

**Entwicklung von Secretin- und
Glucagon-like peptide-2-Rezeptor-Antagonisten
für die Tumordiagnostik**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen
Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)**

**Eingereicht im Fachbereich Biologie, Biochemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**



vorgelegt von

**Anja Klußmeier
aus Frankfurt am Main**

Berlin, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von 2007 – 2011 in der Arbeitsgruppe von Dr. Carsten Grötzinger in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum der Charité, Universitätsmedizin Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. Bertram Wiedenmann, angefertigt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Petra Knaus
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Bertram Wiedenmann

Disputation am 31.10.2011

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCRs)	1
1.2	Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren	2
1.2.1	Einleitung von Signalwegen durch β -Arrestine.....	3
1.2.2	Aktivierung von GPCRs durch Signalweg-spezifische Liganden.....	5
1.3	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren der Klasse A	5
1.4	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren der Klasse B	6
1.4.1	Struktur und Aktivierungsmechanismus der GPCRs der Klasse B.....	6
1.4.2	Liganden der Secretinrezeptor-Familie.....	7
1.4.3	Alternative Modelle zur Aktivierung der GPCRs der Klasse B.....	8
1.5	Der Secretinrezeptor (SCTR)	8
1.5.1	Struktur und funktionelle Regionen des Secretinrezeptors.....	8
1.5.2	Signalweg des Secretinrezeptors.....	8
1.5.3	Splicevarianten und Dimere des Secretinrezeptors.....	9
1.6	Secretin	9
1.6.1	Physiologie des Secretin.....	9
1.6.2	Struktur des Secretin.....	10
1.6.3	Varianten des Secretin.....	10
1.7	Der Glucagon-like peptide-2-Rezeptor (GLP-2R)	11
1.7.1	Struktur und Signalweg des Glucagon-like peptide-2-Rezeptors.....	11
1.8	Glucagon-like peptide-2 (GLP-2)	11
1.8.1	Physiologie des GLP-2.....	11
1.8.2	Struktur des GLP-2.....	12
1.8.3	Varianten des GLP-2.....	13
1.9	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren der Klasse C	13
1.10	Expression und Funktion von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren im Tumor	14
1.10.1	Expression des Secretinrezeptors in Normal- und Tumorgewebe.....	14
1.10.2	Expression des Glucagon-like peptide-2-Rezeptors in Normal- und Tumorgewebe.....	16
1.11	Peptid-basierte Entwicklung von Medikamenten	17
1.11.1	Peptide als Trägermoleküle für die zielgerichtete Tumordiagnostik.....	18
1.11.2	Grundbegriffe der Rezeptorpharmakologie.....	19
1.11.3	Charakterisierung von GPCR-Liganden durch „High-Content-Analyse“.....	20
2	<u>Zielsetzung</u>	22
3	<u>Material</u>	23
3.1	Chemikalien	23
3.2	Verbrauchsmaterialien	24
3.3	Kits	25
3.4	Geräte	25
3.5	Puffer	26

3.6	Wachstumsmedien und Reagenzien für die Säugerzellkultur	27
3.7	Nukleinsäuren und Nukleotide	28
3.7.1	DNA-Oligonukleotide (Primer)	28
3.7.2	Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide	28
3.8	Vektoren und rekombinante Plasmide	28
3.9	Proteine und Peptide	29
3.9.1	Enzyme	29
3.9.2	Antikörper	29
3.9.3	Proteine als Größenstandard	29
3.9.4	Hochreine Peptide	30
3.9.5	Peptide, LIPS [®] -Synthese	30
3.10	Zellen und Gewebe	31
3.10.1	Prokaryotische Zellen	31
3.10.2	Eukaryotische Zellen / Gentechnisch veränderte Zelllinien	31
3.10.3	humane Gewebe, <i>Tissue Microarrays</i> (TMA)	31
3.11	Software	32
4	Methoden	33
4.1	Molekularbiologische Methoden	33
4.1.1	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	33
4.1.2	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	33
4.1.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	33
4.1.4	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
4.1.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren	34
4.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren	34
4.1.7	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	34
4.1.8	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	34
4.1.9	DNA-Sequenzierung	35
4.2	Zellbiologische Methoden	35
4.2.1	Kultivierung von humanen Zelllinien	35
4.2.2	Konservierung von humanen Zelllinien	35
4.2.3	Transiente Transfektion von U2OS-Zellen	36
4.2.4	Stabile Transfektion von U2OS-Zellen	36
4.2.5	Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot	37
4.3	Biochemische und immunologische Methoden	37
4.3.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	37
4.3.2	Detektion von Proteinen in Paraffinschnitten	38
4.3.3	SDS-PAGE	39
4.3.4	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	39
4.4	Funktionelle Methoden zur Untersuchung G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren	40

4.4.1	β-Arrestin2-GFP Translokation.....	40
4.4.2	Messung von intrazellulären cAMP-Konzentrationen in transfizierten Zelllinien.....	42
4.4.3	Messung von intrazellulären cAMP-Konzentrationen in nativen Zelllinien.....	42
4.4.4	Messung von zytoplasmatischen Kalzium-Konzentrationen.....	43
4.4.5	Bindung und Internalisierung IDCC-markierter Liganden an lebenden und fixierten Zellen.....	44
5	Ergebnisse	46
5.1	Expression des Secretinrezeptors in humanem Normal- und Tumorgewebe	46
5.1.1	Validierung von Antikörpern gegen den Secretin- und Glucagon-like peptide-2-Rezeptor.....	46
5.1.2	Expression des Secretinrezeptors in gesundem Gewebe.....	47
5.1.3	Expression des Secretinrezeptors im Tumorgewebe.....	50
5.1.4	Expression des Secretinrezeptors in Tumoren des Pankreas.....	50
5.1.5	Expression des Secretinrezeptors in Tumoren des Ösophagus.....	50
5.1.6	Expression des Secretinrezeptors in neuroendokrinen Tumoren.....	53
5.2	Optimierung des humanen Secretins für die zielgerichtete Tumordiagnostik	54
5.2.1	Etablierung einer hochdurchsatzfähigen Methode für die Messung der GPCR-Aktivierung.....	54
5.2.2	Die β-Arrestin2-GFP Translokation im Vergleich mit cAMP-Messungen.....	58
5.2.3	Aktivierung des SCTR durch Alanin-substituierte Secretin-Varianten.....	59
5.2.4	Aktivierung des SCTR durch weitere Substitutionsvarianten des Secretin.....	59
5.2.5	Aktivierung des SCTR durch N- oder C-terminal verkürzte Secretin-Varianten.....	61
5.2.6	Aktivierung des SCTR durch Kombinationen aus N- und C-terminal verkürzten Secretin-Varianten.....	61
5.2.7	Untersuchung von 10/11meren mit N-terminaler Secretin-Sequenz.....	63
5.2.8	Entwicklung von Secretinrezeptor-Antagonisten.....	65
5.2.9	Modifikation der β-Arrestin2-GFP Translokation für die Untersuchung von Antagonisten.....	65
5.2.10	Antagonistische Aktivität N-terminal verkürzter Secretin-Varianten.....	67
5.2.11	Substitutionen an N-terminal verkürzten Secretin-Varianten.....	67
5.2.12	Abschließende Untersuchungen an aufgereinigten Secretin-Varianten.....	70
5.3	Der Secretinrezeptor in Tumorzelllinien des Pankreas und Ösophagus	72
5.3.1	Expression des Secretinrezeptors Tumorzelllinien des Pankreas und Ösophagus.....	72
5.3.2	Funktionelle Experimente an BxPC-3- und Kyse410-Zellen.....	72

5.4	Optimierung des humanen Gucagon-like peptide-2 für die zielgerichtete Tumordiagnostik	72
5.4.1	Aktivierung des GLP-2R durch Alanin-substituierte GLP-2-Varianten	74
5.4.2	N-terminale Substitutionen beeinflussen die intrinsische Aktivität des GLP-2	76
5.4.3	Multiple Substitutionen am N-Terminus des GLP-2	78
5.4.4	Aktivierung des GLP-2R durch C-terminal verkürzte GLP-2-Varianten	79
5.4.5	Anwendung der „Endogenen-Agonisten-Theorie“ für den GLP-2R	79
5.4.6	Entwicklung von GLP-2-Rezeptor-Antagonisten	81
5.4.7	Deletionen am N-Terminus des GLP-2 führen zu GLP-2R-Antagonisten	81
5.4.8	Abschließende Untersuchungen an aufgereinigten GLP-2-Varianten	86
6	<u>Diskussion</u>	89
6.1	Der Secretinrezeptor als molekulare Zielstruktur im Tumor	89
6.2	Die β-Arrestin2-GFP Translokation zur funktionellen Charakterisierung von Liganden der GPCR-Klasse B	91
6.3	Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Secretin und GLP-2	93
	Bedeutung der einzelnen Aminosäuren des Secretin und GLP-2 für die Aktivierung ihrer Rezeptoren	
	Struktur-Aktivitätsbeziehungen von N-terminal verkürzten GLP-2-Varianten	
	Einfluss von N-terminalen Substitutionen auf die Potenz und Aktivität von Secretin und GLP-2	
6.4	Optimierung von Secretin- und GLP-2-Varianten für die zielgerichtete Tumordiagnostik	97
	Optimierung des Secretin für die zielgerichtete Tumordiagnostik	
	Optimierung des GLP-2 für die zielgerichtete Tumordiagnostik	
6.5	Potential und weitere Entwicklung der optimierten Secretin- und GLP-2-Varianten	101
7	<u>Zusammenfassung</u>	103
7.1	Summary	104
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	105
9	<u>Anhang</u>	120
	Peptidtabellen I-III	120
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	138
	Abkürzungsverzeichnis	140
	Aminosäuren	143
	Veröffentlichungen	144
	Danksagung	145
	Lebenslauf	146
	Erklärung	147

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren

Die Zellen des menschlichen Körpers sind darauf angewiesen, Reize aus ihrer Umwelt aufzunehmen und zu verarbeiten. Diese Aufgabe erfüllen unter anderem Membranrezeptoren, die auf der zellulären Oberfläche exprimiert werden und Signalmoleküle, z.B. Hormone, erkennen und ein entsprechendes Signal ins Zellinnere weiterleiten können.

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (engl.: *G-Protein coupled receptors*, GPCRs) bildet die größte Familie der Rezeptoren an der Zelloberfläche. Sie bestehen aus einem extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus), sieben alpha-helikalen Transmembrandomänen, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, und einem intrazellulären Carboxyterminus (C-Terminus) [Abbildung (Abb.)1]. Nach der Bindung an ihren Liganden binden sie an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine), welche im Anschluss unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden einleiten [1.2]. Trotz ihrer großen Ähnlichkeit untereinander binden die verschiedenen GPCRs an vollkommen unterschiedliche Liganden, bei denen es sich um kleine Moleküle, Peptide und Proteine, aber auch um Ionen oder Photonen handeln kann¹.

Die Gruppe der GPCRs ist vor allem pharmakologisch von besonders hoher Bedeutung. Zum heutigen Zeitpunkt beeinflussen etwa 30 % aller zugelassenen Medikamente auf unterschiedliche Weise die Funktion von GPCRs, wobei die meisten Wirkstoffe an einigen wenigen, gut charakterisierten Rezeptoren angreifen². Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass in den übrigen im menschlichen Genom vorkommenden GPCRs noch ein hohes pharmakologisches Potential liegt.

Basierend auf der Homologie ihrer Proteinsequenzen lassen sich die GPCRs in drei Hauptfamilien einteilen. Die größte Familie mit mehr als 600 unterschiedlichen Rezeptoren bildet die Klasse A (auch Klasse 1 oder Rhodopsinfamilie genannt). Den Familien der Klasse B (auch Klasse 2 oder Secretinfamilie) und der Klasse C (auch Klasse 3 oder metabotrope Glutamat-Familie) gehören weitaus weniger Rezeptoren an^{3,4}.

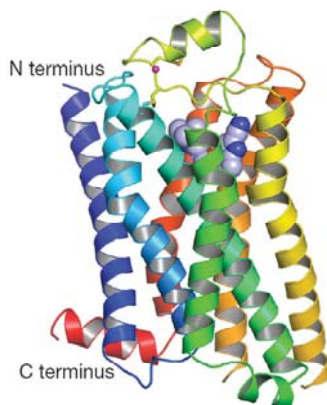


Abbildung 1: Struktur eines GPCRs. Die Kristallstruktur zeigt den β 1-adrenergen Rezeptor des Truthahns, einen GPCR der Klasse A. An den extrazellulären N-Terminus (blau) schließen sich sieben alpha-helikale Transmembrandomänen an, die in einem intrazellulären C-Terminus (rot) enden. Abbildung modifiziert nach Warne et al.⁵

1.2 Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren

Um die Informationen extrazellulärer Liganden ins Zellinnere zu leiten, verwenden GPCRs bestimmte Wege zur Signaltransduktion. Der am besten untersuchte Weg führt über heterotrimeren G-Proteine. Der durch den Liganden aktivierte GPCR hat dabei die Rolle eines „*guanine nucleotide exchange factors*“ (GEF) und katalysiert den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) an der $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Dadurch trennen sich die beiden G-Protein-Untereinheiten ($G\alpha$ und $G\beta\gamma$) voneinander, lösen sich vom GPCR und aktivieren anschließend unterschiedliche zelluläre Signal- und Effektormoleküle. Jede Zelle verfügt dabei über eine spezifische Ausstattung dieser G-Protein-Untereinheiten, wobei mindestens 20 verschiedene $G\alpha$ -, sechs verschiedene $G\beta$ - und zwölf verschiedene $G\gamma$ -Untereinheiten existieren⁶. Ein bestimmter GPCR bindet nach seiner Aktivierung durch einen Liganden jedoch nicht an alle zur Verfügung stehenden G-Protein-Untereinheiten, sondern bevorzugt bestimmte Kombinationen der unterschiedlichen $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten. Dadurch ist es möglich, dass ein GPCR in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Signalwege aktivieren und damit auch unterschiedliche zelluläre Reaktionen auslösen kann. Die meisten Signalwege werden dabei über die aktivierten $G\alpha$ -Untereinheiten induziert, die man grob in $G\alpha_s$ -, $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Untereinheiten unterteilen kann. Eine aktivierte $G\alpha_s$ -Untereinheit aktiviert zunächst die Adenylatzyklase, die die intrazelluläre Konzentration des sekundären Effektormoleküls cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) erhöht. Dies führt wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits Einfluss auf weitere Signalmoleküle ausübt. Die aktivierte $G\alpha_i$ -Untereinheit erzielt den gegenteiligen Effekt, indem sie die Adenylatzyklase inhibiert und damit die intrazelluläre cAMP-Konzentration verringert und in Folge dessen die Aktivität der PKA herabsetzt [Abb.2].

Ein durch GPCRs ausgelöster Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration wird dagegen durch eine aktivierte $G\alpha_q$ -Untereinheit vermittelt. Diese aktiviert die Phospholipase C β (PLC β), die anschließend die Effektormoleküle Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1-4-5-triphosphat (Ins(1,4,5)P₃) generiert. DAG beeinflusst seinerseits die Proteinkinase C (PKC) und Ins(1,4,5)P₃ die Freisetzung von Kalzium aus zellulären Speichern. Diese kurzfristige Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration löst ebenfalls eine Aktivierung der PKC aus.

Neben den gerade beschriebenen $G\alpha$ -Untereinheiten können jedoch auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten Signale in die Zelle weiterleiten. Sie beeinflussen beispielsweise Ionenkanäle oder die PLC β ⁷ [Abb.2].

Darüberhinaus sind die durch die verschiedenen G-Protein-Untereinheiten aktivierten Kinasen PKA und PKC zusätzlich für die Phosphorylierung verschiedener „*mitogen-activated protein kinases*“ (MAPK), z.B. der „*extracellular signal-regulated kinase*“ (ERK), verantwortlich. Die phosphorylierte ERK (pERK) kann daraufhin vom Zytoplasma in den Nukleus translozieren und so z.B. die Transkription von Zielgenen beeinflussen.

Für eine regulierte Signalüberleitung in die Zelle ist nicht nur die schnelle Reaktion eines GPCRs auf seinen Liganden von Bedeutung. Mindestens genauso wichtig ist das Abschalten des Signals, um die Zelle auf Dauer für weitere Reize aus ihrer Umwelt empfänglich zu halten. Dies wird durch weitere Proteine vermittelt.

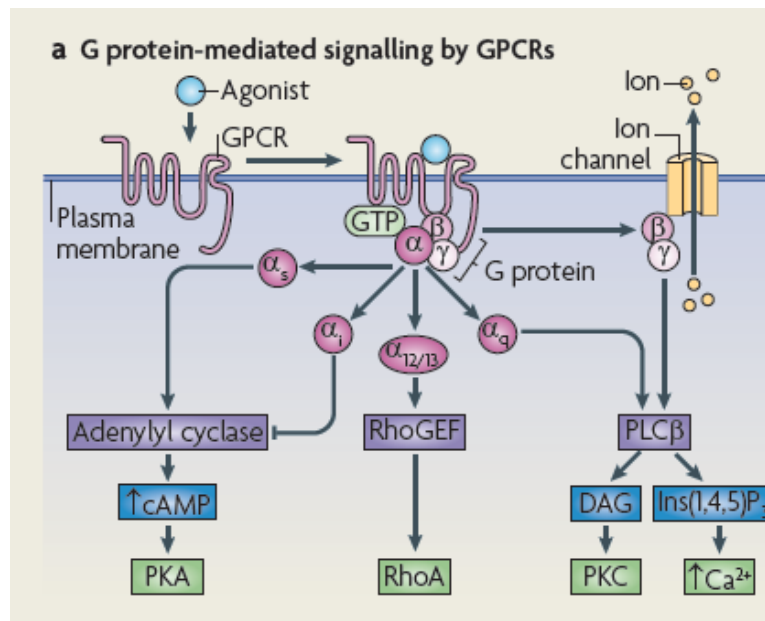


Abbildung 2: G-Protein-vermittelte Signaltransduktion von GPCRs. Nach der Aktivierung eines GPCRs durch seinen Agonisten kommt es zur intrazellulären Bindung des G-Proteins, welches aus der α - und der $\beta\gamma$ -Untereinheit besteht. Nach deren Dissoziation aktivieren die α_s -Untereinheiten die Adenylatzyklase, die für einen intrazellulären cAMP-Anstieg und damit für die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) sorgt. α_i -Untereinheiten inhibieren diesen Prozess. $\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten aktivieren dagegen den RhoA-Signalweg. α_q -Untereinheiten aktivieren die Phospholipase β , durch die DAG und Ins(1,4,5)P $_3$ gebildet werden. Dadurch wird die Proteinkinase C aktiviert und die intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration erhöht. Abbildung aus Ritter & Hall, 2009⁷

Nach der Abspaltung des G-Proteins vom aktivierten GPCR und der Einleitung der G-Protein-abhängigen Signalwege wird der GPCR an definierten Aminosäuren seines intrazellulären C-Terminus durch GPCR-Kinasen (GRKs) phosphoryliert. Dies führt zur Rekrutierung von Arrestinen und deren Bindung an den C-Terminus des GPCRs. Die Arrestine sind ihrerseits in der Lage mit Clathrin und dessen Adaptorprotein AP2 zu interagieren, was zu einer Internalisierung des GPCRs in endosomale Vesikel über sogenannte „clathrin-coated pits“ führt. In den meisten Fällen wird der GPCR dadurch kurz- oder langfristig inaktiviert, mittlerweile sind aber auch Signalwege beschrieben, die erst im endosomalen Vesikel beginnen. Diese werden über die den GPCR bindenden Arrestine vermittelt und können ebenfalls zu einer Aktivierung des ERK-Signalwegs führen^{8,9}. Abschließend wird der GPCR entweder über ein „Recycling“-Endosom zurück an die Zellmembran transportiert, wo er für eine erneute Signalübertragung zur Verfügung steht, oder aber im Lysosom endgültig abgebaut⁷ [Abb.3].

Neben diesen „klassischen“ Signalwegen sind jedoch noch weitere Signalwege bekannt, die von einzelnen GPCRs zur Signalübertragung genutzt werden⁷.

1.2.1 Einleitung von Signalwegen durch β -Arrestine

Die klassische Funktion der Arrestine, das Abschalten der G-Protein-abhängigen Signalwege durch Rezeptorinternalisierung, wurde in Abschnitt 1.2 und Abbildung 3 beschrieben. Im Menschen existieren vier verschiedene Isoformen der Arrestine, wobei Arrestin1 und Arrestin4 ausschließlich in Zellen der Retina exprimiert werden, wo sie die Signalwege des Photorezeptors Rhodopsin und der Opsine regulieren. Die Arrestine 2 und 3, die häufig als β -Arrestin1 und β -Arrestin2 bezeichnet

werden, sind dagegen ubiquitär exprimiert und zu etwa 80 % identisch¹⁰. Inzwischen ist bekannt, dass das Abschalten der G-Protein-abhängigen Signalwege nur einen Bruchteil der Funktionen der Arrestine darstellt, wobei im folgenden lediglich auf die beiden β -Arrestine eingegangen wird. Diese spielen zusätzlich eine wichtige Rolle in der Regulation der „mitogen-activated protein kinases“ (MAPK), die ebenfalls durch G-Proteine aktiviert werden können¹¹. Es konnte gezeigt werden, dass das β -Arrestin1 nach der Aktivierung des β 2-adrenergen Rezeptors die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Src rekrutiert, was letztendlich zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von ERK führt¹². Gleichermäßen führt die Überexpression von β -Arrestin1 oder β -Arrestin2 zu einer gesteigerten ERK-Aktivierung nach Stimulation des Angiotensin II-Typ-1A-Rezeptors (AT1aR) mit Angiotensin II¹³.

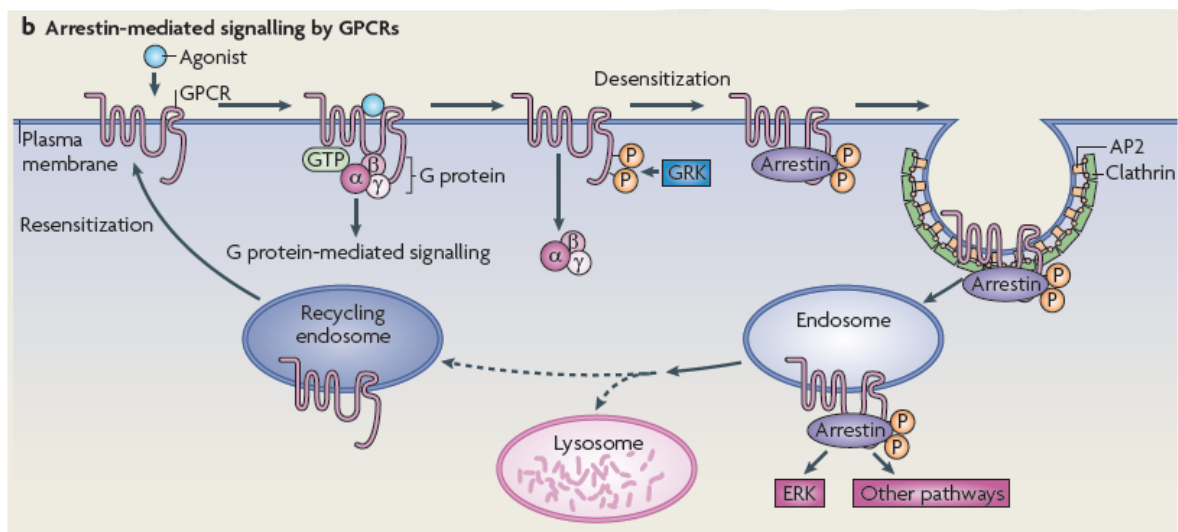


Abbildung 3: Arrestin-vermittelte Signaltransduktion und Internalisierung von GPCRs. Nach der Aktivierung eines GPCRs durch seinen Agonisten werden in den meisten Fällen G-Protein-abhängige Signalwege aktiviert [Abb.2]. Anschließend werden Prozesse eingeleitet, um diese Aktivierung zu beenden. Der GPCR wird dafür zunächst intrazellulär durch GPCR-Kinasen (GRKs) phosphoryliert, was zu einer Bindung des Arrestins an den GPCR führt. Dieses interagiert wiederum mit Clathrin, das die Internalisierung des GPCRs in Vesikel verursacht. Arrestin-vermittelt können im Anschluss weitere Signalwege, z.B. über ERK, aktiviert werden. Je nach GPCR kommt es anschließend zu seinem Abbau im Lysosom oder der GPCR wird zurück an die Zellmembran transportiert, wo er erneut für die Bindung von Liganden zur Verfügung steht. Abbildung aus Ritter & Hall, 2009⁷

Dabei unterscheidet sich die ERK-Aktivierung über den β -Arrestin-abhängigen Signalweg deutlich von der ERK-Aktivierung über einen G-Protein-abhängigen Signalweg. Etwa zwei Minuten nach Stimulation des AT1aR mit Angiotensin II kann die G-Protein-abhängige pERK nachgewiesen werden, während die β -Arrestin-abhängige pERK erst nach etwa 30 Minuten detektierbar ist. Ein weiterer Unterschied macht sich in der Lokalisation der gebildeten pERK bemerkbar. Während die G-Protein-abhängige pERK typischerweise im Nukleus zu finden ist, behält die β -Arrestin-abhängige pERK eine eher zytoplasmatische Lokalisation bei. Dieser Effekt führt letztendlich zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und damit zu unterschiedlichen Reaktionen in der Zelle¹⁴. Neben dem Effekt auf ERK konnten auch β -Arrestin-abhängige Effekte auf AKT und I κ B, sowie die β -Arrestin-abhängige Transaktivierung des „epidermal growth factor receptors“ (EGFR) beobachtet werden¹⁵⁻¹⁷.

1.2.2 Aktivierung von GPCRs durch Signalweg-spezifische Liganden

In den letzten Jahren konnten vermehrt Signalweg-spezifische Agonisten beschrieben werden („*biased Agonism*“). Dies steht im Gegensatz zu der vorangegangenen Theorie, nach der der Arrestin-Bindung stets eine G-Protein-vermittelte zelluläre Reaktion vorausgeht. Die neu beschriebenen Agonisten aktivieren dagegen ausschließlich einen möglichen Signalweg, z.B. führen sie entweder zu einer Aktivierung des G-Protein-vermittelten Signalwegs oder aktivieren Arrestin-vermittelte Effektormoleküle^{18,19}. Diese Tatsache führte in den letzten Jahren zu einem experimentellen Umdenken, da für die vollständige Charakterisierung eines GPCR/Liganden-Paares nun auch mehrere unterschiedliche Signalwege untersucht werden müssen.

Ein Beispiel für einen Signalweg-spezifischen Liganden, genauer einen β -Arrestin-spezifischen Liganden, ist das SII Angiotensin, welches an den AT1aR bindet. Die Bindung von SII Angiotensin aktiviert jedoch, im Gegensatz zum natürlichen Liganden Angiotensin II, keine $G\alpha_q$ -abhängigen Signalwege. Die Fähigkeit zur Rekrutierung des β -Arrestin2 bleibt jedoch erhalten. Dies führt zur Internalisierung des AT1aR, zur β -Arrestin-vermittelten Phosphorylierung und damit der Aktivierung von ERK^{18,20}. Man geht davon aus, dass dieser Effekt durch verschiedene aktive, stabile Konformationen eines GPCRs ausgelöst wird. Signalweg-spezifische Liganden stabilisieren dabei nur jene Konformation, die den jeweiligen Signalweg auslöst²¹.

Für die Entwicklung neuer Medikamente sind diese Signalweg-spezifischen Liganden von großem Interesse. Durch das absichtliche Vermeiden eines Signalwegs kann die gewünschte Wirkung einer Substanz erhalten, mögliche Nebenwirkungen jedoch vermieden werden. Niacin, ein Ligand des GPR109A und Baustein wichtiger Coenzyme wie NAD oder NADP, wird therapeutisch zur Regulation des Fettstoffwechsels eingesetzt. Als Nebenwirkung werden jedoch häufig spontane Hautrötungen beschrieben, die für viele Patienten nicht tolerabel sind. Studien konnten zeigen, dass diese Niacin-induzierten Hautrötungen in β -Arrestin1-Knockout-Mäusen drastisch reduziert sind, während der positive Effekt auf den Fettstoffwechsel bestehen bleibt. Entsprechende Versuche zur Entwicklung eines G-Protein-spezifischen Liganden für den GPR109A erwiesen sich als vielversprechend²²⁻²⁴.

1.3 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren der Klasse A

Die GPCRs der Klasse A sind mit etwa 670 Rezeptoren nicht nur die größte, sondern zu diesem Zeitpunkt auch die am besten charakterisierte Unterfamilie der GPCRs. Sie enthält neben diversen Duft-, Peptid- und Glykoprotein-hormonrezeptoren auch die Rezeptoren der wichtigen Neurotransmitter Adrenalin, Dopamin und Serotonin. Bis vor kurzem war das inaktive, bovine Rhodopsin die einzige vorhandene Kristallstruktur eines GPCRs, auf der sämtliche Theorien über den Aktivierungsmechanismus von GPCRs beruhten²⁵. In den letzten vier Jahren wurden auf diesem Gebiet jedoch enorme Fortschritte erzielt, so dass nun auch die Kristallstrukturen anderer GPCRs der Klasse A vorliegen^{5,26-29}. Gemeinsames Merkmal aller GPCRs der Klasse A ist neben verschiedenen, hochkonservierten Aminosäuren eine Disulfidbrücke, die die erste und zweite extrazelluläre Domäne miteinander verbindet. Die meisten der Rezeptoren tragen außerdem einen Palmitoylrest innerhalb des C-Terminus, der als Membrananker fungiert¹.

1.4 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren der Klasse B

Die GPCRs der Klasse B, oder „*secretin receptor-like receptors*“ bilden eine weitere Unterfamilie der GPCRs und bestehen vor allem aus Peptidhormonrezeptoren, welche sich nochmals in die Calcitoninrezeptoren, Corticotropin-releasing hormone-Rezeptoren, Parathyroidhormonrezeptoren, VIP/PACAP-Rezeptoren und die Secretinrezeptor-Familie unterteilen lassen. Da die GPCRs der Klasse B, vor allem die Rezeptoren der Secretinfamilie, in dieser Arbeit von hoher Bedeutung sind, werden die Struktur und Funktion dieser GPCRs in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.4.1 Struktur und Aktivierungsmechanismus der GPCRs der Klasse B

GPCRs der Klasse B lassen sich wie alle GPCRs in eine extrazelluläre Domäne (ECD), sieben Transmembrandomänen, die durch extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, und eine intrazelluläre Domäne unterteilen [Abb.1/Abb.4]. Alle GPCRs der Klasse B zeichnen sich dabei speziell durch ihre lange ECD aus, die je nach Rezeptor eine Länge von 120 bis 150 Aminosäuren erreicht. In dieser Domäne befinden sich neben hochkonservierten Aminosäuren auch drei konservierte Disulfidbrücken, die für die Funktion der Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen³⁰.

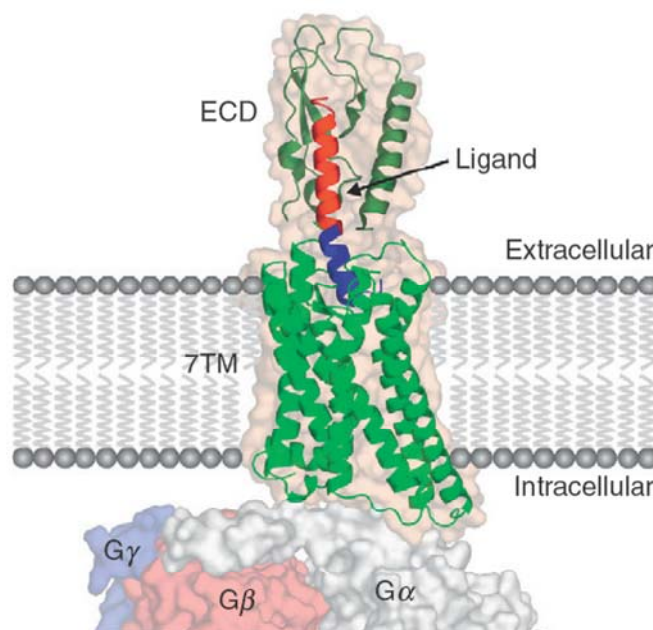


Abbildung 4: Modell eines GPCRs der Klasse B mit gebundenem Liganden. Der C-Terminus des Peptidliganden (rot) bindet an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors (dunkelgrün). Der N-Terminus des Peptidliganden (blau) interagiert anschließend mit den Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen des GPCRs (grün), der dadurch aktiviert wird. In diesem Zustand kann das G-Protein intrazellulär an den GPCR binden und die entsprechenden Signalwege auslösen. Abbildung aus Underwood et al., 2010³⁸

Im Gegensatz zu den GPCRs der Klasse A konnte bisher jedoch kein GPCR der Klasse B erfolgreich kristallisiert werden, so dass über die vollständige Struktur nur spekuliert werden kann. Für die ECD alleine liegen hingegen mehrere Kristallstrukturen, meist in Liganden-gebundenem Zustand, vor³¹⁻³⁶. Diese sind sich untereinander so ähnlich, dass die Struktur auch als „*secretin family recognition fold*“ bezeichnet wird³⁷. Das momentan schlüssigste Modell beschreibt die

Aktivierung eines GPCRs der Klasse B folgendermaßen: Der C-Terminus des Peptidliganden bindet zuerst an die ECD des Rezeptors, so dass der N-Terminus des Peptidliganden mit den Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen des Rezeptors interagieren kann. Dies induziert eine strukturelle Umlagerung innerhalb der Transmembrandomänen des GPCRs und intrazellulär die Bindung des G-Proteins, was schließlich zur Aktivierung der Signalwege führt [Abb.4].

1.4.2 Liganden der Secretinrezeptor-Familie

Die Liganden der GPCRs der Secretinrezeptor-Familie sind Peptide mit einer Länge zwischen 27 und 44 Aminosäuren. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen dieser Peptide, ist eine große Homologie im N-Terminus zu erkennen [Abb.5]. Auf ein Histidin oder Tyrosin an Position 1 folgt stets eine kleine, ungeladene Aminosäure (Alanin oder Serin). An Position 3 befindet sich mit Ausnahme des Glucagons eine saure Aminosäure (Aspartat oder Glutamat), der eine kleine Aminosäure folgt (Glycin oder Alanin). Alle Peptide tragen an Position 6 ein Phenylalanin, Position 7 ist meistens ein Threonin. Die Aminosäuren im sich anschließenden C-terminalen Teil der Peptide unterscheiden sich dagegen deutlicher.

	(1)	10	20	30	44
GLP-1 (7-37)	(1) HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVKGRG-----				
GLP-2 (1)	HADGSFSDENNTILDNLAARDFINWLIQTKITD-----				
GIP (1)	YAEGTFTSDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ--				
Glucagon (1)	HSQGTFTSDYSKYLLSRRAQDFVQWLMNT-----				
Secretin (1)	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLQGLV-----				
VIP (1)	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNLSILN-----				
Somatoliberin (1)	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLODIMSRQQGESNQERGARARL				

Abbildung 5: Gegenüberstellung der Aminosäuren ausgewählter Peptidliganden der GPCRs der Klasse B: Die Sequenzen der Peptidliganden der Secretinrezeptor-Familie und ausgewählter verwandter Peptidliganden wurden mit Vector NTI übereinandergelegt und verglichen. Gelb/rot: identische Aminosäuren, blau: teilweise identische Aminosäuren, grün: Blöcke ähnlicher Aminosäuren

Die Ähnlichkeit der Peptide spiegelt sich nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, sondern auch in ihrer Struktur wider. Während die vorhandenen Strukturen aus Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR)-Experimenten der Peptide in wässriger Lösung eine ungeordnete Struktur zeigen, bilden die Peptide nach der Bindung an ihren Rezeptor oder unter dem Einfluss milder organischer Lösungsmittel eine Alphahelix³⁹⁻⁴³ [Abb.6]. Für die Bildung dieser Helix könnte das sogenannte „*N capping motif*“, das aus den Aminosäuren 6, 7 und 10 besteht, eine tragende Rolle spielen⁴⁴. Derzeit wird angenommen, dass sich die Peptidhelix erst bei der Bindung des Peptids an die ECD des GPCRs bildet. Anschließend bindet der N-Terminus des Peptids an die Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen des Rezeptors und löst dadurch dessen Aktivierung aus³⁷. Dass ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus allen Peptiden zugrunde liegen muss, kann auch aus der Aktivität von Peptid-Varianten geschlossen werden. So führen N-terminale Verkürzungen bei allen Peptidliganden der GPCRs der Secretinrezeptor-Familie zum Verlust der Aktivität und kompetitivem Antagonismus⁴⁵⁻⁴⁷.

1.4.3 Alternative Modelle zur Aktivierung der GPCRs der Klasse B

Neben dem oben beschriebenen Modell [1.4.1] existieren weitere Theorien zur Aktivierung von GPCRs der Klasse B durch ihre Liganden. Auch diese Modelle gehen davon aus, dass der C-Terminus des Peptids an die ECD des Rezeptors bindet, wonach der N-Terminus des Peptids eine Aktivierung des Rezeptors auslöst. Ein alternatives Modell, welches auch als „endogene-Agonisten-Theorie“ bezeichnet wird, beschreibt anschließend eine weitere Umlagerung innerhalb der ECD des Rezeptors, wodurch ein kurzer Abschnitt der ECD selbst, der „endogene Agonist“, zugänglich wird. Dieser interagiert mit den Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen des GPCRs und führt dadurch zu dessen Aktivierung^{37,48-50}. Die Basis dieser Theorie sind *Crosslinking*-Experimente und Untersuchungen mit Peptiden aus den ECDs des Secretinrezeptors (SCTR) und Glucagon-like peptide-1 Rezeptors (GLP-1R)^{49,50}.

1.5 Der Secretinrezeptor (SCTR)

1.5.1 Struktur und funktionelle Regionen des Secretinrezeptors

Der Secretinrezeptor (SCTR) wurde im Jahr 1991 als G-Protein-gekoppelter-Rezeptor identifiziert⁵¹. Dabei handelte es sich um den SCTR der Ratte, der dem humanen zu 81 % homolog ist. Das humane SCTR-Gen besteht aus 13 Exons und 12 Introns, welche für einen GPCR von 440 Aminosäuren Länge kodieren. Diese lassen sich in ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid, eine 122 Aminosäuren lange ECD, sieben Transmembrandomänen, die durch extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, und einen 42 Aminosäuren langen intrazellulären C-Terminus unterteilen⁵²⁻⁵⁴. In der ECD befinden sich fünf Glykosylierungsstellen, wobei die Modifikation an Position 72 essentiell für die Funktionstüchtigkeit des Rezeptors ist^{55,56}. Wie die anderen Rezeptoren der GPCR-Klasse B besitzt der SCTR in seiner ECD außerdem sechs Cysteine, die drei Disulfidbrücken ausbilden und für die Ligandenbindung von großer Bedeutung sind³⁰. In mehreren Studien konnten außerdem weitere Aminosäuren identifiziert werden, deren Mutation eine schlechtere Bindung seines Liganden, des Secretins, zur Folge hat⁵⁷⁻⁵⁹. So kann trotz des Fehlens einer Kristallstruktur die Secretin-Bindungsstelle auf den N-Terminus und die erste extrazelluläre Schleife eingegrenzt werden^{58,60,61}. Hochkonservierte, basische Motive in der dritten intrazellulären Schleife des SCTR sind dagegen für die Bindung an das G-Protein verantwortlich⁶².

1.5.2 Signalweg des Secretinrezeptors

Die Bindung von Secretin an den SCTR führt wie bei allen GPCRs der Secretin-Familie vor allem zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration über $G\alpha_s$ -Proteine^{63,64} [1.2]. Daneben konnte aber auch ein transients intrazellulärer Kalziumanstieg gemessen werden, was auf eine zusätzlich mögliche Bindung des SCTR an $G\alpha_q$ -Proteine schließen lässt⁶⁵⁻⁶⁷. Nach der Rezeptorbindung wird das Secretin zusammen mit dem SCTR internalisiert⁶⁸. Dieser Prozess der Internalisierung konnte jedoch nicht endgültig aufgeklärt werden. Zunächst wurde berichtet, dass die SCTR-Internalisierung unabhängig von der C-terminalen Phosphorylierung ist⁶⁹. Eine andere Gruppe beobachtete jedoch, dass G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) die SCTR-

Internalisierung verstärken⁷⁰. Später wurde wiederum gezeigt, dass GRKs und β -Arrestine bei der Endozytose keine Rolle spielen⁷¹.

1.5.3 Splicevarianten und Dimere des Secretinrezeptors

Das SCTR-Gen besteht aus 13 Exons, was grundsätzlich die Möglichkeit für alternative Splicevarianten bietet⁷². Deren Existenz konnte erstmals 2002 in Proben eines Gastrinoms nachgewiesen werden. Das fehlende Exon 3, welches für 36 Aminosäuren im N-Terminus des SCTR codiert, führt dabei zu einer dominant negativen SCTR-Splicevariante, die anschließend auch in pankreatischen Adenokarzinomen nachgewiesen werden konnte^{73,74}. In pankreatischen Tumoren wurde auch eine weitere Splicevariante gefunden, bei der es durch Deletion der Exone drei und vier zu einer Verschiebung des Leserasters und zum vorzeitigen Translationsabbruch kommt. Das entstehende Produkt besteht aus den ersten 43 Aminosäuren des SCTR und 68 weiteren, SCTR-unabhängigen, Aminosäuren. Durch das vorhandene Signalpeptid und die fehlenden Transmembrandomänen wird diese Splicevariante jedoch nicht in die Membran inseriert, sondern sezerniert, so dass sie im Serum nachgewiesen werden kann⁷⁵. In Tumoren der Lunge konnten Splicevarianten des SCTR identifiziert werden, in denen Exon neun beziehungsweise die Exone zwei und drei fehlen⁷⁶.

In den letzten Jahren wurde außerdem die Existenz von SCTR-Homodimeren nachgewiesen, wobei das Secretin dabei nur an einen der beteiligten Rezeptoren bindet. Die Bildung von höhergradigen Oligomeren wurde ausgeschlossen^{77,78}. Neben Homodimeren bildet der SCTR außerdem Heterodimere mit den nah verwandten vasoaktiven intestinalen Peptidrezeptoren. Diese Heterodimere zeigen jedoch keine Reaktion auf die Applikation ihrer Liganden, ihre Funktion ist daher unklar⁷⁹.

1.6 Secretin

1.6.1 Physiologie des Secretin

Vor etwa hundert Jahren beschrieben Bayliss und Starling mit Secretin das erste Hormon, indem sie Hunden saure Extrakte aus der oberen Dünndarmmukosa injizierten und dabei die Zunahme der pankreatischen Sekretion beobachteten. Dies schrieben sie einer Komponente zu, die sie „Secretin“ nannten⁸⁰. Bis zur endgültigen Isolation und Sequenzierung des Peptids aus Schweinedärmen vergingen allerdings weitere sechzig Jahre⁸¹.

Die Secretin-Sekretion aus den S-Zellen des Duodenums wird vor allem durch Magensäure, aber auch durch die Verdauungsprodukte von Fetten und Proteinen ausgelöst. Anschließend induziert Secretin die Freisetzung von Bicarbonat-reichen Flüssigkeiten aus dem Pankreas und erfüllt damit eine wichtige Rolle im pH-Haushalt des Gastrointestinaltrakts.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die duodenalen S-Zellen die einzigen Secretin-produzierenden Zellen des Körpers sind. Mittlerweile konnte Secretin aber auch in anderen Organen, z.B. in Regionen des Gehirns, nachgewiesen werden. Welche Rolle das Secretin in diesen Organen spielt ist jedoch weitestgehend ungeklärt⁸²⁻⁸⁴. Auch die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke konnte für Secretin gezeigt werden⁸⁵. Verschiedene Publikationen diskutieren die

Bedeutung des Secretins im Glucose-Stoffwechsel. Frühere Studien konnten zeigen, dass Secretin die Aufnahme von Glucose fördert, beziehungsweise die Insulin-Freisetzung stimuliert^{86,87}. Dem entgegen stehen neuere Untersuchungen, die bei Verwendung physiologischer Dosen von Secretin keinen Effekt auf den Insulinspiegel beobachten konnten⁸⁸.

Klinisch wird Secretin zur Diagnose des Zollinger-Ellison Syndroms verwendet, das durch eine Überproduktion von Gastrin aus einem neuroendokrinen Tumor (Gastrinom) ausgelöst wird. Nach provokativer Injektion von Secretin steigt der Serum-Gastrin-Spiegel in Gastrinom-Patienten stark an, während er bei gesunden Patienten auf physiologischem Niveau bleibt^{89,90}.

1.6.2 Struktur des Secretin

Die Transkription und Translation des humanen Secretin-Gens resultiert in einem 121 Aminosäuren langen Vorläuferprotein („Preprosecretin“), welches neben Secretin ein Signalpeptid sowie ein N- und ein C-terminal-assoziiertes Peptid enthält. Die Abspaltung des Signalpeptids führt zum Prosecretin, aus dem das eigentliche Secretin, aber auch modifizierte Secretin-Peptide, hervorgehen⁹¹.

Das humane Secretin besteht aus 27 Aminosäuren und liegt in wässriger Lösung unstrukturiert vor. In organischer Umgebung bilden sich vermutlich zwei Domänen: eine etwa sechs Aminosäuren lange unstrukturierte N-terminale Domäne und eine C-terminale Alpha-helix. Die N-terminale Domäne ist unter den anderen Peptidliganden der GPCR-Klasse B hochkonserviert und scheint für die Aktivierung des Rezeptors zuständig [1.4.1/Abb.4], wobei das Histidin an Position 1 und das Aspartat an Position 3 des Secretin die größte Bedeutung zu haben scheinen^{30,57,92}. Die C-terminale Alpha-helix bewirkt dagegen die hochaffine Bindung des Secretins an den SCTR^{60,61}. Aufgrund der großen Ähnlichkeit des Secretins mit dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) findet außerdem eine schwächere Bindung an dessen Rezeptoren, die vasoaktiven intestinalen Peptidrezeptoren (VIP1R und VIP2R), statt⁹³.

1.6.3 Varianten des Secretin

Während der Prozessierung des Preprosecretins des Schweins können neben dem nativen Secretin auch Varianten entstehen, die das Secretin entweder um ein Gly oder um Gly-Lys-Arg am C-Terminus verlängern. Diese natürlich entstehenden Varianten weisen *in vivo* eine ähnliche Aktivität wie das native Secretin auf, ihre Funktion ist jedoch nicht bekannt⁹¹.

Robberecht et al. untersuchten schon 1988 verschiedene N-terminal verkürzte Varianten des Secretins auf ihre Fähigkeit zur cAMP-Bildung an isolierten pankreatischen Membranen. Dabei stellten sie fest, dass Secretin(2-27) eine stark verminderte Aktivität im Vergleich zum nativen Secretin aufwies, die mit weiterer Verkürzung immer stärker abfiel. Bei Secretin(7-27) konnte keine agonistische Reaktion mehr gemessen werden⁹⁴. Gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass die N-terminal verkürzten Varianten des Secretins das native Secretin kompetitiv vom Rezeptor verdrängen, wenn auch nur in vergleichsweise hohen Konzentrationen. Diese N-terminal verkürzten Secretin-Varianten werden jedoch bis heute als SCTR-Antagonisten verwendet, da ein potenterer Antagonist fehlt^{94,95}.

1.7 Der Glucagon-like peptide-2-Rezeptor (GLP-2R)

1.7.1 Struktur und Signalweg des Glucagon-like peptide-2-Rezeptors

Der humane Glucagon-like peptide-2-Rezeptor (GLP-2R) konnte 1999 identifiziert werden und gehört, wie auch der SCTR, zur Secretinrezeptor-Familie der GPCRs der Klasse B⁹⁶. Er besteht aus insgesamt 553 Aminosäuren, die sich in eine 179 Aminosäuren lange ECD (inklusive potentielllem Signalpeptid), sieben Transmembrandomänen und einen 108 Aminosäuren langen intrazellulären C-Terminus unterteilen lassen. Innerhalb der ECD befinden sich die drei familientypischen Disulfidbrücken und vier potentielle Glykosylierungsstellen (UniProtKB). Zum heutigen Zeitpunkt steht keine Kristallstruktur des GLP-2R zur Verfügung, strukturelle Daten zur ECD basieren auf Homologiemodellierungen mit ECD-Strukturen des nah verwandten Glucagon-like peptide-1-Rezeptor (GLP-1R)⁴¹.

Der GLP-2R bindet wie alle GPCRs der Secretinrezeptor-Familie an das $G\alpha_s$ -Protein, so dass seine Aktivierung durch seinen Liganden Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt [1.2]. In transfizierten HeLa-Zellen konnte aber auch eine Phosphorylierung von ERK beobachtet werden, die durch G-Proteine der Familie G_i/G_o vermittelt wurde⁹⁷. Nach der Aktivierung der G-Protein-abhängigen Signalwege wird der GLP-2R inaktiviert und internalisiert, wobei die Internalisierung Clathrin-unabhängig und „*Lipid-raft*“-abhängig erfolgt⁹⁸. Im Gegensatz zu anderen GPCRs scheint der intrazelluläre C-Terminus des GLP-2R sowohl für den cAMP- und ERK-Signalweg als auch für die Rezeptor-Endozytose allerdings eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine fast vollständige Deletion dieser Domäne führte lediglich zu einer gestörten Rekrutierung des β -Arrestin2 zum GLP-2R an die Plasmamembran, was auf eine β -Arrestin2-unabhängige Internalisierung des GLP-2R hindeutet⁹⁹.

Obwohl das Gen des GLP-2R, wie das des SCTR, aus 13 Exons aufgebaut ist, konnten bisher keine Splicevarianten nachgewiesen werden⁷².

1.8 Glucagon-like peptide-2 (GLP-2)

1.8.1 Physiologie des GLP-2

Das humane Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) entsteht aus dem Proglucagon-Gen, welches vor allem in pankreatischen A-Zellen und intestinalen L-Zellen exprimiert wird. Eine niedrigere Expression erfolgt jedoch auch in Neuronen des Hypothalamus und des Hirnstamms¹⁰⁰. Die posttranslationale Prozessierung des Proglucagons durch Enzyme der Prohormonkonvertase-Familie führt zur Generierung von Gewebe-spezifischen Peptiden. In den pankreatischen A-Zellen wird vor allem Glucagon gebildet, in den intestinalen L-Zellen dagegen GLP-1 und GLP-2 zu gleichen Anteilen. Weitere aus dem Proglucagon-Gen gebildete Peptide sind das Glicentin, das „*glicentin related pancreatic peptide*“ (GRPP) und das Oxyntomodulin¹⁰¹.

Auslöser für die Sekretion des GLP-2 aus den intestinalen L-Zellen sind die luminalen Nährstoffe des Darms, vor allem langkettige Fettsäuren im Bereich des terminalen Ileum^{101,102}. GLP-2 induziert anschließend die Proliferation der Kryptenzellen der intestinalen Mukosa, wodurch unter anderem die Absorptionsfähigkeit von Nährstoffen verbessert wird. Es wird jedoch vermutet, dass

dies durch einen indirekten Mechanismus ausgelöst wird, da GLP-2 die Produktion des „*insulin-like growth-factor-I*“ (IGF-I) in den perikryptischen Fibroblasten und des „*keratinocyte growth factor*“ (KGF) in den subepithelialen Myofibroblasten fördert^{103,104}.

Neben den proliferativen Effekten konnte auch eine direkte Hemmung der Apoptose durch GLP-2 beobachtet werden. Genauer gesagt kommt es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Inhibition des proapoptotischen Moleküls Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3), in Fibroblasten zu einer Inhibition von Bad und in neonatalen Schweinen konnte eine erhöhte Bcl-2 Expression nachgewiesen werden^{105,106}.

Neben der vorteilhaften Wirkung des GLP-2 in absorptiven gastrointestinalen Erkrankungen birgt eine Stimulation der Proliferation und Inhibition der Apoptose jedoch die Gefahr einer Tumorfördernden Wirkung. Während *in vitro* Daten an kolorektalen Zelllinien zum Teil dagegen sprechen, konnte in Mausmodellen ein erhöhtes Tumorwachstum durch GLP-2 gezeigt werden¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

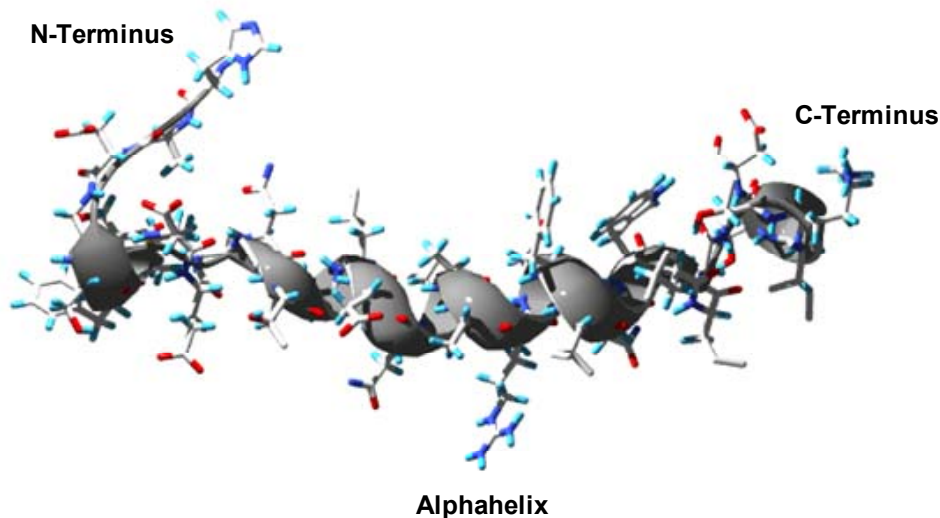


Abbildung 6: NMR-Struktur des GLP-2 in TFE-H₂O. Eine der zehn NMR-Strukturen des GLP-2 in einem Trifluoroethanol (TFE)-H₂O Gemisch von Venetti et al⁴¹ (PDB 2L63). Der unstrukturierte bzw. locker helikale N-Terminus befindet sich links im Bild, von Phe6 bis Ile27 schließt sich die Alpha-Helix des GLP-2 an, die in einem wiederum unstrukturierten extremen C-Terminus endet. Die graphische Bearbeitung der pdb-Daten erfolgte mit dem Deep View/Swiss-pdb Viewer und POV-Ray.

1.8.2 Struktur des GLP-2

Das Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) besteht aus 33 Aminosäuren, die in ihrer Zusammensetzung einem typischen GPCR Klasse B-Peptid entsprechen [Abb.5]. Anfang 2011 wurden erstmals NMR-Strukturen des GLP-2 veröffentlicht [Abb.6]. In einer Trifluoroethanol (TFE)-H₂O Mischung bildet das GLP-2 dabei von Phe6 bis Ile27 eine Alpha-Helix. Der C-Terminus ist dagegen nur locker helikal, der N-Terminus bis Ser5 unstrukturiert (PDB 2L63). In zwitterionischen Micellen, einer Zellmembran-ähnlichen Umgebung, bildet sich die Alpha-Helix zwischen Phe6 und Asn24 und von Asn24 bis Gln28 besteht eine locker helikale Struktur (PDB 2L64)⁴¹.

Diese Struktur entspricht weitestgehend den bisherigen Annahmen durch frühere NMR-Strukturen verwandter Peptide. Daher lässt sich auch das GLP-2 in zwei funktionelle Domänen einteilen, die

für die Rezeptoraktivierung von Bedeutung sind. Der C-terminale Teil, Leu17 bis Asp33, steht mit der ECD des Rezeptors in Kontakt und bewirkt die hochaffine Bindung. Der N-Terminus des GLP-2 interagiert dagegen mit dem Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen des Rezeptors und löst dabei seine Aktivierung aus⁴¹.

1.8.3 Varianten des GLP-2

Per Infusion verabreichtes humanes GLP-2 hat lediglich eine Halbwertszeit von etwa sieben Minuten, danach ist es als GLP-2(3-33) im Blut nachweisbar, das durch die Abspaltung der ersten beiden Aminosäuren durch die Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV) entsteht¹¹¹⁻¹¹³. GLP-2(3-33) ist allerdings nur ein extrem schwacher partieller Agonist und verdrängt das GLP-2 kompetitiv antagonistisch vom GLP-2R⁴⁵. Daher könnte es im menschlichen Körper nicht nur ein Abbauprodukt sein, sondern auch eine regulatorische Funktion zur Beendigung der GLP-2-Aktivität besitzen.

Mit der Klonierung des GLP-2R wurden die ersten Variationen am GLP-2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Deletionen am C-Terminus von bis zu vier Aminosäuren die Aktivität *in vitro* und *in vivo* kaum beeinflussen. Deletionen am N-Terminus des GLP-2 führten dagegen zu einem größeren Verlust der Aktivität, eine Bindung an den GLP-2R konnte jedoch noch beobachtet werden⁹⁶. Weitere Arbeiten zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung des GLP-2 stammen aus dem Jahr 2000. DaCamba et al. substituierten verschiedene Aminosäuren des GLP-2 und bestimmten die Bindung an den GLP-2R und die Fähigkeit zur Anregung des cAMP-Signalwegs. Die Arbeiten konzentrierten sich zunächst auf das Alanin an Position 2 des GLP-2, welches die Spaltstelle für die DPP-IV darstellt. Die Substitution durch Glycin zeigte sich dabei resistent gegenüber der Degradierung durch die DPP-IV, zeigte ansonsten aber gleiche Eigenschaften wie das native GLP-2^{112,114}. Das GLP-2(Gly2) trägt mittlerweile den Namen Teduglutide (NPS Pharmaceuticals, Bedminster (USA)) und befindet sich in Phase III-Studien zur Therapie des Kurzdarmsyndroms, einer absorptiven Störung des Dünndarms. Durch seinen positiven Effekt auf die Proliferation der mukosalen Kryptenzellen führt GLP-2 bzw. GLP-2(Gly2) bei diesen Patienten zu einer Verbesserung der intestinalen Absorption [1.8.1]^{115,116}.

