



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Entwicklung einer enzymatischen Methode für die in-vitro
Umsetzung von 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA zu 6-[¹⁸F]Fluoro-
Dopamin mit Aufreinigung über Festphasenextraktion und
anschließender HPLC-Qualitätskontrolle“

verfasst von / submitted by

Irene Klag

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

O. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Danksagung

Ich bedanke mich bei O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für die Möglichkeit die Diplomarbeit am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie durchführen zu können.

Danken möchte ich Prof. Mag. Dr. Markus Mitterhauser, der durch seine Vorlesungen mein Interesse für das Gebiet der Radiopharmazie geweckt hat und mir ermöglicht hat, den praktischen Teil meiner Diplomarbeit in der Abteilung für Nuklearmedizin des AKH Wien durchzuführen. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich auch Univ.-Prof. Dr. Marcus Hacker und Assoc.-Prof. Mag. Dr. Wolfgang Wadsak.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Mag. Dr. Lukas Nics für das interessante Thema, die kompetente Anleitung und Unterstützung und die sehr lehrreiche Zeit.

Ich möchte allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken, da mir jeder auf die eine oder andere Art geholfen hat.

Danke an Britta, Stefanie und Marko, die mir den Einstieg sehr erleichtert und mir den Laboralltag stets verschönert haben.

Ich danke Tanja, die sich mit mir durch dieses Studium gekämpft hat und mir in so vielerlei Hinsicht geholfen und mich am Aufgeben gehindert hat. Danke an Denise, Michael, Judith und Stefan, die mich ebenso auf unterschiedlichste Weise gestärkt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium durch ihre großzügige Unterstützung und Motivation ermöglicht haben und immer bestrebt sind, meinen Horizont zu erweitern.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Enzyme	1
1.1.1	Enzymkinetik.....	2
1.1.2	Coenzym Vitamin B ₆	3
1.1.3	Aminosäure-Decarboxylasen.....	4
1.2	Rekombinant hergestellte Proteine.....	7
1.3	Dopamin	8
1.3.1	Biosynthese	8
1.3.2	Wirkung	9
1.4	Radioaktivität.....	10
1.4.1	Herstellung radioaktiver Nuklide	11
1.5	Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC)	13
2	Aufgabenstellung.....	14
3	Experimenteller Teil.....	15
3.1	Reagenzien	15
3.2	Geräte.....	17
3.3	Methoden.....	19
3.3.1	Vortests.....	19
3.3.2	Vorbereitung der Enzyme.....	22
3.3.3	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	23
3.3.4	Enzymreaktion.....	23
3.3.5	Isolierung und Aufreinigung von 6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin	27
3.3.6	Qualitätskontrolle.....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Vortests.....	29
4.1.1	Absorptionsmaximum von 6-Fluoro-L-DOPA und Dopamin.....	29
4.1.2	Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA, Dopamin und Vitamin B ₆	29
4.1.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymfunktion.....	31
4.2	Qualitative Enzymreaktion	32
4.2.1	DOPA-Decarboxylase	32
4.2.2	Histidindecarboxylase.....	36
4.2.3	Tyrosindecarboxylase	37
4.3	Quantitative Enzymreaktion.....	39

4.3.1	Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an Tyrosindecaboxylase	39
4.3.2	Enzymversuche mit verschiedenen Zugaben an 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA.....	41
4.4	Isolierung, Aufreinigung und Qualitätskontrolle	42
5	Diskussion.....	44
5.1	Allgemein.....	44
5.2	DOPA-Decarboxylase	46
5.3	Histidindecaboxylase	47
5.4	Tyrosindecaboxylase	47
6	Schlussfolgerung.....	47
7	Zusammenfassung.....	48
8	Abstract	49
9	Literatur	50
10	Abkürzungen	55
11	Abbildungen	56
12	Chromatogramme	56
13	Diagramme	57
14	Tabellen	58
15	Anhang	60
15.1	Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA, Dopamin und Vitamin B ₆	60
15.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymfunktion.....	63
15.3	Enzymreaktion.....	66
15.3.1	DOPA-Decarboxylase	66
15.3.2	Histidin-Decarboxylase	69
15.3.3	Tyrosindecaboxylase	70
15.4	Isolierung, Aufreinigung und Qualitätskontrolle	77

1 Einleitung

1.1 Enzyme

Enzyme sind Proteine, die chemische Reaktionen katalysieren indem sie Substrate in ihrem aktiven Zentrum binden und zu Produkten umsetzen. Die aktiven Zentren sind mit Aminosäureresten ausgestattet, die eine geeignete räumliche Anordnung zur Bindung und Umsetzung des Substrats aufweisen und die Spezifität des Enzyms bestimmen. Einige Enzyme benötigen, um optimal funktionieren zu können, Coenzyme. [1] Enzyme, an die ein Coenzym gebunden ist, bezeichnet man als Holoenzyme, liegen sie ohne Coenzym vor nennt man sie Apoenzyme. [2]

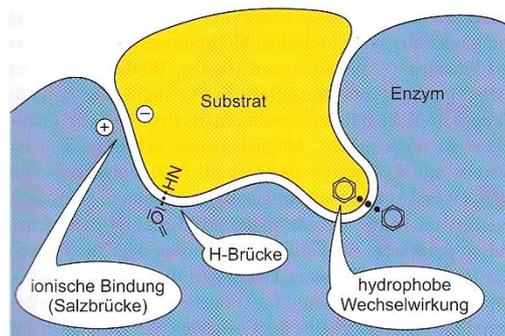


Abbildung 1: Substratbindungsstelle eines Enzyms (schematisch) [1]

Die Einteilung der Enzyme erfolgt nach der Art der Reaktion, die sie katalysieren. Die Hauptklassen umfassen Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen.

Ohne die Hilfe von Enzymen würden verschiedene biochemische Reaktionen gar nicht oder nur sehr langsam ablaufen. Um ein Substrat in ein Produkt umzusetzen muss eine energetische Schwelle überwunden werden, die als freie Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger bezeichnet wird. Sie stellt die Differenz zwischen freier Energie des Edukts und freier Energie des Übergangszustands dar.

Enzyme beschleunigen Reaktionen, indem sie die Aktivierungsenergie senken und den Übergangszustand stabilisieren. [1]

Die Enzymaktivität hängt von pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Reaktionsmediums ab.

Die katalytischen Zentren von Enzymen besitzen zum Beispiel Carboxyl- oder Aminogruppen die je nach pH-Wert protoniert oder deprotoniert vorliegen und so zur Aktivität oder Inaktivität des Enzyms beitragen. Jedes Enzym besitzt ein pH-Optimum, das für Enzymtests gewählt

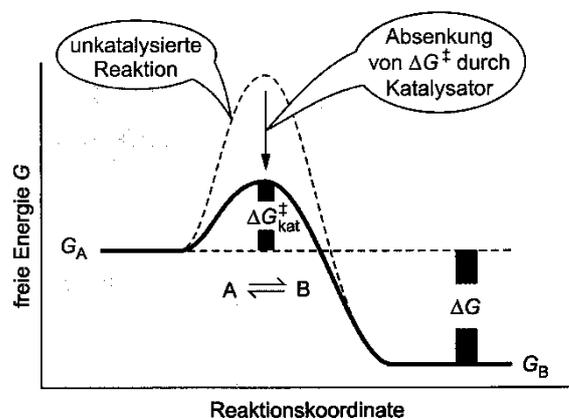


Abbildung 2: Vergleich unkatalysierte und katalysierte Reaktion [1]

werden sollte. Das Enzym sollte einer Vorinkubation beim idealen pH-Wert unterzogen werden, um seine volle Aktivität beim Zeitpunkt der Zugabe des Substrats zu gewährleisten. Viele Enzyme besitzen ein pH-Optimum von 7,5, das dem physiologischen Milieu entspricht. Enzyme können durch zu großes Abweichen vom Optimum oder durch starke pH-Wert-Schwankungen in ihrer Funktion stark beeinträchtigt werden.

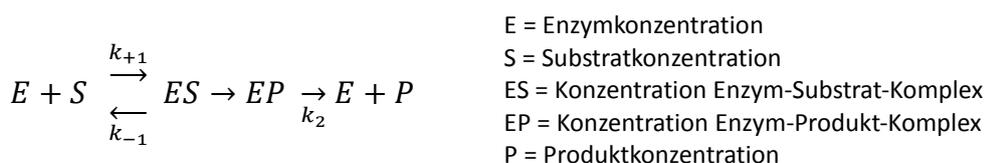
Die Temperatur des Reaktionsmilieus spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle. Mit steigender Temperatur steigt die Teilchenbeweglichkeit und damit die Wahrscheinlichkeit der Zusammenstöße der Reaktanden. Die optimale Temperatur vieler Enzyme liegt bei physiologischen 37°C. Zu hohe Temperaturen können zur Inaktivierung oder Zerstörung des Enzyms führen.

Sowohl sehr niedrige als auch sehr hohe Ionenstärken können die Aktivität von Enzymen beeinflussen, dabei spielt die Art der Ionen ebenfalls eine Rolle. [2]

1.1.1 Enzymkinetik

Die Enzymkinetik beschreibt die Geschwindigkeit mit der ein Enzym mit definierter Konzentration eine bestimmte Menge an Substrat zum Produkt umsetzt. Eine Möglichkeit der Darstellung ist die Michaelis-Menten-Gleichung.

Die Reaktion verläuft über die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES). Dabei werden jeweils die Bildung des Komplexes und der Zerfall des Komplexes zu Enzym und Produkt durch Geschwindigkeitskonstanten charakterisiert.



Geschwindigkeitskonstanten:

k_{+1} = Bildung von ES

k_{-1} = Zerfall von ES

k_2 = Bildung von P und freiem E

Die Geschwindigkeit der Produktbildung hängt demnach auch von der Geschwindigkeit der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ab. Zu Beginn der Reaktion ist noch viel Substrat vorhanden und Entstehung und Verbrauch des Enzym-Substrat-Komplexes stehen im Gleichgewicht. Sobald die Substratkonzentration deutlich abnimmt und demnach die

Produktkonzentration hoch ist, nimmt auch die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ab.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{(K_M + [S])}$$

V_0 = Anfangsgeschwindigkeit
 S = Substratkonzentration
 V_{max} = Maximale Geschwindigkeit der Reaktion
 K_M = Michaelis Menten Konstante

Die maximale Geschwindigkeit ist erreicht, wenn das gesamte Enzym als Enzym-Substrat-Komplex vorliegt. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M gibt die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte des Enzyms gesättigt ist, also als ES vorliegt. [1, 3]

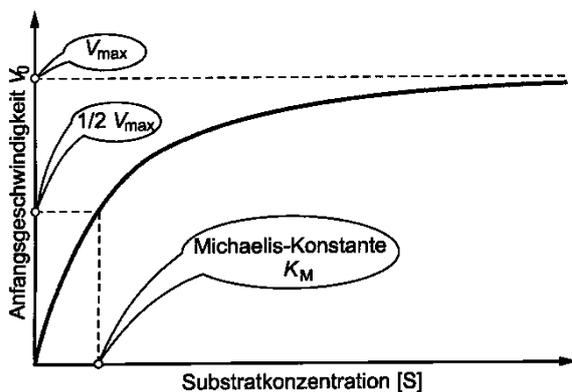


Abbildung 3: Sättigungskurve der Michaelis-Menten-Kinetik [1]

1.1.2 Coenzym Vitamin B₆

Die aktive Form des Vitamin B₆ (Pyridoxin), das 5'-Pyridoxalphosphat (PLP), spielt eine wichtige Rolle als Coenzym im Aminosäurestoffwechsel, unter anderem bei der Decarboxylierung von aromatischen Aminosäuren. [4]

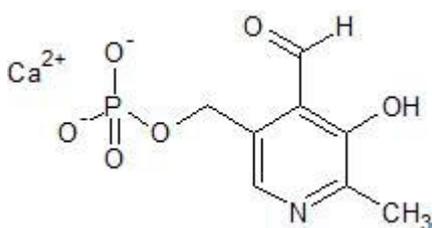


Abbildung 4: Pyridoxalphosphat

Die Aldehydgruppe des PLP verbindet sich mit der Aminogruppe einer Aminosäure, bei PLP-abhängigen Enzymen ist das die ϵ -Aminogruppe des Lysins, zu einem Aldimin (Schiff'sche Base). [2, 4, 5]

1.1.3 Aminosäure-Decarboxylasen

Sie gehören zur Klasse der Lyasen und sind PLP-abhängigen Enzyme. Sie setzen Aminosäuren zu Aminen um, indem sie die Abspaltung von Kohlenstoffdioxid katalysieren.

DOPA-Decarboxylase (DDC)

Die DDC, auch Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) oder Hydroxytryptophan-Decarboxylase genannt, ist ein Enzym das die Decarboxylierung der L-Aminosäuren

- 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) zu Dopamin,
- 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) zu Serotonin,
- 3,4-Dihydroxyphenylserin zu Noradrenalin,
- Tyrosin zu Tyramin,
- Phenylalanin zu Phenethylamin,
- Histidin zu Histamin und
- Tryptophan zu Tryptamin

katalysiert. [6] Die DDC ist demnach ein unspezifisches Enzym und kann verschiedene Substrate zu Produkten umsetzen.

Sie besteht aus 486 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 104 kDa. [5]

Histidin-Decarboxylase (HDC)

L-Histidin wird neben der DDC auch durch die HDC decarboxyliert. Die HDC weist ein ähnliches katalytisches Zentrum und einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie die DDC auf, ist jedoch viel spezifischer. [7] Das heißt die Wahrscheinlichkeit ist gering, dass die HDC fähig ist andere Substrate außer L-Histidin umzusetzen, da nur dieses perfekt in das aktive Zentrum des Enzyms passt und umgesetzt werden kann.

Die HDC besteht aus 662 Aminosäuren [8] und besitzt eine Masse von 74 kDa. [9]

Tyrosin-Decarboxylase (TDC)

Tyrosindecaboxylasen findet man zum Beispiel in Bakterien, wie etwa Streptococcus faecalis, jedoch nicht in Säugetierorganismen [15].

Die TDC decarboxyliert L-Tyrosin und kann auch L-Phenylalanin und L-Dihydroxyphenylalanin umsetzen, jedoch bei einer langsameren Rate als L-Tyrosin. [10, 11, 12, 13, 14] Die Stellung der phenolischen Hydroxylgruppen spielt dabei eine entscheidende

Rolle bei der Bindung zwischen Enzym und Substrat. So wird 3,4-DOPA bei einer langsameren Rate als Tyrosin decarboxyliert. 2,6-DOPA wird vom Enzym nicht umgesetzt, 2,5- und 3,6-DOPA werden nur langsam decarboxyliert. [15, 39]

Nach Connil et al. [16] besitzt die TDC eine Masse von 150 kDa.

Reaktionsmechanismus der Decarboxylierung

Nachdem das Coenzym PLP an das Apoenzym über die Bildung eines internen Aldimins gebunden hat erfolgt die Bindung zwischen PLP und der Aminogruppe des Substrates über eine Schiff'sche Base, es bildet sich ein externes Aldimin. Anschließend formt sich ein chinoides Zwischenprodukt, bei dessen Bildung CO_2 freigesetzt wird. Tyr332 dient vermutlich als Protonendonator. Im nächsten Schritt bildet sich ein externes Aldimin zwischen PLP und Produkt. Durch die erneute Reaktion zum internen Aldimin wird das Produkt freigesetzt und das Enzym regeneriert. [5]

1.2 Rekombinant hergestellte Proteine

Proteine können zur Erforschung oder Verwendung für medizinische Zwecke aus Blut oder Organen isoliert werden. Probleme sind hier die Verfügbarkeit und die Gefahr der Verunreinigung mit Krankheitserregern. Die Lösung bietet die rekombinante Herstellung *in vitro*. Dazu werden ein Expressionsvektor, in den das entsprechende Gen des Proteins eingeschleust wird, und ein Wirtsorganismus benötigt, zudem ist eine Modulation der Proteine möglich. Verwendung finden dazu Bakterien-, Hefe-, Insekten- oder Säugerzellen. [17, 18]

Die Expression in Bakterienzellen, wie zum Beispiel in *Escherichia coli*, ist zwar kostengünstig und liefert hohe Ausbeuten, jedoch finden keine posttranslationalen Modifikationen, wie zum Beispiel Glykosylierungen oder die Bildung von Disulfidbrücken, statt. Folglich entspricht das Produkt nicht dem natürlich vorkommenden Protein, und das kann Grund für eine Herabsetzung bis hin zum Verlust seiner biologischen Aktivität sein. [18]

Durch die Verwendung von Hefezellen als Wirtsorganismen, wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae*, sind teilweise posttranslationale Modifikationen möglich, jedoch erfolgen zum Beispiel die Glykosylierungen nicht korrekt. [18]

Ebenfalls kostengünstig und einfach können Proteine in Insektenzellen hergestellt werden. Eine Methode behilft sich hier rekombinanter Baculoviren als Vektoren und zum Beispiel Sf9- oder Sf21-Zelllinien aus Puppenovarzellen von *Spodoptera frugiperda*. [18]

Zur Herstellung in Säugerzellen werden Tumorzellen oder immortalisierte Zellen, wie zum Beispiel CHO-Zellen (chinese hamster ovary), verwendet. Es werden Produkte mit biologischer Aktivität erhalten, die Glykosylierungsmuster können jedoch abweichen. Nachteile sind die höheren Kosten, der größere Arbeitsaufwand und die geringeren Ausbeuten. [18]

Rekombinant hergestellte Proteine können anschließend über zum Beispiel Affinitätschromatografie gereinigt werden. Dazu werden die Proteine mit einem

sogenannten Tag versehen. Tags sind Peptide mit bekannter Aminosäuresequenz, wie zum Beispiel das His-Tag, welches aus 6 bis 12 Histidinen zusammengesetzt ist [17], oder das T7-Tag mit 11 Aminosäuren (MASMTGGQQMG) [19].

1.3 Dopamin

1.3.1 Biosynthese

Dopamin, auch Prolactostatin oder prolactin-inhibierendes Hormon genannt, ist ein Neurotransmitter und gehört zur Klasse der Katecholamine, der auch Adrenalin und Noradrenalin angehören. [1, 20]

In Nervenzellen wird durch Hydroxylierung von Tyrosin durch die Tyrosin-Hydroxylase Dihydroxyphenylalanin (DOPA) gebildet. Mit Hilfe der DOPA-Decarboxylase wird DOPA zum Dopamin decarboxyliert. Aus Dopamin kann anschließend durch die Dopamin- β -Hydroxylase Noradrenalin gebildet werden, welches durch die Methyl-Transferase zum Adrenalin methyliert wird. Die Methylierung zum Adrenalin kann nur im Nebennierenmark und im zentralen Nervensystem erfolgen, nicht aber in sympathischen Synapsen. [1, 21, 22]

Dopamin wird in den Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert und durch Aktionspotentiale mittels Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt. Die Inaktivierung erfolgt durch Wiederaufnahme in die Präsynapse mittels Dopamintransporter wo es entweder wieder in Vesikeln gespeichert wird oder durch die Monoaminoxidase (MAO) und Aldehyddehydrogenase in Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) umgewandelt wird. DOPAC wird durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu Homovanillinsäure (HVA) abgebaut.

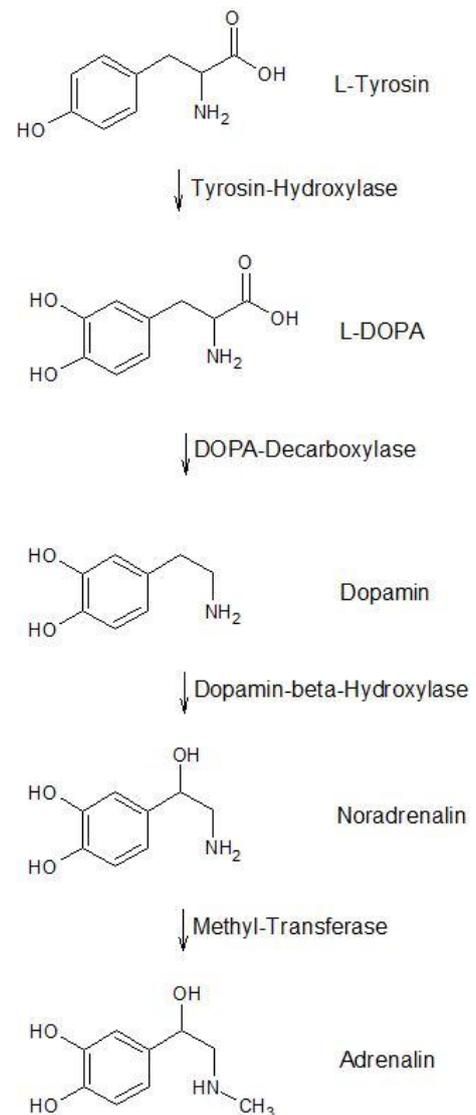


Abbildung 6: Biosynthese der Katecholamine

In Gliazellen aufgenommenes Dopamin wird durch COMT in Methoxytyramin (MT) und anschließend durch die MAO und Aldehyddehydrogenase in HVA umgewandelt.

