

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



***In vivo*-Bildgebung transplanteder neonataler Schweineinseln
im diabetischen Mausmodell mit Gallium-68-markiertem Exendin-4
hoher molarer Aktivität zur Kontrolle der Transplantatsviabilität**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Felix Lindheimer

aus

Bad Friedrichshall

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: *Prof. Dr. Sibylle Ziegler*

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Clemens Cyran

Drittes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Georg Beyer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.08.2024



Eidesstattliche Versicherung

Lindheimer, Felix

—

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

***In vivo*-Bildgebung transplanteder neonataler Schweineinzellen im diabetischen Mausmodell mit Gallium-68-markiertem Exendin-4 hoher molarer Aktivität zur Kontrolle der Transplantatsviabilität**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 16.09.2024

Felix Lindheimer

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Zusammenfassung

Radioaktiv markierte Tracer bieten die Möglichkeit, molekulare Prozesse *in vivo* quantitativ zu beobachten. Die Markierung mit Gallium-68 ermöglicht hierbei den Einsatz in der Positronen-Emissions-Tomographie. Ziel dieser Arbeit war es, die Synthese von [⁶⁸Ga]Ga-Exendin-4 als GLP-1-Rezeptor-Liganden zur Detektion transplantierte neonataler Inselzellen zu etablieren.

Zur Detektion der transplantierten Inselzellmasse mit [⁶⁸Ga]Ga-Exendin-4 wurden im Rahmen der Studie sieben NSG-Mäuse untersucht. Zur Etablierung wurden hierfür mehrere Testsynthesen und präklinische Vorversuche durchgeführt. Nach Positronen-Emissions-Tomographie wurden die Tiere seziiert und Autoradiographie-Daten der Transplantationsorte (linke Nierenrinde, n = 3; Inguinalfalte, n = 1; Oberschenkelmuskel, n = 3) und Referenzregionen ohne Transplantat erstellt.

[⁶⁸Ga]Ga-Exendin-4 konnte im Zuge der Arbeit mit hohen molaren Aktivitäten markiert werden. Die Aufreinigung ergab Volumenaktivitäten von bis zu 1 MBq/μL. Der Arbeitsablauf von der Synthese bis zur Anwendung wurde standardisiert und konnte in weniger als 35 min durchgeführt werden. Die Auswertung der *in vivo*- und der *ex vivo*-Daten ergab positive Signale im Bereich der Transplantate. Die *in vivo*-Messung des Transplantats im Oberschenkel ergab ein um Faktor 4 größeres Anreicherungssignal im Vergleich zur Referenzregion und konnte visuell gut beobachtet werden. Für das Transplantat in der Nierenrinde und der Inguinalfalte konnte *in vivo* aufgrund des hohen Uptakes der Niere bzw. der benachbarten Blase keine Unterscheidung zum Hintergrund ermittelt werden. In der *ex vivo*-Autoradiographie konnte das Transplantat im Oberschenkelmuskel und in der Inguinalfalte jedoch eindeutig lokalisiert werden.

Die molare Aktivität der [⁶⁸Ga]Ga-Exendin-4-Markierung war gegenüber anderen Publikationen deutlich erhöht. Sowohl die *in vivo*- als auch *ex vivo*-Daten zeugen von der Funktion der Transplantate. Da die Leber nur eine geringe Akkumulation aufweist und besser durchblutet ist als der Beinmuskel, könnte sie ein günstigerer Ort für die Untersuchung der Inselzelltransplantation sein. Positronen-Emissions-Tomographie mit [⁶⁸Ga]Ga-Exendin-4 bietet die Möglichkeit, die Viabilität transplantierte Inselzellen auch im Verlauf nicht invasiv zu beobachten.

Abstract

Radioactive labeled tracers offer the possibility of quantitatively observing molecular processes *in vivo*. Labeling with gallium-68 enables the use in positron emission tomography. The aim of this work was to establish the synthesis of [⁶⁸Ga]Ga-exendin-4 as a GLP-1 receptor ligand for the detection of transplanted neonatal islet cells.

To detect the transplanted islet cell mass with [⁶⁸Ga]Ga-exendin-4, seven NSG-mice were examined as part of the study. Several test syntheses and preclinical experiments were carried out to establish this. After Positron-Emission-Tomography, the animals were dissected and autoradiography data of the transplantation sites (left renal cortex, n = 3; inguinal fold, n = 1; thigh muscle, n = 3) and reference regions without graft were generated.

[⁶⁸Ga]Ga-exendin-4 could be labeled with high molar activities in the course of the work. The purification resulted in volume activities of up to 1 MBq/μL. The workflow from synthesis to application was standardized and could be performed in less than 35 min. The evaluation of the *in vivo* and *ex vivo* data revealed positive signals in the area of the grafts. The *in vivo* measurement of the transplant in the thigh resulted in an enrichment signal that was four times higher than in the reference region and could be easily observed visually. For the graft in the renal cortex and the inguinal fold, no differentiation from the background could be determined *in vivo* due to the high uptake of the kidney or the neighboring bladder. In *ex vivo* autoradiography, however, the graft could be clearly localized in the thigh muscle and in the inguinal fold.

The molar activity of [⁶⁸Ga]Ga-exendin-4 labeling was significantly increased compared to other publications. Both the *in vivo* and *ex vivo* data prove the function of the grafts. Since the liver has only a low accumulation and is better supplied with blood than the leg muscle, it could be a more favorable site for the investigation of islet cell transplantation. Positron-Emission-Tomography with [⁶⁸Ga]Ga-exendin-4 offers the possibility of non-invasively monitoring the viability of transplanted islet cells during the course of the disease.

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyase
AR	Autoradiographie
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Biokünstlicher Pankreas
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DOTA	2,2',2'',2'''-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
ECD	Extrazelluläre Domäne
Epac	Exchange Protein Directly Activated by cAMP
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GLC	Glucose
GLP-1(R)	Glucagon-like Peptide 1(-Rezeptor)
GLUT4	Glucose Transporter 4
hGLP-1	Humanes Glucagon-like Peptide 1
IEQ	Inseläquivalente
IL2R	Interleukin-2-rezeptor
Ins	Insulin
IP	Imaging Platte
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
MRT	Magnetresonanztomographie
NHP	Non-human Primate
NODAGA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-essigsäure
NPICC	Neonatale porzine Inselzellcluster
NSG	NOD scid gamma
PDK1	Phosphatidylinositolabhängige Proteinkinase 1
PDX1	Insulin Promoter Factor 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA/B	Proteinkinase A/B
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie
STZ	Streptozotocin
SUV	Standardized Uptake Value
T1D / T2D	Typ 1 Diabetes / Typ 2 Diabetes
TMD	Transmembrandomäne
VDCC	Spannungsabhängiger Calciumkanal
Vol	Volume of Interest

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	4
Abstract	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Liste der Publikationen.....	8
1. Einleitung.....	9
1.1 Diabetes.....	9
1.2 Tiermodelle.....	10
1.2.1 LEA29Y-tg-Schweine als Spendertiere für Inselzellen	10
1.2.2 NSG-Mäuse als Empfängertiere resistenter Betazellen	10
1.3 The Sweet Ways of Life – Der Mechanismus der Zuckerverwertung	12
1.3.1 Das Glucagon-like Peptide 1 und Rezeptorinteraktion	12
1.3.2 Insulin	13
1.3.3 Exendin-4.....	14
1.4 Grundlagen der Nuklearmedizin	15
1.4.1 Allgemein.....	15
1.4.2 Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie	16
1.4.3 Autoradiographie	17
1.5 Radiochemie	19
1.5.1 Radiopharmaka in der Nuklearmedizin.....	19
1.5.2 Rezeptorabhängigkeit und molare Aktivität	20
1.6 Ziel	22
2. Material und Methoden	24
2.1. Grundschemata der Arbeit.....	24
2.2 Materialien	24
2.3 Radiomarkierung und Aufreinigung des Exendin-4.....	25
2.4 Tierexperimente	25
2.4.1 Tiermodelle und Transplantation.....	25
2.4.2 <i>In vivo</i> -Bildgebung und Analyse	26
2.5 Autoradiographie	26
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Radiomarkierung	27
3.3 Autoradiographie	29
4. Diskussion.....	31
Literaturverzeichnis.....	33
Danksagung	37
Curriculum Vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Liste der Publikationen

Diese Arbeit beinhaltet Teile folgender Publikation:

- **Lindheimer, F.**, Lindner, M. J., Oos, R., Honarpisheh, M., Zhang, Y., Lei, Y., Wolf-van Bürck, L., Gildehaus, F. J., Lindner, S., Bartenstein, P., Kemter, E., Wolf, E., Seißler, J., Ziegler, S. Non-invasive in vivo imaging of porcine islet xenografts in a preclinical model with [68Ga]Ga-exendin-4, *Frontiers in Nuclear Medicine* **2023**; 3.
<https://doi.org/10.3389/fnume.2023.1157480>

Weitere Publikationen:

- Meindl, M., Bläske, A., Steiger, K., Lindner, S., **Lindheimer, F.**, Lauber, K., Brix, N., von Ungern-Sternberg, B., Oos, R., Palumbo, G., Böning, G., Schüle, S., Majewski, M., Port, M., Ziegler, S., Bartenstein, P. Proliferation and apoptosis after whole-body irradiation: longitudinal PET study in a mouse model, *European Journal of Nuclear Medicine and molecular Imaging* **2023**.
<https://doi.org/10.1007/s00259-023-06430-x>
- Kostelnik, T. I., Scheiber, H., Cappai, R., Choudhary, N., **Lindheimer, F.**, de Guadalupe Jaraquemada-Peláez, M., Orvig, C. Phosphonate Chelators for Medicinal Metal Ions, *Inorganic Chemistry* **2021**, 60, 7, 5343–5361.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c00290>
- Strobl, N., Droseros, N. D., Köntges, W., Pietsch, M., Schliske, S., **Lindheimer, F.**, Schröder, R., Lemmer, U., Pfannmöller, M., Banerji, N., Hernandez-Sosa, G. Color-Selective Printed Organic Photodiodes for Filterless Multichannel Visible Light Communication, *Advanced Materials* **2020**, 32, 1908258.
<https://doi.org/10.1002/adma.201908258>

1. Einleitung

Mit steigender Lebenserwartung erhöht sich auch die Anzahl der Menschen mit Volkskrankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Demenz und Diabetes (1, 2). Die Gründe dafür, können sowohl genetisch als auch umwelt- oder ernährungsbedingt sein. Ein gutes Beispiel dafür liefert die Diabeteserkrankung. Klassifiziert wird Diabetes durch einen absoluten oder relativen Insulinmangel, ein Peptid, welches nach der Nahrungsaufnahme von den Betazellen des Pankreas sekretiert wird, um anderen Zellen die Aufnahme von Blutzucker ins Zellinnere zu ermöglichen (3). Durch Insulinmangel kommt es zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel der Azidosen, Ketosen und Glucosurie bewirken kann (4).

1.1 Diabetes

Der Insulinmangel eines Diabetespatienten kann dabei mehrere Ursachen haben. Eine durch ungesunde Ernährung, mangelnde Bewegung, übermäßigen Alkoholkonsum hervorgerufene und meist im fortgeschrittenen Alter auftretende Erkrankung beschreibt dabei den Typ 2 Diabetes (T2D), bei dem die Zellen eine Insulinresistenz aufbauen oder die Betazellen nur noch vermindert Insulin ausschütten (5, 6). Dieser macht ca. 90% aller Diabetesfälle aus. Demgegenüber handelt es sich beim Typ 1 Diabetes (T1D) um eine Insulinmangelerkrankung, die durch die autoimmune Zerstörung der Betazellen im Heranwachsendenalter auftritt (4). Die Autoimmunkrankheit führt dabei zum absoluten Insulinmangel und tritt bei ca. 10% aller Diabetiker auf (4).

Die Zahl der Fälle von T1D hat seit den 1950er Jahren weltweit erheblich zugenommen und steigt zu Beginn des 21. Jahrhunderts immer noch um bis zu 3% pro Jahr (7, 8). Therapiert wird die Erkrankung durch Insulininjektionen oder einer kontinuierlichen Insulininfusion über Insulinpumpen, wie z. B. durch den Einsatz einer bioartificialen Bauchspeicheldrüse (BAP, von engl. *bioartificial pancreas*), um die Fehlfunktion der Bauchspeicheldrüse zu überwinden (9, 10). Trotz ständiger technischer Verbesserungen der BAP-Technologien ist jedoch die Blutzuckerkontrolle bei einem kleinen Teil der T1D-Patienten nach wie vor ungeeignet, da bei diesen Patienten unvorhersehbare lebensbedrohliche Hypoglykämien auftreten können (11). In den letzten Jahren wird zunehmend eine neue Strategie verfolgt, die Zellersatztherapien mit isolierten Inselzellen oder Betazellen aus embryonalen oder induzierten pluripotenten Stammzellen umfasst (12). Da es einen erheblichen Mangel an menschlichen Insel Spendern gibt, sind genetisch veränderte Inseln von anderen Tierarten, wie z. B. genetisch veränderten Schweinen, von größerem Interesse (11, 13). Jüngste Studien haben bereits gezeigt, dass neonatale porcine Inselzellcluster (NPICCs, von engl. *neonatal porcine islet cell cluster*) eine vielversprechende alternative Betazellquelle für die Inseltransplantation darstellen könnten (14, 15).

