahan (1998). "Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes." *Cancer Res* 58(20): 4673-81.
- Gebhard, B., J. J. Holst, et al. (2001). "Postprandial GLP-1, norepinephrine, and reactive hypoglycemia in dumping syndrome." *Dig Dis Sci* 46(9): 1915-23.
- Geiss, L. H., WH; Smith, PJ (1995). "Mortality in non-insulin-dependent diabetes." *Diabetes in America*. 2nd edition. NIH Publication: 95-1468: 233-250.
- 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.
- Göke, B., B. Hoppe, et al. (2002). "[A therapeutic option for type-2 diabetes. The incretion hormone GLP-1]." *Pharm Unserer Zeit* 31(3): 294-9.
- Göke, B., H. Steffen, et al. (1996). "The signal transduction of the glucagon-like peptide 1 receptor: fishing beyond the protein kinase level." *Acta Physiol Scand* 157(3): 321-8.
- Göke, R., T. Cole, et al. (1989). "Characterization of the receptor for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on plasma membranes from rat insulinoma-derived cells by covalent cross-linking." *J Mol Endocrinol* 2(2): 93-8.
- Göke, R. and J. M. Conlon (1988). "Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells." *J Endocrinol* 116(3): 357-62.
- Göke, R., P. J. Larsen, et al. (1995). "Identification of specific binding sites for glucagon-like peptide-1 on the posterior lobe of the rat pituitary." *Neuroendocrinology* 62(2): 130-4.
- Göke, 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." *Res Exp Med (Berl)* 193(2): 97-103.

- Gotthardt, M., O. C. Boermann, et al. (2004). "Development and clinical application of peptide-based radiopharmaceuticals." *Curr Pharm Des* 10(24): 2951-63.
- 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., G. Lalyko, et al. (2006). "A new technique for in vivo imaging of specific GLP-1 binding sites: first results in small rodents." *Regul Pept* 137(3): 162-7.
- 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.
- Grant, C. S. (1996). "Gastrointestinal endocrine tumours. Insulinoma." *Baillieres Clin Gastroenterol* 10(4): 645-71.
- Graziano, M. P., P. J. Hey, et al. (1993). "Cloning and functional expression of a human glucagon-like peptide-1 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 196(1): 141-6.
- Groop, L. C., R. Pelkonen, et al. (1986). "Secondary failure to treatment with oral antidiabetic agents in non-insulin-dependent diabetes." *Diabetes Care* 9(2): 129-33.
- Gutniak, M. K., L. Juntti-Berggren, et al. (1996). "Glucagon-like peptide I enhances the insulinotropic effect of glibenclamide in NIDDM patients and in the perfused rat pancreas." *Diabetes Care* 19(8): 857-63.
- Gutzwiller, J. P., J. Drewe, et al. (1999). "Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2." *Am J Physiol* 276(5 Pt 2): R1541-4.
- Gutzwiller, J. P., B. Göke, et al. (1999). "Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans." *Gut* 44(1): 81-6.
- Hanahan, D. (1985). "Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes." *Nature* 315(6015): 115-22.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* 86(3):

353-64.

- Hanefeld, M. and F. Schaper (2008). "Acarbose: oral anti-diabetes drug with additional cardiovascular benefits." *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6(2): 153-63.
- Hansen, B. F., P. Jensen, et al. (1998). "Effects of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on insulin stimulated rat skeletal muscle glucose transport." *Acta Diabetol* 35(2): 101-3.
- Hansen, L., C. F. Deacon, et al. (1999). "Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine." *Endocrinology* 140(11): 5356-63.
- Hansen, L., B. Hartmann, et al. (2000). "Somatostatin restrains the secretion of glucagon-like peptide-1 and -2 from isolated perfused porcine ileum." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(6): E1010-8.
- 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." *Nucl Med Biol* 26(4): 413-20.
- Heller, R. S. and G. W. Aponte (1995). "Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7--36) amide." *Am J Physiol* 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.
- 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.
- Heverhagen, J. T., H. K. Hahn, et al. (2004). "Volumetric analysis of mice lungs in a clinical magnetic resonance imaging scanner." *Magma* 17(2): 80-5.
- Hofland, L. J., S. W. Lamberts, et al. (2003). "Crucial role for somatostatin receptor subtype 2 in determining the uptake of [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]octreotide in somatostatin receptor-positive organs." *J Nucl Med* 44(8): 1315-21.