DOPAC und HVA werden schlussendlich über die Nieren ausgeschieden. [23]

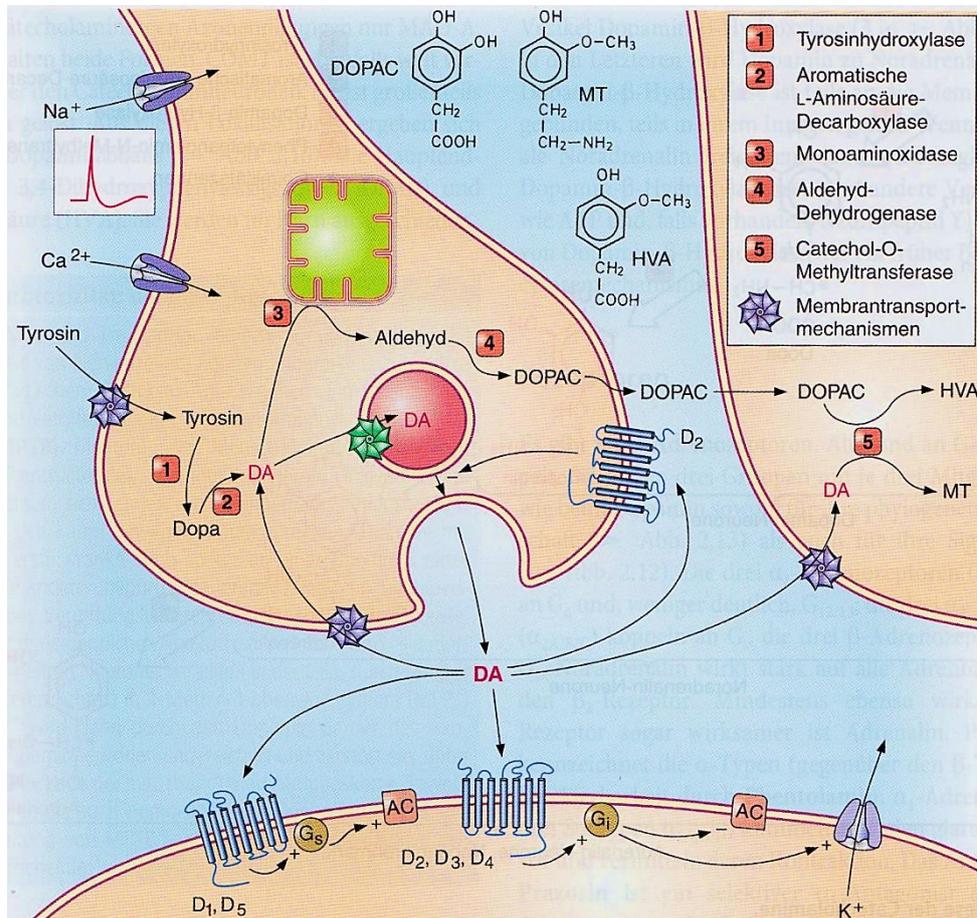


Abbildung 7: Synaptische Übertragung durch Dopamin (DA) [23]

1.3.2 Wirkung

Dopaminrezeptoren lassen sich in die D₁-Gruppe, mit den Subtypen D₁ und D₅, und die D₂-Gruppe, mit den Subtypen D₂-D₄ einteilen.

Sie befinden sich sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Peripherie, besonders in glatten Muskelzellen von Niere und Darm. Dopamin wirkt aber auch auf α - und β -Adrenozeptoren. [21, 23, 24]

Dosierungen zwischen 0,5 und 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ bewirken eine Vasodilatation von renalen und mesenterialen Blutgefäßen. Durch Bindung an D₁-Rezeptoren kommt es hier zu einer verstärkten Durchblutung und gesteigerten Ausscheidung von Natrium und Harn. Bindung

an D₂-Rezeptoren führt zu Übelkeit und Erbrechen (durch Bindung in der Area postrema) und verminderter Prolaktinfreisetzung (durch Bindung im Hypophysenvorderlappen). [21, 23, 24]

Bei 2,5-5 µg/kg/min kommt es zusätzlich zur Wirkung an β₁-Rezeptoren des Herzens und einem positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt. [21, 23, 24]

Über 5 µg/kg/min kommt eine Wirkung an vaskulären α-Adrenozeptoren hinzu, die zu einer Vasokonstriktion führt. [21, 23, 24]

Dopaminrezeptoren und Dopamintransporter findet man auch bei Thrombozyten. In Kombination mit ADP kann Dopamin zu einer Thrombozytenaggregation führen. [25, 26]

1.4 Radioaktivität

Radionuklide sind instabile Atomkerne, die sich bei ihrem Zerfall in stabile Atomkerne umwandeln. Dabei wird Energie in Form von ionisierender Strahlung frei. Die wichtigsten Zerfallsarten sind der Alpha-, Beta- und Gamma-Zerfall.

Beim Alpha-Zerfall emittiert das Nuklid einen Helium-4-Kern, auch Alphateilchen genannt, was zur Folge hat, dass sich die Massenzahl um vier und die Kernladungszahl um zwei verringert. Alphateilchen besitzen eine Geschwindigkeit von zirka 10% der Lichtgeschwindigkeit. Ihre Reichweite ist gering und bereits ein dickes Blatt Papier reicht aus um sie abzuschirmen.

Der Beta-Zerfall wird unterteilt in den β⁻- und den β⁺-Zerfall. Beim β⁻-Zerfall kommt es zur Umwandlung von einem Neutron in ein Proton unter Emission eines Elektrons und eines Antineutrinos, die Ordnungszahl erhöht sich um eins. Beim β⁺-Zerfall wandelt sich ein Proton in ein Neutron unter Emission eines Positrons und eines Neutrinos um, die Ordnungszahl erniedrigt sich um eins. Die Reichweite der Betateilchen kann in Luft ein paar Meter betragen.

Ein Gamma-Zerfall ist eigentlich kein Zerfall, sondern die Emission eines Photons, die Ordnungs- und Massenzahl des Nuklids bleiben gleich. Diese Reaktion kann nach einem

Alpha- oder Beta-Zerfall stattfinden, da sich der Kern danach in einem angeregten Zustand befindet. Gamma-Strahlung erreicht Lichtgeschwindigkeit. [27]

Den Strahlenschutz betreffend sind als wichtigste Parameter Abstand, Aufenthaltsdauer und Abschirmung zu nennen. Verdoppelt man den Abstand zur Strahlungsquelle verringert sich die Strahlungsintensität auf ein Viertel und die Dauer der Bestrahlung ist proportional zur Strahlendosis. Das zur Abschirmung gewählte Material und seine Dicke beziehen sich auf die Energie der Teilchen.

Betastrahlen werden je nach Aktivität mit Aluminium, Kunststoff (zum Beispiel Plexiglas) oder Blei abgeschirmt. Strahlenquellen mit hoher Energie werden optimal durch eine Kombination aus Kunststoff, der die Betastrahlung absorbiert, und Blei, das die Bremsstrahlung schwächt, abgeschirmt.

Zur Abschirmung der Gammastrahlung kann Blei, Beton, Eisen oder auch Wasser verwendet werden. [41]

Die Einheit der Radioaktivität ist Becquerel (Bq) und gibt die Anzahl der Zerfälle pro Sekunde an.

Radioaktivität findet Anwendung in der radiologischen- und nuklearmedizinischen diagnostischen Bildgebung, wie Röntgen, Computer Tomographie (CT), Positronen-Emissions Tomographie (PET), Single Photon Emission Computed Tomographie (SPECT), den Hybridverfahren PET/CT und PET/MRT (Magnetresonanz Tomographie) aber auch in der Therapie.

Die dabei eingesetzten Radiopharmaka sind Arzneimittel, die entweder nur aus einer radioaktiven Substanz oder aus einem Molekül, an das ein Radionuklid gebunden ist, bestehen. [27]

1.4.1 Herstellung radioaktiver Nuklide

Allgemein

Die Herstellung von Radionukliden erfolgt im Kernreaktor, Zyklotron (Teilchenbeschleuniger) oder Generator. In Kernreaktoren werden zum Beispiel Iod-125, Iod-131 und Kohlenstoff-14 hergestellt. Im Zyklotron hergestellte Radionuklide sind zum Beispiel Kohlenstoff-11 und Fluor-18. In Generatoren wird das Radionuklid erst kurz vor

seiner Verwendung von seinem Mutternuklid abgetrennt und findet Verwendung bei Radionukliden mit kurzer Halbwertszeit. Ein häufig verwendeter Generator ist der Technetium-99m-Generator. [42]

Fluor-18

Die Herstellung des Fluor-18 erfolgt in einem Zyklotron. Dort wird mit Sauerstoff-18 angereichertes Wasser mit energiereichen Protonen beschossen. Sauerstoff-18 wird durch die Aufnahme eines Protons und Abgabe eines Neutrons in Fluor-18 umgewandelt. In wässrigem Milieu liegt es als Fluorid-Ion ($^{18}\text{F}^-$) vor.

Fluor-18 kann auch als $^{18}\text{F}-\text{F}_2$ aus Neon-20 hergestellt werden. Dabei werden mit Neongas gefüllte Nickel-Targets mit Deuteronen ($^2\text{H}^+$) beschossen.

Fluor-18 unterliegt dem β^+ -Zerfall und zerfällt zu Sauerstoff-18. Die Halbwertszeit beträgt 109,7 Minuten.

Fluor-18 kann zur Markierung organischer Moleküle verwendet werden. Die Reaktion wird entweder als nukleophile Substitution mit $^{18}\text{F}^-$ oder als elektrophile Addition mit $^{18}\text{F}-\text{F}_2$ durchgeführt.

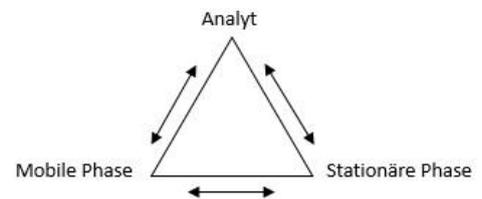
Verwendung findet Fluor-18 zum Beispiel als ^{18}F -FDG (2- ^{18}F Fluor-2-desoxy-D-glucose) zur Tumordiagnostik oder als ^{18}F Fluoro-L-DOPA (6- ^{18}F Fluor-L-dihydroxyphenylalanin) zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen und endokriner Tumoren. Bildgebendes Verfahren ist dabei die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Der Radiotracer wird intravenös verabreicht und verstoffwechselt. ^{18}F -FDG wird bevorzugt von Zellen mit erhöhtem Stoffwechsel aufgenommen, wie es bei Tumorzellen der Fall ist. ^{18}F Fluoro-L-DOPA gelangt durch die Blut-Hirn-Schranke und wird in dopaminergen Neuronen decarboxyliert und gespeichert.

Das Radionuklid emittiert ein Positron, bei dessen Reaktion mit einem Elektron, der sogenannten Annihilation, zwei hochenergetische Photonen ausgesandt werden. Diese Photonen werden mittels PET detektiert und Schnittbilder der betreffenden Zielgewebe erstellt. [8, 28, 29]

1.5 Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC)

Die HPLC ist eine Methode zur Trennung und Analyse von Substanzen. Ein HPLC-System besteht im Wesentlichen aus Laufmittel, Entgaser, Pumpe, Injektionsventil, Trennsäule, Detektor und einem Computer mit einer Software zur Auswertung.

Die zu analysierenden Substanzen werden mit hohem Druck mit Hilfe einer Pumpe und des Laufmittels, der mobilen Phase, durch eine Säule gepumpt, welche die stationäre Phase enthält. Dabei ist das Zusammenspiel



von mobiler und stationärer Phase und Analyt von grundlegender Bedeutung. Der Analyt wird mit Hilfe der mobilen Phase transportiert und gelangt zur stationären Phase mit der er Wechselwirkungen eingeht, die seine Retentionszeit bedingen. Die Retentionszeit ist jene Zeit, die eine Substanz zum Durchlaufen des gesamte HPLC-Systems inklusive der Säule benötigt, und wird auch durch die mobile Phase beeinflusst. Die Wahl des Laufmittels richtet sich neben vielen anderen Eigenschaften auch nach der elutropen Reihe, die seine Elutionskraft, also die Fähigkeit eine Substanz mitzutransportieren, in Bezug auf eine bestimmte stationäre Phase angibt.

Um die zu analysierende und gelöste Substanz in das HPLC-System einzubringen wird sie manuell oder über ein automatisiertes Injektionssystem in eine Spritze aufgezogen und damit eine Loop mit definiertem Volumen, die am Injektionsventil angebracht ist, beladen. Bei der manuellen Injektion besitzt das Injektionsventil die Positionen „Load“, in der die Loop beladen wird und kein Laufmitteldurchfluss stattfindet, und „Inject“, bei der die Flüssigkeit in der Loop mithilfe des Laufmittels Richtung Trennsäule transportiert wird.

Die Detektion mittels zum Beispiel UV/VIS-Detektor erfolgt dadurch, dass die Substanzen durch eine Durchflusszelle transportiert werden und mit monochromatischem Licht der gewählten Wellenlänge bestrahlt werden, wobei als UV-Lichtquelle eine Deuterium- und als VIS-Lichtquelle eine Wolframlampe dienen. Die vorhandenen Substanzen absorbieren einen Teil des Lichtes, welches dadurch in reduzierter Intensität auf eine Photodiode trifft. Dieses physikalische Signal wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und kann danach über einen Integrator dementsprechend ausgewertet werden.

Ein Radiodetektor beinhaltet in vielen Fällen einen Natriumjodidkristall (Szintillator), der durch ionisierende Strahlung angeregt wird, und beim Zurückkehren in seinen

Normalzustand Photonen aussendet. Diese werden in weiterer Folge in ein elektrisches Signal umgewandelt. [30, 31, 32, 33]

2 Aufgabenstellung

6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA findet als Radiotracer bereits seit langem in der Routine zur Diagnose von Morbus Parkinson und endokriner Tumore Anwendung, doch neue Einsatzbereiche könnten erschlossen werden. Als Anwendungsmöglichkeit wurde bereits eine Aufnahme von 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA in Thrombozyten evaluiert. Allerdings besitzen Thrombozyten keine Transporter, beziehungsweise andere Diffusionsmöglichkeiten für DOPA, was schlussendlich zu einer wissenschaftlichen Sackgasse führte. Als logische Konsequenz wäre Dopamin, wofür Thrombozyten Transporter besitzen, als Radiotracer heranzuziehen.

Die Umwandlung von DOPA zu Dopamin erfolgt biochemisch mit Hilfe der DOPA-Decarboxylase. Das bedeutet, dass über diesen biochemischen Weg auch eine mögliche Radiosynthese von 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin umgangen werden könnte, um dieses biogene Amin zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, besagte Reaktion mit 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA *in vitro* durchzuführen, um anschließend radioaktiv markiertes Dopamin zu erhalten. Ziel war es, ein Enzym zu finden, das effizient 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA in 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin umwandelt, da die enzymatische Methode mit weniger Aufwand durchzuführen wäre als die Markierung von 6-Fluoro-Dopamin mit Fluor-18. Insgesamt wurden fünf verschiedene Enzyme verwendet und jenes mit der besten katalytischen Fähigkeit besagte Umsetzung zu steuern ausgewählt, um weitere Versuche durchzuführen.

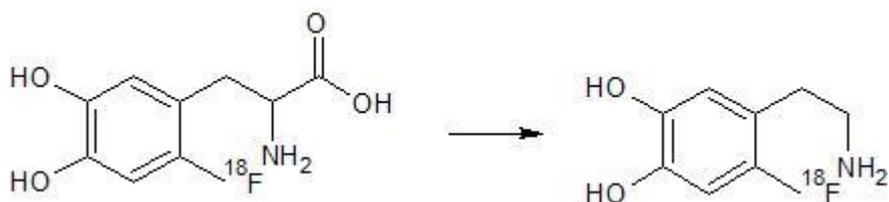


Abbildung 8: Reaktion 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA zu 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin

3 Experimenteller Teil

3.1 Reagenzien

6-[¹⁸ F]Fluoro-L-dihydroxyphenylalanin IASON GmbH (Graz-Seiersberg, AT)	Konzentrat zur Herstellung einer Injektionslösung; 1 ml enthält 0,3 GBq zum Zeitpunkt der Kalibrierung; Essigsäure 100%, Wasser für Injektionszwecke Zulassungsnummer: 4-00032
6-Fluoro-L-DOPA hydrochloride ABX (Radeberg, DE)	> 95% CAS 144334-59-8
Acetonitril Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	≥ 99,9% CAS 75-05-8
Aqua destillata	Laborleitungswasser
Dikaliumhydrogenphosphat Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	≥ 99,0% CAS 16788-57-1
DOPA-Decarboxylase Novus Biologicals (Abingdon, UK)	53 kDa; 0,1 mg; Lyophilisat Katalognr. NBP1-56918PEP
DOPA-Decarboxylase R&D Systems (Minneapolis, USA)	55 kDa; 0,01 mg; 0,2 µm gefilterte Lösung in 25 mM MES, 150 mM NaCl und 5 mM DTT pH 6,5; 0,513 mg/ml Aus Spodoptera frugiperda, Sf 21 (baculovirus)-derived Katalognr. 3564-DC-010
DOPA-Decarboxylase ATGen (Seongnam, KR)	56,4 kDa; in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0) mit 2 mM DTT; 1 mg/ml; aus E.coli Katalognr. ATGP0267
Dopamin hydrochlorid Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	CAS 62-31-7
Essigsäure Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	99,9 – 100,5% CAS 64-19-7
Ethanol Merck (Darmstadt, DE)	≥ 99,2% (m/m), ≥ 99,5% (V/V) CAS 64-17-5

HEPES Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	≥ 99,5% CAS 7365-45-9
Histidin-Decarboxylase Cloud-Clone Corp. (Houston, USA)	27,5 kDa; 0,01 mg; Lyophilisat in 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0, mit 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01% sarcosyl, 5% trehalose, und Konservierungsstoff; aus E. coli Katalognr. RPG476Hu01
L-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)alanine Avocado Research Chemicals Limited (London, UK)	CAS 59-92-7
Methanol Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	≥ 99,9% CAS 67-56-1
Natrium-1-heptasulfonat Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	CAS 22767-50-6
Natriumchlorid Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	≥ 99,0% CAS 7647-14-5
Natriumdihydrogenphosphat Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	≥ 99,0% CAS 7558-80-7
Natriumhydroxid Merck (Darmstadt, DE)	≥ 99,0%, Pellets CAS 1310-73-2
Ortho-Phosphorsäure Merck (Darmstadt, DE)	85,0 - 85,7% CAS 7664-38-2
PBS (Phosphate buffered saline) Morphisto (Frankfurt am Main, DE)	pH 7,4 10 x Konzentrat
Pyridoxal 5'-phosphat hydrate Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	≥ 98,0% CAS 853645-22-4
Tyrosin-Decarboxylase Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)	Streptococcus faecalis; Aceton-getrocknetes Pulver 33 mg; 0,3 units/mg CAS 9002-09-9

3.2 Geräte

Inkubator Eppendorf (Hamburg, DE)	Thermomixer compact
Mikroreaktionsgefäße Eppendorf (Hamburg, DE)	1,5 ml Safe Lock Tubes
pH-Meter WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim in Oberbayern, DE)	537792
Pipetten Eppendorf (Hamburg, DE)	
Sep-Pak Light Waters Corporation (Milford, USA)	130 mg Sorbens pro Kartusche, Partikelgröße 55-105 µm
Sep-Pak Plus Waters Corporation (Milford, USA)	360 mg Sorbens pro Kartusche, Partikelgröße 55-105 µm
Sterilfilter Merck (Darmstadt, DE)	Millex-GV, 0,22 µm, PVDF, 33 mm, durch Gamma-Bestrahlung sterilisiert Katalognr. SLGV033RS
Vortexmischer Labinco (Breda, NL)	L 24
Waage Mettler Mettler-Toledo (Columbus, USA)	PJ300
Waage Sartorius Sartorius Mechatronics Austria GmbH (Wien, AT)	Supermicro S4
Zentrifuge Hettich Hettich Lab Technology (Tuttlingen, DE)	Universal 30 RF
Dosiskalibrator Veenstra Instruments (Joure, NL)	VD-404
Gefrierschrank Elektra Bregenz (Wien, AT)	-20°C
Gefrierschrank Eppendorf (Hamburg, DE)	-80 °C U725 Innova

HPLC Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, USA)	
Injektion	Hamilton 50 µl Spritze; Loop 20 µl 1 ml Spritze; Loop 500 µl
Pumpe	Gradient
UV/VIS-Detektor	Variabler Wellenlängendetektor (VWD)
Radiodetektor Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Straubenhardt, DE)	GABI Star
Software Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Straubenhardt, DE)	GINA Star, Version 5.9
Trennsäule Prodigy Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, DE)	5 u Phenyl-3 (PH-3), 100 Å, 250 x 4,6 mm
Trennsäule Obelisc N Vorsäule Obelisc N SIELC Technologies (Wheeling, USA)	5 u, 100 Å, 150 x 4,6 mm 5 u, 100 Å, G x 4,6 mm
HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity (Santa Clara, USA)	
Injektion	Hamilton 50 µl Spritze; Loop 5 µl
Pumpe	Gradient
UV/VIS-Detektor	Variabler Wellenlängendetektor (VWD)
Software Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Straubenhardt, DE)	GINA Star, Version 5.9

3.3 Methoden

3.3.1 Vortests

Absorptionsmaximum von 6-Fluoro-L-DOPA und Dopamin

Das Absorptionsmaximum einer Substanz ist jene Wellenlänge, bei der eine Substanz am meisten Licht absorbiert. Somit ist die Sensitivität des Detektors für die Substanz bei dieser Wellenlänge am größten.