1.2 Tiermodelle

1.2.1 LEA29Y-tg-Schweine als Spendertiere für Inselzellen

Schweine können genetisch so verändert werden, dass sich ihre Organe zur Transplantation in den menschlichen Körper eignen, ohne dass sie vom humanen Immunsystem abgestoßen werden, wie kürzlich die erste Schweineherz xenotransplantation in den Menschen gezeigt hat (16). Genetische Veränderungen an Inselependerschweinen zielen darauf ab, eine lokale immunprotektive Mikroumgebung zu etablieren, die Inselzellen xenotransplantierte vor Transplantatabstoßung schützt, obwohl keine systemische Immunsuppression durchgeführt wird (13).

Zur Gewinnung stabiler NPICCs wurden im Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität, München in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Eckhard Wolf LEA29Y-tg-Schweine gezüchtet, deren Betazellen auf der Zelloberfläche das Protein LEA29Y aufweisen (17). Zur Züchtung der transgenen Tiere wurde die genetische Kodierungssequenz des LEA29Y-Oberflächenproteins zuerst in den betazellenspezifischen Expressionsvektor des Schweineinsulins eingeschrieben und anschließend durch Nucleofektion in fetale Schweinefibroblasten eingefügt (18, 19). Stabile Klone dieser Zellen wurden dann als Spenderzellen zum somatischen Zellkerntransfer verwendet und laparoskopisch im Zuge eines Embryonentransfers in ein Versuchstier eingepflanzt (20). Nach Kontrolle des Klonerfolgs wurden weitere LEA29Y-tg-Schweine durch erneutes Klonen gewonnen (21).

Beim LEA29Y-Oberflächenprotein handelt es sich um eine hochaffine Variante des CTLA-4-Immunoglobulins (von engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*), das diverse T-Zellen nach Aktivierung der Immunantwort auf der Zelloberfläche exprimieren, um eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern (17). T-Zellen selbst benötigen zur Aktivierung sowohl ein antigenabhängiges Signal als auch eine Co-Stimulation um eine Immunantwort hervorzurufen. Die Modifikation mit LEA29Y führt dazu, dass das T-Zellen-Oberflächenprotein CD28 mit LEA29Y um die Membranproteine antigen-präsentierender Zellen B7.1/CD80 und B7.2/CD86 konkurrieren muss (17, 22). Diese ermöglichen dem Immunsystem die Erkennung pathogener Zellen. Durch hohe Affinität und Expression des LEA29Y kommt es vermehrt zur Interaktion zwischen B7.1 und B7.2 mit LEA29Y und damit zur Inhibierung der T-Zellenaktivität (23). Somit sinkt die Intensität der Immunantwort und es kommt zu einer erhöhten *in vivo*-Stabilität der NPICCs.

Ein weiterer Vorteil der genetisch modifizierten Inselzellen ist die Resistenz gegenüber dem humanen Immunsystem (24). So kann es bei humanen Spenderzellen in T1D-Patienten zu einer erneuten Zerstörung des Transplantats kommen, die bei den Zellen mit LEA29Y-Mutation nicht auftritt.

1.2.2 NSG-Mäuse als Empfängertiere resistenter Betazellen

Neben der Erzeugung genetisch modifizierter Transplantate dienen präklinische Tiermodelle Wissenschaftlern auch dazu, ihre Ideen und Konzepte ohne Gefährdung menschlichen Lebens *in vivo*

zu testen. Aufgrund evolutionärer Gemeinsamkeiten bieten sich diesbezüglich vor allem menschenverwandte Tiere der Primatengruppe (NHPs, von engl. *non-human primates*) an, da sie uns physiologisch und psychologisch sehr ähnlich sind. Jedoch liegt auch gerade in diesen Gemeinsamkeiten der Grund, warum NHPs von Forschenden ungern als Versuchstiere eingesetzt werden. Um den Mangel menschlicher oder menschenähnlicher Versuchsmodelle auszugleichen, bietet die Entwicklung humanisierter Tiermodelle eine willkommene Alternative (25). Aufgrund der hohen Replikationsrate eignen sich Kleintiere wie Mäuse und Ratten besonders gut für solche Versuche. In den US-amerikanischen Jackson-Laboratorien wurden mehrere genetisch modifizierte Mäuselinien gezüchtet. Um das humane Immunsystem zu simulieren werden bevorzugt NSG-Mäuse (NOD scid gamma Mäuse, von englisch *non-obese diabetic mice with severe combined immunodeficiency with IL2R γ -mutation*) verwendet (26). Der betreffende Interleukin-2-Rezeptor (IL2R) besteht dabei aus den drei Untereinheiten α , β und γ , und ist als Teil des Immunsystems primär auf T-Zellen lokalisiert. Um eine Immunantwort zu erzeugen muss ein Interleukin-2-Molekül an alle drei Untereinheiten binden. Die Mutation der γ -Untereinheit verhindert dies. Auch schaltet die Mutation die natürlichen Killerzellen des Immunsystems aus und dieses bildet nur nicht-funktionelle B-Zellen aus, sodass das murine Immunsystem komplett ausgeschaltet wird. Dies ermöglicht den Aufbau eines menschlichen Immunsystem im Zuge einer Humanisierung des Tieres durch periphere mononukleäre Blutzellen oder hämatopoetische Stammzellen (26, 27).

Da das Ausbilden der Diabetes durch die NOD-Mutation bei manchen Tieren nicht eintritt und auch der Zeitpunkt des Auftretens der Erkrankung recht variabel sein kann, wird die T1D prinzipiell unterstützend durch den Einsatz von Streptozotocin (STZ) hervorgerufen (Abbildung 1) (15, 26, 28).

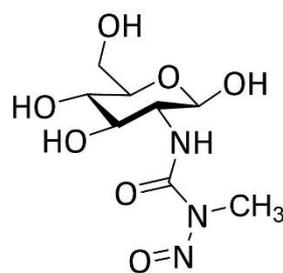


Abb. 1: Struktur des STZ (28).

Aufgrund des Zuckergrundkörpers wird dieses vom Glucose Transporter 2 in Betazellen aufgenommen und in Glucose und Methylnitrosoharnstoff gespalten. Letzterer führt zur Alkylierung der Betazell-DNA und unterbindet dadurch die Zellteilung, was zum Absterben der Betazellen und zum Auftreten eine T1D führt (28).

1.3 The Sweet Ways of Life – Der Mechanismus der Zuckerverwertung

1.3.1 Das Glucagon-like Peptide 1 und Rezeptorinteraktion

Durch die orale Nahrungsaufnahme werden im Organismus eine Reihe von Prozessen in Gang gesetzt, die der Aufschlüsselung und Verwertung der Nährstoffe dienen. Das Peptidhormon Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) wird in den endokrinen L-Zellen des Ileums und des Colons synthetisiert und als Antwort auf Glucoseaufnahme in den Blutkreislauf sekretiert.

Durch Stimulation des GLP-1-Rezeptors (GLP-1R) der Betazellen der Bauchspeicheldrüse setzt es dabei das Hormon Insulin frei, das wiederum die Glucoseaufnahme in andere Zellen unterstützt (Abbildung 2) (29).

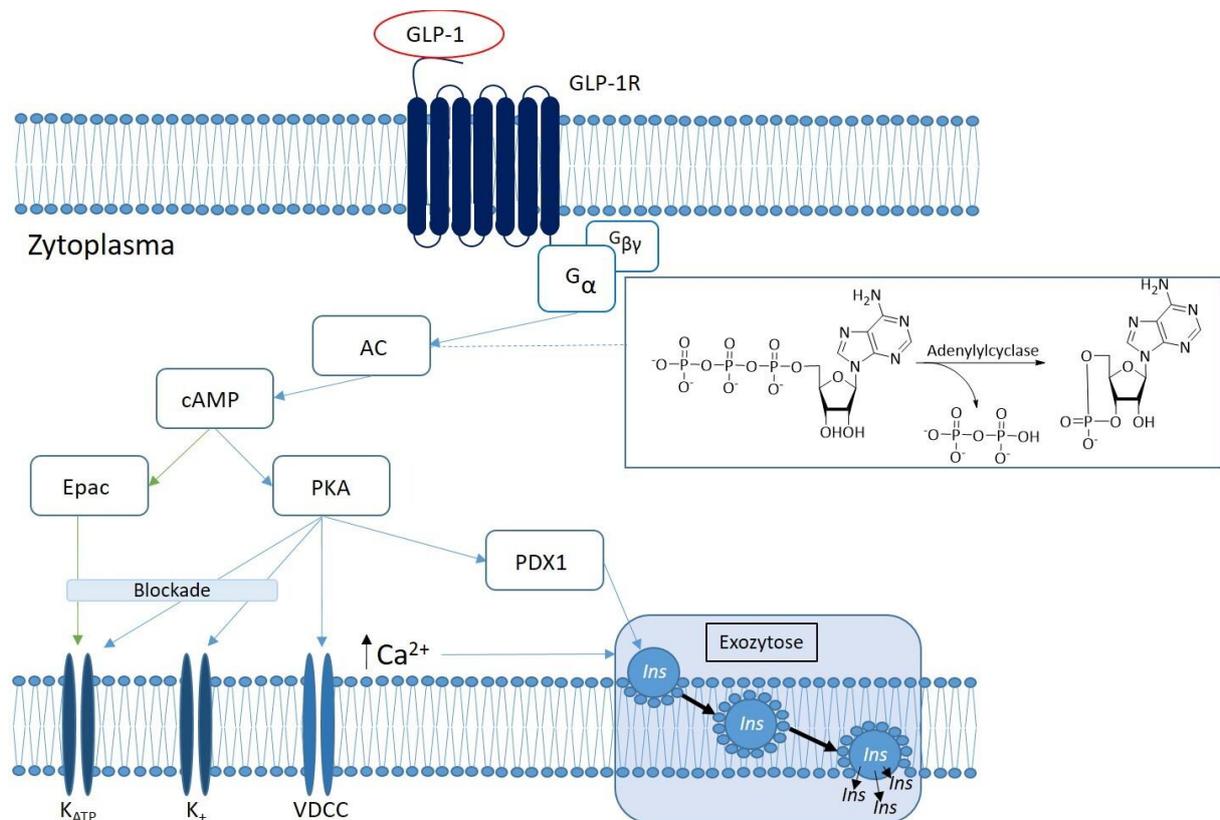


Abb. 2: Vereinfachter Mechanismus der Insulinfreisetzung nach Aktivierung des GLP-1R durch GLP-1 an der Zellmembran einer Betazelle (3)(30).

(G: G-Proteine (α , β , γ), AC: Adenylylcyclase, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, Epac: Exchange protein directly activated by cAMP, PKA: Proteinkinase A, PDX1: Insulin Promoter Factor 1, K: Kaliumkanäle (ATP- bzw. spannungsabhängig (+)), Ca²⁺: Calciumion, VDCC: Spannungsabhängiger Calciumkanal, Ins: Insulin.)

Der GLP-1R als transmembraner G-Protein-gekoppelter Rezeptor, besteht aus sieben α -Helices, die in der Zellwand von Betazellen wie auch Hirnneuronen lokalisiert sind. Er besteht aus zwei Domänen, der N-terminalen extrazellulären Domäne (ECD) und der transmembranen Domäne (TMD). Die ECD dient dem C-terminalen Ende des GLP-1 als Andockstelle, wohingegen das N-terminale Ende des GLP-1 an die TMD bindet. Durch Bindung von GLP-1 oder anderer Inkretinmimetika ändert sich die

Konformation des GLP-1R und das intrazelluläre C-terminale Ende des Rezeptors aktiviert über G-Proteine eine intrazelluläre Signalkaskade, die final zur Ausschüttung von Insulin führt. Im ersten Schritt kommt es zum Austausch eines Guanosindiphosphats mit Guanosintriphosphat an der α -Untereinheit G_α des G-Proteins, wodurch die Adenylylase (AC) aktiviert wird. Diese setzt Adenosintriphosphat (ATP) zum sekundären Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) um. Im nächsten Schritt binden sich vier cAMP-Moleküle an die beiden R-Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), wodurch deren zwei C-Untereinheiten dissoziieren und die Phosphorylierung von Threonin- und Serinresten PKA-aktiver Substrate des Zellplasmas ermöglichen. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung sowohl spannungs- auch als ATP-abhängiger Kaliumkanäle ($K_{+/ATP}$). Die resultierende Zelldepolarisation führt zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle VDCC (von engl. *voltage-dependent calcium channels*). Verstärkt wird dies durch das cAMP-aktivierte Protein Epac 2 (von engl. *exchange protein directly activated by cAMP 2*), das ebenso die Schließung der K_{ATP} und gleichzeitig die Ausschüttung von Calciumionen aus dem Insulin Promoter Factor 1 (PDX1) des Endoplasmatischen Retikulum (ER) fördert, was die intrazelluläre Calciumionenkonzentration weiter erhöht (30).