- Holman, R. R., C. A. Cull, et al. (1999). "A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemc control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44)." *Diabetes Care* 22(6): 960-4.
- Holst, J. J. (1994). "Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone." *Gastroenterology* 107(6): 1848-55.
- Holst, J. J. (1997). "Enteroglucagon." *Annu Rev Physiol* 59: 257-71.
- Holst, J. J. (1999). "Glucagon-like peptide-1, a gastrointestinal hormone with a pharmaceutical potential." *Curr Med Chem* 6(11): 1005-17.
- Holst, J. J. (2002). "Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1." *Diabetes Metab Res Rev* 18(6): 430-41.
- Holst, J. J. (2007). "The physiology of glucagon-like peptide 1." *Physiol Rev* 87(4): 1409-39.
- Holz, G. G. t., W. M. Kuhlreiber, 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., C. Wright, et al. (2001). "Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells." *Diabetes* 50(4): 785-96.
- Hupe-Sodmann, K., R. Goke, et al. (1997). "Endoproteolysis of glucagon-like 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." *Regul Pept* 58(3): 149-56.
- Janka Hu, R. M., Gandjour A, Giani G, Hauner H, Michaelis D, Standle E (2000). "Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland." *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG; hrsg. v. Scherbaum WA, Lauterbach KW,*
- Renner R. *Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Düsseldorf: 1: 13-30.*

- Jensen, R. T. and F. Gibril (1999). "Somatostatin receptor scintigraphy in gastrinomas." *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31 Suppl 2: S179-85.
- Juntti-Berggren, L., J. Pigon, et al. (1996). "The antidiabetogenic effect of GLP-1 is maintained during a 7-day treatment period and improves diabetic dyslipoproteinemia in NIDDM patients." *Diabetes Care* 19(11): 1200-6.
- Kann, P. H. (2006). "[Endoscopic ultrasound imaging in neuroendocrine pancreatic tumors. A critical analysis]." *Med Klin (Munich)* 101(7): 546-51.
- Kann, P. H., E. Balakina, et al. (2006). "Natural course of small, asymptomatic neuroendocrine pancreatic tumours in multiple endocrine neoplasia type 1: an endoscopic ultrasound imaging study." *Endocr Relat Cancer* 13(4): 1195-202.
- Kann, P. H., B. Kann, et al. (2006). "Small neuroendocrine pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): least significant change of tumor diameter as determined by endoscopic ultrasound (EUS) imaging." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114(7): 361-5.
- Kann, P. H., M. Rothmund, et al. (2005). "Endoscopic ultrasound imaging of insulinomas: limitations and clinical relevance." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113(8): 471-4.
- Kendall, D. M., M. C. Riddle, et al. (2005). "Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea." *Diabetes Care* 28(5): 1083-91.
- Kieffer, T. J., C. H. McIntosh, et al. (1995). "Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." *Endocrinology* 136(8): 3585-96.
- Kim, J. G., L. L. Baggio, et al. (2003). "Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo." *Diabetes* 52(3): 751-9.
- Kloppel, G. and P. U. Heitz (1994). "Classification of normal and neoplastic neuroendocrine cells." *Ann N Y Acad Sci* 733: 19-23.
- Knudsen, L. B., P. F. Nielsen, et al. (2000). "Potent derivatives of

- glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration." *J Med Chem* 43(9): 1664-9.
- Kolb, H. G., EAM (2001). "Diabetologia." *Diabetologia* 44: 1349.
 - Korner, M., M. Stockli, et al. (2007). "GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting." *J Nucl Med* 48(5): 736-43.
 - Koster, I., L. von Ferber, et al. (2006). "The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study." *Diabetologia* 49(7): 1498-504.
 - 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., P. P. Kooij, et al. (1996). "Somatostatin receptor: scintigraphy and radionuclide therapy." *Digestion* 57 Suppl 1: 57-61.
 - Krenning, E. P., D. J. Kwekkeboom, et al. (1992). "Somatostatin receptor imaging of endocrine gastrointestinal tumors." *Schweiz Med Wochenschr* 122(17): 634-7.
 - Kwekkeboom, D. J., J. Mueller-Brand, et al. (2005). "Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs." *J Nucl Med* 46 Suppl 1: 62S-6S.
 - Lamari, Y., C. Boissard, et al. (1996). "Expression of glucagon-like peptide 1 receptor in a murine C cell line: regulation of calcitonin gene by glucagon-like peptide 1." *FEBS Lett* 393(2-3): 248-52.
 - Lang, U. L., T (2001). "Gestationsdiabetes." *Diabetologie kompakt*: 174-178.
 - Lankat-Buttgereit, B., R. Goke, et al. (1994). "Molecular cloning of a cDNA encoding for the GLP-1 receptor expressed in rat lung." *Exp Clin Endocrinol* 102(4): 341-7.
 - Lankat-Buttgereit, B., R. Goke, et al. (1994). "Detection of the human glucagon-like peptide 1(7-36) amide receptor on insulinoma-derived cell membranes." *Digestion* 55(1): 29-33.
 - Larsen, M. O., B. Rolin, et al. (2004). "Reduction of beta cell mass: partial insulin secretory compensation from the residual beta cell

- population in the nicotinamide-streptozotocin Gottingen minipig after oral glucose in vivo and in the perfused pancreas." *Diabetologia* 47(11): 1873-8.
- Larsen, P. J., M. Tang-Christensen, et al. (1997). "Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem." *Neuroscience* 77(1): 257-70.
 - Larsen, P. J., M. Tang-Christensen, et al. (1997). "Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat." *Endocrinology* 138(10): 4445-55.
 - Lauritsen, K. B., A. J. Moody, et al. (1980). "Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin release after small-bowel resection in man." *Scand J Gastroenterol* 15(7): 833-40.
 - Leger, R., K. Thibaudeau, et al. (2004). "Identification of CJC-1131-albumin bioconjugate as a stable and bioactive GLP-1(7-36) analog." *Bioorg Med Chem Lett* 14(17): 4395-8.
 - Levy, A. D. and L. H. Sobin (2007). "From the archives of the AFIP: Gastrointestinal carcinoids: imaging features with clinicopathologic comparison." *Radiographics* 27(1): 237-57.
 - Lopez-Delgado, M. I., M. Morales, et al. (1998). "Effects of glucagon-like peptide 1 on the kinetics of glycogen synthase a in hepatocytes from normal and diabetic rats." *Endocrinology* 139(6): 2811-7.
 - Lugari, R., C. Dell'Anna, et al. (2000). "Effect of nutrient ingestion on glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) secretion in human type 1 and type 2 diabetes." *Horm Metab Res* 32(10): 424-8.
 - Lyman, M. A., C. T. Nugent, et al. (2005). "The fate of low affinity tumor-specific CD8+ T cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* 174(5): 2563-72.
 - Maes, F., A. Collignon, et al. (1997). "Multimodality image registration by maximization of mutual information." *IEEE Trans Med Imaging* 16(2): 187-98.
 - Maes, F., D. Vandermeulen, et al. (1999). "Comparative evaluation of multiresolution optimization strategies for multimodality image registration by maximization of mutual information." *Med Image Anal*

3(4): 373-86.

- Marguet, D., L. Baggio, et al. (2000). "Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6874-9.
- Mariani, G., P. A. Erba, et al. (2006). "Receptor-mediated tumor targeting with radiolabeled peptides: there is more to it than somatostatin analogs." *J Nucl Med* 47(12): 1904-7.
- McIntyre, N., C. D. Holdsworth, et al. (1964). "New Interpretation of Oral Glucose Tolerance." *Lancet* 2: 20-1.
- Melis, M., E. P. Krenning, et al. (2005). "Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32(10): 1136-43.
- Miholic, J., C. Orskov, et al. (1991). "Emptying of the gastric substitute, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and reactive hypoglycemia after total gastrectomy." *Dig Dis Sci* 36(10): 1361-70.
- Modlin, I. M. and L. H. Tang (1997). "Approaches to the diagnosis of gut neuroendocrine tumors: the last word (today)." *Gastroenterology* 112(2): 583-90.
- Montrose-Rafizadeh, C., P. Avdonin, et al. (1999). "Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells." *Endocrinology* 140(3): 1132-40.
- Moore, B. (1906). "On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane." *Biochem J* 1(1): 28-38.
- Morales, M., M. I. Lopez-Delgado, et al. (1997). "Preserved GLP-I effects on glycogen synthase activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats." *Diabetes* 46(8): 1264-9.
- Mrena, S., K. Savola, et al. (1999). "Staging of preclinical type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group." *Pediatrics* 104(4 Pt 1): 925-30.
- Naslund, E., J. Bogefors, et al. (1999). "GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans." *Am*