Zur Ermittlung des Absorptionsmaximums von 6-Fluoro-L-DOPA und Dopamin wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus Acetonitril und Puffer im Verhältnis 1:10 verwendet, welches dem später verwendeten Laufmittel entsprach. Die Stammlösungen wurden 1:20 verdünnt und die Absorption bei Wellenlängen von 195 bis 350 nm untersucht. Dafür wurde das HPLC System Agilent 1260 Infinity verwendet, da dort der Detektor vier Wellenlängen parallel messen konnte.

Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA, Dopamin und Vitamin B₆

6-Fluoro-L-DOPA und Dopamin wurden bei Raumtemperatur in Acetonitril:Puffer (1:10) und bei 37°C in Puffer getestet. Vitamin B₆ wurde bei 37°C in Puffer getestet.

Der Puffer für die Untersuchung bei Raumtemperatur bestand aus 25 mM NaH₂PO₄ und 10 mM Heptasulfonat bei pH 3,5.

Für die Untersuchungen bei 37°C wurde ein Puffer bestehend aus 50 mM HEPES und 100 mM NaCl bei pH 7,2 verwendet.

Die Substanzen wurden gelöst und entweder bei Raumtemperatur belassen oder bei 37°C inkubiert, und zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquote entnommen und analysiert.

Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymfunktion

Der pH-Wert des Reaktionsmediums ist entscheidend für die Reaktivität von Enzymen. So besitzt jedes Enzym ein eigenes pH-Optimum. Liegt der pH-Wert des Milieus unter oder ober diesem Wert, läuft die Reaktion langsamer oder gar nicht ab.

Um pH-Wert Schwankungen und Einflüsse durch Zugabe der 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA-Lösung von IASON auszuschließen, wurde eine essigsaure Lösung hergestellt, mit dem pH-Wert der 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA-Lösung. Für die essigsaure Lösung wurden 100 ml H₂O mit 0,1 ml Essigsäure gemischt und mit NaOH auf pH 5,8 eingestellt.

Es wurde der Puffer für die Versuche mit den DOPA-Decarboxylasen und der Puffer für die Versuche mit der Tyrosindecarboxylase getestet. Es wurden unterschiedliche Puffer verwendet, da sich die Raumstruktur und die Ladung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum der Enzyme unterscheiden und vom pH-Wert abhängen.

	Volumen (µl)		Volumen (µl)
DOPA-Decarboxylase	160	Tyrosindecarboxylase	100
Vitamin B ₆	4	Vitamin B ₆	4
6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	10	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	10
Puffer	126	Puffer	186
Endvolumen	300	Endvolumen	300

Tabelle 1: Zugrunde gelegte Verhältnisse für die Überprüfung der Pufferkapazität

Der für die Versuche mit der Tyrosindecarboxylase verwendete Phosphatpuffer (22 mM NaH₂PO₄) wurde auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt.

Der für die Versuche mit den DOPA-Decarboxylasen verwendete Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl) wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Die 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA-Lösung und der Puffer lagen bei diesen Versuchsanordnungen im Verhältnis 1:18,6 beziehungsweise 1:12,6 vor. Daher wurden 18,6 ml beziehungsweise 12,6 ml Puffer vorgelegt, 1 ml essigsäure Lösung zugegeben und der pH-Wert gemessen (n = 10).

Um einen Einfluss des pH-Wertes der 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA-Lösung gänzlich auszuschließen, wurden zusätzlich Enzymversuche mit 6-Fluoro-L-DOPA durchgeführt, bei denen die zuvor beschriebene essigsäure Lösung der Inkubationsmischung zugesetzt wurde.

	Volumen (µl)
Tyrosindecaboxylase	10
Vitamin B ₆	4
6-Fluoro-L-DOPA	100
Puffer	176
Essigsäure Lösung	10
Endvolumen	300

Tabelle 2: Pipettierschema für die Enzymversuche mit Zusatz der essigsäuren Lösung

3.3.2 Vorbereitung der Enzyme

DOPA-Decarboxylasen

Die drei verwendeten DOPA-Decarboxylasen von Novus Biologicals, R&D Systems und ATGen wurden vor ihrer Verwendung je auf 5 µg/ml verdünnt.

Beim Enzym von Novus Biologicals handelte es sich um 100 µg Lyophilisat. Wie im Produktdatenblatt beschrieben, wurde das Enzym in 500 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS Konzentrat zuvor mit Aqua dest. 1:10 verdünnt, pH 7,4) gelöst und anschließend steril filtriert. Danach wurde mit 19,5 ml Puffer verdünnt, der aus 50 mM HEPES und 100 mM NaCl bei pH 7,2 bestand und vor der Verwendung ebenfalls steril filtriert wurde. Das Enzym wurde dann zu 200 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die DOPA-Decarboxylase von R&D Systems lag in einer Konzentration von 0,513 mg/ml vor, die Gesamtmenge betrug 10 µg. Um eine Konzentration von 5 µg/ml zu erhalten wurde mit 1980,5 µl Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2, steril filtriert) verdünnt, zu 200 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Das Enzym von ATGen lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Davon wurden 50 µl entnommen mit 9950 µl Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2, steril filtriert) verdünnt, zu 200 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Histidindecaboxylase

Die Histidindecaboxylase von Cloud-Clone Corp. lag als 10 µg Lyophilisat vor. Es wurde in 2 ml zuvor steril filtriertem 50 mM Dikaliumhydrogenphosphat bei pH 6,8 gelöst [23] und zu 200 µl aliquotiert. Die Aliquote wurden bei -80 °C gelagert.

Tyrosindecaboxylase

Die Tyrosindecaboxylase von Sigma-Aldrich lag als acetongetrocknetes Streptokokken-Pulver vor. Daher musste das Enzym vor der Verwendung zunächst extrahiert werden. Für die Methode nach Epps et al. [21] wurde ein Phosphatpuffer hergestellt und steril filtriert. Dafür wurden 22 mM NaH₂PO₄ verwendet und mit H₃PO₄ und NaOH auf einen pH-Wert von 5,5 titriert.

Vom Streptokokken-Pulver wurden 20 mg eingewogen, mit einem Milliliter Puffer versetzt und 21 Stunden bei 37°C und 300 rpm im Rüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde

bei 464 g (3000 rpm) und Raumtemperatur 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

3.3.3 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA

Das verwendete 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA von IASON [22] lag in Durchstechflaschen vor. Es wurde mit einer Spritze ein Aliquot entnommen und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Daraus wurden 500 µl pipettiert, in ein zweites Reaktionsgefäß überführt und die Aktivität mittels Dosiskalibrator vermessen.

Die weiteren Komponenten dieser Zubereitung waren Wasser für Injektionszwecke und Essigsäure. Laut IASON Produktbeschreibung [22] muss der pH-Wert vor Applikation mit steriler Natriumhydrogencarbonat-Lösung (8,4 g/100 ml) auf einen pH-Wert zwischen 4,0 bis 5,0 eingestellt werden.

3.3.4 Enzymreaktion

Allgemein

Die gewählten Bedingungen für die Enzymreaktion wurden aus der Methodenbeschreibung von R&D Systems übernommen [20]. Die Konzentration an 6-Fluoro-L-DOPA/L-DOPA wurde modifiziert. Es wurden Lösungen mit 1 mM statt 5 mM hergestellt und anschließend die fünffache Menge zum Reaktionsgemisch pipettiert. 6-Fluoro-L-DOPA/L-DOPA und Vitamin B₆ wurden in destilliertem Wasser, das mittels Milli-Q® Wasseraufbereitungssystem gereinigt wurde, gelöst.

Alle Versuche wurden im Duplikat immer mit einer Kontrollprobe (welche kein Enzym enthielt) durchgeführt.

Für den Probenansatz wurde das Enzym in Reaktionsgefäßen mit dem Coenzym Vitamin B₆ und dem Puffer versetzt und 5 Minuten bei 37°C und 700 rpm vorinkubiert. Danach wurde das Substrat zugegeben, gemischt und zu definierten Zeitpunkten ein Aliquot entnommen. Zum Stoppen des enzymatischen Substratabbaus wurden die Aliquote mit derselben Menge an Stopplösung (Acetonitril:Methanol 10:1) versetzt und gemischt.

Anschließend wurden die Proben bei 11592 g (15000 rpm) und 4°C 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC (Agilent 1200) analysiert um den Fortschritt der Enzymreaktion zu dokumentieren.

Die erhaltenen Peaks wurden mit Peaks der Standards von 6-Fluoro-L-DOPA, Dopamin und Vitamin B₆ verglichen und dementsprechend identifiziert.

Säule	Pumpe	Laufmittel	Wellenlänge (nm)	Verwendung
Phenomenex Prodigy	Isokratisch 1 ml/min	ACN:Puffer (1:10) Puffer: 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 25 mM Natriumheptasulfonat, pH 3,5	280	Trennung des Reaktionsgemisches

Tabelle 3: HPLC Agilent 1200 Einstellungen für die Trennung des Reaktionsgemisches

DOPA-Decarboxylasen

Die Reaktionen wurden mit 6-Fluoro-L-DOPA (1 mM), L-DOPA (1 mM) beziehungsweise 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA jeweils mit dem Coenzym Vitamin B₆ (5 mM) durchgeführt. Der Puffer bestand aus 50 mM HEPES und 100 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7,2.

	Volumen (µl)		Volumen (µl)
DOPA-Decarboxylase	160	DOPA-Decarboxylase	160
Vitamin B ₆	4	Vitamin B ₆	4
6-Fluoro-L-DOPA/L-DOPA	100	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	10
Puffer	36	Puffer	126
Endvolumen	300	Endvolumen	300

Tabelle 4: Pipettierschemata für die Versuche mit den DOPA-Decarboxylasen

Histidin-Decarboxylase

Die Reaktionen wurden mit 6-Fluoro-L-DOPA (1 mM), L-DOPA (1 mM) beziehungsweise 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA jeweils mit dem Coenzym Vitamin B₆ (5 mM) durchgeführt. Der Puffer bestand aus 50 mM Dikaliumhydrogenphosphat bei einem pH-Wert von 6,8.

	Volumen (µl)		Volumen (µl)
Histidindecarboxylase	160	Histidindecarboxylase	160
Vitamin B ₆	4	Vitamin B ₆	4
6-Fluoro-L-DOPA/L-DOPA	100	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	10
Puffer	36	Puffer	126
Endvolumen	300	Endvolumen	300

Tabelle 5: Pipettierschemata für die Versuche mit der Histidindecarboxylase

Tyrosin-Decarboxylase

Die Versuche mit der Tyrosindecarboxylase wurden ebenfalls mit 6-Fluoro-L-DOPA (1 mM), L-DOPA (1 mM) beziehungsweise 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA jeweils mit dem Coenzym Vitamin B₆ durchgeführt. Als Puffer wurde derselbe Phosphatpuffer wie für die Extraktion der Tyrosindecarboxylase verwendet (22 mM NaH₂PO₄, pH 5,5). Die Konzentration an Tyrosindecarboxylase kann nicht angegeben werden, da das Enzym nicht in reiner Form, sondern als Streptokokken-Pulver vorlag.

	Volumen (µl)		Volumen (µl)
Tyrosindecarboxylase	10	Tyrosindecarboxylase	10
Vitamin B ₆	4	Vitamin B ₆	4
6-Fluoro-L-DOPA/L-DOPA	100	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	10
Puffer	186	Puffer	276
Endvolumen	300	Endvolumen	300

Tabelle 6: Pipettierschemata für die Versuche mit der Tyrosindecarboxylase

Die Enzymreaktion wurde anschließend mit unterschiedlichen Volumina an Tyrosindecarboxylase durchgeführt, dabei wurde die Menge des Puffers jeweils angepasst um 150 µl beziehungsweise 300 µl Endvolumen zu erhalten.

Danach wurde die Menge an 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA variiert und jeweils ebenfalls die Pufferzugabe angepasst.

TDC (µl)	50	100
	6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (MBq)	6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (MBq)
	0,05	1,10
	0,20	2,71
	0,25	2,94
	0,40	
	0,43	
	0,50	
	0,70	
	0,86	
	1,00	
	1,20	
	1,29	
	1,72	
	2,15	
Endvolumen (µl)	150	300

Tabelle 7: Verwendete Mengen an 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA (MBq)

3.3.5 Isolierung und Aufreinigung von 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin

Für den präparativen Enzymversuch zur anschließenden Isolierung von 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

	Volumen (µl)
Tyrosindecarboxylase	100
Vitamin B ₆	4
6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	50
Puffer	146
Endvolumen	300

Tabelle 8: Pipettierschema für den präparativen Enzymversuch

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und 700 rpm wurden die Proben sofort bei 4°C und 11592 g (15000 rpm) 5 Minuten zentrifugiert und der gesamte Überstand in die HPLC injiziert. Mittels Phenomenex-Säule wurde das Substanzgemisch getrennt. Für die Isolierung des 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamins wurde ein Umschaltventil betätigt und die Flüssigkeit dementsprechend separiert.

Das entstandene 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin wurde im Laufmittel in einem Rundkolben gesammelt, in dem zuvor 15 ml H₂O vorgelegt wurden. Eine ausreichende Verdünnung mit H₂O war wichtig, da der Anteil an Acetonitril < 5% sein sollte. Bei Konzentrationen > 5% wäre das 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin in der anschließend verwendeten C-18-Kartusche nicht retiniert, sondern hätte einen Säulendurchbruch erfahren. Da das Laufmittel zu 10% aus Acetonitril bestand, war mindestens eine 1:1 Verdünnung des gesammelten Volumens mit Wasser notwendig.

Um das 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin vom Laufmittel zu reinigen wurden Sep-Pak Light beziehungsweise Sep-Pak Plus Kartuschen verwendet. Sie enthalten eine aus Kieselgel mit C18-Ketten ausgestattete Festphase, die in der Lage ist hydrophobe Substanzen aus wässrigen Lösungen zu binden. [26]

	1. Ethanol (ml)	2. H ₂ O (ml)
Sep-Pak Light C-18	10	10
Sep-Pak Plus C-18	10	20

Tabelle 9: Konditionierung der Festphasenextraktionskartuschen vor der Verwendung

Die gesamte Flüssigkeit wurde aus dem Rundkolben in eine Spritze transferiert, und anschließend langsam aus dieser durch die Kartusche geleitet. Danach wurde mit 10 ml H₂O nachgewaschen. Die Elution des 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamins erfolgte bei der Sep-Pak Light Kartusche mit 1 ml Ethanol, bei der Sep-Pak Plus Kartusche mit 1,5 ml Ethanol.

3.3.6 Qualitätskontrolle

Um festzustellen, ob es sich bei der durch die Enzymreaktion entstandenen Substanz tatsächlich um Dopamin handelte, wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Dazu wurde stichprobenartig, nach präparativer Trennung des Gemisches, ein Teil der Substanz mittels der SIELC HPLC-Säule getrennt und mittels UV- und Radiodetektor derselben Anlage analysiert. Der UV-Peak der Probe wurde mit dem eines Dopamin-Standards verglichen. Diese Qualitätskontrolle wurde ebenfalls nach der Aufreinigung über Festphasenextraktion durchgeführt. Hier wurde ein Teil des Eluats derselben Analyse unterzogen.

Säule	Pumpe	Laufmittel	Wellenlänge (nm)	Verwendung
SIELC	Isokratisch	ACN:H ₃ PO ₄ (1:5)	280	Qualitätskontrolle
Obelisc N	1 ml/min	H ₃ PO ₄ 0,1%ig		

Tabelle 10: HPLC Agilent 1200 Einstellungen für die Qualitätskontrolle

4 Ergebnisse

Die Rohdaten der Ergebnisse sind im Anhang aufgelistet.

4.1 Vortests

4.1.1 Absorptionsmaximum von 6-Fluoro-L-DOPA und Dopamin

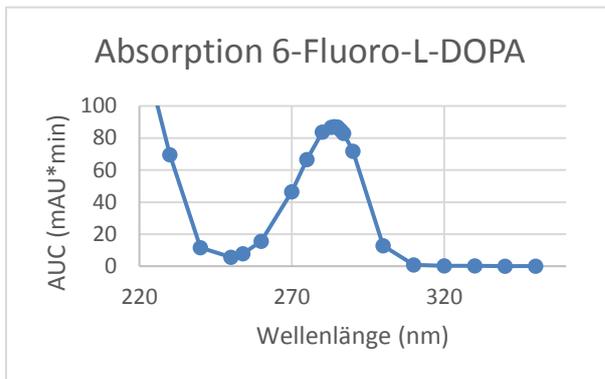


Diagramm 2: Absorption 6-Fluoro-L-DOPA

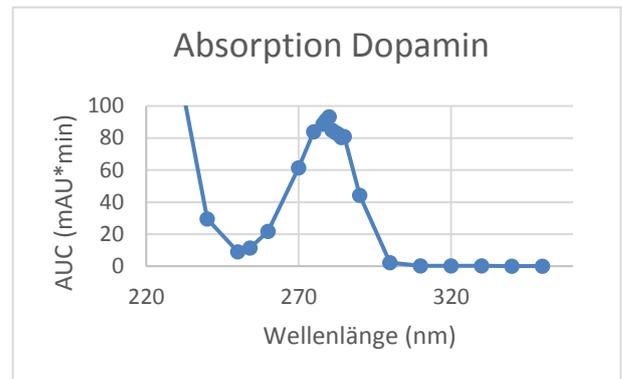


Diagramm 1: Absorption Dopamin

Das Absorptionsmaximum von 6-Fluoro-L-DOPA lag bei 285 nm, das von Dopamin bei 280 nm.

4.1.2 Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA, Dopamin und Vitamin B₆

Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA bei 37°C in Puffer

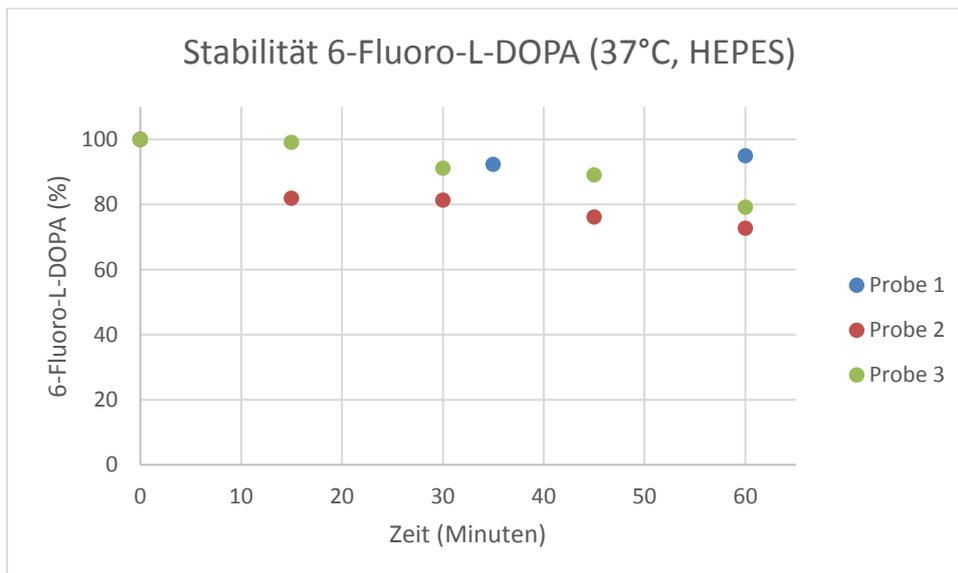


Diagramm 3: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c (Probe 1) = 50 µg/ml, c (Probe 2,3) = 250 µg/ml)

Stabilität von Dopamin bei 37°C in Puffer

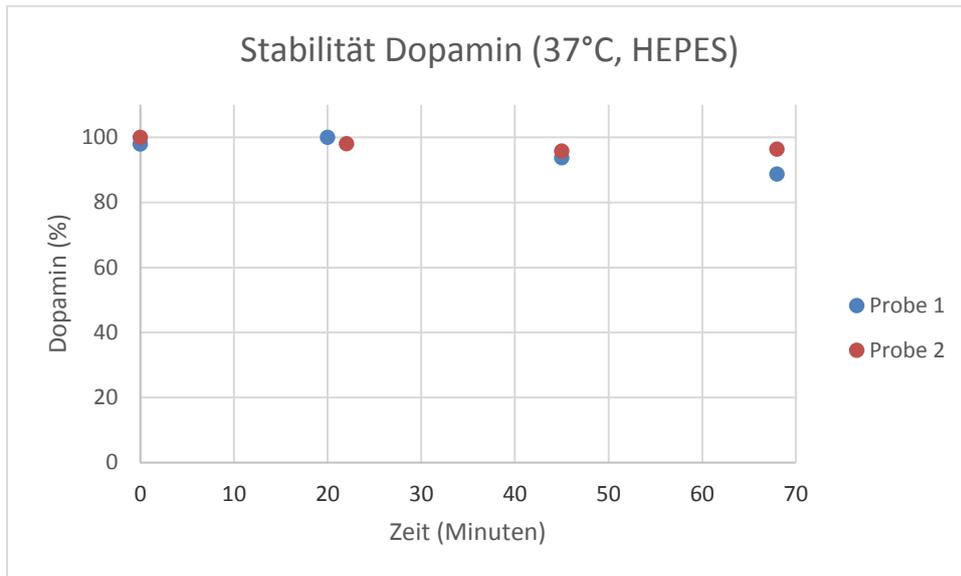


Diagramm 4: Stabilität Dopamin (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c = 500 µg/ml)

Stabilität von Vitamin B₆ bei 37°C in Puffer

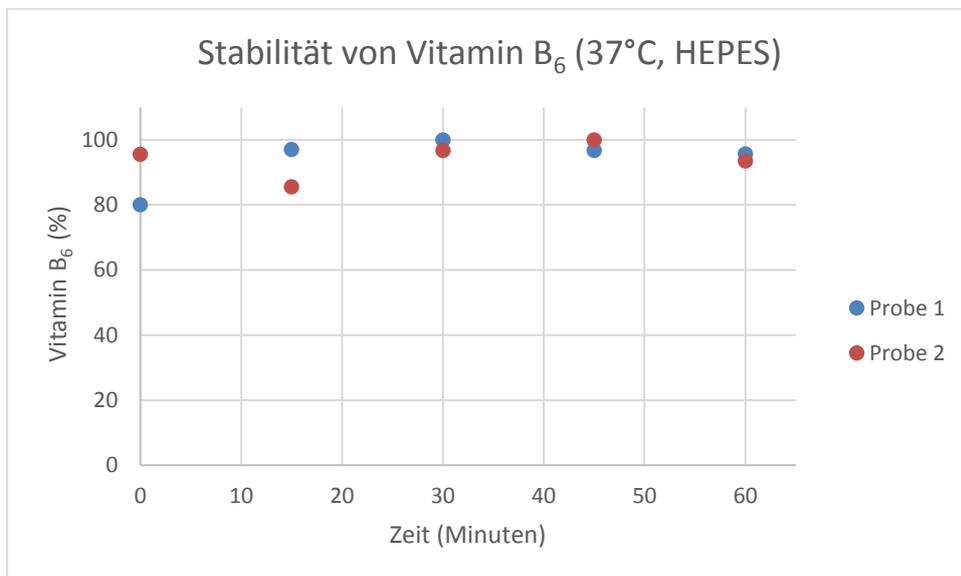


Diagramm 5: Stabilität Vitamin B₆ (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c = 50 µg/ml)

4.1.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymfunktion

Die Überprüfung des Phosphat- und des HEPES-Puffers ergab, dass beide Puffer eine ausreichende Pufferkapazität aufwiesen. Die Versuchsanordnung ist auf Seite 19 f. zu finden. Die Ergebnisse sind im Appendix auf Seite 63 f. aufgelistet.