Insulin selbst wird durch die Phosphorylierung des PDX1 durch PKA aus Proinsulin gewonnen und in insulinbeladenen Vesikeln, die aus zinkgebundenen Insulinhexameren und C-Peptidketten bestehen ins Zellplasma freigesetzt (31). Durch die erhöhte Calciumionenkonzentration im Zellinneren kommt es dann zur Exozytose in deren Verlauf das Insulin in den Blutkreislauf sekretiert wird (30).

1.3.2 Insulin

Die zelluläre Glucoseaufnahme steuert Insulin durch Bindung an den transmembranen Insulinrezeptor (IR), der zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren gehört. Durch Bindung eines Insulinmoleküls an die beiden extrazellulären α -Untereinheiten des Rezeptors kommt es zu einer Konformationsänderung und die beiden β -Untereinheiten, die in der Zellmembran lokalisiert sind und deren Enden bis ins Zellinnere reichen, nähern sich an (32). Dabei kommt es zur Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste und es bildet sich eine Bindungsstelle für das Insulinrezeptorsubstrat (IRS-1), das an das Rezeptorende bindet und durch eine weitere Phosphorylierung aktiviert wird. Im nächsten Schritt bindet es an die Phosphoinositid-3-kinase (PI3K), die die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) katalysiert, das als sekundärer Botenstoff dient und die Phosphatidylinositolabhängige Proteinkinase (PDK1) aktiviert. Diese aktiviert die Proteinkinase B (PKB), die durch die Aktivierung von SNARE-Proteinen (von engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) zur Dissoziation Glucose Transporter 4 (GLUT4)-tragender Vesikel führt, die sich in die Zellmembran einfügen und diese für Glukosemoleküle (Glc) permeabel machen.

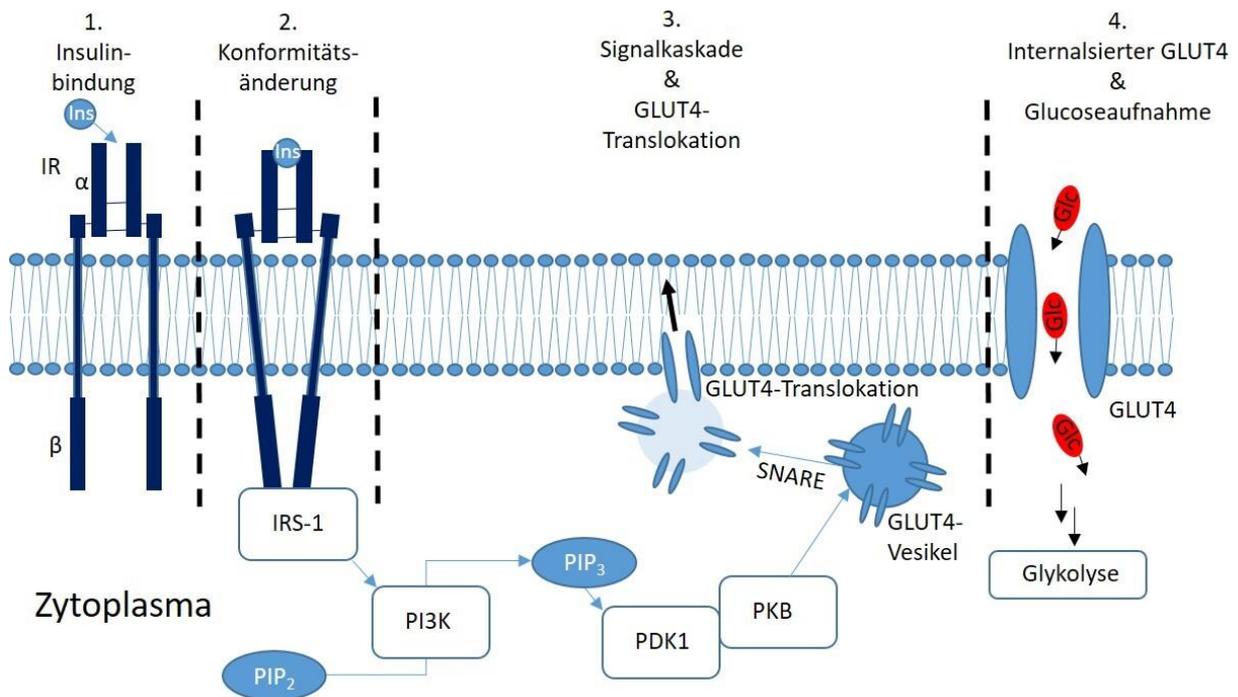


Abb. 3: Vereinfachter Mechanismus der insulininduzierten Glucoseaufnahme (32).

(IR: Insulinrezeptor (mit α - und β - Untereinheiten, IRS-1: Insulinrezeptorsubstrat 1, PI3K: Phosphoinositid-3-kinase, PIP_x : Phosphatidylinositol-4,5-bis-($_2$) bzw. 3,4,5-tris($_3$)phosphat, PDK1: Phosphatidylinositolabhängige Proteinkinase 1, PKB: Proteinkinase B, SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor, GLUT4: Glucose Transporter 4, Glc: Glucose.)

1.3.3 Exendin-4

Exendin ist ein Inkretinmimetikum, das eine ca. 50%ige Struktursimilarität gegenüber humanem GLP-1 aufweist (Abbildung 4) (33, 34).

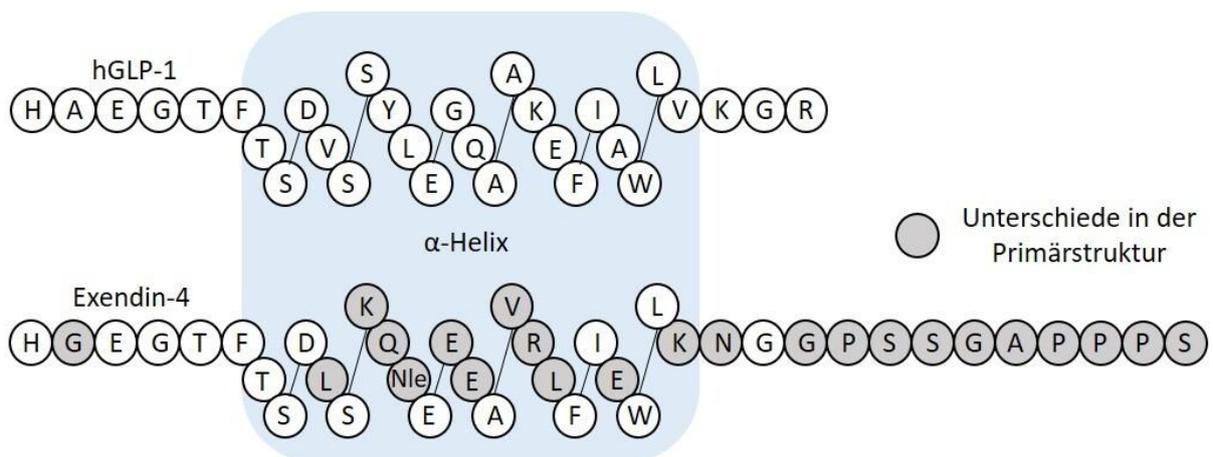


Abb. 4: Vergleich der Struktur von humanem GLP-1 (hGLP-1) und Exendin-4 (35).

Ähnlich wie dieses bindet es an den GLP-1R und stimuliert dadurch die Insulinausschüttung im Pankreas. Aufgrund der strukturellen Unterschiede besitzt es gegenüber der humanen

Dipeptidylpeptidase IV eine erhöhte Verweildauer im Blutpool (33). Diese Eigenschaft macht es zu einem geeigneten Werkzeug im Rahmen der Diabetesbehandlung.

Durch Funktionalisierung mit Chelatoren oder Farbstoffen findet es außerdem im Gebiet der Diabetesforschung Anwendung. Die GLP1R-Bildgebung unter Verwendung von radionuklidmarkiertem Exendin-4, wurde erfolgreich zum Nachweis von Insulinomen bei menschlichen Patienten durchgeführt (36). Die Bindung und Internalisierung von radionuklidmarkiertem Exendin-4 durch GLP-1R-positive Zellen wird begünstigt, wenn Exendin-4 an den Lysinen entweder an Position 12 oder 40 funktionalisiert wurde (37). Eine Studie zur Biodistribution von ^{68}Ga -markiertem Exendin-4 in Mäusen ergab eine hohe spezifische Aufnahme und Signalakkumulation in Lunge und Bauchspeicheldrüse sowie in geringerem Maße in Magen und Darm, deren Signal blockiert werden konnte, wenn kurz vor der Tracerapplikation unmarkiertes Exendin-4 verabreicht wurde, während das starke Signal in der Niere als Ausscheidungsorgan nicht blockiert werden konnte (37). Dieses Biodistributionsmuster der Exendin-4-GLP-1R-Bildgebung stimmte mit dem berichteten GLP-1R-Expressionsmuster überein (38).

Die Insulinom-Theranostik ist ein Schwerpunkt der Exendin-4-Bildgebung, wie in einer kürzlich erschienenen Übersicht von Jansen *et al.* zusammengefasst (39). Auch die Bildgebung von Betazellen der Bauchspeicheldrüse mit Exendin-4 wurde bereits in Tiermodellen mit PET durchgeführt(40). Eter *et al.* zeigten, dass es möglich ist, das lebensfähige Betazelltransplantat bei Mäusen *in vivo* mittels Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) mit ^{111}In -markiertem Exendin-3 zu bestimmen (41). Darüber hinaus wurde die Transplantation menschlicher Inselzellen in die Leber diabetischer Mäuse unter Verwendung von [^{68}Ga] ^{68}Ga -DO3A-VS-Cys⁴⁰-Exendin-4 für die Positronen-Emissions-Tomographie-Bildgebung (PET) durchgeführt und zeigte die allgemeine Eignung zur Behandlung von Hyperglykämie mit transplantierten Inselzellen und die Verwendung von Exendin-4 als Mittel der Wahl während des Überwachungsprozesses (42).

1.4 Grundlagen der Nuklearmedizin

1.4.1 Allgemein

Die Nuklearmedizin kennt mehrere bildgebende Verfahren um das Innere des menschlichen Körpers zu untersuchen. Zur Diagnostik wird dem Patienten hierbei ein Radiopharmakon verabreicht, das sich gezielt im Körper anreichert und je nach Nuklid *via* PET oder SPECT detektiert wird. Um die diagnostischen Bilddaten mit der Anatomie des Patienten abzugleichen, werden die Körperstrukturen im Zuge der PET und der SPECT für gewöhnlich durch Daten der Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT) überlagert. Die MRT basiert dabei auf der magnetischen Resonanz angeregter Atomkerne im externen Magnetfeld, die je nach Gewebetyp unterschiedlich ausfällt. Bei der CT handelt es sich hingegen um eine Methode, die Gewebe aufgrund der Absorptionseigenschaft

von Röntgenstrahlen wiedergibt. Hieraus ergeben sich dann nutzbare Aussagen über die Biodistribution des Radiopharmakons und das Krankheitsbild des Patienten, die im Idealfall zur zielgenauen Behandlung beitragen.

1.4.2 Grundlagen der Positronen-Emissions-Tomographie

Im Zuge dieser Publikation wurden Studien mithilfe eines präklinischen PET-Scanners durchgeführt. Die PET ist eine hochsensitive Bildgebungsmethode im nuklearmedizinischen Bereich und setzt dabei auf Nuklide, die beim Zerfall Positronen (e^+) freisetzen (Beta-Plus-Strahler). Diese treten bei der Umwandlung eines Kernprotons (p^+) in ein Neutron (n) auf (Gleichung I).



Da es sich bei Positronen um die Antiteilchen der Elektronen handelt, die zusammen mit Protonen und Neutronen die Grundlage der natürlich vorkommenden Elemente ausmachen, besitzen Positronen in der Umwelt nur eine eingeschränkte Reichweite bevor sie auf ein Elektron treffen. In diesem Zusammenhang kommt es zur Annihilation, der Paarvernichtung von Elektronen und Positronen. Treffen beide Teilchen aufeinander, so bilden sie ein Positronium, das in kürzester Zeit in zwei hochenergetische Photonen mit 511 keV zerfällt (Abbildung 5) (43).