Daneben substituierten DaCamba et al. jede Aminosäure des GLP-2 durch Alanin und untersuchten die Bindung der Varianten an den GLP-2R und die ausgelöste cAMP-Bildung. Besonders empfindlich gegenüber der Substitution waren dabei His1, Asp3, Phe6, Met10, Leu17, Phe22, Trp25 und Lys30, woraus auf eine hohe Bedeutung dieser Aminosäuren für die Aktivierung des GLP-2R geschlossen werden kann¹¹⁴.

1.9 G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren der Klasse C

In die Klasse C der GPCRs gehören verschiedene Pheromon-, Vomeronasal- und Geschmacksrezeptoren, darunter die *Calcium-Sensing*-Rezeptoren (CaSR) und die metabotropen GABA_B- und Glutamat-Rezeptoren. Wie alle GPCRs bestehen auch die Rezeptoren der Klasse C aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, sieben Transmembrandomänen und einer C-terminalen intrazellulären Domäne. Charakteristisch für die GPCRs der Klasse C ist ihr extrem langer N-Terminus, der bis zu 600 Aminosäuren lang sein kann und über eine Cystein-reiche

Verbindungssequenz an die Transmembrandomänen anschließt. Die Liganden-Bindungsdomäne befindet sich im N-Terminus des Rezeptors und wird auch als „*venus flytrap domain*“ bezeichnet, da sie sich nach der Bindung des Liganden schließt^{117,118}.

1.10 Expression und Funktion von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren im Tumor

G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren sind grundsätzlich in jeder Zelle zu finden, wobei jede Zelle, entsprechend ihrer Funktion im Organismus, ihr eigenes Repertoire an GPCRs exprimiert. Während der Transformation in eine Tumorzelle werden unterschiedliche zelluläre Prozesse verändert, darunter auch die Expression mancher GPCRs. So konnte unter anderem in Tumoren der Lunge, der Brust, der Prostata, des Magens und der Haut eine erhöhte Expression bestimmter GPCRs gefunden werden¹¹⁹. Die Überexpression des Somatostatinrezeptor Typ 2 (SSTR2) in neuroendokrinen Tumoren wird beispielsweise diagnostisch verwendet, um die Tumoren mit einem radioaktiv markierten Peptidliganden (Octreotid) zu detektieren¹²⁰ [1.11.1].

Die Funktion von über- oder unterexprimierten GPCRs in Tumorzellen ist sehr divers und konnte bisher nur in Einzelfällen geklärt werden. Einige GPCRs sind in der Lage, Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu modulieren. So führt die Stimulation von Thrombin- und Endothelin-Rezeptoren über die autokrine und parakrine Freisetzung von „*epidermal growth factor*“ (EGF)-ähnlichen Liganden zur Transaktivierung des „*epidermal growth factor receptor*“ (EGFR)^{121,122}. Die übermäßige Aktivierung dieses Signalwegs fördert so das Tumorwachstum. Eine ähnliche Transaktivierung konnte kürzlich auch für den „*insulin like growth factor I receptor*“ (IGFR) gezeigt werden¹²³. Viele GPCRs sind außerdem an der Regulation der Apoptose in Tumorzellen beteiligt. Eine übermäßige Aktivierung des „*lysophosphatic acid receptor*“ (LPA)-Signalwegs verringert zum Beispiel die nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors p53 und schützt dadurch Tumorzellen der Lunge vor der Apoptose¹²⁴.

1.10.1 Expression des Secretinrezeptors in Normal- und Tumorgewebe

Die Klonierung des humanen SCTR erfolgte 1995 aus einer Pankreaskarzinomzelllinie⁵³, in späteren Untersuchungen konnte die SCTR-Expression im Pankreas auf die duktafen und azinären Zellen eingegrenzt werden. In pankreatischen Inseln wurde dagegen keine Expression des SCTR nachgewiesen^{94,125,126}. Weitere Publikationen beschreiben die Expression des SCTR unter anderem in den Cholangiozyten der Leber¹²⁷, der Fundusmembran des Magens¹²⁸, im Dünndarm, in der Milz⁸³, in der Niere und Nebenniere^{83,129,130}, den Hoden und Nebenhoden^{83,131}, im Fettgewebe¹³² und in verschiedenen Hirnstrukturen^{83,133,134} [Tabelle (Tab.)1].

Die ersten Daten über die Expression des SCTR im Tumor stammen aus dem Jahr 1997. Tang et al. wiesen die Bindung eines radioaktiv markierten Secretins an fünf von zwölf pankreatischen Adenokarzinomen nach, wobei alle tumorfreien Gewebe ebenfalls Secretin binden konnten¹³⁵. In einer weiteren Arbeit konnte der SCTR ebenfalls autoradiographisch in 52 % der verwendeten pankreatischen Adenokarzinomproben nachgewiesen werden. Die Autoren betonen jedoch, dass die SCTR-Dichte im Vergleich zum Normalgewebe verringert ist. Eine hohe SCTR-Dichte fanden sie dagegen in 89 % der untersuchten Gastrinome, einer Unterart der pankreatischen neuroendokrinen Tumore¹²⁶. Eine SCTR-Überexpression konnte außerdem in bronchopulmonalen

Karzinoiden der Lunge, nicht aber in Kleinzelligen- bzw. Nichtkleinzelligen Karzinomen nachgewiesen werden⁷⁶. Hepatozelluläre Tumore erwiesen sich als SCTR-negativ, während Cholangiokarzinome der Leber den SCTR in 63 % der untersuchten Proben exprimierten¹³⁶.

Gewebe	Spezies	Methode	Referenz
Pankreas, duktales/azinäre Zellen	Human Ratte	Autoradiographie RT-PCR	94,125,126
Leber, Cholangiozyten	Human Ratte	Northern Blot Autoradiographie RT-PCR	127,136
Magen	Ratte Maus	Autoradiographie RT-PCR	128,132
Dünndarm	Human	Northern Blot	83
Milz	Human	Northern Blot	83
Niere	Maus Ratte	Immunhistochemie Autoradiographie	130,137
Nebenniere	Maus	RT-PCR	132
Hoden	Human	Northern Blot	83
Nebenhoden, Hauptzellen	Ratte	Immunhistochemie RT-PCR	131
Gehirn: Medulla, Cerebellum, Hippocampus	Human Ratte	Northern Blot In situ Hybridisierung Immunhistochemie Autoradiographie	83,133,134
Fettgewebe	Maus	RT-PCR	132
Tumorgewebe	Spezies	Methode	Referenz
Pankreas, duktales Adenokarzinom	Human	Autoradiographie	126
Leber, Cholangiokarzinom	Human	Autoradiographie RT-PCR	136
Pankreas, Gastrinom	Human	Autoradiographie	126
Lunge, Carcinoid	Human	Autoradiographie	76

Tabelle 1: Übersicht der Expression des SCTR in Normal- und Tumorgeweben.

Bei der Betrachtung dieser Daten muss jedoch erwähnt werden, dass der SCTR nur in den wenigsten Untersuchungen immunhistochemisch über Antikörper-Bindung nachgewiesen wurde. Meist wurde in der Autoradiographie die Bindung eines radioaktiv markierten Secretins am Gewebe untersucht oder die mRNA des SCTR durch PCR- oder Northern Blot-Analysen detektiert [Tab.1].

1.10.2 Expression des Glucagon-like peptide-2-Rezeptors in Normal- und Tumorgewebe

Die ersten Daten zur Expression des GLP-2R wurden durch Northern Blot-Analysen aus Mausgeweben gewonnen [Tab.2]. Dabei zeigte sich, dass der GLP-2R in den gastrointestinalen Geweben Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon vorhanden ist. Die meisten anderen Organe wie Ösophagus, Leber, Pankreas, Herz, Lunge, Niere, Hoden, Uterus, Speicheldrüse und Skelettmuskel erwiesen sich als negativ. In der Ratte konnte die mRNA des GLP-2R durch RT-PCR auch in Hypothalamus und Hirnstamm und, im Gegensatz zur Maus, auch in der Lunge nachgewiesen werden¹³⁸.

Gewebe	Spezies	Methode	Referenz
Magen	Maus	Northern Blot	138
Duodenum	Maus	Northern Blot	138
Jejunum	Maus	Northern Blot	138
Ileum	Maus	Northern Blot	138
Dünndarm, enteroendokrine Zellen	Human Schwein	Immunhistochemie	138,140
Kolon	Maus	Northern Blot	138
Kolon, enteroendokrine Zellen	Human	Immunhistochemie	138
Pankreas, A-Zellen	Ratte	Immunhistochemie	139
Hypothalamus / Hirnstamm	Ratte	RT-PCR	138
Zervix	Human	Immunhistochemie RT-PCR	97
Auge	Maus	RT-PCR	132
Tumorgewebe	Spezies	Methode	Referenz
Intestinales Karzinoid	Human	Immunhistochemie Northern Blot	138
Zervix, Adenokarzinom	Human	Immunhistochemie	97

Tabelle 2: Übersicht der Expression des GLP-2R in Normal- und Tumorgewebe.

Immunhistochemische Nachweise des Rezeptors selbst wurden bisher vor allem an gastrointestinalen Geweben durchgeführt. Dabei konnte der GLP-2R zusammen mit Proglucagon in den A-Zellen des Pankreas kolokalisiert werden¹³⁹. Im Dünndarm exprimierten vor allem die subepithelialen Myofibroblasten im proximalen Anteil den GLP-2R¹⁰⁴, andere Publikationen beschreiben jedoch nur einen kleinen Teil der enteroendokrinen Zellen in Dün- und Dickdarm als GLP-2R-positiv¹³⁸. Innerhalb dieser Experimente konnte auch eine Kolokalisation des GLP-2R mit Serotonin gezeigt werden¹⁴⁰. Einzelne GLP-2R-positive Zellen konnten außerdem in einem intestinalen Karzinoid nachgewiesen werden¹³⁸. Zudem wurde die mRNA des GLP-2R in der Zervix und in zervikalen Tumoren gefunden, wobei deren Bedeutung in diesem Gewebe bisher unklar ist⁹⁷ [Tab.2].

In Zelllinien konnte eine endogene GLP-2R-Expression bisher nur schwer nachgewiesen werden. HeLa-Zellen scheinen den GLP-2R nur vereinzelt zu exprimieren und auch die fetale Kolonzelllinie FHC zeigte nach GLP-2-Zugabe nur eine sehr schwache Aktivierung des cAMP-Signalwegs^{97,141}.

1.11 Peptid-basierte Entwicklung von Medikamenten

Der pharmazeutische Markt für Peptid-basierte Medikamente hat in den letzten Jahren einen enormen Zuwachs erfahren. Im Jahr 2009 befanden sich etwa 67 Peptide auf dem Markt, 150 in der klinischen Entwicklung und etwa 400 in fortgeschrittenen präklinischen Studien¹⁴². Damit stellen sie zwar immer noch einen sehr kleinen Teil aller zugelassenen Medikamente dar, im Vergleich zu anderen Substanzen wächst der Markt für Peptide allerdings fast doppelt so schnell¹⁴³. Dies mag vor allem an den mittlerweile stark verbesserten und damit kostengünstigeren Synthesebedingungen für Peptide liegen.

Name	Ziel-GPCR	Verwendung	Entwicklung	Referenz
Degarelix	GnRHR	Prostatakarzinom	zugelassen	146
Icatibant	B2R	Hereditäres Angioödem	zugelassen	147
Octreotid	SSTR2/5	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NET) Akromegalie	zugelassen	120,148,149
Teduglutide	GLP-2R	Kurzdarmsyndrom	Phase III	115

Tabelle 3: Ausgewählte Peptid-basierte Medikamente, die ihre Funktion an GPCRs ausüben. GnRHR: Gonadotropin releasing hormone-Rezeptor, B2R: Bradykinin B2-Rezeptor, SSTR2/5: Somatostatinrezeptor Typ 2/5, GLP-2R: Glucagon-like peptide-2-Rezeptor

Im Vergleich zu anderen Substanzen haben Peptide deutliche Vorteile: sie sind in der Regel hochaktive Substanzen, die in kleinen Mengen wirken können und eine hohe Spezifität für ihre Zielmoleküle besitzen. Die Bandbreite möglicher Zielmoleküle ist dabei äußerst hoch. Neben diversen Rezeptoren an der Zelloberfläche sind bestimmte Peptide auch in der Lage die Zellmembran zu überwinden („*cell penetrating peptides*“), um an intrazelluläre Zielmoleküle zu binden¹⁴⁴. Dadurch sind Peptide grundsätzlich sehr vielseitig einsetzbar. Weil sie selbst, und auch ihre Abbauprodukte, eine geringe Toxizität aufweisen, ist das Risiko für mögliche Nebenwirkungen vergleichsweise gering. Die größte Schwierigkeit in der Entwicklung von Peptid-basierten Medikamenten liegt allerdings in der Stabilität der Peptide, da sie oft durch endogene Peptidasen frühzeitig abgebaut werden. Dieser Nachteil kann jedoch in vielen Fällen durch eine Optimierung der Peptidsequenz minimiert werden^{143,145}.

Wie schon zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, sind die verschiedenen GPCRs wichtige Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente, da sie zum einen in vielen Krankheitsprozessen eine Rolle spielen und zum anderen viele extrazelluläre Signale in das Innere von Zellen übertragen [1.1]. Neben den in dieser Arbeit verwendeten GPCRs SCTR und GLP-2R haben auch viele weitere GPCRs Peptide als natürliche Liganden. Diese natürlichen Liganden bilden in den meisten Fällen den Ausgangspunkt für die Entwicklung von Peptid-basierten Medikamenten gegen ihren GPCR.

Durch systematische Substitutionen oder Deletionen in einer Peptidbibliothek (d.h. eine größere Anzahl von ähnlichen Peptid-Varianten, die gemeinsam in einem Syntheseansatz erzeugt wurden) lassen sich erste Aussagen über die Rolle der einzelnen Aminosäuren im Peptid treffen, auf deren Basis anschließend aufgebaut werden kann.

Ein erstes Ziel ist oft die Entwicklung einer stabilisierten Peptid-Variante. Dies kann beispielsweise durch die Substitution von jenen Aminosäuren erreicht werden, die Bestandteil einer Peptidasen-Spaltstelle sind (Beispiel: Teduglutide [Tab.3]). Meist werden dafür D-Aminosäuren oder nicht-proteinogene Aminosäuren eingesetzt, da diese von humanen Peptidasen und Proteasen in der Regel nicht als Spaltstelle erkannt werden.

Auch für die Entwicklung von GPCR-Antagonisten lohnt sich die genauere Untersuchung des nativen Rezeptor-Agonisten. So kann beispielsweise versucht werden die GPCR-affine Domäne des Peptids zu erhalten, dabei jedoch gleichzeitig die aktivierende Domäne auszuschalten. Der Bradykininrezeptor 2 (B2R)-Antagonist Icatibant ist ein solches Dekapeptid, dessen Struktur der des Agonisten (Bradykinin) sehr ähnlich, gleichzeitig aber fünf nicht-proteinogene Aminosäuren enthält.

Allerdings geben diese Startstrategien lediglich Anhaltspunkte für die Entwicklung neuer Peptid-Varianten und lassen sich nicht verallgemeinern.

1.11.1 Peptide als Trägermoleküle für die zielgerichtete Tumordiagnostik und -therapie

Die Standardtherapie einer Krebserkrankung besteht zum heutigen Zeitpunkt aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie, entweder einzeln angewendet oder in Kombination. Während eine Operation zielgerichtet am Tumor erfolgt, trifft eine Bestrahlung meist nicht nur den Tumor, sondern auch umgebendes, gesundes Gewebe. Eine Chemotherapie ist sogar noch weniger spezifisch und hat einen zytotoxischen Einfluss auf alle Zellen des menschlichen Körpers, was in starken Nebenwirkungen für den Patienten resultiert. Aus diesem Grund ist eine gerichtete Therapie, die selektiv den Tumor schädigt, aber keine negativen Effekte auf das umgebende Gewebe hat, wünschenswert. Die Strategie dieser zielgerichteten Tumordiagnostik und -therapie setzt allerdings voraus, dass nur der Tumor entsprechende Zielmoleküle exprimiert, die mit einem dafür spezifischen Trägermolekül angegriffen werden können.

Während der Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle werden viele zelluläre Prozesse modifiziert, unter anderem auch die Expression von Oberflächenrezeptoren, z.B. GPCRs. So werden die Somatostatinrezeptoren der Subtypen 2 und 5 (SSTR2/5) in neuroendokrinen Tumoren verstärkt exprimiert während Brust- und Prostata Tumoren eine Überexpression der *Gastrin-releasing peptide* (GRP)-Rezeptoren zeigen^{150,151}. Das Prinzip der zielgerichteten Tumordiagnostik sieht die Bindung eines Trägermoleküls an diese überexprimierten Rezeptoren im Tumor vor, wobei die Trägermoleküle mit unterschiedlichen aktiven Substanzen gekoppelt werden können. Die radioaktive Markierung der Trägermoleküle erlaubt neben einer zielgerichteten Radiotherapie auch die nicht-invasive Diagnostik mit einem Positionen-Emissions-Tomographen (PET). Zusätzlich ist auch eine direkte Kopplung der Trägermoleküle an zytotoxische Substanzen zur zielgerichteten Chemotherapie denkbar.

Als potentielle Trägermoleküle wurden zunächst hauptsächlich Antikörper verwendet, da diese sich durch eine hohe Spezifität für ihr Zielmolekül auszeichnen¹⁵². Gleiches gilt jedoch auch für Peptide. Neben ihrer hohen Spezifität für das Zielmolekül sind sie kleiner als Antikörper und daher einfacher und günstiger zu produzieren und zu modifizieren¹⁵³ [1.11].

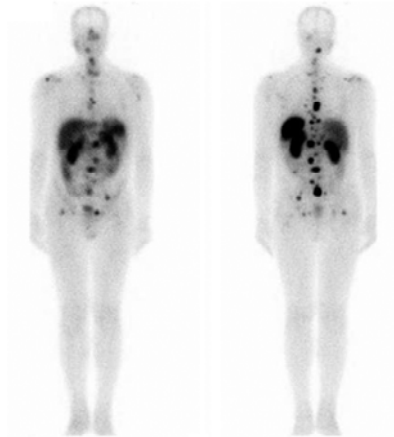


Abbildung 7: PET-Diagnostik mit [¹¹¹In]Pentreotide: Einer Patientin mit einem gastrointestinalen neuroendokrinen Tumor (NET) wurde [¹¹¹In]Pentreotide, eine Variante des Octreotids, injiziert und eine Positionen-Emissions-Tomographie (PET) durchgeführt. Dabei sind multiple Metastasen entlang der Wirbelsäule sichtbar. Graphik aus Bombardieri et al.¹⁵⁴

Ein bereits zugelassenes Trägerpeptid ist das Octreotid. Hierbei handelt es sich um eine stabilisierte Somatostatin-Variante, die an die überexprimierten SSTR2 und SSTR5 in neuroendokrinen Tumoren bindet. Durch die radioaktive Markierung des Octreotids ist die sensitive, nicht-invasive Diagnostik dieser Tumore und ihrer Metastasen mit einer PET-Untersuchung möglich^{120,148} [Abb.7]. Dies zeigt, dass das Prinzip der zielgerichteten Tumordiagnostik grundsätzlich funktioniert und dass dieses Prinzip auch für andere Tumortypen, z.B. die schwer zu diagnostizierenden Karzinome des Pankreas, einen medizinischen Fortschritt bedeuten würde.

1.11.2 Grundbegriffe der Rezeptorpharmakologie

In Abschnitt 11.1 wurden die grundsätzlichen Strategien im Entwicklungsprozess von Peptid-basierten Medikamenten erläutert. Im Optimierungsprozess eines Trägerpeptids müssen die entworfenen und synthetisierten Peptide in biologischen Systemen auf ihre Wirkung an ihrem Rezeptor untersucht werden. Um diese Zustände genau beschreiben und vergleichen zu können, werden verschiedene pharmakologische Begriffe verwendet, die in diesem Abschnitt näher erläutert werden sollen.

Abbildung 8 zeigt typische Konzentrations-Wirkungskurven beliebiger Liganden an ihrem Rezeptor. Dabei wird die experimentell ermittelte biologische Antwort eines Rezeptors gegen die logarithmisch dargestellte applizierte Ligandenkonzentration aufgetragen und eine logistische Regressionskurve erstellt [4.4.1]. Die Konzentration halbmaximaler Aktivität eines Liganden wird als EC₅₀ bezeichnet und als Maß für dessen Potenz herangezogen. Die Höhe der biologischen

Antwort, die je nach verwendeter Methode unterschiedlich ist, wird als intrinsische Aktivität (oder kurz: Aktivität) bezeichnet und als relativer Wert zum maximal erreichbaren Wert angegeben.

Als volle Agonisten bezeichnet man Liganden, die die maximal mögliche biologische Antwort auslösen. Partielle Agonisten hingegen lösen nur einen Teil der möglichen biologischen Antwort aus, wobei die EC_{50} davon nicht beeinflusst wird. Als neutrale Antagonisten werden Rezeptorbindende Liganden bezeichnet, die keine biologische Reaktion auslösen, diese bleibt auf dem basalen Aktivitätsniveau. Inverse Agonisten sind dagegen in der Lage eine umgekehrte biologische Reaktion auszulösen, d.h. das basale Aktivitätsniveau wird herabgesetzt. Eine anschließende Stimulation des Rezeptors mit einem Agonisten wird dadurch erschwert.

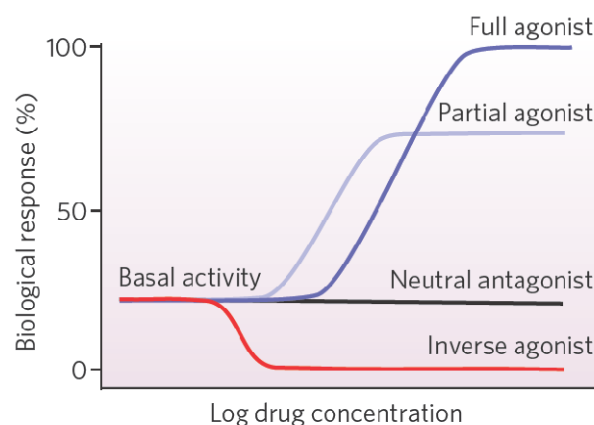


Abbildung 8: Grundbegriffe der Rezeptorpharmakologie. Liganden eines Rezeptors lassen sich in volle Agonisten, partielle Agonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten einteilen. Sie unterscheiden sich in der Höhe ihrer intrinsischen Aktivität, die durch die biologische Reaktion des Rezeptors in der verwendeten Methode ermittelt wird. Abbildung aus Rosenbaum et al.¹⁵⁵

1.11.3 Charakterisierung von GPCR-Liganden durch „High-Content-Analyse“

Die „*High-Content-Analyse*“ oder das „*High-Content-Screening*“ beschreibt als Überbegriff Methoden, die auf einem hochdurchsatzfähigen Fluoreszenzmikroskop und einer anschließenden Bildanalyse basieren. Diese Methoden haben gegenüber anderen Hochdurchsatzmethoden vor allem einen Vorteil: Durch die mikroskopische Betrachtung von Zellen lassen sich nicht nur Aussagen über einen gewünschten Parameter (z.B. die Lokalisation eines Fluoreszenz-markierten Proteins) machen, sondern auch weitere Aspekte (Zellform, Zellgröße, Zellzahl, etc.) berücksichtigen. Dadurch kann eine große Menge an Informationen aus einem einzelnen Versuch gezogen werden („*High-Content*“). Dieser große Informationsgehalt bringt jedoch mit sich, dass die *High-Content-Analyse* im Vergleich zu anderen verwendeten Hochdurchsatzmethoden (Reportergen-Systemen, FRET-Systemen, „*Calcium-Imaging*“) relativ langsam ist. Zusätzlich wird für die Speicherung und Analyse tausender hochauflösender Bilder eine große Festplatten- und Rechenkapazität benötigt¹⁵⁶. Ein deutlicher Vorteil der automatisierten Bildaufnahme und -analyse ist aber auch die objektive Betrachtung der Bilder, die im Gegensatz zur manuellen Mikroskopie nicht durch den Experimentator beeinflusst werden kann.

Der mögliche Einsatz der *High-Content-Analyse* ist sehr vielseitig. Die ersten hochrangigen Publikationen, die auf *High-Content-Analyse* basieren, sind in erster Linie groß angelegte RNAi-

Studien^{157,158}, während die pharmazeutische Industrie die *High-Content-Analyse* vor allem in Toxizitätsanalysen einsetzt^{159,160}. Hier hat die *High-Content-Analyse* klare Vorteile, da verschiedene Toxizitätsmarker innerhalb eines Versuchs miteinander kombiniert werden können (z.B. die Detektion eines apoptotischen Nukleus anhand seiner Größe bzw. Form in Kombination mit der Messung der Zellmembran-Integrität über Fluoreszenzfarbstoffe). Mit dem Trend zur vermehrten Verwendung von Stamm- und Primärzellen, die *in vitro* meist nur als Ko-Kulturen mit Fibroblasten zu halten sind, gewinnt die *High-Content-Analyse* zusätzlich an Bedeutung. Die Definition von Subpopulationen während der Bildanalyse macht die alleinige Betrachtung der Stamm- bzw. Primärzellen trotz der gleichzeitigen Anwesenheit von Fibroblasten möglich¹⁶¹.

Um GPCR-Liganden funktionell zu charakterisieren, wurden in den letzten zehn Jahren verschiedene Mikroskopie-basierte Methoden entwickelt. In ersten Experimenten wurde der gewünschte GPCR mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert und die Internalisierung des GPCRs nach der Applikation des Liganden in die Zelle beobachtet und quantifiziert¹⁶²⁻¹⁶⁴. Eine ähnliche Methode, die β -Arrestin2-GFP Translokation, wurde 1997 zum ersten Mal beschrieben¹⁶⁵. Dabei wird allerdings nicht der GPCR selbst, sondern das den Rezeptor nach seiner Aktivierung bindende β -Arrestin2 mit einem Fluoreszenzprotein markiert, welches mit dem GPCR internalisiert und in Vesikeln nachgewiesen werden kann. Dies macht die Methode universeller einsetzbar, da nicht jeder GPCR einzeln markiert werden muss. Heute ist die β -Arrestin2-GFP Translokation, die in dieser Arbeit als Methode erster Wahl verwendet und in Abschnitt 5.2.1 dieser Arbeit näher beschrieben wird, unter dem Namen *Transflour*[®] kommerziell vermarktet (Molecular Devices) und wird vereinzelt in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt¹⁶⁶⁻¹⁷². Daneben findet auch das sogenannte „*Single Cell Calcium Imaging*“, die Messung des Kalzium-Einstroms in das Zytoplasma einzelner Zellen nach der Aktivierung von GPCRs, und verschiedene Untersuchungen der MAPK-Signalwege immer mehr Anwender^{173,174}.

2 Zielsetzung

Die erfolgreiche Therapie einer Krebserkrankung ist häufig von einer rechtzeitigen Diagnose und dem damit verbundenen frühzeitigen Behandlungsbeginn abhängig. Dies ist klinisch jedoch für viele Tumortypen noch immer eine Herausforderung.

Für die seltenen neuroendokrinen Tumoren konnte die nicht-invasive, hochempfindliche Diagnostik bereits klinisch etabliert werden, wobei die in diesen Tumoren auftretende Überexpression der Somatostatinrezeptoren Typ 2 und Typ 5 (SSTR2/5) ausgenutzt wird. Die Detektion der Tumoren erfolgt dabei durch eine stabilisierte, radioaktiv-markierte Somatostatin-Variante (Octreotid) in der Positronen-Emissions-Tomographie.

Der klinische Erfolg dieser Methode war die Motivation der vorliegenden Arbeit: die Entwicklung eines ähnlichen GPCR/Liganden-Systems zur frühzeitigen Detektion anderer Tumortypen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher die Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) im Normal- und Tumorgewebe untersucht werden. Den Schwerpunkt bildeten dabei die GPCRs der Klasse B, da sie alle über Peptidliganden verfügen. Es sollte geklärt werden, ob bestimmte GPCRs eine verstärkte Expression im Tumorgewebe zeigen und sich daher als molekulare Zielstrukturen für die gerichtete Tumordiagnostik eignen könnten.

Anhand der ermittelten GPCR-Expressionsdaten sollten anschließend die entsprechenden Peptidliganden, in dieser Arbeit Secretin und GLP-2, im Hinblick auf eine zielgerichtete Tumordiagnostik als Trägerpeptid optimiert werden. Die natürlichen Peptidliganden von GPCRs eignen sich in den meisten Fällen nicht direkt als Trägerpeptid zur Detektion von Tumoren, da sie häufig eine niedrige Stabilität im Serum aufweisen und/oder zu unspezifisch für die gewünschte Zielstruktur sind. Aus diesem Grund ist es nötig, Peptide mit verbesserten Eigenschaften bezüglich ihrer Größe, Aktivität und Stabilität zu selektieren. Zu diesem Zweck sollte zunächst eine hochdurchsatzfähige Methode etabliert werden, um in kurzer Zeit eine große Zahl an Peptidvarianten *in vitro* untersuchen zu können.

In diese Untersuchungen sollten sowohl agonistische als auch antagonistisch wirkende Peptide einbezogen werden, da bisher nicht endgültig geklärt werden konnte welche der beiden Liganden-Gruppen als molekulares Trägerpeptid besser geeignet ist. Neben dieser Optimierung sollten gleichzeitig die für den Agonismus als auch die für den Antagonismus wichtigen Aminosäuren der Peptide identifiziert werden.

Am Ende der vorliegenden Arbeit sollte/n neben der Identifizierung eines im Tumor verstärkt exprimierten Ziel-GPCRs ein oder mehrere Peptid/e entwickelt worden sein, die im Anschluss in einem bereits etablierten *in vivo*-Mausmodell auf ihre Bindung an subkutane und orthotope Tumoren untersucht werden können.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ampicillin (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure-1-Hydrat	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
6 x DNA Loading Dye	Fermentas, St.Leon-Rot
Essigsäure	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	J.T.Baker, Deventer (NL)
Ethanol 100 % (MEK)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Fluo-4, AM	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Formaldehyd 4%	Herbeta Arzneimittel, Berlin
GloSensor™ cAMP Reagent	Promega, Madison (USA)
D-(+)-Glucose, wasserfrei	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
IDCC (7-Diethylamino-3-(((2-iodoacetamido)-ethyl)-amino)carbonyl)coumarin)	Mivenion GmbH, Berlin
Isopropanol	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
jetPEI, Transfektionsreagenz	Polyplus Transfection, Illkirch Cedex (F)
Kaliumalaunsulfat (KAl(SO ₄) ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
LB-Agar	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe

Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Natriumjodat (NAJO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Probenicid	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Rotihistol	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Rotiphorese [®] 10x SDS-PAGE	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
SuperSignal Ultra [®] West Dura Extended Duration Substrat	Thermo Scientific, Rockford (USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Tricine	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Tween 20	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Ziegenserum	Invitrogen, Carlsbad (USA)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96well-Platten, runder Boden	Greiner bio-one, Kremsmünster (A)
Blottingpapier	GE Healthcare, Waukesha (USA)
Chirurgische Einmalskalpelle	Feather
Nitrocellulose – Transfermembran	GE Healthcare, Waukesha (USA)
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney, Chicago (USA)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Einmal-Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
ProxiPlate-384 Plus, weiß	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Reagenz Reservoir	Corning, Amsterdam (NL)
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhrchen 2 ml, Cryo	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhrchen 15 ml	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Schraubröhrchen 50 ml	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturplatten standard (6-, 12-, 24-, 96 well)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturplatten Microtest Optilux 96 well	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturplatten 96 well, weiß	Corning, Amsterdam (NL)
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)

3.3 Kits

Kit	Hersteller
AB-Komplex-Kit	Vector, Burlingame (USA)
LANCE™ cAMP 384 kit	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Liquid DAB+ Substrat Chromogen System	Dako, Hamburg
NucleoBond® Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

3.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Steri-Cult 3308	Thermo Scientific, Waltham (USA)
CellLux, Cellular Imaging System	Perkin Elmer, Waltham (USA)
DNA-Agarosegel-Systeme	Peqlab, Erlangen
Einfrühbehälter für die Zellkultur „Mr.Frosty“	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
EnVision 2103 Multilabel Reader	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Gelelektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories , Hercules (USA)
Kühlschrank, 4°C	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
IN Cell Analyzer 1000	GE Healthcare, Waukesha (USA)
KinedX Laborroboter	Peak Robotics, Colorado Springs (USA)
Magnetrührer	IKA, Staufen
Microplate Washer ELx405 Select CW	BioTek, Winooski (USA)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axio Observer.Z1	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellengerät	MDA
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetboy acu	Integra, Fernwald
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (0,5-10 µl ; 10-100 µl ; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipette 8-Kanal, 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 8-Kanal, 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 12-Kanal, 30-300 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 12-Kanal, 20-200 µl	Abimed GmbH, Langenfeld
Power Supply: PowerPac Basic / PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories , Hercules (USA)

Schüttler WT16	Biometra, Göttingen
Sciclone ALH3000 Workstation	Caliper Life Sciences, Hopkinton (USA)
Sicherheitswerkbank Lamin Air HB2448	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 3722L	Fisher Scientific, Waltham (USA)
Transferpette® 8-Kanal 20-200 µl	Brand GmbH+CO KG, Wertheim
Twister Plate Handler	Caliper Life Science, Hopkinton (USA)
VersaDoc	Bio-Rad Laboratories , Hercules (USA)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waage	Kern
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wet-Blot Kammern	Bio-Rad Laboratories , Hercules (USA)

3.5 Puffer

Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzen	2 %	BSA in PBS
Blockierungspuffer für Western Blot	2 %	Magermilchpulver in PBS
C1	130 mM 5 mM 10 mM 2 mM 10 mM	NaCl KCl Na-HEPES CaCl ₂ Glucose
Citratpuffer für Immunhistochemie, pH 6,0	10 mM	Citronensäure-1- Hydrat
Equilibrierungspuffer für GloSensor™	88 % 10 % 2 %	HBSS FCS GloSensor™ Substrat
Hämalaun nach Mayer	1 g 0,2 g 50 g 50 g 1 g ad 1 l	Hämatoxylin Natriumjodat Kaliumalaunsulfat Chloralhydrat Citronensäure-1- Hydrat dH ₂ O
Lysis - Puffer	100 mM 1 %	Tris, pH 8,4 SDS

PBS	8 g 0,2 g 2,72 g 0,24 g ad 1 l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ dH ₂ O
Permeabilisierungspuffer für Immunfluoreszenz	0,1 % 0,01 %	Triton X-100 5 mg / ml DAPI in PBS
5 x SDS-PAGE Probenpuffer	250 mM 5 % 45 % 500 mM 0,12 %	2 M Tris pH 6,8 SDS Glycerol DTT Bromphenolblau
SDS-PAGE Top Puffer, pH 8,25	0,1 M 0,1 M 0,1 %	Tris Tricine SDS
SDS-PAGE Bottom Puffer, pH 8,8	0,2 M	Tris
50 x TAE, pH 8,0	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1 l	Tris Essigsäure 0,5 M EDTA, pH 8,0 H ₂ O
Transfer Puffer für Western Blot	100 ml 200 ml ad 1 l	Rotiphorese® 10x SDS-PAGE Ethanol 96% vergällt H ₂ O

3.6 Wachstumsmedien und Reagenzien für die Säugerzellkultur

Einfriermedium	60 % Kulturmedium 30 % FCS 10 % DMSO
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
G418	Biochrom AG, Berlin
Glutamax	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Hank's Salt Solution (HBSS)	Biochrom AG, Berlin
Hygromycin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
McCoy's 5A Medium	Biochrom AG, Berlin

McCoy's 5A Medium, Vollmedium	500 ml	McCoy's 5A Medium
	50 ml	FCS
	5 ml	Glutamax
	5 ml	Penicillin / Streptomycin
PBS		Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin		Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640 Medium		Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640 Medium, Vollmedium	500 ml	RPMI 1400 Medium
	50 ml	FCS
	5 ml	Penicillin / Streptomycin
Tryptin/EDTA		Biochrom AG, Berlin
Zeocin		Invitrogen, Carlsbad (USA)

3.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

3.7.1 DNA-Oligonukleotide (Primer)

Nummer	Zielgen	Sequenz	Schnittstellen / Besonderheiten
AK-2 fw	SCTR	gat <i>gaa ttc</i> taa acc atg cgt ccc cac ctg tcg ccg c	<i>EcoRI</i>
AK-6 rev	SCTR	tcg <i>ctc gag</i> tca aat gca tct ctt cac aat gta gaa ggc gtc atc ctt gtc gat gat gct ggt cct gca g	<i>XhoI</i> / Epitop POL
AK-9 fw	GLP-2R	gat <i>gaa ttc</i> taa acc atg aag ctg gga gga tcg agc agg	<i>EcoRI</i>
AK-12 rev	GLP-2R	tcg <i>ctc gag</i> tca aat gca tct ctt cac aat gta gaa ggc gtc atc ctt gtc gat ctc act ctc ttc cag aat ctc	<i>XhoI</i> / Epitop POL
AK-22 fw	β -Arr2-GFP	gat <i>aag ctt</i> taa acc atg ggg gag aaa ccc ggg	<i>HindIII</i>
AK-24 rev	β -Arr2-GFP	tcg <i>ggt acc</i> tta tct aga tcc gga ctt gta tag	<i>KpnI</i>

3.7.1 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

Nukleinsäuren	Hersteller
dNTP-Mix	Peqlab, Erlangen
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot

3.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

Vektor	Herkunft
GloSensor™ 22F	Promega, Madison (USA)
pcDNA3.1	Invitrogen, Carlsbad (USA)
pcDNA4/TO	Invitrogen, Carlsbad (USA)
pcDNA3.1 GLP-2R	Missouri S&T cDNA Resource Center, (USA)
pcDNA3.1 SCTR	Missouri S&T cDNA Resource Center, (USA)
pcDNA3.1 VIP1R	Missouri S&T cDNA Resource Center, (USA)
pcDNA3.1 VIP2R	Missouri S&T cDNA Resource Center, (USA)
pGFP-N3 rat β -Arrestin2	Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin

Kloniertes Plasmid	Matrizen-DNA	Primer
pcDNA3.1 GLP-2R-POL	pcDNA3.1 GLP-2R	AK-9, AK-12
pcDNA3.1 SCTR-POL	pcDNA3.1 SCTR	AK-2, AK-6
pcDNA4/TO rat β -Arrestin2-GFP	pGFP-N3 rat β -Arrestin2	AK-22, AK-24

3.9 Proteine und Peptide

3.9.1 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (10 U/ μ l)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
PWO DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Restriktionsendonukleasen: EcoRI, HindIII, KpnI, XhoI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4 DNA-Ligase (4 U/ μ l)	New England Biolabs, Ipswich (USA)

3.9.2 Antikörper

Antikörper	Ergebnis der Validierung	Hersteller
α POL, monoklonal, Maus	bereits etabliert	AG Grötzinger, Charité, Berlin
α GLP-2R, polyklonal, Kaninchen	erkennt GLP-2R nicht	Millipore, Billerica (USA) (#AB9179)
α SCTR, polyklonal, Kaninchen	gut	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA) (#HPA007269)
α SCTR, polyklonal, Kaninchen	erkennt SCTR nicht	AbD Serotec, Düsseldorf (#0100-0178)
α SCTR, monoklonal, Maus	erkennt SCTR nicht	Abnova, Taipai City (Taiwan) (#H00006344-M01)
Ziege α Maus, POD	bereits etabliert	Dianova, Hamburg
Ziege α Kaninchen, POD	bereits etabliert	Dianova, Hamburg
Ziege α Maus, Cy3	bereits etabliert	Dianova, Hamburg
Ziege α Kaninchen, Cy3	bereits etabliert	Dianova, Hamburg
α Kaninchen IgG, biotinyliert	bereits etabliert	Vector, Burlingame (USA)

3.9.3 Proteine als Größenstandard

Protein	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot

3.9.4 Hochreine Peptide ($\geq 95\%$, HPLC gereinigt)

Name	Sequenz	Herkunft
Chemerin9-IDCC	*YFPGQFAFS	AG Henklein, Berlin
GLP-2	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	peptides&elephants, Potsdam
GLP-2(3-33)	DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	peptides&elephants, Potsdam
GLP-2-IDCC	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDK*	AG Henklein, Berlin
Secretin	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLQGLV	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Secretin-IDCC	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLQGLVK*SGS	peptides&elephants, Potsdam
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN	Jerini AG, Berlin
G01-R	WNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	JPT, Berlin
G02-R	MNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	JPT, Berlin
G03-R	WNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	peptides&elephants, Potsdam
G03-2-R	WNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	JPT, Berlin
G04-R	Acetyl-WNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	peptides&elephants, Potsdam
G05-R	WNAILDNLAARDFINWLIQTKITd	peptides&elephants, Potsdam
G06-R	WNTILDALAARDFINWLIQTKITD	JPT, Berlin
G07-R	WNAILDALAARDFINWLIQTKITD	JPT, Berlin
G08-R	YNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	JPT, Berlin
G09-R	YNAILDALAARDFINWLIQTKITD	JPT, Berlin
G10-R	2NaI- NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	peptides&elephants, Potsdam
S11-R	rFTSELSRLREGARLQRLQGLV	peptides&elephants, Potsdam
S11-2-R	rFTSELSRLREGARLQRLQGLV	JPT, Berlin
S12-R	rFTSELSRLREGARLQRLLAGLV	JPT, Berlin
S13-R	rFTSELSRLREGARLQRLQALV	JPT, Berlin
EP01650	CLQQLSKEKKGALGPETASGSEGLWDNMSC	peptides&elephants, Potsdam
EP01647	Dap-WDN-D (linear)	peptides&elephants, Potsdam
EP01648	Dap-LWDM-D (linear)	peptides&elephants, Potsdam
EP01649	Dap-WDN-D (cyclisch)	peptides&elephants, Potsdam

Bei allen natürlich vorkommenden Peptiden handelt es sich um die humane Sequenz. Alle Peptide wurden in 100 % DMSO gelöst. * = IDCC

3.9.5 Peptide, LIPS® Synthese

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Syntheseverfahren, um viele Peptide kostengünstig in kurzer Zeit zu synthetisieren. Dabei entstehen Peptidbibliotheken, die aus Syntheserohprodukten bestehen. Die meisten in dieser Arbeit beschriebenen Peptide [Ausnahmen siehe 3.9.4] wurden auf diese Weise synthetisiert (peptides & elephants, Potsdam). Aufgrund der großen Datenmenge sind sie zusammen mit den experimentellen Ergebnissen aufgelistet [Anhang: Tab.I-III]. Alle Peptide wurden in 100 % DMSO gelöst.

3.10 Zellen und Gewebe

3.10.1 Prokaryotische Zellen

Zelltyp	Hersteller
E.coli Top10, chemisch kompetent	Invitrogen, Carlsbad (USA)

3.10.2 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Spezies	Herkunft	Kulturmedium
BxPC-3	Human	Pankreas, Adenokarzinom	RPMI 1640, Vollmedium
Kyse410	Human	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	RPMI 1640, Vollmedium
U2OS	Human	Osteosarkom	McCoy's 5A, Vollmedium

Gentechnisch veränderte Zelllinien

Name	Zielzelle	Transfiziertes Plasmid	Resistenz
U2OS β A2-GFP	U2OS	pcDNA4/TO rat β -Arrestin2-GFP	Zeocin
U2OS β A2-GFP SCTR	U2OS β A2-GFP	pcDNA3.1 SCTR	Zeocin/G418
U2OS β A2-GFP GLP-2R	U2OS β A2-GFP	pcDNA3.1 GLP-2R	Zeocin/G418
U2OS β A2-GFP VIP1R	U2OS β A2-GFP	pcDNA3.1 VIP1R	Zeocin/G418
U2OS β A2-GFP VIP2R	U2OS β A2-GFP	pcDNA3.1 VIP2R	Zeocin/G418
U2OS β A2-GFP GCGR	U2OS β A2-GFP	pcDNA3.1 GCGR	Zeocin/G418
U2OS SCTR	U2OS	pcDNA3.1 SCTR	G418
U2OS GLP-2R	U2OS	pcDNA3.1 GLP-2R	G418
U2OS GloSensor™	U2OS	GloSensor™ 22F	Hygromycin
U2OS GloSensor™ SCTR	U2OS GloSensor™	pcDNA3.1 SCTR	Hygromycin/G418
U2OS GloSensor™ GLP-2R	U2OS GloSensor™	pcDNA3.1 GLP-2R	Hygromycin/G418

3.10.3 humane Gewebe, „Tissue Microarrays“ (TMA)

Name	Gewebeart	Quelle / Hersteller
Einzelne Gewebe	Verschiedene Organe	Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie, CVK, Charité, Berlin
TMA AccuMax A307	Pankreas-Tumore / Normalgewebe	BioCat, Heidelberg
TMA Biomax PA2081	Pankreas-Tumore / Normalgewebe	Biomax, Rockville (USA)
TMA BR7	Verschiedene Organe und Tumore	Super Bio Chips, Seoul (Korea)
TMA CR1	Ösophagus-Tumore	Super Bio Chips, Seoul (Korea)
TMA NET 1 – 12	Neuroendokrine Tumore	Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie, CVK, Charité, Berlin

3.11 Software

Software	Hersteller
Deep View / Swiss-PDB Viewer 4.0.1	http://spdbv.vital-it.ch/
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla (USA)
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html
IN Cell Developer Toolbox 1.8	GE Healthcare, Waukesha (USA)
IN Cell Investigator 3.6	GE Healthcare, Waukesha (USA)
Adobe Photoshop CS2	Adobe, San Jose (USA)
POV-Ray™	http://www.povray.org/
Spotfire DecisionSite 9.1.1	Tibco, Palo Alto (USA)
Vector NTI Advance 11	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Bei der aufgelisteten Software handelt es sich lediglich um die spezielle Software, die zur Auswertung und Bearbeitung der erzeugten Daten benötigt wurde.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigt werden. Durch die Verwendung modifizierter Primer können außerdem kurze DNA-Motive, zum Beispiel die Sequenz für das Epitop eines Antikörpers, in eine bestehende Sequenz eingefügt werden. Diese Technik wurde in dieser Arbeit verwendet, um die DNA-Sequenz des POL-Epitops an den C-Terminus des Secretin- bzw. GLP-2-Rezeptors anzufügen. Die dafür verwendeten Primer sind in [3.7.1] aufgelistet, die Reaktion erfolgte nach folgendem Ansatz:

Reaktionsansatz:

10 ng	Matrizen-DNA
0,05 pmol	Vorwärts-Primer
0,05 pmol	Rückwärts-Primer
80,5 µl	H ₂ O
10 µl	10x Reaktionspuffer für Pwo-Polymerase
1,5 U	Pwo-Polymerase

Programm:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1x	95°C	2 min
Denaturierung	30x	95°C	1 min
Anlagerung		50 - 61°C	1 min
Synthese		72°C	1 min 30 sec + 5 sec pro Zyklus
Synthese	1x	72°C	2 min
Ende der Synthese	1x	4°C	∞

4.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nach einer PCR [4.1.1] erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente über ein präparatives 1 %iges DNA-Agarosegel. Nach der Zugabe von 6 x DNA-Probenpuffer werden die DNA-Fragmente bei 100 V für etwa 40 min in einer Elektrophoresekammer nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Gel befindet sich dabei in 1x TAE-Puffer, zusätzlich wird Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Dieses lagert sich in die DNA-Fragmente ein und macht sie unter UV-Licht sichtbar. Neben den Proben wird ein DNA-Größenstandard verwendet, um die gewünschten DNA-Fragmente anhand ihrer Größe im Gel identifizieren zu können.

4.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

In einem präparativen DNA-Agarosegel [4.1.2] werden die gewünschten Banden auf einem UV-Tisch anhand ihrer Größe identifiziert und aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion der

reinen DNA erfolgt anschließend mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers. Die Elution erfolgt mit 30 µl H₂O.

4.1.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA-Moleküle können mit Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungssequenzen hydrolytisch gespalten werden. Diese Spaltungen sind nötig, um ein PCR-Produkt später in einen Vektor ligieren zu können [4.1.6]. In einem präparativen Verdau werden 5 µg DNA gespalten, in einem analytischen Verdau 0,1 – 0,5 µg DNA, der Reaktionsansatz erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers für das verwendete Enzym.

4.1.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nach einem Restriktionsverdau [4.1.4] muss die DNA wieder von den Enzymen getrennt und isoliert werden. Dafür kann erneut ein präparatives DNA-Agarosegel verwendet werden [4.1.2], in den meisten Fällen wird jedoch das QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 µl H₂O.

4.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

Nachdem das gewünschte DNA-Fragment und der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut [4.1.4] und aufgereinigt [4.1.5] worden sind erfolgt die Ligation. Dazu werden 100 – 200 ng des PCR-Produktes zusammen mit 25-50 ng des linearisierten Vektors nach Herstellerangaben in einem 20 µl Ansatz mit 400 U T4 DNA-Ligase für 1 h bei RT inkubiert. 1 µl dieses Ansatzes wird anschließend direkt zur Transformation chemisch kompetenter E.coli-Bakterien eingesetzt [4.1.7].

4.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Für die Transformation werden chemisch kompetente E.coli-Bakterien zunächst langsam aufgetaut, 1 µl des Ligationsansatzes [4.1.6] zugegeben und die Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Der folgende „*heat shock*“ für 60 sec bei 42°C bewirkt die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen. Anschließend werden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für etwa 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert, bevor sie auf einer LB-Agar-Platte, die das Vektor-spezifische Antibiotikum enthält, ausgestrichen werden.

4.1.8 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Isolation von Plasmid-DNA werden Bakterien, die die gewünschte Plasmid-DNA tragen, in 5 ml LB-Medium, dem das entsprechende Vektor-spezifische Antibiotikum zugesetzt wurde, über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die anschließende Isolation der Plasmid-DNA erfolgt mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 µl H₂O. Eine Kontrolle des entstehenden Produkts erfolgt mit einem analytischen Restriktionsverdau [4.1.4] und anschließendem DNA-Agarosegel [4.1.2].

Für die Isolation von Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab werden Bakterien in 500 ml LB-Medium, inklusive des Vektor-spezifischen Antibiotikums, über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die

Isolation der Plasmid-DNA erfolgt in diesem Fall mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Plus Kit nach Herstellerangaben, die Elution abschließend mit 500 µl H₂O. Die erhaltene DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt und die korrekte DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung [4.1.9] verifiziert.

4.1.9 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen in dieser Arbeit wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin) als „Barcode Sequencing“ mit Vektor-spezifischen Primern durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgt mit Vector NTI Advance 11.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Die Kultivierung aller humanen Zelllinien [3.10.2] erfolgt in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂. BxPC-3- und Kyse410-Zellen werden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin kultiviert, U2OS-Zellen in McCoy's 5A Medium, welches mit 10 % FCS, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin ergänzt wird. Die Passage der Zellen erfolgt alle 3 bis 5 Tage unter der Sicherheitswerkbank. Dafür wird das alte Medium abgenommen und der konfluente Zellrasen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, die Zellen in Vollmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Um die Zellen für Experimente zu verwenden, werden sie an dieser Stelle auf entsprechende Zellkulturplatten in der gewünschten Dichte ausgesät.

4.2.2 Konservierung von humanen Zelllinien

Zur Konservierung von Zellen über einen längeren Zeitraum müssen sie eingefroren werden. Dazu werden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen bis zum Erreichen einer etwa 90 %igen Konfluenz wachsen gelassen und dann wie bei der Kultivierung mit Trypsin/EDTA vom Boden gelöst [4.2.1]. Anschließend werden die Zellen bei 800 rpm für 3 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbleibenden Zellen werden in 3 ml Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml in ein steriles Kryoröhrchen überführt. Diese werden in einem speziellen Einfrierbehälter bei -80°C langsam eingefroren. Zur Konservierung über einen langen Zeitraum erfolgt die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, werden die eingefrorenen Zellen schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut und in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit Kulturmedium transferiert. Nach etwa 20 min bei 37°C sitzen U2OS-Zellen so fest auf dem Flaschenboden, dass ein Mediumwechsel erfolgen kann, um das für Zellen toxische DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. Beim Auftauen von Zellen, die weniger adhärent wachsen, muss das Einfriermedium durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt entfernt werden.

4.2.3 Transiente Transfektion von U2OS-Zellen

Um Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen wird deren negative Ladung durch Komplexbildung mit kationischen Lipiden maskiert. In dieser Form können sich die DNA-Lipidkomplexe an die Zellmembran anlagern und diese passieren, so dass eine Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen möglich wird. U2OS-Zellen werden einen Tag vor der Transfektion so umgesetzt, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von etwa 70 % aufweisen. Für die Transfektion einer 10 cm Schale werden 4 µg Plasmid-DNA mit 500 µl 150 mM NaCl gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß werden 8 µl jetPEI mit 500 µl 150 mM NaCl gemischt und zur Plasmid-DNA-Mischung gegeben. In einer Inkubationszeit von etwa 20 min bilden sich die DNA-Lipidkomplexe, die dann zusammen mit 10 ml serumfreien Medium auf die U2OS-Zellen gegeben werden. Etwa 2 h nach Transfektion wird das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. Die Expression der Proteine erfolgt über Nacht im Brutschrank bei 37°C.

4.2.4 Stabile Transfektion von U2OS-Zellen

Stabil transfizierte Zelllinien tragen die Plasmid-DNA im Vergleich zur transienten Transfektion in ihrem Genom integriert. Dadurch erhält man eine homogene Expression des gewünschten Proteins innerhalb der Zelllinie. Dies ist vor allem für die Reproduzierbarkeit quantitativer Messungen von Bedeutung.

Für eine stabile Transfektion wird eine 10 cm Schale von U2OS-Zellen analog der transienten Transfektion mit der gewünschten Plasmid-DNA und jetPEI transfiziert [4.2.3]. Dabei ist zu beachten, dass der DNA-Vektor zusätzlich zum codierenden Gen ein eukaryotisches Antibiotika-Resistenzgen tragen muss. Etwa 24 h nach der Transfektion erfolgt der Wechsel auf Selektionsmedium, dem neben den Standard-Mediumbestandteilen das dem Vektor entsprechende Antibiotikum zugesetzt wird. Dieses Medium bewirkt, dass nur die Zellen überleben, die die Antibiotika-Resistenz, und damit auch das gewünschte Protein, exprimieren. Die für die Selektion nötige Antibiotika-Konzentration variiert je nach Zelllinie und muss vor Versuchsbeginn ermittelt werden, für U2OS-Zellen wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Antibiotikum	Selektionskonzentration	Kulturkonzentration
G418 (Neomycin)	0,4 mg / ml	0,4 mg / ml
Hygromycin	0,1 mg / ml	0,1 mg / ml
Zeocin	0,4 mg / ml	0,4 mg / ml

In der folgenden Zeit wird alle 3-4 Tage das Selektionsmedium gewechselt und der Selektionsprozess beobachtet. Nach dem Absterben aller nicht-transfizierten Zellen werden die verbleibenden Zellen in 10 cm Schalen vereinzelt, so dass sich einzelne Zellklone bilden. Haben diese Klone eine gewisse Größe erreicht können sie isoliert werden. Die Lokalisation der Klone wird dabei am Plattenboden markiert, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend Trypsin/EDTA zugegeben. Der Prozess der Zellablösung wird dabei unter dem Mikroskop beobachtet und das Trypsin/EDTA entfernt, sobald eine vollständige Abkuglung der Zellen erreicht ist, sie aber noch auf der Platte haften. Die Klone werden dann einzeln mit einer

Pipettenspitze abgesaugt und in eine 96well-Platte transferiert und darin kultiviert. Bei Erreichen der vollständigen Konfluenz wird ein Teil der Zellen in eine weitere 96well-Platte überführt [4.2.1], in der anschließend die Expression des gewünschten Proteins überprüft wird. Die Klone, die das gewünschte Protein homogen exprimieren, werden selektiert und unter Standardbedingungen kultiviert [4.2.1], wobei stets eine Kulturkonzentration des Antibiotikums beibehalten wird, um die Proteinexpression aufrecht zu erhalten.

4.2.5 Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot

Zur Analyse im Western Blot [4.3.4] werden U2OS-Zellen, die in einer 6well-Platte konfluent wachsen, in 100 µl Lysis-Puffer aufgenommen und dabei vom Boden gelöst. Nach Überführung des Lysats in ein Reaktionsgefäß werden zusätzlich 25 µl eines 5x SDS-PAGE-Probenpuffers zugegeben und das Zelllysate für 10 min bei 99°C gekocht, wodurch die Proteine denaturiert werden. Die Zelllysate können anschließend mittels einer SDS-PAGE [4.3.3] aufgetrennt und durch einen Western Blot [4.3.4] analysiert werden.

4.3 Biochemische und immunologische Methoden

4.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Zur intrazellulären Lokalisation von Proteinen kann die indirekte Immunfluoreszenzanalyse genutzt werden. Dabei wird ein Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, mit einem weiteren, Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper, detektiert, dessen Lokalisation anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden kann.

Dazu werden native oder stabil transfizierte U2OS-Zellen 24 h vor dem Versuch in 96well-Platten ausgesät, so dass sie eine Konfluenz von etwa 70 % aufweisen. Bei zusätzlicher transienter Transfektion werden die Zellen an Tag 1 ausgesät, an Tag 2 transfiziert [4.2.3] und am Tag 3 die Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Dabei werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei RT in 4 % Formaldehyd fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS erfolgt bei Bedarf die Inkubation für 10 min bei RT in 0,1 % TritonX-100, dem zusätzlich DAPI in einer Konzentration von 0,25 µg/ml zugesetzt werden kann. Dadurch werden die Zellen permeabilisiert und gleichzeitig die Zellkerne angefärbt. Die Zellen werden anschließend erneut gewaschen und für mindestens 30 min mit einer 2 %igen BSA-Lösung in PBS blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Der erste Antikörper, der sich gegen das gewünschte Protein richtet, wird in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben.