Enzymversuche mit Zusatz essigsaurer Lösung

Um einen Einfluss des pH-Wertes der 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA-Lösung auszuschließen, wurden Enzymversuche mit 6-Fluoro-L-DOPA und Tyrosindecaboxylase durchgeführt, bei denen eine essigsaurer Lösung, mit dem pH-Wert der 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA-Lösung, der Inkubationsmischung zugesetzt wurde. Parallel wurde ein Enzymversuch mit gleichen Bedingungen durchgeführt, bei dem keine essigsaurer Lösung zugesetzt wurde.

Der Zusatz zeigte keinen Einfluss auf die Reaktion und die Produktausbeute.

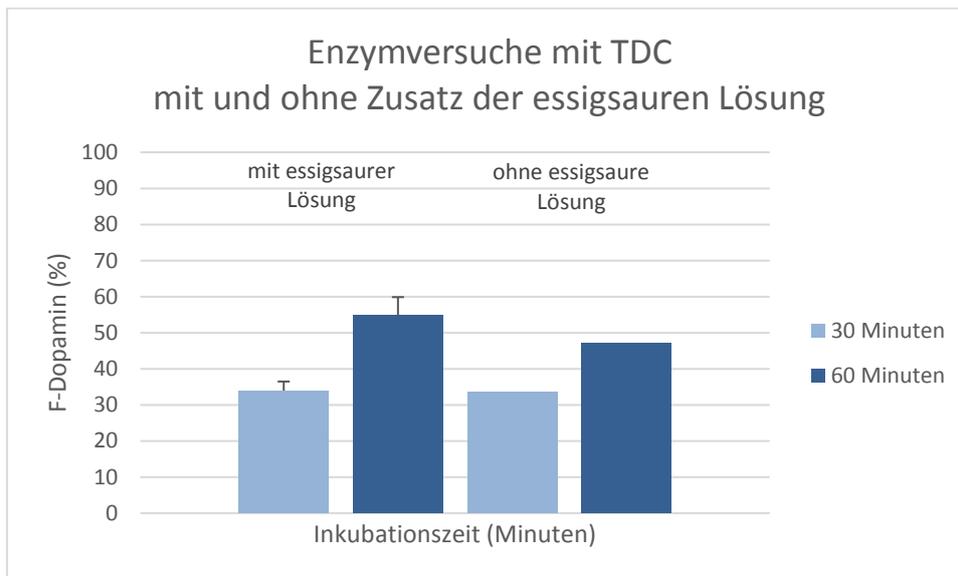


Diagramm 6: Enzymversuche mit TDC, mit (n = 3) und ohne (n = 1) Zusatz der essigsaurer Lösung (10 µl), TDC (10 µl) und 6-Fluoro-L-DOPA (100 µl)

4.2 Qualitative Enzymreaktion

Zur Entwicklung einer enzymatischen Methode zur Umsetzung von 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA zu 6-^[18F]Fluoro-Dopamin *in vitro* wurden Versuche mit drei rekombinanten DOPA-Decarboxylasen, einer rekombinanten Histidindecarboxylase und einer bakteriellen Tyrosindecarboxylase durchgeführt. Zuerst wurde untersucht, welches dieser Enzyme die katalytische Fähigkeit zur Umsetzung der Reaktion besaß. Dazu wurden Versuche mit den Substraten L-DOPA, 6-Fluoro-L-DOPA und 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA durchgeführt.

4.2.1 DOPA-Decarboxylase

Novus Biologicals

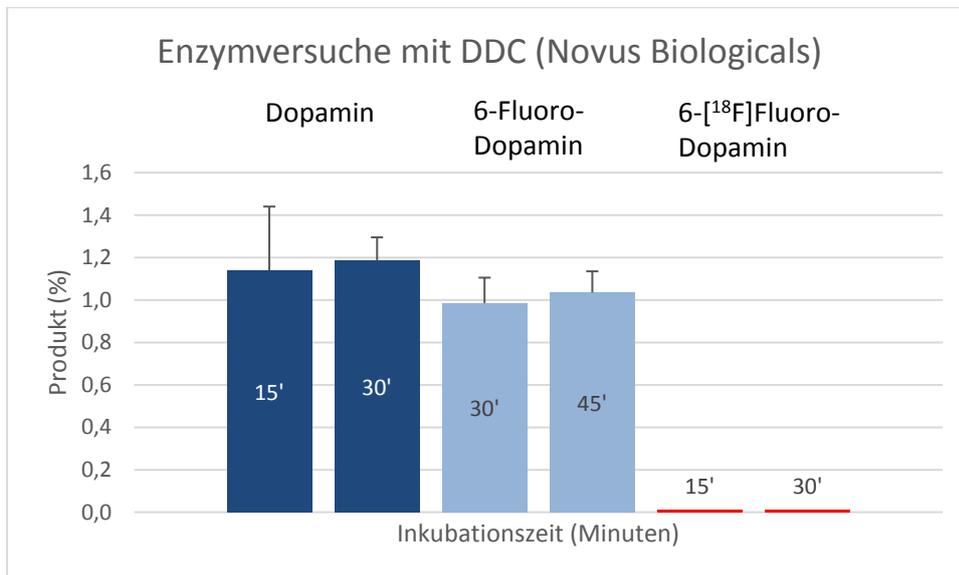
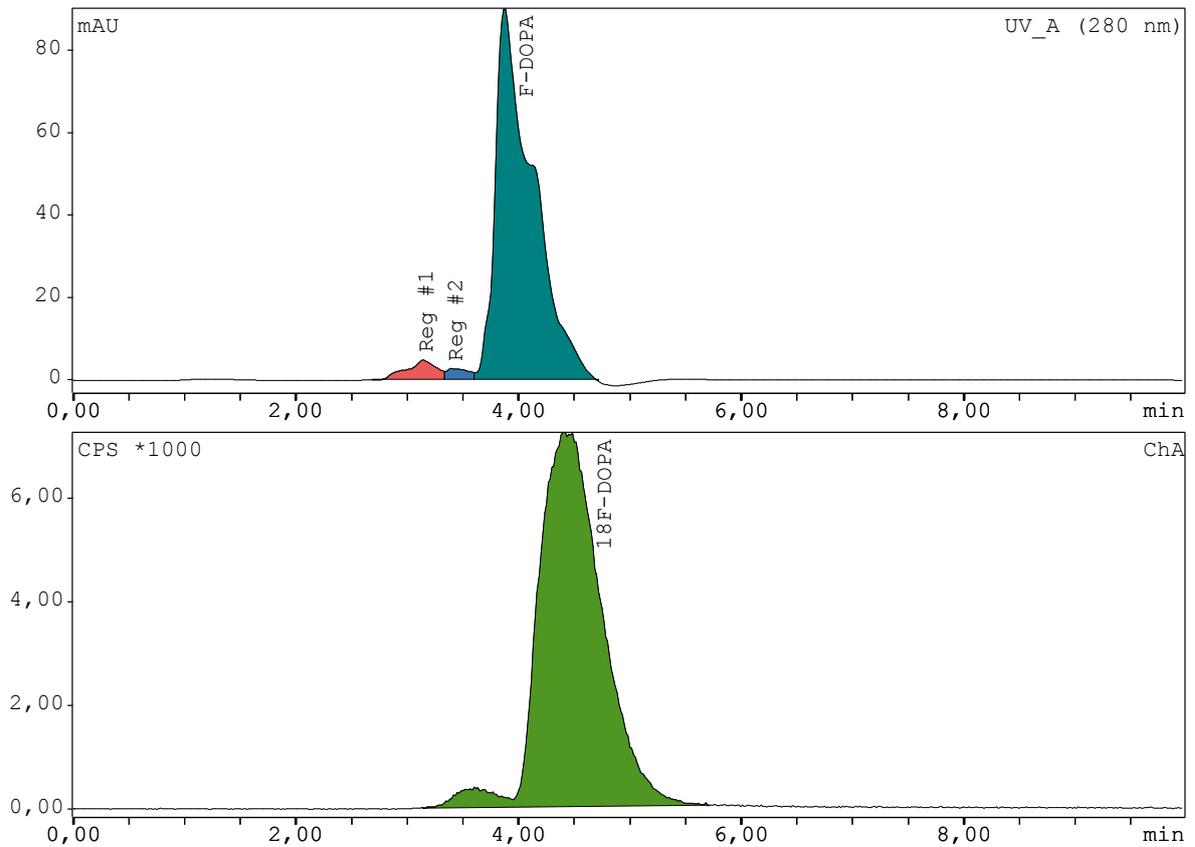


Diagramm 7: Enzymversuche mit der DDC von Novus Biologicals und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2)

Chromatogramm 1 zeigt, dass bei der Verwendung der DDC von Novus Biologicals kein 6-^[18F]Fluoro-Dopamin entstanden ist.



Chromatogramm 1: Enzymversuch mit DDC von Novus Biologicals und 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA als Substrat

R&D Systems

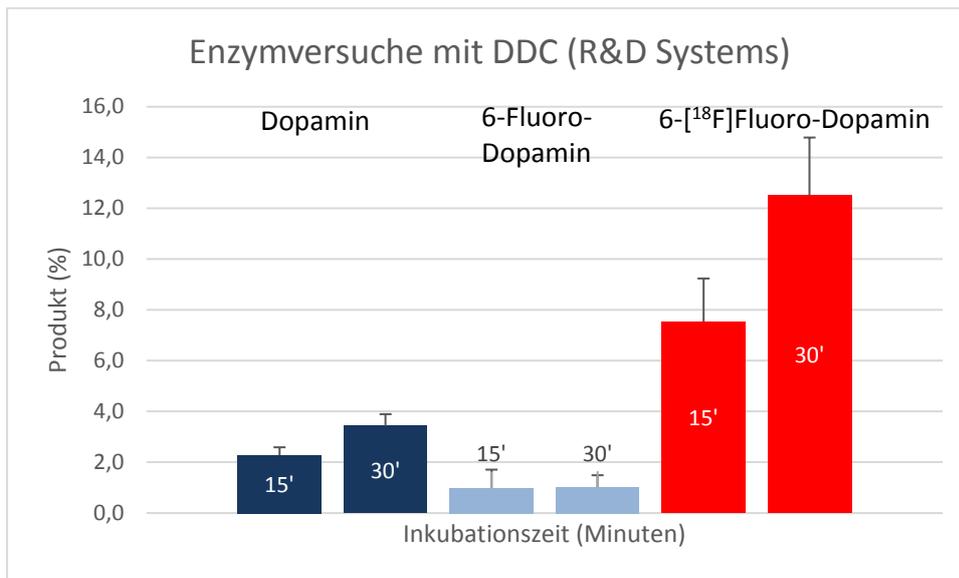
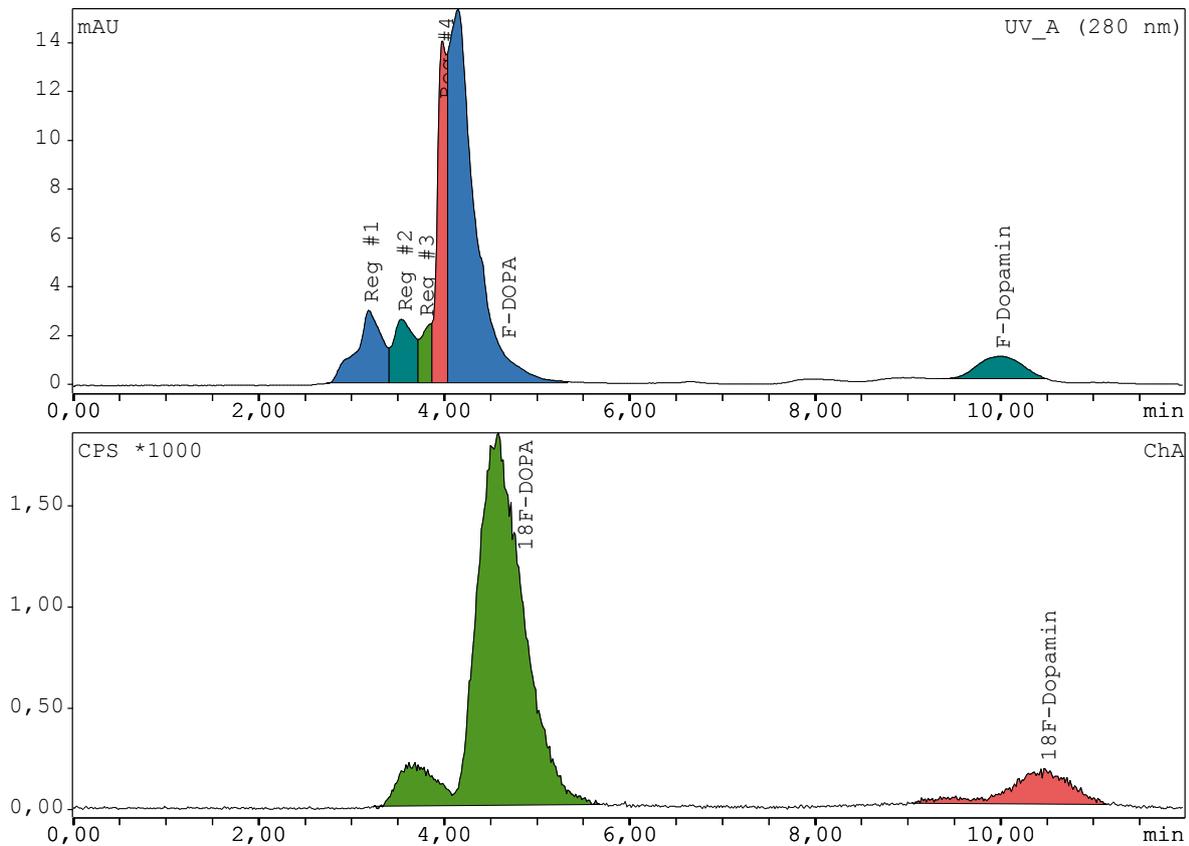


Diagramm 8: Enzymversuche mit der DDC von R&D Systems und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2)

Chromatogramm 2 zeigt, dass nach 30-minütiger Inkubation mit der DDC von R&D Systems 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin entstanden ist.



Chromatogramm 2: Enzymversuch mit DDC von R&D Systems und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat

ATGen

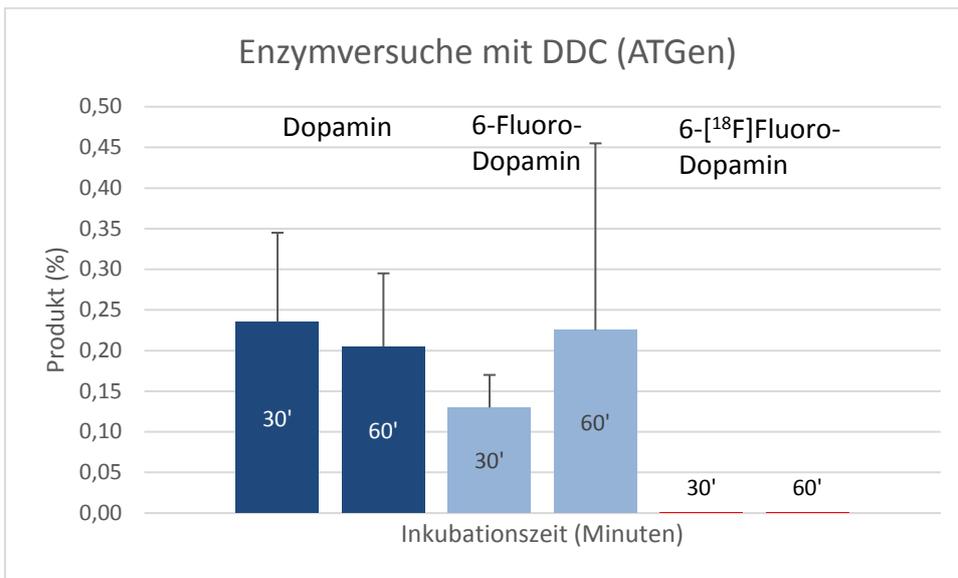
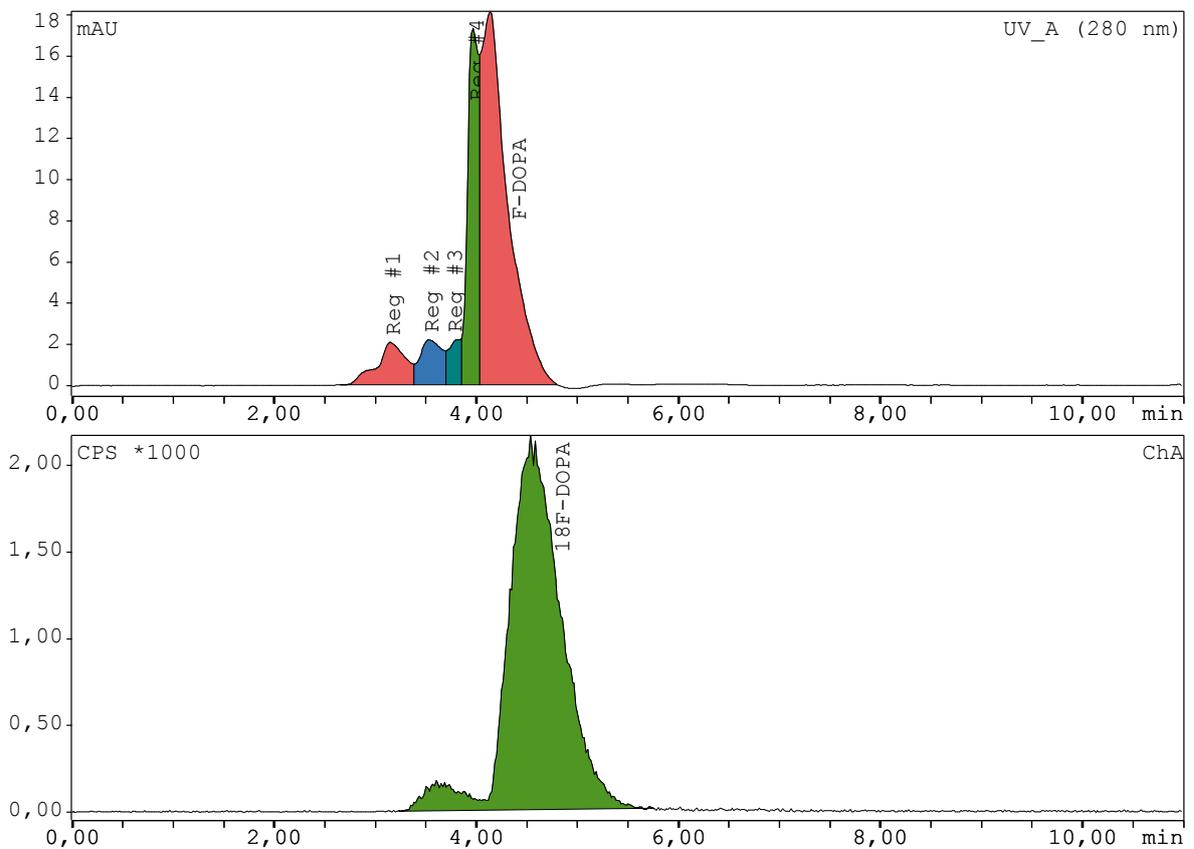


Diagramm 9: Enzymversuche mit der DDC von ATGen und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2)

Chromatogramm 3 zeigt, dass nach 30-minütiger Inkubation mit der DDC von ATGen kein 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin entstanden ist.