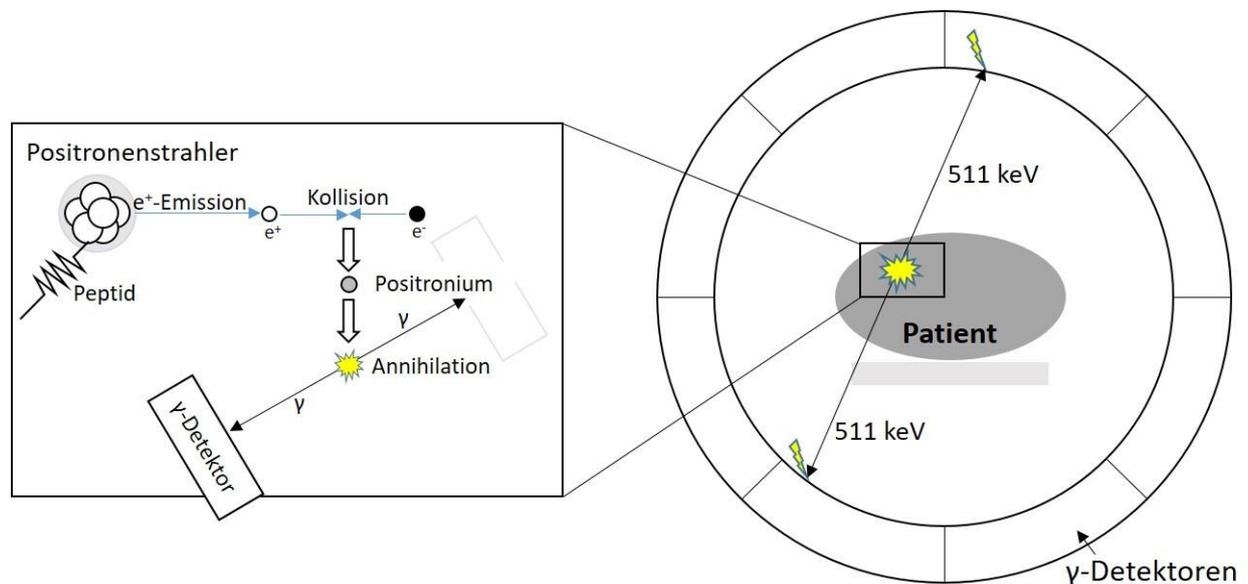


Abb. 5: Grundschemata der Funktionsweise der PET-Bildgebung (43).

Besitzt das Positronium geringen Impuls so entspricht der Winkel zwischen beiden abgestrahlten Photonen exakt 180° . Diese ausgesandte Gammastrahlung nutzt die PET um mithilfe mehrerer ringförmig angebrachter Detektoren unter Berücksichtigung der Zeitabweichung der eintreffenden Signale die Linie der Annihilationsphotonen (Koinzidenzen) zu identifizieren. Die Detektoren bestehen aus Szintillationskristallen und Dioden oder Photomultipliern, die die Koinzidenzen messen. Wahre

Koinzidenzen, sog. Trues, entstehen, wenn beide Quanten des Annihilationsprozesses ohne Streuung und Absorptionsverluste gemessen werden (44). Die Sensitivität der PET steigt dabei mit der Anzahl der Trues. Im nächsten Schritt werden die gesammelten Daten der Trues rekonstruiert und der Ursprungsort der Strahlung kann über geeignete Software sichtbar gemacht werden.

Die PET wird in der Nuklearmedizin herangezogen, um mithilfe eines radioaktiven Tracers, des Radiopharmakons, eine Krankheit bspw. einen Tumor genauer zu lokalisieren oder metabolische Vorgänge im Körper nachzuvollziehen. Die Ortsauflösung eines präklinischen PET-Geräts, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, ist ca. 1 mm. Durch Verknüpfung mit der MRT oder der CT kann die Aktivitätsverteilung im PET-Bild genauer lokalisiert und beobachtet werden (Abbildung 6) (45).

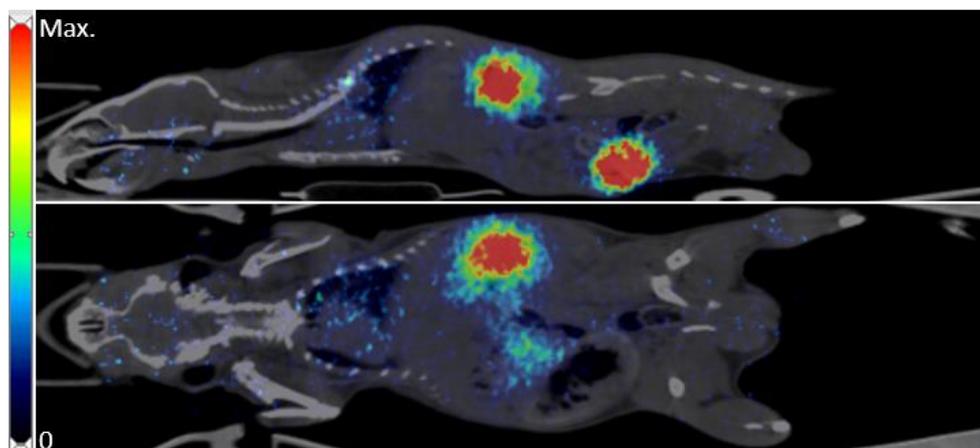


Abb. 6: Sagittale (oben) und coronale (unten) Ganzkörperansicht eines PET-Tracers im Mausmodell (Farbskala), überlagert mit kombiniertem CT (Grauskala) (45).

1.4.3 Autoradiographie

Zur Verifizierung von *in vivo*-Ergebnissen bietet die Autoradiographie (AR) eine sensitive Methode zur Kontrolle erhaltener Daten (46). Im Zusammenhang mit Vorversuchen kann sie *in vitro* zur Anwendung kommen, sie wird in der Präklinik jedoch in der Regel nach durchgeführten Scans *ex vivo* angewandt. Bei der *ex vivo*-Methode werden dem Versuchsobjekt *post mortem* Organe bzw. Körperpartien entnommen und in ein Fixiergel eingebettet. Dieses besteht in der Regel aus einer wasserlöslichen Kombination aus Glykolen und Harzen (primär Polyvinylalkohol und Polyethylenglykol), die bei ca. -10 °C gefriert. Im nächsten Schritt werden die eingefrorenen Körperteile auf einem Probenhalter fixiert und es werden mittels Rotationsmikrotom Schnitte angefertigt (Abbildung 7).

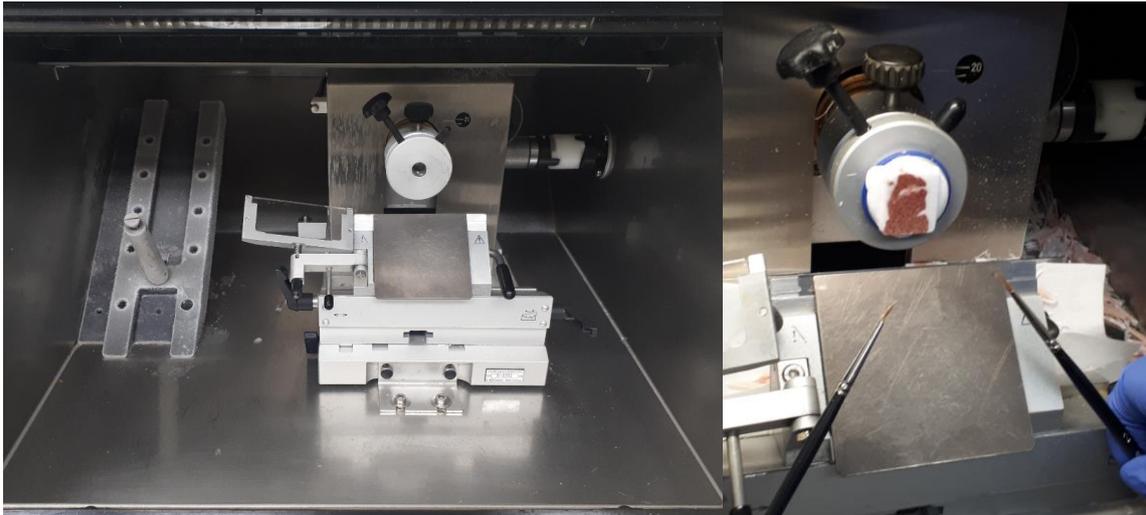


Abb. 7: Kryostat mit Rotationsmikrotom (links) und beladener Probenhalter mit Gewebeprobe in gefrorenem Kryoeinbettmedium Tissue-Tek® im Schnittprozess (rechts).

Die Schnittdicke variiert dabei je nach Wunsch und Gewebeart meist zwischen 1 und 60 μm Schnittdicke.

Nach Anfertigung der Schnitte werden diese mit einem Objektträger aufgenommen und eine Imaging Platte (IP) wird der Strahlung über einen gewissen Zeitraum (meist nuklidabhängig) ausgesetzt (47). Die IP besteht dabei aus mehreren Schichten und ist außen mit einer Schutzschicht umgeben. Die äußerste, aktive Schicht besteht aus einem fotostimulierbaren Phosphor (lat. für Leuchtstoff) oder kurz PSP (48). Sie besteht bspw. aus amorphen, europiumdotierten Bariumfluorobromid. Durch die Dotierung mit Eu^{2+} -Kationen entstehen in der Kristallstruktur Gitterfehler, sog. F-Zentren (49). Durch die Anregung mit γ -Quanten, deren Ursprung die AR-Schnitte sind, kommt es zu einer fotoelektrischen Absorption. Hierbei werden Elektronen aus dem Valenzband des Kristalls in das Leitungsband gehoben (Abbildung 8).

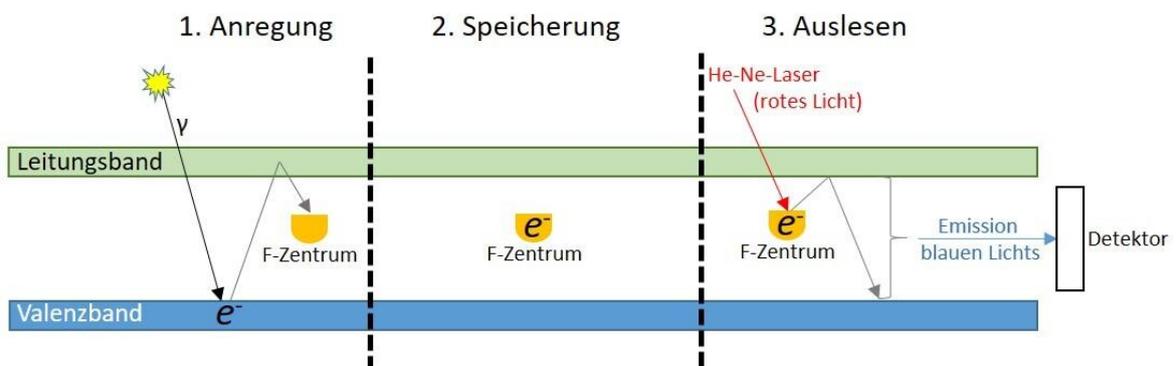


Abb. 8: Prinzip der Autoradiographie mit PSP-IPs.

Beim Versuch in das Valenzband zurückfallen, landen die Elektronen jedoch in den F-Zentren, wo sie zwischenzeitlich gespeichert werden. Nach Beendigung des Inkubationszeitraums der IP wird diese in

einen CR-Reader gelegt. Durch Anregung eines Helium-Neon-Lasers springt das Elektron zurück in das Leitungsband und von dort, unter Aussendung eines blauen Lichtquants, zurück in das Valenzband. Durch Detektion des blauen Lichts und Fotomultiplikation des Signals kann dann ein Bild der Gewebeschnitte bzw. der Radioaktivitätsakkumulation im Gewebe erstellt werden (47).

1.5 Radiochemie

1.5.1 Radiopharmaka in der Nuklearmedizin

Die Radiochemie beschäftigt sich mit der Synthese der radioaktiven Verbindungen, den Radiopharmaka zur therapeutischen und diagnostischen Anwendung im Rahmen der Nuklearmedizin sowie der Entwicklung neuer Radiopharmaka und deren Etablierung im klinischen Gebrauch. Ein diagnostisches Radiopharmakon wird in diesem Kontext auch als Radiotracer oder Tracer (engl. *trace* = Spur) bezeichnet.