- J Physiol 277(3 Pt 2): R910-6.
- Nauck, M. A., M. M. Heimesaat, et al. (1993). "Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus." *J Clin Invest* 91(1): 301-7.
 - Nauck, M. A., M. Hompesch, et al. (2006). "Five weeks of treatment with the GLP-1 analogue liraglutide improves glycaemic control and lowers body weight in subjects with type 2 diabetes." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114(8): 417-23.
 - Nauck, M. A., A. Sauerwald, et al. (1998). "Influence of glucagon-like peptide 1 on fasting glycemia in type 2 diabetic patients treated with insulin after sulfonylurea secondary failure." *Diabetes Care* 21(11): 1925-31.
 - Navarro, M., F. Rodriguez de Fonseca, et al. (1996). "Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake." *J Neurochem* 67(5): 1982-91.
 - Nussdorfer, G. G., M. Bahcelioglu, et al. (2000). "Secretin, glucagon, gastric inhibitory polypeptide, parathyroid hormone, and related peptides in the regulation of the hypothalamus- pituitary-adrenal axis." *Peptides* 21(2): 309-24.
 - Oberg, K., L. Kvols, et al. (2004). "Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system." *Ann Oncol* 15(6): 966-73.
 - 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'Harte, F. P., M. H. Mooney, et al. (2001). "Degradation and glycemic effects of His(7)-glucitol glucagon-like peptide-1(7-36)amide in obese diabetic ob/ob mice." *Regul Pept* 96(3): 95-104.
 - Orskov, C. (1992). "Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis." *Diabetologia* 35(8): 701-11.

- Orskov, C., J. Andreasen, et al. (1992). "All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients." *J Clin Endocrinol Metab* 74(2): 379-84.
- Orskov, C., J. J. Holst, et al. (1986). "Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas." *Endocrinology* 119(4): 1467-75.
- Orskov, C., L. Rabenhøj, et al. (1994). "Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans." *Diabetes* 43(4): 535-9.
- Orskov, 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.
- Patzelt, C. and E. Schiltz (1984). "Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(16): 5007-11.
- Patzelt, C. and E. Schiltz (1984). "Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(16): 5007-11.
- Perley, M. J. and D. M. Kipnis (1967). "Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects." *J Clin Invest* 46(12): 1954-62.
- Perry, R. R. and A. I. Vinik (1995). "Clinical review 72: diagnosis and management of functioning islet cell tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 80(8): 2273-8.
- Pfützner, A. F., T.; Beyer, J. (1995). "Immunology of type1-diabetes: The autoimmune destruction of the β -cell." *The Microbiologist* Vol 6, I.
- Rahfeld, J., M. Schierhorn, et al. (1991). "Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and

- diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV?" *Biochim Biophys Acta* 1076(2): 314-6.
- 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.
 - Ranganath, L. R., J. M. Beety, et al. (1996). "Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence?" *Gut* 38(6): 916-9.
 - Rasmussen, S. B., T. S. Sorensen, et al. (2000). "Functional rest through intensive treatment with insulin and potassium channel openers preserves residual beta-cell function and mass in acutely diabetic BB rats." *Horm Metab Res* 32(7): 294-300.
 - Raun, K., P. von Voss, et al. (2007). "Liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 analog, reduces body weight and food intake in obese candy-fed rats, whereas a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, vildagliptin, does not." *Diabetes* 56(1): 8-15.
 - Reinehr, T., G. de Sousa, et al. (2007). "Fasting glucagon-like peptide-1 and its relation to insulin in obese children before and after weight loss." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44(5): 608-12.
 - Reubi, J. C. and B. Waser (2003). "Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30(5): 781-93.
 - 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." *Am J Physiol* 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 Lett* 267(1): 78-80.
 - Ricke, J., K. J. Klose, et al. (2001). "Standardisation of imaging in neuroendocrine tumours: results of a European delphi process." *Eur J*

Radiol 37(1): 8-17.