Chromatogramm 3: Enzymversuch DDC von ATGen und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat

4.2.2 Histidindecarboxylase

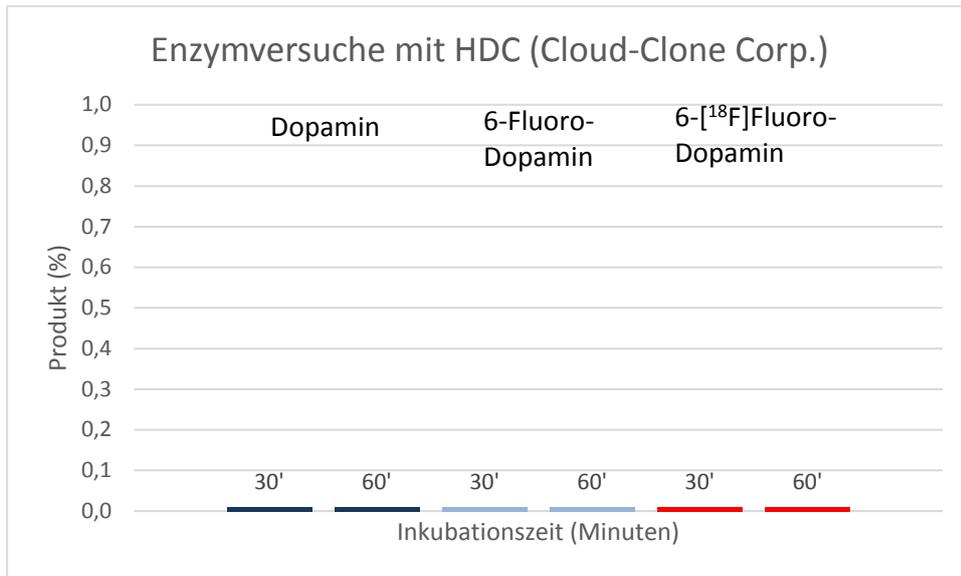
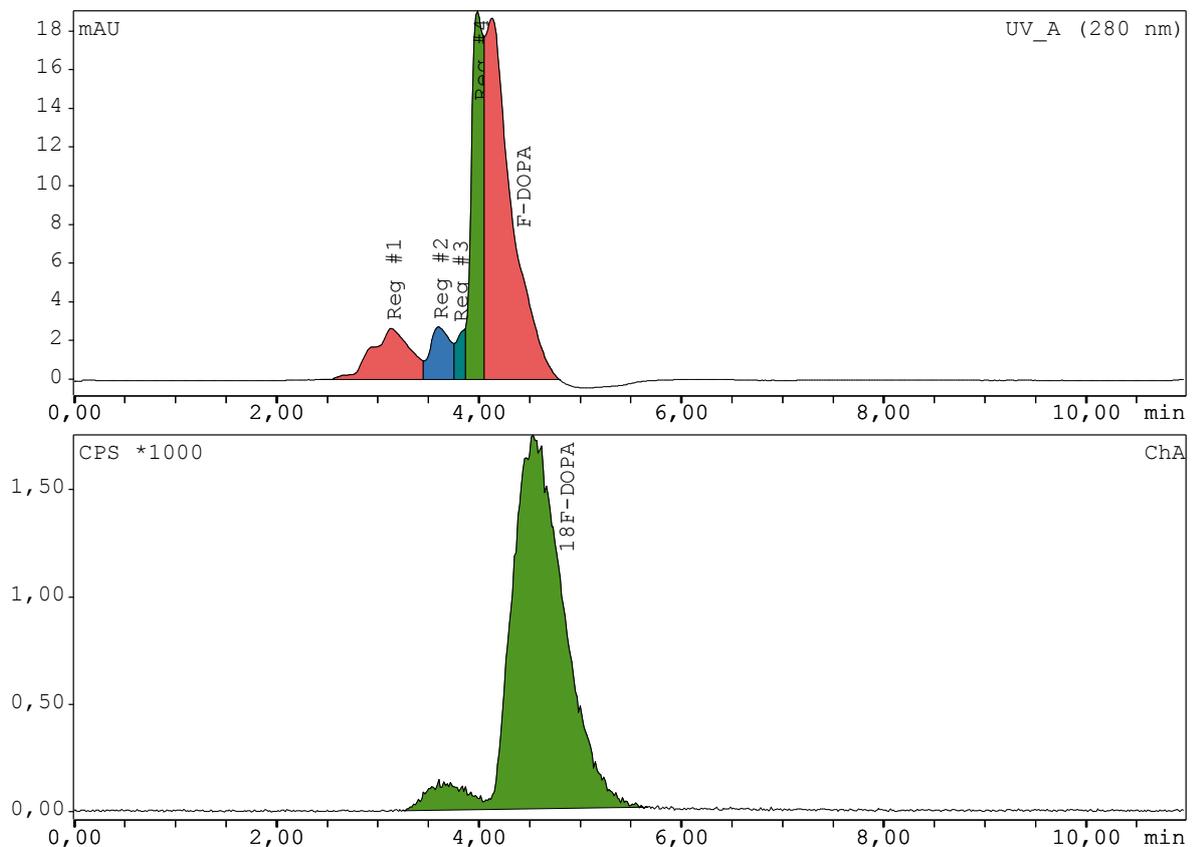


Diagramm 10: Enzymversuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2)

Chromatogramm 4 zeigt, dass nach 30-minütiger Inkubation mit der HDC von Cloud-Clone Corp. kein 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin entstanden ist.



Chromatogramm 4: Enzymversuch HDC von Cloud-Clone Corp. und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat

4.2.3 Tyrosindecaboxylase

Die Menge an zugesetztem L-DOPA beziehungsweise 6-Fluoro-L-DOPA entsprach hier, wie auch bei den Versuchen mit der DDC und HDC, einem Drittel der Inkubationsmischung.

Für die ersten Versuche mit der TDC wurden zunächst 10 µl (3,33%) TDC zugesetzt.

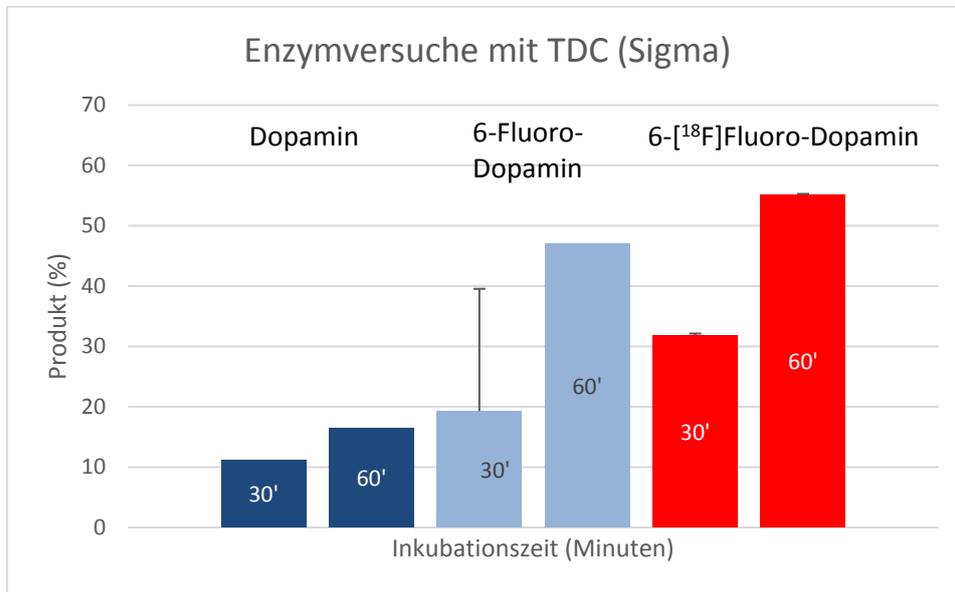
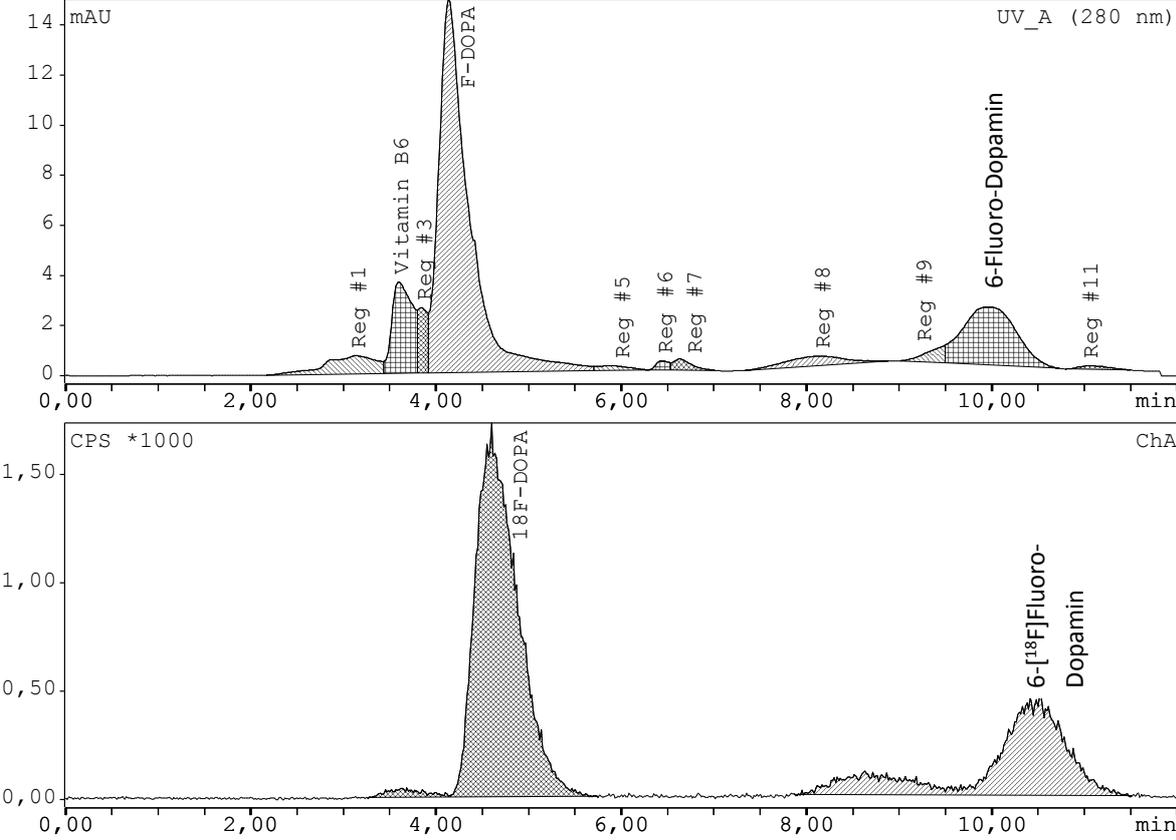


Diagramm 11: Enzymversuche mit der TDC von Sigma (L-DOPA: n = 1; 6-Fluoro-L-DOPA: n(30) = 2, n(60) = 1; 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA: n = 2)

Chromatogramm 5 zeigt, dass nach 30-minütiger Inkubation mit der TDC von Sigma 6-^[18F]Fluoro-Dopamin entstanden ist.



Chromatogramm 5: Enzymversuch TDC von Sigma und 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA als Substrat

4.3 Quantitative Enzymreaktion

4.3.1 Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an Tyrosindecaboxylase

Die Menge an zugesetztem 6-Fluoro-L-DOPA dieser Enzymversuche entsprach auch hier einem Drittel der Inkubationsmischung, 6-Fluoro-L-DOPA lag immer in einer Konzentration von 1 mM vor.

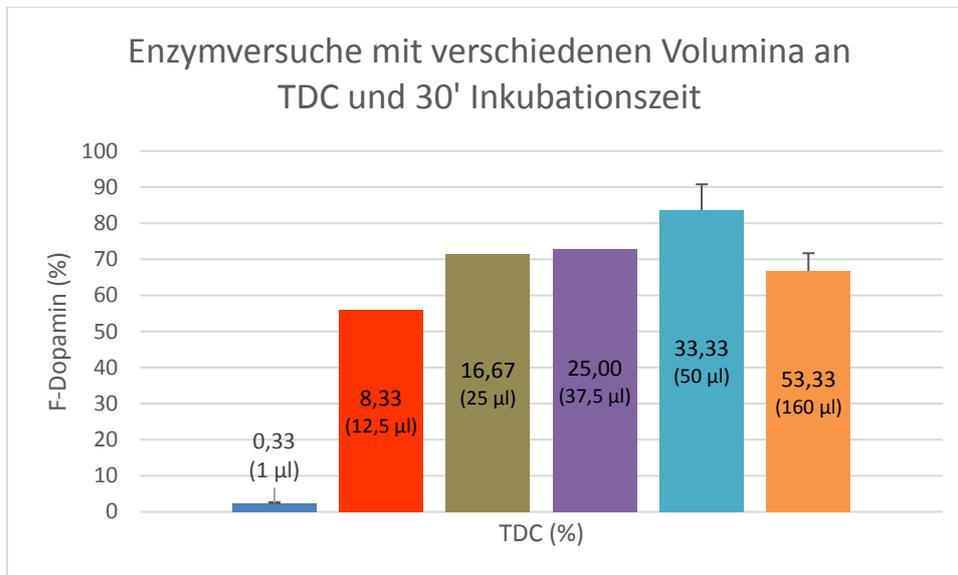


Diagramm 12: Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an TDC, Inkubationszeit 30 Minuten; n(0,33) = 2; n(8,33) = 1; n(16,67) = 1; n(25) = 1; n(33,33) = 4; n(53,33) = 2

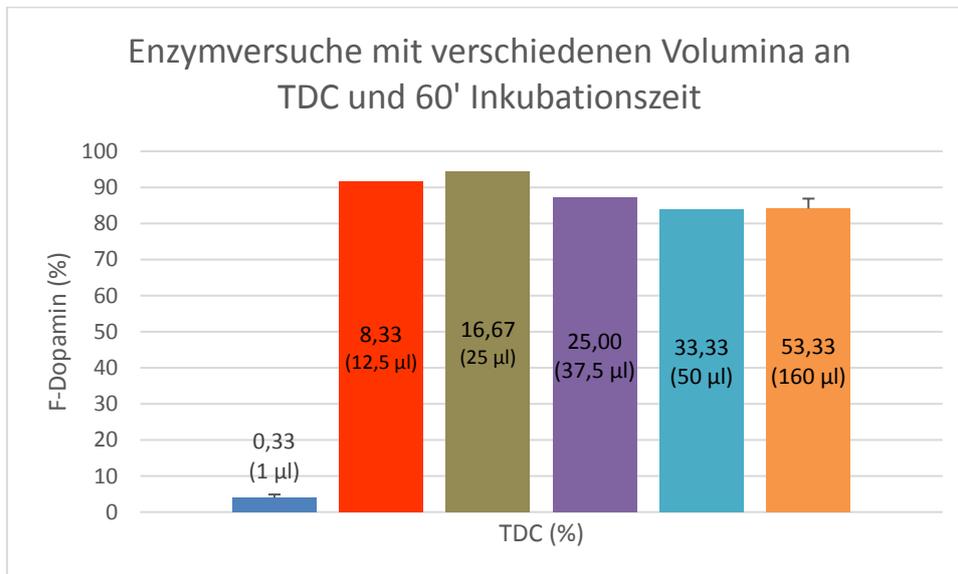


Diagramm 13: Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an TDC, Inkubationszeit 60 Minuten; n(0,33) = 2; n(8,33) = 1; n(16,67) = 1; n(25) = 1; n(33,33) = 1; n(53,33) = 2

Die Versuche ergaben einen optimalen Anteil der TDC von einem Drittel (33,33%) an der Inkubationsmischung. Da die Inkubationszeit für die späteren Versuche mit dem radioaktiven Substrat aufgrund der Halbwertszeit so kurz wie möglich sein sollte, wurden weitere Versuche mit einem Anteil von einem Drittel 6-Fluoro-L-DOPA und einem Drittel TDC an der Inkubationsmischung durchgeführt.

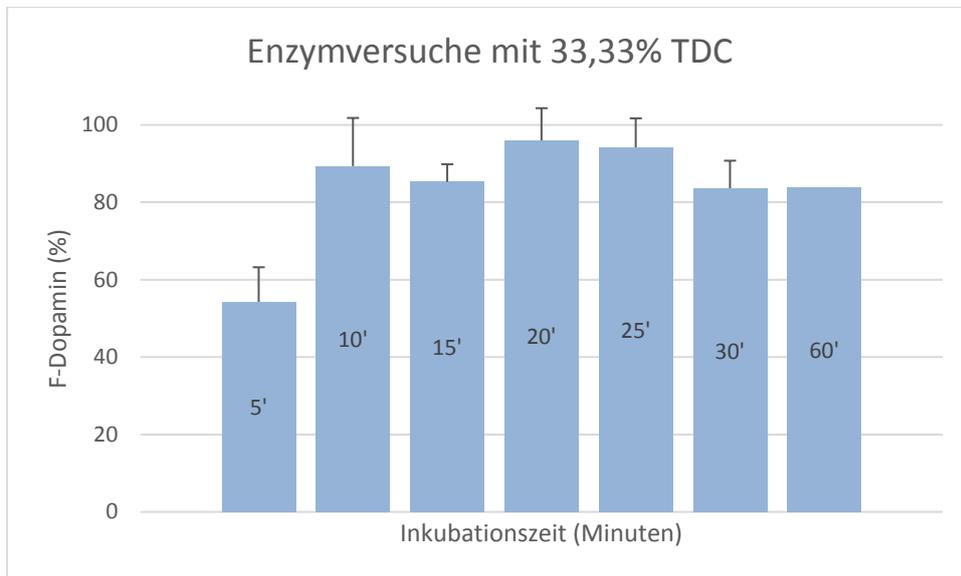


Diagramm 14: Enzymversuche mit 33,33% TDC; n(5) = 2; n(10) = 2; n(15) = 4; n(20) = 2; n(25) = 2; n(30) = 4; n(60) = 1

Die Anzahl der Versuche war jedoch zu gering um eine Aussage über die optimale Inkubationsdauer zu treffen. Daher wurden bei den Versuchen mit 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA nach 15 und 30 Minuten Inkubationszeit Proben gezogen.

4.3.2 Enzymversuche mit verschiedenen Zugaben an 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA

Die Menge an zugesetzter TDC dieser Enzymversuche entsprach einem Drittel der Inkubationsmischung.