Im Grundaufbau besteht ein Radiopharmakon aus zwei Teilen: Zum einen dem biologisch aktiven Teil. Dieser entspricht meist einer Aminosäurenkette (Antikörper, Peptide, bspw. Exendin), kann aber auch aus anderen Verbindungen wie einem Zuckergrundkörper (2-Fluor-2-desoxyglucose), Nucleosiden (2-Fluoro-Thymidin) oder anderen organisch aktiven Molekülen bestehen (ML-10) (50-53). Den zweiten Teil übernimmt ein radioaktives Nuklid, welches je nach Zerfallsart therapeutisch oder diagnostisch wirksam ist. Die Wahl des geeigneten Nuklids hängt hierbei von dessen Halbwertszeit und der Zerfallsart ab. Für die diagnostische Anwendung sind sowohl Gammastrahler wie Iod-123 und Technetium-99m (bei SPECT) als auch Beta-Plus-Strahler wie Fluor-18 und Gallium-68 (bei PET) geeignet (54-57). Alphastrahler wie Actinium-225 und Beta-Minus-Strahler wie Lutetium-177 hingegen kommen im Zuge der Therapie zum Einsatz (58, 59).

Nichtmetallische Nuklide wie Kohlenstoff-11 und Fluor-18 sind in der Regel kovalent an den biologisch aktiven Teil des Radiopharmakons gebunden und eignen sich dadurch zur Einbringung in kleinere Moleküle (60, 61). Bei größeren Peptiden gibt es gerade für Fluor-18 auch andere Bindungsmöglichkeiten. So wird es bei SiFAlin-TATE über ein kovalent gebundenes Silizium-Atom im Rahmen eines Isotopenaustauschs gebunden oder beim Fibroblasten-Aktivierungsprotein-Inhibitor (FAPI) über ein bereits komplexiertes Aluminium-Ion (Abbildung 9) (62, 63).

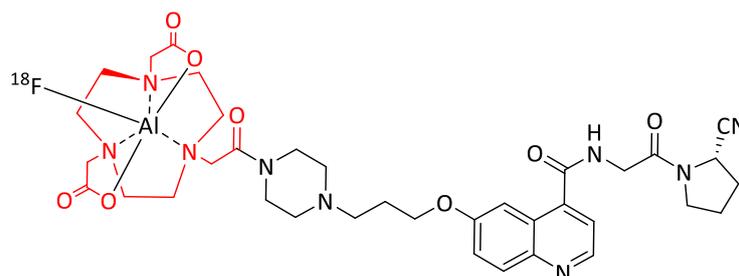


Abb. 9: Chelator der NODAGA-Familie (rot) mit komplexiertem [^{18}F]Aluminiumfluorid in FAPI-74 (63).

Das Prinzip der Komplexierung metallischer Ionen nutzt man in der Radiopharmazie auch zur Einbringung anderer metallischer Nuklide wie Gallium-68, Technetium-99m oder Lutetium-177. Die Chelatoren komplexieren die Radionuklide über elektronenreiche, elektronegative Atome wie Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff und stabilisieren sie somit gegenüber dem Metabolismus. Wichtige klinische Chelatoren sind hierbei 2,2',2'',2'''-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) und 1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-essigsäure (NODAGA) und deren Derivate (64, 65). Da SPECT und PET sehr empfindlich sind, kann im Zuge der Diagnostik mit kleinen Tracermengen gearbeitet werden. Eine typische Tracermenge bei einer FDG-Untersuchung liegt generell unter 1 ng (66).

1.5.2 Rezeptorabhängigkeit und molare Aktivität

Radiotracer bestehen in der Regel aus einem Rezeptorligand oder einem Molekül, welches von Körperzellen aufgenommen und verstoffwechselt wird. Während jedoch bspw. FDG als Zuckerimitat in Zellen aufgenommen wird und die Menge des FDG im Vergleich zum unmarkierten Blutzucker physiologisch unbedeutend ist, ist die Tracermenge und das Verhältnis von markiertem („heißem“) zu unmarkiertem („kaltem“) Tracer bei Untersuchungen mit Rezeptorliganden oftmals entscheidend für die Bildqualität.

Bei Rezeptoren handelt es sich um modifizierte Proteine, über die Signalverbindungen (Proteine, Antikörper, Signalmoleküle wie Dopamin etc.) nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip an die Zelloberfläche andocken können. Im Zuge dessen wird im Zellinneren eine Signalkaskade ausgelöst, die die Membran für unterschiedliche Ionen und Verbindungen durchlässig macht oder Nervenimpulse weitergibt. Durch die Entwicklung und Synthese maßgeschneiderter Verbindungen nutzt die Radiopharmazie dieses Prinzip aus, um auch Radiopharmaka zielgenau an bestimmte Zelltypen zu transportieren. Dank der lokalen Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche und im Rahmen der PET-Untersuchung demnach auch lokalen Akkumulation der Radioaktivität können so z.B. Tumore diagnostisch dargestellt oder im Zuge einer Therapie überprüft werden.

Da viele Rezeptoren partiell auch auf anderen Gewebetypen vorkommen und ein Teil der Radioaktivität schon auf dem Weg zum Target zerfällt und somit auch umliegendes, gesundes Gewebe betrifft, versucht man im Zuge der Untersuchung mit möglichst geringen Radioaktivitätsmengen auszukommen, die jedoch möglichst gute Signale im Interessensgebiet liefern. Des Weiteren ist die Anzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche begrenzt. Im Idealfall bindet an jeden Rezeptor ein Tracermolekül. Dies wird in der Realität aufgrund mehrerer Faktoren jedoch nicht erreicht. So ist es nicht gewährleistet, dass jedes Nuklid im Syntheseprozess automatisch einen geeigneten, unbesetzten Chelator oder eine freie Substitutionsposition findet. Freie Nuklide müssen dann nach der Markierung aus dem Ansatz entfernt werden. Auch müssen sowohl kovalent bindende als auch metallische

Zerfallsprodukte sowie weitere Verunreinigungen berücksichtigt werden. Im Falle der F-18-Tracer spielt bspw. Wasser eine wichtige Rolle, da dieses die Positionen der Abgangsgruppen des Precursor hydrolysieren kann. Bei metallischen Nukliden hingegen sind es hauptsächlich Tochternuklide und metallische Verunreinigungen, die um die freien Bindungsstellen der Chelatoren konkurrieren. Aus rein physikalischer Sicht ist es durch den radioaktiven Zerfall selbst bereits ausgeschlossen, dass man durchweg 100% markierte Substanz zur Verfügung hat.

Daraus resultierend ergibt sich bei rezeptoraktiven Radiotracern die Problematik, dass nicht jeder Rezeptor automatisch ein heißes Tracermolekül n_{A^*} bindet, sondern diese mit kalten, aber (aufgrund des Rezeptoragonisten) biologisch ebenso aktiven Nebenprodukten n_A um die Andockstelle konkurrieren. Bei diesen ist es deshalb oft wünschenswert, ein möglichst großes Verhältnis von n_{A^*} zu n_A zu haben. Ein aussagenkräftiges Maß hierfür ist die sog. molare Aktivität A_m (67, 68). Diese gibt das Verhältnis von Aktivität A pro biologisch aktiver Stoffmenge n wieder (Gleichung II).

$$A_m = \frac{A_{A^*}}{n_A + n_{A^*}} \quad \text{in } \left[\frac{\text{MBq}}{\text{nmol}} \right]; \text{ mit } A_{A^*} = \text{Aktivität in MBq} \quad (\text{Gl. II})$$

Unter Berücksichtigung weiterer möglicher markierter Verunreinigungen (B) sowie restlichen Precursors (C) wird daraus die „scheinbare“ molare Aktivität $ApparentA_m$ (von engl. *apparent molar activity*) abgeleitet (Gleichung III).

$$ApparentA_m = \frac{A_{A^*} + A_{B^*}}{n_A + n_{A^*} + n_B + n_{B^*} + n_C} \quad (\text{Gl. III})$$

Aufgrund mehrerer Faktoren kann diese Gleichung meist jedoch deutlich vereinfacht werden. So besitzen die beiden meistgenutzten PET-Nuklide Fluor-18 und Gallium-68 mit Sauerstoff-18 bzw. Zink-68 zwei stabile Tochternuklide und die Variablen um B entfallen komplett. Im GMP-konformen Syntheseprozess wird weiterhin eine definierte Stoffmenge n_{ges} hochreinen Precursors verwendet und Nebenprodukte n_A oder restliche Precursormengen n_C haben oft eine zum Produkt n_{A^*} vergleichsweise biologische Aktivität. Da n_A , n_{A^*} und n_C in Summe der Ansatzmenge n_{ges} des Precursors entsprechen, kann Gleichung III vereinfacht werden (Gleichung IV).

$$ApparentA_m = A_m = \frac{A_{A^*}}{n_{ges}} \quad (\text{Gl. IV})$$

Diese wird normalerweise auf den Injektionszeitpunkt t berechnet, da sie erst dann physiologisch relevant wird. Da die eingesetzte Aktivitätsmenge meist nicht quantitativ gebunden wird, muss im Realfall auch die radiochemische Markierungsausbeute RCY (von engl. *Radiochemical Yield*) berücksichtigt werden. Diese wird im Rahmen einer HPLC- oder DC-Kontrolle bestimmt und kann als Korrekturfaktor mit in die Berechnung aufgenommen werden. Bei Precursoren mit hohem Molekulargewicht wie bspw. DOTA-funktionalisiertem Exendin-4 kann dabei davon ausgegangen

werden, dass sich markiertes Radiopharmakon, restlicher Precursor und ggf. kaltes, markiertes Nebenprodukt in der Retention beim Aufreinigungsschritt nicht wesentlich voneinander unterscheiden, d.h. das Verhältnis der Verbindungen ist im Ansatz wie auch bei der Injektion gleich und es kann zur Bestimmung der molaren Aktivität auf die erweiterte Gleichung IV zurückgegriffen werden. Ungebundenes Nuklid hingegen kann durch die Aufreinigung in der Regel leicht entfernt werden und spielt in der Schlussbetrachtung keine Rolle. Unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren für RCY und t ergibt sich somit Gleichung V:

$$A_m(t) = \frac{RCY * A(t)}{n_{ges}} \quad (\text{Gl. V})$$

$$; \text{ mit } A(t) = A_0 * e^{\frac{-(\ln(2)*t)}{T_{1/2}}} \quad (A_0 = \text{Startaktivität, } T_{1/2} = \text{Halbwertszeit})$$

Um nun möglichst hohe molare Aktivitäten $A_m(t)$ zum Injektionszeitpunkt zu erhalten, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden (67). Für generatorbasierte Tracer ist die Qualität und Handhabung des Generators ausschlaggebend. Generatoren bieten den Vorteil, dass sie dem Anwender eine zyklotronunabhängige Tracersynthese erlauben. Im Grundaufbau bestehen sie aus einem matrixgebundenen Mutternuklid, das eine lange Halbwertszeit besitzt und langsam in das Tochternuklid zerfällt. Wichtige klinische Generatoren sind hierbei der $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator für SPECT und der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator für PET (69, 70). Die entstandenen Tochternuklide werden mit geeignetem Lösungsmittel eluiert. Bei Technetium-99m ist dies bspw. eine 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung. Gallium-68 lässt sich mit einer 0,1 M Salzsäure von der Matrix lösen, während die Mutternuklide sich in beiden Fällen unter diesen Bedingungen nicht eluieren lassen. Ein $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator besitzt ca. 4 h nach einer Elution wieder sein größtes Elutionsvermögen. Um die Menge am Gallium-68-Tochternuklid Zink-68 zu begrenzen und dabei hohe Gallium-68-Aktivitäten zu erhalten, ist es sinnvoll das Galliumeluat ca. 3-4 h nach der letzten Elution zu verwenden (71). Auch metallfreie Elution und Handhabung der Synthesekomponenten und gezielte Elution im Bereich des Elutionsmaximums erhöhen die Reinheit des Eluats und damit die maximale molare Aktivität. Für Fluor-18-Tracer sind die Qualität des bestrahlten $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$, des Targets und der Komponenten bis zum Abschluss des Syntheseprozesses ausschlaggebend. Allgemein trägt vor allem auch ein sinnvoller und standardisierter Synthese-, Aufreinigungs- und Applikationsprozess dazu bei, gute Ergebnisse zu erzielen.