- Rinaman, L. (1999). "Interoceptive stress activates glucagon-like peptide-1 neurons that project to the hypothalamus." *Am J Physiol* 277(2 Pt 2): R582-90.
- Ritzel, U., U. Leonhardt, et al. (1998). "A synthetic glucagon-like peptide-1 analog with improved plasma stability." *J Endocrinol* 159(1): 93-102.
- Rocca, A. S. and P. L. Brubaker (1999). "Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion." *Endocrinology* 140(4): 1687-94.
- Roher, H. D., D. Simon, et al. (1997). "[Special diagnostic and therapeutic aspects of insulinoma]." *Chirurg* 68(2): 116-21.
- Rothmund, M. (1994). "Localization of endocrine pancreatic tumours." *Br J Surg* 81(2): 164-6.
- 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.
- Rothmund, M., B. Stinner, et al. (1991). "Endocrine pancreatic carcinoma." *Eur J Surg Oncol* 17(2): 191-9.
- 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." *J Biol Chem* 270(44): 26488-96.
- Rubio, I. G., G. Castro, et al. (2008). "Oral ingestion of a hydrolyzed gelatin meal in subjects with normal weight and in obese patients: Postprandial effect on circulating gut peptides, glucose and insulin." *Eat Weight Disord* 13(1): 48-53.
- Ruiz-Grande, C., C. Alarcon, et al. (1993). "Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide 1." *Horm Metab Res* 25(12): 612-6.
- Ryschich, E., J. Schmidt, et al. (2002). "Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis." *Int J Cancer* 97(6): 719-25.
- Schaaf, N. G., Raue F, Tuschy U, Seif FJ, Trojan J, Usadel KH (1994). "Klinische epidemiologische Daten zur MEN-I in Deutschland." *Med*

Klinik 89.

- Schirra, J., P. Houck, et al. (2000). "Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans." *Gut* 46(5): 622-31.
- Schirra, J., P. Kuwert, et al. (1997). "Differential effects of subcutaneous GLP-1 on gastric emptying, antroduodenal motility, and pancreatic function in men." *Proc Assoc Am Physicians* 109(1): 84-97.
- Schirra, J., P. Leicht, et al. (1998). "Mechanisms of the antidiabetic action of subcutaneous glucagon-like peptide-1(7-36)amide in non-insulin dependent diabetes mellitus." *J Endocrinol* 156(1): 177-86.
- Schirra, J., K. Sturm, et al. (1998). "Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans." *J Clin Invest* 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." *Dig Dis Sci* 34(5): 703-8.
- Schmid, R., V. Schusdziarra, et al. (1990). "Comparison of GLP-1 (7-36amide) and GIP on release of somatostatin-like immunoreactivity and insulin from the isolated rat pancreas." *Z Gastroenterol* 28(6): 280-4.
- Schmidt, W. E., E. G. Siegel, et al. (1985). "Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets." *Diabetologia* 28(9): 704-7.
- Schneider, S. K., T.; Pfützner, A.; Goitom, K.; Engelbach, M.; Schauf, B.; Beyer, J.; Forst, T. (1999). *Diabetologia* 42: 465.
- Scholz (2005). "Taschenbuch der Arzneibehandlung." 13. Auflage.
- Shapiro, B. (1995). "Ten years of experience with MIBG applications and the potential of new radiolabeled peptides: a personal overview and concluding remarks." *Q J Nucl Med* 39(4 Suppl 1): 150-5.
- Shimizu, I., M. Hirota, et al. (1987). "Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain." *Endocrinology* 121(3): 1076-82.
- Simpson, N. R., F. Souza, et al. (2006). "Visualizing pancreatic beta-cell mass with [11C]DTBZ." *Nucl Med Biol* 33(7): 855-64.