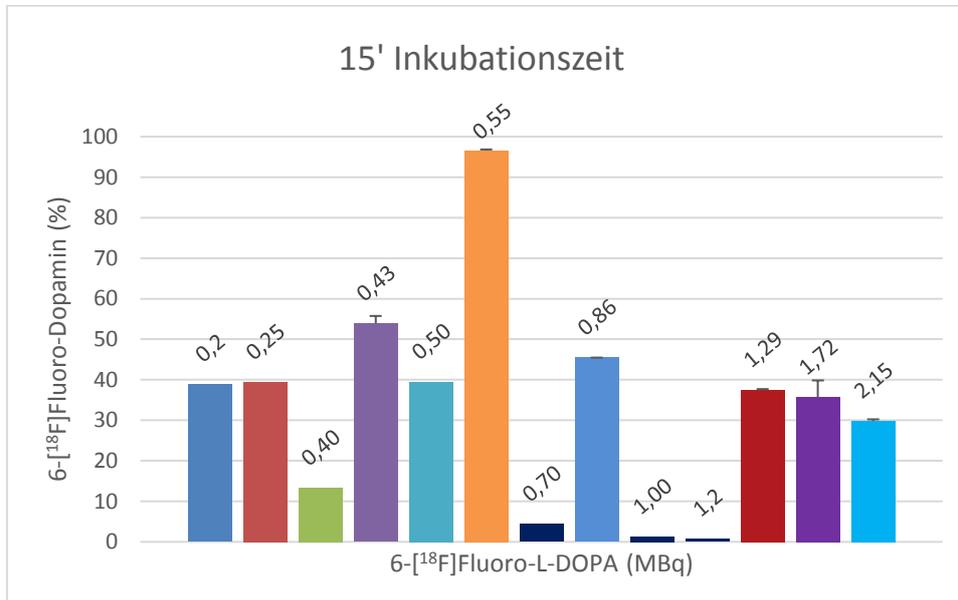


Diagramm 15: Enzymversuche mit verschiedenen Zugaben an 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA, Inkubationszeit 15 Minuten; n(0,2) = 1; n(0,25) = 1; n(0,40) = 1; n(0,43) = 2; n(0,50) = 1; n(0,55) = 2; n(0,70) = 1; n(0,86) = 2; n(1,00) = 1; n(1,2) = 1; n(1,29) = 2; n(1,72) = 2; n(2,15) = 2

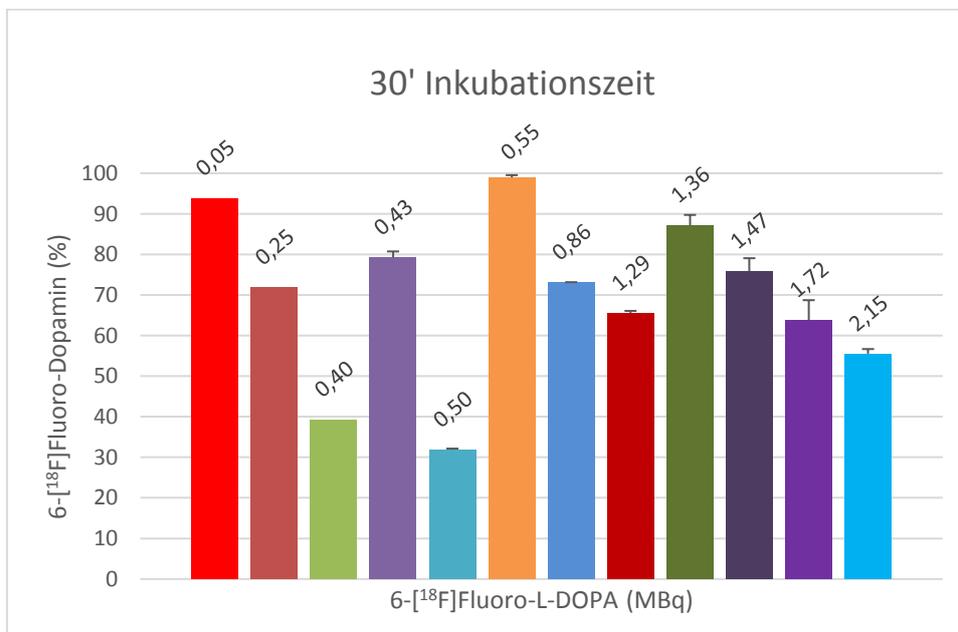


Diagramm 16: Enzymversuche mit verschiedenen Zugaben an 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA, Inkubationszeit 30 Minuten; n(0,05) = 1; n(0,25) = 1; n(0,40) = 1; n(0,43) = 2; n(0,50) = 2; n(0,55) = 2; n(0,86) = 2; n(1,29) = 2; n(1,36) = 3; n(1,47) = 3; n(1,72) = 2; n(2,15) = 2

Aus den Versuchen lassen sich folgende optimale Parameter ableiten:

Inkubationszeit	TDC-Anteil an der Inkubationsmischung	6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA
30 Minuten	33,33%	Anzahl der Versuche für Angabe des optimalen Substrat-Enzym-Verhältnisses zu gering; bei fast allen Versuchen jedoch über 50% Umsetzung zum Produkt

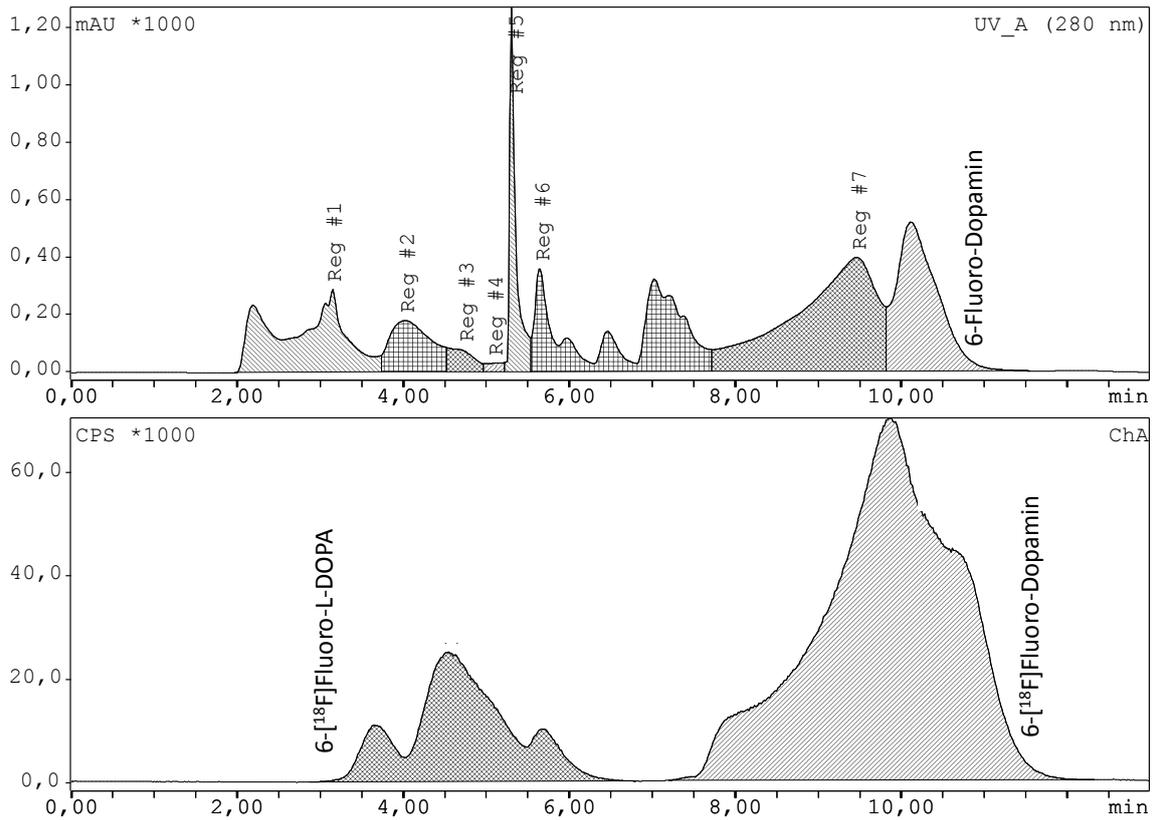
4.4 Isolierung, Aufreinigung und Qualitätskontrolle

Die Isolierung, Aufreinigung und Qualitätskontrolle des 6-^[18F]Fluoro-Dopamins konnte erfolgreich durchgeführt werden.

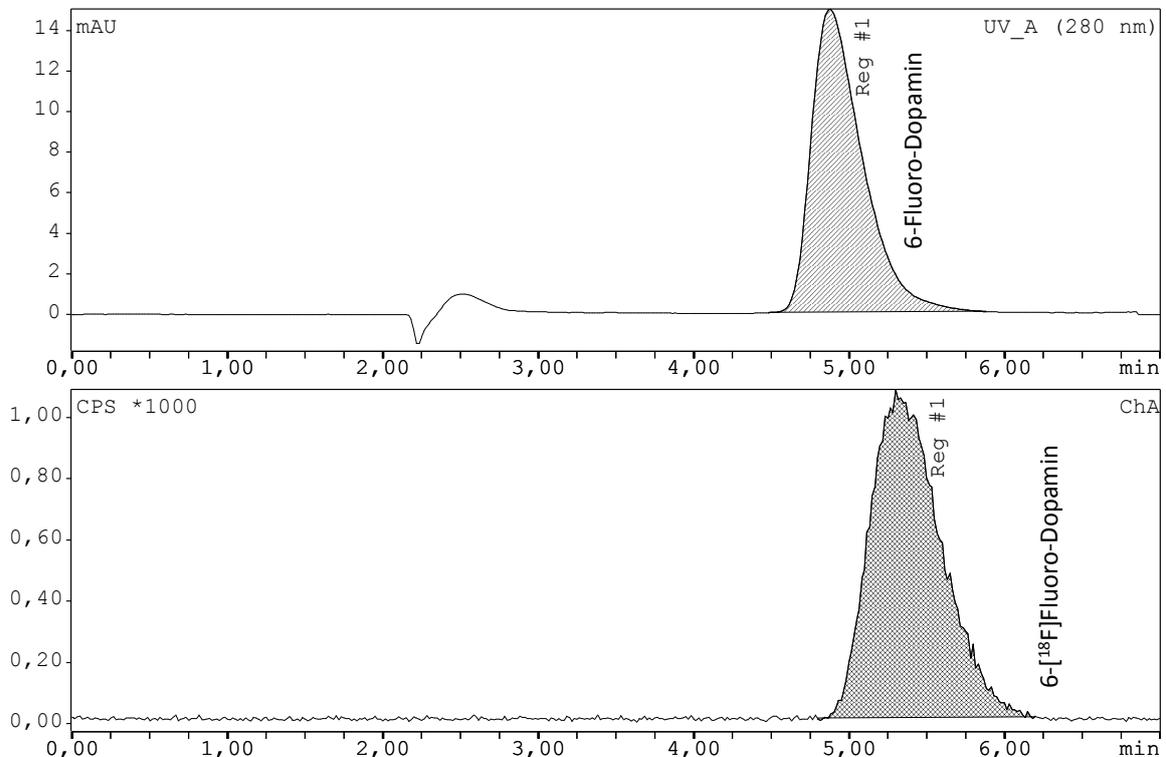
Chromatogramm 6 zeigt die Aufreinigung des Reaktionsgemisches der Enzymreaktion von 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA mit der Tyrosindecarboxylase, dessen Anteil am Reaktionsgemisch 33,33% entsprach. Da es sich beim zugesetzten Enzym um ein unaufgereinigtes Extrakt aus Bakterien handelte, sind im UV-Kanal neben dem 6-Fluoro-L-DOPA- und 6-Fluoro-Dopamin-Peak einige andere nicht identifizierte Peaks zu erkennen. Im Kanal des Radiodetektors hingegen sind nur die Peaks von 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA und 6-^[18F]Fluoro-Dopamin sichtbar. Das Produkt wurde gesammelt und das Eluat anschließend der Qualitätskontrolle zugeführt.

Im Chromatogramm 7 ist die erfolgreiche Isolierung und Aufreinigung des 6-^[18F]Fluoro-Dopamins erkennbar, da sowohl im UV-Kanal als auch im Kanal des Radiodetektors nur der Peak des kalten beziehungsweise des radioaktiven Dopamins sichtbar ist.

Eine nähere Beschreibung der Durchführung ist im Kapitel „Methoden“ zu finden.



Chromatogramm 6: Beispiel eines Chromatogramms der Auftrennung des Reaktionsgemisches (1,47 MBq 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA; 33,33% TDC; Inkubationszeit 30 Minuten)



Chromatogramm 7: Beispiel eines Chromatogramms der Qualitätskontrolle nach Aufreinigung des 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamins

5 Diskussion

5.1 Allgemein

Ziel dieser Arbeit war es ein Enzym zu finden, das eine rasche und möglichst quantitative Decarboxylierung von 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA zu 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin katalysieren kann.

Enzym	Masse (kDa)
DDC (nativ) 486 Aminosäuren	104
DDC (rekombinant, Novus Biologicals) Synthetisches Peptid für die Verwendung in Kombination mit anti-DDC Antikörper	53
DDC (rekombinant, R&D Systems) Aus <i>Spodoptera frugiperda</i> , Sf21 (baculovirus)-derived, Met1-Glu480, mit C-terminalem 6-His-Tag	55
DDC (rekombinant, ATGen) Aus <i>E. Coli</i> , mit N-terminalem His-Tag	56,4
HDC (nativ) 662 Aminosäuren	74
HDC (Clone-Cloud Corp.) Aus <i>E. Coli</i> , Ala160-Phe369, mit zwei N-terminalen Tags (His-Tag und T7-Tag)	27,5
TDC (nativ, Sigma) Aus <i>Streptococcus faecalis</i>	150

Tabelle 11: Übersicht Enzyme und Eigenschaften

Dazu wurden zuerst drei rekombinante DOPA-Decarboxylasen und eine rekombinante Histidindecarboxylase getestet, anschließend wurden Versuche mit einer bakteriellen Tyrosindecarboxylase durchgeführt.

Anzumerken ist, dass die verfügbaren und kommerziell erwerbbaaren rekombinanten Enzyme nicht explizit für Enzymversuche dieser Art ausgelegt waren oder zuvor in Bezug darauf von den Firmen getestet wurden. Sie wurden unter anderem zur Anwendung für Immunhistochemie, Immunpräzipitation, Western Blot, SDS-PAGE oder ELISA hergestellt.

Vorangehende Studien mit erfolgreicher und rascher Decarboxylierung von aromatischen Aminosäuren bedienten sich stets Organextrakten. [40, 41, 42, 43, 44]

In Tabelle 11 sind die Eigenschaften der verwendeten und nativen Enzyme zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass die rekombinanten Enzyme bezüglich ihrer Massen deutlich von ihren natürlichen Vorbildern abweichen. Daher stellt sich die Frage, ob der jeweils vorhandene Teil des Enzyms das vollständige aktive Zentrum beinhaltet, das Coenzym binden kann und in der Lage ist das gewünschte Substrat zu decarboxylieren. Durch die nach der Herstellung vorgenommene Aufreinigung von rekombinanten Enzymen kann die biologische Aktivität möglicherweise verloren gehen, ebenso durch falsche Lagerung. Ungünstige Lagerungstemperaturen oder Medien können dem Enzym schaden. Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Enzyms sollte daher auch vermieden werden. Die Enzyme wurden aliquotiert und nur die benötigte Menge jeweils aufgetaut und sofort verwendet. Die für die Lagerung der DOPA-Decarboxylasen und Histidindecarboxylase verwendeten Medien entsprachen jeweils den verwendeten Puffern für die Enzymversuche. Die Tyrosindecarboxylase wurde immer frisch extrahiert und sofort für die Versuche weiterverwendet.

Das Gelingen eines Enzymversuchs hängt nicht nur von der passenden räumlichen Struktur des Enzyms ab, sondern auch vom pH-Wert und der Temperatur der Inkubationslösung, außerdem von der Verfügbarkeit und Bindung des Coenzym an das Enzym.

Jedes Enzym besitzt ein pH-Optimum, das bei den durchgeführten Versuchen berücksichtigt wurde, und ein Temperatur-Optimum, das für viele Enzyme 37°C beträgt. Läge die Temperatur unter dem Optimum, würde die Reaktion langsamer oder gar nicht ablaufen, zu hohe Temperaturen können zur Veränderung ihrer räumlichen Struktur und damit zur Denaturierung führen.

Die Geschwindigkeit der Umsetzung des gesamten vorhandenen Substrats kann erhöht werden durch Erhöhung der Enzymkonzentration oder der Temperatur. Eine erfolgreiche Reaktion kann auch von einem bestimmten Enzym-Substrat-Verhältnis abhängen. Um das ideale Verhältnis herauszufinden kann bei konstanter Enzymkonzentration die Substratkonzentration variiert werden und anschließend eine Aktivitätskurve erstellt werden.

5.2 DOPA-Decarboxylase

Die DOPA-Decarboxylase ist ein unspezifisches Enzym mit der Fähigkeit mehr als nur ein Substrat umzusetzen. Die *in vitro* Umsetzung der Substrate L-DOPA, 6-Fluoro-L-DOPA und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA durch Verwendung von rekombinanten DOPA-Decarboxylasen lieferte jedoch nicht den erwünschten Erfolg. Alle drei verwendeten Enzyme erzielten nur sehr geringe Produktausbeuten in Bezug auf die Decarboxylierung von L-DOPA und 6-Fluoro-L-DOPA. Nur eines von ihnen war in der Lage 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA umzusetzen.

Die besten Ergebnisse dieser drei Enzyme lieferte die DDC von R&D Systems mit 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat. Grund dafür könnte sein, dass die verwendete Versuchsanordnung von R&D Systems angewandt wurde und dieses Enzym eher auf einen solchen Versuch ausgelegt war als die anderen Enzyme. Nach 15 Minuten Inkubationszeit betrug die Ausbeute 7%, nach weiteren 15 Minuten stieg sie auf 12%. Möglicherweise hätten durch längere Inkubation noch höhere Produktausbeuten erzielt werden können, jedoch war das Ziel möglichst viel Produkt in kurzer Zeit zu generieren.

Die DDC von Novus Biologicals ergab mit L-DOPA und auch 6-Fluoro-L-DOPA nach 15 Minuten Inkubationszeit Ausbeuten um 1% und stieg aber nach weiteren 15 Minuten Inkubation nicht mehr an. Möglich wäre, dass nur ein geringer Anteil an Enzym eine Bindung mit dem Coenzym gebildet hatte oder das Enzym nicht in der Lage war sich nach einem Decarboxylierungsvorgang zu regenerieren, was den nicht mehr steigenden Produktzuwachs erklären würde.

Der geringste Erfolg wurde mit der DDC von ATGen erzielt. Der Kontakt mit der Firma ergab, dass das Enzym noch nicht für eine solche Anwendung getestet wurde, jedoch biologisch aktiv sei. Zusätzlich wurde auf die Versuchsanordnung von R&D Systems verwiesen.

Auch trotz Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Minuten blieb die Ausbeute an Dopamin stets unter 1%.

5.3 Histidindecarboxylase

Die verwendete Histidindecarboxylase setzte keines der Substrate um. Gründe dafür könnten sein, dass die HDC ein spezifisches Enzym ist und hauptsächlich Histidin decarboxyliert, außerdem handelt es sich bei dem verwendeten rekombinanten Enzym nicht um das vollständige Protein. Hier stellt sich ebenfalls die Frage, ob das aktive Zentrum überhaupt zur Verfügung stand und in der Lage war das Coenzym zu binden.

5.4 Tyrosindecarboxylase

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass *Streptococcus faecalis* die Fähigkeit besitzt L-DOPA zu decarboxylieren. [10, 35, 39, 45, 46]

Die Versuche mit Extrakten von *Streptococcus faecalis* der Firma Sigma Aldrich ermöglichte die Decarboxylierung von L-DOPA, 6-Fluoro-L-DOPA und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA. Die Anzahl der Versuche war jedoch zu gering um ein optimales Enzym-Substrat-Verhältnis auszuarbeiten. Obwohl versucht wurde, die Versuchsanordnung an jedem Versuchstag so exakt wie möglich zu reproduzieren, sind die Ergebnisse uneinheitlich, dem zugrunde liegt sicher auch die nicht bestimmbare Quantität des Enzyms im Extrakt.

Schon der erste Versuch mit der TDC (3,33%) und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat führte nach 30 Minuten Inkubationszeit zu etwa 30% Produktausbeute. Daher wurde die TDC der DDC von R&D Systems für weitere Versuche vorgezogen. Fast alle nachfolgenden Versuche mit der TDC, bei denen ein Verhältnis von Streptokokken-Extrakt zu Substrat von 1:1 gewählt wurde, führten zu Produktausbeuten zwischen 50 und 90%.

6 Schlussfolgerung

Die *in vitro* Decarboxylierung von L-DOPA, 6-Fluoro-L-DOPA und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA funktioniert am effektivsten mit der DOPA-Decarboxylase aus Extrakten von Organen oder Bakterien und mit keinem oder geringem Erfolg mit rekombinanten Enzymen. Eventuell sind andere Substanzen in diesen Extrakten vorhanden, die am Decarboxylierungsvorgang beteiligt sein könnten. *In vivo* ist ein Gesamtumfeld vorhanden, in dem diese Reaktion gut funktioniert. Wenn diese Reaktion jedoch isoliert *in vitro* durchgeführt wird, scheinen Komponenten für den reibungslosen Ablauf der Reaktion zu fehlen.

7 Zusammenfassung

Ziel:

Ziel dieser Arbeit war es ein Enzym zu finden, das eine rasche und möglichst quantitative Decarboxylierung von 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA zu 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin katalysieren kann.

Methoden:

Es wurden drei verschiedene rekombinante DOPA-Decarboxylasen, eine rekombinante Histidindecarboxylase und eine bakterielle Tyrosindecarboxylase verwendet. Jenes mit der besten katalytischen Fähigkeit wurde für weitere Versuche ausgewählt.

Ergebnisse:

Die bakterielle Tyrosindecarboxylase besaß von den fünf verwendeten Enzymen die beste katalytische Fähigkeit 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA zu 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin umzusetzen. Eine Inkubationszeit von 30 Minuten führte bei Verwendung der Tyrosindecarboxylase bei fast allen Versuchen zu Produktausbeuten über 50%.

Schlagwörter:

Enzym, Decarboxylase, Dopamin, Fluor-18

8 Abstract

Aim:

The aim of this study was to find an enzyme for the rapid and highly quantitative decarboxylation of 6-[¹⁸F]fluoro-L-DOPA to 6-[¹⁸F]fluoro-dopamine.

Methods:

Three different recombinant DOPA decarboxylases, one recombinant histidine decarboxylase and one bacterial tyrosine decarboxylase were used. The one with the best catalytic ability to carry out this reaction was selected for further experiments.

Results:

The bacterial tyrosine decarboxylase possessed the best catalytic ability of these five enzymes to convert 6-[¹⁸F]fluoro-L-DOPA to 6-[¹⁸F]fluoro-dopamine.

With an incubation time of 30 minutes almost every attempt in which the tyrosine decarboxylase has been used led to yields over 50%.