Antikörper	Verdünnung
α POL, monoklonal, Maus	1 : 2.000 (0,89 µg/ml)
α SCTR, polyklonal, Kaninchen	1 : 200 (0,4 µg/ml)
Ziege α Maus, Cy3	1 : 2.500 (0,3 µg/ml)
Ziege α Kaninchen, Cy3	1 : 2.500 (0,3 µg/ml)

Nach weiterem zweimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Inkubation mit dem Fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper für eine weitere Stunde bei RT im Dunklen. Die Zellen werden abschließend weitere zwei Mal mit PBS gewaschen und mit etwa 50 µl PBS überschichtet. Die Aufnahme der Bilder erfolgt im IN Cell Analyzer 1000, einem automatisierten Fluoreszenzmikroskop. Dies hat den Vorteil, dass durch die maschinelle Bildaufnahme keine subjektiven Kriterien durch den Experimentator in die Bilder einfließen können.

4.3.2 Detektion von Proteinen in Paraffinschnitten

Für die Lokalisation von Proteinen in Gewebe wird die Immunhistochemie verwendet. Dafür sind dünne Gewebeschnitte nötig, die entweder in Paraffin oder bei -80°C konserviert sind. Diese werden mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert, der anschließend über einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise kann der Expressionsort eines Proteins im nativen Gewebe bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 2 µm dicke Paraffin-Gewebeschnitte verwendet, die entweder in der eigenen Arbeitsgruppe vorhanden waren oder käuflich erworben wurden [3.10.3]. Um den Secretinrezeptor (SCTR) in humanem Gewebe zu lokalisieren, werden die Paraffinschnitte über Rotihistol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Nach zweimaligem Waschen in PBS werden die Schnitte für 4 min in Citratpuffer in einem Dampfkochtopf gekocht, erneut gewaschen, und für 5 min in 3 % H₂O₂ blockiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgt ein zweiter Blockierungsschritt für 30 min in 5 %igem Ziegenserum, um die unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe abzudecken. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Schnitte über Nacht mit dem SCTR-Antikörper (0,4 µg/ml) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Schnitte erneut gewaschen und ein biotinylierter Sekundärantikörper für 30 min RT auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem Waschen erfolgt die Inkubation mit AB-Komplex laut Herstellerangaben für 30 min bei RT. Die braune Färbung der Antigen-Antikörper-Komplexe im Gewebe wird nach anschließender Inkubation mit dem Liquid DAB+ Substrat Chromogen System Kit (Dako) sichtbar. Diese Reaktion wird im Mikroskop beobachtet und nach 2 min mit H₂O gestoppt.

Abschließend werden die Schnitte für 10 min zusätzlich mit Hämalaun gefärbt, um die zellulären Strukturen erkennen und so den Ort der SCTR-Expression besser lokalisieren zu können.

Nach dem Eindecken und Trocknen der Gewebeschnitte erfolgt die Aufnahme der Bilder am Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss).

Antikörper	Verdünnung
α SCTR, polyklonal, Kaninchen	1 : 200 (0,4 µg/ml)
α Kaninchen IgG, biotinyliert	1: 400

Zur Auswertung werden die Bilder in drei Kategorien eingeteilt. Eine starke SCTR-Expression bedeutet, dass 100 % der vorhandenen Tumorzellen eine deutliche Färbung zeigen. Keine SCTR-Expression bedeutet, dass 0 % der vorhandenen Tumorzellen gefärbt werden. Die Zustände dazwischen werden als schwache SCTR-Expression eingestuft. Hier liegt entweder nur eine schwache Färbung vor oder es werden nur ein Teil der vorhandenen Tumorzellen angefärbt.

Um eine unspezifische Reaktion der Antikörper ausschließen zu können werden bei allen Gewebefärbungen Kontrollen ohne den entsprechenden Primärantikörper, bzw. mit einem unterschiedlichen Primärantikörper aus der gleicher Spezies gefärbt und einem Vergleich mit der eigentlichen Färbung unterzogen.

4.3.3 SDS-PAGE

Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Proteine werden dabei mit SDS (Natriumdodecylsulfat) komplexiert und dadurch negativ geladen. Die negativen SDS-Protein-Komplexe wandern in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode und trennen sich entsprechend ihres Molekulargewichtes auf. Dabei zeigen kleinere Moleküle ein schnelleres Laufverhalten als große. Das Gel besteht aus einem 4 %igem Sammelgel und einem höherprozentigen Trenngel, das sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine richtet.

Mengenangaben für 2 Gele	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %
Rotiphorese® Gel 30	380 µl	2,18 ml
2 M Tris pH 8,45	1,39 ml	4,38 ml
10 % SDS	37,5 µl	87,5 µl
H ₂ O	1,95 ml	2,10 ml
10 % APS	24,4 µl	30,0 µl
TEMED	4,9 µl	6,9 µl

Die Taschen des Sammelgels werden mit den aufzutrennenden Proteinen bzw. Zelllysaten [4.2.5] beladen, denen vorher SDS-PAGE-Probenlaufpuffer zugesetzt wurde. Neben diesen Proben wird ein Größenstandard aufgetragen, der anschließend die Bestimmung des Molekulargewichts der aufzutrennenden Proteine ermöglicht. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Gelkammer, die oben mit „*Top Buffer*“ und unten mit „*Bottom Buffer*“ gefüllt wird, bei einer Spannung von 100 V. In den meisten Fällen folgt der SDS-PAGE ein Western Blot [4.3.4] zur Analyse der aufgetrennten Proteine.

4.3.4 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen innerhalb eines Proteingemisches. Dabei werden die Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel [4.3.3] auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

Die Durchführung des Western Blots erfolgt nach dem „*Wet Blot*“ Prinzip in entsprechenden Kammern. Diese wird mit dem Transfer Puffer für *Wet Blots* gefüllt und die Blotting-Vorrichtung gemäß der Herstellerangaben mit dem SDS-Polyacrylamidgel und der Nitrocellulose-Membran beladen. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgt bei einer Spannung von 100 V über 1 h. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wird die Nitrocellulose-Membran, an der nun die Proteine gebunden sind, für 1 h in 2 % Magermilchpulver in PBS

geschwenkt. Anschließend erfolgt die Bindung des spezifischen ersten Antikörpers für 1 h bei RT in der dem Antikörper entsprechenden Verdünnung in PBS. Nach drei Waschschritten in PBS erfolgt die Detektion des Erstantikörpers mit einem POD-gekoppelten, gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichteten, Zweitantikörper. Auch dieser wird für 1 h bei RT auf der Nitrocellulose-Membran geschwenkt und die Reste durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Abschließend wird SuperSignal® Substrat nach Herstellerangaben vermischt und für 5 min auf die Membran gegeben. Am gebundenen Antikörper entsteht dabei Chemilumineszenz, die mit einem Detektionssystem (VersaDoc) detektiert und quantifiziert werden kann.

Erstantikörper:	Verdünnung:
α POL, monoklonal, Maus	1 : 2000 (0,89 µg/ml)
α SCTR, polyklonal, Kaninchen	1 : 500 (0,16 µg/ml)
Zweitantikörper:	Verdünnung:
Ziege α Maus, POD	1 : 5.000 (0,08 µg/ml)
Ziege α Kaninchen, POD	1 : 5.000 (0,08 µg/ml)

4.4 Funktionelle Methoden zur Untersuchung G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren

4.4.1 β-Arrestin2-GFP Translokation

Mit der β-Arrestin2-GFP Translokation können die Reaktionen unterschiedlicher Liganden an GPCRs untersucht werden. Dabei wird die Lokalisation des zytoplasmatischen β-Arrestin2-GFPs beobachtet, welches nach Stimulation des GPCRs durch einen Agonisten in Vesikel transloziert [Abb.15/16]. Diese Translokation lässt sich mit einem Hochdurchsatzmikroskop und der entsprechenden Analysesoftware quantifizieren und damit die Potenz (EC_{50}) und die intrinsische Aktivität eines Liganden am GPCR berechnen.

U2OS-Zellen, die das β-Arrestin2-GFP der Ratte und den GPCR stabil exprimieren [3.10.2], werden einen Tag vor dem Versuch in 96well Standard-Zellkulturplatten ausgesät, dass sie am folgenden Tag eine Konfluenz von etwa 60-80 % erreicht haben [4.2.1]. Nach optischer Kontrolle der Zellen im Mikroskop am Versuchstag werden sie für mindestens eine Stunde in serumfreien Medium kultiviert, um eventuell auftretende Artefakte durch mögliche Liganden im Serum zu vermeiden. In dieser Zeit werden die zu applizierenden Liganden in C1-Puffer auf die benötigte Konzentration verdünnt. Dem C1-Puffer wird 1 % BSA zugesetzt, um ein Verkleben der Peptide mit den Plastikoberflächen zu vermindern. Das Medium wird durch Ausschlagen der Platte von den Zellen entfernt, 50 µl der Ligandenlösung pro well jeweils in Duplikaten hinzugegeben und die Zellen für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 4 % Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert, und für weitere 10 min bei RT mit 0,1 % TritonX-100 permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI (0,25 µg/ml) angefärbt. Abschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen.

Die Aufnahme der Bilder erfolgt im IN Cell Analyzer 1000, einem automatisierten Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskop (GE Healthcare). Es werden fünf Bilder aus jedem well der 96well-Platte mit einem 20x Objektiv aufgenommen, die verwendeten Belichtungszeiten betragen dabei 50 ms für

DAPI und 1000 ms für das β -Arrestin2-GFP. Die Bildanalyse erfolgt anschließend mit der IN Cell Investigator Software (GE Healthcare) im *Granularity Algorithmus* mit folgenden Einstellungen:

Parameter	Einstellung
Granules:	
Granule Size Min.	0,01 μm
Granule Size Max.	0,1 μm
# Scales	3
Sensitivity	50 – 80 (abhängig von Zelllinie)
Nuclei:	
Min. nucleus area	150 μm^2
Sensitivity	100

Das Ergebnis wird als Vesikelfläche/Zelle ausgegeben. In den meisten Fällen werden die zu untersuchenden Liganden in Verdünnungsreihen eingesetzt, so dass aus den erhaltenen Werten Konzentrations-Wirkungskurven erstellt werden können. Dafür wird in Spotfire eine Lineare Regression durchgeführt (Formel: $y = \min + (\max - \min) / (1 + (EC_{50}/x)^{\text{Hill}})$), die Standardabweichung aus den Duplikatwells und die Konzentration halbmaximaler Aktivität (EC_{50}), sowie die Minima und Maxima aus der Kurve berechnet. Zur Berechnung der intrinsischen Aktivität der Liganden wird in jedem Versuch zusätzlich das entsprechende Wildtyp-Peptid appliziert und dessen Kurven-Maximum auf 100 % festgelegt. Die Maxima der zu untersuchenden Peptid-Varianten werden dazu in Relation gesetzt und bilden so die intrinsische Aktivität in Prozent zum Wildtyp.

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind dabei stets die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Für die Untersuchung von Antagonisten an einem GPCR wird ein leicht modifiziertes Protokoll der β -Arrestin2-GFP Translokation verwendet. Die zu untersuchenden Antagonisten werden dabei wie oben beschrieben zu den Zellen gegeben und 5 min bei 37°C alleine inkubiert. Anschließend wird ein Fluoreszenz-markierter Agonist, in dieser Arbeit entweder Secretin-IDCC oder GLP-2-IDCC [4.4.5], in einer finalen Konzentration von 10 nM zugegeben. Diese Konzentration würde alleine appliziert eine volle Aktivierung des Rezeptors auslösen. Die Zellen werden damit weitere 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgt die Fixierung und Permeabilisierung wie oben beschrieben. Durch die Verwendung von IDCC-markierten Agonisten ergibt sich ein weiterer (nahinfraroter) Aufnahmekanal im IN Cell Analyzer 1000, der mit einer Belichtungszeit von 2000 ms aufgenommen wird. Da der markierte Agonist entweder gar nicht vom GPCR gebunden wird (beim Vorhandensein eines Antagonisten) oder zusammen mit dem β -Arrestin2-GFP in Vesikel aufgenommen wird, kann auch für die Auswertung in diesem Kanal der oben beschriebene *Granularity Algorithmus* verwendet werden. In der Regel entsprechen dabei die Werte des markierten Liganden den Werten, die über das β -Arrestin2-GFP gewonnen werden.

4.4.2 Messung von intrazellulären cAMP-Konzentrationen in transfizierten Zelllinien

Neben der β -Arrestin2-GFP Translokation [4.4.1] gibt es weitere Methoden, um die Funktion von GPCRs zu untersuchen. Eine häufig verwendete Methode ist die Messung von intrazellulären cAMP-Konzentrationen, die vor allem für $G\alpha_s$ -koppelnde GPCRs angewendet wird [1.2]. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt über eine Signalkaskade zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, welche sich mit unterschiedlichen Methoden messen lässt. Eine Möglichkeit, die sich vor allem für einen höheren Durchsatz eignet, ist die Verwendung des GloSensor™-Systems (Promega). Dazu wird eine zweifach stabile Zelllinie benötigt, die zusätzlich zu dem zu untersuchenden GPCR das GloSensor™-Plasmid trägt. Dieses codiert neben einer cAMP-bindenden Domäne für eine Luciferase, die durch cAMP-Bindung aktiviert wird und anschließend ein ihrerseits ein Substrat aktiviert. Dabei wird messbare Lumineszenz abgestrahlt, die der Menge des gebildeten cAMP entspricht.

GloSensor™- und GPCR-exprimierende U2OS-Zellen werden dafür einen Tag vor Versuchsbeginn in weiße, optische 96well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert [4.2.1]. Am Versuchstag werden die Zellen zunächst 2 h bei RT in 50 μ l/well Equilibrierungspuffer für GloSensor™ laut Hersteller mit dem Luciferasesubstrat beladen. In der Zwischenzeit wird eine Verdünnungsreihe der zu applizierenden Liganden in HBSS, dem 1 % BSA zugefügt wird, hergestellt und nach Ende der Beladungszeit davon 50 μ l/well zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 20 min bei RT wird die Chemilumineszenz mit entsprechenden Filtern im EnVision (Perkin Elmer) gemessen. Zur Datenauswertung wird der Quotient aus stimulierten und unstimulierten Zellen gebildet und die Mittelwerte und Standardabweichungen der Duplikatwells berechnet. Aus diesen Werten werden Konzentration-Wirkungskurven erstellt und die EC_{50} und Aktivität der jeweiligen Liganden analog [4.4.1] berechnet.

Für die Untersuchung von Antagonisten wird analog [4.4.1] ein leicht modifiziertes Protokoll angewendet. Die Behandlung der Zellen und die Verdünnung der potentiellen Antagonisten erfolgt wie oben beschrieben. Diese werden anschließend zu den Zellen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wird der native Agonist, in dieser Arbeit Secretin oder GLP-2, in einer finalen Konzentration von 0,5 nM zugegeben und für weitere 15 min bei RT auf den Zellen inkubiert. Die gebildete Chemilumineszenz, die mit der Menge an gebildetem cAMP korreliert, kann dann mit entsprechenden Filtern im EnVision (Perkin Elmer) gemessen werden. Die Auswertung der Daten erfolgt wie in [4.4.1] beschrieben, dabei wird die halbmaximale Verdrängung (IC_{50}) berechnet.

4.4.3 Messung von intrazellulären cAMP-Konzentrationen in nativen Zelllinien

Die in [4.4.2] beschriebene Messung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen mit dem GloSensor™-System zeichnet sich durch ihre einfache und schnelle Handhabung aus. Da für diese Methode jedoch mindestens das GloSensor™-Plasmid stabil in die Zellen transfiziert werden muss, ist es für die Messung von cAMP-Konzentrationen in nativen Zelllinien nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde für diese Anwendung das LANCE™ cAMP 384 Kit (Perkin Elmer) verwendet.

Dieses basiert auf einem TR-FRET-Prinzip. An ein biotinyliertes cAMP ist das Eu-Chelate-Streptavidin gebunden, welches bei einer Wellenlänge von etwa 330 nm angeregt werden kann.

Dessen Emission kann wiederum einen Alexa-Fluor[®] 647-gekoppelten spezifischen cAMP-Antikörper anregen, der sich durch das biotinylierte cAMP in unmittelbarer Nähe befindet und bei einer Wellenlänge von 665 nm Licht emittiert. Bei der Stimulation eines $G\alpha_s$ -koppelnden GPCRs kommt es zu einer Bildung von endogenem cAMP, welches das biotinylierte cAMP vom Antikörper verdrängt und so das emittierte FRET-Signal verringert.

Für die cAMP-Messung mit dem LANCE[™] cAMP 384 Kit werden die Zellen einen Tag vor Versuchsbeginn in Standard 96well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen [4.2.1]. Vor Versuchsbeginn werden sie für mindestens eine Stunde in serumfreien Medium gehalten, um interferierende Effekte durch das FCS zu verhindern. Der grundsätzliche Versuchsablauf entspricht dem Herstellerprotokoll, wurde jedoch an die U2OS-Zellen angepasst.

Die zu untersuchenden Liganden wurden dafür in absteigenden Konzentrationen in „*Stimulation Buffer*“ verdünnt und 40 µl/well jeweils in Duplikaten zu den Zellen gegeben. Die Reaktion erfolgt dann für 30 min bei 37°C bevor die Reaktion mit 10 µl 0,5 % TritonX-100 durch Permeabilisierung der Zellen gestoppt wird. 5 µl dieses Lysats werden anschließend in eine weiße ProxiPlate 384 plus überführt und die weiteren Reaktionsschritte gemäß der Herstelleranweisung durchgeführt. Zunächst erfolgt die Zugabe von 5 µl des Alexa-Fluor[®] 647-cAMP-Antikörpers, der für 30 min bei RT mit dem Lysat inkubiert wird. Anschließend wird 10 µl eines Gemischs aus Biotin-markiertem cAMP und LANCE[™]-markiertem Streptavidin hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Detektion des FRET-Signals erfolgt mit LANCE[™]-Filtern im EnVision (Perkin Elmer). Auch hier wird ein Quotient zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen gebildet, Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die Potenz bzw. die Aktivität der zugegebenen Liganden analog [4.4.1] berechnet. Durch die Verwendung eines cAMP-Konzentrationsstandards kann außerdem die genaue intrazelluläre cAMP-Konzentration berechnet werden.

4.4.4 Messung von zytoplasmatischen Kalzium-Konzentrationen

G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren können nach ihrer Aktivierung nicht nur intrazelluläre cAMP-Konzentration, sondern auch die intrazelluläre Kalzium (Ca^{2+})-Konzentration verändern [1.2]. Einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration beobachtet man vor allem bei GPCRs, die nach ihrer Aktivierung an G-Proteine der Klasse $G\alpha_q$ binden, wodurch es nach Durchlaufen des Signalwegs zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern ins Zytoplasma kommt. Diese Veränderung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration lässt sich über Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe messen. Für dieses sogenannte „*Calcium Imaging*“ werden die zu untersuchenden Zellen, die sowohl nativ als auch transfiziert sein können, einen Tag vor dem Versuch in schwarze, optische 96well-Zellkulturplatten ausgesät, und bei 37°C über Nacht inkubiert [4.2.1]. Am nächsten Tag werden sie für mindestens eine Stunde ohne FCS kultiviert, um unerwünschte Reaktionen zu minimieren. Die zu untersuchenden Liganden werden in absteigender, zweifacher Konzentration in C1-Puffer verdünnt, dem 1 % BSA zugesetzt wurde. Anschließend werden die Zellen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff „fluo-4 AM“ beladen. Für eine 96well-Platte werden dazu 50 µl einer Probenecidlösung (0,071 g Probenecid in 1 ml 1 N NaOH) und 5 µl fluo-4 AM in 5 ml serumfreien Medium gelöst, 50 µl/well davon auf die Zellen gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Probenecid ist ein Inhibitor der zellulären Anionen-Austauscher, wodurch der Ca^{2+} -sensitive Farbstoff länger in der

Zelle verbleibt. Nach zweimaligem automatisiertem Waschen mit C1-Puffer werden die Zellen für 25 min bei RT im Dunklen inkubiert, nochmals gewaschen und weitere 25 min bei RT stehen gelassen. Der Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration wird im CellLux (Perkin Elmer) gemessen, wobei die Zugabe der Liganden aufgrund der schnellen Ca^{2+} -Reaktion der Zellen automatisiert im Gerät stattfindet. Aus den gemessenen Werten wird der Quotient aus stimulierten und der unstimulierten Zellen gebildet und Konzentrations-Wirkungskurven erstellt, aus denen die Potenz bzw. die Aktivität der applizierten Substanzen analog [4.4.1] berechnet werden kann.

4.4.5 Bindung und Internalisierung IDCC-markierter Liganden an lebenden und fixierten Zellen

Die Markierung peptidischer Liganden mit dem Fluoreszenzfarbstoff IDCC macht eine ganze Reihe an Experimenten möglich. IDCC war der Farbstoff der Wahl, weil er nicht nur mit den üblichen Cy5-Filtern eines Mikroskops *in vitro* visualisiert werden kann, sondern auch vergleichsweise weit durch Gewebe strahlt und dadurch auch in *in vivo*-Experimenten eingesetzt werden kann. So lässt sich das Verhalten eines markierten Peptids sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachten und näher beschreiben. Vor allen Versuchen mit diesen Peptiden, in dieser Arbeit Secretin-IDCC und GLP-2-IDCC, wurde durch vergleichende Experimente mit den unmarkierten Peptiden sichergestellt, dass der Farbstoff die funktionellen Eigenschaften des Peptids am Rezeptor nicht verändert.

Zur Beobachtung der Bindung und Internalisierung des Secretin-IDCC und GLP-2-IDCC werden Experimente an lebenden Zellen durchgeführt. Dabei wird die transfizierte oder native Zelllinie einen Tag vor Versuchsbeginn in Standard 96well-Zellkulturplatten so ausgesät, dass sie am Versuchstag eine Konfluenz von etwa 60-80 % aufweisen [4.2.1]. Am nächsten Tag werden sie für mindestens eine Stunde in serumfreien Medium gehalten, um unspezifische Reaktionen durch das Serum zu vermeiden. Secretin- bzw. GLP-2-IDCC wird in PBS auf eine Konzentration von 10 nM verdünnt, das eine maximale Rezeptor-Reaktion auslöst, und ebenso wie die Zellen auf 37°C erwärmt. Dies ist nötig um Fokus-Verschiebungen des Mikroskops zu minimieren, die durch Temperaturänderungen am Plattenboden entstehen. Das Medium wird anschließend von den Zellen abgenommen und 50 μl Peptid-IDCC zugegeben. Diese Peptidlösung wird kurz in der Platte geschwenkt, sofort wieder abgesaugt und durch reines PBS ersetzt, da das Belassen der Peptid-IDCC-Lösung auf den Zellen eine zu große Hintergrundfluoreszenz zur Folge hätte. Die Bildaufnahme im IN Cell Analyzer 1000 wird sofort gestartet, dabei wird von denselben Zellen alle 10 sec (bis $t = 5$ min) bzw. 5 min (bis $t = 30$ min) ein Bild im Cy5-Kanal mit einer Belichtungszeit von 5000 ms gespeichert.

Diese Methode erlaubt die Beobachtung der Internalisierung IDCC-markierter Peptide in einem Zeitraum von 20 sec bis 30 min nach Zugabe. Die Bearbeitung der so erzeugten Bildstapel erfolgt mit ImageJ.

Die Internalisierung von Secretin-IDCC und GLP-2-IDCC kann auch an fixierten Zellen aufgenommen werden. Dies ist zum Beispiel für eine zusätzliche Färbung mit Antikörpern nötig [4.3.1]. Das Prinzip der Methode entspricht dann der β -Arrestin2-GFP Translokation [4.4.1]. Das IDCC-markierte Peptid wird in der gewünschten Konzentration für 20 min bei 37°C auf die Zellen

gegeben, die anschließend fixiert und permeabilisiert werden [4.4.1]. Die Aufnahme der Bilder erfolgt im IN Cell Analyzer 1000 bei einer Belichtungszeit von 2000 ms mit entsprechenden Filtern.

5 Ergebnisse

5.1 Expression des Secretinrezeptors in humanem Normal- und Tumorgewebe

5.1.1 Validierung von Antikörpern gegen den Secretin- und Glucagon-like peptide-2-Rezeptor

Das Ziel dieser Arbeit war es, Peptide zu entwickeln, die G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCRs) binden und damit für die zielgerichtete Diagnostik von Tumoren mit GPCR-Überexpression verwendet werden können. Um die Expression von GPCRs in Tumoren untersuchen zu können, mussten zunächst entsprechende Antikörper validiert werden. Gegen den Secretinrezeptor (SCTR) stehen verschiedene kommerzielle Antikörper zur Verfügung, die auf ihre Spezifität untersucht werden sollten. Um über entsprechende Kontrollen für die Expression des SCTR zu verfügen, wurde eine kurze Proteinsequenz („tag“) an den C-Terminus des SCTR und des Glucagon-like peptide-2-Rezeptors (GLP-2R) kloniert. Diese Proteinsequenz entspricht dem Epitop eines im Labor vorhandenen und validierten monoklonalen Mausantikörpers und wird als POL-Epitop bezeichnet. Die DNA, die für das POL-Epitop kodiert, wurde dabei über die PCR-Primer in die Rezeptorsequenzen eingebracht [4.1].

Die entstehenden Plasmide, die für SCTR-POL und GLP-2R-POL kodieren, wurden transient in U2OS-Zellen transfiziert und diese 24 h später lysiert [4.2.5]. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt [4.3.3] und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Ein Teil der Membran wurde dabei als Positivkontrolle mit dem POL-Antikörper gefärbt, der andere Teil der Membran mit den zu validierenden Antikörpern gegen SCTR bzw. GLP-2R [4.3.4]. Für die Immunfluoreszenz wurden stabil transfizierte U2OS-Zellen verwendet, welche nach ihrer Fixierung und Permeabilisierung mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert wurden [4.3.1].

Bei der Antikörpervalidierung mit diesen Methoden zeigte sich, dass nur die allerwenigsten der kommerziell erhältlichen Antikörper den GPCR, gegen den sie laut Hersteller gerichtet sein sollen, spezifisch erkennen. Dies stellt ein generelles Problem in der GPCR-Forschung dar¹⁷⁵. Eine Ausnahme bildete ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen SCTR. Im Western Blot [Abb.9 A] werden Banden in Höhe von etwa 65, 55 und 50 kDa gefärbt, die auch in der Positivkontrolle mit dem POL-Antikörper sichtbar sind. In der Negativkontrolle, dem Lysat von GLP-2R-POL transfizierten Zellen, sind dagegen keine Banden sichtbar. In der Immunfluoreszenz [Abb.9 B] wurden U2OS-Zellen verwendet, die den SCTR bzw. GLP-2R stabil exprimieren. Der zu validierende Antikörper gegen SCTR zeigte hier deutliche Fluoreszenzsignale auf den SCTR-exprimierenden Zellen, aber kein Signal auf den GLP-2R exprimierenden Zellen. Für die Spezifität des Antikörpers spricht weiterhin die Lokalisation des Fluoreszenzsignals an der Zellmembran der nicht-permeabilisierten Zellen [Abb.9 B, untere Reihe], was für einen GPCR zu erwarten ist.

Ein spezifischer Antikörper, der sich gegen den GLP-2R richtet, konnte dagegen nicht identifiziert werden. Der erworbene Antikörper führte zu keinem spezifischen Signal in Western Blot oder Immunfluoreszenz (nicht gezeigt) [3.9.2]. Ein in unserem Labor entwickelter Antikörper gegen den GLP-2R befindet sich momentan in der Validierungsphase (Experimente von Quirino Schefer). Aus diesem Grund konnte zunächst nur die Expression des SCTR im Gewebe untersucht werden.

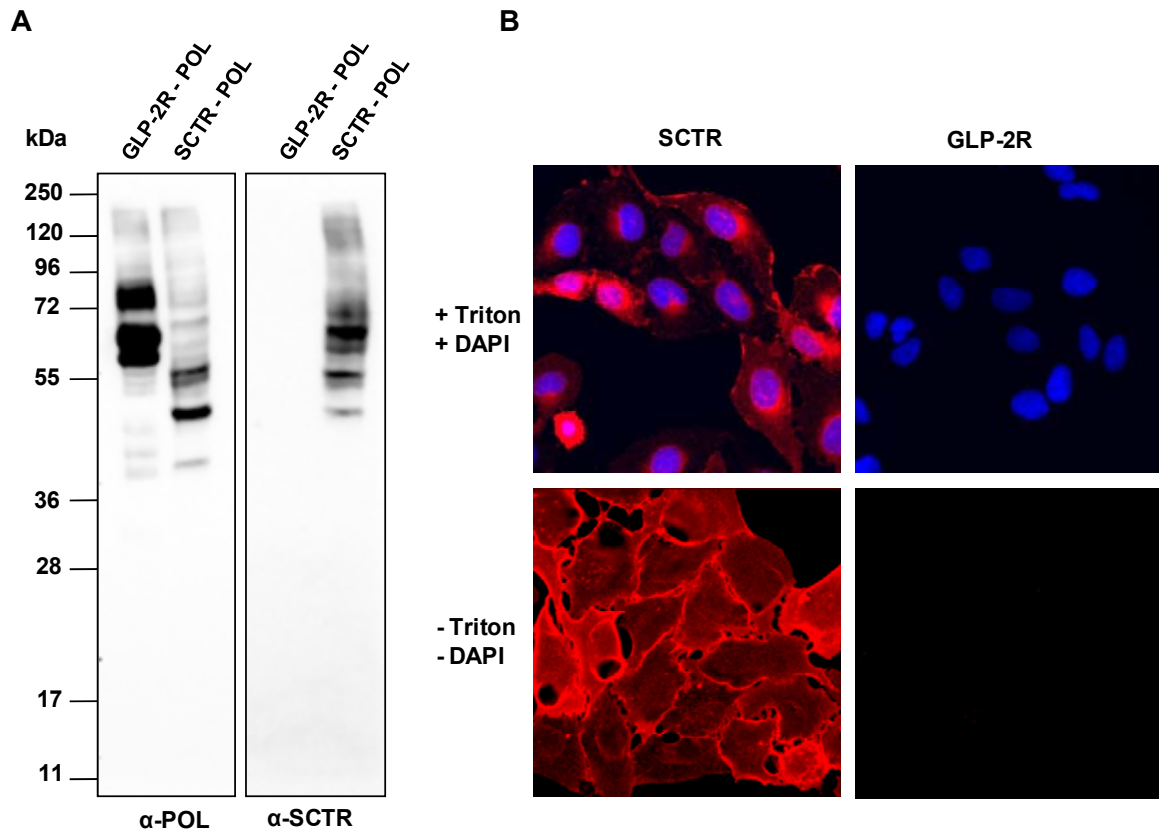
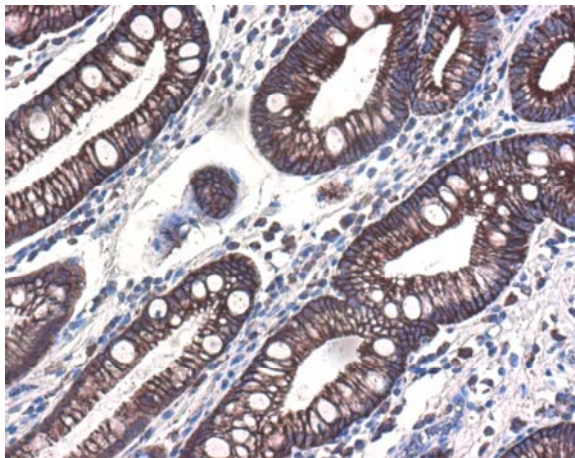


Abbildung 9: Validierung des Antikörpers gegen SCTR. A) Western Blot. U2OS-Zellen wurden transient mit GLP-2R-POL bzw. SCTR-POL transfiziert und 24 h später lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der linke Teil der Membran wurde mit einem Antikörper gegen das POL-Epitop inkubiert, der rechte Teil der Membran mit dem Antikörper gegen SCTR (0,16 µg/ml, Sigma-Aldrich). Die Detektion erfolgte über einen POD-gekoppelten Ziege α-Maus bzw. Ziege α-Kaninchen Antikörper und Entwicklungssubstrat. **B) Immunfluoreszenz.** U2OS-Zellen, die den SCTR oder GLP-2R stabil exprimieren, wurden fixiert und ein Teil der Zellen direkt mit dem Antikörper gegen SCTR (0,4 µg/ml, Sigma-Aldrich) und einem Cy3-markierten Ziege α-Kaninchen Antikörper gefärbt (untere Reihe). Der andere Teil der Zellen wurde zunächst mit 0,1 % Triton permeabilisiert, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und anschließend mit den gleichen Antikörpern inkubiert (obere Reihe). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem 20x Objektiv im IN Cell Analyzer 1000.

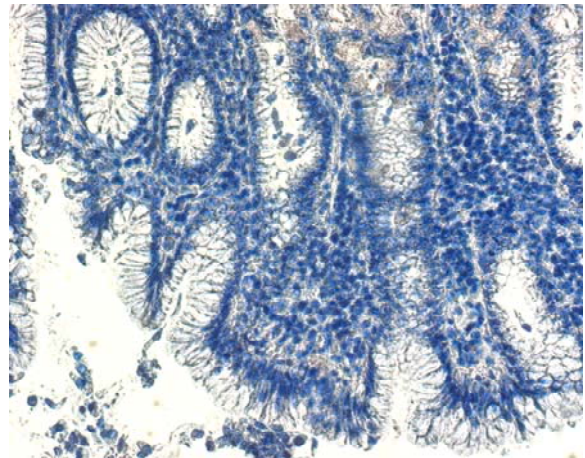
5.1.2 Expression des Secretinrezeptors in gesundem Gewebe

Um eine mögliche Überexpression des SCTR im Tumor beurteilen zu können, musste zuerst die Expression des SCTR im normalen humanen Gewebe betrachtet werden. Dafür wurde sowohl ein kommerziell erhältlicher „*Tissue Microarray*“ als auch Gewebe aus dem Bestand der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité in Berlin verwendet [3.10.3]. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden sie mit dem SCTR-Antikörper (0,4 µg/ml) inkubiert, der anschließend über einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurden alle Gewebeschnitte mit Hämalaun gegengefärbt, um die zellulären Strukturen besser sichtbar zu machen [4.3.2].

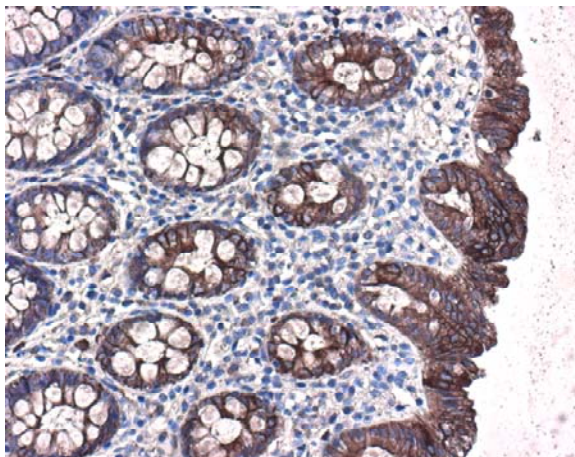
In jedem Versuch wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der der primäre SCTR-Antikörper durch reine Pufferlösung ersetzt wurde.



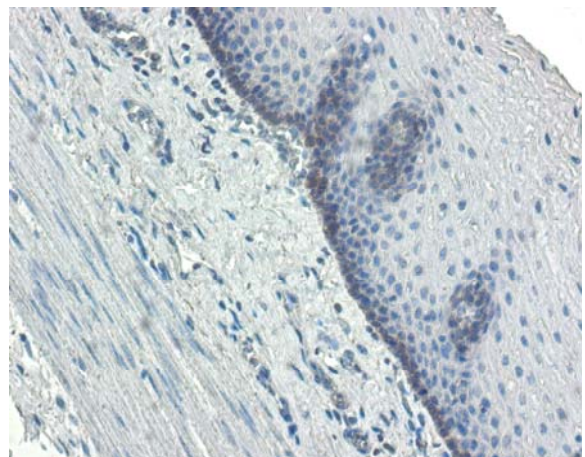
Magen



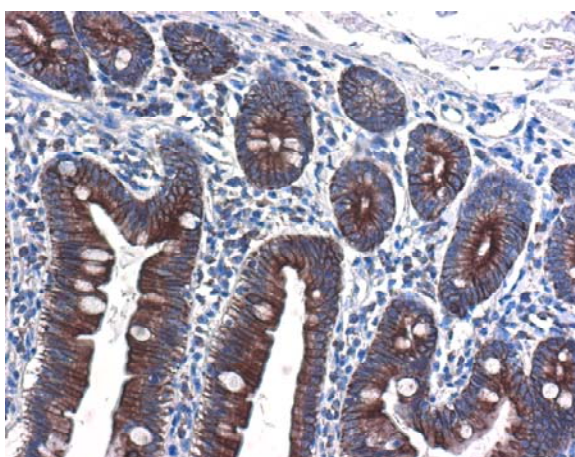
Magen (Negativkontrolle)



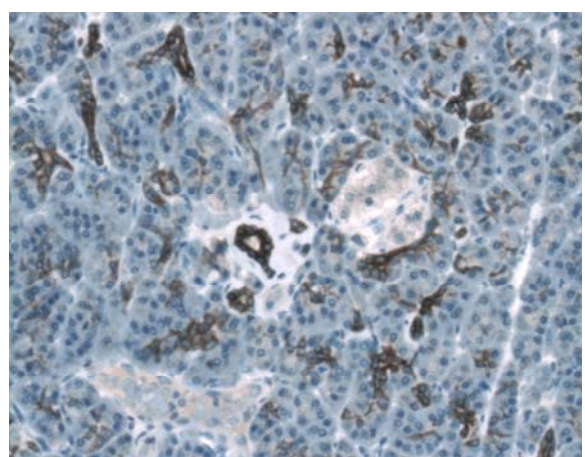
Rektum



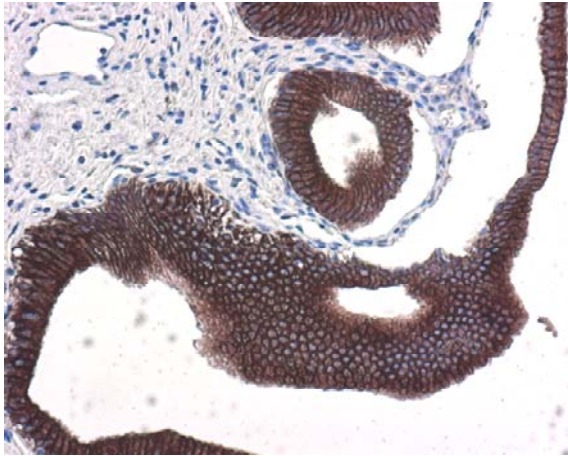
Ösophagus



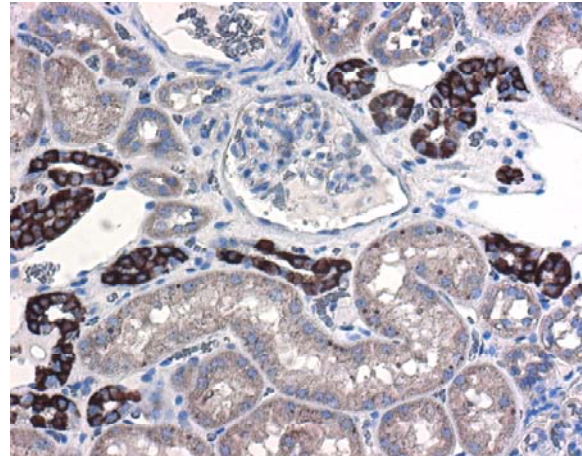
Dünndarm



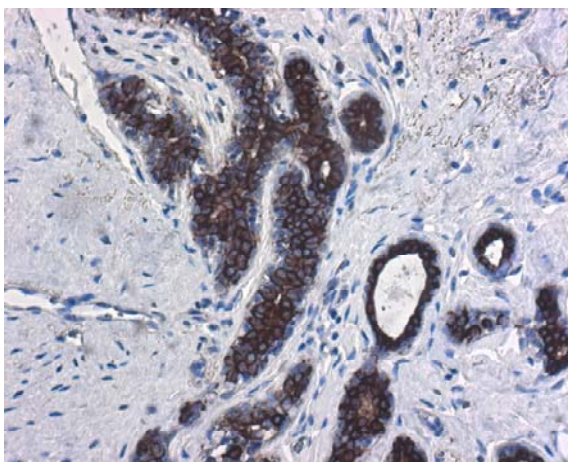
Pankreas



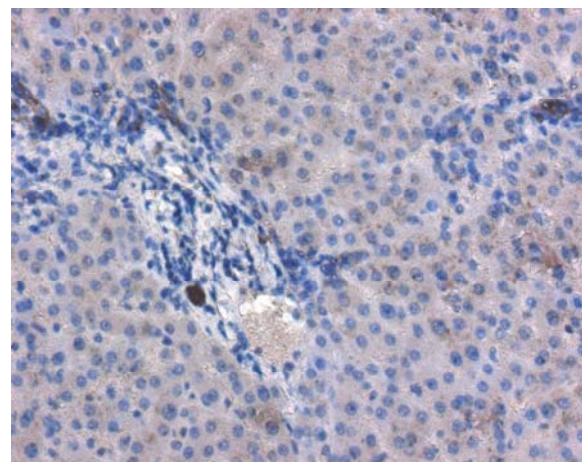
Gallenblase



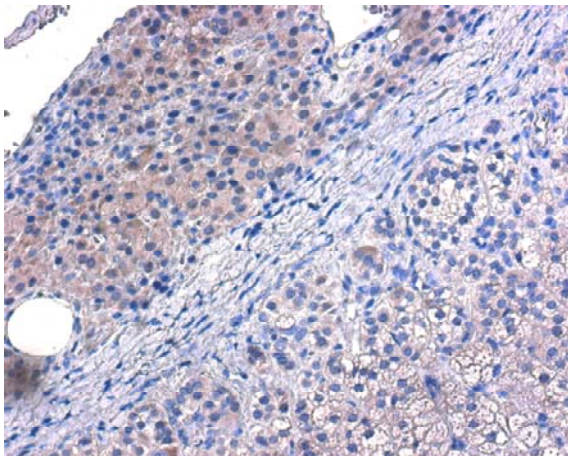
Niere



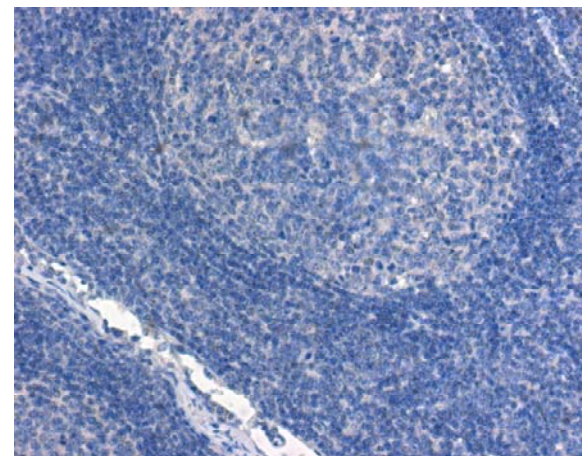
Brust



Leber



Nebenniere



Lymphknoten

Abbildung 10: Expression des SCTR in gesundem, humanem Gewebe. Paraffinschnitte unterschiedlicher gesunder, humaner Gewebe wurden entparaffiniert und blockiert. Die Färbung gegen den SCTR erfolgte mit einem SCTR-Antikörper (0,4 µg/ml, Sigma-Aldrich) dessen Lokalisation mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Bilder wurden mit dem Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss) in einer 100fachen Vergrößerung aufgenommen. Negativkontrolle: Gewebe des Magens, bei dessen Färbung der SCTR-Antikörper durch Puffer ersetzt wurde.

In den Epithelien von Magen, Dünndarm und Rektum lässt sich nach dem Trocknen der gefärbten Gewebeschnitte eine deutliche positive Braunfärbung erkennen, während im Ösophagus nur eine schwache SCTR-Expression im Stratum basale des Plattenepithels zu beobachten ist [Abb.10]. Die Epithelzellen der Gallengänge in der Leber exprimieren den SCTR, während die Hepatozyten selbst negativ sind. Auch im Pankreas zeigt sich eine deutliche Färbung der Epithelzellen der Ausführungsgänge, die Pankreasazini und die Pankreasinseln exprimieren dagegen keinen SCTR. Außerdem konnte der SCTR im Epithel der Gallenblase, im Epithel der zervikalen Drüsengänge und der Brustdrüsen, sowie in den Tubuli der Niere gefunden werden. Als SCTR-negativ erwiesen sich Lymphknoten, Nebenniere [Abb.10], Milz, Hoden und Plazenta (nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass der SCTR in fast allen untersuchten Organen exprimiert wird, wobei sich seine Expression auf Ausführungsgänge und Epithelien beschränkt.

5.1.3 Expression des Secretinrezeptors im Tumorgewebe

Nach der Expressionsanalyse des SCTR im gesunden Gewebe sollte nun die Expression des SCTR nach gleicher Methodik in unterschiedlichen Tumorgeweben untersucht werden. Auch hier wurde zunächst ein kommerziell erhältlicher *Tissue Microarray* mit unterschiedlichen Tumorproben verwendet. In diesen ersten Experimenten zeigten vor allem Karzinome des Pankreas und des Ösophagus eine starke Expression des SCTR, so dass der Fokus der weiteren Untersuchungen auf diese beiden Tumortypen gelegt wurde.

5.1.4 Expression des Secretinrezeptors in Tumoren des Pankreas

Für die Expressionsanalyse des SCTR in Tumoren des Pankreas wurden zwei kommerziell erhältliche *Tissue Microarrays* verwendet, deren Inhalt histopathologisch verifiziert vorlag [3.10.3]. Pro Patient wurden dabei zwei Tumorproben ausgewertet, zusätzlich lag in den meisten Fällen tumor-umgebendes Gewebe vor. Es zeigte sich, dass der SCTR in 93 % aller duktalem Adenokarzinomen des Pankreas stark exprimiert wird, wobei die Expression mit absteigendem Differenzierungsgrad verloren gehen kann (100 % starke SCTR-Expression in gut differenzierten duktalem Adenokarzinomen versus 83 % starke SCTR-Expression in schwach differenzierten duktalem Adenokarzinomen [Abb.11/Tab.4]. Im Gegensatz dazu ist im Inselzellkarzinom/-tumor und im entzündlichen Gewebe (z.B. Pankreatitis) keine Expression des SCTR nachzuweisen [Abb.12]. Differentialdiagnostisch wäre die duktalem Hyperplasie abzugrenzen, da hier erwartungsgemäß ebenfalls eine starke SCTR-Expression vorhanden ist.

5.1.5 Expression des Secretinrezeptors in Tumoren des Ösophagus

Das gesunde Ösophagusgewebe zeigte nur eine leichte Expression des SCTR im Stratum basale des Plattenepithels [Abb.10]. Daher wurde nun ein *Tissue Microarray* mit dem SCTR-Antikörper gefärbt, der vor allem Plattenepithelkarzinome des Ösophagus enthielt. Dabei zeigten 94 % der Karzinome eine starke Expression des SCTR. Wie auch schon beim duktalem Pankreaskarzinom beobachtet werden konnte, sind vor allem die gut differenzierten Plattenepithelkarzinome des Ösophagus SCTR-positiv (100 %) während die schwach differenzierten Karzinome in 20 % der untersuchten Proben keine SCTR-Expression aufwiesen [Abb.13/Tab.5].

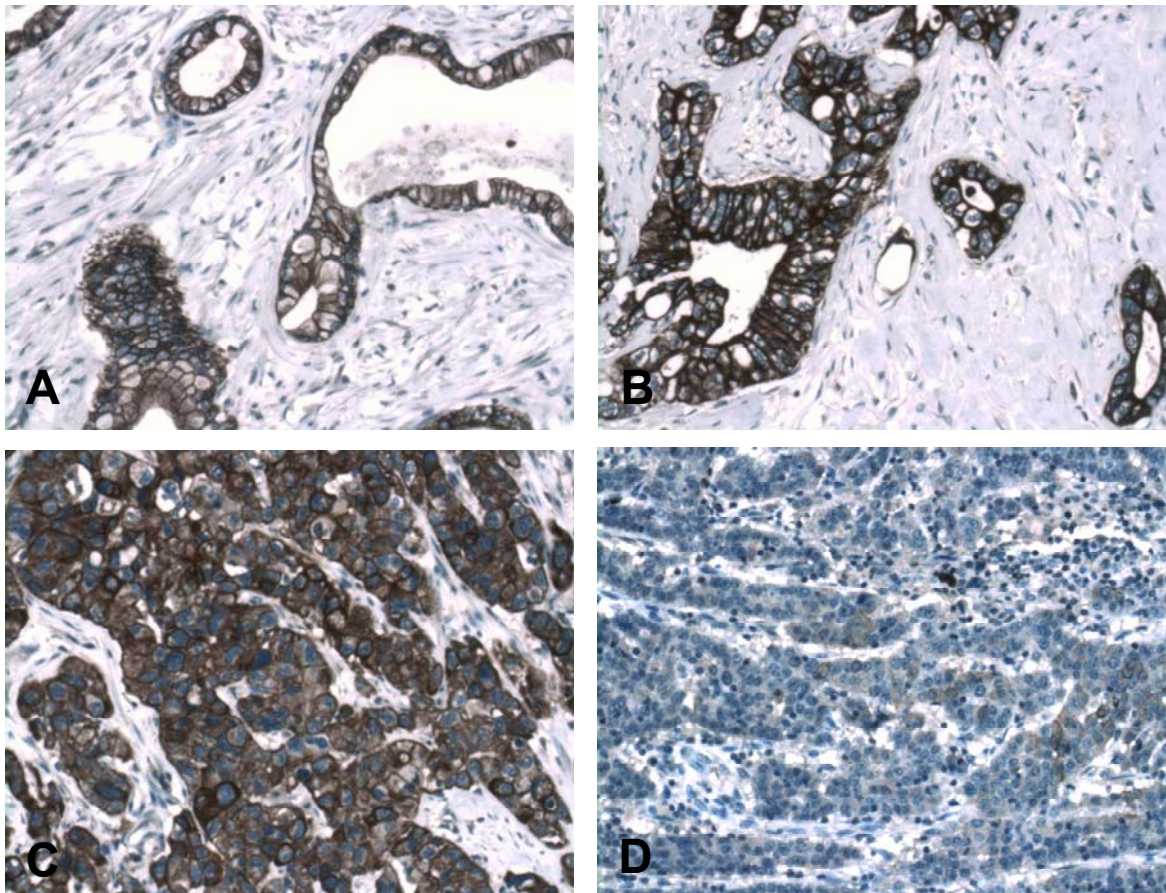


Abbildung 11: Expression des SCTR in humanen, duktalem Adenokarzinomen des Pankreas. Die Paraffinschnitte von humanen, duktalem Adenokarzinomen des Pankreas wurden entparaffiniert und blockiert. Die Färbung erfolgte mit einem SCTR-Antikörper (0,4 µg/ml, Sigma-Aldrich) dessen Lokalisation mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Bilder wurden mit dem Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss) in einer 100fachen Vergrößerung aufgenommen. **A) duktales Adenokarzinom, gut differenziert B) duktales Adenokarzinom, mäßig differenziert C + D) duktales Adenokarzinom, schwach differenziert**

Tumor / Gewebe	Differenzierung	Stark SCTR-positiv	Schwach SCTR-positiv	SCTR-negativ
Duktales Adenokarzinom	Gesamt	65/70 (93 %)	1/70 (1 %)	4/70 (6 %)
Duktales Adenokarzinom	Schwach	19/23 (83 %)	0/23 (0 %)	4/23 (17 %)
Duktales Adenokarzinom	Mäßig	36/37 (97 %)	1/37 (3 %)	0/37 (0 %)
Duktales Adenokarzinom	Gut	10/10 (100 %)	0/10 (0 %)	0/10 (0 %)
Adenosquamöses Karzinom		2/3 (67 %)	1/3 (33 %)	0/3 (0 %)
Inselzellkarzinom (maligne)		0/1 (0 %)	0/1 (0 %)	1/1 (100 %)
Inselzelltumor (benigne)		0/10 (0 %)	1/10 (10 %)	9/10 (90 %)
Duktale Hyperplasie		2/2 (100 %)	0/2 (0 %)	0/2 (0 %)
Entzündetes Gewebe		0/10 (0 %)	0/10 (0 %)	10/10 (100 %)

Tabelle 4: Übersicht der SCTR-Expression in Erkrankungen des Pankreas.

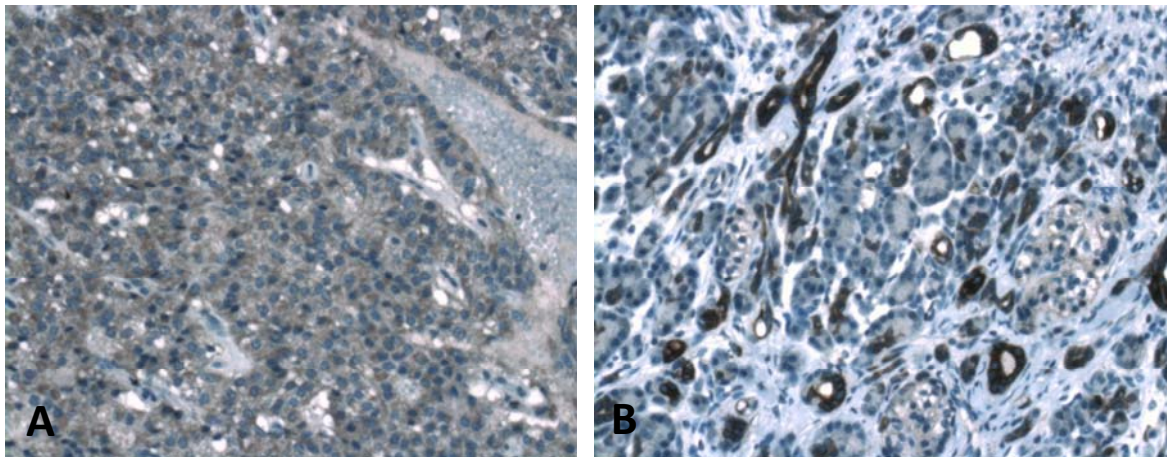


Abbildung 12: Expression des SCTR in humanen Erkrankungen des Pankreas. Die Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und blockiert. Die Färbung erfolgte mit einem SCTR-Antikörper (0,4 µg/ml, Sigma-Aldrich) dessen Lokalisation mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Bilder wurden mit dem Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss) in einer 100fachen Vergrößerung aufgenommen. **A) Inselzellkarzinom (maligne) B) chronische Pankreatitis**

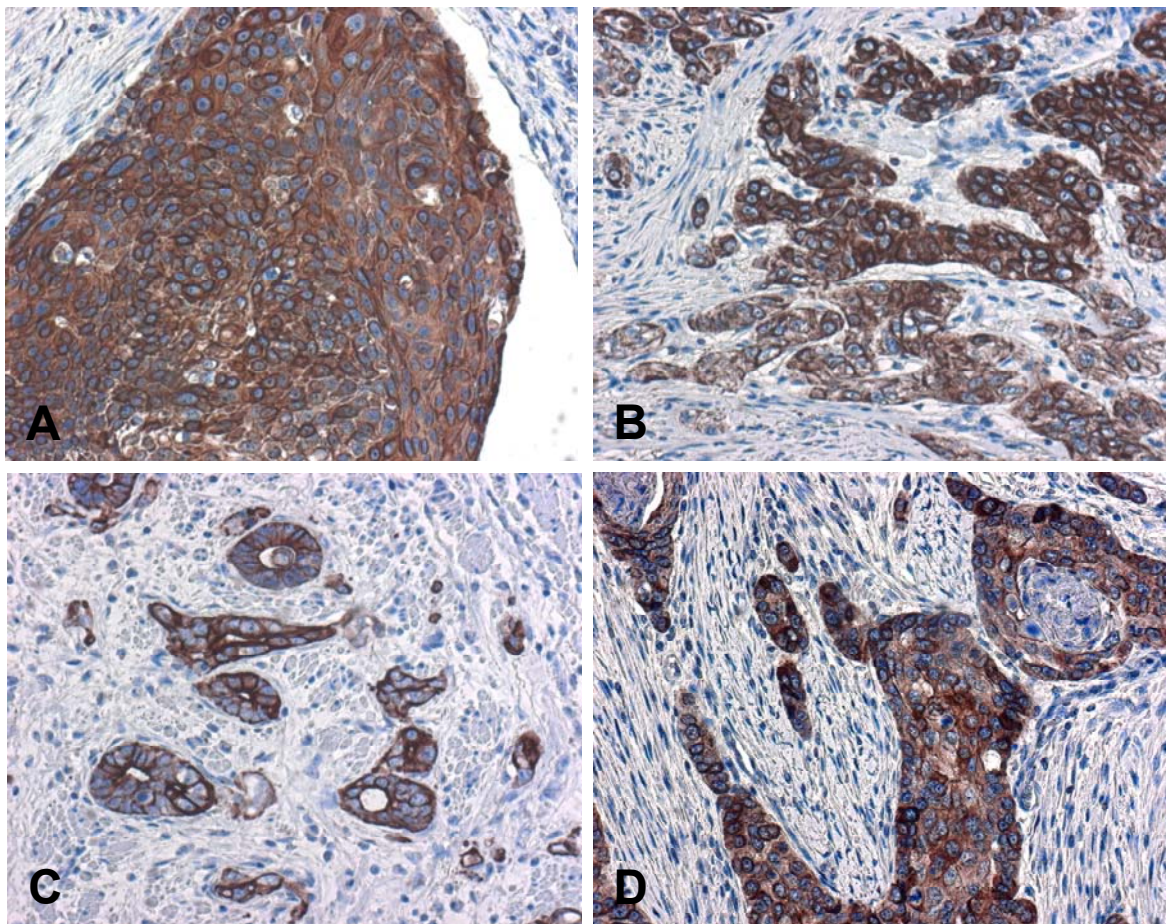


Abbildung 13: Expression des SCTR in humanen Karzinomen des Ösophagus. Die Paraffinschnitte von humanen Karzinomen des Ösophagus wurden zunächst entparaffiniert und blockiert. Die Färbung erfolgte mit dem SCTR Antikörper (0,4 µg/ml, Sigma-Aldrich) dessen Lokalisation mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Bilder wurden mit dem Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss) in einer 100fachen Vergrößerung aufgenommen. **A) Plattenepithelkarzinom, gut differenziert B) Plattenepithelkarzinom, schwach differenziert C) Adenokarzinom, mäßig differenziert D) Adenosquamöses Karzinom**

Tumor	Differenzierung	Stark SCTR-positiv	Schwach SCTR-positiv	SCTR-negativ
Plattenepithelkarzinom	Gesamt	48/51 (94 %)	0/52 (0 %)	3/51 (6 %)
Plattenepithelkarzinom	schwach	4/5 (80 %)	0/5 (0 %)	1/5 (20 %)
Plattenepithelkarzinom	mäßig	23/25 (92 %)	0/25 (0 %)	2/25 (8 %)
Plattenepithelkarzinom	gut	21/21 (100 %)	0/21 (0 %)	0/21 (0 %)
Adenokarzinom		1/3 (33 %)	2/3 (66 %)	0/3 (0 %)
Adenosquamoses Karzinom		3/4 (75 %)	1/4 (25 %)	0/4 (0 %)

Tabelle 5: Übersicht der SCTR-Expression in Tumoren des Ösophagus.