1.6 Ziel

Ziel dieser Arbeit war es, die Durchführbarkeit der *in vivo*-Betazell-Darstellung modifizierter Schweineinselzelltransplantate an verschiedenen Transplantationsstellen in einem NSG-Mausmodell mittels PET/CT zu untersuchen. Als Radioligand-Peptid für die Bindung an den porzinen GLP1-R wählten wir ^{68}Ga -markiertes $[\text{Nle}^{14}, \text{Lys}^{40}(\text{Ahx-DOTA})\text{NH}_2]\text{Exendin-4}$. Zu diesem Zweck wurde die

Markierung und Aufreinigung des Syntheseansatzes soweit perfektioniert, dass mit hohen molaren Aktivitäten zur Verbesserung des Radiosignals im Transplantat gearbeitet werden konnte (45, 72). ^{68}Ga ist über einen $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator leicht verfügbar und wird in der klinischen und präklinischen PET-Bildgebung routinemäßig eingesetzt. Die AR wurde als *ex vivo*-Referenz für die PET-Signale verwendet.

2. Material und Methoden

2.1. Grundschemata der Arbeit.

Abbildung 10 liefert eine schematische Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Studie. Ferner sind auch die beteiligten Projektpartner aufgeführt.

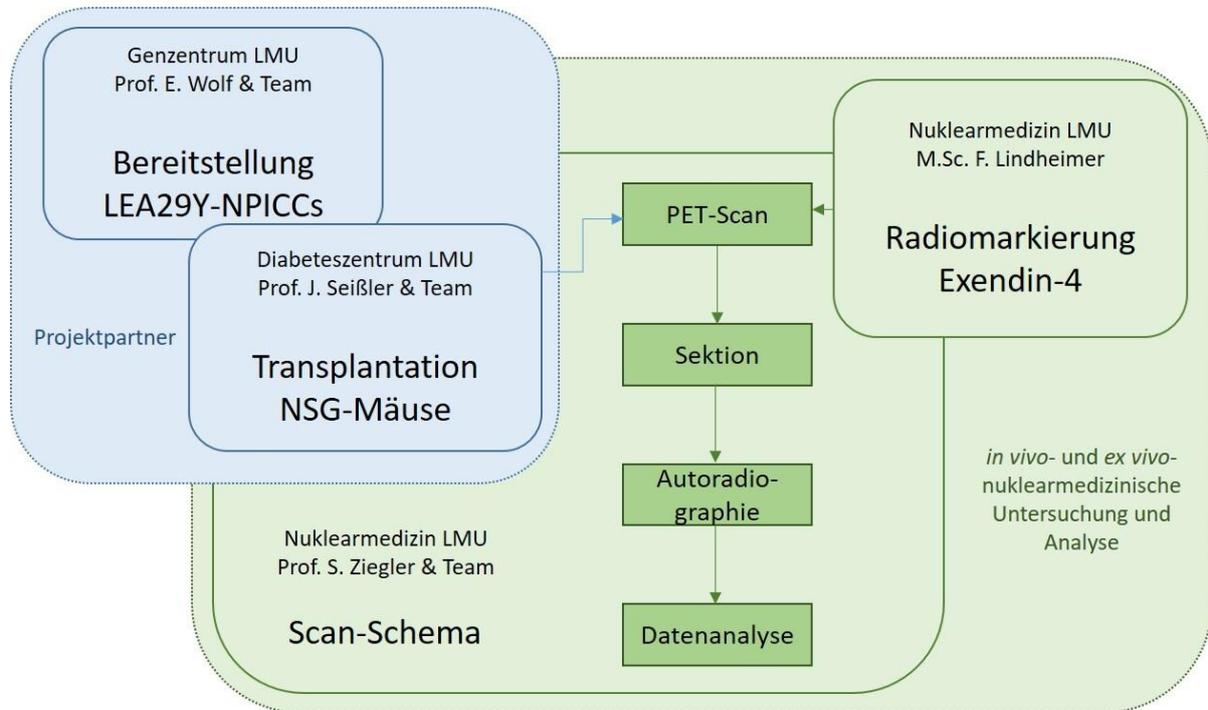


Abb. 10: Grundschemata der Arbeit.

2.2 Materialien

[Nle¹⁴,Lys⁴⁰(Ahx-DOTA)NH₂]exendin-4 wurde von Peptide Speciality Laboratories (Heidelberg, Deutschland) synthetisiert. Ultrapure Wasser und absolutes Ethanol (Gradient Grade für HPLC) wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. HEPES wurde von AppliChem (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurde von der B. Braun SE (Melsungen, Deutschland) bezogen. [⁶⁸Ga]GaCl₃ wurde von einem ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generator mit 0,1 M Salzsäure von Eckert & Ziegler Radiopharma (Berlin, Deutschland) eluiert.

PET-Scans wurden an einem nanoscan PET/CT (Mediso Ltd., Hungary) durchgeführt. Zur Analyse der PET-Daten wurde die Bildanalyse-Software von PMOD (PMOD Technologies LLC, Zürich, Schweiz) verwendet.

Kryoschnitte für die Autoradiographie wurden an einem Leica CM15010 Kryostat (leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) erstellt und eine Imaging Platte des Typs BAS-IP TR2025 (FUJI Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan) der Strahlung ausgesetzt. Zur Auslesung der Autoradiographiedaten

wurden ein Computer Radiography-(CR-)Reader (v.1.4.1, Elysia-raytest GmbH) und die Aida Image Analyzer Software (v.4.50.010, Elysia-raytest GmbH) genutzt.

2.3 Radiomarkierung und Aufreinigung des Exendin-4

350 μL [^{68}Ga]GaCl₃-Eluat aus der Hauptfraktion (zwischen 1,5 mL und 2,5 mL der gesamten Elution, nadellos eluiert) wurden in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß mit 40 μL HEPES-Puffer (2,5 M, pH 7) und 2 μL Exendin-4 (0,2 mM in ultrapure Wasser) gegeben. Die Lösung wurde 10 min bei 95°C und 900 rpm gemischt und die Markierungsausbeute mittels HPLC (Agilent Serie 2302, Chromolith RP-18e, 100 mm x 4,6 mm, Flussrate 2,0 mL/min, 99,9% H₂O + 0,1% TFA zu 99,9% MeCN + 0,1% TFA innerhalb von 7 min) bestimmt (Abbildung 11).

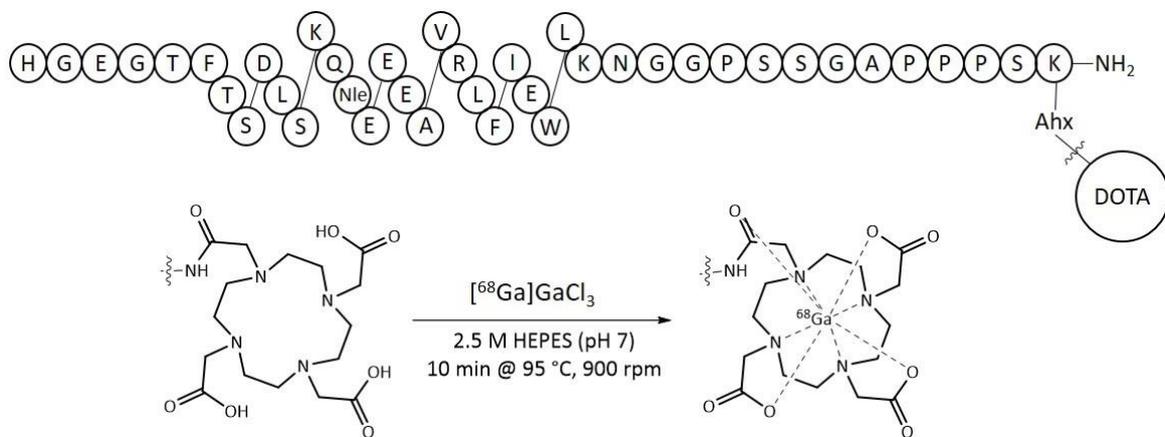


Abb. 11: Struktur (oben) des verwendeten Exendin-4-Derivates und Markierungsvorgang (unten) des DOTA-Chelators mit Gallium-68.

Die Aufreinigung erfolgte mit einer 50 mg C8-Festphasenextraktionskartusche von Waters (Boston, USA). 2 mL ultrapure Wasser wurden zum Konditionieren der Kartusche verwendet. Nach dem Beladen wurde die Kartusche mit 2 mL Wasser und fraktioniert mit 600 μL EtOH (20%), 75 μL EtOH (50%) und schließlich 300 μL EtOH (50%) eluiert, die die Hauptaktivität mit einer Reinheit von mehr als 99% enthielt (überprüft mittels HPLC). Die letzte Fraktion wurde mit PBS formuliert, um weniger als 10% (v/v) EtOH im Endprodukt zu erhalten und zur Applikation bereitgestellt.

2.4 Tierexperimente

2.4.1 Tiermodelle und Transplantation

Zur Durchführung der Experimente wurden NSG-Mäuse (The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA)) mit STZ (180 mg/kg Körpergewicht, einmalige intraperitoneale Injektion) Typ-1-diabetisch gemacht. Temperatur und Feuchtigkeit des Tierstalls wurden durchgehend kontrolliert und der Stall wies einen 12 h-Tag-Nacht-Zyklus auf.

NPICCs aus eins bis fünf Tage alten LEA29Y-Schweinen wurden isoliert und *in vitro* kultiviert. 2500 bis 3000 NPICCs wurden *subcapsular* in die linke Nierenkapsel (n = 3), intramuskulär in den rechten Oberschenkelmuskel (n = 3) sowie *subcutan* in die Inguinalfalte (n = 1) der NSG-Mäuse injiziert.

Die Tierexperimente wurden im Rahmen gültiger Tierversuchsanträge nach behördlichen Vorschriften durchgeführt.

2.4.2 *In vivo*-Bildgebung und Analyse

Nach Reifung der NPICCs und Erreichen eines normoglykämischen Blutzuckerlevels (sieben bis zehn Wochen *post* Transplantation), wurden die Tiere in den Tierstall der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des LMU Klinikums, München transferiert. Nach einer Eingewöhnungsphase von zwei Wochen, wurde mit den PET-Experimenten begonnen. Die Mäuse wurden mit 2% Isofluran narkotisiert und auf dem präklinischen PET/CT-Scanner platziert. Die Narkose wurde mit 1.5% Isofluran in einem Sauerstoffstrom von 2 L/min aufrechterhalten.

In Abhängigkeit der erwünschten zu applizierenden Aktivität wurde der markierte Tracer mit einer 1 mL-Spritze aufgezogen und mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung auf ein Gesamtvolumen von 200 bis 250 μ L gebracht. Die Spritze wurde dann in einer Bleiabschirmung zum präklinischen PET/CT-Gerät transportiert. Dort wurde der Tracer den Tieren jeweils über die Schwanzvene appliziert und die Messung gestartet.

Mittels der dazugehörigen Software von Mediso, wurden die erhaltenen Rohdaten nach Einpflegung der Messparameter rekonstruiert. Die erhaltenen PET- und CT-Bilddaten wurden mit pmod überlagert und Volumes of Interest (Vols) im Rahmen der Datenauswertung in betreffende Regionen implementiert. Zur Vergleichbarkeit der Daten wurden aus den Vols standardisierte Uptake-Values (SUVs) berechnet und die einzelnen Organe und Regionen gegeneinander aufgetragen.

2.5 Autoradiographie

Direkt nach Durchführung des PET-Scans wurden die Tiere durch eine Überdosis Isofluran (5 L/min Isofluran- und 2 L/min Sauerstoff-Flow) und darauffolgender zervikaler Dislokation euthanasiert. In der anschließenden Sezierung wurden den Tieren Nieren, ein Stück Oberschenkelmuskulatur und (beim Tier mit dem Inguinalfaltentransplantat) ein Stück im Bereich der Leiste entnommen, in Tissue-Tek O.T.C. eingebettet, in einer Box mit Trockeneis platziert und eingefroren. Danach wurden am Kryostat bei -20 °C 16 μ m dicke Schnitte erstellt und diese auf vorbereiteten Objektträgern aufgenommen. Eine Fotoplatte wurde auf den Schnitten platziert und diese den Schnitten über Nacht (ca. 16 h) ausgesetzt, bevor die Fotoplatte am CR-Reader ausgelesen wurde und die Daten per Aida Imager Software analysiert wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Radiomarkierung

Die radiochemische Ausbeute lag in einem Bereich zwischen 51% und 98% (durchschnittlich 86,4%) mit molaren Aktivitäten zwischen 232,9 und 459,3 MBq/nmol (durchschnittlich 312,4 MBq/nmol) zum Zeitpunkt der Injektion. Die Aufreinigung ergab endgültige Fraktionen von bis zu 300 MBq mit einer Reinheit von über 99% (Abbildung 12).