- 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.
- Stoffel, M., R. Espinosa, 3rd, et al. (1993). "Human glucagon-like peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6." *Diabetes* 42(8): 1215-8.
- Storch, D., M. Behe, et al. (2005). "Evaluation of [99mTc/EDDA/HYNIC0]octreotide derivatives compared with [111In-DOTA0,Tyr3, Thr8]octreotide and [111In-DTPA0]octreotide: does tumor or pancreas uptake correlate with the rate of internalization?" *J Nucl Med* 46(9): 1561-9.
- Strack, T. (2008). "Metformin: a review." *Drugs Today (Barc)* 44(4): 303-14.
- Sturis, J., C. F. Gotfredsen, et al. (2003). "GLP-1 derivative liraglutide in rats with beta-cell deficiencies: influence of metabolic state on beta-cell mass dynamics." *Br J Pharmacol* 140(1): 123-32.
- Tang-Christensen, M., N. Vrang, et al. (2001). "Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour." *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5: S42-7.
- Teitelman, G., S. Alpert, et al. (1988). "Proliferation, senescence, and neoplastic progression of beta cells in hyperplastic pancreatic islets." *Cell* 52(1): 97-105.
- Thim, L. and A. J. Moody (1981). "The amino acid sequence of porcine glicentin." *Peptides* 2 Suppl 2: 37-9.
- Thim, L. and A. J. Moody (1982). "Purification and chemical characterization of a glicentin-related pancreatic peptide (proglucagon fragment) from porcine pancreas." *Biochim Biophys Acta* 703(2): 134-41.
- Thompson, J. C. a. C. M. T. (2004). "Endocrine Pancreas." *Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practise* 17th edition.
- Thorens, B. (1992). "Expression cloning of the pancreatic beta cell

- receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 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." *Clin Sci (Lond)* 95(3): 325-9.
 - Toft-Nielsen, M. B., S. Madsbad, et al. (1999). "Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients." *Diabetes Care* 22(7): 1137-43.
 - Tomassetti, P., M. Migliori, et al. (2000). "Treatment of type II gastric carcinoid tumors with somatostatin analogues." *N Engl J Med* 343(8): 551-4.
 - Tomassetti, P., M. Migliori, et al. (2000). "Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours with octreotide LAR." *Aliment Pharmacol Ther* 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.
 - Unger, R. H. and A. M. Eisentraut (1969). "Entero-insular axis." *Arch Intern Med* 123(3): 261-6.
 - Vaag, A. A., J. J. Holst, et al. (1996). "Gut incretin hormones in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)--evidence for decreased glucagon-like peptide 1 secretion during oral glucose ingestion in NIDDM twins." *Eur J Endocrinol* 135(4): 425-32.
 - van Eyll, B., B. Lankat-Buttgereit, et al. (1994). "Signal transduction of the GLP-1-receptor cloned from a human insulinoma." *FEBS Lett* 348(1): 7-13.
 - Vara, E., J. Arias-Diaz, et al. (2001). "Glucagon-like peptide-1(7-36)

- amide stimulates surfactant secretion in human type II pneumocytes." *Am J Respir Crit Care Med* 163(4): 840-6.
- Vegt, E., J. E. van Eerd, et al. (2008). "Reducing renal uptake of radiolabeled peptides using albumin fragments." *J Nucl Med* 49(9): 1506-11.
 - Vilsboll, T., T. Krarup, et al. (2001). "Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients." *Diabetes* 50(3): 609-13.
 - Vilsboll, T., T. Krarup, et al. (2001). "No reactive hypoglycaemia in Type 2 diabetic patients after subcutaneous administration of GLP-1 and intravenous glucose." *Diabet Med* 18(2): 144-9.
 - Wang, Y., R. Perfetti, et al. (1997). "Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats." *J Clin Invest* 99(12): 2883-9.
 - 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 Lett* 358(3): 219-24.
 - Weir, G. C. and S. Bonner-Weir (2004). "Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes." *Diabetes* 53 Suppl 3: S16-21.
 - Wells, W. M., 3rd, P. Viola, et al. (1996). "Multi-modal volume registration by maximization of mutual information." *Med Image Anal* 1(1): 35-51.
 - Wettergren, A., P. Maina, et al. (1997). "Glucagon-like peptide-1 7-36 amide and peptide YY have additive inhibitory effect on gastric acid secretion in man." *Scand J Gastroenterol* 32(6): 552-5.
 - Wettergren, A., M. Wajdemann, et al. (1997). "The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation." *Gut* 40(5): 597-601.
 - Wettergren, A., M. Wajdemann, et al. (1997). "The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation." *Gut* 40(5): 597-601.
 - Wheeler, M. B., M. Lu, et al. (1993). "Functional expression of the rat