5.1.6 Expression des Secretinrezeptors in neuroendokrinen Tumoren

Ein Schwerpunkt der Klinik Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie am Campus Virchow-Klinikum der Charité in Berlin liegt auf der Behandlung und Erforschung von neuroendokrinen Tumoren (NETs). In etwa 80 % dieser Tumore sind die Somatostatinrezeptoren (SSTR), bei denen es sich ebenfalls um GPCRs handelt, überexprimiert wodurch eine frühzeitige Diagnose der mit radioaktiv-markierten Somatostatin-Varianten möglich ist [1.11/Abb.7]. Bei 20 % dieser Tumore ist diese nicht-invasive Früherkennung jedoch aufgrund fehlender SSTR-Expression nicht möglich¹⁷⁶.

Aus diesen Gründen wurden zusätzlich Proben dieser vergleichsweise seltenen Tumoren auf die Expression des SCTR untersucht. Die Tumورproben, die in der Mehrzahl aus Lebermetastasen neuroendokriner Tumore bestehen, wurden in der eigenen Arbeitsgruppe in Triplikaten auf zwölf *Tissue Microarrays* aufgebracht und mit dem Antikörper gegen SCTR gefärbt. In 29 % der untersuchten neuroendokrinen Tumoren konnte eine starke SCTR-Expression festgestellt werden, in 21 % ist die Expression nur sehr schwach vorhanden, 50 % der untersuchten Proben zeigten keine SCTR-Expression. Auch die Sortierung der Tumoren nach dem Ort des Primärtumors zeigte keine signifikante Über- bzw. Unterexpression des SCTR in den verschiedenen Subtypen der neuroendokrinen Tumoren [Abb.14/Tab.6].

NET (Primär-)Tumor	Stark SCTR-positiv	Schwach SCTR-positiv	SCTR-negativ
Gesamt	53/184 (29 %)	39/184 (21 %)	92/184 (50 %)
Pankreas	17/43 (40 %)	9/43 (21 %)	17/43 (40 %)
Magen	3/5 (60 %)	1/5 (20 %)	1/5 (20 %)
Dünndarm	14/49 (28 %)	16/59 (27 %)	29/59 (49 %)
Dickdarm	4/10 (40 %)	3/10 (30 %)	3/10 (30 %)
andere / unbekannt	15/56 (27 %)	10/56 (18 %)	31/56 (55 %)

Tabelle 6: Übersicht der SCTR-Expression in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren

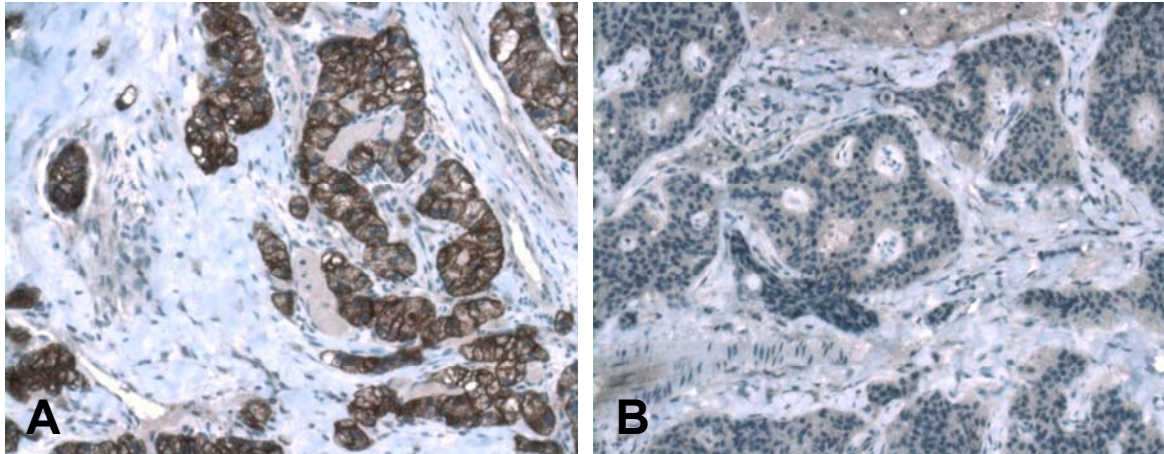


Abbildung 14: Expression des SCTR in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren. Die Paraffinschnitte von neuroendokrinen Tumoren wurden zunächst entparaffiniert und blockiert. Die Färbung erfolgte mit einem SCTR Antikörper (0,4 µg/ml, Sigma-Aldrich) dessen Lokalisation mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Bilder wurden mit dem Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss) in einer 100fachen Vergrößerung aufgenommen. **A) gastrointestinaler neuroendokriner Tumor (Lebermetastase) B) Gastrinom (Lebermetastase)**

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es sich beim SCTR um einen hochinteressanten potentiellen Zielrezeptor für die zielgerichtete Diagnostik von duktalem pankreatischen Adenokarzinomen und ösophagealen Plattenepithelkarzinomen handelt.

5.2 Optimierung des humanen Secretins für die zielgerichtete Tumordiagnostik

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der humane SCTR im duktalem Adenokarzinom des Pankreas und im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus stark exprimiert wird. Das nächste Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines SCTR-bindenden Trägerpeptids, welches nach der Kopplung an einen Farbstoff oder einen Radioliganden für die zielgerichtete Tumordiagnostik nutzbar ist. Das humane Secretin ist in seiner natürlichen Form als Trägerpeptid jedoch nicht optimal. Zum einen wäre es aufgrund der Länge von 27 Aminosäuren aufwendig und teuer in der Synthese und damit für eine Standardtherapie wenig geeignet. Vor allem aber konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von Secretin in humanem Blut, wie bei vielen Peptidliganden, mit zwei bis 30 min äußerst kurz ist [1.11]. Eine ausreichende Bindung eines Kontrastmittel-gekoppelten Secretins an den SCTR im Tumor erscheint nach intravenöser Injektion daher wenig realistisch.

Der folgende Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Optimierung des Secretins hinsichtlich seiner Länge und Aktivität im Hinblick auf die zielgerichtete Tumordiagnostik.

5.2.1 Etablierung einer hochdurchsatzfähigen Methode für die Messung der GPCR-Aktivierung

Für die Optimierung des Secretins zur zielgerichteten Tumordiagnostik stand zunächst die Etablierung einer funktionellen Methode im Vordergrund, um die Aktivität der modifizierten Peptide am SCTR messen zu können. Aufgrund der hohen pharmakologischen Bedeutung von GPCRs

stehen hierfür eine Vielzahl von möglichen Methoden zur Verfügung, die jedoch alle entsprechende Vor- und Nachteile besitzen. Die verwendete Methode sollte vor allem hochdurchsatzfähig sein, da von einer großen Menge an zu charakterisierenden Peptidliganden ausgegangen wurde. Außerdem sollte die verwendete Methode möglichst unabhängig von der spezifischen G-Protein-Kopplung eines GPCRs sein, um über eine universelle Methode für möglichst viele GPCRs zu verfügen. Daneben sollte die Methode so kostengünstig wie möglich sein. Unter den genannten Kriterien erschien die Methode der β -Arrestin2-GFP Translokation vielversprechend. Diese Technik basiert auf einer Zelllinie, die einen GPCR nach Wahl und das β -Arrestin2 der Ratte, welches C-terminal mit dem „green fluorescent protein“ (GFP) fusioniert ist, exprimiert. Die Bindung des entsprechenden agonistischen Liganden führt zu einer C-terminalen Phosphorylierung des Rezeptors und der Rekrutierung des β -Arrestin2-GFPs aus dem Zytoplasma zum GPCR an die Zellmembran, welches anschließend zusammen mit dem GPCR internalisiert wird. Es bilden sich dabei fluoreszierende Vesikel, während das β -Arrestin2-GFP in unstimulierten Zellen gleichmäßig im Zytoplasma verteilt bleibt [Abb.15/Abb.16]. Mit einem geeigneten Mikroskop und entsprechender Software werden diese Zustände quantifizierbar.

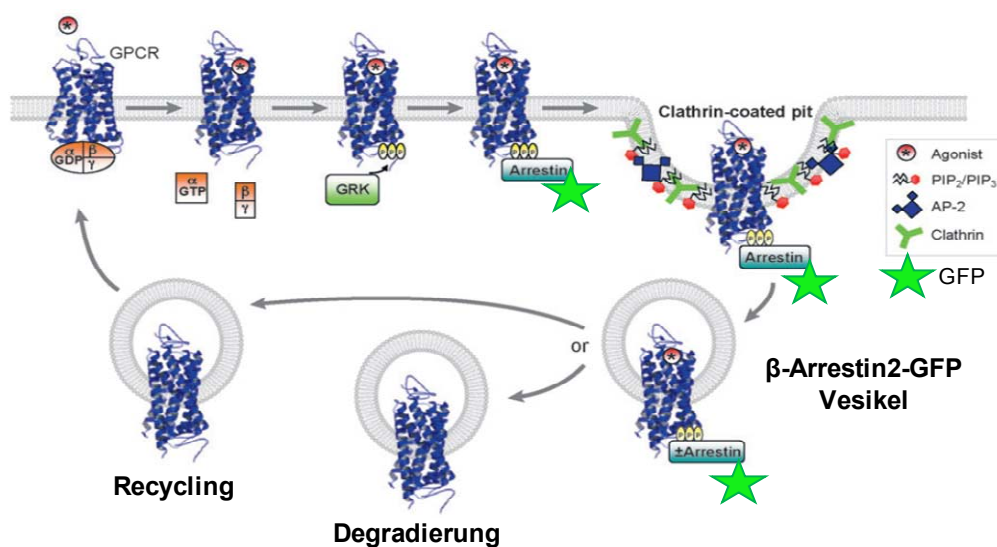


Abbildung 15: Prinzip der β -Arrestin2-GFP Translokation. U2OS-Zellen sind stabil mit dem β -Arrestin2-GFP der Ratte und einem GPCR der Wahl transfiziert. Durch die Bindung eines Agonisten wird der G-Protein-abhängige Signalweg des Rezeptors aktiviert und gleichzeitig seine Inaktivierung ausgelöst. Dabei wird der GPCR an seinem C-Terminus phosphoryliert, wodurch es zur Rekrutierung des β -Arrestin2-GFPs kommt, welches vorher homogen im Zytoplasma verteilt war. Es transloziert zunächst zum GPCR an die Zellmembran, wird dann aber zusammen mit dem Rezeptor über „Clathrin-coated pits“ in Vesikel aufgenommen. Anschließend kommt es rezeptorabhängig entweder zu einer Degradierung des GPCRs im Lysosom oder zu einem Recycling zurück an der Zellmembran. Die Vesikelbildung des β -Arrestin2-GFP wird dabei deutlich sichtbar und ist ein Maß für die Aktivierung des GPCRs. Grafik modifiziert nach Moore et al. 2007¹⁷⁷

Für die Generierung der nötigen Zelllinien wurden U2OS-Zellen verwendet, weil diese nicht nur ein großes Zytoplasma im Vergleich zum Nukleus besitzen, sondern auch stark adhären an den Zellkulturplatten wachsen, so dass zur Handhabung auch automatisierte Systeme genutzt werden können. Die U2OS-Zellen wurden zunächst transient mit dem β -Arrestin2-GFP der Ratte und

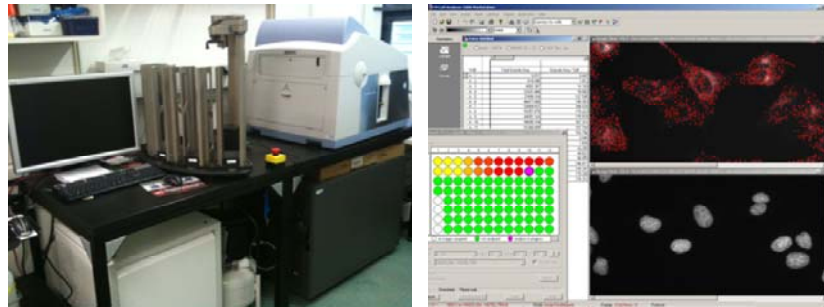
diversen GPCRs transfiziert, welche etwa 24 h später mit ihren entsprechenden Liganden stimuliert wurden. An lebenden Zellen konnte so die Translokation des β -Arrestin2-GFP in Vesikel beobachtet werden (nicht gezeigt) [4.4.5]. In diesen ersten Versuchen zeigte sich, dass die β -Arrestin2-GFP Translokation in der Tat ohne vorherige Kenntnisse über den aktivierten G-Protein-Signalweg funktioniert und daher sehr vielseitig einsetzbar ist.

Um die Reproduzierbarkeit der β -Arrestin2-GFP Translokation zu erhöhen, wurden U2OS-Zellen stabil mit dem β -Arrestin2-GFP der Ratte transfiziert und der Klon mit der gleichmäßigsten Expression selektiert [4.2.4]. Dieser diente anschließend als Ausgangsklon für die zweifach stabilen Zelllinien, die zusätzlich einen GPCR exprimieren [3.10.2]. Mit diesen Zelllinien war es nun möglich Konzentrations-Wirkungskurven mit hoher Reproduzierbarkeit zu erstellen und daraus die Konzentration halbmaximaler Aktivität (EC_{50}) bzw. die intrinsische Aktivität der Liganden zu berechnen [4.4.1]. Abschließend wurde die Inkubationszeit der Liganden sowie die Dauer der Fixierung und Permeabilisierung optimiert und die Anzahl der nötigen Waschschriffe reduziert, um einen hohen Durchsatz garantieren zu können.

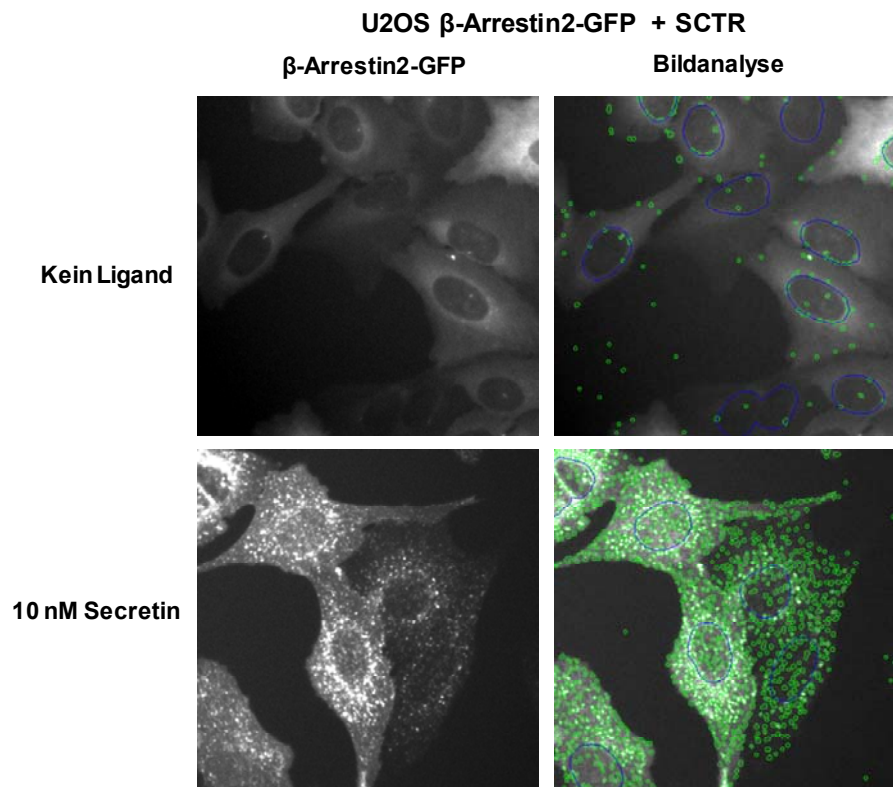
Parallel zu der Optimierung der biologischen Bedingungen erfolgte die Optimierung der Hard- und Software. Am IN Cell Analyzer 1000, einem automatisierten Fluoreszenzmikroskop [Abb.16 A], wurden die Belichtungszeiten im Blau- und Grünkanal so gewählt, dass die anschließende Analysesoftware die Zellkerne und Vesikel gerade noch erkennen konnte. Dies garantiert eine kurze Aufnahmezeit der Bilder und damit den höchstmöglichen Durchsatz. Zur Analyse der Bilder aus dem IN Cell Analyzer 1000 liefert GE Healthcare zwei mögliche Analyseprogramme: die IN Cell Investigator Software bietet vor allem vorgefertigte, einfach zu handhabende Algorithmen für Standardanwendungen während die IN Cell Developer Software dem Nutzer die größtmöglichen Freiheiten zur eigenen Algorithmusprogrammierung bietet. Für die β -Arrestin2-GFP Translokation wurden beide Programme getestet, dabei lieferte der vorgefertigte „Granularity Algorithmus“ der IN Cell Investigator Software die gewünschten Ergebnisse [Abb.16 B]. Hier erfolgte die Anpassung des Algorithmus an die verwendete Zelllinie hinsichtlich Zellkern- und Vesikelgröße und der Fluoreszenzintensität [4.4.1].

Für die Bildauswertung stehen letztendlich unterschiedliche Parameter zur Auswahl: die Fläche der β -Arrestin2-GFP-Vesikel, die Anzahl der Vesikel und die Intensität der Vesikel. Diese können entweder als Absolutwerte betrachtet werden, hierbei handelt es sich um die Summe der gemessenen Werte innerhalb eines aufgenommenen Bildes, der Absolutwert kann jedoch auch durch die Anzahl der erkannten Zellkerne im DAPI-Kanal, welches der Anzahl der Zellen entspricht, geteilt werden. Dadurch wird eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht, da der Fehler durch eine eventuell vorkommende inhomogene Zellaussaat automatisch herausgerechnet wird. Die Messung der „Intensität/Zelle“ erwies sich als ungeeignet, da es auch in der stabilen Zelllinie einzelne Zellen gibt, die eine übermäßig starke oder schwache β -Arrestin2-GFP Expression aufweisen. Außerdem konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität über längere Zellpassagen beobachtet werden. Die Werte der „Vesikelfläche/Zelle“ und der „Vesikelzahl/Zelle“ lieferten dagegen ähnlich konstante Ergebnisse, so dass letztendlich die „Vesikelfläche/Zelle“ als fester Parameter für die Auswertung der β -Arrestin2-GFP Translokation gewählt wurde.

A



B



C

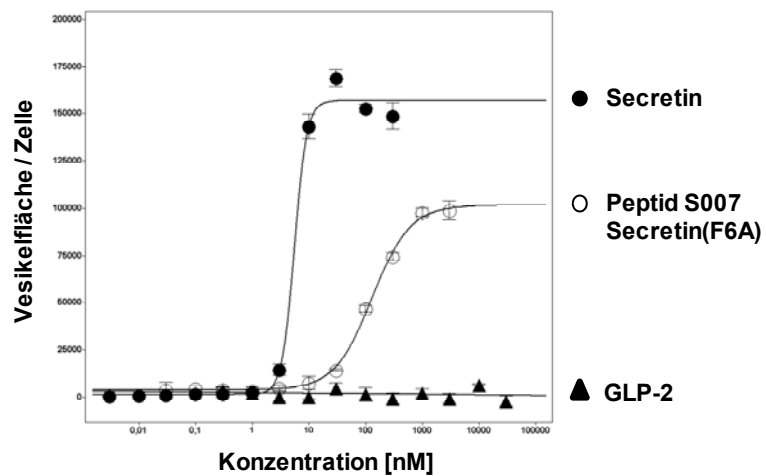


Abbildung 16: β -Arrestin2-GFP Translokation. A) **Hard- und Software.** Für die automatische Bildaufnahme wird der IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) verwendet, an den ein KinedX Laborroboter (Peak Robotics) für den automatischen Wechsel der Multiwell-Platten angeschlossen ist. Die Bildanalyse erfolgt mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software (GE Healthcare) B) **Bildanalyse.**

U2OS-Zellen, die das β -Arrestin2-GFP der Ratte und SCTR stabil exprimieren, wurden in 96well-Platten ausgesät. Die Inkubation mit Secretin in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Puffer erfolgte für 20 min bei 37°C in Duplikaten. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem 20x Objektiv im IN Cell Analyzer 1000, die Analyse der Bilder mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Analyzer Investigator Software. Die linke Spalte zeigt die Originalbilder, die rechte Spalte die Überlagerung der Software-detektierten Zellstrukturen. Blau: Zellkerne, die im DAPI-Kanal erkannt wurden (Originalbild nicht gezeigt), Grün: vesikuläre Strukturen **C) Konzentrations-Wirkungskurven.** Aus den "Vesikelfäche/Zelle"-Werten der Bildanalyse wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die Konzentration halbmaximaler intrinsischer Aktivität (EC_{50}) und die maximale intrinsische Aktivität berechnet. Dabei wurde die maximale intrinsische Aktivität des nativen Peptids, in diesem Fall Secretin, auf 100 % festgelegt und die intrinsischen Aktivitäten der anderen Peptide in Relation gesetzt. Für die gezeigten Peptide wurden folgende Werte berechnet: Secretin EC_{50} $3,26 \pm 0,80$ nM, Secretin(F6A) EC_{50} $155,16 \pm 30,79$ nM, intrinsische Aktivität: $61,83 \pm 4,92$ %. Das verwandte GLP-2 zeigt keine Reaktion und diente in den Versuchen als Kontrolle für die Rezeptorspezifität.

In Abbildung 16 C wird deutlich, dass mit der β -Arrestin2-GFP Translokation auch die Unterscheidung zwischen vollen und partiellen Agonisten möglich ist. Die gezeigte Secretin-Variante Secretin(F6A) verfügt lediglich über etwa 61 % der maximalen biologischen Aktivität des Wildtyp Secretins und ist daher ein partieller Agonist des SCTR [1.11.2]. Das außerdem im Versuch mitgeführte, verwandte Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) führt dagegen zu keiner Translokation des β -Arrestin2-GFPs, was für die Spezifität der verwendeten Zelllinie für den SCTR spricht.

Mit der β -Arrestin2-GFP Translokation war nun eine Methode etabliert, die nicht nur G-Protein-unabhängig, sondern auch einfach in der Handhabung, gut reproduzierbar und darüber hinaus sehr kostengünstig ist.

5.2.2 Die β -Arrestin2-GFP Translokation im Vergleich mit cAMP-Messungen

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Rezeptoren SCTR und GLP-2R binden beide nach Kontakt mit ihren Liganden an das $G\alpha_s$ -Protein, dessen Aktivierung zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Traditionell werden daher für diese Rezeptoren Methoden verwendet, die diesen Anstieg messen. Um die gewonnenen Daten aus der β -Arrestin2-GFP Translokation mit den Werten vorangegangener Publikationen vergleichen zu können wurden für Secretin und GLP-2 zusätzlich Konzentrations-Wirkungskurven auf der Basis des cAMP-Anstiegs erstellt.

Peptid	Rezeptor	β -Arr2-GFP EC_{50} [nM]	cAMP EC_{50} [nM]
Secretin	SCTR	$3,26 \pm 0,80$	$0,0012 \pm 0,0003$
GLP-2	GLP-2R	$1,84 \pm 0,90$	$0,068 \pm 0,020$

Tabelle 7: Vergleich der β -Arrestin2-GFP Translokation mit cAMP-Messungen. Für Secretin und GLP-2 wurde die EC_{50} in der β -Arrestin2-GFP Translokation [4.4.1] und in cAMP-Messungen bestimmt. Dafür wurden U2OS-Zellen verwendet, die den jeweiligen Rezeptor (SCTR bzw. GLP-2R) und entweder β -Arrestin2-GFP oder den cAMP GloSensor™ stabil exprimieren. Die cAMP-Messungen wurde mit der cAMP GloSensor™-Methode nach Herstellerangaben durchgeführt [4.4.2]. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse aus Tabelle 7 zeigen, dass die EC_{50} -Werte der cAMP-Messung deutlich unter denen der β -Arrestin2-GFP Translokation liegen. Dies konnte auch für andere Rezeptoren beobachtet werden und es wird allgemein angenommen, dass der Grund für diesen Unterschied in der Signalamplifikation liegt. In der β -Arrestin2-GFP Translokation erfolgt die Auswertung rezeptornah in einem 1:1-Verhältnis, während dem cAMP-System eine längere Signalamplifikationskaskade vorausgegangen ist.

Da die β -Arrestin2-GFP Translokation experimentell einfacher und um ein vielfaches kostengünstiger ist, wurde sie als die Methode erster Wahl für die Analyse der sich anschließenden, großen Peptidbibliotheken verwendet. cAMP-Messungen wurden als Methode zweiter Wahl für einzelne ausgewählte Peptide durchgeführt und sind im entsprechenden Teil dieser Arbeit genauer beschrieben.

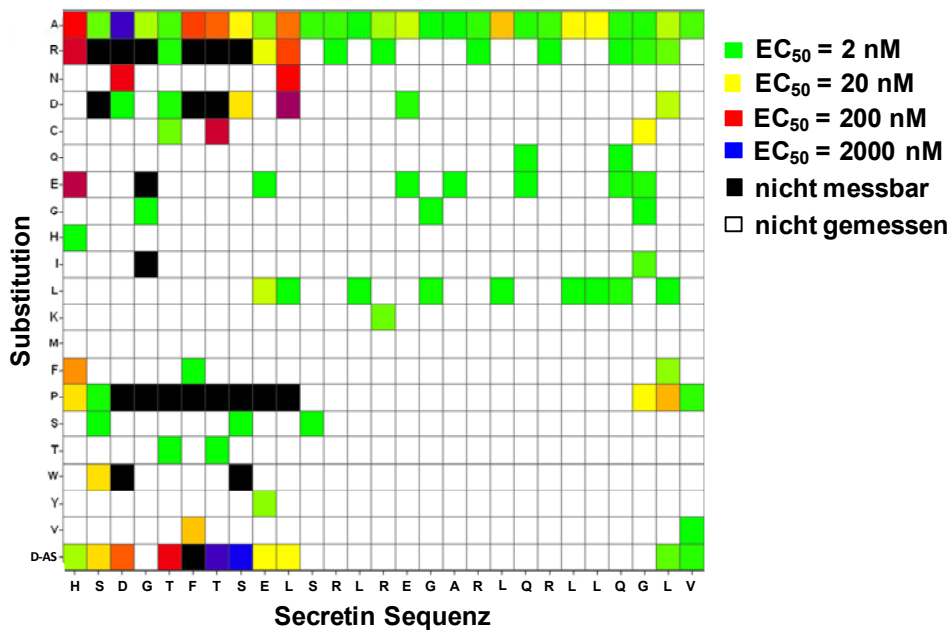
Nach erfolgreicher Etablierung eines geeigneten Systems zur Charakterisierung von Secretin-Varianten konnte nun mit der eigentlichen Optimierung des Secretins für die zielgerichtete Tumordiagnostik begonnen werden.

5.2.3 Aktivierung des SCTR durch Alanin-substituierte Secretin-Varianten

In der Literatur waren zu Beginn dieser Arbeit nur einzelne Aminosäuresubstitutionen im Secretin beschrieben, ein systematischer Ansatz fehlte. Aus diesem Grund wurde zunächst jede Aminosäure des Secretin einzeln durch Alanin substituiert, um einen ersten Überblick über die Relevanz jeder einzelnen Aminosäure für seine agonistische Aktivität zu erlangen. Jedes dieser synthetisierten Peptide wurde in der β -Arrestin2-GFP Translokation mit SCTR- und β -Arrestin2-GFP-exprimierenden U2OS-Zellen in einer Verdünnungsreihe gemessen und die EC_{50} bzw. die intrinsische Aktivität berechnet [Abb.17, Zeilen „A“]. Dabei zeigte sich, dass die für den Agonismus wichtigen Aminosäuren vor allem im N-Terminus des Secretin liegen. Dies konnte durch bereits publizierte Ergebnisse an verwandten Peptiden erwartet werden [1.4.2]. Die Substitution des Aspartats an Position 3 führte zu einer etwa 500fachen Verschlechterung der EC_{50} , die Substitutionen von His1, Phe6, Thr7 und Leu10 erhöhten die EC_{50} etwa um den Faktor 60-70. Alle anderen Aminosäuren konnten ohne großen Potenzverlust durch Alanin ersetzt werden. Die intrinsische Aktivität wurde lediglich durch die Substitutionen an Asp3 und Phe6 beeinflusst, diese sank auf etwa 60 % im Vergleich zum Wildtyp-Secretin.

5.2.4 Aktivierung des SCTR durch weitere Substitutionsvarianten des Secretin

Im Anschluss an die Alanin-Substitutionen sollte untersucht werden welche Eigenschaften einer Aminosäure für die jeweilige Position im Peptid von Bedeutung sind. Es wurden dabei pro Position etwa fünf Substitutionen mit Aminosäuren unterschiedlicher Eigenschaften, inklusive der jeweiligen D-Aminosäuren, vorgenommen, wobei der Fokus auf den N-terminalen und C-terminalen Aminosäuren des Secretin lag [Abb.17].

A) Potenz (EC_{50})

B) Intrinsische Aktivität

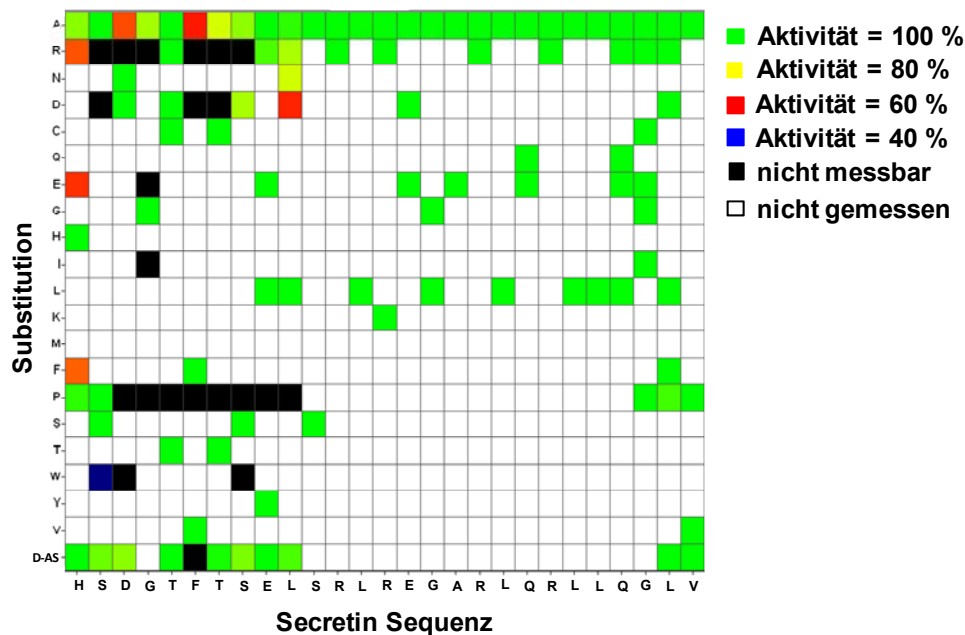


Abbildung 17: Substitutionen einzelner Aminosäuren des Secretin. Einzelne Aminosäuren des humanen Secretin wurden durch andere natürliche bzw. die jeweiligen D-Aminosäuren substituiert und eine β -Arrestin2-GFP Translokation der entstehenden Peptide mit β -Arrestin2-GFP- und SCTR-exprimierenden U2OS-Zellen durchgeführt. Dabei wurden für jedes Peptid Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die Potenz ($=EC_{50}$) (A) und die intrinsische Aktivität (B) berechnet, welche in der Abbildung farblich dargestellt sind. Auf der x-Achse der Graphik ist die native Sequenz des Secretin aufgeführt, die y-Achse zeigt die jeweils eingefügte Aminosäure. D-AS bedeutet die Substitution durch die native Aminosäure in D-Konformation. **A)** Grün gefärbte Aminosäuren können durch die jeweils angegebene Aminosäure ersetzt werden ohne dass die EC_{50} erhöht wird (EC_{50} des nativen Secretin: $3,26 \pm 0,80 \text{ nM}$), während die EC_{50} im Verlauf von gelb über rot nach schwarz schlechter wird. **B)** Grün gefärbte Aminosäure-Substitutionen haben eine ähnliche intrinsische Aktivität wie das humane Secretin (100 %). Diese nimmt über gelb, rot und blau nach schwarz ab. Alle dargestellten Werte stellen den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. Tabelle I im Anhang zeigt die absoluten Werte.

Das N-terminale Histidin konnte ohne große Potenzverluste mit D-His substituiert werden, Prolin verschlechterte dagegen die EC_{50} um den Faktor 10. Die saure Glutaminsäure bzw. das basische Arginin setzten die EC_{50} sogar um den Faktor 200 herab. Die genannten Aminosäuren sorgten außerdem für eine Verschlechterung der intrinsischen Aktivität des Peptids. An Position 2 des Secretin ist eine kleine, ungeladene Aminosäure nötig. Der Austausch des Glycins zu Ala oder Pro (oder auch Abu) war ohne Einschränkung möglich, während die Substitution zu Arg, Asp und Trp zu starken Einbußen in Potenz und/oder Aktivität führte.

Das Aspartat an Position 3 zeigte sich als sehr empfindlich gegenüber Substitutionen, D-Asp und Asn erhöhten die EC_{50} um den Faktor 50-100, bei Substitutionen zu Arg, Pro und Trp war keinerlei agonistische Aktivität zu messen. Auch an Position 4 (nativ: Glycin) wurde, mit Ausnahme von Ala, keine der untersuchten Substitutionen toleriert.

Das Threonin in Position 5 des Secretin zeigte sich dagegen als sehr flexibel. Mit Ausnahme von Pro und D-Thr konnte hier jede der eingesetzten Aminosäuren verwendet werden.

Das Phenylalanin an Position 6 ist eine hochkonservierte Aminosäure in allen Peptiden der Klasse B GPCRs [Abb.5]. Dies spiegelt sich auch in den möglichen Substitutionen wider. Alanin und Valin an dieser Position führen zu einer messbaren, wenn auch schlechteren, EC_{50} , alle anderen untersuchten Aminosäuren konnten nicht ohne Verlust der kompletten Aktivität eingesetzt werden.

Auch das Threonin an Position 7 scheint eine tragende Rolle für die agonistische Reaktion zu spielen. Substitutionen führten auch hier in jedem Fall zu starken Einschränkungen.

Das Serin an Position 8 konnte mit nur leicht erhöhter EC_{50} durch Asp ersetzt werden, Arg, Pro, Trp und auch D-Ser waren kaum bzw. gar nicht möglich.

Bis auf die Substitution zu Pro zeigte sich die Glutaminsäure an Position 9 flexibel. Auch Leucin an Position 10 war nicht durch Pro zu ersetzen, die anderen untersuchten Positionen erhöhten in den meisten Fällen die EC_{50} um den Faktor 45-300.

Ab Position 11 zeigte Secretin eine hohe Flexibilität gegenüber einzelnen Substitutionen [Abb.17].

5.2.5 Aktivierung des SCTR durch N- oder C-terminal verkürzte Secretin-Varianten

Um eine kürzere, leichter synthetisierbare und damit kostengünstigere Variante des Secretin herzustellen wurde das Secretin in seiner originalen Sequenz sukzessive vom C-Terminus und vom N-Terminus her verkürzt und die Messungen der Potenz und der Aktivität mit der β -Arrestin2-GFP Translokation begonnen. Es zeigte sich jedoch, dass mit dieser Methode kaum Peptide innerhalb der möglichen Konzentrationsspanne gemessen werden konnten.

Wie schon in Abschnitt 5.2.2 gezeigt, hat Secretin in der β -Arrestin2-GFP Translokation eine vielfach höhere EC_{50} im Vergleich zu cAMP-Messungen. Daher wurde für die Charakterisierung der verkürzten Peptide die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Peptidzugabe mit der GloSensorTM-Methode gemessen [4.4.2], um den maximal möglichen Messbereich zu vergrößern. Abbildung 18 zeigt die normalisierten EC_{50} -Werte der Peptide im Vergleich zu humanem Secretin, welches sich in der obersten Reihe befindet. Es wird dabei deutlich sichtbar, dass die EC_{50} der Peptide mit zunehmender Verkürzung, sowohl C- als auch N-terminal, um ein Vielfaches schlechter wird.

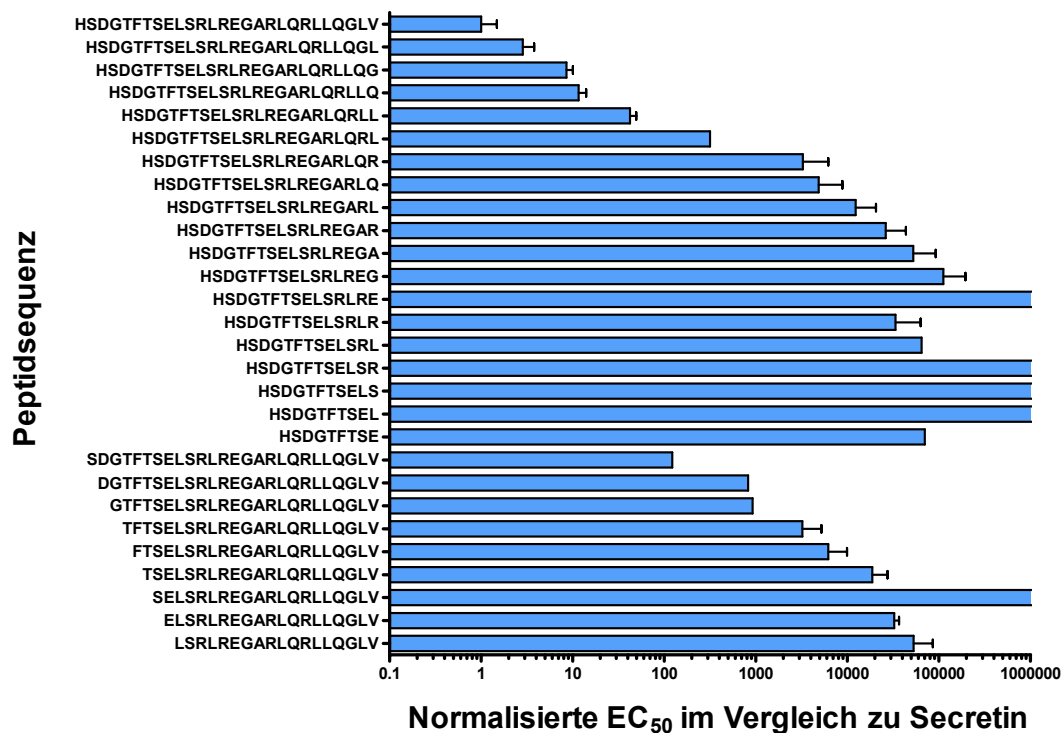


Abbildung 18: Aktivierung des SCTR durch N- oder C-terminal verkürzte Secretin-Varianten: Das 27 Aminosäuren lange humane Secretin wurde sukzessive C- oder N-terminal verkürzt. Die entstehenden Peptide wurden in Verdünnungsreihen auf U2OS-Zellen mit stabiler SCTR-Expression gegeben, die gleichzeitig das GloSensorTM-Plasmid tragen. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurde der Anstieg des intrazellulären cAMP gemessen und Konzentrations-Wirkungskurven erstellt, aus denen die EC₅₀ und die intrinsische Aktivität der Peptide berechnet wurde. Zur verbesserten Darstellung wurde in dieser Abbildung die EC₅₀ des Secretin auf den Wert 1 festgelegt (obere Reihe), die Werte aller verkürzten Peptide wurden entsprechend normalisiert und logarithmisch aufgetragen. Die dargestellten Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. Die absoluten Werte sind in Tabelle II im Anhang aufgelistet.

5.2.6 Aktivierung des SCTR durch Kombinationen aus N- und C-terminal verkürzten Secretin-Varianten

Aus den vorangegangenen Ergebnissen wird deutlich, dass sowohl der N-, als auch der C-Terminus des Secretin für die Aktivierung des SCTR benötigt wird. Daher stellte sich die Frage, ob es möglich ist den SCTR mit zwei voneinander unabhängigen Peptiden zu aktivieren. Ein „C-terminales Peptid“ sollte dabei an die extrazelluläre Domäne des SCTR binden und für eine Konformationsänderung sorgen, die die Bindung des „N-terminalen Peptids“ möglich macht, welches daraufhin den SCTR aktiviert.

Zur Überprüfung dieser Theorie wurden entsprechende „N- und C-terminale“ Peptide ausgewählt und einzeln oder in Kombinationen auf SCTR- und GloSensorTM-exprimierende U2OS-Zellen gegeben [Tab.8]. Dabei wurde jedes Peptid in einer Konzentration von 15 µM eingesetzt und die entstehende cAMP-Konzentration gemessen. Es zeigte sich jedoch, dass keine der Peptidkombinationen die cAMP-Bildung stärker anregte als die jeweils eingesetzten Peptide alleine [5.2.5].

Für die Aktivierung des SCTR scheint daher ein zusammenhängendes Peptid nötig zu sein, welches sowohl über den N- als auch über den C-Terminus verfügt.

Peptid-kombinationen	Sequenzen
S116 + S142	HSDGTFTSELSRLR SELSRLREGARLQRLQGLV
S116 + S143	HSDGTFTSELSRLR ELSRLREGARLQRLQGLV
S116 + S144	HSDGTFTSELSRLR LSRLREGARLQRLQGLV
S118 + S144	HSDGTFTSELSR SELSRLREGARLQRLQGLV
S119 + S144	HSDGTFTSELS SELSRLREGARLQRLQGLV
S120 + S144	HSDGTFTSEL SELSRLREGARLQRLQGLV
S121 + S144	HSDGTFTSE LSRLREGARLQRLQGLV

Tabelle 8: Verwendete Kombinationen aus N- und C-terminalen verkürzten Secretin-Peptidvarianten

5.2.7 Untersuchung von 10/11meren mit N-terminaler Secretin-Sequenz

Lange Zeit erschien es unmöglich, verkürzte, peptidische Liganden für GPCRs der Klasse B zu entwickeln. Dies änderte sich mit der Veröffentlichung eines elf Aminosäuren langen Agonisten des Glucagon-like peptide-1-Rezeptors (GLP-1R)^{178,179}. Für dessen Entwicklung wurden die ersten neun Aminosäuren des GLP-1 beibehalten und die Positionen 10 und 11 mit nicht-natürlichen Aminosäuren besetzt. Nach diesem System sollte nun auch ein kurzer Agonist gegen den SCTR gefunden werden. Dafür wurde eine Peptidbibliothek mit Peptiden erstellt, die dem Schema in Abbildung 19 A folgen.

Die ersten neun beziehungsweise zehn Aminosäuren (in schwarz dargestellt) entsprechen dabei dem humanen Secretin. Die Positionen 10, 11 oder 10 plus 11 wurden jeweils mit natürlichen oder nicht-natürlichen Aminosäuren aufgefüllt (in rot dargestellt). Während der Herstellung der Peptidbibliothek wurde darauf geachtet, dass sämtliche Eigenschaften der Aminosäuren (groß, klein, sauer, basisch,...) vertreten waren. Eine Auflistung aller untersuchten Peptide mit den entsprechenden nicht-natürlichen Aminosäuren ist im Anhang in den Tabellen I und II zu finden.

Die Peptide wurden zunächst in der β -Arrestin2-GFP Translokation auf β -Arrestin2-GFP und SCTR-exprimierenden U2OS-Zellen nach Standardprotokoll eingesetzt [4.4.1]. Es zeigte allerdings keines der Peptide eine agonistische Reaktion im Vergleich zum mitgeführten nativen Secretin. Daher wurde anschließend noch eine funktionelle cAMP-Messung nach der GloSensorTM-Methode mit SCTR- und GloSensorTM-exprimierenden U2OS-Zellen durchgeführt [4.4.2]. Bei allen Peptiden war ein leichter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ab etwa 10 μ M Peptid messbar. Da

aber auch die „Basispeptide“ der Bibliothek mit der Sequenz HSDGTFTSE(L) diese Potenz aufwiesen, konnte von keiner Optimierung der Peptide durch die modifizierten Positionen 10 und 11 ausgegangen werden. Auch hier wurde in jedem Versuch das native Secretin in einer Konzentration von 10 nM als Positivkontrolle mitgeführt.

A

HSDGTFTSE + X

HSDGTFTSEL + X

HSDGTFTSE + X + X

B

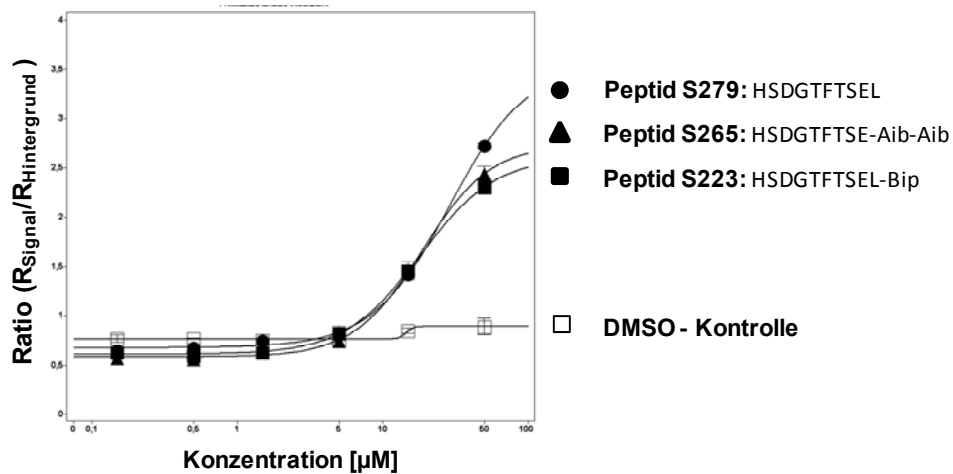


Abbildung 19: 10/11mere. A) Schema der hergestellten 10/11mere. Die ersten 9 bzw. 10 Aminosäuren des humanen Secretin wurden beibehalten (schwarz) und die Position 10, 11 oder 10 + 11 (rot) wurde jeweils mit natürlichen oder nicht-natürlichen Aminosäuren besetzt. Die genauen Peptidsequenzen der verwendeten Peptidbibliothek sind in den Tabellen I und II im Anhang aufgelistet. **B) Agonistische Aktivität der 10/11mere im cAMP-Assay:** Die Peptide wurden von 50 μM absteigend in einer Verdünnungsreihe auf SCTR- und GloSensor™-exprimierende U2OS-Zellen gegeben und die cAMP-Bildung mit der cAMP GloSensor™-Methode gemessen. Die drei abgebildeten Kurven stehen dabei exemplarisch für die gesamte Bibliothek, die durchweg ähnliche Aktivitäten zeigte. Aufgrund des Einsatzes von hohen Peptidkonzentrationen wurde in allen Versuchen eine DMSO-Kontrolle entsprechend des DMSO-Gehalts der Peptidlösung mitgeführt.

Eine Verdrängung von 10 nM Secretin-IDCC, einer Fluoreszenz-markierten Secretin-Variante [siehe auch 5.2.9], durch die 10/11mere auf SCTR-exprimierenden U2OS-Zellen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der N-terminalen Sequenzen aller GPCR Klasse B-Peptide erschien eine Aktivierung anderer Secretin-ähnlicher Rezeptoren durch die modifizierten Peptide möglich. Daher sollte abschließend geklärt werden, ob Peptide dieser Bibliothek möglicherweise als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Agonisten andere Rezeptoren in Frage kommen. Es konnte allerdings auch keine β-Arrestin2-GFP Translokation in GLP-2R-, VIP1R-, VIP2R- oder Glucagon-Rezeptor (GCGR)-exprimierenden U2OS-Zellen gemessen werden.

Für den SCTR war es auf diese Weise nicht möglich, kurze potente Agonisten nach dem Vorbild des publizierten GLP-1R-Agonisten zu entwickeln. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass für eine Aktivierung des SCTR sowohl der N- als auch der C-terminale Teil des Secretins zwingend vorhanden sein muss, wobei der N-terminale Teil für die Aktivierung des SCTR die primäre Rolle zu spielen scheint.

5.2.8 Entwicklung von Secretinrezeptor-Antagonisten

Das Ziel dieser Arbeit stellt die erste Entwicklung eines Trägerpeptids für die zielgerichtete Tumordiagnostik und -therapie dar. Dabei ist die hochaffine Bindung des Peptids an den überexprimierten GPCR von Bedeutung, während die Aktivierung eines Signalwegs zunächst eine untergeordnete Rolle spielt. Daher sollten nun auch antagonistisch wirkende Secretin-Varianten in die Untersuchung miteinbezogen werden.

Als SCTR-Antagonisten werden bisher vor allem N-terminal verkürzte oder modifizierte Secretin-Varianten verwendet, zum Beispiel Secretin(7-27) oder Pseudopeptide, in denen Peptidbindungen verändert wurden^{94,95}. Diese binden zwar alle an den SCTR und verdrängen das humane Secretin vom Rezeptor, haben jedoch meist eine geringe Affinität und/oder zusätzlich noch schwache agonistische Aktivität. Ein potenter, voller SCTR-Antagonist wäre also nicht nur für die Diagnostik von Pankreas- und Ösophaguskarzinomen interessant, sondern auch für pharmakologische und physiologische Untersuchungen des SCTR von allgemeinem Interesse.

5.2.9 Modifikation der β -Arrestin2-GFP Translokation für die Untersuchung von Antagonisten

Um die Aktivität von Antagonisten am SCTR zu untersuchen, musste zunächst das Protokoll der β -Arrestin2-GFP Translokation modifiziert werden. Die entsprechend veränderte Methode misst die Fähigkeit eines Peptids zur Verdrängung einer IDCC-markierten Secretin-Variante. IDCC ist ein nahinfraroter Fluoreszenzfarbstoff, der im Mikroskop mit den üblichen Filtern für Cy5 genutzt werden kann, sich jedoch auch für die später geplante Kleintier-Bildgebung eignet.

Um einen störenden Einfluss des IDCCs am Peptid ausschließen zu können, wurde zunächst die agonistische Aktivität des Secretin-IDCC am SCTR in der β -Arrestin2-GFP Translokation bestimmt. Das Secretin-IDCC aktivierte den SCTR dabei mit einer EC_{50} von $3,02 \pm 0,02$ nM, was der EC_{50} des nativen Secretins von $3,26 \pm 0,80$ nM entspricht. Da das Secretin-IDCC zusammen mit dem β -Arrestin2-GFP in endosomale Vesikel transloziert, können neben den β -Arrestin2-GFP-Vesikeln auch die Secretin-IDCC-Vesikel quantitativ mit dem *Granularity Algorithmus* ausgewertet werden. Es zeigte sich, dass die beiden Parameter gleiche Ergebnisse liefern und daher parallel verwendet werden können [Abb.20 A/B].

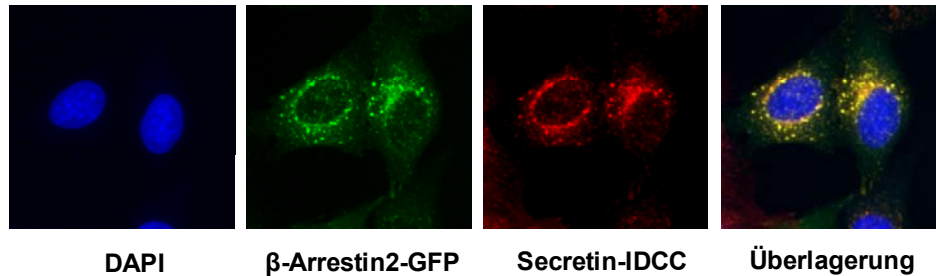
Eine weitere Spezifitätskontrolle ist die Verdrängung des Secretin-IDCC durch das native Secretin. Dafür wurden β -Arrestin2-GFP und SCTR-exprimierenden U2OS-Zellen zunächst mit dem nativen Secretin in unterschiedlichen Konzentrationen für 5 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde der IDCC-markierte Agonist in einer Konzentration von 10 nM zugegeben und die Zellen für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem etablierten Standardprotokoll

A

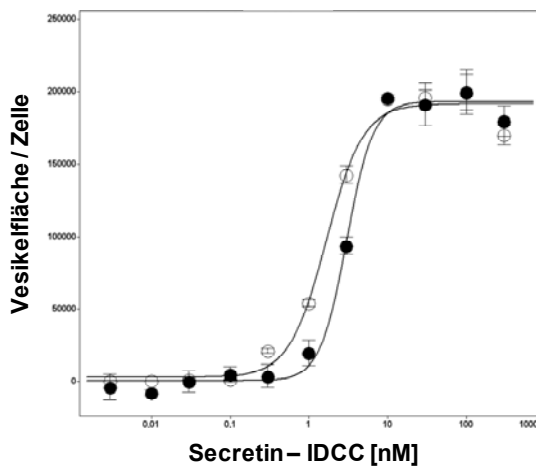
HSDGFTTSELSRLREGARLQRLQLGLV**KSGS**



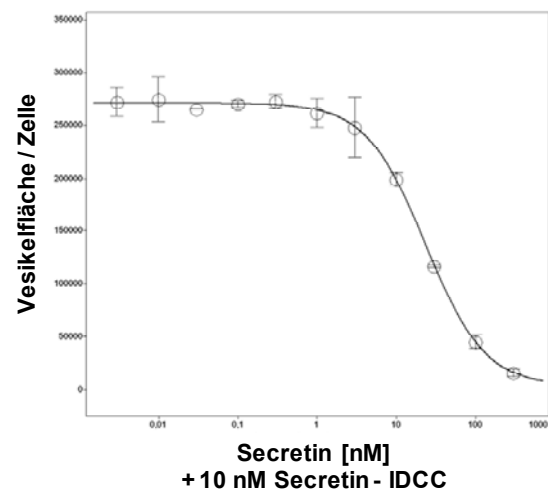
B



C



D



- Auswertung der β -Arrestin2-GFP Vesikel
- Auswertung der Secretin-IDCC Vesikel

Abbildung 20: Secretin-IDCC: A) Aminosäuresequenz des Secretin-IDCC. Die 27 Aminosäuren des humanen Secretins wurden aus Synthesegründen C-terminal um die Sequenz KSGS (rot) verlängert, das IDCC (Stern) wurde an das Lysin gekoppelt. **B) β -Arrestin2-GFP Translokation des Secretin-IDCC:** U2OS-Zellen, die β -Arrestin2-GFP und SCTR stabil exprimieren, wurden für 20 min bei 37°C mit 10 nM Secretin-IDCC inkubiert und anschließend fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte im IN Cell Analyzer 1000, die Überlagerung der Bilder in Adobe Photoshop. **C) Konzentrations-Wirkungskurve von Secretin-IDCC:** Secretin-IDCC wurde in einer Verdünnungsreihe zu β -Arrestin2-GFP und SCTR stabil exprimierenden U2OS-Zellen gegeben und die β -Arrestin2-GFP Translokation analog B) durchgeführt. Die Vesikelbildung im GFP- und im IDCC-Kanal wurde mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Analyzer Investigator Software ausgewertet. Aus den erhaltenen Vesikelfläche/Zelle-Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und EC_{50} -Werte berechnet. Zur besseren Darstellung wurden der höchste Wert der IDCC-Kurve dem höchsten Wert der GFP-Kurve gleichgesetzt und alle anderen Werte der IDCC-Kurve entsprechend normalisiert. Dies ist nötig weil die Auswertung des Secretin-IDCC aufgrund stärkerer Fluoreszenz grundsätzlich höhere absolute Werte ergibt, was jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der Kurven und die daraus berechneten Werte hat. EC_{50} der β -Arrestin2-GFP-Auswertung: $3,02 \pm 0,12$ nM, EC_{50} der Secretin-IDCC-Auswertung: $1,45 \pm 0,54$ nM. **D) Verdrängung des Secretin-IDCC durch Secretin:** U2OS-Zellen, die β -Arrestin2-GFP und SCTR stabil exprimieren, wurden zunächst für 5 min bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen Secretin inkubiert. Daraufhin wurde konstant 10 nM Secretin-IDCC appliziert und die Zellen für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte analog B). Die Vesikelbildung im IDCC-Kanal wurde mit dem *Granularity Algorithmus* ausgewertet und die Vesikelfläche/Zelle-Werte in Abhängigkeit der applizierten Secretinkonzentration aufgetragen. IC_{50} : $22,26 \pm 0,93$ nM. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

der β -Arrestin2-GFP Translokation [4.4.1]. Dabei zeigte sich eine Internalisierung des Secretin-IDCC in endosomale Vesikel, die in Abhängigkeit von der eingesetzten Secretin-Konzentration erfolgte [Abb.20 D]. Die Spezifität des Secretin-IDCC war damit nachgewiesen.