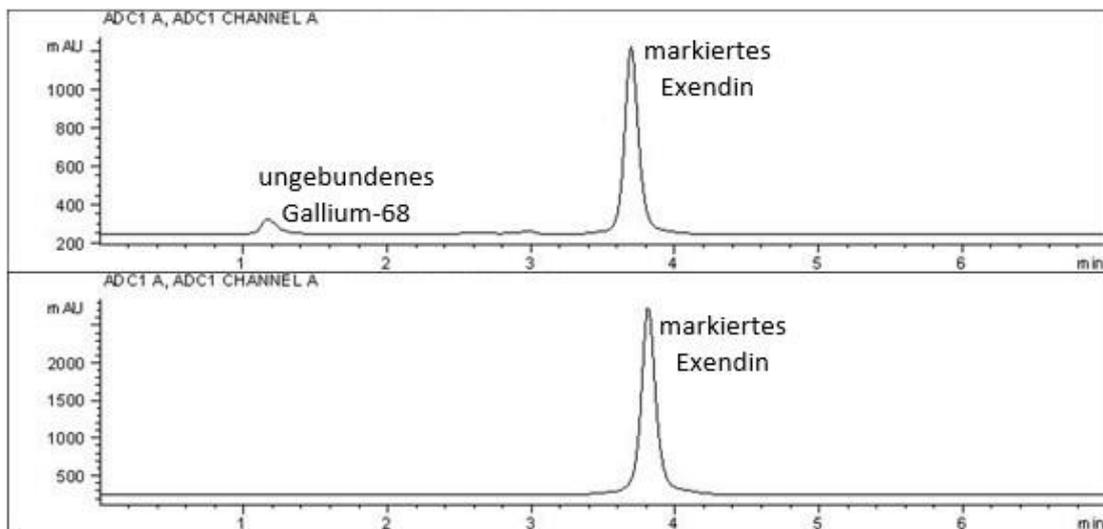


Abb. 12: HPLC-Diagramm der Markierung (oben) und Kontrolle der Reinheit nach Aufreinigung (unten) (Radioaktivsignal).

3.2 PET-Bildgebung

Resultate der *in vivo*-Bildgebung für späte (30 bis 40 min p.i.) PET-Bilder sind in Abbildung 13 dargestellt. Nur im Falle der in den Beinmuskel transplantierten NPICCs war ein Signal im Bereich des Transplantats deutlich zu erkennen.

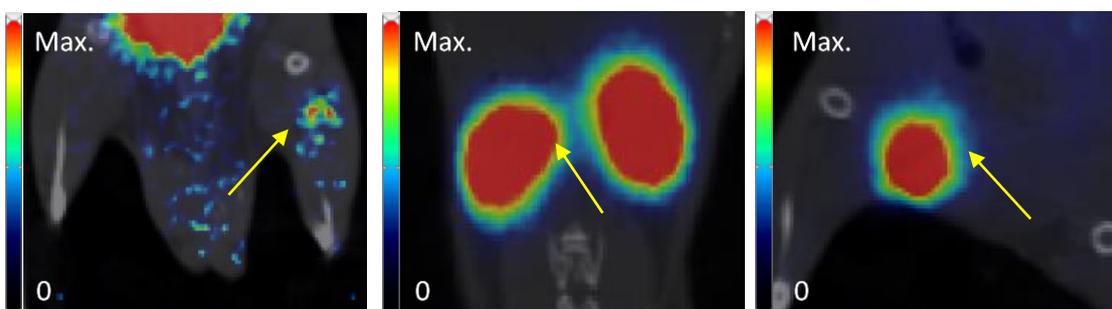


Abb. 13: Beispiele von PET-Bildern (coronaler Schnitt, Min. 30 bis 40 p.i., überlagert von koregistrierten CT-Bildern) von NPICCs an verschiedenen Transplantationsstellen (von links nach rechts: Bein, Niere, Leistenfalte; der gelbe Pfeil zeigt auf die Transplantationsstelle).

Der SUV in Organen ohne transplantierte NPICCs zeigt eine hohe Aufnahme in der Niere (SUV $9,29 \pm 1,02$), aber nur eine geringe Akkumulation im Beinmuskel ($0,37 \pm 0,13$) und im Lebergewebe ($0,48 \pm 0,12$) (Abbildung 14).

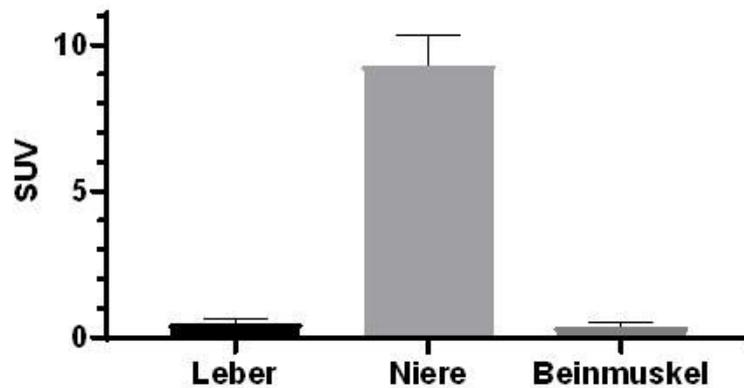


Abb. 14: Durchschnittlicher SUV im letzten Frame (Min. 30 bis 40, n = 7) in verschiedenen untersuchten und möglichen Transplantationsstellen.

Ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivitätskonzentration im Transplantationsbereich der NPICCs gegenüber der Referenzregion wurde bis zu 30 Minuten bei den Tieren mit Transplantat im Beinmuskel, aber nicht in der Niere festgestellt (Abbildung 15).

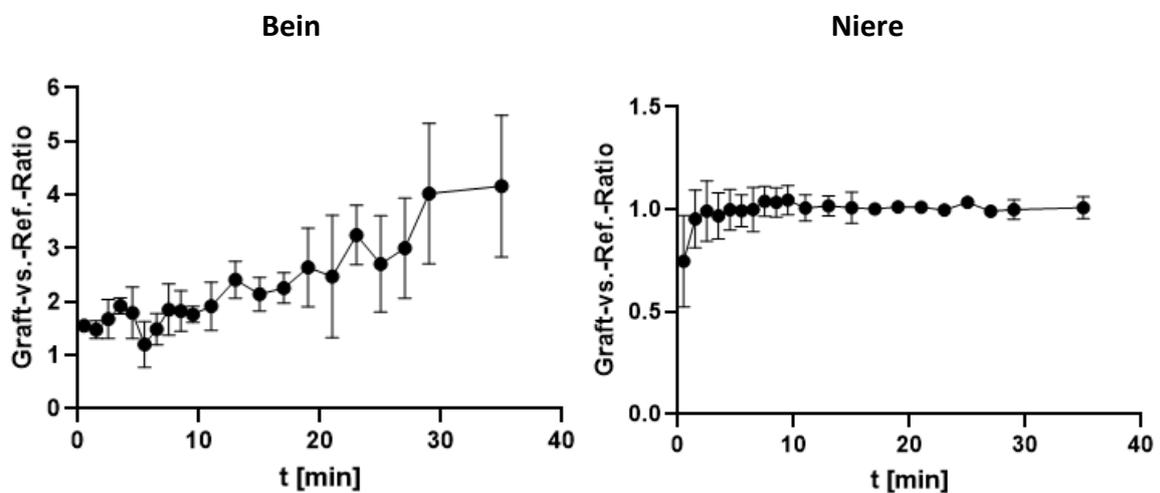


Abb. 15: Ratio zwischen dem durchschnittlichen Uptake im Transplantat und der Referenzregion in Bein und Niere (Mittelwerte, n = 3).

Für das Transplantat in der Inguinalfalte konnte das Verhältnis nicht bestimmt werden, da das Volumen der Blase während des Scanvorgangs zunahm, was eine genaue Lokalisierung verhinderte.

Die durchschnittlichen Ergebnisse des mittleren SUV im letzten Bild sind in Abbildung 16 dargestellt. Ein signifikanter Unterschied im SUV konnte nur für Transplantate im Beinmuskel festgestellt werden.

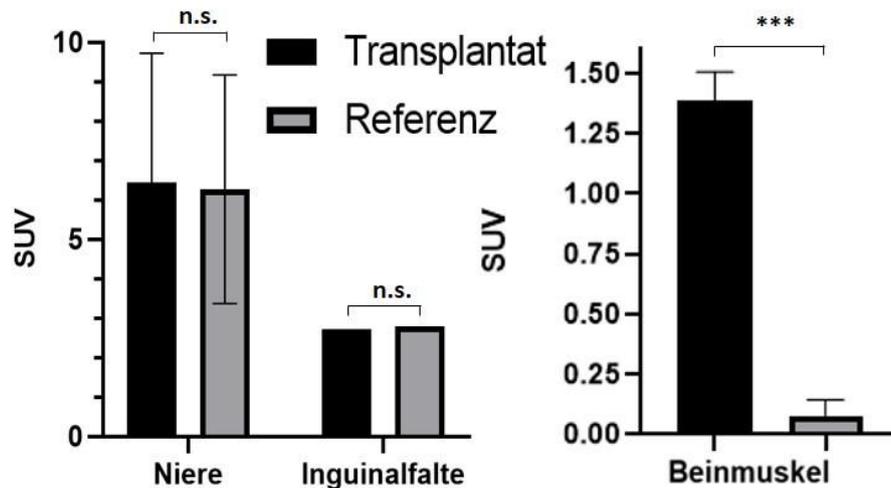


Abb. 16: SUVs in Transplantatregion und Referenzgewebe nach Erreichen eines Plateaus (letzter Frame, Min. 30 bis 40; n = 3 (Niere und Beinmuskel), n = 1 (Inguinalfalte)). a) Mittelwert des mittleren SUV im Kugelvolumen (r = 2 mm), b) Mittelwert des maximalen SUV im Beintransplantat gegenüber dem Mittelwert im Muskel (t-Test, P=0,007).

3.3 Autoradiographie

Die Transplantate in der Niere und der Leistenfalte konnten während der Sektion visuell eindeutig lokalisiert werden (Abbildung 17).

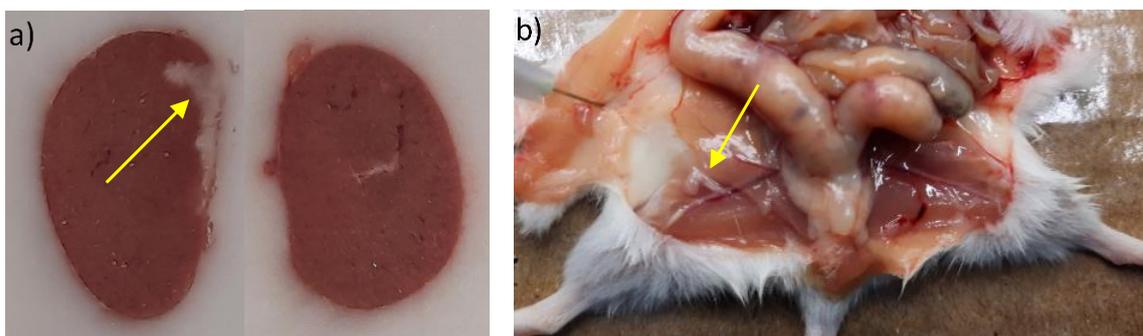


Abb. 17: Lokalisation des Transplantats in a) der linken Niere (links; Vergleich mit der rechten Niere) und b) der Leistenfalte während des Schnitts (gelbe Pfeile weisen auf das Transplantat).

Die NPICCs in der Muskulatur der Hintergliedmaße konnten bei der Präparation nicht mit dem Auge vom umgebenden Gewebe unterschieden werden, waren aber in der AR deutlich nachweisbar (Abbildung 18).

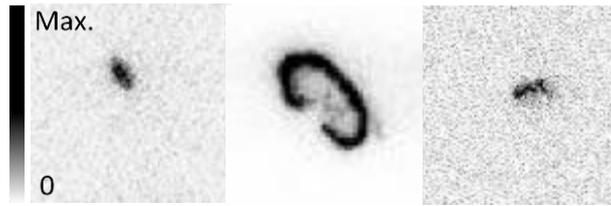


Abb. 18: AR-Resultate der Transplantationsorte in (von links nach rechts) Beinmuskel, Niere und Inguinalfalte.

Das Signal der in die Niere transplantierten NPICCs konnte *via* AR nicht von der hohen Aufnahme des Organs unterschieden werden. Die in die Leistenfalte transplantierten NPICCs wurden in der AR deutlich nachgewiesen.

4. Diskussion

Die Radiomarkierung von Exendin-4 mit Gallium-68 war erfolgreich mit guten Ausbeuten und hohen molaren Aktivitäten, die es uns ermöglichten, mit hohen Aktivitäten und niedrigen Peptid-zu-Subjekt-Verhältnissen zu arbeiten. Hohe molare Aktivitäten erlauben hierbei besonders die Detektion kleiner Transplantate mit geringer Rezeptordichte (67). Der Reinigungsprozess führte zu hoch konzentrierten Fraktionen mit Aktivitätskonzentrationen bis zu 1 MBq/ μ L.