Keywords:

Enzyme, Decarboxylase, Dopamine, Fluorine-18

9 Literatur

- [1] Müller-Esterl W. Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 2. Auflage. Heidelberg (D): Spektrum Akademischer Verlag; 2011;63,461,672
- [2] Bisswanger H. Enzyme – Struktur, Kinetik und Anwendungen. Weinheim (D): Wiley-Vch Verlag; 2015;27-29,33-34,81-91
- [3] Berner H. Kinetik chemischer Reaktionen mit besonderer Berücksichtigung der Enzymkinetik. Vortragsunterlagen 2015. Universität Wien
- [4] Ammon R, Dirscherl W. Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehungen dieser Wirkstoffe zueinander. 3. Auflage in 3 Bänden. Band 3/1 Vitamine. Stuttgart (D): Thieme Verlag; 1974;681-691
- [5] http://proteopedia.org/wiki/index.php/DOPA_Decarboxylase [Zugriff am 27.11.2015]
- [6] <http://biomedphys.sgu.ru/Files/LIB/Springer/Neurotransmitter%20Enzymes%20/02.pdf> [Zugriff am 27.11.2015]
- [7] Moya-Garcia AA, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F. Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. *BioEssays*. 2005;27:57-63
- [8] <https://de.wikipedia.org/wiki/Histidindecarboxylase> [Zugriff am 18.12.2015]
- [9] Nitta Y, Ohshita J, Liu H, Kuronuma Y, Ueno H. Expression of recombinant human histidine decarboxylase with full length and C-terminal truncated forms in yeast and bacterial cells. *J Biol Macromol*. 2010;10:73-82
- [10] Sloane-Stanley GH. The substrate specificity of the tyrosine decarboxylase of *Streptococcus faecalis*. *Biochem J*. 1949;44:373-377
- [11] <http://www.worthington-biochem.com:8080/enzyme-manual/TYD/> [Zugriff am 27.11.2015]

- [12] López-Contreras AJ, Galindo JD, López-García C, Castells MT, Cremades A, Peñafiel R. Opposite sexual dimorphism of 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase in the kidney and small intestine of mice. *J Endocrinol.* 2008;196:615-624
- [13] Berry MD, Juorio AV, Li XM, Boulton AA. Aromatic L-amino acid decarboxylase: A neglected and misunderstood enzyme. *Neurochem Res.* 1996;21:1075-1087
- [14] Minelli A, Charteris AT, Voltattorni CB, John RA. Reactions of DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) decarboxylase with DOPA. *Biochem J.* 1979;183:361-368
- [15] Alberty RA, Hoppe-Seyler F, Siebert G, Thierfelder H. Handbuch der physiologisch- und pathologisch chemischen Analytik. 10. Auflage, Band 6, Teil C. Heidelberg (D): Springer Verlag; 1966;540
- [16] Connil N, Le Breton Y, Dousset X, Auffray Y, Rincé A, Prévost H. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:3537-3544
- [17] Munk K. Taschenlehrbuch Biologie – Biochemie, Zellbiologie. Stuttgart (D): Thieme Verlag; 2008;163-164
- [18] Wink M. Molekulare Biotechnologie – Konzepte, Methoden und Anwendungen. 2. Auflage. Weinheim (D): Wiley-Vch Verlag; 2011;175-183
- [19] <http://www.apexbt.com/t7-tag.html> [Zugriff am 8.12.2015]
- [20] Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas Physiologie. 8. Auflage. Stuttgart (D): Thieme Verlag; 2012;283
- [21] Dellas C. Crashkurs Pharmakologie. 3. Auflage. München (D): Elsevier Urban & Fischer Verlag; 2011;23,63
- [22] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. Stuttgart (D): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2008;322-325,337-339

- [23] Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage. München (D): Elsevier Urban & Fischer Verlag; 2009;115-119,170
- [24] Lüllmann H, Mohr K, Hein L. Taschenatlas Pharmakologie. 6. Auflage. Stuttgart (D): Thieme Verlag; 2008;112
- [25] Schedel A, Thornton S, Klüter H, Bugert P. The effect of psychoactive drugs on in vitro platelet function. *Transfus Med Hemother*. 2010;37:293-298
- [26] Schedel A, Schloss P, Klüter H, Bugert P. The dopamine agonism on ADP-stimulated platelets is mediated through D2-like but not D1-like dopamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008;378:431-439
- [27] Mitterhauser M. Radiopharmazeutische Technologie I. Vortragsunterlagen 2013. Universität Wien
- [28] Schicha H, Schober O. Nuklearmedizin – Basiswissen und klinische Anwendung. 7. Auflage. Stuttgart (D): Schattauer GmbH; 2013;17-24,42,60
- [29] Bailey DL, Townsend DW, Valk PE, Maisey MN. Positron Emission Tomography: Basic Sciences. London (UK): Springer-Verlag London Limited; 2005
- [30] Kromidas S. HPLC für Neueinsteiger. © NOVIA GmbH, <http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf> [Zugriff am 29.8.2015]
- [31] <https://de.wikipedia.org/wiki/Szintillator> [Zugriff am 29.8.2015]
- [32] Nics L. Chromatographie in der qualitativen und quantitativen Bioanalytik – Schwerpunkt HPLC. Vortragsunterlagen 2015. Universität Wien
- [33] Meyer VR. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 10. Auflage. Weinheim (D): Wiley-Vch Verlag; 2009
- [34] Nitta Y, Ohshita J, Liu H, Kuronuma Y, Ueno H. Expression of recombinant human histidine decarboxylase with full length and C-terminal truncated forms in yeast and bacterial cells. *J Biol Macromol*. 2010;10:73-82

- [35] Epps HMR. Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. *Biochem J.* 1944;38:242-249
- [36] © IASON GmbH.
http://www.iason.eu/fileadmin/user_upload/SPC/IASOdopa_austria.pdf [Zugriff am 8.11.2015]
- [37] © R&D Systems. https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-dopa-decarboxylase-ddc-protein-cf_3564-dc [Zugriff am 9.3.2015]
- [38] © Waters Corp.
<http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=WAT020515>
[Zugriff am 8.11.2015]
- [39] Jucker E. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Band 9. Basel (CH): Springer Basel AG; 1966;268
- [40] Goldstein DS, Chang PC, Eisenhofer G, Miletich R, Finn R, Bacher J, et al. Positron emission tomographic imaging of cardiac sympathetic innervation and function. *Circulation.* 1990;81:1606-1621
- [41] Davis VE, Awapara J. A Method for the determination of some amino acid decarboxylases. *J Biol Chem.* 1960;235:124-127
- [42] Holtz P, Westermann E. Über die Dopadecarboxylase und Histidindecaboxylase des Nervengewebes. *Arch Exper Pat. u Pharmakol.* 1956;227:538-546
- [43] Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S. On the identity of DOPA Decarboxylase and 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1972;69:343-347
- [44] Voltattorni CB, Minelli A, Vecchini P, Fiori A, Turano C. Purification and Characterization of 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase from pig kidney. *Eur J Biochem.* 1979;93:181-188
- [45] Udenfriend S, Cooper JR. Assay of L-phenylalanine as phenylethylamine after enzymatic decarboxylation; application to isotopic studies. *J Biol Chem.* 1953;203:953-960

[46] McGilvery RW, Cohen PP. The decarboxylation of L-Phenylalanine by streptococcus faecalis R. *J Biol Chem.* 1948;174:813-816

10 Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AUC	Area under the curve (mAU*min)
c	Konzentration
DDC	DOPA-Decarboxylase
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
HDC	Histidindecarboxylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
min, '	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
PLP	5'-Pyridoxalphosphat
rpm	rounds per minute
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TDC	Tyrosindecarboxylase
UV/VIS	ultraviolett/visible
x	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
σ	Standardabweichung

11 Abbildungen

Abbildung 1: Substratbindungsstelle eines Enzyms (schematisch) [1].....	1
Abbildung 2: Vergleich unkatalysierte und katalysierte Reaktion [1]	1
Abbildung 3: Sättigungskurve der Michaelis-Menten-Kinetik [1].....	3
Abbildung 4: Pyridoxalphosphat	3
Abbildung 5: Reaktionsmechanismus Decarboxylierung von L-DOPA.....	6
Abbildung 6: Biosynthese der Katecholamine	8
Abbildung 7: Synaptische Übertragung durch Dopamin (DA) [23]	9
Abbildung 8: Reaktion 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA zu 6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin.....	14

12 Chromatogramme

Chromatogramm 1: Enzymversuch mit DDC von Novus Biologicals und 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA als Substrat.....	33
Chromatogramm 2: Enzymversuch mit DDC von R&D Systems und 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA als Substrat	34
Chromatogramm 3: Enzymversuch DDC von ATGen und 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA als Substrat	35
Chromatogramm 4: Enzymversuch HDC von Cloud-Clone Corp. und 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA als Substrat	36
Chromatogramm 5: Enzymversuch TDC von Sigma und 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA als Substrat	38
Chromatogramm 6: Beispiel eines Chromatogramms der Auftrennung des Reaktionsgemisches (1,47 MBq 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA; 33,33% TDC; Inkubationszeit 30 Minuten).....	43
Chromatogramm 7: Beispiel eines Chromatogramms der Qualitätskontrolle nach Aufreinigung des 6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamins	43

13 Diagramme

Diagramm 1: Absorption Dopamin.....	29
Diagramm 2: Absorption 6-Fluoro-L-DOPA.....	29
Diagramm 3: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c (Probe 1) = 50 µg/ml, c (Probe 2,3) = 250 µg/ml).....	29
Diagramm 4: Stabilität Dopamin (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c = 500 µg/ml).....	30
Diagramm 5: Stabilität Vitamin B ₆ (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c = 50 µg/ml)	30
Diagramm 6: Enzymversuche mit TDC, mit (n = 3) und ohne (n = 1) Zusatz der essigsauren Lösung (10 µl), TDC (10 µl) und 6-Fluoro-L-DOPA (100 µl).....	31
Diagramm 7: Enzymversuche mit der DDC von Novus Biologicals und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2).....	32
Diagramm 8: Enzymversuche mit der DDC von R&D Systems und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2).....	34
Diagramm 9: Enzymversuche mit der DDC von ATGen und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2).....	35
Diagramm 10: Enzymversuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und unterschiedlichen Inkubationszeiten (n = 2).....	36
Diagramm 11: Enzymversuche mit der TDC von Sigma (L-DOPA: n = 1; 6-Fluoro-L-DOPA: n(30) = 2, n(60) = 1; 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA: n = 2).....	37
Diagramm 12: Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an TDC, Inkubationszeit 30 Minuten; n(0,33) = 2; n(8,33) = 1; n(16,67) = 1; n(25) = 1; n(33,33) = 4; n(53,33) = 2.....	39
Diagramm 13: Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an TDC, Inkubationszeit 60 Minuten; n(0,33) = 2; n(8,33) = 1; n(16,67) = 1; n(25) = 1; n(33,33) = 1; n(53,33) = 2.....	39
Diagramm 14: Enzymversuche mit 33,33% TDC; n(5) = 2; n(10) = 2; n(15) = 4; n(20) = 2; n(25) = 2; n(30) = 4; n(60) = 1.....	40
Diagramm 15: Enzymversuche mit verschiedenen Zugaben an 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA, Inkubationszeit 15 Minuten; n(0,2) = 1; n(0,25) = 1; n(0,40) = 1; n(0,43) = 2; n(0,50) = 1; n(0,55) = 2; n(0,70) = 1; n(0,86) = 2; n(1,00) = 1; n(1,2) = 1; n(1,29) = 2; n(1,72) = 2; n(2,15) = 2.....	41
Diagramm 16: Enzymversuche mit verschiedenen Zugaben an 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA, Inkubationszeit 30 Minuten; n(0,05) = 1; n(0,25) = 1; n(0,40) = 1; n(0,43) = 2; n(0,50) = 2; n(0,55) = 2; n(0,86) = 2; n(1,29) = 2; n(1,36) = 3; n(1,47) = 3; n(1,72) = 2; n(2,15) = 2.....	41
Diagramm 17: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (Raumtemperatur; ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml).....	60
Diagramm 18: Stabilität Dopamin (Raumtemperatur; ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml).....	61
Diagramm 19: Pufferkapazität des Phosphatpuffers (22 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,5) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8).....	63
Diagramm 20: Pufferkapazität des HEPES-Puffers (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8).....	64

14 Tabellen

Tabelle 1: Zugrunde gelegte Verhältnisse für die Überprüfung der Pufferkapazität	20
Tabelle 2: Pipettierschema für die Enzymversuche mit Zusatz der essigsauren Lösung....	21
Tabelle 3: HPLC Agilent 1200 Einstellungen für die Trennung des Reaktionsgemisches ...	24
Tabelle 4: Pipettierschemata für die Versuche mit den DOPA-Decarboxylasen	24
Tabelle 5: Pipettierschemata für die Versuche mit der Histidindecarboxylase.....	25
Tabelle 6: Pipettierschemata für die Versuche mit der Tyrosindecarboxylase	25
Tabelle 7: Verwendete Mengen an 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (MBq).....	26
Tabelle 8: Pipettierschema für den präparativen Enzymversuch	27
Tabelle 9: Konditionierung der Festphasenextraktionskartuschen vor der Verwendung..	27
Tabelle 10: HPLC Agilent 1200 Einstellungen für die Qualitätskontrolle	28
Tabelle 11: Übersicht Enzyme und Eigenschaften	44
Tabelle 12: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (Raumtemperatur, ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml)	60
Tabelle 13: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c (Probe 1) = 50 µg/ml, c (Probe 2,3) = 250 µg/ml)	61
Tabelle 14: Stabilität Dopamin (Raumtemperatur; ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml)	61
Tabelle 15: Stabilität Dopamin (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c = 500 µg/ml).....	62
Tabelle 16: Stabilität Vitamin B ₆ (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm, c = 50 µg/ml)	62
Tabelle 17: Pufferkapazität des Phosphatpuffers (22 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,5) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8)	63
Tabelle 18: Puffkapazität des HEPES-Puffers (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8).....	64
Tabelle 19: Ergebnisse der Enzymversuche mit TDC, 6-Fluoro-L-DOPA und Zusatz essigsaurer Lösung	65
Tabelle 20: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von Novus Biologicals und L-DOPA als Substrat (n = 2)	66
Tabelle 21: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von Novus Biologicals und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)	66
Tabelle 22: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von Novus Biologicals und 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)	66
Tabelle 23: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von R&D Systems und L-DOPA als Substrat (n = 2)	67
Tabelle 24: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von R&D Systems und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2).....	67
Tabelle 25: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von R&D Systems und 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)	67
Tabelle 26: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von ATGen und L-DOPA als Substrat (n = 2).....	68
Tabelle 27: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von ATGen und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)	68

Tabelle 28: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von ATGen und 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)	68
Tabelle 29: Ergebnisse der Versuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und L-DOPA als Substrat (n = 2)	69
Tabelle 30: Ergebnisse der Versuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2).....	69
Tabelle 31: Ergebnisse der Versuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 1)	69
Tabelle 32: Ergebnisse der Versuche mit der TDC von Sigma und L-DOPA als Substrat (n = 1).....	70
Tabelle 33: Ergebnisse der Versuche mit der TDC von Sigma und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)	70
Tabelle 34: Ergebnisse der Versuche mit der TDC von Sigma und 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)	71
Tabelle 35: Ergebnisse der Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an TDC und 6-Fluoro-L-DOPA (33,33%) als Substrat	73
Tabelle 36: Ergebnisse der Versuche mit der TDC (33,33 %) und verschiedenen Zugaben an 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA.....	77
Tabelle 37: Ergebnisse der Enzymversuche mit der TDC und 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA als Substrat zur anschließenden Aufreinigung (1. Versuch)	77
Tabelle 38: Ergebnisse der Enzymversuche mit der TDC und 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA als Substrat zur anschließenden Aufreinigung (2. Versuch).....	77

15 Anhang

15.1 Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA, Dopamin und Vitamin B₆

Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA bei Raumtemperatur in ACN:Puffer

Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)
0	47,94	0	53,23	0	53,03
82	49,82	35	49,55	35	52,15
125	48,05	71	50,43	70	51,96
156	47,20	102	52,28	105	50,33
185	46,91	131	50,92	130	51,26
215	48,04	161	52,50	162	50,71
		191	43,47	190	51,55
		216	48,86	214	48,97

Tabelle 12: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (Raumtemperatur, ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml)

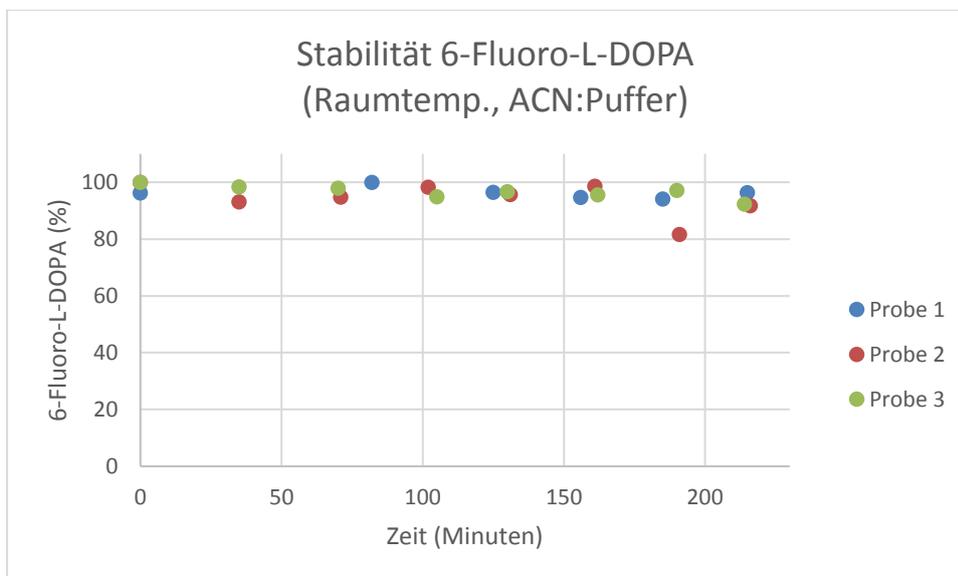


Diagramm 17: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (Raumtemperatur; ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml)

Stabilität von 6-Fluoro-L-DOPA bei 37°C in Puffer

Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)
0	778,50	0	3586,48	0	3197,20
35	718,95	15	2939,45	15	3169,47
60	739,97	30	2920,09	30	2915,79
		45	2731,70	45	2850,01
		60	2609,04	60	2534,65

Tabelle 13: Stabilität 6-Fluoro-L-DOPA (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c (Probe 1) = 50 µg/ml, c (Probe 2,3) = 250 µg/ml)

Stabilität von Dopamin bei Raumtemperatur in ACN:Puffer

Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)
0	81,81	0	79,74	0	86,60
58	82,07	30	84,57	60	85,48
118	85,87	60	86,24	120	85,64
177	82,36	90	85,43	184	85,92
237	81,82	120	83,87	250	84,38
300	78,88	150	79,83	313	83,56
		180	82,36		
		221	79,24		
		245	81,16		
		275	79,39		
		305	77,91		

Tabelle 14: Stabilität Dopamin (Raumtemperatur; ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml)

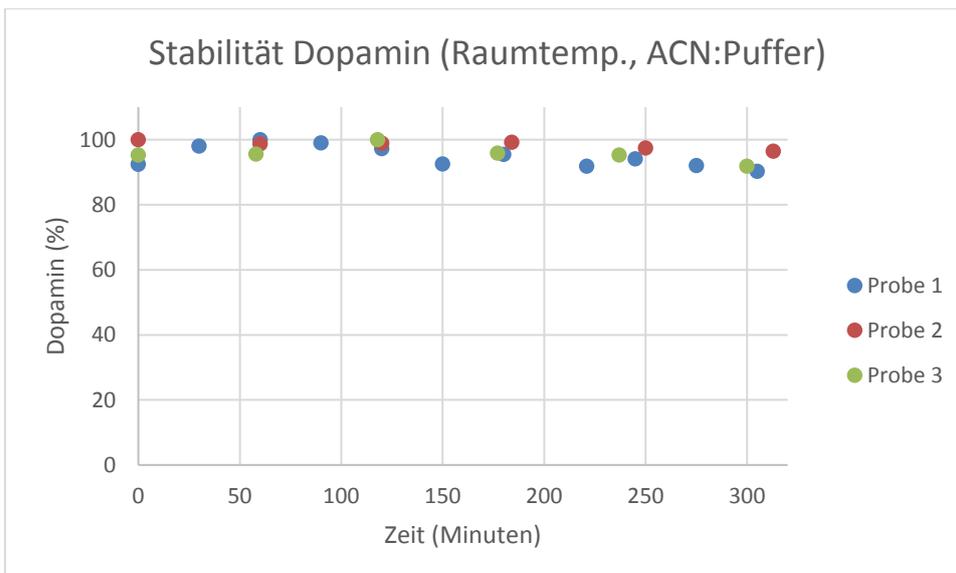


Diagramm 18: Stabilität Dopamin (Raumtemperatur; ACN:Puffer; gemessen bei 254 nm; c = 50 µg/ml)

Stabilität von Dopamin bei 37°C in Puffer

Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)
0	7222,21	0	7294,19
20	7376,86	22	7149,75
45	6911,76	45	6983,79
68	6547,14	68	7029,23

Tabelle 15: Stabilität Dopamin (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm; c = 500 µg/ml)

Stabilität von Vitamin B₆ bei 37°C in Puffer

Zeit (Min)	AUC (mAU*min)	Zeit (Min)	AUC (mAU*min)
0	260,23	0	324,28
15	315,43	15	290,40
30	325,22	30	328,28
45	314,63	45	339,44
60	310,92	60	317,34

Tabelle 16: Stabilität Vitamin B₆ (37°C; Puffer; gemessen bei 280 nm, c = 50 µg/ml)

15.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymfunktion

Puffer 22 mM NaH ₂ PO ₄ (ml)	Essigsäure Lösung (ml)	pH-Wert
18,6	0	5,52
	1	5,53
	2	5,55
	3	5,56
	4	5,58
	5	5,59
	6	5,59
	7	5,60
	8	5,61
	9	5,61
	10	5,62

Tabelle 17: Pufferkapazität des Phosphatpuffers (22 mM NaH₂PO₄, pH 5,5) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8)