Die Verdrängung von 10 nM Secretin-IDCC vom SCTR, analog Abb.20 D, erwies sich gleichzeitig als geeignet für die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) antagonistisch wirkender Peptide [4.4.1].

5.2.10 Antagonistische Aktivität N-terminal verkürzter Secretin-Varianten

Der Ausgangspunkt für die Entwicklung von Antagonisten für GPCRs der Klasse B ist in den meisten Fällen eine Deletion am N-Terminus des Peptidliganden. Dieser Ansatz war auch der Ausgangspunkt dieser Arbeit. Die Peptide wurden vorher schon auf ihren Agonismus am SCTR untersucht und zeigten hier nur geringe bis gar keine Aktivität [5.2.5]. Nun wurden sie in der modifizierten β -Arrestin2-GFP Translokation für die Messung von Antagonisten in Verdünnungsreihen eingesetzt und ihre IC_{50} gegenüber 10 nM Secretin-IDCC bestimmt. In Tabelle 9 wird deutlich, dass auch die IC_{50} der Peptide mit zunehmender Verkürzung am N-Terminus schlechter wird.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP + 10nM Secretin-IDCC IC_{50} [nM]
S136	SDGTFTSELSRLREGARLQRLQGLV	1283,01 \pm 703,06
S137	DGTFTSELSRLREGARLQRLQGLV	1735,62 \pm 590,35
S138	GTFTSELSRLREGARLQRLQGLV	1917,23 \pm 355,66
S139	TFTSELSRLREGARLQRLQGLV	2588,12 \pm 317,15
S140	FTSELSRLREGARLQRLQGLV	2338,18 \pm 366,01
S141	TSELSRLREGARLQRLQGLV	-
S142	SELSRLREGARLQRLQGLV	2727,94 \pm 60,50
S143	ELSRREGARLQRLQGLV	-
S144	LSRREGARLQRLQGLV	-

Tabelle 9: Antagonistische Aktivität N-terminal verkürzter Secretin-Varianten. (-) keine messbare Reaktion. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

5.2.11 Substitutionen an N-terminal verkürzten Secretin-Varianten

Aus den Ergebnissen der Tabelle 9 war zu schließen, dass für die antagonistische Bindung des Secretin an den SCTR auch N-terminale Aminosäuren eine Rolle spielen. Die nächste Idee bestand nun darin, durch zusätzliche Substitutionen am verkürzten N-Terminus des Secretin die Affinität für den SCTR wieder zu erhöhen und damit einen verbesserten Antagonisten zu gewinnen. Dazu wurde die jeweils N-terminale Aminosäure von Secretin(4-27), Secretin(5-27) und Secretin(7-27) (= S138, S139 und S141) durch natürliche Aminosäuren unterschiedlicher

chemischer Eigenschaften (Alanin, Arginin, Glutaminsäure bzw. Tryptophan) substituiert und die IC_{50} in der β -Arrestin2-GFP Translokation bei Vorhandensein von 10 nM Secretin-IDCC gemessen. Dabei zeigte sich, dass ein N-terminales Tryptophan bei allen Verkürzungen die niedrigste IC_{50} aufwies, wobei die Substitutionen am Secretin(5-27) vorteilhafter waren als die am Secretin(4-27). Substitutionen an Secretin(7-27) führten lediglich bei der Tryptophan-Substitution zu einer messbaren IC_{50} [Tab.10]. Keines der untersuchten Peptide zeigte dabei in der β -Arrestin2-GFP Translokation eine agonistische Wirkung.

Für die Peptide S156 und S191 wurden zusätzlich cAMP GloSensor™-Messungen durchgeführt. Beide Peptide zeigten dabei eine agonistische Reaktion mit einer EC_{50} von $12,69 \pm 6,66$ bzw. $39,72 \pm 22,86$ nM. Die intrinsische Aktivität der Peptide lag jedoch lediglich bei $13,40 \pm 2,69$ % für S156 bzw. $50,67 \pm 10,75$ % für S191. Da eine zusätzliche agonistische Aktivität für die Entwicklung von reinen Antagonisten unerwünscht ist, wurde aus diesem Grund das in dieser Messung schwächere Peptid S156 als Ausgangspeptid für weitere Modifikationen gewählt.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP + 10nM Secretin-IDCC IC_{50} [nM]
S145	RFTTSELSRLREGARLQRLQGLV	812,45 \pm 372,01
S146	EFTTSELSRLREGARLQRLQGLV	1348,30 \pm 468,45
S147	WFTTSELSRLREGARLQRLQGLV	272,21 \pm 59,35
S148	ATFTSELSRLREGARLQRLQGLV	775,80 \pm 330,46
S156	RFTSELSRLREGARLQRLQGLV	259,75 \pm 144,78
S190	EFTSELSRLREGARLQRLQGLV	374,30 \pm 150,40
S191	WFTSELSRLREGARLQRLQGLV	207,40 \pm 23,65
S195	AFTSELSRLREGARLQRLQGLV	505,80 \pm 241,64
S210	RSELSRLREGARLQRLQGLV	-
S211	ESELSRLREGARLQRLQGLV	-
S212	WSELSRLREGARLQRLQGLV	1013,08 \pm 751,52
S213	ASELSRLREGARLQRLQGLV	-

Tabelle 10: Substitutionen an N-terminal verkürzten Secretin-Varianten. Substituierte Aminosäuren im Vergleich zum humanen Secretin sind grau hinterlegt. (-): keine messbare Reaktion. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Zunächst wurde im Peptid S156 [Tab.10], welches S159 entspricht [Tab.11], das substituierte Arginin durch ein D-Arginin ersetzt, da sich D-Aminosäuren an den Peptidenden sehr häufig positiv auf deren Stabilität auswirken. Die dadurch bedingte leichte Verschlechterung der IC_{50} wurde dabei toleriert [Tab.11, S161]. Es ist dabei zu bemerken, dass alle Peptide aus der Peptidbibliothek in Tabelle 11 insgesamt eine höhere IC_{50} aufwiesen als die Peptide der Peptidbibliothek in Tabelle 10, was durch entsprechende Kontrollpeptide belegt werden konnte. Dies ist bei der

Verwendung von Syntheserohprodukten nicht auszuschließen. Aus diesem Grund sind die IC_{50} -Werte der Tabelle 11 höher als die der Tabelle 10, das in beiden Peptidbibliotheken vorhandene Secretin(5-27;G5R) (= S156 und S159) kann dabei jedoch als Referenzpeptid angesehen werden.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP + 10nM Secretin-IDCC IC_{50} [nM]
S159	RFTSELSRLREGARLQRLQGLV	924,95 ± 237,65
S161	rFTSELSRLREGARLQRLQGLV	1361,71 ± 322,28
S162	rATSELSRLREGARLQRLQGLV	1757,97 ± 322,18
S163	rFASELSRLREGARLQRLQGLV	1612,47 ± 185,83
S164	rFTAELSLREGARLQRLQGLV	897,53 ± 108,14
S165	rFTSALSRLREGARLQRLQGLV	1141,94 ± 281,93
S166	rFTSEASRLREGARLQRLQGLV	-
S167	rFTSELARLREGARLQRLQGLV	998,78 ± 142,75
S168	rFTSELSALREGARLQRLQGLV	2479,68 ± 579,84
S169	rFTSELSRAREGARLQRLQGLV	884,54 ± 169,75
S170	rFTSELSRLAEGARLQRLQGLV	1580,75 ± 77,34
S171	rFTSELSRLRAGARLQRLQGLV	-
S172	rFTSELSRLREAARLQRLQGLV	309,00 ± 73,62
S173	rFTSELSRLREGAALQRLQGLV	1858,45 ± 159,61
S174	rFTSELSRLREGARAQRLQGLV	-
S175	rFTSELSRLREGARLARLLQGLV	1017,97 ± 107,85
S176	rFTSELSRLREGARLQALLQGLV	1492,57 ± 218,34
S177	rFTSELSRLREGARLQRALQGLV	-
S178	rFTSELSRLREGARLQRLAQGLV	-
S179	rFTSELSRLREGARLQRLLAGLV	697,38 ± 54,66
S180	rFTSELSRLREGARLQRLQALV	570,61 ± 29,51
S181	rFTSELSRLREGARLQRLQGA	-
S182	rFTSELSRLREGARLQRLQGLA	2057,36 ± 760,62

Tabelle 11: Bedeutung einzelner Aminosäuren in N-terminal verkürzten Secretin-Varianten. Substituierte Aminosäuren im Vergleich zum humanen Secretin sind grau hinterlegt. (-): keine messbare Reaktion. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Jede Aminosäure des Secretin(5-27;G5r) (= S161) wurde anschließend durch Alanin ersetzt, um die Relevanz der Aminosäuren für den kompetitiven Antagonismus am SCTR zu bestimmen [Tab.11]. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Substitution der Leucine 10, 19, 22, 23 und 26, sowie Glu15 zu einem kompletten Verlust der messbaren Aktivität führte. Die Substitution von

Gln24 und Gly25 führte dagegen zu einer leicht verbesserten IC_{50} von $697,38 \pm 54,66$ bzw. $570,61 \pm 29,51$ nM. Aufgrund der Variation der IC_{50} -Werte zwischen den verschiedenen Peptidbibliotheken wurden anschließend drei Peptide in hochreiner, kontrollierter Qualität synthetisiert, um die vorangegangenen Ergebnisse zu verifizieren.

5.2.12 Abschließende Untersuchungen an aufgereinigten Secretin-Varianten

Für die Bestätigung der vorangegangenen Daten wurden drei Peptide ausgewählt, das aufgereinigte Peptid S11-R entspricht dabei S156/S157/S158/S159, S12-R entspricht S179 und S13-R entspricht S180 [Tab.12].

Als erstes wurden die aufgereinigten Peptide auf ihre antagonistische Wirkung mit SCTR- und β -Arrestin2-GFP-exprimierenden U2OS-Zellen in der β -Arrestin2-GFP Translokation mit 10 nM Secretin-IDCC eingesetzt [4.4.1]. Dabei erreichte S13-R mit $717,02 \pm 316,41$ nM die niedrigste und damit beste IC_{50} . Abbildung 21 A zeigt beispielhaft eine Inhibitionskurve dieser Variante, die eine verbesserte Inhibition im Vergleich zu den lediglich N-terminal verkürzten Secretin-Varianten zeigt (Peptid S138 (Secretin(4-27)) $IC_{50} = 1917,23 \pm 355,66$ nM und Peptid S143 (Secretin(9-27)) $IC_{50} =$ nicht messbar). Bei der Applikation von Peptid S13-R alleine zeigte sich in der β -Arrestin2-GFP Translokation bis zur maximal eingesetzten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ keine sichtbare Translokation, während das native Secretin eine deutliche agonistische Reaktion hervorrief [Abb.21 B].

Anschließend sollten diese Ergebnisse in cAMP-Messungen mit der GloSensorTM-Methode bestätigt werden [4.4.2]. Auch hier wurden die aufgereinigten Peptide zunächst als Antagonist mit 0,5 nM Secretin auf SCTR- und GloSensorTM-exprimierende U2OS-Zellen gegeben. Hier konnte jedoch mit keinem der Peptide eine Abnahme der cAMP-Konzentration beobachtet werden (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Peptide auf ihre eigene agonistische Wirkung am SCTR untersucht. Alle drei aufgereinigten Peptide erhöhten dabei den cAMP-Level mit einer EC_{50} von etwa 30 nM und einer intrinsischen Aktivität von etwa 30 % im Vergleich zum nativen Secretin [Abb.21 C/Tab.12].

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP	cAMP	cAMP
		+ 10nM Secretin-IDCC IC_{50} [nM]	EC_{50} [nM]	intr.Akt. [%]
S11-R	rFTSELSRLREAARLQRLQGLV	$1280,25 \pm 547,63$	$38,43 \pm 18,59$	$33,55 \pm 0,91$
S12-R	rFTSELSRLREGARLQRLLAGLV	$1103,50 \pm 524,59$	$23,37 \pm 16,19$	$27,50 \pm 8,87$
S13-R	rFTSELSRLREGARLQRLQALV	$717,02 \pm 316,41$	$29,38 \pm 17,44$	$31,12 \pm 2,21$

Tabelle 12: β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Messungen mit aufgereinigten Secretin-Varianten. Substituierte Aminosäuren im Vergleich zum humanen Secretin sind grau hinterlegt. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

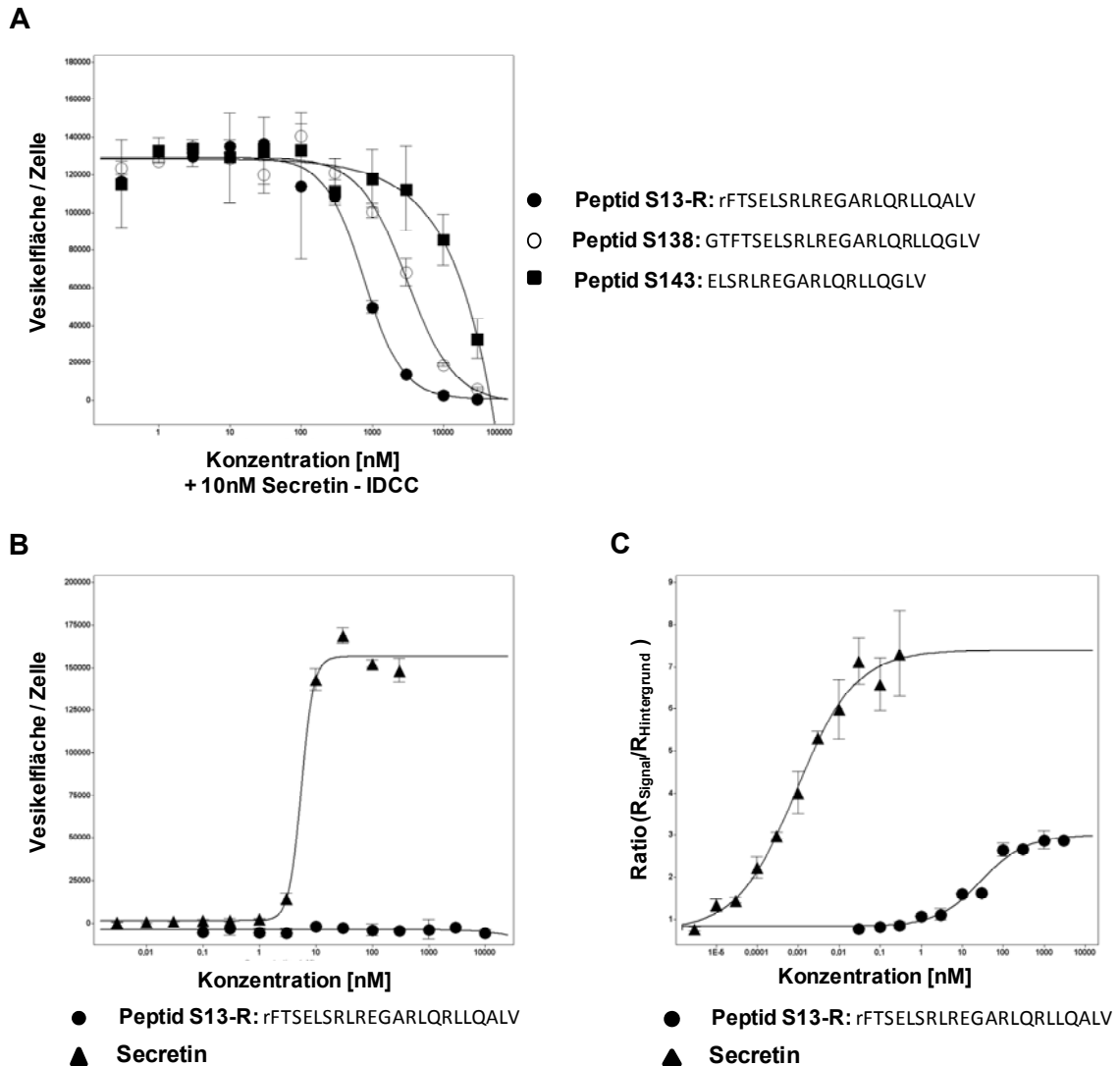


Abbildung 21: β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Messungen an aufgereinigten SCTR-Varianten. **A) Antagonismus in der β -Arrestin2-GFP Translokation:** Die Peptide S13-R, S138 und S143 wurden in Verdünnungsreihen zusammen mit 10 nM Secretin-IDCC auf die β -Arrestin2-GFP Translokation in SCTR- und β -Arrestin2-GFP-exprimierenden U2OS-Zellen untersucht. Aus den Vesikelfläche/Zelle-Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und folgende IC_{50} -Werte berechnet: Peptid S13-R: $717,02 \pm 316,41$ nM, Peptid S138: $1917,23 \pm 355,66$ nM, Peptid S143: nicht messbar. **B) Agonismus, β -Arrestin2-GFP Translokation:** Humanes Secretin und Peptid S13-R wurden in Verdünnungsreihen auf β -Arrestin2-GFP- und SCTR-exprimierende U2OS-Zellen gegeben und die β -Arrestin2-GFP Translokation nach Peptidapplikation gemessen. Aus den erhaltenen Vesikelfläche/Zelle-Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die EC_{50} errechnet. Secretin: $3,26 \pm 0,80$ nM, Peptid S13-R: keine Reaktion bis 10 μ M sichtbar. **C) Agonismus, cAMP GloSensor™-Methode:** Humanes Secretin und Peptid S13-R wurden in Verdünnungsreihen auf SCTR- und GloSensor™-exprimierende U2OS-Zellen gegeben und die intrazelluläre cAMP-Konzentration gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die EC_{50} bzw. die intrinsische Aktivität der Peptide errechnet. Secretin: $0,0012 \pm 0,0003$ nM (100 %), Peptid S13-R: $29,38 \pm 17,44$ nM ($31,12 \pm 2,21$ %). Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Um die Spezifität der Peptide für den SCTR sicherzustellen, wurden Kontrollversuche mit verwandten GPCR Klasse B-Rezeptoren durchgeführt. In der β -Arrestin2-GFP Translokation wurde

das agonistische oder antagonistische Verhalten der Peptide mit U2OS-Zellen untersucht, die neben dem β -Arrestin2-GFP den VIP1R, VIP2R oder den GLP-2R stabil exprimieren. Die cAMP-Messungen wurden parallel an U2OS-Zellen durchgeführt, die anstelle des SCTR den GLP-2R exprimieren. In keinem dieser Experimente konnten die Peptide S11-R, S12-R oder S13-R eine agonistische oder antagonistische Reaktion im Vergleich zu den nativen Peptiden VIP und GLP-2 auslösen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Peptide S11-R, S12-R und S13-R eine antagonistische Reaktion mit einer IC_{50} von etwa $1 \mu\text{M}$ in der β -Arrestin2-GFP Translokation am SCTR zeigen. Ein Peptid mit dieser antagonistischen Potenz konnte bisher noch nicht beschrieben werden. In cAMP-Messungen ist jedoch zusätzlich eine schwache partiell agonistische Reaktion mit einer intrinsischen Aktivität von 30 % im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten.

5.3 Der Secretinrezeptor in Tumorzelllinien des Pankreas und Ösophagus

5.3.1 Expression des Secretinrezeptors in Tumorzelllinien des Pankreas und Ösophagus

Ein wichtiger Schritt in der Validierung eines optimierten Peptids für die zielgerichtete Tumordiagnostik stellen *in vivo*-Versuche mit Tumormodellen dar. In unserer Arbeitsgruppe sind dafür diverse subkutane und orthotope Maus-Tumormodelle etabliert, die bei Bedarf für die *in vivo*-Bildgebung genutzt werden können. Hierfür mussten jedoch humane Tumorzelllinien identifiziert werden, die den SCTR endogen exprimieren und sich für solche *in vivo*-Versuche eignen. Es wurden daher immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen subkutanen Tumoren aus der Maus mit dem SCTR-Antikörper analog den gezeigten humanen Färbungen durchgeführt [5.1/4.3.2]. Dabei zeigte sich eine starke SCTR-Expression in der duktaalen Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 und der Zelllinie eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus, Kyse410 (Experimente von Dr. Petra Schulz und Annett Rexin).

5.3.2 Funktionelle Experimente an BxPC-3- und Kyse410-Zellen

Neben dem grundsätzlichen Vorhandensein des SCTR in den BxPC-3- und Kyse410-Zellen sollte dieser auch in der Lage sein das Secretin, bzw. die entwickelten Secretin-Varianten, zu binden. Um dies zunächst *in vitro* zu untersuchen, wurde das Fluoreszenz-markierte Secretin-IDCC auf die nativen Zellen gegeben und die Bindung beziehungsweise Internalisierung im IN Cell Analyzer 1000 beobachtet [4.4.5].

Abbildung 22 A zeigt die konzentrationsabhängige Vesikelbildung des Secretin-IDCC in BxPC-3-Zellen. Als Kontrolle wurden dabei gleiche Konzentrationen des freien Farbstoffs und Chemerin9-IDCC, einem nicht-verwandten Peptid, verwendet. Hier war keine Bindung beziehungsweise Internalisierung sichtbar. Abbildung 22 B zeigt ein Fluoreszenzbild aus dieser Konzentrations-Wirkungskurve bei Applikation von $3 \mu\text{M}$ Secretin-IDCC, die EC_{50} dieser Reaktion beträgt $611,09 \pm 254,40 \text{ nM}$. Im Gegensatz dazu war an Kyse410-Zellen keine Secretin-IDCC Bindung oder Internalisierung zu beobachten [Tab.13].

Als nächstes wurde die Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Secretin-Applikation mit dem LANCETM cAMP 384 Kit untersucht. Im Vergleich zu der bisher verwendeten cAMP GloSensorTM-Methode können damit auch native, untransfizierte Zelllinien untersucht werden [4.4.3].

BxPC-3-Zellen zeigten dabei keine Reaktion, während in Kyse410-Zellen eine cAMP-Steigerung mit einer EC_{50} von $92,19 \pm 39,72$ nM zu beobachten war. Allerdings lag für die Kyse410-Zellen die EC_{50} bei der Applikation des vasoaktiven intestinalen Polypeptids (VIP) im picomolaren Bereich [Tab.13]. Aufgrund der Tatsache, dass Secretin mit einer schwächeren Affinität auch an die VIP-Rezeptoren VIP1R und VIP2R bindet, ist es daher möglich, dass es sich um eine reine VIPR-vermittelte cAMP-Reaktion handelt.

Neben dem $G\alpha_s$ - ist auch eine Kopplung des SCTR an das $G\alpha_q$ -Protein beschrieben. Aus diesem Grund wurde auch die Kalzium-Mobilisierung der BxPC-3- und Kyse410-Zellen nach der Applikation von Secretin gemessen [4.4.4]. Beide Zelllinien zeigten jedoch auch in diesem Versuch keine positive Reaktion, während die Positivkontrollen ATP und Carbachol deutliche Signale hervorriefen [Tab.13].

Aus diesen Versuchen wird deutlich, dass native BxPC-3- und Kyse410-Zellen den SCTR grundsätzlich exprimieren und BxPC-3-Zellen außerdem das Secretin-IDCC internalisieren. Die Identifikation von möglichen verwendeten Signalwegen bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

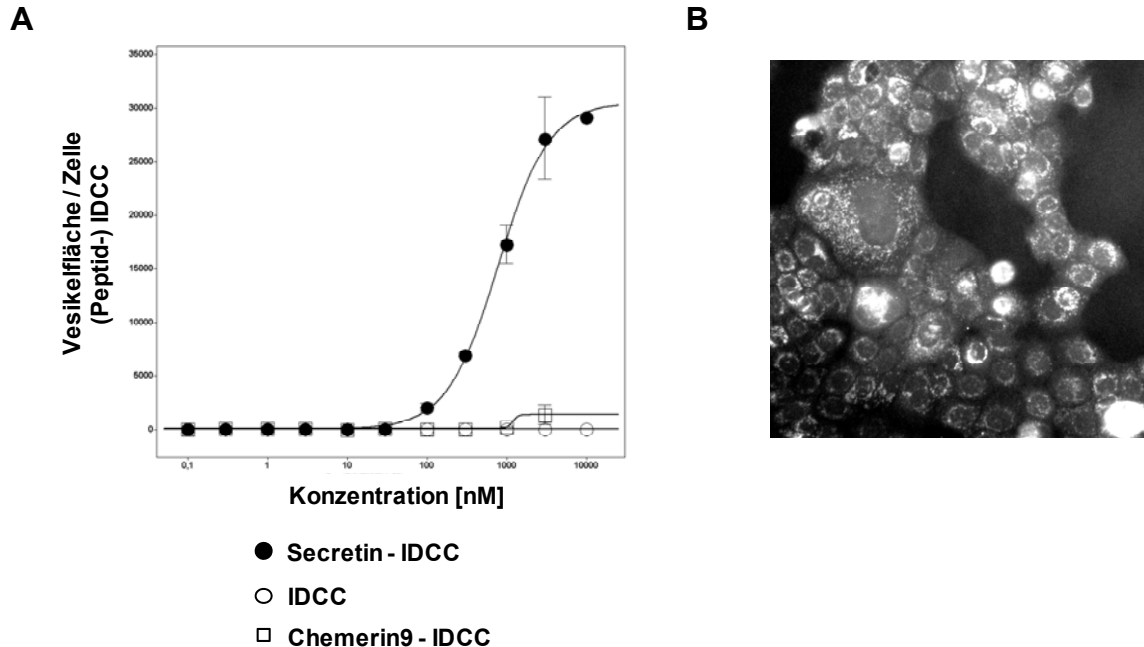


Abbildung 22: Internalisierung des Secretin-IDCC in BxPC-3-Zellen. A) Konzentrations-Wirkungskurve: BxPC-3-Zellen wurden für 20 min bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen des Secretin-IDCC, Chemerin9-IDCC bzw. des freien Farbstoffs inkubiert, anschließend fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Internalisierung des (Peptid-)IDCCs wurde mit dem IN Cell Analyzer 1000 aufgenommen, mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software ausgewertet und die Konzentrations-Wirkungskurven berechnet. Die EC_{50} für Secretin-IDCC beträgt $611,09 \pm 254,40$ nM. **B) Internalisierung von Secretin-IDCC in BxPC-3-Zellen:** Ein beispielhaftes Bild des Experiments aus A) nach Applikation von 3 µM Secretin-IDCC auf BxPC-3-Zellen.

Methoden	Ligand	BxPC-3-Zellen	Ky5e410-Zellen
Peptid-IDCC Internalisierung	Secretin -IDCC	611,09 ± 254,40 nM	keine Reaktion
cAMP-Bildung (LANCE)	Secretin	keine Reaktion	92,19 ± 39,72 nM
	VIP	keine Reaktion	< 100 pM
Kalzium-Mobilisierung	Secretin	keine Reaktion	keine Reaktion
	VIP	keine Reaktion	keine Reaktion
β-Arrestin2-GFP Translokation (transiente Transfektion des β-Arrestin2-GFP)	Secretin	keine Reaktion	nicht untersucht

Tabelle 13: Funktionelle Experimente mit BxPC-3- und Ky5e410-Zellen. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

5.4 Optimierung des humanen Glucagon-like peptide-2 für die zielgerichtete Tumordiagnostik

Neben dem Secretin sollte mit dem Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) ein weiteres Peptid der GPCR Klasse B für die zielgerichtete Tumordiagnostik optimiert werden. Dabei bestand die Hoffnung möglichst bald einen Antikörper zur Verfügung zu haben, um die Expression des Glucagon-like peptide 2-Rezeptors (GLP-2R) in Normal- und Tumorgewebe untersuchen zu können. Die Suche nach GPCR-spezifischen Antikörpern gestaltete sich jedoch generell als sehr schwierig [5.1.1]. Der kommerziell erhältliche Antikörper gegen GLP-2R zeigte keine spezifische Reaktion auf GLP-2R-POL-transfizierten U2OS-Zellen im Vergleich zu SCTR-POL-transfizierten Kontrollzellen im Western Blot und in der Immunfluoreszenz (nicht gezeigt). Ein in der Arbeitsgruppe selbst hergestellter, vielversprechender monoklonaler Maus-Antikörper gegen GLP-2R zeigte sich in ersten Versuchen als spezifisch, befindet sich zum Zeitpunkt dieser Arbeit allerdings noch in der Validierungsphase für die Verwendung in der Immunhistochemie (Experimente von Quirino Schefer). Die schon weit fortgeschrittene Optimierung des GLP-2-Peptids sollte jedoch nach Erhalt positiver Expressionsdaten des GLP-2R den direkten Einstieg in erste *in vivo*-Experimente ermöglichen.

5.4.1 Aktivierung des GLP-2R durch Alanin-substituierte GLP-2-Varianten

DaCabra et al. veröffentlichten im Jahr 2000 erste Daten über die Relevanz der einzelnen Aminosäuren des GLP-2 für dessen Bindung und Aktivität am GLP-2R¹¹⁴. Sie substituierten unter anderem alle Aminosäuren durch Alanin und untersuchten die Verdrängung eines radioaktiv markierten GLP-2 vom GLP-2R und die Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Applikation der modifizierten GLP-2-Peptide. Diese Daten sollten zunächst verifiziert werden. Daher wurden alle 33 Aminosäuren des GLP-2 durch Alanin ersetzt und die Peptide in der β-Arrestin2-GFP Translokation eingesetzt. Dafür wurden U2OS-Zellen verwendet, die neben dem β-Arrestin2-GFP der Ratte den GLP-2R stabil exprimieren. Als Negativkontrolle dienten in allen folgenden Versuchen entsprechende Zellen, die anstelle des GLP-2R den Secretinrezeptor (SCTR) exprimieren. Die Peptide wurden in Verdünnungsreihen auf die Zellen gegeben und 20 min

bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Abbildung 23 zeigt die verwendete Zelllinie in unstimuliertem Zustand, hier befindet sich das β -Arrestin2-GFP gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, und nach Stimulation mit 10 nM GLP-2, wodurch das β -Arrestin2-GFP in Vesikel transloziert. Bei der Applikation des nah verwandten Secretin ist keine Translokation des β -Arrestin2-GFP zu beobachten, was für die Spezifität der hergestellten Zelllinie spricht [Abb.23 B].

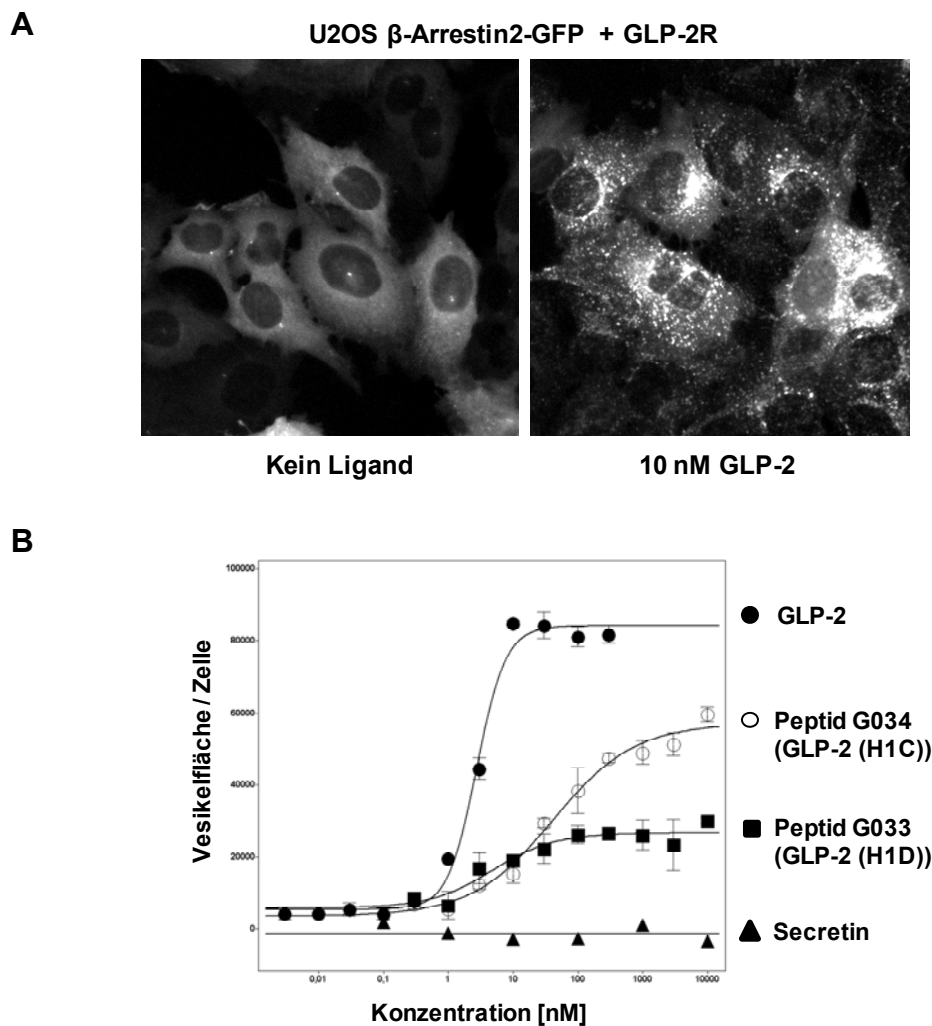
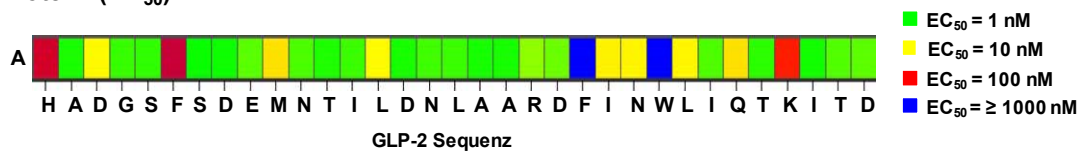


Abbildung 23: Durchführung der β -Arrestin2-GFP Translokation mit dem GLP-2R. U2OS-Zellen, die das β -Arrestin2-GFP stabil exprimieren wurden zusätzlich stabil mit dem GLP-2R transfiziert. Die hergestellte Zelllinie wurde mit einer Verdünnungsreihe von GLP-2 und GLP-2-Varianten bzw. Secretin für 20 min bei 37°C inkubiert und die Zellen anschließend fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem IN Cell Analyzer 1000, die Bildanalyse mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software. Aus den „Vesikelfläche/Zelle“-Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die EC_{50} und die intrinsische Aktivität der Peptide berechnet. Dabei wird die maximale intrinsische Aktivität des nativen Peptids, in diesem Fall GLP-2, auf 100 % festgelegt und die intrinsischen Aktivitäten der anderen Peptide in Relation gesetzt. **A) Repräsentative Bilder der verwendeten Zelllinie** im nativen Zustand und nach Stimulation der Zellen mit 10 nM GLP-2 **B) Konzentrations-Wirkungskurven ausgewählter Peptide.** Für die gezeigten Peptide wurden folgende Werte berechnet: GLP-2 (EC_{50} : $1,84 \pm 0,90$ nM, Aktivität: 100 % festgelegt), Peptid G034 (GLP-2(H1C)) (EC_{50} : $93,53 \pm 21,28$ nM, Aktivität: $58,43 \pm 11,59$ %), Peptid G033 (GLP-2(H1D)) (EC_{50} : $9,34 \pm 6,38$ nM, Aktivität: $22,30 \pm 6,22$ %) Secretin als Negativkontrolle. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die Bilder wurden im IN Cell Analyzer 1000 aufgenommen und anschließend mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software analysiert [4.4.1]. Die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven, die Berechnung der EC_{50} und der intrinsischen Aktivität erfolgte mit Spotfire. Abbildung 24 zeigt die dabei erhaltenen EC_{50} -Werte [Abb.24 A] und die intrinsische Aktivität [Abb.24 B] in einer Heatmap-Darstellung. Dabei zeigte sich, dass es sich bei den, für die Aktivität des GLP-2R, wichtigen Aminosäuren vor allem um His1, Asp3, Phe6, Phe22, Trp25 und Lys30 handelt. Bei der Substitution von Phe22 und Trp25 durch Alanin verschlechterte sich die Potenz der entstehenden Peptide am GLP-2R um den Faktor 1000 – 2000, bei His1, Phe6 und Lys30 um etwa den Faktor 100 [Abb.24 A]. Zusätzlich fällt auf, dass die intrinsische Aktivität der Peptide [Abb.24 B] nur bei Substitutionen im extremen N-Terminus des GLP-2 beeinträchtigt wurde. Diese ist bei Alanin-Substitution von His1 und Asp3 im Vergleich zum nativen GLP-2 stark verringert (33 % bzw. 21 % im Vergleich zu 100 %). Diese Beobachtungen entsprechen weitestgehend der vorangegangenen Publikation¹¹⁴.

A) Potenz (EC_{50})



B) Intrinsische Aktivität

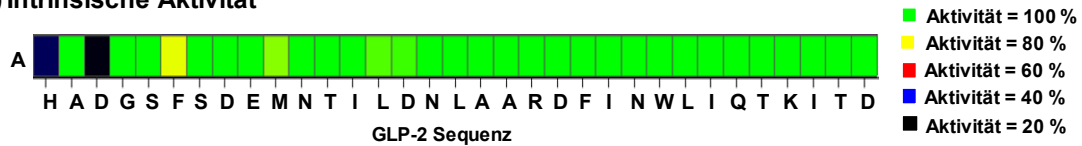


Abbildung 24: Aktivierung des GLP-2R durch Alanin-substituierte GLP-2-Varianten. In der nativen Sequenz des GLP-2 wurden alle Aminosäuren einzeln durch Alanin ersetzt und die Potenz und intrinsische Aktivität der Peptide in der β -Arrestin2-GFP Translokation bestimmt. Dafür wurden U2OS-Zellen verwendet, die das β -Arrestin2-GFP und den GLP-2R stabil exprimieren. Die Peptide wurden in Verdünnungsreihen für 20 min bei 37°C auf die Zellen gegeben und anschließend fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem IN Cell Analyzer 1000, die Bildanalyse mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software. Aus den „Vesikelfläche/Zelle“-Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die EC_{50} und die intrinsische Aktivität der Peptide berechnet. **A) EC_{50} der Alanin-substituierten Peptide.** Eine grüne Farbe bedeutet dabei eine Potenz ähnlich dem nativem GLP-2 ($1,84 \pm 0,02$ nM). Diese verschlechtert sich im Verlauf von gelb nach rot bis zu blau. **B) intrinsische Aktivität der Alanin-substituierten Peptide.** Eine grüne Farbe bedeutet eine Aktivität ähnlich dem nativen GLP-2 (auf 100 % festgelegt). Von gelb über rot und blau nach schwarz verschlechtert sich diese zunehmend. Alle dargestellten Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. Die absoluten Werte sind im Anhang in Tabelle III aufgeführt.

5.4.2 N-terminale Substitutionen beeinflussen die intrinsische Aktivität des GLP-2

Aus Untersuchungen verschiedener Peptidliganden der GPCRs der Klasse B ist bekannt, dass vor allem der extreme N-Terminus des Peptids für die Aktivierung des GPCRs eine entscheidende Rolle spielt. In vielen Fällen führt die proteolytische Abspaltung zweier Aminosäuren am N-Terminus zu einem Peptid mit antagonistischem Verhalten am Rezeptor [1.4.2]. Entsprechende Experimente lagen jedoch für GLP-2 nur vereinzelt vor, so dass nun die Bedeutung der N-terminalen Aminosäuren des GLP-2 systematisch charakterisiert werden sollte. Dazu wurden die ersten fünf Aminosäuren des GLP-2 einzeln durch jede andere natürliche Aminosäure

ausgetauscht und die Potenz bzw. intrinsische Aktivität der Peptide in der β -Arrestin2-GFP Translokation bestimmt [4.4.1]. Abbildung 25 zeigt die erhaltenen Ergebnisse als Heatmap-Darstellung. Dabei wird auf den ersten Blick deutlich, dass sich vor allem die intrinsische Aktivität der GLP-2-Varianten verschlechtert, während nur sehr wenige Substitutionen durch ihren Einfluss auf die Potenz der Peptide auffallen.

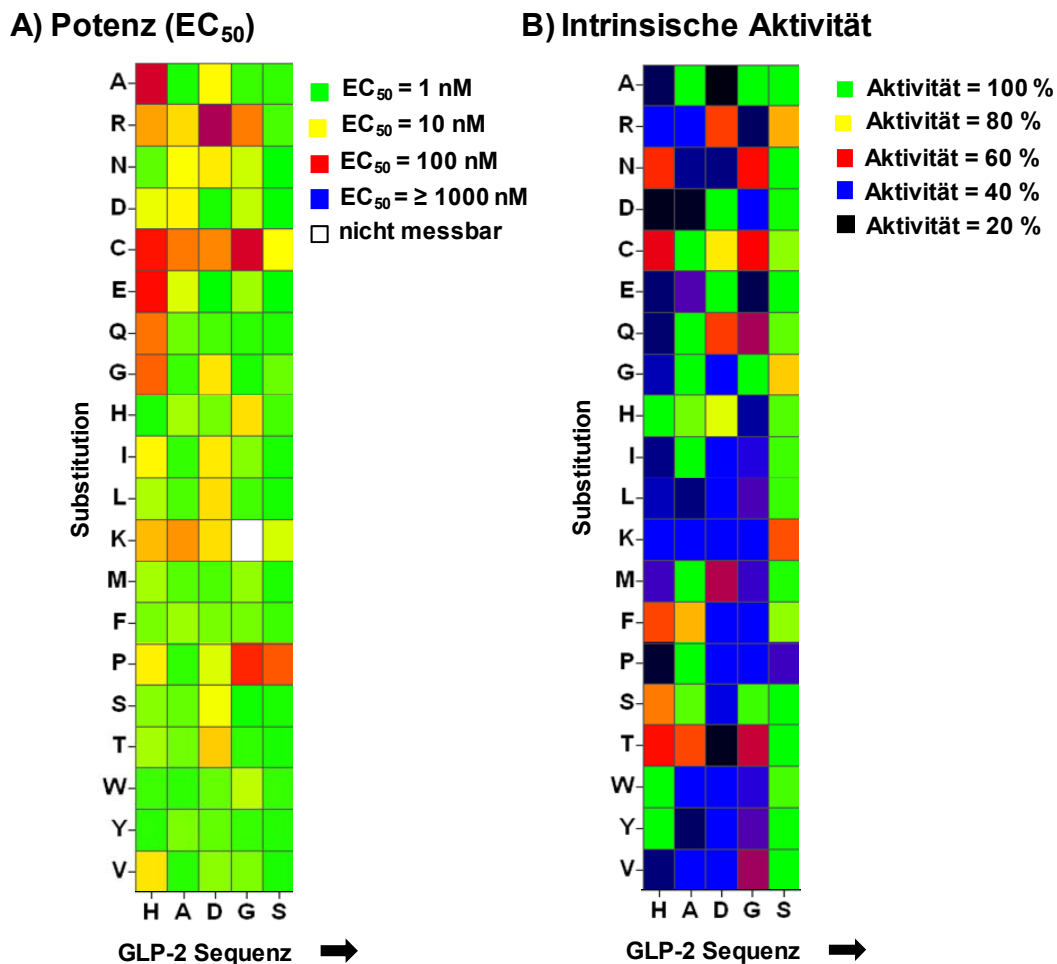


Abbildung 25: Aktivierung des GLP-2R durch N-terminal substituierte GLP-2-Varianten. In der nativen Sequenz des GLP-2 wurden die ersten fünf Aminosäuren durch alle anderen natürlichen Aminosäuren ersetzt und die Potenz und intrinsische Aktivität der Peptide in der β -Arrestin2-GFP Translokation bestimmt. Dafür wurden U2OS-Zellen verwendet, die das β -Arrestin2-GFP und den GLP-2R stabil exprimieren. Die Peptide wurden in Verdünnungsreihen für 20 min bei 37°C auf die Zellen gegeben und anschließend fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem IN Cell Analyzer 1000, die Bildanalyse mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software. Aus den „Vesikelfläche/Zelle“-Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die EC_{50} und die intrinsische Aktivität der Peptide berechnet. **A) EC_{50} der substituierten Peptide.** Eine grüne Farbe bedeutet dabei eine Potenz ähnlich dem nativem GLP-2 ($1,84 \pm 0,02 \text{ nM}$). Diese verschlechtert sich im Verlauf von gelb nach rot bis zu blau. **B) intrinsische Aktivität der substituierten Peptide.** Eine grüne Farbe bedeutet eine Aktivität ähnlich dem nativen GLP-2 (auf 100 % festgelegt). Von gelb über rot und blau nach schwarz verschlechtert sich diese zunehmend. Alle dargestellten Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. Die absoluten Werte sind im Anhang in Tabelle III aufgeführt.

Das Histidin an Position 1 kann ohne große Veränderung von intrinsischer Aktivität und Potenz lediglich durch die großen, aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan ersetzt werden.

Das Alanin an Position 2 zeigt eine etwas höhere Flexibilität. An dieser Stelle werden neben den anderen kleinen Aminosäuren Glycin, Prolin und Serin auch Glutamin, Histidin, Isoleucin und Methionin gut toleriert. Das Aspartat an Position 3 scheint dagegen wieder eine große Rolle für die Aktivierung des GLP-2R durch das GLP-2 zu spielen. Es konnte lediglich durch die nah verwandte Aminosäure Glutamat und das Histidin ersetzt werden ohne einen großen Verlust an intrinsischer Aktivität und/oder eine starke Verschlechterung der EC_{50} zu erzeugen. An Position 4 des GLP-2 muss dagegen eine kleine Aminosäure stehen. Das native Glycin konnte in den Versuchen dieser Arbeit lediglich durch Alanin und Serin ersetzt werden. Das Serin an Position 5 des GLP-2 scheint für dessen aktivierende Wirkung am GLP-2R kaum eine Rolle zu spielen. Lediglich die Substitution mit Prolin sorgte hier für eine leichte Verschlechterung der intrinsischen Aktivität. Dies war zu erwarten, da in diesem Bereich der Anfang der peptidischen Helix vorausgesagt wird und ein Prolin die Helixbildung in der Regel ausschließt.

Aus diesen Versuchen kann eine Aminosäurefolge der ersten fünf Positionen des GLP-2 als ideal für die Aktivierung des GLP-2R abgeleitet werden: groß/aromatisch – klein – sauer – klein – flexibel.

5.4.3 Multiple Substitutionen am N-Terminus des GLP-2

Aus den vorangegangenen Daten konnten die Aminosäure-Eigenschaften eines „idealen“ GLP-2-N-Terminus entnommen werden. Daher lag es nahe, nun multiple Austausche im N-Terminus vorzunehmen, um ein Peptid mit einer höheren Aktivität und Potenz am GLP-2R zu erzeugen.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP EC_{50} [nM]	β -Arr2-GFP Intr.Aktivität [% GLP-2]
GLP-2	HADGSFS~KITD	1,84 ± 0,02	100
G187	HA ESS SFS~KITD	9,75 ± 4,23	77,97 ± 1,00
G188	HA ESE SFS~KITD	4,56 ± 0,78	77,93 ± 5,33
G189	HA ESN SFS~KITD	25,67 ± 7,68	31,90 ± 3,00
G190	HA ESD SFS~KITD	3,17 ± 0,16	72,97 ± 2,80
G191	YGE GSFS~KITD	4,16 ± 1,18	95,10 ± 5,89
G192	HA EGN SFS~KITD	27,12 ± 5,92	52,70 ± 2,85
G193	YGE GNFS~KITD	8,39 ± 0,84	67,37 ± 5,13
G194	YGE GEFS~KITD	2,24 ± 0,20	95,40 ± 3,20

Tabelle 14: Multiple Substitutionen am N-Terminus des GLP-2. Substituierte Aminosäuren im Vergleich zum nativen GLP-2 sind grau hinterlegt. (~) steht für die nativen Aminosäuren des GLP-2, die sich zwischen den genannten Abschnitten befinden. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Dafür wurden in den Positionen 1 bis 5 verschiedene Aminosäuren substituiert, die in den Experimenten aus 5.4.2 einen positiven Einfluss auf die Potenz und intrinsische Aktivität am GLP-2R zeigten [siehe Tabelle III im Anhang]. Auch bei den dadurch abgeleiteten GLP-2-Varianten

wurde die Potenz bzw. die intrinsische Aktivität in der β -Arrestin2-GFP Translokation am GLP-2R untersucht [4.4.1]. Dabei zeigte keines der Peptide eine Verbesserung im Vergleich zum nativen GLP-2, wobei das Peptid G194, in dem sich N-terminal vier Substitutionen befinden, eine sehr ähnliche Potenz bzw. intrinsische Aktivität aufweist [Tab.14].

5.4.4 Aktivierung des GLP-2R durch C-terminal verkürzte GLP-2-Varianten

Analog zu der Secretin-Optimierung war es auch beim GLP-2 eines der Ziele, eine kürzere Variante zu entwickeln. Mit 33 Aminosäuren ist das GLP-2 sogar noch um sechs Aminosäuren länger als das Secretin und damit komplizierter und teurer in der Synthese. Daher wurden auch beim GLP-2 zunächst sukzessive Aminosäuren am C-Terminus deletiert und die Potenz bzw. die intrinsische Aktivität der Peptidvarianten in der β -Arrestin2-GFP Translokation gemessen [4.4.1]. Aus den Ergebnissen der Tabelle 15 wird deutlich, dass sich die Potenz der Peptide mit zunehmender Deletion verschlechtert, bei vier deletierten Aminosäuren schon um den Faktor 10 und bei sechs deletierten um den Faktor 100. Noch weitergehende Verkürzungen führen zum großen Teil zu einer nicht mehr messbaren Potenz bzw. intrinsischen Aktivität. Eine Verkürzung des GLP-2 durch einfache Deletion erschien daher nicht möglich.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP EC ₅₀ [nM]	β -Arr2-GFP Intr.Aktivität [% GLP-2]
GLP-2	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	1,84 ± 0,02	100
G195	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKI	9,08 ± 1,33	106,70 ± 6,03
G196	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQT	10,83 ± 1,54	101,98 ± 11,41
G197	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLI	184,28 ± 81,77	83,20 ± 4,06
G198	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINW	-	-
G199	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFI	11077,51 ± 1946,34	102,65 ± 7,28
G200	HADGSFSDE	-	-

Tabelle 15: Aktivierung des GLP-2R durch C-terminal verkürzte GLP-2 Varianten. (-): keine messbaren Reaktionen. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

5.4.5 Anwendung der „Endogenen-Agonisten-Theorie“ für den GLP-2R

Dong et. al publizierten im Jahr 2006 eine neue Theorie für die Aktivierung von GPCRs der Klasse B⁴⁹. Dabei findet nach der Bindung des Peptidliganden eine strukturelle Umlagerung in der extrazellulären Domäne (ECD) statt, wodurch ein sogenannter „endogener Agonist“, welcher Bestandteil der ECD selbst ist, frei zugänglich wird. Dieser sorgt schließlich final für die Aktivierung des GPCRs [1.4.3]. Die von Dong et. al publizierten Daten beziehen sich vor allem auf den SCTR und den Glucagon-like peptide-1-Rezeptor (GLP-1R)^{49,50}, daher sollte in dieser Arbeit die Theorie für den GLP-2R bestätigt werden. Gleichzeitig sollten auf diese Weise kürzere, hochaffine Peptide erzeugt werden.

Dazu wurde die ECD des GLP-2R in kurze Peptide von jeweils neun Aminosäuren unterteilt, wobei jeweils sechs Aminosäuren mit dem vorangehenden und dem nachfolgenden Peptid überlappen.

Die Aminosäuresequenzen der so entstehenden Peptide sind in Tabelle 16 aufgelistet. Diese Peptide wurden zunächst in der β -Arrestin2-GFP Translokation auf β -Arrestin2-GFP- und GLP-2R-exprimierenden U2OS-Zellen nach Standardprotokoll eingesetzt [4.4.1]. Die höchste verwendete Konzentration der Peptide betrug dabei 50 μ M, als Positivkontrolle wurde auf jeder 96well-Platte 10 nM GLP-2 mitgeführt. Während das β -Arrestin2-GFP bei der Applikation von 10 nM GLP-2 in Vesikel translozierte blieb es bei den zu untersuchenden Peptiden gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Darüber hinaus konnte nach der Applikation von 50 μ M Peptid auch keine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mit der cAMP LANCE-Methode gemessen werden. Keines der „endogenen“ Peptide war also in der Lage eine agonistische Reaktion am GLP-2R auszulösen.

Peptidsequenzen zur „endogenen-Agonisten-Theorie“				
MKLGSSRAG	HRKCSLWAP	WAQYKQACL	GNVSVPCPS	NATDIWQDD
GSSRAGPGR	CSLWAPGRP	YKQACLRDL	SVPCPSYLP	DIWQDDSEC
RAGPGRGSA	WAPGRPFLT	ACLRDLLKE	CPSYLPWWS	QDDSECSN
PGRGSAGLL	GRPFLTLVL	RDLLKEPSG	YLPWWSEES	SECSNHSF
GSAGLLPGV	FLTLVLLVS	LKEPSGIFC	WWSEESSGR	SENHSFKQN
GLLPGVHEL	LVLVLSIKQ	PSGIFCNGT	EESSGRAYR	HSFKQNVDR
HELPMGIPA	LVSIKQVTG	IFCNGTFDQ	SGRAYRHCL	KQNVDRYAL
PMGIPAPWG	IKQVTGSL	NGTFDQYVC	AYRHCLAQG	VDRYALLST
IPAPWGTSP	VTGSLLEET	FDQYVCWPH	HCLAQGTWQ	
PWGTSPLSF	SLLEETTRK	YVCWPHSSP	AQGTWQTIE	
TSPLSFHRK	EETTRKWAQ	WPHSSPGNV	TWQTIENTAT	
LSFHRKCSL	TRKWAQYKQ	SSPGNVSVP	TIENTATDIW	

Tabelle 16: Peptidsequenzen zur „Endogenen-Agonisten-Theorie“ für den GLP-2R. Die Sequenz der ECD des GLP-2R wurde in einzelne Peptide von je neun Aminosäuren aufgeteilt. Bei jedem Peptid überlappen sechs dieser Aminosäuren mit dem vorangegangenen beziehungsweise nachfolgenden Peptid (vertikal aufgelistet).

Peptid	Sequenz	Konformation	β -Arr2-GFP SCTR 50 μ M Peptid	cAMP SCTR 50 μ M Peptid
EP01650	CLQQLSKEKKGALGPETASGSEGLWDNMSC	linear	Keine Reaktion	Keine Reaktion
EP01647	Dap-WDN-D	linear	Keine Reaktion	Keine Reaktion
EP01648	Dap-LWDNM-D	linear	Keine Reaktion	Keine Reaktion
EP01649	Dap-WDN-D	cyclisch	Keine Reaktion	Keine Reaktion

Tabelle 17: Kontrollpeptide für die „Endogene-Agonisten-Theorie“: Die Peptidsequenzen wurden aus Dong et al. 2006 entnommen⁴⁹, hochrein synthetisiert und gegebenenfalls cyclisiert (peptides & elephants, Potsdam).

Um die Theorie an sich überprüfen zu können, wurden die Peptide aus Dong et al. hochrein synthetisiert [Tab.17]. Diese werden als „endogene Agonisten“ des Secretin-Rezeptors der Ratte bezeichnet. Aufgrund der hohen Homologie des SCTR der Ratte mit dem humanen SCTR wurden die Versuche mit dem humanen SCTR durchgeführt, da hier schon entsprechende Zelllinien etabliert waren¹⁸⁰. Die Peptide wurden in Konzentrationen von bis zu 50 μ M in der β -Arrestin2-GFP Translokation mit β -Arrestin2-GFP- und SCTR-exprimierenden U2OS-Zellen untersucht. Nachdem

auch hier keine Translokation des β -Arrestin2-GFP zu erkennen war, wurde die cAMP-Reaktion von SCTR-exprimierenden U2OS-Zellen auf 50 μ M der Peptide mit dem LANCETM cAMP 384 Kit gemessen. Im Gegensatz zu der mitgeführten Positivkontrolle von 10 nM Secretin konnte jedoch auch hier keine agonistische Reaktion festgestellt werden. Die Theorie von Dong et. al konnte daher nicht bestätigt werden.

5.4.6 Entwicklung von GLP-2-Rezeptor-Antagonisten

Wie schon in Abschnitt 5.2.8 für das Secretin beschrieben, sollte parallel zu der Optimierung eines GLP-2-Agonisten auch ein hochaffiner, kurzer Antagonist entwickelt werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass sich Antagonisten möglicherweise besser für die zielgerichtete Tumordiagnostik eignen¹⁸¹. Zum anderen ist das GLP-2 ein Wachstumsfaktor, dessen tumorfördernde Wirkung bereits im Tiermodell gezeigt werden konnte^{103,104,107-109} [1.8.1]. Die Verwendung einer antagonistischen Peptid-Variante sollte daher für einen Tumorpatienten ein geringeres Risiko darstellen.

Als Antagonist des GLP-2R wird bisher vor allem das GLP-2(3-33) verwendet, das mit zwei deletierten N-terminalen Aminosäuren das natürliche Abbauprodukt des GLP-2 darstellt. Dieses ist jedoch wenig affin und hat zusätzlich eine schwache partiell agonistische Wirkung am GLP-2R⁴⁵. Außerdem ist es mit 31 Aminosäuren immer noch sehr lang und damit kompliziert und teuer in der Synthese. Ein Ziel dieser Arbeit stellte daher die Entwicklung eines kürzeren und affineren Peptidantagonisten für den GLP-2R dar.

5.4.7 Deletionen am N-Terminus des GLP-2 führen zu GLP-2R-Antagonisten

Neben den oben beschriebenen C-terminalen Deletionen am GLP-2 wurde auch der N-Terminus sukzessive verkürzt. Aus den Ergebnissen der Substitutionsanalyse konnte erwartet werden, dass dies zu einer massiven Verschlechterung der Potenz und der intrinsischen Aktivität am GLP-2R führen würde. In der Tat war eine agonistische Aktivität in der β -Arrestin2-GFP Translokation überhaupt nur für das GLP-2(3-33) messbar, wobei die intrinsische Aktivität nur bei etwa 7 % im Vergleich zum nativen GLP-2 lag. Diese Daten entsprechen vorangegangenen Publikationen, die das GLP-2(3-33) als schwachen partiellen Agonisten beschreiben, der gleichzeitig kompetitiv das native GLP-2 vom GLP-2R verdrängt⁴⁵.