- glucagon-like peptide-1 receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C." *Endocrinology* 133(1): 57-62.
- 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." *J Nucl Med* 47(12): 2025-33.
 - Wild, D., H. Macke, et al. (2008). "Glucagon-like peptide 1-receptor scans to localize occult insulinomas." *N Engl J Med* 359(7): 766-8.
 - Wildhage, I., H. Trusheim, et al. (1999). "Gene expression of the human glucagon-like peptide-1 receptor is regulated by Sp1 and Sp3." *Endocrinology* 140(2): 624-31.
 - Willms, B., J. Werner, et al. (1996). "Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients." *J Clin Endocrinol Metab* 81(1): 327-32.
 - Wishart, J. M., M. Horowitz, et al. (1998). "Relation between gastric emptying of glucose and plasma concentrations of glucagon-like peptide-1." *Peptides* 19(6): 1049-53.
 - World Health Organization (WHO) (2007). "Health Topics " Diabetes mellitus"." http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/.
 - 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.
 - Xu, G., D. A. Stoffers, et al. (1999). "Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats." *Diabetes* 48(12): 2270-6.
 - Yalow, R. S. and S. A. Berson (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man." *J Clin Invest* 39: 1157-75.
 - Yamamoto, H., T. Mori, et al. (2005). "A possible role of GLP-1 in the pathophysiology of early dumping syndrome." *Dig Dis Sci* 50(12): 2263-7.
 - Yanaihara, C., T. Matsumoto, et al. (1985). "Rat pancreas contains the proglucagon(64-69) fragment and arginine stimulates its release." *FEBS Lett* 187(2): 307-10.

- Zander, M., M. Taskiran, et al. (2001). "Additive glucose-lowering effects of glucagon-like peptide-1 and metformin in type 2 diabetes." *Diabetes Care* 24(4): 720-5.
- Zollei, L., J. W. Fisher, et al. (2003). "A unified statistical and information theoretic framework for multi-modal image registration." *Inf Process Med Imaging* 18: 366-77.
- Zueco, J. A., A. I. Esquifino, et al. (1999). "Coexpression of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor, vasopressin, and oxytocin mRNAs in neurons of the rat hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: effect of GLP-1(7-36)amide on vasopressin and oxytocin release." *J Neurochem* 72(1): 10-6.

7.2 Verzeichnis der 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, Engenhardt-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, Stempel, Sturm, Thomas,
Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Walthers, Weber, Weihe, Wennemuth,
Werner, Wesemann, Westermann, Wiegandt, Wilke, Wirth, Wulf, Zielke

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

7.3 Danksagung

Bei Prof. Dr. Martin Gotthardt möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dem Laborleiter Dr. Martin Behe, der mir mit seiner stets vorhandenen Diskussionsbereitschaft, seinem praktischen Rat und seinem überwältigendem Wissensreichtum viele Türen geöffnet hat.

Gudrun Höhn, Ulla Kramer, Dr. Tino Schurrat, Dr. Sebastian Huss, Dr. Tobias Topp, Philipp Baumeister und allen anderen Mitarbeitern möchte ich für die gute Zusammenarbeit, das freundliche Arbeitsklima und die besondere Unterstützung im Labor danken.

Viel Dank gebührt auch meiner Familie, meinen Freunden und meiner Frau Miriam, die mich, wo sie konnten unterstützt haben und diese Arbeit erst ermöglichen.