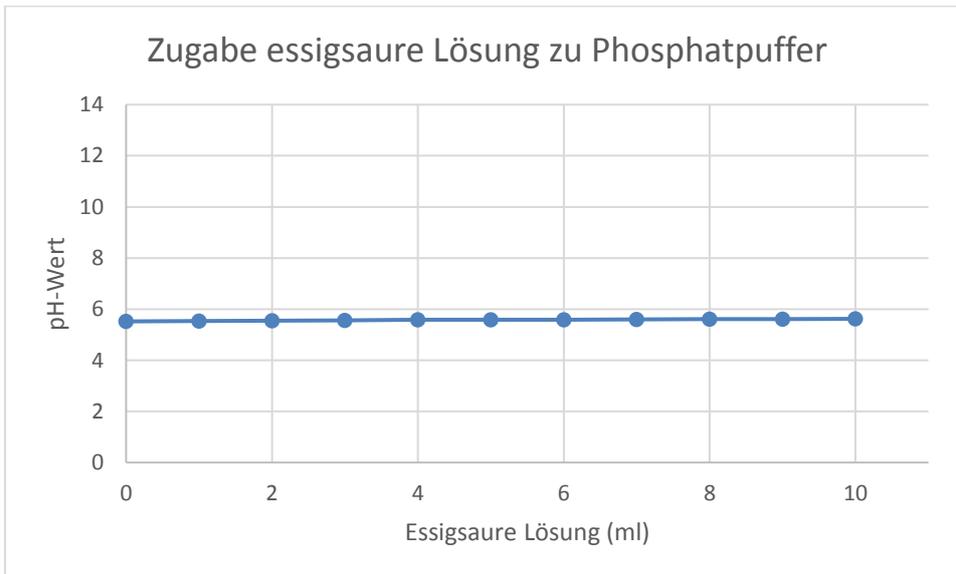


Diagramm 19: Pufferkapazität des Phosphatpuffers (22 mM NaH₂PO₄, pH 5,5) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8)

Puffer 50 mM HEPES, 100 mM NaCl (ml)	Essigsäure Lösung (ml)	pH-Wert
12,6	0	7,21
	1	7,21
	2	7,21
	3	7,21
	4	7,20
	5	7,20
	6	7,19
	7	7,19
	8	7,19
	9	7,19
	10	7,18

Tabelle 18: Puffkapazität des HEPES-Puffers (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8)

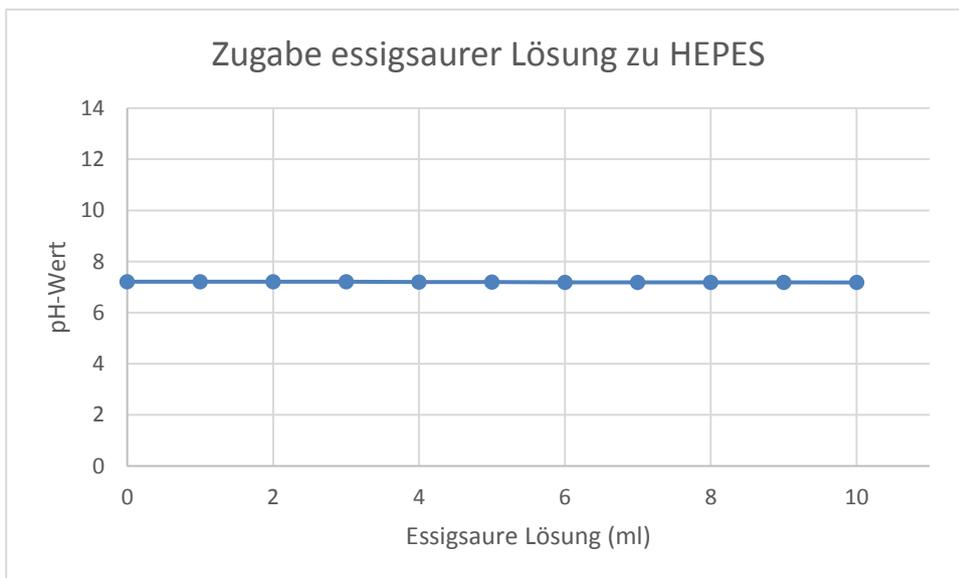


Diagramm 20: Pufferkapazität des HEPES-Puffers (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2) durch Zugabe essigsaurer Lösung (pH 5,8)

Enzymversuche mit Zusatz essigsaurer Lösung

Inkubationszeit (Minuten)	AUC 6-Fluoro- L-DOPA (mAU*min)	6-Fluoro-L- DOPA (%)	AUC F-Dopamin (mAU*min)	F-Dopamin (%)
0	483,95	100,00	0,00	0,00
30	319,53	66,03	150,86	31,17
60	207,03	42,78	242,53	50,11
0	468,59	100,00	0,00	0,00
30	284,23	60,66	162,19	34,61
60	167,93	35,84	255,51	54,53
0	454,90	100,00	0,00	0,00
30	279,05	61,34	164,15	36,09
60	153,68	33,78	273,12	60,04
x (30)				33,96
x (60)				54,89
σ (30)				2,54
σ (60)				4,97

Tabelle 19: Ergebnisse der Enzymversuche mit TDC, 6-Fluoro-L-DOPA und Zusatz essigsaurer Lösung

15.3 Enzymreaktion

15.3.1 DOPA-Decarboxylase

Novus Biologicals

Substrat L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC L-DOPA (mAU*min)	L-DOPA (%)	AUC Dopamin (mAU*min)	Dopamin (%)
x (0)	534,86	100,00	7,69	1,43
x (15)	515,30	96,45	6,08	1,14
x (30)	515,10	96,40	6,34	1,19
σ (0)				0,28
σ (15)				0,03
σ (30)				0,11

Tabelle 20: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von Novus Biologicals und L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-Fluoro-L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC 6-Fluoro-L-DOPA (mAU*min)	6-Fluoro-L-DOPA (%)	AUC F-Dopamin (mAU*min)	F-Dopamin (%)
x (0)	545,12	100,00	6,90	1,27
x (30)	416,91	76,38	5,39	0,99
x (45)	376,33	69,02	5,64	1,04
σ (0)				0,01
σ (30)				0,12
σ (45)				0,01

Tabelle 21: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von Novus Biologicals und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA (0,42 MBq) (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA (%)	Counts 6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin	6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin (%)
x (0)	102747,00	100,00	0,00	0,00
x (15)	85698,60	100,00	0,00	0,00
x (30)	75588,20	100,00	0,00	0,00

Tabelle 22: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von Novus Biologicals und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

R&D Systems

Substrat L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC L-DOPA (mAU*min)	L-DOPA (%)	AUC Dopamin (mAU*min)	Dopamin (%)
x (0)	393,23	100,00	1,61	0,41
x (15)	358,43	91,16	8,94	2,28
x (30)	350,47	89,13	13,48	3,44
σ (0)				0,00
σ (15)				0,31
σ (30)				0,46

Tabelle 23: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von R&D Systems und L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-Fluoro-L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC 6-Fluoro- L-DOPA (mAU*min)	6-Fluoro-L- DOPA (%)	AUC F- Dopamin (mAU*min)	F-Dopamin (%)
x (0)	533,84	100,00	1,72	0,33
x (15)	488,52	91,50	5,30	0,99
x (30)	446,23	83,60	4,45	1,02
σ (0)				0,04
σ (15)				0,72
σ (30)				0,47

Tabelle 24: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von R&D Systems und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-¹⁸F]Fluoro-L-DOPA (1,08 MBq) (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6- [¹⁸F]Fluoro-L- DOPA	6-[¹⁸F]Fluoro-L- DOPA (%)	Counts 6- [¹⁸F]Fluoro- Dopamin	6-[¹⁸F]Fluoro- Dopamin (%)
x (0)	195053,13	100,00	0,00	0,00
x (15)	107250,52	92,47	8599,47	7,53
x (30)	57215,55	87,49	8028,71	12,51
σ (0)				0,00
σ (15)				1,71
σ (30)				2,28

Tabelle 25: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von R&D Systems und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

ATGen

Substrat L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC L-DOPA (mAU*min)	L-DOPA (%)	AUC Dopamin (mAU*min)	Dopamin (%)
x (0)	485,66	100,00	0,89	0,19
x (30)	402,00	82,84	1,16	0,24
x (60)	389,42	80,37	0,99	0,21
σ (0)				0,02
σ (30)				0,11
σ (60)				0,09

Tabelle 26: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von ATGen und L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-Fluoro-L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC 6-Fluoro- L-DOPA (mAU*min)	6-Fluoro-L- DOPA (%)	AUC F- Dopamin (mAU*min)	F-Dopamin (%)
x (0)	578,28	100,00	1,54	0,27
x (30)	495,43	85,67	0,76	0,13
x (60)	443,91	76,76	1,32	0,23
σ (0)				0,13
σ (30)				0,04
σ (60)				0,13

Tabelle 27: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von ATGen und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-¹⁸F]Fluoro-L-DOPA (0,64 MBq) (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6- [¹⁸F]Fluoro-L- DOPA	6-[¹⁸F]Fluoro-L- DOPA (%)	Counts 6- [¹⁸F]Fluoro- Dopamin	6-[¹⁸F]Fluoro- Dopamin (%)
x (0)	131059,00	100,00	0,00	0,00
x (30)	66317,53	100,00	0,00	0,00
x (60)	48939,55	100,00	0,00	0,00

Tabelle 28: Ergebnisse der Versuche mit der DDC von ATGen und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

15.3.2 Histidin-Decarboxylase

Cloud-Clone Corp.

Substrat L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC L-DOPA (mAU*min)	L-DOPA (%)	AUC Dopamin (mAU*min)	Dopamin (%)
x (0)	493,90	100,00	0,00	0,00
x (30)	410,69	83,22	0,00	0,00
x (60)	404,87	82,12	0,00	0,00

Tabelle 29: Ergebnisse der Versuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-Fluoro-L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC 6-Fluoro-L-DOPA (mAU*min)	6-Fluoro-L-DOPA (%)	AUC F-Dopamin (mAU*min)	F-Dopamin (%)
x (0)	550,93	100,00	0,00	0,00
x (30)	442,90	81,09	0,00	0,00
x (60)	342,42	62,74	0,00	0,00

Tabelle 30: Ergebnisse der Versuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA (0,64 MBq) (n = 1)

Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA (%)	Counts 6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin	6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin (%)
x (0)	105228,5	100,00	0,00	0,00
x (30)	64391,9	100,00	0,00	0,00
x (60)	47889,8	100,00	0,00	0,00

Tabelle 31: Ergebnisse der Versuche mit der HDC von Cloud-Clone Corp. und 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 1)

15.3.3 Tyrosindecaboxylase

Sigma-Aldrich

Substrat L-DOPA (n = 1)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC L-DOPA (mAU*min)	L-DOPA (%)	AUC Dopamin (mAU*min)	Dopamin (%)
0	527,8903	100,00	0,0	0,00
30	325,2575	61,62	58,9522	11,17
60	216,9865	41,11	86,8436	16,45

Tabelle 32: Ergebnisse der Versuche mit der TDC von Sigma und L-DOPA als Substrat (n = 1)

Substrat 6-Fluoro-L-DOPA (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	AUC 6-Fluoro-L-DOPA (mAU*min)	6-Fluoro-L-DOPA (%)	AUC F-Dopamin (mAU*min)	F-Dopamin (%)
0	483,7828	100,00	0,0	0,00
30	348,4745	72,03	23,9343	4,95
45	265,4502	54,87	42,1408	8,71
0	477,5276	100,00	0,0	0,00
30	362,1350	75,84	160,4906	33,61
60	225,6303	47,25	224,7670	47,07
x (30)				19,28
σ (30)				20,27

Tabelle 33: Ergebnisse der Versuche mit der TDC von Sigma und 6-Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

Substrat 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA (1,0 MBq) (n = 2)

Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA	6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (%)	Counts 6- ^[18F] Fluoro-Dopamin	6- ^[18F] Fluoro-Dopamin (%)
0	140513,4	100,00	0,0	0,00
30	58586,6	68,30	27188,9	31,70
60	24794,7	44,73	30638,6	55,27
0	117155,8	100,00	0,0	0,00
30	51340,5	67,93	24236,9	32,07
60	21738,9	44,83	26756,44	55,17
x (30)				31,89
x (60)				55,22
σ (30)				0,26
σ (60)				0,07

Tabelle 34: Ergebnisse der Versuche mit der TDC von Sigma und 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA als Substrat (n = 2)

Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an Tyrosindecaboxylase (Zugabe 6-Fluoro-L-DOPA 33,33%)

TDC (%)	Inkubationszeit (Minuten)	AUC 6-Fluoro-L-DOPA (mAU*min)	6-Fluoro-L-DOPA (%)	AUC F-Dopamin (mAU*min)	F-Dopamin (%)
0,33	0	422,36	100,00	0,00	0,00
	30	409,01	96,84	10,26	2,43
	60	415,86	98,47	14,10	3,34
	0	401,51	100,00	0,00	0,00
	30	397,00	98,88	10,41	2,59
	60	392,17	97,68	18,53	4,61
x (30)					2,51
x (60)					3,98
σ (30)					0,11
σ (60)					0,90
8,33	0	391,99	100,00	0,00	0,00
	30	196,48	50,12	219,56	56,01
	60	15,61	3,98	359,41	91,69
16,67	0	402,81	100,00	0,00	0,00
	30	147,46	36,61	288,43	71,61
	60	0,00	0,00	379,95	94,33

25,00	0	425,75	100,00	0,00	0,00
	30	139,00	32,65	310,07	72,83
	60	0,00	0,00	371,07	87,16
33,33	0	437,49	100,00	0,00	0,00
	30	0,00	0,00	383,56	87,67
	60	0,00	0,00	366,74	83,83
	0	493,08	100,00	0,00	0,00
	5	212,29	43,05	298,84	60,61
	10	45,58	9,24	484,04	98,17
	15	25,55	5,18	494,71	100,33
	20	23,41	4,75	502,44	101,90
	25	24,63	5,00	490,72	99,52
	0	581,65	100,00	0,00	0,00
	15	59,62	10,30	423,59	72,80
	30	34,71	6,00	444,59	76,40
	0	592,70	100,00	0,00	0,00
	15	65,21	11,00	439,77	74,20
	30	34,48	5,80	468,20	79,00
	0	569,57	100,00	0,00	0,00
	5	312,48	54,86	273,29	47,98
	10	180,66	31,72	458,82	80,56
	15	68,04	11,95	534,79	93,89
	20	47,24	8,29	513,47	90,15
	25	45,68	8,02	506,40	88,91
	30	46,17	8,11	521,18	91,50
x (5)					54,30
x (10)					89,37
x (15)					85,31
x (20)					96,03
x (25)					94,22
x (30)					83,64
σ (5)					8,93
σ (10)					12,45
σ (15)					4,55
σ (20)					8,31
σ (25)					7,50
σ (30)					7,12
53,33	0	505,33	100,00	0,00	0,00

	30	215,38	42,62	352,93	69,84
	60	64,09	12,68	434,89	86,06
	0	519,07	100,00	0,00	0,00
	30	217,24	41,85	330,14	63,60
	60	64,86	12,50	426,38	82,14
x (30)					66,72
x (60)					84,10
σ (30)					4,41
σ (60)					2,77

Tabelle 35: Ergebnisse der Enzymversuche mit verschiedenen Volumina an TDC und 6-Fluoro-L-DOPA (33,33%) als Substrat

Enzymversuche mit verschiedenen Zugaben an 6-[¹⁸F]Fluoro-L-DOPA

(Zugabe TDC 33,33%)

6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA (MBq/%)	Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA	6-[¹⁸ F]Fluoro-L-DOPA (%)	Counts 6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin	6-[¹⁸ F]Fluoro-Dopamin (%)
0,05/0,03	0	3270,80	100,00	0,00	0,00
	30	781,00	6,13	11950,80	93,87
0,20/0,13	15	48191,10	61,13	30648,10	38,87
0,25/0,17	0	8771,70	100,00	0,00	0,00
	15	911,80	60,58	593,30	39,42
	30	18249,10	28,10	46688,10	71,90
0,40/0,27	0	7853,40	100,00	0,00	0,00
	15	1419,50	86,70	217,70	13,30
	30	56611,40	60,66	36707,10	39,34
0,43/0,29	0	45330,80	100,00	0,00	0,00
	15	8846,20	47,39	9820,10	52,61
	30	1570,10	21,78	5640,00	78,22
	0	52950,70	100,00	0,00	0,00
	15	9276,90	44,79	11435,10	55,21
	30	1761,20	19,70	7176,70	80,30
x (15)					53,91
x (30)					79,26
σ (15)					1,84
σ (30)					1,47
0,50/0,33	15	21550,30	60,51	14064,10	39,49
	0	140513,40	100,00	0,00	0,00
	30	58586,60	68,30	27188,90	31,70
	60	24794,70	44,73	30638,60	55,27
	0	117155,80	100,00	0,00	0,00
	30	51340,50	67,93	24236,90	32,07
	60	21738,90	44,83	26756,44	55,17
x (30)					31,89
x (60)					55,22
σ (30)					0,26

σ (60)					0,07
0,55/0,37	0	247968,80	97,67	5914,00	2,33
	5	71179,40	37,15	120401,70	62,85
	10	17449,20	11,21	138215,00	88,79
	15	4638,40	3,60	124085,00	96,39
	20	2286,50	2,08	107747,60	97,92
	25	1341,10	1,48	89058,00	98,51
	30	460,60	0,63	72211,70	99,37
	0	222459,20	97,82	4978,80	2,19
	5	67329,00	37,19	113721,80	62,81
	10	16867,90	11,64	128013,90	88,36
	15	3181,30	3,24	113704,50	96,76
	20	1549,50	1,63	93977,60	98,38
	25	705,30	0,88	79483,80	99,12
	30	979,20	1,45	66755,10	98,55
x (5)					62,83
x (10)					88,58
x (15)					96,58
x (20)					98,15
x (25)					98,82
x (30)					98,96
σ (5)					0,03
σ (10)					0,30
σ (15)					0,26
σ (20)					0,33
σ (25)					0,43
σ (30)					0,58
0,70/0,47	15	139334,30	95,58	6439,10	4,42
0,86/0,57	0	76665,00	100,00	0,00	0,00
	15	16766,70	54,53	13978,80	45,47
	30	3521,50	26,94	9552,10	73,06
	0	84267,70	100,00	0,00	0,00
	15	18855,70	54,54	15714,90	45,46
	30	3636,70	26,86	9901,00	73,14
x (15)					45,47
x (30)					73,10
σ (15)					0,01
σ (30)					0,06

1,00/0,67	15	208225,70	98,75	2629,60	1,25
1,20/0,80	15	259794,90	99,30	1835,80	0,70
1,29/0,86	0	99988,10	100,00	0,00	0,00
	15	25837,30	62,64	15406,90	37,36
	30	6339,940	34,09	1225,90	65,91
	0	108495,30	100,00	0,00	0,00
	15	27123,00	62,36	16369,80	37,64
	30	125270,20	32,52	250677,50	65,07
x (15)					37,50
x (30)					65,49
σ (15)					0,20
σ (30)					0,59
1,36/0,90	30	19490890,00	15,59	10556057,00	84,41
	30	1187174,00	12,07	8647647,00	87,93
	30	1027371,00	10,70	8576171,00	89,30
x (30)					87,21
σ (30)					2,52
1,47/0,98	30	3661542,00	26,82	9990645,00	73,18
	30	2800708,00	24,99	8406402,00	75,01
	30	1988475,00	20,59	7669448,00	79,41
x (30)					75,87
σ (30)					3,20
1,72/1,15	0	109361,90	100,00	0,00	0,00
	15	31176,50	67,28	15160,30	32,72
	30	8580,80	39,57	21683,50	60,43
	0	114463,80	100,00	0,00	0,00
	15	29542,70	61,38	18588,50	38,62
	30	138945,50	32,69	286044,50	67,31
x (15)					35,67
x (30)					63,87
σ (15)					4,17

σ (30)					4,86
2,15/1,43	0	129349,80	100,00	0,00	0,00
	15	37635,00	70,39	15829,90	29,61
	30	230318,70	43,66	297222,50	56,34
	0	116906,90	100,00	0,00	0,00
	15	33926,00	69,87	14628,70	30,13
	30	12155,20	45,27	14696,60	54,73
x (15)					29,87
x (30)					55,54
σ (15)					0,37
σ (30)					1,14

Tabelle 36: Ergebnisse der Versuche mit der TDC (33,33 %) und verschiedenen Zugaben an 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA

15.4 Isolierung, Aufreinigung und Qualitätskontrolle

6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (MBq/%)	Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA	6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (%)	Counts 6- ^[18F] Fluoro-Dopamin	6- ^[18F] Fluoro-Dopamin (%)
2,71/0,90	30	1949089	15,59	10556057	84,41
	30	1187174	12,07	8647647	87,93
	30	1027371	10,70	8576171	89,30

Tabelle 37: Ergebnisse der Enzymversuche mit der TDC und 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA als Substrat zur anschließenden Aufreinigung (1. Versuch)

Nach Aufreinigung mit Sep-Pak Light:

Probe	Counts 6- ^[18F] Fluoro-Dopamin
1	19395,6
2	14528,0
3	9751,2

6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (MBq/%)	Inkubationszeit (Minuten)	Counts 6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA	6- ^[18F] Fluoro-L-DOPA (%)	Counts 6- ^[18F] Fluoro-Dopamin	6- ^[18F] Fluoro-Dopamin (%)
2,94/0,98	30	3661542	26,82	9990645	73,18
	30	2800708	24,99	8406402	75,01
	30	1988475	20,59	7669448	79,41

Tabelle 38: Ergebnisse der Enzymversuche mit der TDC und 6-^[18F]Fluoro-L-DOPA als Substrat zur anschließenden Aufreinigung (2. Versuch)

Nach Aufreinigung mit Sep-Pak Plus:

Probe	Counts 6-[¹⁸F]Fluoro-Dopamin
1	36494,3
2	36550,2
3	33895,4