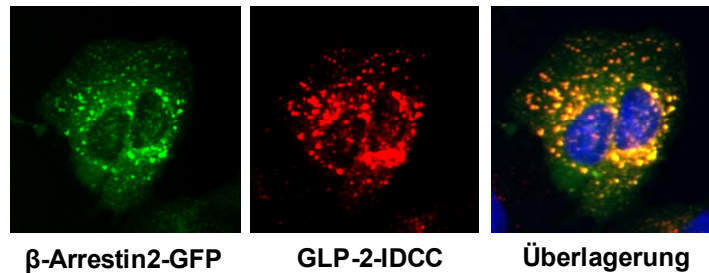
Da dieses GLP-2(3-33) jedoch der einzige beschriebene Antagonist des GLP-2R ist, wurde damit die β -Arrestin2-GFP Translokation für die Untersuchung von Antagonisten am GLP-2R etabliert. Analog der Secretin-Experimente wurde auch hier ein IDCC-markiertes GLP-2 verwendet, um die Verdrängung des nativen Liganden besser darstellen zu können [5.2.9]. Dabei wurde zunächst die Wirkung des GLP-2-IDCC als Agonist verifiziert, um einen Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs ausschließen zu können. Abbildung 26 B zeigt exemplarisch Bilder aus einer Verdünnungsreihe von GLP-2-IDCC auf β -Arrestin2-GFP- und GLP-2R-exprimierenden U2OS-Zellen. Dabei wird sichtbar, dass sich das GLP-2-IDCC zusammen mit dem β -Arrestin2-GFP in Vesikeln befindet, welche sich über den *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software quantitativ auswerten lassen.

A

HADGSFSD~~EMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD~~K



B

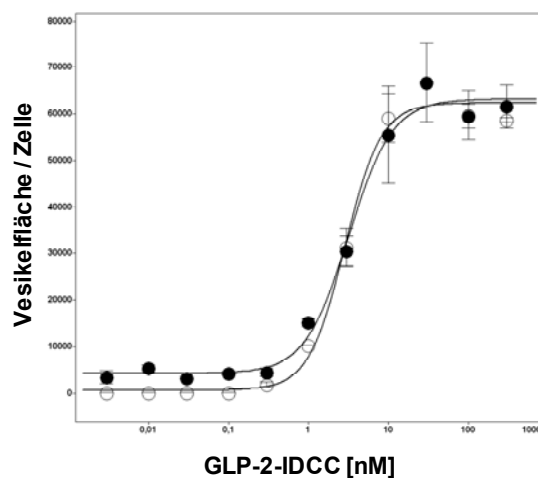


β-Arrestin2-GFP

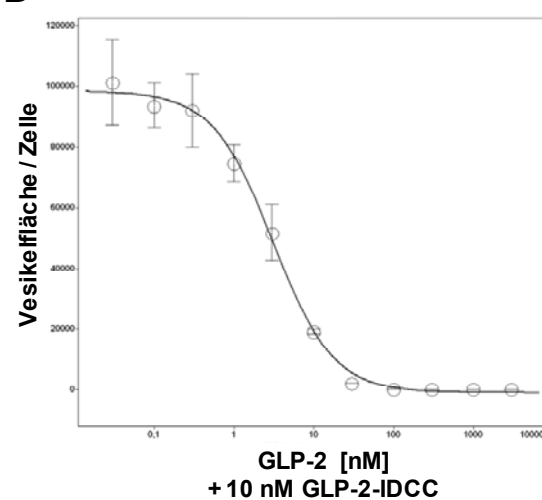
GLP-2-IDCC

Überlagerung

C



D



- Auswertung der β-Arrestin2-GFP-Vesikel
- Auswertung der GLP-2-IDCC-Vesikel

Abbildung 26: GLP-2-IDCC. **A) Aminosäuresequenz des GLP-2-IDCC.** Die 33 Aminosäuren des humanen GLP-2 wurden C-terminal um ein Lysin verlängert (rot), an das der Fluoreszenzfarbstoff IDCC (roter Stern) gekoppelt wurde. **B) β-Arrestin2-GFP Translokation des GLP-2-IDCC:** U2OS-Zellen, die β-Arrestin2-GFP und GLP-2R stabil exprimieren, wurden für 20 min bei 37°C mit 10 nM GLP-2-IDCC inkubiert und anschließend fixiert, permeabilisiert und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte im IN Cell Analyzer 1000, die Überlagerung der Bilder in Adobe Photoshop. **C) Konzentrations-Wirkungskurven von GLP-2-IDCC:** GLP-2-IDCC wurde in Verdünnungsreihen in der β-Arrestin2-GFP Translokation analog B) eingesetzt. Anschließend wurde die Vesikelbildung sowohl im Grün- als auch im Rot-Kanal mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Analyzer Investigator Software ausgewertet. Zur verbesserten Darstellung wurde in der Abbildung der höchste Wert der Konzentrations-Wirkungskurve der GLP-2-IDCC-Vesikel auf den höchsten Wert der β-Arrestin2-GFP-Kurve gleichgesetzt und die restlichen Werte der IDCC-Kurve entsprechend normalisiert. Dies ist nötig, da aufgrund der stärkeren IDCC-Fluoreszenz grundsätzlich mehr Vesikel erkannt werden, was jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der Kurven und die daraus berechneten Werte hat. **D) Verdrängung des GLP-2-IDCC durch natives GLP-2:** U2OS-Zellen, die β-Arrestin2-GFP und GLP-2R stabil exprimieren, wurden für 20 min bei 37°C mit 10 nM GLP-2-IDCC und absteigenden Konzentrationen an nativem GLP-2 inkubiert und anschließend fixiert, permeabilisiert und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Die Verdrängung des GLP-2-IDCC wurde mit dem IN Cell Analyzer 1000 aufgenommen und mit dem *Granularity Algorithmus* der IN Cell Investigator Software ausgewertet. Die IC_{50} des GLP-2 beträgt dabei $5,01 \pm 2,94$ nM. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die Auswertung der Konzentrations-Wirkungskurven ergaben dabei eine ähnliche Potenz und intrinsische Aktivität des GLP-2-IDCC im Vergleich zum unmarkierten GLP-2 ($3,94 \pm 0,67$ nM versus $1,84 \pm 0,90$ nM) [Abb.26 C]. Das GLP-2-IDCC ließ sich außerdem mit dem unmarkierten GLP-2 vom GLP-2R verdrängen [Abb.26 D] und zeigte keinerlei Reaktion auf β -Arrestin2-GFP- und SCTR-exprimierenden Kontrollzellen (nicht gezeigt).

Um die antagonistische Wirkung von GLP-2(3-33) und anderen N-terminalen Deletionsvarianten des GLP-2 zu untersuchen, wurden sie in Verdünnungsreihen für 5 min bei 37°C auf β -Arrestin2-GFP- und GLP-2R exprimierende U2OS-Zellen gegeben. Anschließend wurden 10 nM GLP-2-IDCC hinzugefügt und die Zellen für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Alle weiteren experimentellen Schritte erfolgten nach dem Standardprotokoll der β -Arrestin2-GFP Translokation [4.4.1].

Tabelle 18 zeigt die Verdrängung von 10 nM GLP-2-IDCC in der β -Arrestin2-GFP Translokation durch N-terminal verkürzte GLP-2-Varianten. Das GLP-2(3-33), das dabei als Ausgangspeptid diente, zeigte eine IC_{50} von $84,55 \pm 52,25$ nM. Diese verschlechterte sich bei weiterer Deletion im GLP-2(6-33) und GLP-2(8-33) (=G207/G209) stark auf Werte von etwa 1000 – 2000 nM. GLP-2(9-33), GLP-2(10-33) und GLP-2(11-33) (=G210/G214/G273) verdrängten GLP-2-IDCC allerdings wieder besser mit einer IC_{50} von 200 – 300 nM vom GLP-2R. GLP-2(14-33) und weiter verkürzte Peptide führten bis zu einer Konzentration von 10 μ M zu keinerlei Verdrängung des GLP-2-IDCC vom GLP-2R. Dies führte zu der Entscheidung auf der Basis des GLP-2(10-33) (=Peptid G214) mit weiteren Modifikationen zu fortzufahren.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP + 10nM GLP-2-IDCC IC_{50} [nM]
GLP-2(3-33)	DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	$84,55 \pm 52,25$
G207	FSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	$976,92 \pm 280,85$
G209	DEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	$1884,37 \pm 272,97$
G210	EMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	$309,87 \pm 97,86$
G214	MNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	$209,03 \pm 48,28$
G273	NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	$292,02 \pm 152,64$
G274	TILDNLAARDFINWLIQTKITD	$8211,72 \pm 2664,11$
G275	LDNLAARDFINWLIQTKITD	-
G277	AARDFINWLIQTKITD	-
G278	RDFINWLIQTKITD	-
G279	FINWLIQTKITD	-
G280	NWLIQTKITD	-

Tabelle 18: Antagonismus von N-terminal verkürzten GLP-2-Varianten am GLP-2R. (-): keine messbaren Reaktionen. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Als erster Schritt wurde die N-terminale Position 10 des GLP-2(10-33) gegen alle anderen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht, um dadurch die Affinität zum GLP-2R wieder zu erhöhen. Tabelle 19 zeigt diese Daten im Vergleich zum Ausgangspeptid GLP-2(10-33), das eine IC_{50} von $209,03 \pm 48,28$ nM zeigte.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP + 10nM GLP-2-IDCC IC_{50} [nM]
G214	MNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	209,03 \pm 48,28
G211	F MNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	120,74 \pm 26,08
G212	Y MNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	147,44 \pm 43,03
G213	W MNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	255,10 \pm 47,27
G216	A NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	982,07 \pm 537,88
G217	R NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	890,84 \pm 345,55
G218	N NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	668,77 \pm 418,58
G219	D NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	1147,70 \pm 552,57
G220	C NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	457,64 \pm 211,78
G221	Q NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	710,34 \pm 373,72
G222	G NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	404,37 \pm 213,67
G223	E NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	1060,19 \pm 358,42
G224	H NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	726,28 \pm 398,45
G225	I NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	418,28 \pm 162,06
G226	L NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	296,93 \pm 104,53
G227	K NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	1820,50 \pm 653,77
G228	F NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	100,68 \pm 25,50
G229	P NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	913,93 \pm 198,99
G230	S NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	978,05 \pm 286,24
G231	T NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	533,31 \pm 306,56
G232	V NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	24,07 \pm 11,66
G234	Y NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	75,38 \pm 19,81
G236	V NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	472,87 \pm 246,61

Tabelle 19: Substitution der N-terminalen Aminosäure an verkürzten GLP-2-Varianten. Substituierte Aminosäuren wurden grau hinterlegt. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Positiv oder negativ geladene Aminosäuren wie Arginin, Lysin, Glutamat und Aspartat führten dabei zu einer Verschlechterung der IC_{50} . Kleine, ungeladene Aminosäuren beeinflussten die IC_{50} tendenziell nicht, während die großen, aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zu einer verbesserten IC_{50} führten, hier vor allem das Tryptophan mit einer IC_{50} von

24,07 ± 11,66 nM. Dies stellt eine Optimierung um etwa den Faktor 10 zum Ausgangspeptid GLP-2(10-33) dar.

Peptid	Sequenz	β-Arr2-GFP + 10nM GLP-2-IDCC IC ₅₀ [nM]
G214	MNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	209,03 ± 48,28
G216	ANTILDNLAARDFINWLIQTKITD	982,07 ± 537,88
G237	MATILDNLAARDFINWLIQTKITD	513,94 ± 134,67
G238	MNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	37,13 ± 8,51
G240	MNTALDNLAARDFINWLIQTKITD	823,34 ± 431,18
G241	MNTIADNLAARDFINWLIQTKITD	212,98 ± 78,89
G242	MNTILANLAARDFINWLIQTKITD	1787,64 ± 701,81
G243	MNTILDALAARDFINWLIQTKITD	95,44 ± 20,53
G245	MNTILDNAARDFINWLIQTKITD	2130,90 ± 1153,29
G246	MNTILDNLAAADFINWLIQTKITD	-
G247	MNTILDNLAARAFINWLIQTKITD	331,83 ± 184,65
G248	MNTILDNLAARDAINWLIQTKITD	-
G249	MNTILDNLAARDFANWLIQTKITD	-
G250	MNTILDNLAARDFIAWLIQTKITD	640,61 ± 47,01
G251	MNTILDNLAARDFINALIQTAKITD	-
G252	MNTILDNLAARDFINWAIQTKITD	-
G253	MNTILDNLAARDFINWLAQTKITD	-
G254	MNTILDNLAARDFINWLIATKITD	332,87 ± 193,47
G255	MNTILDNLAARDFINWLIQAKITD	1875,93 ± 702,27
G256	MNTILDNLAARDFINWLIQTAITD	-
G257	MNTILDNLAARDFINWLIQTKATD	741,42 ± 355,20
G258	MNTILDNLAARDFINWLIQTKIAD	696,69 ± 227,45
G259	MNTILDNLAARDFINWLIQTKITA	206,69 ± 57,62

Tabelle 20: Alanin-Substitutionen des GLP-2(10-33). Substituierte Aminosäuren wurden grau hinterlegt. (-): keine messbaren Reaktionen. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Neben der beschriebenen Veränderung der Position 10 wurde außerdem jede Aminosäure des GLP-2(10-33) durch Alanin ersetzt und die Verdrängung von 10 nM GLP-2-IDCC in der β-Arrestin2-GFP Translokation gemessen. Dabei konnte eine Verbesserung der IC₅₀ bei der Substitution von Thr12 (37,13 ± 8,51 nM) und Asn16 (95,44 ± 20,53 nM) durch Alanin erreicht werden [Tab.20]. Im Gegensatz dazu scheinen die Aminosäuren Arg20, Phe22, Ile23, Trp25,

Leu26, Ile27 und Lys30 für die Bindung des GLP-2(10-33) an den GLP-2R von größerer Bedeutung zu sein. Bei der Substitution dieser Aminosäuren zu Alanin konnte kein kompetitiver Antagonismus bis zu einer Konzentration von 10 μM gemessen werden. Während Phe22, Ile23, Trp25, Leu26 und Lys30 auch für die agonistische Aktivität des nativen GLP-2 eine tragende Rolle spielen [5.4.1] scheinen Arg20 und Ile27 nur für die Bindung des GLP-2(10-33) von Bedeutung zu sein.

Zur Verifizierung der gezeigten Daten aus den Peptidbibliotheken mit Syntheserohprodukten wurden anschließend einige Peptide mit einer Reinheit von über 95 % synthetisiert.

5.4.8 Abschließende Untersuchungen an aufgereinigten GLP-2-Varianten

Wie schon bei der Optimierung des Secretins besprochen, ist es nötig die vielversprechenden Peptide der Peptidbibliotheken aus Syntheserohprodukten in ihrer aufgereinigten Form zu kontrollieren [5.2.11]. Für die Optimierung des GLP-2 wurden zehn Varianten ausgewählt, die teilweise schon in den Peptidbibliotheken aussichtsreich erschienen [Tab.19/Tab.20], aber auch aus Kombinationen vielversprechender Peptide entstanden.

Die aufgereinigten Peptide wurden zunächst in der β -Arrestin2-GFP Translokation auf β -Arrestin2-GFP- und GLP-2R-exprimierenden U2OS-Zellen untersucht [4.4.1]. Die Vorergebnisse aus den Peptidbibliotheken konnten hierbei bestätigt werden. Alle Peptide zeigten ein antagonistisches Verhalten und verdrängten 10 nM GLP-2-IDCC vom GLP-2R [Tab.21]. Die beste IC_{50} zeigten die Peptide G03-2-R und G07-R mit $14,28 \pm 7,31$ bzw. $13,30 \pm 4,41$ nM. Neben der Verwendung eines N-terminalen Tryptophans wurden in diesen Peptiden weitere Aminosäuren durch Alanin ersetzt. Das als Antagonist bekannte GLP-2(3-33) verdrängte das GLP-2-IDCC dagegen mit einer IC_{50} von $84,55 \pm 52,25$ nM [Tab.21]. Vergleichende Kurven dieser drei Peptide zeigt Abbildung 27 A.

Vom GLP-2(3-33) ist bekannt, dass es auch als schwacher partieller Agonist des GLP-2R fungiert. Daher wurden alle Peptidvarianten alleine auf β -Arrestin2-GFP- und GLP2R-exprimierende U2OS-Zellen gegeben und ihre Fähigkeit zur β -Arrestin2-GFP Translokation gemessen. Keine der verkürzten Peptidvarianten zeigte dabei eine agonistische Reaktion im Vergleich zum nativen GLP-2, während das GLP-2(3-33) den GLP-2R nur minimal aktivierte (intrinsische Aktivität von $14,28 \pm 7,37$ % im Vergleich zum nativen GLP-2) [Abb.27 C].

Anschließend sollten die Ergebnisse aus der β -Arrestin2-GFP Translokation mit cAMP-Messungen bestätigt werden. Dafür wurde die cAMP GloSensorTM-Methode gewählt, mit der die Erhöhung der cAMP-Konzentration nach Peptidapplikation in GloSensorTM- und GLP-2R-exprimierenden U2OS-Zellen gemessen wird [4.4.2]. Um die antagonistische Wirkung der Peptide zu untersuchen, wurde die Verdrängung von 0,5 nM GLP-2 durch unterschiedliche Konzentrationen der Peptid-Varianten gemessen. Auch hier zeigten die beiden Peptide G03-2-R und G07-R eine leicht verbesserte Verdrängung gegenüber dem GLP-2(3-33) ($15,94 \pm 3,74$ nM und $28,86 \pm 17,68$ nM im Vergleich zu $52,64 \pm 31,92$ nM) [Abb.27 B].

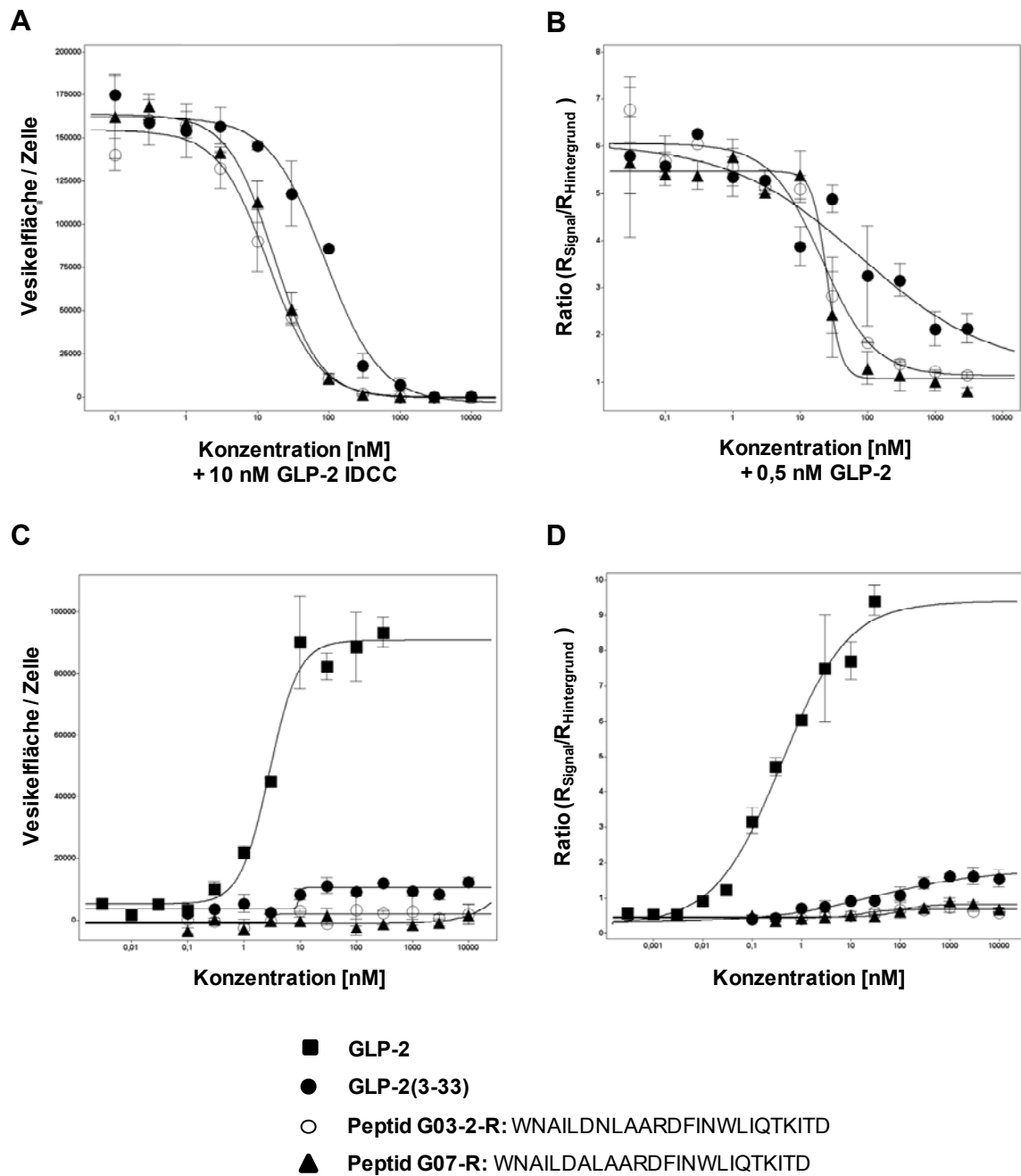


Abbildung 27: β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Bildung durch aufgereinigte GLP-2-Varianten.

A) Antagonismus, β -Arrestin2-GFP Translokation: U2OS-Zellen, die β -Arrestin2-GFP und GLP-2R stabil exprimieren, wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen GLP-2(3-33) bzw. der Peptide G03-2-R und G07-2-R inkubiert und anschließend 10 nM GLP-2-IDCC zugegeben. Nach Fixierung der Zellen wurden Bilder im IN Cell Analyzer 1000 aufgenommen und die gebildete Vesikelfläche/Zelle gemessen. Die Kurven wurden in Spotfire erstellt und die IC_{50} -Werte der Peptide berechnet [Tab.21] **B) Antagonismus, cAMP:** U2OS-Zellen, die GloSensorTM und GLP-2R stabil exprimieren, wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen GLP-2(3-33) bzw. der Peptide G03-2-R und G07-2-R inkubiert und anschließend 0,5 nM GLP-2-IDCC zugegeben. Die cAMP-abhängige Lumineszenz wurde im EnVision gemessen und Konzentrations-Wirkungskurven in Spotfire erstellt. IC_{50} der Peptide siehe Tabelle 21. **C) Agonismus, β -Arrestin-2 GFP Translokation:** Die Kurve zeigt den gleichen Versuchsaufbau wie A), allerdings wurde kein GLP-2-IDCC zugegeben, so dass die reine agonistische Aktivität der Peptide gemessen wurde. EC_{50} GLP-2: $1,84 \pm 0,90$ nM. **D) Agonismus, cAMP:** Die Kurve zeigt den gleichen Versuchsaufbau wie B), allerdings wurde kein GLP-2 zugegeben, so dass die reine agonistische Aktivität der Peptide gemessen wurde. EC_{50} GLP-2: $0,069 \pm 0,02$ nM.

Die agonistische Aktivität der Peptid-Varianten wurde auch im cAMP-Assay überprüft. Dafür wurden die Peptide in Verdünnungsreihen auf die GloSensor™- und GLP-2R-exprimierenden U2OS-Zellen gegeben und die Höhe der cAMP-Bildung im Vergleich zu unstimulierten Zellen gemessen. Dabei fand nur nach Applikation von GLP-2(3-33) eine minimale cAMP-Erhöhung von $6,44 \pm 1,93$ % im Vergleich zum nativen GLP-2 statt [Abb.27 D]. Tabelle 21 zeigt die prozentuale Erhöhung der cAMP-Bildung nach Applikation der Peptide in der höchsten verwendeten Konzentration (10 μ M) im Vergleich zur maximalen cAMP-Bildung nach Applikation von nativem GLP-2.

Um die Spezifität der Peptide für den GLP-2R sicherzustellen wurden Kontrollversuche mit verwandten Rezeptoren der GPCR Klasse B durchgeführt. In der β -Arrestin2-GFP Translokation wurde das agonistische und antagonistische Verhalten der Peptide mit U2OS-Zellen untersucht, die neben dem β -Arrestin2-GFP den VIP1R, VIP2R oder den SCTR stabil exprimieren. Die cAMP-Messungen wurden parallel an U2OS-Zellen durchgeführt, die anstelle des GLP-2R den SCTR exprimieren. In keinem dieser Experimente konnten die GLP-2-Varianten eine agonistische oder antagonistische Reaktion im Vergleich zu den nativen Peptiden VIP und Secretin auslösen.

Peptid	Sequenz	β -Arr2-GFP + 10nM GLP-2-IDCC IC ₅₀ [nM]	cAMP + 0,5 nM GLP-2 IC ₅₀ [nM]	cAMP 10 μ M Peptid [% GLP-2]
GLP-2(3-33)	DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	84,55 \pm 52,25	52,64 \pm 31,92	6,44 \pm 1,93
G01-R	WNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	64,16 \pm 31,99	192,51 \pm 156,78	1,14 \pm 0,20
G02-R	MNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	69,67 \pm 29,84	541,19 \pm 436,54	0,00 \pm 0,00
G03-2-R	WNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	14,28 \pm 7,31	15,94 \pm 3,74	0,00 \pm 0,00
G04-R	Acetyl-WNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	259,73 \pm 46,64	1156,94 \pm 536,79	2,64 \pm 0,56
G05-R	WNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	18,36 \pm 3,04	38,15 \pm 3,12	5,10 \pm 0,39
G06-R	WNTILDALAARDFINWLIQTKITD	62,35 \pm 33,93	108,78 \pm 42,21	6,80 \pm 8,70
G07-R	WNAILDALAARDFINWLIQTKITD	13,30 \pm 4,41	28,86 \pm 17,68	1,13 \pm 1,96
G08-R	YNAILDNLAARDFINWLIQTKITD	30,36 \pm 7,97	53,06 \pm 20,21	0,20 \pm 0,35
G09-R	YNAILDALAARDFINWLIQTKITD	31,77 \pm 6,81	48,42 \pm 20,08	0,00 \pm 0,00
G10-R	2NaI-NTILDNLAARDFINWLIQTKITD	240,97 \pm 89,76	439,90 \pm 147,80	2,75 \pm 3,29

Tabelle 21: β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Messungen mit aufgereinigten GLP-2-Varianten. Bei grau unterlegten Aminosäuren handelt es sich um Substitutionen. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Damit konnten die Daten aus den Peptidbibliotheken bestätigt werden. Die Peptide G03-2-R und G07-R sind potente Antagonisten des GLP-2R sowohl in der β -Arrestin2-GFP Translokation als auch im cAMP-Assay. Im Vergleich zum bisher verwendeten GLP-2(3-33) sind sie um sieben Aminosäuren kürzer und weisen keine partiell agonistische Aktivität am GLP-2R auf.

6 Diskussion

6.1 Der Secretinrezeptor als molekulare Zielstruktur im Tumor

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die erste umfassende Expressionsanalyse des Secretinrezeptors (SCTR) sowohl in Normal- als auch in unterschiedlichen Tumorgeweben. Die bis zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Expressionsdaten beruhten vor allem auf Untersuchungen der SCTR-mRNA oder auf Autoradiographie-Experimenten mit radioaktiv markiertem Secretin^{83,126}. Eine in der Zelle vorhandene mRNA kann dabei einen guten Hinweis auf den möglicherweise vorhandenen Rezeptor geben, ein Nachweis für dessen funktionelle Expression an der Plasmamembran ist sie jedoch nicht^{182,183}. Die Autoradiographie weist dagegen die Bindung eines radioaktiv markierten Liganden an seine Rezeptoren im Gewebe nach. Dabei muss jedoch die Spezifität der Ligandenbindung, in diesem Fall des Secretin, eng kontrolliert werden, da Secretin neben dem SCTR auch mit niedrigerer Affinität an die vasoaktiven intestinalen Peptidrezeptoren VIP1R und VIP2R bindet¹²⁶. Aus diesen Gründen war für die Expressionsanalyse der direkte Nachweis des SCTR selbst über Antikörperfärbungen in der Immunhistochemie vorzuziehen.

Eine erste Validierung des in dieser Arbeit verwendeten SCTR-Antikörpers konnte im „Human Protein Atlas“ eingesehen werden¹⁸⁴, die eigene Validierung bestätigte diese Daten. Der verwendete Antikörper ist sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz spezifisch für den SCTR. Die in der Immunhistochemie deutlich detektierte Membranfärbung unterstützt dies weiter.

In normalem Gewebe konnte der SCTR in den Epithelien diverser Organe, wie Magen, Dünndarm, Rektum, Pankreas, Leber, Gallenblase, Zervix, Brust und Niere nachgewiesen werden. Keine SCTR-Expression zeigten Lymphknoten, Nebenniere, Milz, Hoden und Plazenta. Dies bestätigt die Daten aus vorangegangenen Publikationen zum größten Teil, die mRNA des SCTR konnte im Gegensatz zu den Immunhistochemie-Ergebnissen dieser Arbeit jedoch auch im humanen Hoden und in der Milz sowie in der Nebenniere der Maus gefunden werden^{83,137}. Eine physiologische Funktion des SCTR ist zum heutigen Zeitpunkt jedoch nur in den gastrointestinalen Organen bekannt [1.6.1].

Bei der Analyse diverser Tumorgewebe konnte eine starke SCTR-Expression in 93 % aller untersuchten duktalem Adenokarzinome des Pankreas nachgewiesen werden, wobei eine fehlende Expression meist mit einem schwachen Differenzierungsgrad des Tumors korrelierte. Differentialdiagnostisch ist vor allem die gutartige, duktalem Hyperplasie abzugrenzen, in der der SCTR ebenfalls stark exprimiert wird. Keine übermäßige Expression im Vergleich zum Normalgewebe zeigten die entzündlichen pankreatischen Erkrankungen. Eine Expression des SCTR in duktalem pankreatischen Adenokarzinomen konnte schon autoradiographisch gezeigt werden, allerdings beschreiben die Autoren eine Abnahme der Rezeptordichte im Vergleich zum pankreatischen Normalgewebe, was in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte¹²⁶. Möglicherweise ist dies durch die unterschiedlichen verwendeten Methoden verursacht (Immunhistochemie versus Rezeptorautoradiographie). Im Gegensatz dazu konnten die per Autoradiographie gewonnenen Daten der gleichen Arbeitsgruppe bezüglich der SCTR-Expression in der Leber bestätigt werden. Im hepatozellulären Karzinom war kein SCTR nachzuweisen¹³⁶.

Neben dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas wurde auch in 94 % aller untersuchten Plattenepithelkarzinome des Ösophagus eine starke Expression des SCTR nachgewiesen, wobei der normale Ösophagus nur eine schwache Expression im Stratum basale des Plattenepithels aufwies. Auch bei diesem Tumortyp korrelierte eine schwache SCTR-Expression meist mit einem schwachen Differenzierungsgrad der Tumoren.

Neben Tumoren des Pankreas und des Ösophagus wurde auch eine große Anzahl gastrointestinaler neuroendokriner Tumore auf ihre SCTR-Expression untersucht, wobei 50 % den SCTR exprimierten. Dies steht im Gegensatz zu bisher publizierten Daten, die eine sehr hohe Rezeptordichte in 89 % der per Autoradiographie untersuchten Gastrinome, einem Subtyp der neuroendokrinen Tumore, beschreiben¹²⁶. Neben der unterschiedlichen verwendeten Methodik zum Nachweis des SCTR könnte zusätzlich das Vorhandensein von SCTR-Splicevarianten diese Unterschiede erklären. Die in Gastrinomen gezeigte Deletion von Exon drei im extrazellulären N-Terminus könnte sowohl eine gestörte Antikörper-, als auch eine gestörte Ligandenbindung verursachen^{126,185}.

Diese Beobachtungen zeigen, dass es sich beim SCTR um ein vielversprechendes Zielmolekül für die gerichtete Diagnostik von pankreatischen, duktalem Adenokarzinomen und ösophagealen Plattenepithelkarzinomen handelt.

Für die molekulare Bildgebung sollte der SCTR eine hohe Expression im Tumor gegenüber einer fehlenden oder sehr niedrigen Expression im gesunden Gewebe aufweisen, um einen guten Kontrast, und damit eine deutliche Tumordetektion, sicherzustellen. Die hohe Expression des SCTR konnte, wie oben beschrieben, in den duktalem, pankreatischen Adenokarzinomen und den Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nachgewiesen werden. Daneben wurde der SCTR aber auch in Epithelien des gesunden Gewebes detektiert. Dies könnte sich in der molekularen Bildgebung als Nachteil erweisen, da der Kontrast zwischen dem Tumor und seinem umgebendem Gewebe dadurch niedrig erscheinen könnte. Diesen wichtigen Punkt gilt es noch zu klären, da hierfür ein geeigneter Kontrastmittel-markierter Ligand für die entsprechenden *in vivo*-Versuche benötigt wird. Da die Entwicklung eines solchen Liganden für den SCTR jedoch erst Bestandteil dieser Arbeit war, steht die Klärung dieser Frage noch aus.

In Vorbereitung auf die spätere Verwendung von *in vivo*-Tumormodellen der Maus sollten Zelllinien identifiziert werden, die den SCTR endogen exprimieren. Dafür wurden zunächst Gewebeschnitte von unterschiedlichen Zelllinien aus Xenograft-Tumoren der Maus auf ihre SCTR-Expression untersucht. Dabei zeigten die Tumoren der pankreatischen Tumorzelllinie BxPC-3 und der Plattenepithelkarzinomzelllinie des Ösophagus, Kyse410, eine Expression des SCTR.

In den sich anschließenden funktionellen Experimenten wurde das IDCC-markierte Secretin in die BxPC-3-, nicht aber in die Kyse410-Zellen, internalisiert. Allerdings konnte in den BxPC-3-Zellen keine Erhöhung der cAMP-Konzentration nach der Applikation von Secretin gemessen werden. Dies konnte schon durch Al-Nakkash et al. beschrieben werden¹⁸⁶. Weitere funktionelle Versuche wie Kalzium-Mobilisierung und β -Arrestin2-GFP Translokation erbrachten ebenfalls keinen Hinweis

darauf, dass der in BxPC-3- und Kyse410-Zellen vorhandene SCTR einen zellulären Signalweg auslöst. Diese Beobachtungen waren nicht zu erwarten und konnten bis jetzt noch nicht genau geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre das Vorliegen von SCTR-Splicevarianten in diesen Tumoren, die zwar das Epitop des Antikörpers beinhalten, aber keinen Signalweg aktivieren können^{73,74}. Daneben könnten in den Zellen aber auch noch andere, bisher noch nicht untersuchte Signalwege, durch Secretin aktiviert werden, z.B. die verschiedenen MAPK-Signalwege.

6.2 Die β -Arrestin2-GFP Translokation zur funktionellen Charakterisierung von Liganden der GPCR-Klasse B

Aufgrund der hohen Bedeutung der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren und ihrer Liganden für die pharmazeutische Industrie existiert eine Vielzahl an Methoden, um deren Aktivität funktionell zu charakterisieren. Am Beginn des Projekts stand daher die Auswahl und Etablierung einer geeigneten Methode für die Untersuchung von Liganden des SCTR und Glucagon-like peptide-2-Rezeptors (GLP-2R). Wie alle anderen Rezeptoren der GPCRs der Klasse B binden auch diese Rezeptoren nach ihrer Aktivierung an das $G\alpha_s$ -Protein, was letztendlich zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt⁶³ [1.2]. Der klassische Weg zur Charakterisierung von Liganden dieser Rezeptoren wäre daher die Messung des cAMP-Anstiegs gewesen, die in dieser Arbeit jedoch nur als sekundäre Methode gewählt wurde. Dafür gab es zunächst zwei Gründe: Zum einen wurde in einem Nebenprojekt auch mit GPCRs gearbeitet, deren Signalweg unbekannt ist, und deren Liganden daher nicht ausschließlich über eine cAMP-Methode charakterisiert werden können. Zum anderen sind Methoden, die cAMP-Konzentrationen messen, sehr kostenintensiv. Mit der Etablierung der β -Arrestin2-GFP Translokation konnten beide Probleme umgangen werden.

Mit nur wenigen Ausnahmen (z.B. Urotensin II-Rezeptor, nicht gezeigt) löst die Aktivierung aller untersuchten GPCRs die Translokation des β -Arrestin2-GFPs in Vesikel konzentrationsabhängig aus, wobei die Anzahl und Größe der gebildeten Vesikel von dem aktivierten GPCR abhängig ist und variieren kann¹⁶⁶. Die β -Arrestin2-GFP Translokation ist gleichzeitig extrem kostengünstig, eine *High-Content-Analyse*-Plattform vorausgesetzt. Neben den Standardkosten für die Zellkultur fallen im Gegensatz zu anderen Methoden kaum weitere Kosten für Substrate, Kits, Antikörper etc. an. Dies macht die β -Arrestin2-GFP Translokation vor allem für akademische Gruppen interessant, die eine Ligandenbibliothek von kleinerer bis mittlerer Größe untersuchen möchten. Für die Analyse sehr großer Ligandenbibliotheken im Industriemaßstab wäre die β -Arrestin2-GFP Translokation mit einem maximalen Durchsatz von etwa 50-60 96well-Platten/Tag relativ langsam. Ein weiterer Vorteil der β -Arrestin2-GFP Translokation ist außerdem die extrem einfache Handhabung, die von jedermann durchgeführt werden kann und eine sehr hohe Reproduzierbarkeit ermöglicht.

In den letzten Jahren konnten vermehrt Signalweg-spezifische Liganden identifiziert werden, die entweder nur G-Protein- oder nur Arrestin-vermittelte zelluläre Reaktionen auslösen²¹ [1.2.2]. Aus

diesem Grund sollten zur vollständigen Charakterisierung eines Liganden/Rezeptor-Paares immer unterschiedliche Effektormoleküle betrachtet werden. Für die in dieser Arbeit verwendeten GPCRs der Klasse B, die alle G-Proteine der Klasse $G\alpha_s$ aktivieren, bieten sich neben der β -Arrestin2-GFP Translokation die durchgeführten cAMP-Messungen als zusätzliche Methode an. Für andere GPCRs wäre die Kalzium-Mobilisierung (vor allem für $G\alpha_q$ -Protein-koppelnde GPCRs) oder auch die Detektion von phosphorylierter ERK oder anderen MAPK eine geeignete zweite Methode.

In Abschnitt 5.2.2 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die β -Arrestin2-GFP Translokation grundsätzlich zu höheren EC_{50} -Werten im Vergleich zu den herkömmlichen cAMP-Methoden führt. Dies konnte auch durch andere Gruppen beobachtet werden¹⁷⁰. Es wird angenommen, dass dies durch die Signalamplifikationskaskade verursacht wird, die der cAMP-Bildung vorausgeht. Durch die Aktivierung eines GPCRs werden viele cAMP-Moleküle gebildet, im Gegensatz dazu bindet jedoch nur ein β -Arrestin-Molekül an einen GPCR. Dies könnte der Grund für die erhöhte Sensitivität der cAMP-Methoden im Vergleich zur β -Arrestin2-GFP Translokation sein. Diese Tatsache muss vor allem bei der Verwendung von seltenen und teuren Liganden/Substanzen bedacht werden, da für die β -Arrestin2-GFP Translokation dadurch eine höhere Ausgangskonzentration eingesetzt werden muss. Dies machte es auch in dieser Arbeit notwendig bei einigen Liganden auf eine cAMP-Methode auszuweichen, weil mit der maximal einsetzbaren Konzentration der Liganden in der β -Arrestin2-GFP Translokation keine ausreichende zelluläre Reaktion erzielt werden konnte.

Sowohl für den SCTR als auch für den GLP-2R ist eine Arrestin-unabhängige Internalisierung nach der Aktivierung durch ihre Liganden beschrieben^{71,98,99}. Es stellte sich daher die Frage, wie es bei der β -Arrestin2-GFP Translokation zu einer β -Arrestin2-GFP-Vesikelbildung nach der Aktivierung der Rezeptoren mit Secretin oder GLP-2 kommen kann. Die Lösung scheint das unterschiedliche Verhalten der β -Arrestin2-Moleküle der verschiedenen Spezies zu sein. In der β -Arrestin2-GFP Translokation wird grundsätzlich das β -Arrestin2 der Ratte verwendet¹⁶⁶, gleiche Versuche mit den humanen β -Arrestin1- oder β -Arrestin2-Proteinen führten mit allen verwendeten GPCRs zu weitaus schwächeren oder fehlenden Reaktionen (nicht gezeigte Vorexperimente). Diese Beobachtung ist überraschend, da das β -Arrestin2 der Ratte zu 96 % identisch mit der humanen Variante ist. Hier wäre zu klären, ob die wenigen Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz zu einer unterschiedlichen Bindung an den GPCR oder an weitere Moleküle der Internalisierungsmaschinerie führen. Diese Beobachtung zeigt allerdings, dass die β -Arrestin2-GFP Translokation als reine Liganden-Charakterisierungs-Methode angesehen werden sollte, die zunächst keine Rückschlüsse auf das endogene Verhalten eines GPCRs in der Zelle zulässt.

6.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Secretin und GLP-2

Bedeutung der einzelnen Aminosäuren des Secretin und GLP-2 für die Aktivierung ihrer Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung jeder einzelnen Aminosäure im Secretin und GLP-2 durch systematische Substitutionen zu Alanin untersucht. In diesem *Alanin-Scan* wurde die Potenz und die intrinsische Aktivität in der β -Arrestin2-GFP Translokation an Rezeptor-transfizierten U2OS-Zellen gemessen. Dabei spielte das N-terminale Histidin sowohl für das Secretin als auch für das GLP-2 eine große Rolle. Die Substitution dieser Aminosäure resultierte in einer Verschlechterung der Potenz und/oder einer Verringerung der intrinsischen Aktivität der Peptide. Weiterhin sind für Secretin und GLP-2 die Aminosäuren Asp3 und Phe6 wichtig⁵⁸. Diese Aminosäuren sind auch in anderen Peptiden der GPCRs der Klasse B hochkonserviert [Abb.5], so dass von einer grundsätzlichen Bedeutung dieser Aminosäuren für die Aktivierung der Rezeptoren ausgegangen werden kann. Im Secretin führte außerdem die Substitution fast aller Leucine zu einer verminderten Potenz bei gleichbleibender intrinsischer Aktivität.

Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit veröffentlichte eine andere Arbeitsgruppe ebenfalls Ergebnisse eines *Alanin-Scans* für das Secretin⁹². Auch in ihren Experimenten war die Potenz des Secretin durch Alanin-Substitutionen an His1, Asp3 und Phe6 stark vermindert. Photoaffinitäts-Experimente zeigten zuvor, dass His1 in engem Kontakt mit der Aminosäure Phe338 des SCTR steht, welche sich auf der extrazellulären Seite der Transmembrandomäne sechs befindet¹⁸⁷. Asp3 interagiert dagegen mit Tyr128 in der ersten Transmembrandomäne und Lys173 in der ersten extrazellulären Schleife des SCTR^{58,188}. Phe6 des Secretin befindet sich mit Val4 der distalen extrazellulären Domäne des SCTR in engem Kontakt¹⁸⁹.

Auch die Substitution der schon erwähnten C-terminalen Leucine beeinträchtigte die Potenz des Peptids am SCTR im *Alanin-Scan* von Dong et al.⁹². In ihren Experimenten konnte das Leu an Position 10 zwar nicht ohne Potenz-Verlust durch Alanin ersetzt werden, die Substitution mit Tyrosin war jedoch möglich¹⁹⁰. Dies lässt vermuten, dass an dieser Stelle im Secretin eine größere Aminosäure als Alanin nötig ist, um mit dem SCTR zu interagieren bzw. diesen zu aktivieren.

Entgegen der hier gezeigten Ergebnisse fanden Dong et al. jedoch auch starke Einschränkungen der Secretin-Potenz durch Alanin-Substitution der Aminosäuren Gly4, Thr7, Ser8, Glu9, Asp15 und Leu23. Die meisten dieser Aminosäuren sind in den GPCR-Klasse B-Peptiden hochkonserviert [Abb.5], für Leu23 wurde in Photoaffinitäts-Experimenten der Kontakt mit Arg21 des SCTR nachgewiesen¹⁹¹. Dong et al. untersuchten in ihrem *Alanin-Scan* sowohl die Bindung des Secretin an den SCTR als auch die cAMP-Bildung nach der Aktivierung durch die modifizierten Peptide in stabil transfizierten CHO-Zellen, wobei sichtbar wird, dass für die Bindung und die cAMP-Bildung teilweise unterschiedliche Aminosäuren eine wichtige Funktion erfüllen [Abb.28, Reihen 3 und 4]. Dies ist grundsätzlich zu erwarten, da die Bindung eines Liganden nicht zwangsläufig eine Aktivierung des Rezeptors auslöst, sondern auch zu einer antagonistischen Reaktion führen kann. Die in dieser Arbeit erzeugten Daten fügen mit der β -Arrestin2-GFP Translokation als Ausdruck der Rezeptor-Internalisierung einen weiteren Aspekt hinzu, der durch die vorgenommenen Alanin-Substitutionen generell weniger stark beeinträchtigt wird [Abb.28]. Dies könnte an der schon oben

diskutierten niedrigeren Sensitivität der β -Arrestin2-GFP Translokation im Vergleich zu anderen Methoden liegen [6.2]. Andererseits könnte die Translokation des β -Arrestins aber auch ohne die vorherige Aktivierung des cAMP-Signalwegs stattfinden.

Beim Vergleich der Daten in Abbildung 28 ist allerdings zu beachten, dass sich Dong et al. mit dem Secretin der Ratte am SCTR der Ratte beschäftigten, so dass Spezies-spezifische Unterschiede im Vergleich zu dieser Arbeit nicht ausgeschlossen sind. Ein Vergleich der intrinsischen Aktivitäten war durch fehlende Daten in Dong et al. nicht möglich⁹².

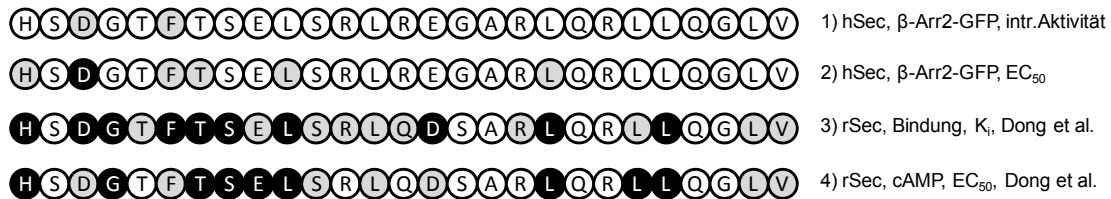


Abbildung 28: Vergleich der Daten verschiedener Alanin-Scans des Secretin. Jede Aminosäure des Secretin wurde durch Alanin ersetzt und der biologische Effekt der entstehenden Peptidvarianten mit unterschiedlichen Methoden am SCTR gemessen. Die Reihen 1 und 2 zeigen die in dieser Arbeit erzeugten β -Arrestin2-GFP Translokations-Daten des humanen Secretins am humanen SCTR, wobei Reihe 1 die intrinsische Aktivität und Reihe 2 die EC₅₀ angibt. Die Reihen 3 und 4 zeigen die Daten von Dong et al.⁹², des Secretins der Ratte am SCTR der Ratte. Hier wurde die Bindung des Peptids an den Rezeptor (Reihe 3) und die EC₅₀ in cAMP-Messungen (Reihe 4) bestimmt. Weiß: <10x verschlechtert im Vergleich zum Wildtyp, Grau: >10x - <100x, Schwarz: >100x. Graphik modifiziert nach Dong et al.⁹²

Für GLP-2 lagen schon vor Beginn dieser Arbeit Ergebnisse aus einem Alanin-Scan vor¹¹⁴. Auch hier wurden die modifizierten GLP-2-Peptide auf ihre Bindung an den GLP-2R und die cAMP-Bildung untersucht. Wie schon für das Secretin gab es auch in dieser Studie deutliche Unterschiede zwischen beiden Methoden. His1, Asp3 und Thr32 waren für die cAMP-Bildung von hoher Bedeutung während ihre Substitution zu Alanin kaum Effekt auf die Bindung der Peptide an den GLP-2R hatte. Auch für die β -Arrestin2-GFP Translokation spielen His1 und Asp3 eine wichtige Rolle, während der Austausch von Thr32 keine Verschlechterung der Potenz oder intrinsischen Aktivität zeigte [Abb.29]. Auch das Leucin an Position 17 konnte in der β -Arrestin2-GFP Translokation problemlos zu Alanin substituiert werden während es in der Bindung und in den cAMP-Messungen von DaCambra et al. von hoher Bedeutung war¹¹⁴. Allerdings wurde auch in dieser Arbeit der GLP-2R der Ratte verwendet, so dass Spezies-spezifische Unterschiede grundsätzlich möglich sind. Wichtige Aminosäuren im C-Terminus des GLP-2 sind vor allem das Phe22, das Trp25 und das Lys30. Ein Docking-Modell des GLP-2 mit einer Modellstruktur der extrazellulären Domäne des GLP-2R zeigt eine hydrophile Interaktion des Lys30 des GLP-2 mit Asp101 und Asp151 des GLP-2R⁴¹.

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten und den bereits publizierten Daten von Dong et al. und DaCambra et al. lassen sich daher die wichtigen Aminosäuren des Secretin und des GLP-2 benennen. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Methoden können zusätzlich Rückschlüsse auf die Bedeutung der jeweiligen Aminosäuren in Bezug auf die Peptid-Bindung, cAMP-Bildung und Rezeptor-Internalisierung gezogen werden. Dieses Wissen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Peptid-Varianten dar.

Struktur-Aktivitätsbeziehungen von N-terminal verkürzten GLP-2-Varianten

Um eine kurze, affine GLP-2-Variante herzustellen, wurde während der Peptidoptimierung neben dem oben diskutierten *Alanin-Scan* des nativen GLP-2 ein weiterer *Alanin-Scan* mit der N-terminal verkürzten Variante GLP-2(10-33) durchgeführt. Während beim nativen GLP-2 die agonistische Potenz/Aktivität gemessen wurde, wurde beim GLP-2(10-33) die antagonistische Aktivität in Verdrängungsexperimenten mit 10 nM GLP-2-IDCC in der β -Arrestin2-GFP Translokation bestimmt. Beim Vergleich der beiden Datensätze fällt auf, dass bestimmte Aminosäuren des GLP-2 lediglich für die agonistische Aktivität am GLP-2R wichtig sind, während andere Aminosäuren nur für die antagonistische Aktivität des GLP-2(10-33) eine Rolle spielen [Abb.29].

Die Substitution von Met10 und Gln28 zu Alanin verschlechterte die agonistische Aktivität des GLP-2 beispielsweise um mehr als das Zehnfache, während die gleiche Substitution im GLP-2(10-33) keinen Effekt auf den Antagonismus zeigte. Das Met10 ist Bestandteil eines sogenannten „*N-capping motifs*“, welches für den Agonismus der Klasse B-Peptide eine wichtige Funktion zu haben scheint⁴⁴. Man nimmt an, dass dieses Motiv, welches aus den Aminosäuren Phe6, Ser7 und Met10 des GLP-2 besteht, für die Initiation und Stabilisierung der Peptid-Alpha-helix verantwortlich ist, die durch die Bindung des Peptids an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gebildet wird. Beim GLP-2(10-33) fehlen grundsätzlich schon die beiden anderen Aminosäuren dieses Motivs, Phe6 und Ser7, so dass eine Substitution des Methionins wahrscheinlich nicht mehr ausschlaggebend für die Bindung an den GLP-2R ist.

Im Gegensatz dazu werden im GLP-2(10-33) einige Aminosäuren wichtig, die im nativen GLP-2 kaum eine Rolle spielen. Leu17, Arg20 und Ile27 konnten im GLP-2 ohne Verlust an agonistischer Aktivität durch Alanin ersetzt werden, während die antagonistische Aktivität des GLP-2(10-33) um mehr als den Faktor zehn abnahm. Zum einen kann man vermuten, dass durch die Deletion des GLP-2-N-Terminus einige, für die Bindung an den GLP-2R wichtige, Aminosäuren fehlen, so dass die Substitution zunächst weniger wichtiger Aminosäuren im GLP-2(10-33) stärker ins Gewicht fällt als beim nativen GLP-2. Zum anderen könnte es aber auch sein, dass die genannten Aminosäuren lediglich für die antagonistische, aber nicht für die agonistische Aktivität, am GLP-2R in der β -Arrestin2-GFP Translokation von Bedeutung sind.

Der GLP-2-*Alanin-Scan* von DaCambra et al. wurde oben schon ausführlich diskutiert. In ihren Daten aus Bindungsstudien und cAMP-Assays führte die Substitution von Leu17 und auch Arg20 auch im nativen GLP-2 neben einer schlechteren Bindung zusätzlich zu einer Verringerung der agonistischen Aktivität¹¹⁴.



Abbildung 29: Vergleich der *Alanin-Scans* von GLP-2 und GLP-2(10-33). Jede Aminosäure des GLP-2 und des GLP-2(10-33) wurde durch Alanin ersetzt und die agonistische Aktivität (GLP-2) bzw. antagonistische Aktivität (GLP-2(10-33)) in der β -Arrestin2-GFP Translokation gemessen. Reihe 1 zeigt die agonistische Potenz der Varianten, Reihe 2 zeigt die antagonistische Aktivität gegenüber 10 nM GLP-2-IDCC. Weiß: <5x verschlechtert im Vergleich zu den Ausgangspeptiden GLP-2 (Reihe 1) bzw. GLP-2(10-33) (Reihe 2), Grau: >5x - <10x, Schwarz: >10x.

Einfluss von N-terminalen Substitutionen auf die Potenz und Aktivität von Secretin und GLP-2

Die Peptide der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren der Klasse B weisen eine sehr hohe Homologie in ihren N-terminalen Aminosäuren auf [1.4.2]. Es wird allgemein angenommen, dass diese N-terminalen Aminosäuren durch ihre Bindung an die Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen der GPCRs die intrazelluläre G-Protein-Bindung, und damit die Aktivierung der Signalwege, auslösen [1.4.1]^{37,44}.

Sowohl für das Secretin als auch für das GLP-2 wurden in dieser Arbeit multiple Substitutionen innerhalb der N-terminalen Aminosäuren vorgenommen und die Potenz und Aktivität der modifizierten Peptide in der β -Arrestin2-GFP Translokation gemessen [5.2.1]. Dabei zeigte sich ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Secretin und GLP-2. Während bei Substitutionen innerhalb des N-Terminus des Secretins die Potenz und intrinsische Aktivität gleichermaßen beeinträchtigt wurden, führten Substitutionen im N-Terminus des GLP-2 vor allem zum Verlust an intrinsischer Aktivität, während die Potenz seltener betroffen war. Diese alleinige Verschlechterung der intrinsischen Aktivität ist durch das Aktivierungsmodell der Klasse B-GPCRs zu erklären: Ein N-terminal substituiertes Peptid sollte mit den nativen C-terminalen Aminosäuren ähnlich affin wie das Wildtyp-Peptid an den GPCR binden können, was in einer gleichbleibenden Potenz (EC_{50}) resultiert. Für die Aktivierung des GPCRs spielt anschließend jedoch der N-Terminus des Peptids die entscheidende Rolle, so dass eine ungünstige Substitution in diesem Bereich eine Aktivierung und damit die intrinsische Aktivität vermindert.

Das Histidin an Position 1 spielt sowohl im GLP-2 als auch im Secretin eine tragende Rolle. Im GLP-2 konnte es nur durch die großen, hydrophoben Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan ersetzt werden. Im Secretin konnte D-Histidin verwendet werden (Tyr und Trp wurden hier nicht untersucht).

Die Position 2 sollte mit einer kleinen Aminosäure besetzt sein (nativ im GLP-2: Alanin, nativ im Secretin: Serin). Substitutionen zu Ala, Ser, Gly und Pro waren in beiden Peptiden ohne den Verlust an Potenz oder intrinsischer Aktivität möglich, während große, geladene Aminosäuren diese stark beeinträchtigten.

Das Aspartat an Position 3 hat ebenfalls eine große Bedeutung. Im GLP-2 konnte es nur durch das eng verwandte Glutamat, im Secretin durch D-Aspartat ersetzt werden.

Die Position 4 muss dagegen wieder zwingend mit einer kleinen Aminosäure besetzt werden.

Im Gegensatz dazu können die meisten natürlichen Aminosäuren, mit der Ausnahme von Prolin, an Position 5 eingebaut werden. Dies konnte aus den bisher bekannten NMR-Strukturen der GPCR Klasse B-Peptide vermutet werden. All diese Peptide bilden bei der Bindung an ihren GPCR eine Alphahelix, die beim GLP-2 an Position 6 beginnt³⁹⁻⁴³. Prolin kann aufgrund seiner Struktur jedoch nur schlecht in eine Alphahelix eingebaut werden. Sterische Hinderungen und fehlende Wasserstoffbrückenbindungen führen zu einem Knick in der Helix, der die Sekundärstruktur und damit das Bindungsverhalten eines Peptids oder Proteins gravierend ändert¹⁹². Die massive Verschlechterung der Potenz und Aktivität der untersuchten Secretin- und GLP-2-Varianten nach Substitution zu Prolin an einer ansonsten flexiblen Position unterstützt daher die NMR-Daten

funktionell⁴¹. Alle weiteren Substitutionen mit Prolin im Secretin bis Position 10 resultierten ebenfalls in einem Verlust der kompletten Aktivität.

Das hochkonservierte Phenylalanin an Position 6 konnte im Secretin durch keine andere Aminosäure ersetzt werden, ähnliches gilt für das Thr7.

Etwas weniger, aber noch deutlich, wird die Position 10 (nativ: Leucin) durch Substitutionen beeinträchtigt. Eine wichtige Funktion des Phe6, Thr7 und Leu10 ist möglicherweise die Initiation der alpha-helikalen Struktur des Secretins nach der Bindung an den SCTR. Die drei Aminosäuren bilden dabei das *N-capping motif*, welches stabilisierend auf die N-Termini einer Alpha-helix wirkt und damit die Bindung des Secretin an den SCTR verbessert⁴⁴.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der „ideale“ N-Terminus eines GPCR Klasse B-Peptids aus einer hydrophoben Aminosäure (AS), einer kleinen AS, einer sauren AS, einer kleinen AS, einer weiteren AS und einem Phenylalanin besteht. Die gilt jedoch auch nur mit Einschränkungen. Ein modifizierter N-Terminus, der nach diesem Schema erzeugt wurde (Peptid G194: YGEGEF...) aktiviert den GLP-2R ähnlich dem nativen N-Terminus des GLP-2. Ersetzt man jedoch den N-Terminus des Secretin mit dieser Sequenz findet keine aktivierende Reaktion am SCTR statt (nicht gezeigt). Die Bildung anderer chimärer Liganden, die aus Kombinationen unterschiedlicher GPCR Klasse B-Peptide zusammengesetzt sind, ist jedoch grundsätzlich möglich¹⁹³.

Im Gegensatz zu den N-terminalen Aminosäuren zeigt sich der C-Terminus des Secretin hochflexibel in Bezug auf einzelne Substitutionen. Kaum eine einzelne Substitution verschlechterte die Potenz oder die intrinsische Aktivität um mehr als den Faktor zehn im Vergleich zum nativen Secretin.

6.4 Optimierung von Secretin- und GLP-2-Varianten für die zielgerichtete Tumordiagnostik

Die zuvor beschriebenen Struktur-Aktivitätsbeziehungen stellen eine wichtige Voraussetzung für die zielgerichtete Entwicklung neuer Peptidliganden dar. In dieser Arbeit sollten Secretin- und GLP-2-Varianten identifiziert werden, die sich für die zielgerichtete Tumordiagnostik des SCTR bzw. GLP-2R eignen. Für den SCTR konnte in dieser Arbeit eine starke Expression in duktalem, pankreatischen Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nachgewiesen werden. Eine optimierte Secretin-Variante sollte nun als Trägerpeptid fungieren um Kontrastmittel für die Diagnostik zielgerichtet zum Tumor zu bringen. Aufgrund fehlender spezifischer Antikörper stehen die Expressionsanalysen für den GLP-2R zum momentanen Zeitpunkt noch aus, ein optimiertes GLP-2 Peptid sollte jedoch schon im Vorfeld entwickelt werden.

Ein ideales Trägerpeptid sollte dabei spezifisch an seinen Rezeptor binden, der im Idealfall nur im Tumor exprimiert wird. Es sollte außerdem möglichst kurz sein, um die Kosten der Peptidsynthese so niedrig wie möglich zu halten. Zusätzlich sollten die entwickelten Peptide über eine hohe Stabilität verfügen. Das native GLP-2 wird innerhalb weniger Minuten durch die

Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) inaktiviert und auch Secretin besitzt nur eine kurze Halbwertszeit von etwa 2 - 30 min nach intravenöser Injektion^{111,112,194,195}.

In den ersten Optimierungsversuchen sollten sowohl agonistische als auch antagonistische Peptide untersucht werden, da bisher noch nicht endgültig geklärt werden konnte, ob eine der beiden Ligandengruppen als Trägerpeptid besser geeignet ist [siehe unten]. Ein sekundäres Ziel dieser Versuche war die Entwicklung von reinen, potenten SCTR- bzw. GLP-2R-Antagonisten.

Optimierung des Secretin für die zielgerichtete Tumordiagnostik

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um eine geeignete Secretin-Variante als Trägerpeptid für die zielgerichtete Tumordiagnostik zu entwickeln. Im ersten Schritt sollte eine Verkürzung des Peptids erreicht werden, um die Anzahl der Substitutionsmöglichkeiten zu verringern. Dies erleichtert die systematischen Substitutionen innerhalb eines Peptids um ein Vielfaches und spart Arbeit und Synthesekosten im Verlauf der weiteren Peptid-Entwicklung.

Dabei lag der Fokus zunächst auf der Entwicklung eines agonistisch wirkenden Peptids. Einfache N- oder C-terminale Deletionen führten jedoch schnell zu einem Verlust der Aktivität am SCTR⁹⁴. Ein weiterer Ansatz war die Entwicklung eines kurzen, agonistischen Peptids nach dem Vorbild eines bereits beschriebenen Glucagon-like peptide-1 Rezeptor (GLP-1R)-Agonisten. Hier wurden die ersten neun Aminosäuren des nativen Peptids erhalten und die Positionen 10 und 11 durch nicht-proteinogene Aminosäuren ersetzt, die für die Peptidaffinität und -spezifität sorgen^{179,196,197}. Entsprechende Versuche durch Modifikation des Secretin waren jedoch nicht erfolgreich.

Für den SCTR wurde außerdem die „Endogene-Agonisten-Theorie“ beschrieben. Dabei soll die Bindung des nativen Secretin an die extrazelluläre Domäne (ECD) des Rezeptors für eine Umlagerung sorgen, so dass ein Abschnitt der ECD selbst (der sogenannte „endogene Ligand“) den Rezeptor aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass kurze Peptide mit der Sequenz aus der eigenen ECD den SCTR aktivieren können⁵⁰. Die beschriebenen Peptide wurden auch in dieser Arbeit verwendet, allerdings konnte entgegen der Daten von Dong et al. keine Aktivierung des SCTR sowohl in der β -Arrestin2-GFP Translokation als auch in cAMP-Messungen detektiert werden [5.4.5]. Dong et al. arbeiteten jedoch in ihren Experimenten mit dem SCTR der Ratte, der stabil in CHO-Zellen exprimiert wurde, während in dieser Arbeit der humane SCTR in U2OS-Zellen verwendet wurde. Spezies-spezifische Unterschiede zwischen den Experimenten können daher nicht ausgeschlossen werden.

Für die zielgerichtete Tumordiagnostik wird eine möglichst hohe Konzentration der Kontrastmittelmarkierten Trägerpeptide im Tumor benötigt. Zunächst wurden vor allem Agonisten als Trägerpeptide verwendet, weil man sich durch ihre Internalisierung eine höhere Akkumulation in den Tumoren versprach. Später entwickelten Gjinj et al. jedoch einen Somatostatinrezeptor-Antagonisten, der sich im Vergleich zu den bisher verwendeten Agonisten verstärkt in die Tumoren einlagerte. Darüberhinaus war das gewonnene Signal deutlich länger im Tumor messbar. Die Autoren spekulieren, dass Agonisten nur an eine beschränkte Anzahl von Rezeptorkonformationen binden können. Antagonisten binden dagegen weniger selektiv und decken damit mehrere

mögliche Rezeptor-Bindungsstellen ab. Dies resultiert schließlich in einer gesteigerten Akkumulation der Antagonisten im Tumor. Außerdem beschreiben sie, dass Antagonisten im Vergleich zu Agonisten chemisch stabiler und hydrophober sind und damit länger an der Plasmamembran verbleiben können¹⁸¹.

Neben diesen möglichen Vorteilen sollte mit der Entwicklung von SCTR-Antagonisten auch das Problem der Peptidverkürzung gelöst werden. Wie in Abschnitt 1.4.1 näher erläutert wurde, verfügt ein GPCR Klasse B-Peptid über eine Rezeptor-Bindungs- und eine Rezeptor-Aktivierungsdomäne. Theoretisch sollte daher die N-terminale Rezeptor-Aktivierungsdomäne für einen Antagonisten überflüssig sein, so dass durch deren Deletion eine Verkürzung des Peptids möglich werden sollte. Bei nahezu allen Peptiden der GPCRs der Klasse B führt eine N-terminale Deletion der nativen Peptide zu schwachen, kompetitiven Antagonisten^{45,46,94,198}. Dies konnte auch beim Secretin beobachtet werden. Weitere Modifikationen am N-terminal verkürzten Secretin führten schließlich zu der Entwicklung des Peptids S13-R (=Secretin(5-27;T5r;G25A)). Dieses Peptid verdrängt in der β -Arrestin2-GFP Translokation 10 nM Secretin-IDCC mit einer IC_{50} von etwa 700 nM kompetitiv vom SCTR. Eine agonistische Reaktion war mit dieser Methode nicht zu beobachten.

Überraschenderweise findet jedoch eine agonistische Aktivierung des cAMP-Signalwegs durch S13-R statt, die EC_{50} dieser Reaktion beträgt etwa 30 nM bei einer 30 %igen intrinsischen Aktivität im Vergleich zum nativen Secretin [Abb.21/Tab.12]. Für diese gegensätzliche Beobachtung kommen mehrere Gründe in Betracht. Zum einen wird in der β -Arrestin2-GFP Translokation mit einer anderen Zelllinie gearbeitet als im verwendeten cAMP GloSensorTM-System. Beide Zelllinien sind zwar von Grund auf U2OS-Zellen, allerdings werden zur Durchführung der Methoden neben dem SCTR verschiedene Proteine stabil überexprimiert (β -Arrestin2-GFP versus GloSensorTM), die einen Einfluss auf die zelluläre Reaktion ausüben können. In Abschnitt 5.2.2 wurde außerdem gezeigt, dass die cAMP-Methoden grundsätzlich eine höhere Sensitivität haben als die β -Arrestin2-GFP Translokation, d.h. es muss für letztere mehr Peptid eingesetzt werden, um eine sichtbare zelluläre Reaktion auszulösen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die eingesetzte Konzentration von S13-R in der β -Arrestin2-GFP Translokation zu niedrig war, um wie mit der cAMP-Methode eine agonistische Reaktion der Zellen auszulösen. Eine weitere Erhöhung der Peptidkonzentration in der β -Arrestin2-GFP Translokation war jedoch aufgrund der hohen DMSO-Konzentrationen, die zur Lösung der Peptide benötigt werden, nicht möglich.

In den letzten Jahren wurden außerdem vermehrt Signalweg-spezifische Liganden beschrieben, die nur einen möglichen Signalweg aktivieren oder inhibieren können [1.2.2]. Es besteht daher grundsätzlich die Möglichkeit, dass Peptid S13-R nur den cAMP-Signalweg aktiviert, die β -Arrestin2-abhängige Internalisierung jedoch blockiert. Dieser Effekt wird durch unterschiedliche, stabilisierte Konformationen eines GPCRs durch diese speziellen Liganden erklärt²¹. Um diese Theorie bestätigen zu können, müssen jedoch zunächst die ersten beiden erwähnten Aspekte geklärt werden. Dafür sollte das Peptid S13-R allerdings in einer Zelllinie untersucht werden, die den SCTR endogen exprimiert, um Artefakte durch die stabile Überexpression weitestgehend auszuschließen zu können. Die Identifizierung einer solchen Zelllinie steht jedoch noch aus und wurde in Abschnitt 6.1 ausführlich diskutiert.

Für einige GPCRs ist die Entwicklung eines Signalweg-spezifischen Agonisten ein vielversprechendes Ziel der pharmazeutischen Industrie, da ihre Aktivierung durch die natürlichen Liganden starke Nebenwirkungen verursacht. Ein Beispiel ist der Niacinrezeptor GPR109A. Niacin, ein Bestandteil des Vitamin-B-Komplexes und Baustein wichtiger Coenzyme wie NAD und NADP, wird klinisch zur verbesserten Regulation des Fettstoffwechsels verwendet¹⁹⁹. Als Nebenwirkung verursacht es jedoch eine starke Hautrötung, die von vielen Patienten nicht toleriert wird. Diese Hautrötungen sind, im Gegensatz zu den Effekten auf den Fettstoffwechsel, durch Arrestine vermittelt, so dass Signalweg-spezifische Liganden zur Entwicklung eines verbesserten Medikaments führen könnten²²⁻²⁴. Für den SCTR oder das Secretin sind bisher keine Signalweg-spezifischen Effekte beschrieben. Secretin wird klinisch zur Diagnose von neuroendokrinen Tumoren oder zur Erweiterung der pankreatischen Ausführungsgänge im Rahmen von Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen des Pankreas eingesetzt^{89,90,200}. Bei einer Injektion von 0,4 µg/kg Körpergewicht treten dabei nur selten Nebenwirkungen auf, so dass für einen Signalweg-spezifischen Liganden bisher keine therapeutische Indikation besteht¹⁹⁵.

Optimierung des GLP-2 für die zielgerichtete Tumordiagnostik

Aufgrund der hohen Homologie des GLP-2 mit dem Secretin wurde für dieses Peptid eine ähnliche Strategie zur Optimierung für die zielgerichtete Tumordiagnostik verwendet. Auch hier war die Priorität zunächst die Verkürzung des Peptids. Um einen verkürzten Agonisten zu generieren wurde die in 1.4.3 beschriebene „Endogene-Agonisten-Theorie“ untersucht, da sie zuvor schon für den nah verwandten Glucagon-like peptide-1-Rezeptor (GLP-1R) beschrieben wurde⁵⁰. Allerdings zeigte keines der nach diesem System erzeugten Peptide, wie auch schon zuvor am SCTR beobachtet, eine Reaktion am GLP-2R. Die „Endogene-Agonisten-Theorie“ konnte daher weder für den SCTR bestätigt, noch für den GLP-2R angewendet werden und scheint daher keinen universellen Mechanismus für die Aktivierung der GPCRs der Klasse B darzustellen, wie die Erstbeschreiber der Theorie spekulierten⁴⁸.

Das in intestinalen L-Zellen gebildete GLP-2 führt zu einer Proliferation der intestinalen Kryptenzellen der Mukosa und ist damit ein Wachstumsfaktor^{103,104}. Gleichzeitig konnte in einigen Studien eine tumorfördernde Wirkung des GLP-2 nachgewiesen werden¹⁰⁷⁻¹¹⁰ [1.8.1]. Aus diesem Grund erschien es grundsätzlich sinnvoller ein antagonistisches Peptid für die zielgerichtete Tumordiagnostik des GLP-2R zu entwickeln, um diesen Effekt in Tumorpatienten ausschließen zu können. Als GLP-2R-Antagonist wurde bisher in den meisten Studien das GLP-2(3-33) verwendet, weil es auch als natürliches Abbauprodukt des GLP-2 im menschlichen Körper vorkommt. GLP-2(3-33) ist ein schwacher, kompetitiver Antagonist und hat zusätzlich einen sehr schwachen partiell agonistischen Effekt am GLP-2R⁴⁵. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl in der β-Arrestin2-GFP Translokation als auch mit cAMP-Messungen bestätigt werden. Weitere N-terminale Verkürzungen des Peptids resultierten in einer Verschlechterung der antagonistischen Aktivität. Verschiedene Substitutionen am N-Terminus des GLP-2(10-33) führten schließlich zu den Peptiden G03-2-R (=GLP-2(10-33;M10W;T12A)) und G07-R (=GLP-2(10-33;M10W;T12A;N16A)), die nicht nur neun Aminosäuren kürzer als das native GLP-2 sind, sondern auch eine etwa sechsfach stärkere antagonistische Aktivität in der β-Arrestin2-GFP Translokation im Vergleich zu

GLP-2(3-33) aufweisen (2-3x in cAMP-Messungen). Außerdem war für G03-2-R und G07-R im Vergleich zum GLP-2(3-33) keine agonistische Aktivität messbar.

Die GLP-2-Varianten G03-2-R und G07-R sind daher reine Antagonisten des GLP-2R. Aus diesen Grund sind sie neben ihrem geplanten Einsatz als Trägerpeptide für die Tumordiagnostik auch für pharmakologische Untersuchungen des GLP-2R hochinteressant, da bisher kein besserer, reiner Antagonist identifiziert werden konnte.

6.5 Potential und weitere Entwicklung der optimierten Secretin- und GLP-2-Varianten

In dieser Arbeit konnten das Secretin und das GLP-2 im Hinblick auf die zielgerichtete Tumordiagnostik mit dem SCTR bzw. GLP-2R als Zielrezeptor optimiert werden. Das entwickelte Peptid S13-R ist eine verkürzte Secretin-Variante mit schwach antagonistischer Wirkung in der β -Arrestin2-GFP Translokation (IC_{50} etwa 700 nM) und schwach agonistischer Wirkung im Hinblick auf die cAMP-Bildung. Dies stellt eine Verbesserung im Vergleich zum Ausgangs-peptid, vor allem bezüglich der Länge des Peptids, dar, allerdings wäre eine Affinität des Peptids im niedriger nanomolaren Bereich am SCTR wünschenswert.

Dies konnte mit den GLP-2-Varianten G03-2-R und G07-R am GLP-2R erreicht werden. Mit einer IC_{50} von etwa 10-15 nM in der β -Arrestin2-GFP Translokation und leicht höherer IC_{50} in cAMP-Messungen ohne jegliche agonistische Aktivität haben diese beiden Peptide eine hohe Affinität für den GLP-2R [Abb.27/Tab.21]. Außerdem sind sie um sieben Aminosäuren kürzer als das bisher verwendete GLP-2(3-33), was die Kosten für die Peptidsynthese stark reduziert.

Da für die Entwicklung der Secretin- und der GLP-2-Varianten eine sehr ähnliche Strategie verfolgt wurde, ist auch ein weiteres Potential für die Optimierung der Secretin-Variante S13-R denkbar. Sowohl bei den Secretin-, als auch bei den GLP-2-Varianten konnte durch Alanin-Substitutionen an N-terminal verkürzten Peptiden im letzten Schritt der in dieser Arbeit gezeigten Peptidoptimierung eine starke Verbesserung der Affinität erzielt werden. Substitutionen zu Aminosäuren mit anderen Eigenschaften (positiv- oder negativ geladen, groß, hydrophob etc.) wurden bisher nicht durchgeführt. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass solche Substitutionen an einzelnen Positionen die Affinität der verkürzten Secretin- und GLP-2-Varianten an ihre Rezeptoren weiter steigern können.

Einen weiteren wichtigen Faktor in der Entwicklung eines Trägerpeptids für die zielgerichtete Tumordiagnostik stellt die Stabilität der Peptide im menschlichen Körper dar. Das ideale Peptid bleibt nach intravenöser Injektion über einen langen Zeitraum stabil und wird erst nach mehreren Stunden ausgeschieden, damit ein ausreichender Zeitraum für eine klinische Diagnostik gegeben ist. Die Peptidliganden der GPCRs der Klasse B sind jedoch grundsätzlich sehr instabil, die Halbwertszeiten des nativen GLP-2 und Secretin liegen zwischen zwei und 30 Minuten^{111,112,194,195}.

Beim GLP-2 erfolgt die Spaltung durch die Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) zum GLP-2(3-33). Die DPP-IV spaltet die zwei N-terminalen Aminosäuren von Peptiden ab, die an Position 2 ein Alanin oder Prolin tragen. Dies ist lediglich beim GLP-2, nicht aber beim Secretin, der Fall und die Entwicklung der weitaus stabileren GLP-2-Variante Teduglutide (=GLP-2(Gly2)) zeigt die Bedeutung der DPP-IV für die Stabilität des GLP-2^{112,115}. Dies gilt auch für die nah verwandten Peptide GLP-1 und GIP, die beide nativ an Position 2 ein Alanin tragen. In der stabilisierten GLP-1-Variante Exenatide (oder Exendin-4, Handelsname: Byetta) ist das Alanin ebenfalls durch Glycin substituiert, eine stabile GIP-Variante enthält anstelle des natürlichen Alanins das D-Alanin^{201,202}.

Weitere Ansätze zur Stabilisierung von Peptiden der GPCR-Klasse B sind neben der Inkorporation von D-Aminosäuren bzw. nicht-proteinogenen Aminosäuren, die von den meisten Peptidasen nicht gespalten werden können, die Kopplung der Peptide an Fettsäuren oder Albumin oder das Einfügen von stabilisierenden Disulfidbrücken²⁰³⁻²⁰⁷.

In den Peptid-Varianten G03-2-R und G07-R dieser Arbeit wurde der N-Terminus des GLP-2 deletiert. Damit erfolgte auch eine Deletion der DPP-IV-Spaltstelle, die daher keinen Einfluss auf die Stabilität der entwickelten Peptid-Varianten haben sollte. Die kurze Halbwertszeit des nativen Secretin zeigt jedoch, dass die Stabilität der GPCR-Klasse B-Peptide auch ohne eine DPP-IV-Spaltstelle gering ist und weitere Peptidasen involviert sein müssen. Erste Versuche zeigen, dass es sich dabei nicht um Peptidasen bzw. Proteasen des Serums handeln kann. Die Inkubation der nativen Peptide GLP-2 und Secretin in humanem Serum und anschließender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) resultierte in einer Halbwertszeit von weit über 24 h (vorläufige Daten, nicht gezeigt). Dies steht im klaren Gegensatz zu den bisher beschriebenen zwei bis 30 Minuten^{112,194,195}. In einem nächsten Schritt muss daher ein Stabilitätsassay etabliert werden, der die biologische Situation der Peptide im menschlichen Körper besser widerspiegelt. Eine Möglichkeit könnte die Verwendung eines Leberhomogenats anstelle von humanem Serum in den Experimenten sein. Sollten sich die GLP-2-Varianten G03-2-R und G07-R in diesen Versuchen als stabil erweisen, ist eine Kopplung der Peptide mit IDCC, einem nahinfraroten Fluoreszenzfarbstoff, geplant. Neben weiteren möglichen *in vitro*-Versuchen kann die Bindung dieser Peptide an den GLP-2R dann in ersten *in vivo*-Modellen der Maus betrachtet werden.

7 Zusammenfassung

Die erfolgreiche Therapie einer Krebserkrankung ist häufig von einer rechtzeitigen Diagnose und dem damit verbundenen rechtzeitigen Behandlungsbeginn abhängig. Eine mögliche Strategie ist dabei die zielgerichtete, bildgebende Diagnostik durch Tumor-bindende Moleküle, die an Kontrastmittel gekoppelt werden. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von G-Proteingekoppelten-Rezeptoren (GPCRs), die im Tumor verstärkt exprimiert werden und sich daher als Zielstruktur für eine solche zielgerichtete Diagnostik eignen. Gleichzeitig sollten mögliche Peptidliganden dieser GPCRs hinsichtlich ihrer Länge und Aktivität optimiert werden, um sie als Trägerpeptide einsetzen zu können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der humane Secretinrezeptor (SCTR), ein Vertreter der GPCRs der Klasse B, in 93 % aller untersuchten duktaalen pankreatischen Adenokarzinome und in 94 % aller untersuchten Plattenepithelkarzinome des Ösophagus stark exprimiert wird, während das umgebende Gewebe nur eine mäßige bis sehr schwache SCTR-Expression aufweist. Dies macht den SCTR zu einem vielversprechenden Zielrezeptor für die zielgerichtete Tumordiagnostik.

In einem nächsten Schritt wurde der Ligand des SCTR, das Secretin, und ein zweiter Peptidligand der GPCRs der Klasse B, das Glucagon-like peptide-2 (GLP-2), strukturell charakterisiert und für die zielgerichtete Tumordiagnostik optimiert. Um eine große Anzahl an Peptidvarianten untersuchen zu können, wurde die Methode der β -Arrestin2-GFP Translokation etabliert, die sich als äußerst vielseitig einzusetzende, hoch reproduzierbare und kostengünstige Methode erwies. Dies machte es möglich, eine große Menge an Substitutionsvarianten des Secretin und des GLP-2 zu untersuchen und die Struktur-Aktivitätsbeziehungen beider Peptide näher zu beschreiben.

Dabei zeigte sich, dass, wie für die meisten anderen Peptidliganden der GPCRs der Klasse B, die N-Termini der Peptide für die Rezeptor-Aktivierung entscheidend sind. N-terminale Deletionen führten dagegen zu kompetitiven Antagonisten. Da zuvor beschrieben wurde, dass sich antagonistisch wirkende Peptide möglicherweise besser als Trägerpeptide für die zielgerichtete Tumordiagnostik eignen, wurden Modifikationen an N-terminal verkürzten Secretin- und GLP-2-Varianten vorgenommen. Dies führte zu der Entwicklung von drei Secretin-Varianten, die eine antagonistische Aktivität am SCTR mit einer IC_{50} von etwa $1 \mu\text{M}$ in der β -Arrestin2-GFP Translokation zeigen. Ein potenterer Antagonist wurde bisher nicht beschrieben.

Außerdem konnten in dieser Arbeit hochpotente Glucagon-like peptide-2-Rezeptor (GLP-2R)-Antagonisten entwickelt werden. Diese sind um sieben Aminosäuren kürzer als der bisher verwendete Antagonist GLP-2(3-33) und in der β -Arrestin2-GFP Translokation etwa sechsfach potenter. Im Gegensatz zu GLP-2(3-33) sind die in dieser Arbeit entwickelten GLP-2-Varianten reine Antagonisten und damit auch für pharmakologische Untersuchungen des GLP-2R einsetzbar.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit mit dem SCTR ein vielversprechender Zielrezeptor für die zielgerichtete Tumordiagnostik identifiziert werden. Die Charakterisierung und Optimierung der Liganden stellt zudem den ersten Schritt zur Entwicklung bindender Trägerpeptide dar, die in naher Zukunft in ersten *in vivo*-Versuchen an Tumormodellen der Maus eingesetzt werden können.

7.1 Summary

The successful therapy of cancer is often tightly linked to early diagnosis and the timely initiation of a therapeutic approach. One strategy of non-invasive cancer diagnosis is the targeting of tumors with specifically binding molecules which are coupled to a contrast agent. Therefore, the main goal of this work was the identification of G protein coupled receptors (GPCRs) which are overexpressed in tumors and can be targeted with specific ligands. Those ligands had to be optimized with regard to their length and activity to make them usable as carrier-peptides.

It could be shown in this work that the human secretin receptor (SCTR), which is a member of the class B family of GPCRs, is overexpressed in 93 % of all examined ductal pancreatic adenocarcinomas and in 94 % of esophageal squamous cell carcinomas. In contrast, SCTR is only moderately or poorly expressed in non-cancerous tissues, which makes it a promising molecular target.

The next step in this project was the optimization and structural characterization of Secretin, which is the natural ligand of the SCTR, and another peptide ligand of the class B GPCR family, Glucagon-like peptide-2 (GLP-2). To achieve this aim it was necessary to establish a screening method for a large amount of peptide variants. The β -Arrestin2-GFP translocation was the method of choice and has been proven to be extremely flexible, reproducible and cheap.

The initial screening of multiple substitution variants of Secretin and GLP-2 led to a general understanding concerning the structure-relationship of both peptides. Importantly, the N-terminal part of both peptides proved to be crucial for their activity at the SCTR and the Glucagon-like peptide-2 receptor (GLP-2R), respectively. Deletion of those N-terminal amino acids resulted in competitive antagonism at their receptors. Because it has been proposed that antagonistic peptide ligands might be more suitable for tumor targeting approaches than agonistic peptides, antagonistic peptides were created by modifying N-terminal deletion variants of Secretin and GLP-2. This led to the development of three secretin variants with an IC_{50} of around 1 μ M in β -Arrestin2-GFP translocation which is the most potent antagonistic response of a peptide currently described for SCTR.

Even better antagonists could be developed for the GLP-2R. Those peptides are around seven amino acids shorter than the antagonist which is mainly used at the GLP-2R, the GLP-2(3-33). In the β -Arrestin2-GFP translocation they showed a six-fold improvement in comparison to GLP-2(33-3) which is also a weak partial agonist. The GLP-2R antagonists of this work lack this agonistic activity and are therefore pure antagonists, a fact that makes them also usable for pharmacological studies at the GLP-2R.

In conclusion, this work shows that the SCTR is overexpressed in several tumors and is therefore a promising target molecule for both diagnostic and therapeutic approaches. The characterization and optimization of several peptide variants are crucial steps in the development of carrier-peptides specific for their receptors which can hopefully be used in first *in vivo* experiments in near future.

Literaturverzeichnis

1. Lagerström, M.C. & Schiöth, H.B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 339-57(2008).
2. Hopkins, A.L. & Groom, C.R. The druggable genome. *Nature reviews. Drug discovery* **1**, 727-30(2002).
3. Fredriksson, R. et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* **63**, 1256-72(2003).
4. Foord, S.M. et al. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews* **57**, 279-88(2005).
5. Warne, T. et al. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486-91(2008).
6. Hamm, H.E. The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry* **273**, 669-72(1998).
7. Ritter, S.L. & Hall, R. a Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 819-30(2009).
8. Luttrell, L.M. & Gesty-Palmer, D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacological reviews* **62**, 305-30(2010).
9. Defea, K. a Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: How do they determine what to scaffold? *Cellular signalling* (2010).doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.004
10. Rajagopal, S., Rajagopal, K. & Lefkowitz, R.J. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Drug discovery* **9**, 373-86(2010).
11. Werry, T.D., Sexton, P.M. & Christopoulos, A. "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **16**, 26-33(2005).
12. Luttrell, L.M. et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science (New York, N.Y.)* **283**, 655-61(1999).
13. Tohgo, A. et al. beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 9429-36(2002).

14. Ahn, S. et al. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *The Journal of biological chemistry* **279**, 35518-25(2004).
15. Goel, R. et al. alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression. *The Journal of biological chemistry* **277**, 18640-8(2002).
16. Witherow, D.S. et al. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8603-7(2004).
17. Buchanan, F.G. et al. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1492-7(2006).
18. Violin, J.D. & Lefkowitz, R.J. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences* **28**, 416-22(2007).
19. Sun, Y., McGarrigle, D. & Huang, X.-Y. When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Molecular bioSystems* **3**, 849-54(2007).
20. Wei, H. et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10782-7(2003).
21. Whalen, E.J., Rajagopal, S. & Lefkowitz, R.J. Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends in molecular medicine* 1-14(2010).doi:10.1016/j.molmed.2010.11.004
22. Walters, R.W. et al. beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1312-21(2009).
23. Shen, H.C. et al. Discovery of novel tricyclic full agonists for the G-protein-coupled niacin receptor 109A with minimized flushing in rats. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 2587-602(2009).
24. Shen, H.C. et al. Discovery of a biaryl cyclohexene carboxylic acid (MK-6892): a potent and selective high affinity niacin receptor full agonist with reduced flushing profiles in animals as a preclinical candidate. *Journal of medicinal chemistry* **53**, 2666-70(2010).
25. Palczewski, K. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**, 739-745(2000).
26. Cherezov, V. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 1258-65(2007).

27. Rasmussen, S.G.F. et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-7(2007).
28. Wu, B. et al. Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. *Science* **1066**, (2010).
29. Lebon, G. et al. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **5**, 1-6(2011).
30. Vilardaga, J.P. et al. Mutational analysis of extracellular cysteine residues of rat secretin receptor shows that disulfide bridges are essential for receptor function. *European journal of biochemistry / FEBS* **246**, 173-80(1997).
31. Grace, C.R.R. et al. Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 4858-63(2007).
32. Sun, C. et al. Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7875-80(2007).
33. Parthier, C. et al. Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13942-7(2007).
34. Runge, S. et al. Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. *The Journal of biological chemistry* **283**, 11340-7(2008).
35. Pioszak, A. a et al. Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *The Journal of biological chemistry* **283**, 32900-12(2008).
36. Pioszak, A. a & Xu, H.E. Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5034-9(2008).
37. Parthier, C. et al. Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction? *Trends in biochemical sciences* **34**, 303-10(2009).
38. Underwood, C.R., Parthier, C. & Reedtz-Runge, S. *Structural basis for ligand recognition of incretin receptors. Vitamins and hormones* **84**, 251-78(Elsevier Inc. 2010).
39. Tikhele, S.H. et al. Mapping interactions of gastric inhibitory polypeptide with GIPR N-terminus using NMR and molecular dynamics simulations. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **16**, 383-91(2010).

40. Alaña, I. et al. NMR and alanine scan studies of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in water. *The Journal of biological chemistry* **281**, 16370-6(2006).
41. Venneti, K.C. & Hewage, C.M. Conformational and molecular interaction studies of glucagon-like peptide-2 with its N-terminal extracellular receptor domain. *FEBS letters* **585**, 346-52(2011).
42. Thornton, K. & Gorenstein, D.G. Structure of glucagon-like peptide (7-36) amide in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR. *Biochemistry* **33**, 3532-9(1994).
43. Neidigh, J.W. et al. Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states. *Biochemistry* **40**, 13188-200(2001).
44. Neumann, J.-M. et al. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends in biochemical sciences* **33**, 314-9(2008).
45. Thulesen, J. et al. The truncated metabolite GLP-2 (3-33) interacts with the GLP-2 receptor as a partial agonist. *Regulatory peptides* **103**, 9-15(2002).
46. Thorens, B. et al. 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**, 1678-1682(1993).
47. Gelling, R.W. et al. GIP(6-30amide) contains the high affinity binding region of GIP and is a potent inhibitor of GIP1-42 action in vitro. *Regulatory peptides* **69**, 151-4(1997).
48. Miller, L.J. et al. Structural basis of natural ligand binding and activation of the Class II G-protein-coupled secretin receptor. *Biochemical Society transactions* **35**, 709-12(2007).
49. Dong, M. et al. Possible endogenous agonist mechanism for the activation of secretin family G protein-coupled receptors. *Molecular pharmacology* **70**, 206-13(2006).
50. Dong, M. et al. Insights into the structural basis of endogenous agonist activation of family B G protein-coupled receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **22**, 1489-99(2008).
51. Ishihara, T. et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *The EMBO journal* **10**, 1635-41(1991).
52. Jiang, S. & Ulrich, C. Molecular cloning and functional expression of a human pancreatic secretin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **207**, 883-90(1995).
53. Chow, B.K. Molecular cloning and functional characterization of a human secretin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **212**, 204-11(1995).

54. Ho, P.K. et al. The human secretin receptor gene: genomic organization and promoter characterization. *FEBS letters* **455**, 209-14(1999).
55. Bawab, W., Chastre, E. & Gespach, C. Functional and structural characterization of the secretin receptors in rat gastric glands: desensitization and glycoprotein nature. *Bioscience reports* **11**, 33-42(1991).
56. Pang, R.T.-K. Role of N-Linked Glycosylation on the Function and Expression of the Human Secretin Receptor. *Endocrinology* **140**, 5102-5111(1999).
57. Di Paolo, E. et al. Contribution of the second transmembrane helix of the secretin receptor to the positioning of secretin. *FEBS letters* **424**, 207-10(1998).
58. Vilardaga, J.P. et al. Lysine 173 residue within the first exoloop of rat secretin receptor is involved in carboxylate moiety recognition of Asp 3 in secretin. *Biochemical and biophysical research communications* **218**, 842-6(1996).
59. Holtmann, M.H. et al. Multiple Extracellular Loop Domains Contribute Critical Determinants for Agonist Binding and Activation of the Secretin Receptor * importance of the N terminus and first loop of this re-. *Biochemistry* **271**, 14944 - 14949(1996).
60. Holtmann, M.H., Hadac, E.M. & Miller, L.J. Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. Studies of chimeric receptors. *The Journal of biological chemistry* **270**, 14394-8(1995).
61. Vilardaga, J.P. et al. Properties of chimeric secretin and VIP receptor proteins indicate the importance of the N-terminal domain for ligand discrimination. *Biochemical and biophysical research communications* **211**, 885-91(1995).
62. Chan, K.Y.-Y. Functional Segregation of the Highly Conserved Basic Motifs within the Third Endoloop of the Human Secretin Receptor. *Endocrinology* **142**, 3926-3934(2001).
63. Harmor, A.J. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome biology* **2**, REVIEWS3013(2001).
64. Gether, U. Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocrine Reviews* **21**, 90-113(2000).
65. Trimble, E.R. et al. Secretin induces rapid increases in inositol trisphosphate, cytosolic Ca²⁺ and diacylglycerol as well as cyclic AMP in rat pancreatic acini. *The Biochemical journal* **239**, 257-61(1986).
66. Trimble, E.R. et al. Secretin stimulates cyclic AMP and inositol trisphosphate production in rat pancreatic acinar tissue by two fully independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3146-50(1987).

67. Neves, S.R., Ram, P.T. & Iyengar, R. G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 1636-9(2002).
68. Izzo, R.S. et al. Secretin internalization and adenosine 3',5'-monophosphate levels in pancreatic acinar cells. *Endocrinology* **124**, 2252-60(1989).
69. Holtmann, M.H. et al. Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalization of the secretin receptor. *The Journal of biological chemistry* **271**, 23566-71(1996).
70. Shetzline, M.A. et al. A role for receptor kinases in the regulation of class II G protein-coupled receptors. Phosphorylation and desensitization of the secretin receptor. *The Journal of biological chemistry* **273**, 6756-62(1998).
71. Walker, J.K. et al. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31515-23(1999).
72. Markovic, D. & Grammatopoulos, D.K. Focus on the splicing of secretin GPCRs transmembrane-domain 7. *Trends in biochemical sciences* **34**, 443-52(2009).
73. Ding, W.-qun et al. Dominant Negative Action of an Abnormal Secretin Receptor Arising From mRNA Missplicing in a Gastrinoma. *Gastroenterology* (2002).doi:10.1053/gast
74. Ding, W.-qun et al. Silencing of secretin receptor function by dimerization with a misspliced variant secretin receptor in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research* **62**, 5223-9(2002).
75. Hayes, G.M. et al. A novel secretin receptor splice variant potentially useful for early diagnosis of pancreatic carcinoma. *Gastroenterology* **133**, 853-61(2007).
76. Körner, M.U. et al. Wild-type and splice-variant secretin receptors in lung cancer: overexpression in carcinoid tumors and peritumoral lung tissue. *Modern Pathology* **21**, 387-395(2008).
77. Harikumar, K.G., Happs, R.M. & Miller, L.J. Dimerization in the absence of higher-order oligomerization of the G protein-coupled secretin receptor. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 2555-63(2008).
78. Dong, M. et al. Secretin occupies a single protomer of the homodimeric secretin receptor complex: insights from photoaffinity labeling studies using dual sites of covalent attachment. *The Journal of biological chemistry* **285**, 9919-31(2010).
79. Harikumar, K.G. et al. Constitutive formation of oligomeric complexes between family B G protein-coupled vasoactive intestinal polypeptide and secretin receptors. *Molecular pharmacology* **69**, 363-73(2006).
80. Bayliss, W.M. & Starling, E.H. The mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of physiology* **28**, 325-53(1902).

81. Mutt, V., Jorpes, J.E. & Magnusson, S. Structure of porcine secretin. The amino acid sequence. *European journal of biochemistry / FEBS* **15**, 513-9(1970).
82. Kopin, a S., Wheeler, M.B. & Leiter, a B. Secretin: structure of the precursor and tissue distribution of the mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 2299-303(1990).
83. Whitmore, T.E. et al. Human secretin (SCT): gene structure, chromosome location, and distribution of mRNA. *Cytogenetics and cell genetics* **90**, 47-52(2000).
84. Yuan, Y. et al. Extragastrintestinal functions and transcriptional regulation of secretin and secretin receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1220**, 23-33(2011).
85. Banks, W.A. et al. Differential Transport of a Secretin Analog across the Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers of the Mouse. *Brain* **302**, 1062-1069(2002).
86. St-Pierre, D.H. & Broglio, F. Secretin: Should we revisit its metabolic outcomes? *Journal of endocrinological investigation* **33**, 266-75(2010).
87. DUPRE, J. AN INTESTINAL HORMONE AFFECTING GLUCOSE DISPOSAL IN MAN. *Lancet* **2**, 672-3(1964).
88. Ferrer, R.L. et al. Effect of exogenous cholecystokinin and secretin on pancreatic secretion of insulin and glucagon in rats: in vivo model without hepatic filter. *Digestive diseases and sciences* **46**, 2127-33(2001).
89. Isenberg, J.I. et al. Unusual effect of secretin on serum gastrin, serum calcium, and gastric acid secretion in a patient with suspected Zollinger-Ellison syndrome. *Gastroenterology* **62**, 626-31(1972).
90. Kuiper, P. et al. Diagnostic efficacy of the secretin stimulation test for the Zollinger-Ellison syndrome: an intra-individual comparison using different dosages in patients and controls. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* **10**, 14-8(2010).
91. Solomon, T.E. et al. COOH-terminally extended secretins are potent stimulants of pancreatic secretion. *The American journal of physiology* **276**, G808-16(1999).
92. Dong, M. et al. Importance of Each Residue within Secretin for Receptor Binding and Biological Activity. *Biochemistry* (2011).doi:10.1021/bi200133u
93. Couvineau, a et al. Purification of vasoactive intestinal peptide receptor from porcine liver by a newly designed one-step affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry* **265**, 13386-90(1990).
94. Robberecht, P. et al. Secretin receptors in human pancreatic membranes. *Pancreas* **3**, 529-35(1988).

95. Haffar, B.M. et al. Reduced peptide bond pseudopeptide analogues of secretin. A new class of secretin receptor antagonists. *The Journal of biological chemistry* **266**, 316-22(1991).
96. Munroe, D.G. et al. Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1569-73(1999).
97. Koehler, J. a, Yusta, B. & Drucker, D.J. The HeLa cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **19**, 459-73(2005).
98. Estall, J.L., Yusta, B. & Drucker, D.J. Lipid raft-dependent glucagon-like peptide-2 receptor trafficking occurs independently of agonist-induced desensitization. *Molecular biology of the cell* **15**, 3673-87(2004).
99. Estall, J.L. et al. The glucagon-like peptide-2 receptor C terminus modulates beta-arrestin-2 association but is dispensable for ligand-induced desensitization, endocytosis, and G-protein-dependent effector activation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 22124-34(2005).
100. Lee, Y.C., Brubaker, P.L. & Drucker, D.J. Developmental and tissue-specific regulation of proglucagon gene expression. *Endocrinology* **127**, 2217-22(1990).
101. Brubaker, P.L. & Anini, Y. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **81**, 1005-12(2003).
102. Xiao, Q. et al. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* **117**, 99-105(1999).
103. Dubé, P.E. et al. The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* **131**, 589-605(2006).
104. Ørskov, C. et al. GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regulatory peptides* **124**, 105-12(2005).
105. Burrin, D.G. et al. Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets. *Endocrinology* **146**, 22-32(2005).
106. Yusta, B., Estall, J. & Drucker, D.J. Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **277**, 24896-906(2002).
107. Thulesen, J. et al. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* **53**, 1145-50(2004).

108. Iakoubov, R. et al. Carcinogenic effects of exogenous and endogenous glucagon-like peptide-2 in azoxymethane-treated mice. *Endocrinology* **150**, 4033-43(2009).
109. Masur, K. et al. DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regulatory peptides* **137**, 147-55(2006).
110. Koehler, J. a et al. Glucagon-like peptide-2 does not modify the growth or survival of murine or human intestinal tumor cells. *Cancer research* **68**, 7897-904(2008).
111. Hartmann, B. In Vivo and in Vitro Degradation of Glucagon-Like Peptide-2 in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**, 2884-2888(2000).
112. Drucker, D.J. et al. Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Nature biotechnology* **15**, 673-7(1997).
113. Brubaker, P.L. et al. Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology* **138**, 4837-43(1997).
114. DaCambra, M.P. et al. Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2. *Biochemistry* **39**, 8888-94(2000).
115. Jeppesen, P.B. et al. Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short bowel syndrome patients. *Gut* **54**, 1224-31(2005).
116. Sigalet, D.L., Lam, V. & Boctor, D. The assessment, and glucagon-like peptide-2 modulation, of intestinal absorption and function. *Seminars in pediatric surgery* **19**, 44-9(2010).
117. Rondard, P. et al. The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors. *Neuropharmacology* **60**, 82-92(2011).
118. Urwyler, S. Allosteric Modulation of Family C G-Protein-Coupled Receptors : from Molecular Insights to. *Pharmacological Reviews* **63**, 59 -126(2011).
119. Lappano, R. & Maggiolini, M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 47-60(2011).
120. Reubi, J.C. Peptide receptor expression in GEP-NET. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **451 Suppl** , S47-50(2007).
121. Fischer, O.M. et al. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochemical Society transactions* **31**, 1203-8(2003).
122. Daub, H. et al. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**, 557-60(1996).
123. Rozengurt, E., Sinnott-Smith, J. & Kisfalvi, K. Crosstalk between insulin/insulin-like growth factor-1 receptors and G protein-coupled receptor signaling systems: a novel target for the antidiabetic drug metformin in pancreatic cancer. *Clinical*

- cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 2505-11(2010).
124. Murph, M.M. et al. Lysophosphatidic acid decreases the nuclear localization and cellular abundance of the p53 tumor suppressor in A549 lung carcinoma cells. *Molecular cancer research : MCR* **5**, 1201-11(2007).
 125. Ulrich, C.D. et al. Cellular distribution of secretin receptor expression in rat pancreas. *The American journal of physiology* **275**, G1437-44(1998).
 126. Körner, M. et al. Secretin receptors in normal and diseased human pancreas: marked reduction of receptor binding in ductal neoplasia. *The American journal of pathology* **167**, 959-68(2005).
 127. Alpini, G. et al. Upregulation of secretin receptor gene expression in rat cholangiocytes after bile duct ligation. *The American journal of physiology* **266**, G922-8(1994).
 128. Gespach, C. et al. Secretin binding sites coupled with adenylate cyclase in rat fundic membranes. *Peptides* **2 Suppl 2**, 247-51(1981).
 129. Chu, J.Y.S. et al. Phenotypes developed in secretin receptor-null mice indicated a role for secretin in regulating renal water reabsorption. *Molecular and cellular biology* **27**, 2499-511(2007).
 130. Charlton, C.G. et al. Secretin receptors in the rat kidney: adenylate cyclase activation and renal effects. *Peptides* **7**, 865-71(1986).
 131. Chow, B.K.C. et al. Secretin controls anion secretion in the rat epididymis in an autocrine/paracrine fashion. *Biology of reproduction* **70**, 1594-9(2004).
 132. Regard, J.B., Sato, I.T. & Coughlin, S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* **135**, 561-71(2008).
 133. Lee, S.M.Y. et al. Expression and spatial distribution of secretin and secretin receptor in human cerebellum. *Neuroreport* **16**, 219-22(2005).
 134. Nozaki, S. In Vitro Autoradiographic Localization of ¹²⁵I-Secretin Receptor Binding Sites in Rat Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292**, 133-137(2002).
 135. Tang, C., Biemond, I. & Lamers, C.B. Expression of peptide receptors in human endocrine tumours of the pancreas. *Gut* **40**, 267-71(1997).
 136. Körner, M. et al. Secretin receptors in the human liver: expression in biliary tract and cholangiocarcinoma, but not in hepatocytes or hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* **45**, 825-35(2006).
 137. Chu, J.Y.S. et al. Phenotypes developed in secretin receptor-null mice indicated a role for secretin in regulating renal water reabsorption. *Molecular and cellular biology* **27**, 2499-511(2007).

138. Yusta, B. et al. Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology* **119**, 744-55(2000).
139. Heer, J. de et al. The alpha cell expresses glucagon-like peptide-2 receptors and glucagon-like peptide-2 stimulates glucagon secretion from the rat pancreas. *Diabetologia* **50**, 2135-42(2007).
140. Guan, X. et al. GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology* **130**, 150-64(2006).
141. Sams, A. et al. Naturally occurring glucagon-like peptide-2 (GLP-2) receptors in human intestinal cell lines. *European journal of pharmacology* **532**, 18-23(2006).
142. Danho, W. et al. Opportunities and challenges of developing peptide drugs in the pharmaceutical industry. *Advances in experimental medicine and biology* **611**, 467-9(2009).
143. WATCHING PEPTIDE DRUGS GROW UP. *Chemical & Engineering News* **83**, 17-24(2005).
144. Johnson, R.M., Harrison, S.D. & Maclean, D. Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **683**, 535-51(2011).
145. Bellmann-Sickert, K. & Beck-Sickinger, A.G. Peptide drugs to target G protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 1-8(2010).doi:10.1016/j.tips.2010.06.003
146. Gittelman, M. et al. A 1-year, open label, randomized phase II dose finding study of degarelix for the treatment of prostate cancer in North America. *The Journal of urology* **180**, 1986-92(2008).
147. Cruden, N.L.M. & Newby, D.E. Therapeutic potential of icatibant (HOE-140, JE-049). *Expert opinion on pharmacotherapy* **9**, 2383-90(2008).
148. Delpassand, E.S. et al. Safety and efficacy of radionuclide therapy with high-activity In-111 pentetate in patients with progressive neuroendocrine tumors. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* **23**, 292-300(2008).
149. Neggers, S.J.C.M.M. et al. Long-term efficacy and safety of combined treatment of somatostatin analogs and pegvisomant in acromegaly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 4598-601(2007).
150. Reubi, J.C. et al. High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **31**, 803-10(2004).
151. Van de Wiele, C. et al. Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **27**, 1694-1699(2000).

152. Choudhary, S., Mathew, M. & Verma, R.S. Therapeutic potential of anticancer immunotoxins. *Drug discovery today* **00**, (2011).
153. Khandare, J.J. & Minko, T. Antibodies and peptides in cancer therapy. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **23**, 401-35(2006).
154. Bombardieri, E. et al. Imaging of neuroendocrine tumours with gamma-emitting radiopharmaceuticals. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of Radiopharmaceutica* **54**, 3-15(2010).
155. Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F. & Kobilka, B.K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356-63(2009).
156. Bickle, M. The beautiful cell: high-content screening in drug discovery. *Analytical and bioanalytical chemistry* **398**, 219-26(2010).
157. Moffat, J. et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* **124**, 1283-98(2006).
158. Sönnichsen, B. et al. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**, 462-9(2005).
159. Abraham, V.C. et al. Application of a high-content multiparameter cytotoxicity assay to prioritize compounds based on toxicity potential in humans. *Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening* **13**, 527-37(2008).
160. O'Brien, P.J. et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of toxicology* **80**, 580-604(2006).
161. Desbordes, S.C. et al. High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* **2**, 602-12(2008).
162. Lee, S., Howell, B. & Kunapuli, P. Cell imaging assays for G protein-coupled receptor internalization: application to high-throughput screening. *Methods in enzymology* **414**, 79-98(2006).
163. Haasen, D. et al. G protein-coupled receptor internalization assays in the high-content screening format. *Methods in enzymology* **414**, 121-39(2006).
164. Barak, L.S. et al. Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Molecular pharmacology* **51**, 177-84(1997).
165. Barak, L.S. et al. A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *The Journal of biological chemistry* **272**, 27497-500(1997).

166. Oakley, R.H. et al. The cellular distribution of fluorescently labeled arrestins provides a robust, sensitive, and universal assay for screening G protein-coupled receptors. *Assay and drug development technologies* **1**, 21-30(2002).
167. Hudson, C.C. et al. High-content screening of known G protein-coupled receptors by arrestin translocation. *Methods in enzymology* **414**, 63-78(2006).
168. Oakley, R.H. et al. The ligand-independent translocation assay: an enabling technology for screening orphan G protein-coupled receptors by arrestin recruitment. *Methods in enzymology* **414**, 50-63(2006).
169. Ghosh, R.N. et al. Quantitative cell-based high-content screening for vasopressin receptor agonists using transfluor technology. *Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening* **10**, 476-84(2005).
170. Kredel, S. et al. CXCR2 inverse agonism detected by arrestin redistribution. *Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening* **14**, 1076-91(2009).
171. Garippa, R.J. et al. High-throughput confocal microscopy for beta-arrestin-green fluorescent protein translocation G protein-coupled receptor assays using the Evotec Opera. *Methods in enzymology* **414**, 99-120(2006).
172. Verkaar, F. et al. G protein-independent cell-based assays for drug discovery on seven-transmembrane receptors. *Biotechnology annual review* **14**, 253-74(2008).
173. Ghosh, R.N., Grove, L. & Lapets, O. A quantitative cell-based high-content screening assay for the epidermal growth factor receptor-specific activation of mitogen-activated protein kinase. *Assay and drug development technologies* **2**, 473-81(2004).
174. Chan, G.K.Y. et al. High content kinetic assays of neuronal signaling implemented on BD pathway HT. *Assay and drug development technologies* **3**, 623-36(2005).
175. Michel, M.C., Wieland, T. & Tsujimoto, G. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **379**, 385-8(2009).
176. Fazio, N. et al. Biological targeted therapies in patients with advanced enteropancreatic neuroendocrine carcinomas. *Cancer treatment reviews* **36 Suppl 3**, S87-94(2010).
177. Moore, C. a C., Milano, S.K. & Benovic, J.L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* **69**, 451-82(2007).
178. Mapelli, C. et al. Eleven amino acid glucagon-like peptide-1 receptor agonists with antidiabetic activity. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 7788-99(2009).
179. Haque, T.S. et al. Exploration of structure-activity relationships at the two C-terminal residues of potent 11mer Glucagon-Like Peptide-1 receptor agonist peptides via parallel synthesis. *Peptides* **31**, 1353-60(2010).

180. Patel, D.R., Kong, Y. & Sreedharan, S.P. Molecular cloning and expression of a human secretin receptor. *Molecular pharmacology* **47**, 467-73(1995).
181. Ginj, M. et al. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16436-41(2006).
182. Gry, M. et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC genomics* **10**, 365(2009).
183. Klevebring, D. et al. Analysis of transcript and protein overlap in a human osteosarcoma cell line. *BMC genomics* **11**, 684(2010).
184. Berglund, L. et al. A genecentric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**, 2019-27(2008).
185. Long, S.H. et al. Secretin-receptor and secretin-receptor-variant expression in gastrinomas: correlation with clinical and tumoral features and secretin and calcium provocative test results. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 4394-402(2007).
186. al-Nakkash, L. et al. Adenylate cyclase activity in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* **19**, 39-47(1996).
187. Dong, M. et al. Spatial approximation between the amino terminus of a peptide agonist and the top of the sixth transmembrane segment of the secretin receptor. *The Journal of biological chemistry* **279**, 2894-903(2004).
188. Di Paolo, E. et al. Mutations of aromatic residues in the first transmembrane helix impair signalling by the secretin receptor. *Receptors & channels* **6**, 309-15(1999).
189. Dong, M. et al. Identification of an interaction between residue 6 of the natural peptide ligand and a distinct residue within the amino-terminal tail of the secretin receptor. *The Journal of biological chemistry* **274**, 19161-7(1999).
190. Ulrich, C.D. et al. Intrinsic photoaffinity labeling of native and recombinant rat pancreatic secretin receptors. *Gastroenterology* **105**, 1534-43(1993).
191. Dong, M. et al. Molecular Approximations between Residues 21 and 23 of Secretin and Its Receptor : Development of a Model for Peptide Docking with the Amino Terminus of the Secretin Receptor. *PRISM* **72**, 280-290(2007).
192. Cordes, F.S., Bright, J.N. & Sansom, M.S.P. Proline-induced distortions of transmembrane helices. *Journal of molecular biology* **323**, 951-60(2002).
193. Runge, S. et al. Different domains of the glucagon and glucagon-like peptide-1 receptors provide the critical determinants of ligand selectivity. *British journal of pharmacology* **138**, 787-94(2003).

194. Beglinger, C. et al. Comparative effects of synthetic and natural secretin on pancreatic secretion and on secretin, insulin, and glucagon levels in man. *Digestive diseases and sciences* **27**, 231-3(1982).
195. ChiRhoStim Package Insert. *ChiRhoStim*
196. Mapelli, C. et al. Eleven amino acid glucagon-like peptide-1 receptor agonists with antidiabetic activity. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 7788-99(2009).
197. Haque, T.S. et al. Identification of potent 11mer glucagon-like peptide-1 receptor agonist peptides with novel C-terminal amino acids: Homohomophenylalanine analogs. *Peptides* **31**, 950-5(2010).
198. Gelling, R.W. et al. GIP(6-30amide) contains the high affinity binding region of GIP and is a potent inhibitor of GIP1-42 action in vitro. *Regulatory peptides* **69**, 151-4(1997).
199. Sauve, A.A. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **324**, 883-93(2008).
200. Sandrasegaran, K. et al. State-of-the-art pancreatic MRI. *AJR. American journal of roentgenology* **195**, 42-53(2010).
201. Gault, V. a et al. Comparison of sub-chronic metabolic effects of stable forms of naturally occurring GIP(1-30) and GIP(1-42) in high-fat fed mice. *The Journal of endocrinology* **208**, 265-71(2011).
202. Furman, B.L. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 1-8(2010).doi:10.1016/j.toxicon.2010.12.016
203. Madsbad, S. Exenatide and liraglutide: different approaches to develop GLP-1 receptor agonists (incretin mimetics)--preclinical and clinical results. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **23**, 463-77(2009).
204. Tomkin, G.H. Albiglutide, an albumin-based fusion of glucagon-like peptide 1 for the potential treatment of type 2 diabetes. *Current opinion in molecular therapeutics* **11**, 579-88(2009).
205. Dong, J.Z. et al. Discovery and characterization of taspoglutide, a novel analogue of human glucagon-like peptide-1, engineered for sustained therapeutic activity in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* **13**, 19-25(2011).
206. Sebokova, E. et al. Taspoglutide, an analog of human glucagon-like Peptide-1 with enhanced stability and in vivo potency. *Endocrinology* **151**, 2474-82(2010).
207. Li, Y. et al. GLP-1 analogs containing disulfide bond exhibited prolonged half-life in vivo than GLP-1. *Peptides* 1-10(2011).doi:10.1016/j.peptides.2011.04.001

Peptidtabellen

Tabelle I: Secretin-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation: Die agonistische Potenz und die intrinsische Aktivität verschiedener Secretin-Varianten wurde in der β -Arrestin2-GFP Translokation mit β -Arrestin2-GFP- und SCTR-exprimierenden U2OS-Zellen gemessen [4.4.1]. Die intrinsische Aktivität des nativen Secretins wurde dafür auf 100 % festgelegt. Die antagonistische Aktivität wurde als Verdrängungsexperiment mit 10 nM Secretin-IDCC durchgeführt [Abb.20]. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. *: Peptide wurden hochrein (≥ 95 %) synthetisiert. Bei allen anderen Peptiden handelt es sich um Syntheserohprodukte [3.9.5]. Bei grau hinterlegten Aminosäuren handelt es sich um Substitutionen. (-): keine Reaktion, leere Zelle: nicht gemessen

Tabelle II: Secretin-Varianten, cAMP-Messungen: Für einige ausgewählte Secretin-Varianten wurden neben der β -Arrestin2-GFP Translokation zusätzlich cAMP-Messungen mit der cAMP GloSensorTM-Methode durchgeführt. Die agonistische Potenz und intrinsische Aktivität wurde dabei mit SCTR- und GloSensorTM-exprimierenden Zellen gemessen [4.4.2]. Die intrinsische Aktivität des nativen Secretins wurde dafür auf 100 % festgelegt. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. *: Peptide wurden hochrein (≥ 95 %) synthetisiert. Bei allen anderen Peptiden handelt es sich um Syntheserohprodukte [3.9.5]. Bei grau hinterlegten Aminosäuren handelt es sich um Substitutionen. (-): keine Reaktion, leere Zelle: nicht gemessen

Tabelle III: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation: Die agonistische Potenz und die intrinsische Aktivität verschiedener GLP-2-Varianten wurde in der β -Arrestin2-GFP Translokation mit β -Arrestin2-GFP- und GLP-2R-exprimierenden U2OS-Zellen gemessen [4.4.1]. Die intrinsische Aktivität des nativen GLP-2 wurde dafür auf 100 % festgelegt. Die antagonistische Aktivität der GLP-2-Varianten wurde als Verdrängungsexperiment mit 10 nM GLP-2-IDCC durchgeführt [Abb.26]. Alle angegebenen Werte sind das Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. *: Peptide wurden hochrein (≥ 95 %) synthetisiert. Bei allen anderen Peptiden handelt es sich um Syntheserohprodukte [3.9.5]. Bei grau hinterlegten Aminosäuren handelt es sich um Substitutionen. (-): keine Reaktion, leere Zelle: nicht gemessen

Peptidtablelle I-I: Secretin-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																														Agonismus β -Arr2-GFP			Antagonismus β -Arr2-GFP	
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	EC ₅₀ [nM]	intr.Aktivität [% Secretin]	IC ₅₀ [nM]	
Secretin*		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	3,26 ± 0,80	±					
SecretinDCC*		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	K* SGS	3,02 ± 0,12	±				
S001	Ac	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		3,36 ± 0,44	108,53 ± 1,90				
S002		A	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		233,86 ± 119,49	89,10 ± 4,71				
S003		H	A	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		9,21 ± 6,84	102,60 ± 4,78				
S004		H	S	A	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		1577,92 ± 1386,13	65,88 ± 24,59				
S005		H	S	D	A	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		14,01 ± 7,37	87,17 ± 4,35				
S006		H	S	D	G	A	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		6,99 ± 4,31	104,45 ± 8,49				
S007		H	S	D	G	T	A	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		155,16 ± 30,79	61,83 ± 4,92				
S008		H	S	D	G	T	F	A	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		131,37 ± 48,42	83,88 ± 12,51			
S009		H	S	D	G	T	F	T	A	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		24,29 ± 12,76	88,08 ± 10,83				
S010		H	S	D	G	T	F	T	S	A	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		10,87 ± 3,36	100,17 ± 11,42				
S011		H	S	D	G	T	F	T	S	E	A	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		120,52 ± 23,18	96,50 ± 9,58				
S012		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	A	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		5,76 ± 1,89	101,60 ± 10,47				
S013		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	A	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		6,06 ± 2,04	100,37 ± 18,43				
S014		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	A	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		2,71 ± 1,46	99,50 ± 12,76				
S015		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	A	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		13,38 ± 2,04	106,30 ± 3,58				
S016		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	A	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		16,41 ± 3,16	105,27 ± 7,71				
S017		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	A	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		2,63 ± 0,90	108,87 ± 7,40				
S018		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	A	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		5,37 ± 1,66	110,97 ± 5,59				
S019		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	A	Q	R	L	L	Q	G	L	V		62,53 ± 8,55	107,03 ± 4,54				
S020		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	A	R	L	L	Q	G	L	V		4,60 ± 3,31	108,60 ± 13,30				
S021		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	A	L	L	Q	G	L	V		6,35 ± 1,75	113,40 ± 5,01				
S022		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	A	L	Q	G	L	V		23,86 ± 4,34	110,87 ± 4,31				
S023		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	A	Q	G	L	V		20,76 ± 3,75	108,53 ± 4,58				
S024		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	A	G	L	V		4,71 ± 2,01	111,70 ± 6,77				
S025		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	A	L	V		4,12 ± 0,49	119,50 ± 9,15				
S026		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	A	V		14,96 ± 2,19	112,30 ± 4,00				
S027		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	A		7,20 ± 2,60	114,57 ± 7,50				
S028		H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	G K R	6,88 ± 2,74	116,27 ± 5,81				
S029		R	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		475,36 ± 166,97	66,47 ± 6,36				
S030		E	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		671,37 ± 180,62	63,70 ± 3,24				
S031		F	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		97,34 ± 22,95	67,60 ± 5,09				
S032		H	W	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		41,63 ± 24,81	20,17 ± 4,55				
S033		H	R	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-				
S034		H	D	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-				
S035		H	Abu	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		1,20 ± 0,27	104,60 ± 4,20				
S036		H	2Nal	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-	1328,40 ± 59,91			
S037		H	S	R	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-	952,87 ± 536,40			
S038		H	S	N	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		315,45 ± 123,95	105,20 ± 9,30				
S039		H	S	W	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-	1583,70 ± 625,50			
S040		H	S	D	R	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-	1056,52 ± 235,63			
S041		H	S	D	E	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-				
S042		H	S	D	I	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-				
S043		H	S	D	G	R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		4,16 ± 0,70	106,47 ± 4,48				
S044		H	S	D	G	D	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		4,10 ± 0,84	103,67 ± 6,37				
S045		H	S	D	G	C	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		9,66 ± 1,70	107,17 ± 7,43				
S046		H	S	D	G	T	R	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-				
S047		H	S	D	G	T	D	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		-	-				
S048		H	S	D	G	T	V	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V		61,03 ± 22,75	109,27 ± 2,75				

Peptidtablelle I-II: Secretin-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																														Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	EC ₅₀ [nM]	intr.Aktivität [% Secretin]
S049	H	S	D	G	T	2Nal	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				325,00 ± 162,96	32,05 ± 16,75	
S050	H	S	D	G	T	F	R	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S051	H	S	D	G	T	F	D	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S052	H	S	D	G	T	F	C	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				540,62 ± 288,00	102,57 ± 11,14	
S053	H	S	D	G	T	F	T	R	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S054	H	S	D	G	T	F	T	D	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				38,99 ± 6,87	86,87 ± 3,95	
S055	H	S	D	G	T	F	T	W	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S056	H	S	D	G	T	F	T	S	R	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				18,64 ± 2,30	94,23 ± 11,42	
S057	H	S	D	G	T	F	T	S	L	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				15,98 ± 5,09	106,43 ± 7,73	
S058	H	S	D	G	T	F	T	S	Y	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				11,75 ± 1,29	103,23 ± 7,20	
S059	H	S	D	G	T	F	T	S	E	R	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				154,10 ± 58,03	86,62 ± 7,70	
S060	H	S	D	G	T	F	T	S	E	D	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				869,29 ± 640,61	62,80 ± 12,45	
S061	H	S	D	G	T	F	T	S	E	N	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				213,65 ± 121,19	83,67 ± 11,03	
S062	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	R	G	L	V				2,95 ± 0,65	113,73 ± 3,59	
S063	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	E	G	L	V				3,47 ± 0,19	108,90 ± 6,08	
S064	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	L	G	L	V				4,14 ± 1,80	116,10 ± 3,22	
S065	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	R	L	V				5,25 ± 2,09	112,00 ± 2,00	
S066	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	E	L	V				4,32 ± 2,03	111,30 ± 4,24	
S067	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	I	L	V				7,44 ± 4,42	106,87 ± 0,85	
S068	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	C	L	V				20,93 ± 10,02	110,93 ± 0,75	
S069	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	R	V				9,06 ± 3,94	105,47 ± 1,21	
S070	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	D	V				15,32 ± 3,85	105,00 ± 2,78	
S071	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	F	V				12,00 ± 4,16	103,53 ± 2,33	
S072	Y	G	E	G	E	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S073	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	K	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				9,53 ± 1,58	114,30 ± 7,33	
S074	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	D	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				4,52 ± 1,61	111,23 ± 6,90	
S075	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	E	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				2,26 ± 0,71	104,77 ± 2,89	
S076	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	E	R	L	L	Q	G	L	V				2,28 ± 0,54	100,73 ± 2,80	
S077	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	E	R	L	E	R	L	L	Q	G	L	V				10,16 ± 1,09	108,43 ± 9,68	
S078	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	L	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				3,32 ± 0,60	104,60 ± 4,52	
S079	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	E	G	R	S				6,14 ± 1,31	108,63 ± 4,38	
S080	P	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				39,08 ± 12,83	96,57 ± 6,31	
S081	H	P	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				3,37 ± 1,99	106,23 ± 2,44	
S082	H	S	P	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S083	H	S	D	P	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S084	H	S	D	G	P	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S085	H	S	D	G	T	P	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S086	H	S	D	G	T	F	P	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S087	H	S	D	G	T	F	T	P	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S088	H	S	D	G	T	F	T	S	P	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S089	H	S	D	G	T	F	T	S	E	P	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S090	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	P	L	V				22,13 ± 10,01	103,17 ± 4,12	
S091	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	P	V				72,64 ± 22,88	95,03 ± 7,74	
S092	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	P				5,19 ± 2,62	100,47 ± 11,91	
S093	h	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				13,59 ± 4,52	107,20 ± 1,67	
S094	H	s	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				45,06 ± 21,00	91,57 ± 6,20	
S095	H	S	d	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				135,95 ± 67,03	89,07 ± 1,87	
S096	H	S	D	G	t	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				308,43 ± 31,06	102,97 ± 5,57	
S097	H	S	D	G	T	f	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				-	-	
S098	H	S	D	G	T	F	t	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V				1537,76 ± 534,38	98,33 ± 5,69	

Peptidtablelle I-III: Secretin-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																														Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP	
																															EC ₅₀ [nM]	intr.Aktivität [% Secretin]	IC ₅₀ [nM]	
S099	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	1873,16 ± 538,08	90,37 ± 6,84					
S100	H	S	D	G	T	F	T	S	e	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	20,35 ± 6,53	100,40 ± 5,89					
S101	H	S	D	G	T	F	T	S	E	I	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	20,99 ± 5,47	94,17 ± 6,05					
S102	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	I	V	8,48 ± 3,66	101,90 ± 4,71					
S103	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	V	v	4,73 ± 2,07	99,97 ± 3,64					
S104	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	8,80 ± 2,92	109,53 ± 9,99						
S105	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	26,54 ± 4,55	104,47 ± 14,11							
S106	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	35,92 ± 7,43	103,60 ± 9,27								
S107	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	130,92 ± 21,82	92,23 ± 5,84									
S108	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	-	-										
S109	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	-	-											
S110	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	-	-												
S111	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	-	-													
S112	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	-	-														
S113	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	-	-															
S114	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	-	-																
S115	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	-	-																	
S116	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	-	-																		
S117	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	-	-																			
S118	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	-	-																				
S119	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	-	-																					
S120	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	-	-																						
S121	H	S	D	G	T	F	T	S	E	-	-																							
S122	H	S	D	G	T	F	T	S	E	A	-	-																						
S123	H	S	D	G	T	F	T	S	E	A	A	-	-																					
S124	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	R	-	-																	
S125	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	-	-																	
S126	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	W	-	-																	
S127	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	A	-	-																	
S128	h	S	D	G	T	F	T	S	E	-	-																							
S129	H	s	D	G	T	F	T	S	E	-	-																							
S130	H	S	d	G	T	F	T	S	E	-	-																							
S131	H	S	D	G	t	F	T	S	E	-	-																							
S132	H	S	D	G	T	f	T	S	E	-	-																							
S133	H	S	D	G	T	F	t	S	E	-	-																							
S134	H	S	D	G	T	F	T	s	E	-	-																							
S135	H	S	D	G	T	F	T	S	e	-	-																							
S136	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	1283,01 ± 703,96					
S137	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	1735,62 ± 590,35						
S138	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	1917,23 ± 355,66							
S139	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	2588,12 ± 317,15								
S140	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	2338,18 ± 366,01									
S141	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-										
S142	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	2727,94 ± 60,50											
S143	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-												
S144	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-													
S145	R	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	812,45 ± 372,01							
S146	E	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	1348,30 ± 468,45							
S147	W	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	272,21 ± 59,35							
S148	A	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	775,80 ± 330,46							

Peptidtablelle I-IV: Secretin-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																														Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP					
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	EC ₅₀ [nM]	intr.Aktivität [% Secretin]	IC ₅₀ [nM]				
S149					W	W	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1232,65 ±	232,71
S150					W	W	W	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1476,42 ±	292,10
S151					W	R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									957,43 ±	290,76
S152					W	R	W	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									681,60 ±	263,36
S153					W	R	W	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1071,63 ±	256,45
S154					R	R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									-	-
S155					R	W	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1472,76 ±	723,61
S156					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									259,75 ±	144,78	
S157					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									904,00 ±	458,49	
S158					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1351,96 ±	336,86	
S159					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									924,95 ±	237,65	
S160					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									433,52 ±	79,05	
S161					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1361,71 ±	322,28	
S11-R*					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1280,25 ±	547,63	
S11-2-R*					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1101,39 ±	1225,20	
S162					r	A	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1757,97 ±	322,18	
S163					r	F	A	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1612,47 ±	185,83	
S164					r	F	T	A	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									897,53 ±	108,14	
S165					r	F	T	S	A	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1141,94 ±	281,93
S166					r	F	T	S	E	A	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									-	-	
S167					r	F	T	S	E	L	A	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									998,78 ±	142,75
S168					r	F	T	S	E	L	S	A	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									2479,68 ±	579,84	
S169					r	F	T	S	E	L	S	R	A	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									884,54 ±	169,75	
S170					r	F	T	S	E	L	S	R	L	A	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1580,79 ±	77,34	
S171					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	A	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									-	-	
S172					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	A	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									309,00 ±	73,62	
S173					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	A	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1858,45 ±	159,61	
S174					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	A	Q	R	L	L	Q	G	L	V									-	-	
S175					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	A	R	L	L	Q	G	L	V									1017,97 ±	107,85	
S176					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	A	L	L	Q	G	L	V									1492,57 ±	218,34	
S177					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	A	L	Q	G	L	V									-	-	
S178					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	A	Q	G	L	V									-	-	
S179					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	A	G	L	V									697,38 ±	54,66	
S12-R*					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	A	G	L	V									1103,50 ±	524,59	
S180					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	A	L	V									570,61 ±	29,51	
S13-R*					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	A	L	V									717,02 ±	316,41	
S181					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	A	V									-	-	
S182					r	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	A									2057,36 ±	760,62	
S183					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L										-	-	
S184					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G												-	-
S185					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q													-	-
S186					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L														-	-
S187					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	W	E	G	R	S																		-	-
S188					R	F	T	S	E	L	S	R	L	R	W																						-	-
S189					R	AC5C	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									2386,46 ±	762,83	
S190					E	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									374,30 ±	150,40	
S191					W	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									207,40 ±	23,65	
S192					W	F	T	S	E	L	S	R	L	R	W																					-	-	
S193					w	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1560,35 ±	382,58	
S194					W	AC5C	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V									1244,61 ±	534,04	

Peptidtablelle I-V: Secretin-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																														Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP					
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	EC ₅₀ [nM]	intr.Aktivität [% Secretin]	IC ₅₀ [nM]				
S195					A	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	505,80 ±	241,64
S196					W	W	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	1000,15 ±	458,08
S197					R	R	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-
S198					F	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	2849,66 ±	191,65
S199					f	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	1333,12 ±	598,89
S200					H	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	2233,34 ±	1151,20
S201					h	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	758,19 ±	364,37
S202					h	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	2530,59 ±	265,10
S203					Y	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	1157,38 ±	657,07
S204					y	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	945,93 ±	380,17
S205					2Nal	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	2012,54 ±	311,77
S206					Bip	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	1929,54 ±	634,52
S207					Cit	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	2529,18 ±	1087,06
S208						R	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-
S209						W	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-
S210							R	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-
S211							E	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-
S212						W	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	1013,08 ±	751,52	
S213						A	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-	
S214	H	S	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	1124,14 ±	463,75	
S215	H	S	D	G	T	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-	
S216	H	S	D	G	T	P	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V							-	-	-	-
S217		S	D	G	T	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V								-	-	-	-	
S218	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	Ahx	Q	G	L	V													-	-	-	-	
S219	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Ahx	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V													-	-	-	-	

Peptidtablelle I-VI: Secretin-Varianten, 10/11mere, β -Arrestin2.GFP Translokation

Name	Peptidsequenz											Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	EC ₅₀ [nM]	intr. Aktivität [% Secretin]	IC ₅₀ [nM]
S220	H	S	D	G	T	F	T	S	E	AOAc		-	-	-
S221	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	AoAc	-	-	-
S222	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Bip		-	-	-
S223	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Bip	-	-	-
S224	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Bip	Bip	-	-	-
S225	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Cha		-	-	-
S226	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Cha	-	-	-
S227	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Cha	Cha	-	-	-
S228	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Cit		-	-	-
S229	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Cit	-	-	-
S230	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Cit	Cit	-	-	-
S231	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Hnv		-	-	-
S232	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Hnv	-	-	-
S233	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Hyp		-	-	-
S234	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Hyp	-	-	-
S235	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Hyp	Hyp	-	-	-
S236	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Met(O2)		-	-	-
S237	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Met(O2)	-	-	-
S238	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Met(O2)	Met(O2)	-	-	-
S239	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Orn		-	-	-
S240	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Orn	-	-	-
S241	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Orn	Orn	-	-	-
S242	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Pen		-	-	-
S243	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Pen	-	-	-
S244	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Pen	Pen	-	-	-
S245	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Phe(4-No2)		-	-	-
S246	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Phe(4-No2)	-	-	-
S247	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Tyr(3(NO-2))		-	-	-
S248	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Tyr(3(NO-2))	-	-	-
S249	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Tyr(3(NO-2))	Tyr(3(NO-2))	-	-	-
S250	H	S	D	G	T	F	T	S	E	phosTyr		-	-	-
S251	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	phosTyr	-	-	-
S252	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Tyr(Bzl)		-	-	-
S253	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Tyr(Bzl)	-	-	-
S254	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Tyr(Bzl)	Tyr(Bzl)	-	-	-
S255	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Tyr(Me)		-	-	-
S256	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Tyr(Me)	-	-	-
S257	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Tyr(Me)	Tyr(Me)	-	-	-
S258	H	S	D	G	T	F	T	S	E	2Nal		-	-	-
S259	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	2Nal	-	-	-
S260	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Hphe		-	-	-
S261	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Hphe	-	-	-
S262	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Hphe	Hphe	-	-	-
S263	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Aib		-	-	-
S264	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Aib	-	-	-
S265	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Aib	Aib	-	-	-
S266	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Lys(Me)2		-	-	-
S267	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Lys(Me)2	-	-	-
S268	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Ahx		-	-	-
S269	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Ahx	-	-	-

Peptidtablelle I-VII: Secretin-Varianten, 10/11mere, β -Arrestin2.GFP Translokation

Name	Peptidsequenz											Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	EC ₅₀ [nM]	intr.Aktivität [% Secretin]	IC ₅₀ [nM]
S270	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Ahx	Ahx	-	-	-
S271	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Hse(Me)		-	-	-
S272	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Hse(Me)	-	-	-
S273	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Hse(Me)	Hse(Me)	-	-	-
S274	H	S	D	G	T	F	T	S	E	β Ala		-	-	-
S275	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	β Ala	-	-	-
S276	H	S	D	G	T	F	T	S	E	β Ala	β Ala	-	-	-
S277	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Abu		-	-	-
S278	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Abu	-	-	-
S279	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L		-	-	-
S280	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	-	-	-
S281	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	L	-	-	-
S282	H	S	D	G	T	F	T	S	E	F		-	-	-
S283	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	F	-	-	-
S284	H	S	D	G	T	F	T	S	E	F	F	-	-	-
S285	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	E	-	-	-
S286	H	S	D	G	T	F	T	S	E	Tyr(3,5-12)		-	-	-
S287	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	Tyr(3,5-12)	-	-	-
S288	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	R	-	-	-

Peptidtablelle II-I: Secretin-Varianten, cAMP-Messungen

Name	Peptidsequenz																														Agonismus cAMP			
																															EC ₅₀		intr.Aktivität	
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	[nM]		[% Secretin]
Secretin*	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	0,0012 ±	0,0003	100,00				
S108	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L										13,24 ±	8,77	99,40 ± 4,77
S109	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R											574,01 ±	520,22	104,43 ± 5,77
S110	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q												856,98 ±	703,60	102,77 ± 6,50
S111	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L													2168,00 ±	1444,76	87,63 ± 4,91
S112	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R														4614,33 ±	3093,50	95,13 ± 13,30
S113	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A															9240,99 ±	6951,27	89,00 ± 2,59
S114	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G																19741,52 ±	14636,68	62,40 ± 6,77
S115	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E																	-	-	-
S116	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R																		5908,45 ±	4365,50	82,95 ± 6,56
S117	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L																			11382,65 ±	-	50,87 ± 9,05
S118	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R																				-	-	-
S119	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S																					-	-	-
S120	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L																						-	-	-
S121	H	S	D	G	T	F	T	S	E																							12343,33 ±	-	31,47 ± 10,75
S122	H	S	D	G	T	F	T	S	E	A																						11206,36 ±	-	46,43 ± 7,57
S123	H	S	D	G	T	F	T	S	E	A	A																					-	-	-
S124	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	R																	-	-	-
S125	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E																	-	-	-
S126	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	W																	3760,75 ±	2162,74	99,10 ± 11,46
S127	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	A																	-	-	-
S128	h	S	D	G	T	F	T	S	E																							-	-	-
S129	H	s	D	G	T	F	T	S	E																							-	-	-
S130	H	S	d	G	T	F	T	S	E																							-	-	-
S131	H	S	D	G	t	F	T	S	E																							-	-	-
S132	H	S	D	G	T	f	T	S	E																							-	-	-
S133	H	S	D	G	T	F	t	S	E																							-	-	-
S134	H	S	D	G	T	F	T	s	E																							-	-	-
S135	H	S	D	G	T	F	T	S	e																							-	-	-
S136	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	21,51 ±	-	85,23 ± 17,73					
S137		D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	145,68 ±	11,74	93,58 ± 7,38					
S138			G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	162,61 ±	10,02	89,93 ± 5,67					
S139				T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	566,54 ±	352,54	81,97 ± 5,44					
S140					F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	1090,16 ±	657,52	69,00 ± 6,88					
S141						T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	3297,72 ±	1538,30	90,57 ± 11,47					
S142							S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	1289,11 ±	-	66,77 ± 5,03					
S143							E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	5250,60 ±	1886,10	50,85 ± 6,53						
S144								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	9325,03 ±	4950,83	33,40 ± 5,65						
S145								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						
S146								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						
S147								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	20,16 ±	2,38	95,77 ± 12,06						
S148								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	27,74 ±	13,58	85,30 ± 17,43						
S156								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	12,69 ±	6,66	13,40 ± 2,69						
S190								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						
S191								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	39,72 ±	22,86	50,67 ± 10,75						
S195								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						
S210								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						
S211								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						
S212								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						
S213								L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	-	-	-						

Peptidtablelle III-I: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																																		Agonismus β -Arr2-GFP			Antagonismus β -Arr2-GFP
																																			EC ₅₀		Aktivität	IC ₅₀
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	[nM]	[% GLP-2]	[nM]		
GLP-2*	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,84 ±	0,90	100,00		
G001	A	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	250,94 ±	274,48	33,47 ±	9,64	
G002	H	A	A	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	11,44 ±	6,00	21,30 ±	9,47	
G003	H	A	D	A	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,97 ±	1,37	105,83 ±	4,72	
G004	H	A	D	G	A	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,76 ±	1,74	104,23 ±	5,74	
G005	H	A	D	G	S	A	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	297,38 ±	161,40	81,97 ±	22,33	
G006	H	A	D	G	S	F	A	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,35 ±	0,34	105,10 ±	4,88	
G007	H	A	D	G	S	F	S	A	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,50 ±	0,17	103,17 ±	7,98	
G008	H	A	D	G	S	F	S	D	A	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,20 ±	2,23	100,20 ±	2,57	
G009	H	A	D	G	S	F	S	D	E	A	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	20,56 ±	3,19	86,03 ±	14,17	
G010	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,67 ±	0,26	105,27 ±	5,83	
G011	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,09 ±	0,68	108,50 ±	17,23	
G012	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	A	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,08 ±	0,50	112,27 ±	11,42	
G013	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	A	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	11,24 ±	2,92	93,70 ±	6,80	
G014	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	A	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,85 ±	0,74	95,43 ±	10,09	
G015	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,27 ±	0,38	96,45 ±	10,39	
G016	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	A	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,05 ±	0,34	103,85 ±	17,75	
G017	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	A	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,04 ±	1,90	111,15 ±	8,56	
G018	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	A	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,84 ±	0,75	108,15 ±	6,86	
G019	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	A	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3019,81 ±	495,84	116,30 ±	1,27	
G020	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	A	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	14,46 ±	1,09	86,60 ±	19,09	
G021	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	13,41 ±	5,14	107,00 ±	13,44	
G022	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	A	L	I	Q	T	K	I	T	D	2172,12 ±	967,81	101,75 ±	29,77	
G023	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	A	I	Q	T	K	I	T	D	12,88 ±	1,31	101,45 ±	2,19	
G024	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	A	Q	T	K	I	T	D	3,79 ±	0,43	100,80 ±	8,06	
G025	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	A	T	K	I	T	D	20,78 ±	5,99	111,35 ±	3,75	
G026	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	A	K	I	T	D	2,59 ±	0,50	110,45 ±	1,77	
G027	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	A	I	T	D	89,87 ±	27,42	98,05 ±	7,71	
G028	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	A	T	D	1,65 ±	0,51	112,00 ±	4,10	
G029	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	A	D	3,90 ±	1,72	104,90 ±	9,62	
G030	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	A	4,26 ±	2,40	108,33 ±	6,71	
G031	R	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	42,52 ±	28,07	14,55 ±	4,89	
G032	N	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,31 ±	3,15	63,08 ±	10,06	
G033	D	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	9,34 ±	6,38	22,30 ±	6,22	
G034	C	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	93,53 ±	41,28	58,43 ±	11,59	
G035	E	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	96,68 ±	46,20	28,86 ±	9,92	
G036	Q	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	59,25 ±	44,27	28,77 ±	8,89	
G037	G	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	66,04 ±	62,76	34,25 ±	14,88	
G038	I	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	12,21 ±	9,67	30,65 ±	5,83	
G039	L	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	7,05 ±	1,67	34,70 ±	8,71	
G040	K	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	33,96 ±	10,72	11,45 ±	3,89	
G041	M	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,81 ±	1,55	44,87 ±	9,62	
G042	F	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,23 ±	0,65	65,37 ±	10,64	
G043	P	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	14,61 ±	2,72	23,96 ±	10,46	
G044	S	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,74 ±	2,63	69,63 ±	5,90	
G045	T	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,88 ±	1,91	61,00 ±	4,03	
G046	W	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,20 ±	0,67	105,83 ±	8,21	
G047	Y	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,50 ±	0,97	116,50 ±	9,50	
G048	V	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	18,73 ±	14,76	29,55 ±	9,25	
G049	H	R	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	22,55 ±	1,63	18,43 ±	5,20	

Peptidtablelle III-II: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																																		Agonismus β -Arr2-GFP				Antagonismus β -Arr2-GFP	
																																			EC ₅₀		Aktivität		IC ₅₀	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	[nM]	[% GLP-2]	[nM]				
G050	H	N	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	9,86 ±	3,35	31,28 ±	5,10			
G051	H	D	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	12,98 ±	11,08	22,88 ±	4,41			
G052	H	C	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	56,96 ±	52,47	100,38 ±	16,07			
G053	H	E	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,74 ±	1,94	46,27 ±	5,25			
G054	H	Q	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,87 ±	0,49	100,07 ±	4,19			
G055	H	G	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,07 ±	1,10	121,67 ±	6,07			
G056	H	H	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,82 ±	1,87	91,10 ±	5,02			
G057	H	I	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,79 ±	1,33	105,70 ±	0,61			
G058	H	L	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,69 ±	0,73	29,77 ±	8,75			
G059	H	K	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	47,91 ±	38,34	18,93 ±	5,54			
G060	H	M	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,02 ±	1,50	101,73 ±	14,44			
G061	H	F	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,48 ±	1,97	74,23 ±	4,94			
G062	H	P	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,71 ±	0,46	104,88 ±	26,27			
G063	H	S	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,53 ±	0,58	93,10 ±	9,00			
G064	H	T	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,94 ±	1,24	65,53 ±	4,74			
G065	H	W	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,60 ±	1,29	19,17 ±	1,80			
G066	H	Y	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,33 ±	3,18	27,87 ±	3,07			
G067	H	V	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,40 ±	0,78	100,00 ±	17,18			
G068	H	A	R	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	393,91 ±	23,36	64,83 ±	14,76			
G069	H	A	N	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	16,48 ±	9,68	30,10 ±	2,94			
G070	H	A	C	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	52,58 ±	7,15	78,47 ±	4,73			
G071	H	A	E	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	0,97 ±	0,28	104,43 ±	10,30			
G072	H	A	Q	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,57 ±	0,82	64,57 ±	11,47			
G073	H	A	G	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	18,58 ±	5,42	10,60 ±	2,88			
G074	H	A	H	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,09 ±	1,79	82,37 ±	15,27			
G075	H	A	I	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	17,29 ±	10,62	13,00 ±	3,74			
G076	H	A	L	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	21,59 ±	5,36	10,23 ±	4,37			
G077	H	A	K	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	21,01 ±	7,69	6,10 ±	1,56			
G078	H	A	M	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,65 ±	1,28	53,98 ±	7,47			
G079	H	A	F	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,20 ±	5,80	8,78 ±	0,85			
G080	H	A	P	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,74 ±	3,75	15,60 ±	3,42			
G081	H	A	S	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	9,63 ±	4,62	37,90 ±	9,42			
G082	H	A	T	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	28,34 ±	26,68	22,45 ±	7,48			
G083	H	A	W	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,56 ±	1,21	17,70 ±	3,05			
G084	H	A	Y	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,49 ±	2,12	12,10 ±	2,40			
G085	H	A	V	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,89 ±	3,34	9,53 ±	0,80			
G086	H	A	D	R	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	56,08 ±	28,47	27,57 ±	4,80			
G087	H	A	D	N	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,17 ±	3,24	60,63 ±	7,60			
G088	H	A	D	D	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	7,75 ±	3,94	13,33 ±	3,32			
G089	H	A	D	C	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	240,97 ±	211,45	59,85 ±	12,47			
G090	H	A	D	E	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,55 ±	4,35	27,40 ±	6,97			
G091	H	A	D	Q	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,53 ±	0,18	53,13 ±	7,75			
G092	H	A	D	H	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	20,67 ±	19,51	32,38 ±	6,62			
G093	H	A	D	I	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,64 ±	1,43	42,53 ±	13,63			
G094	H	A	D	L	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,31 ±	1,14	45,77 ±	9,62			
G095	H	A	D	K	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	136,27 ±	188,00	10,00 ±	4,33			
G096	H	A	D	M	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,18 ±	1,95	44,30 ±	6,29			
G097	H	A	D	F	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,06 ±	1,93	17,83 ±	7,88			
G098	H	A	D	P	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	86,64 ±	51,99	16,88 ±	8,82			
G099	H	A	D	S	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,57 ±	0,55	95,33 ±	2,49			

Peptidtablelle III-III: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																																		Agonismus β -Arr2-GFP				Antagonismus β -Arr2-GFP	
																																			EC ₅₀		Aktivität		IC ₅₀	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	[nM]	[% GLP-2]	[nM]				
G100	H	A	D	T	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,71 ± 0,83	55,67 ± 2,84					
G101	H	A	D	W	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	7,71 ± 4,46	43,04 ± 9,46					
G102	H	A	D	Y	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,94 ± 0,23	46,33 ± 5,81					
G103	H	A	D	V	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,47 ± 1,11	52,60 ± 11,22					
G104	H	A	D	G	R	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,57 ± 1,40	73,70 ± 3,70					
G105	H	A	D	G	N	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	0,93 ± 0,29	101,13 ± 6,89					
G106	H	A	D	G	D	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,17 ± 0,60	98,68 ± 17,65					
G107	H	A	D	G	C	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	9,97 ± 4,49	88,83 ± 17,20					
G108	H	A	D	G	E	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	0,97 ± 0,39	101,43 ± 21,21					
G109	H	A	D	G	Q	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,16 ± 1,39	92,53 ± 20,62					
G110	H	A	D	G	G	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,72 ± 2,97	76,03 ± 15,19					
G111	H	A	D	G	H	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,42 ± 1,31	93,60 ± 14,34					
G112	H	A	D	G	I	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,88 ± 0,68	95,13 ± 11,77					
G113	H	A	D	G	L	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,76 ± 0,54	95,63 ± 11,95					
G114	H	A	D	G	K	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,45 ± 2,65	66,23 ± 9,78					
G115	H	A	D	G	M	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,98 ± 0,32	97,57 ± 10,36					
G116	H	A	D	G	F	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,13 ± 0,47	88,67 ± 3,29					
G117	H	A	D	G	P	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	69,22 ± 11,65	44,87 ± 0,93					
G118	H	A	D	G	T	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,82 ± 0,37	99,93 ± 5,40					
G119	H	A	D	G	W	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,92 ± 0,60	94,55 ± 2,33					
G120	H	A	D	G	Y	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,26 ± 0,81	99,45 ± 5,27					
G121	H	A	D	G	V	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,93 ± 0,21	101,80 ± 5,52					
G122	H	A	D	G	V	W	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,61 ± 1,37	61,93 ± 1,24					
G123	H	A	D	G	V	Y	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,27 ± 2,91	77,80 ± 4,34					
G124	H	A	D	G	V	H	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	133,66 ± 85,66	16,43 ± 3,61					
G125	H	A	D	G	S	F	S	R	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	59,11 ± 17,04	77,50 ± 24,20					
G126	H	A	D	G	S	F	S	N	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,14 ± 0,54	92,90 ± 2,69					
G127	H	A	D	G	S	F	S	C	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	44,15 ± 22,28	94,55 ± 11,10					
G128	H	A	D	G	S	F	S	Q	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,68 ± 0,82	96,67 ± 6,73					
G129	H	A	D	G	S	F	S	E	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,44 ± 0,37	105,50 ± 2,40					
G130	H	A	D	G	S	F	S	G	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,08 ± 0,96	99,27 ± 12,03					
G131	H	A	D	G	S	F	S	H	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,63 ± 0,59	103,37 ± 8,70					
G132	H	A	D	G	S	F	S	I	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	39,50 ± 18,39	57,83 ± 9,29					
G133	H	A	D	G	S	F	S	L	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	268,11 ± 279,52	75,85 ± 24,90					
G134	H	A	D	G	S	F	S	K	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	32,56 ± 6,01	80,00 ± 16,37					
G135	H	A	D	G	S	F	S	M	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,83 ± 3,36	90,50 ± 14,29					
G136	H	A	D	G	S	F	S	F	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	35,01 ± 30,51	77,34 ± 10,50					
G137	H	A	D	G	S	F	S	P	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1307,89 ± 1120,93	82,10 ± 27,87					
G138	H	A	D	G	S	F	S	S	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,05 ± 0,60	92,05 ± 11,07					
G139	H	A	D	G	S	F	S	T	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	10,37 ± 2,04	70,10 ± 7,19					
G140	H	A	D	G	S	F	S	W	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	43,94 ± 25,23	72,90 ± 12,77					
G141	H	A	D	G	S	F	S	Y	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	24,27 ± 11,63	73,90 ± 7,10					
G142	H	A	D	G	S	F	S	V	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	27,32 ± 15,14	72,10 ± 31,65					
G143	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	R	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	13,42 ± 4,73	67,30 ± 26,91					
G144	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	D	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,05 ± 1,88	79,15 ± 4,88					
G145	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	C	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	25,91 ± 9,20	95,80 ± 10,32					
G146	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	Q	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,46 ± 0,55	80,38 ± 10,55					
G147	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	E	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,47 ± 0,94	60,70 ± 12,02					
G148	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	G	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,64 ± 0,53	87,90 ± 12,02					
G149	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	H	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	13,84 ± 6,82	74,75 ± 3,75					

Peptidtablelle III-IV: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																																	Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP	
																																		EC ₅₀	Aktivität	IC ₅₀	
																																		[nM]	[% GLP-2]	[nM]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33				
G150	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	I	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,08 ± 1,57	77,00 ± 12,59		
G151	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	L	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,52 ± 0,70	93,55 ± 6,86		
G152	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	K	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,78 ± 0,87	85,95 ± 8,98		
G153	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	M	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,59 ± 1,05	96,55 ± 13,36		
G154	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	F	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,40 ± 3,22	91,85 ± 1,91		
G155	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	P	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-		
G156	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	S	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,50 ± 0,42	105,65 ± 10,68		
G157	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	T	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	7,09 ± 2,56	97,95 ± 8,27		
G158	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	W	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	11,06 ± 5,31	83,73 ± 9,75		
G159	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	Y	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,47 ± 0,90	88,70 ± 14,00		
G160	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	V	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,70 ± 1,51	103,30 ± 15,70		
G161	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	R	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,46 ± 0,96	97,15 ± 8,70		
G162	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	D	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,09 ± 2,03	99,53 ± 5,13		
G163	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	C	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	16,53 ± 8,54	101,30 ± 8,91		
G164	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	Q	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	5,15 ± 3,41	109,10 ± 14,42		
G165	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	E	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	15,25 ± 7,13	107,05 ± 1,20		
G166	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	G	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	15,12 ± 7,12	103,80 ± 2,25		
G167	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	H	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,03 ± 1,29	109,10 ± 15,70		
G168	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	I	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	13,20 ± 3,46	100,95 ± 17,32		
G169	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	L	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	9,83 ± 2,04	99,20 ± 16,97		
G170	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	K	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	6,33 ± 4,41	119,10 ± 13,72		
G171	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	M	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	18,62 ± 3,55	90,15 ± 14,50		
G172	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	F	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	30,66 ± 10,21	103,00 ± 13,11		
G173	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	P	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	923,71 ± 477,17	87,32 ± 9,16		
G174	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	S	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	15,11 ± 6,48	105,75 ± 18,17		
G175	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	T	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	27,94 ± 12,73	114,15 ± 36,84		
G176	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	W	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	7,48 ± 3,46	100,00 ± 9,05		
G177	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	Y	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,44 ± 4,67	114,50 ± 5,94		
G178	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	V	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	25,19 ± 12,40	102,30 ± 16,12		
G179	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	S	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,86 ± 1,08	102,63 ± 7,22		
G180	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	K	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1,68 ± 0,76	107,63 ± 12,16		
G181	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	E	A	L	A	A	A	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	5696,01 ± 4409,25	99,99 ± 23,83		
G182	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	S	T	I	L	E	A	L	A	A	A	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	T	I	D	-	-		
G183	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	E	A	L	A	A	S	D	F	I	S	W	L	I	S	T	K	I	T	D	2664,11 ± 1202,45	88,95 ± 4,88		
G184	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	E	S	L	A	A	A	D	F	I	S	W	L	I	A	T	K	I	T	D	6549,74 ±	62,95 ± 11,67		
G185	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	-	-	
G186	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	-	-	
G187	H	A	E	S	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	9,75 ± 4,23	77,97 ± 1,00		
G188	H	A	E	S	E	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,56 ± 0,78	77,93 ± 5,33		
G189	H	A	E	S	N	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	25,67 ± 7,68	31,90 ± 3,00		
G190	H	A	E	S	D	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	3,17 ± 0,16	72,97 ± 2,80		
G191	Y	G	E	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	4,16 ± 1,18	95,10 ± 5,89		
G192	H	A	E	G	N	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	27,12 ± 5,92	52,70 ± 2,85		
G193	Y	G	E	G	N	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	8,39 ± 0,84	67,37 ± 5,13		
G194	Y	G	E	G	E	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	2,24 ± 0,20	95,40 ± 3,20		
G195	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I		9,08 ± 1,33	106,70 ± 6,03			
G196	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T			10,83 ± 1,54	101,98 ± 11,41				
G197	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I					184,28 ± 81,77	83,20 ± 4,60				
G198	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W								-	-			
G199	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I											11077,51 ± 1946,34	102,65 ± 7,28		

Peptidtablelle III-V: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																																	Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [% GLP-2]	IC ₅₀ [nM]					
G200	H	A	D	G	S	F	S	D	E																										-	-	-				
G201	H	A	D	G	S	F	S	D	E	F	F																									-	-	-			
G202	H	A	D	G	S	F	S	D	E	Y	Y																									-	-	-			
G203	H	A	D	G	S	F	S	D	E	W	W																									-	-	-			
GLP-2(3-33)*		D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D			24,64 ± 14,53	6,57 ± 4,08	84,55 ± 52,25				
G204		S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D					-	-	37,87 ± 9,06				
G205		R	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D					-	-	114,44 ± 30,72				
G206		W	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D					-	-	30,76 ± 4,55				
G207		F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	976,92 ± 280,85				
G208		F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	61,72 ± 8,16				
G209							D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D					-	-	1884,37 ± 272,97		
G210							E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	309,87 ± 97,86		
G211								F	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	120,74 ± 26,08	
G212								Y	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	147,44 ± 43,03	
G213								W	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	255,10 ± 47,27	
G214									M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	-	
G215									M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	209,03 ± 48,28	
G216									A	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	982,07 ± 537,88	
G217									R	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	890,84 ± 345,55	
G218									N	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	668,77 ± 418,58	
G219									D	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	1147,70 ± 552,57	
G220									C	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	457,64 ± 211,78	
G221									Q	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	710,34 ± 373,72	
G222									G	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	404,37 ± 213,67	
G223									E	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	1060,19 ± 358,42	
G224									H	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	726,28 ± 398,45	
G225									I	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	418,28 ± 162,06	
G226									L	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	296,93 ± 104,53	
G227									K	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	1820,50 ± 653,77	
G228									F	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	100,68 ± 25,20	
G229									P	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	913,93 ± 198,99	
G230									S	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	978,05 ± 286,24	
G231									T	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	533,31 ± 306,56	
G232									W	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	24,07 ± 11,66	
G233									W	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	132,44 ± 60,74	
G01-R*									W	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	64,16 ± 31,99	
G234									Y	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	75,38 ± 19,81	
G235									Y	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	298,95 ± 100,19	
G236									V	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	472,87 ± 246,61	
G237									M	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	531,94 ± 134,67	
G238									M	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	37,13 ± 8,51	
G239									M	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	148,19 ± 54,00	
G02-R*									M	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	69,67 ± 29,84	
G240									M	N	T	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	823,34 ± 431,18
G241									M	N	T	I	A	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	212,98 ± 78,89	
G242									M	N	T	I	L	A	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	1787,64 ± 701,81	
G243									M	N	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	95,44 ± 20,53	
G244									M	N	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	422,14 ± 196,03	
G245									M	N	T	I	L	D	N	A	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	2130,90 ± 1153,29	
G246									M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	A	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						-	-	-	

Peptidtablelle III-VI: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																																		Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP	
																																			EC ₅₀	Aktivität	IC ₅₀	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	[nM]	[% GLP-2]	[nM]		
G247										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	A	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	331,83 ±	184,65	
G248										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	A	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	
G249										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	A	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	
G250										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	640,61 ±	47,01	
G251										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	A	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	
G252										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	A	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	
G253										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	A	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	
G254										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	A	T	K	I	T	D	-	-	332,87 ±	193,47	
G255										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	A	K	I	T	D	-	-	1875,93 ±	702,27	
G256										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	A	I	T	D	-	-	-	-	
G257										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	A	T	D	-	-	741,42 ±	355,20	
G258										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	A	D	-	-	696,69 ±	227,45	
G259										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	A	-	-	206,69 ±	57,62	
G260										W	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	20,34 ±	9,85	
G03-R*										W	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	12,61 ±	2,45	
G03-2-R*										W	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	14,28 ±	7,31	
G04-R*								Ac		W	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	259,73 ±	46,64	
G05-R*										W	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	18,36 ±	3,04	
G261										W	N	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	76,73 ±	36,59	
G06-R*										W	N	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	62,35 ±	33,93	
G262										W	N	A	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	17,41 ±	6,36	
G07-R*										W	N	A	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	13,30 ±	4,41	
G263										Y	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	36,12 ±	8,81	
G08-R*										Y	N	A	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	30,36 ±	7,97	
G264										Y	N	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	351,31 ±	126,93	
G265										Y	N	A	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	28,66 ±	0,96	
G09-R*										Y	N	A	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	31,77 ±	6,81	
G266										w	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	299,06 ±	149,67	
G267										y	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	640,45 ±	291,65	
G268										Tyr(Mi	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	477,47 ±	248,80	
G269										Tyr(Bz	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	204,84 ±	139,49	
G270										Tyr(3-Nr	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	129,90 ±	73,22	
G271										2Nal	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	99,57 ±	84,52	
G10-R*										2Nal	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	240,97 ±	89,76	
G272										Bip	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	450,23 ±	331,73	
G273										N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	292,02 ±	152,64		
G274										T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	8211,72 ±	2664,11			
G275										L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	-	-			
G276										N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
G277										A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
G278										R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
G279										F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
G280										N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
G281										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	-	-	1673,22 ±	303,21			
G282										M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
G283	H	A	D	G	S	F	S	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	R	A	F	A	A	W	A	A	A	A	K	I	T	D	-	-	-	-	
G284	H	A	D	G	S	F	S	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1247,81 ±	203,85	16,10 ±	0,71	
G285	H	A	D	G	S	F	S	D	A	A	A	Q	A	A	A	A	Q	A	R	D	F	A	A	W	A	Q	A	A	K	I	T	D	-	-	-	-		
G286	H	A	D	G	S	F	S	D	A	A	A	Q	A	A	A	A	Q	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-	-		
G287	H	A	D	G	S	F	S	D	A	A	K	A	A	A	E	A	A	K	A	R	E	F	A	K	W	A	A	E	A	K	I	T	D	-	-	-	-	

Peptidtablelle III-VII: GLP-2-Varianten, β -Arrestin2-GFP Translokation

Name	Peptidsequenz																																	Agonismus β -Arr2-GFP		Antagonismus β -Arr2-GFP
																																		EC ₅₀ [nM]	Aktivität [% GLP-2]	IC ₅₀ [nM]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
G288	H	A	D	G	S	F	S	D	A	A	K	A	A	A	E	A	A	K	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-
G289	H	A	D	G	S	F	S	D	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	-	-	-
G290	H	A	D	G	S	F	S	D	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	1349,26 ± 233,73	105,60 ± 11,67	-
G291	H	A	D	G	S	F	S	D	Y	R	R	Q	C	Q	R	S	L	T	E	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	9544,76 ± 1225,63	33,57 ± 8,93	-

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Struktur eines GPCRs	1
Abbildung 2	G-Protein-vermittelte Signaltransduktion von GPCRs	3
Abbildung 3	Arrestin-vermittelte Signaltransduktion und Internalisierung von GPCRs	4
Abbildung 4	Modell eines GPCRs der Klasse B mit gebundenem Liganden	6
Abbildung 5	Gegenüberstellung der Aminosäuren ausgewählter Peptidliganden der GPCRs der Klasse B	7
Abbildung 6	NMR-Struktur des GLP-2 in TFE-H ₂ O	12
Abbildung 7	PET-Diagnostik mit [¹¹¹ In]Pentreoide	19
Abbildung 8	Grundbegriffe der Rezeptorpharmakologie	20
Abbildung 9	Validierung des Antikörpers gegen SCTR	47
Abbildung 10	Expression des SCTR in gesundem, humanem Gewebe	48/49
Abbildung 11	Expression des SCTR in humanen, dukalen Adenokarzinomen des Pankreas	51
Abbildung 12	Expression des SCTR in humanen Erkrankungen des Pankreas	52
Abbildung 13	Expression des SCTR in humanen Karzinomen des Ösophagus	52
Abbildung 14	Expression des SCTR in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren	54
Abbildung 15	Prinzip der β -Arrestin2-GFP Translokation	55
Abbildung 16	β -Arrestin-2 GFP Translokation	57
Abbildung 17	Substitutionen einzelner Aminosäuren des Secretin	60
Abbildung 18	Aktivierung des SCTR durch N- oder C-terminal verkürzte Secretin-Varianten	62
Abbildung 19	10/11mere	64
Abbildung 20	Secretin-IDCC	66
Abbildung 21	β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Messungen an aufgereinigten SCTR-Varianten	71
Abbildung 22	Internalisierung des Secretin-IDCC in BxPC-3-Zellen	73
Abbildung 23	Durchführung der β -Arrestin2-GFP Translokation mit dem GLP-2R	75
Abbildung 24	Aktivierung des GLP-2R durch Alanin-substituierte GLP-2-Varianten	76
Abbildung 25	Aktivierung des GLP-2R durch N-terminal substituierte GLP-2-Varianten	77
Abbildung 26	GLP-2-IDCC	82
Abbildung 27	β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Bildung durch aufgereinigte GLP-2-Varianten	87
Abbildung 28	Vergleich der Daten verschiedener <i>Alanin-Scans</i> des Secretin	94
Abbildung 29	Vergleich der <i>Alanin-Scans</i> von GLP-2 und GLP-2(10-33)	95
Tabelle 1	Übersicht der Expression des SCTR in Normal- und Tumorgewebe	15
Tabelle 2	Übersicht der Expression des GLP-2R in Normal- und Tumorgewebe	16
Tabelle 3	Ausgewählte Peptid-basierte Medikamente, die ihre Funktion an GPCRs ausüben	17

Tabelle 4	Übersicht der SCTR-Expression in Erkrankungen des Pankreas.....	51
Tabelle 5	Übersicht der SCTR-Expression in Tumoren des Ösophagus.....	53
Tabelle 6	Übersicht der SCTR-Expression in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren.....	53
Tabelle 7	Vergleich der β -Arrestin2-GFP Translokation mit cAMP-Messungen.....	58
Tabelle 8	Verwendete Kombinationen aus N- und C-terminalen verkürzten Secretin-Peptidvarianten.....	63
Tabelle 9	Antagonistische Aktivität N-terminal verkürzter Secretin-Varianten.....	67
Tabelle 10	Substitutionen an N-terminal verkürzten Secretin-Varianten.....	68
Tabelle 11	Bedeutung einzelner Aminosäuren in N-terminal verkürzten Secretin-Varianten.....	69
Tabelle 12	β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Messungen mit aufgereinigten Secretin-Varianten.....	70
Tabelle 13	Funktionelle Experimente mit BxPC-3- und Kyse410-Zellen.....	74
Tabelle 14	Multiple Substitutionen am N-Terminus des GLP-2.....	78
Tabelle 15	Aktivierung des GLP-2R durch C-terminal verkürzte GLP-2 Varianten.....	79
Tabelle 16	Peptidsequenzen zur „Endogenen-Agonisten-Theorie“ für den GLP-2R.....	80
Tabelle 17	Kontrollpeptide für die „Endogene-Agonisten-Theorie“.....	80
Tabelle 18	Antagonismus von N-terminal verkürzten GLP-2-Varianten am GLP-2R.....	83
Tabelle 19	Substitution der N-terminalen Aminosäure an verkürzten GLP-2-Varianten.....	84
Tabelle 20	Alanin-Substitutionen des GLP-2(10-33).....	85
Tabelle 21	β -Arrestin2-GFP Translokation und cAMP-Messungen mit aufgereinigten GLP-2-Varianten.....	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AT1aR	Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor
β -Arr2-GFP	β -Arrestin2-GFP
AS	Aminosäure
B2R	Bradykinin B2-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium-Sensing-Rezeptor
C-Terminus	Carboxyterminus
DAG	Diacylglycerol
DHCP	1,2-Dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphate
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase-IV
ECD	Extrazelluläre Domäne
EGFR	epidermal growth factor-Rezeptor
(p)ERK	(phosphorylierte) extracellular signal-regulated kinase
Eu-Chelate	Europium-Chelate
FCS	Fötales Kälberserum
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GCGR	Glucagonrezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GIP	Gastrointestinales inhibitorisches Peptid
GLP-1/2	Glucagon-like peptide-1/2
GLP-1/2R	Glucagon-like peptide-1/2-Rezeptor
GnRHR	Gonadotropin Releasing-Hormon-Rezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
GRK	GPCR-Kinase
GRPP	glicentin related pancreatic peptide
GSK3	Glykogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hanks Buffered Saline Solution
IDCC	N-[2-(iodoacetamido)ethyl]-7-diethylaminocoumarin-3-carboxamide
IGFI	insulin like growth factor I

Ins(1,4,5)P ₃	Inositol-1-4-5-triphosphat
kDa	Kilodalton
KGF	keratinocyte growth factor
LB	Lysogeny broth
LPA	lysophosphatic acid
M	Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
NAD(P)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
NET	neuroendokriner Tumor
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
N-Terminus	Aminoterminus
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions- Tomographie
pH	pondus Hydrogenii
PLCβ	Phospholipase Cβ
pM	Picomolar
POD	Peroxidase
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
(q)RT	(quantitative) Reverse Transkriptase
SCTR	Secretinrezeptor
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
t	Zeitpunkt
Tab	Tabelle
TFE	Trifluoroethanol
TMA	Tissue Microarray
TR-FRET	Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer
SSTR2/5	Somatostatin-Rezeptor Typ 2/5

UV	ultraviolett
V	Volt
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VIP1/2R	Vasoaktiver intestinaler Peptidrezeptor 1/2
WT	Wildtyp
°C	Grad Celsius

Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Natürliche / Proteinogene Aminosäuren		
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Nicht-natürliche / Nicht-proteinogene Aminosäuren		
4-Aminobutyric acid	Abu	
6-Aminohexanoic acid	Ahx	
2-Methylalanin	Aib	
2-(9-Fluorenylmethyloxy-carbonyl-aminooxy)-acetic acid	AOAc	
β -Alanin	β Ala	
Biphenylalanin	Bip	
β -Cyclohexyl-alanin	Cha	
Citrulline	Cit	
5-Hydroxy-L-norvaline	Hnv	
Homophenylalanin	Hphe	
Hydroxyprolin	Hyp	
3-(2-Naphthyl)alanin	2Nal	
Ornithin	Orn	
Penicillamin	Pen	

Veröffentlichungen

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Konferenzen präsentiert:

Vorträge:

- 1) **Anja Klussmeier**; High content analysis screening of a glucagon-like peptide 2 (GLP-2) library based on β -arrestin translocation; IN Cell User Meeting, 20.09.2009, Heidelberg, Deutschland
- 2) **Anja Klussmeier**; High content analysis screening of a glucagon-like peptide 2 (GLP-2) library based on β -arrestin translocation; VIB Science Club Imaging, 02.12.2009, Ghent, Belgien

Posterpräsentationen:

- 1) **Anja Klussmeier**, Sebastian Bandholtz, Bertram Wiedenmann, Carsten Grötzinger; Characterization of N-terminal substitutions in Glucagon-like peptide-2; Peptides Europe, 17.-18.09.2009, Berlin, Deutschland
- 2) **Anja Klussmeier**, Sebastian Bandholtz, Bertram Wiedenmann, Carsten Grötzinger; Characterization of N-terminal substitutions in Glucagon-like peptide-2; 6th Status Seminar Chemical Biology, 30.11.-01.12.2009, Frankfurt, Deutschland

Danksagung

Ich möchte mich bei **Herrn Prof. Dr. Wiedenmann** bedanken, an dessen Klinik die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Gleichzeitig geht mein Dank an **Frau Prof. Dr. Knaus** für ihre Bereitschaft zur Übernahme der gutachterlichen Tätigkeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an **Dr. Carsten Grötzinger** für das interessante Thema und für die intensive Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit. Danke für dein Vertrauen, die experimentellen Freiräume und die diversen „Spielzeuge“.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitglieder der **AG Tumortargeting**, die in diese Arbeit direkt oder indirekt involviert waren: **Sebastian Bandholtz, Bianca Bolewski, Cordula Dierkes, Ines Eichhorn, Yvonne Giesecke, Jan Lennart Körner, Annett Rexin, Dr. Céline Schäfer, Quirino Schefer, Claudia Schuldt, Dr. Petra Schulz** sowie alle Ehemaligen und studentischen Hilfskräfte. Mein spezieller Dank geht an:

Ines: Danke für deine großartige Hilfe bei den Histos !

Sebastian: Danke für sämtliche Diskussionen bezüglich meiner Peptide, für die Calcium-Imaging-, und HPLC-Messungen und die gute Kooperation unten im Screening-Lab !

Ein dickes Dankeschön geht außerdem an meine ehemaligen Hubi-Kolleginnen aus Marburg, **Lea Stevermann, Lena Wedeken** und **Conny Ringer**. Danke für die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Telefonate während der letzten Jahre. Und Danke, Danke, Danke für das kritische Lesen dieser Arbeit während ihrer Entstehung, ihr habt mir damit sehr geholfen !

Last but not least möchte ich noch bei allen „Nicht-Wissenschaftlern“ bedanken, die dafür gesorgt haben, dass der passende (sportliche) Ausgleich besteht:

Eva: Danke für die vielen Stunden deiner Zeit, in denen du dich meinen Wissenschaftler-Daseins-Problemen gewidmet hast / widmen musstest.

Alex: Danke für deine motivierenden Worte in Warnemünde, sie kamen genau richtig !

Alex, Claudia, Erica, Janine, Silke,...: Danke für Power, Action, Quatschrunden und diverse geteilte Muskelkater !

Das letzte zu verteilende Dankeschön geht an **meine Eltern**. Danke, dass ich mich bei meinen Plänen und Wünschen stets auf eure Unterstützung verlassen konnte !

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Berlin, den 30.05.2011

(Anja Klußmeier)