Nur die NPICC-Transplantate im Beinmuskel des Mausmodells konnten *in vivo* dank hoher Aufnahme des [^{68}Ga]Ga-Exendin-4 nachgewiesen werden. Im Zuge der *ex vivo*-AR konnte die Peptidaufnahme im Transplantat der Inguinalfalte nachgewiesen werden, was aufgrund der großen Nähe zur Blase im *in vivo*-PET nicht möglich war.

Die Nierenkapsel erwies sich als ungeeignet für den *in vivo*-Nachweis lebensfähiger Betazellen mittels [^{68}Ga]Ga-Exendin-4-Bildgebung, da aufgrund des Vorhandenseins von GLP-1R in den glomerulären Kapillaren und Gefäßwänden der Mausniere nicht einmal ein AR-Signal in der Nähe der extrem hohen Aufnahme von [^{68}Ga]Ga-Exendin-4 in der Nierenrinde nachweisbar war (73). Dies macht die Niere zu einem weniger geeigneten Ort für die *in vivo*-Bildgebung von NPICCs.

Der hohe Kontrast zwischen Transplantat und Hintergrund in der Beinmuskulatur kann die Überwachung der Lebensfähigkeit der Betazellen mittels PET mit Exendin-4 erleichtern. Mit einem Kontrast von etwa 4 zu 1 für 2500 Inseläquivalente (IEQ) ist das Verhältnis der durchschnittlichen Aufnahme niedriger als die zuvor von Li *et al.* veröffentlichten Werte für die Leber von etwa 4 zu 1 für 1000 IEQ (42). Unter Verwendung der maximalen Aufnahme in der Transplantationsregion konnte das Verhältnis auf 17,6 erhöht werden (Abbildung 16). Künftige Experimente zur longitudinalen *in vivo*-Überwachung könnten daher von der Verwendung des maximalen SUVs von [^{68}Ga]Ga-Exendin-4 als Indikator profitieren.

Die Eignung des Muskels zur Detektion transplantierte Inselzellen mit einem [^{111}In]In-Exendin-3 als SPECT-Tracern wurde bereits durch Eter *et al.* und Buitinga *et al.* untersucht (41,74). Hierbei handelte es sich jedoch in zwei Fällen um murine Inselzellen. Buitinga *et al.* untersuchten des Weiteren die Transplantationsmöglichkeit humaner Inselzellen in NSG-Mäusen, verzichteten jedoch auf eine Kontrolle der Transplantatsviabilität durch Aufbau eines humanisierten Immunsystems (74). Die Verwendung von [^{111}In]In-Exendin-3 ermöglicht jedoch Dank der höheren Halbwertszeit des Indium-111 (2,8 Tage) eine längere Untersuchungsperiode.

Da die Leber nur eine geringe Akkumulation aufweist und besser durchblutet ist als der Beinmuskel, könnte sie ein günstigerer Ort für die Untersuchung der Inselzelltransplantation sein. In einem an diese Arbeit anschließendem Projekt wurde die Transplantation von LEA29Y-NPICCs in der Schweineleber

untersucht (75). Hierbei wurde *post Transplantation* ein erhöhter SUV festgestellt, der für die Akkumulation des Tracers im Organ spricht.

In einer Proof-of-Concept-Studie von Jansen *et al.* wurden humane Spenderzellen in die Leber von T1D-Patienten transplantiert und deren Viabilität und Funktion über einen längeren Zeitraum untersucht (75). Die anfängliche Normoglykämie der Studienteilnehmer mit Inselzelltransplantat nahm im Verlauf des Kontrollzeitraums (bis zu fünf Jahre) wieder ab und die Abstoßung bzw. erneute Zerstörung der Betazellen wurde für möglich erachtet. Die in der Doktorarbeit verwendeten NPICCs liefern hier aufgrund der LEA29Y-Expression an der Zelloberfläche einen Vorteil da sie gegenüber des humanen Immunsystems eine erhöhte Stabilität versprechen und langfristig zur Normalisierung des Blutzuckerspiegels und zur Insulinunabhängigkeit der Patienten beitragen können (14).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Überwachung des langfristigen Überlebens und der Stabilität transplantierte NPICCs *in vivo* mit radioaktiv markiertem Exendin-4 ein ausreichender Abstand zu den Ausscheidungsorganen erforderlich ist, wenn die Signale dieser Organe nicht unterdrückt werden können, und daher hat sich der Hinterbeinmuskel als der am besten geeignete Transplantationsort erwiesen. Der verwendete Tracer kann aufgrund der hohen molaren Aktivität auch im Rahmen einer zukünftigen humanen Therapie mit transplantierten NPICCs als wertvolles Tool zur Kontrolle der Transplantatsviabilität dienen.

Literaturverzeichnis

1. Brown GC. Living too long: the current focus of medical research on increasing the quantity, rather than the quality, of life is damaging our health and harming the economy. *EMBO Rep.* 2015;16(2):137-41.
2. Barnett K, Mercer SW, Norbury M, Watt G, Wyke S, Guthrie B. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet.* 2012;380(9836):37-43.
3. Collaboration TER. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet.* 2010;375:2215-22
4. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2006;367(9513):847-58.
5. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci.* 2014;11(11):1185-200.
6. Lebovitz HE. Type 2 Diabetes: An Overview. *Clinical Chemistry.* 1999;45(8):1339-45.
7. Egro FM. Why is type 1 diabetes increasing? *J Mol Endocrinol.* 2013;51(1):R1-13.
8. Onkamo P, Väänänen, S., Karvonen, M., Tuomilehto, J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes - the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 1999;42:1395-403.
9. Renard E. Automated insulin delivery systems: from early research to routine care of type 1 diabetes. *Acta Diabetol.* 2022.
10. Breton MD, Kanapka LG, Beck RW, Ekhlaspour L, Forlenza GP, Cengiz E, et al. A Randomized Trial of Closed-Loop Control in Children with Type 1 Diabetes. *N Engl J Med.* 2020;383(9):836-45.
11. Latres E, Finan DA, Greenstein JL, Kowalski A, Kieffer TJ. Navigating Two Roads to Glucose Normalization in Diabetes: Automated Insulin Delivery Devices and Cell Therapy. *Cell Metab.* 2019;29(3):545-63.
12. Weir GCB-W, S.; Leahy, J. L. Islet Mass and Function in Diabetes and Transplantation. *Diabetes.* 1990;39:401-5.
13. Kemter E, Denner J, Wolf E. Will Genetic Engineering Carry Xenotransplantation of Pig Islets to the Clinic? *Curr Diab Rep.* 2018;18(11):103.
14. Wolf-van Buerck L, Schuster M, Oduncu FS, Baehr A, Mayr T, Guethoff S, et al. LEA29Y expression in transgenic neonatal porcine islet-like cluster promotes long-lasting xenograft survival in humanized mice without immunosuppressive therapy. *Sci Rep.* 2017;7(1):3572.
15. Wolf-van Buerck L, Schuster M, Baehr A, Mayr T, Guethoff S, Abicht J, et al. Engraftment and reversal of diabetes after intramuscular transplantation of neonatal porcine islet-like clusters. *Xenotransplantation.* 2015;22(6):443-50.
16. Griffith BP, Goerlich CE, Singh AK, Rothblatt M, Lau CL, Shah A, et al. Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation. *N Engl J Med.* 2022;387(1):35-44.
17. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant.* 2005;5(3):443-53.
18. Grzech M, Dahlhoff M, Herbach N, Habermann FA, Renner-Muller I, Wanke R, et al. Specific transgene expression in mouse pancreatic beta-cells under the control of the porcine insulin promoter. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;315(1-2):219-24.
19. Aigner B, Renner S, Kessler B, Klymiuk N, Kurome M, Wünsch A, et al. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2010;88(7):653-64.
20. Kurome M, Ueda H, Tomii R, Naruse K, Nagashima H. Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.* 2006;15(2):229-40.
21. Besenfelder UM, J.; Müller, M.; Brem, G. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. *Theriogenology.* 1997;47(5):1051-60.

22. Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett.* 2006;104(1-2):70-5.
23. Bähr A, Käser T, Kemter E, Gerner W, Kurome M, Baars W, et al. Ubiquitous LEA29Y Expression Blocks T Cell Co-Stimulation but Permits Sexual Reproduction in Genetically Modified Pigs. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155676.
24. Klymiuk N, Van Buerck L, Bähr A, Offers M, Kessler B, Wuensch A, et al. Xenografted Islet Cell Clusters From INSLEA29Y Transgenic Pigs Rescue Diabetes and Prevent Immune Rejection in Humanized Mice. *Diabetes.* 2012;61:1527-32.
25. Fujiwara S. Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol.* 2018;233(4):2889-901.
26. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2):118-30.
27. van Buerck L, Seissler, J. The potential of local immunomodulation and tolerance induction in porcine islet xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2013;20:39-64.
28. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res.* 2001;50:536-46.
29. Meloni AR, DeYoung MB, Lowe C, Parkes DG. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic beta-cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15(1):15-27.
30. Barg S. Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol Toxicol.* 2003;92(1):3-13.
31. Pertusa JAG, Leon-Quinto T, Berna G, Tejedo JR, Hmadcha A, Bedoya FJ, et al. Zn²⁺ chelation by serum albumin improves hexameric Zn²⁺-insulin dissociation into monomers after exocytosis. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187547.
32. Boucher J, Kleinriders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1).
33. Liao S, Liang Y, Zhang Z, Li J, Wang J, Wang X, et al. In vitro metabolic stability of exendin-4: pharmacokinetics and identification of cleavage products. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116805.
34. Runge S, Schimmer S, Oschmann J, Schiodt CB, Knudsen LB, Jeppesen CB, et al. Differential Structural Properties of GLP-1 and Exendin-4 Determine Their Relative Affinity for the GLP-1 Receptor N-Terminal Extracellular Domain. *Biochemistry.* 2007;46(19):5830-40.
35. Moon MJ, Kim HY, Kim SG, Park J, Choi DS, Hwang JI, et al. Tyr1 and Ile7 of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) confer differential ligand selectivity toward GIP and glucagon-like peptide-1 receptors. *Mol Cells.* 2010;30(2):149-54.
36. Christ E, Wild D, Ederer S, Béhé M, Nicolas G, Caplin ME, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor imaging for the localisation of insulinomas: a prospective multicentre imaging study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology.* 2013;1(2):115-22.
37. Jodal A, Lankat-Buttgereit B, Brom M, Schibli R, Behe M. A comparison of three (67/68)Ga-labelled exendin-4 derivatives for beta-cell imaging on the GLP-1 receptor: the influence of the conjugation site of NODAGA as chelator. *EJNMMI Res.* 2014;4:31.
38. Andersen DB, Grunddal KV, Pedersen J, Kuhre RE, Lund ML, Holst JJ, et al. Using a Reporter Mouse to Map Known and Novel Sites of GLP-1 Receptor Expression in Peripheral Tissues of Male Mice. *Endocrinology.* 2021;162(3).
39. Jansen TJP, van Lith SAM, Boss M, Brom M, Joosten L, Behe M, et al. Exendin-4 analogs in insulinoma theranostics. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2019;62(10):656-72.
40. Mikkola K, Cheng-Bin Y, Fagerholm V, Ishizu T, Viki-Veikko E, Rajander J, et al. 64Cu- and 68Ga-Labelled [Nle14,Lys40(Ahx-NODAGA)NH2]-Exendin-4 for Pancreatic Beta Cell Imaging in Rats. *Mol Imaging Biol.* 2014;16:255-63.
41. Eter WA, Van der Kroon I, Andralojc K, Buitinga M, Willekens SMA, Frielink C, et al. Non-invasive in vivo determination of viable islet graft volume by (111)In-exendin-3. *Sci Rep.* 2017;7(1):7232.
42. Li J, Rawson J, Chea J, Tang W, Miao L, Sui F, et al. Evaluation of [(68)Ga]DO3A-VS-Cys(40)-Exendin-4 as a PET Probe for Imaging Human Transplanted Islets in the Liver. *Sci Rep.* 2019;9(1):5705.

43. Cherry CS, Gambhir SS. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR*. 2001;42(3):219-32.
44. Zanzonico P. Positron emission tomography: a review of basic principles, scanner design and performance, and current systems. *Semin Nucl Med*. 2004;34(2):87-111.
45. Lindheimer F, Lindner MJ, Oos R, Honarpisheh M, Zhang Y, Lei Y, et al. Non-invasive in vivo imaging of porcine islet xenografts in a preclinical model with [68Ga]Ga-exendin-4. *Frontiers in Nuclear Medicine*. 2023;3.
46. Stein GHY, R. [22] Autoradiography. *Methods in Enzymology*. 1979;58:279-92.
47. Amemiya YM, J. Imaging plate illuminates many field. *Nature*. 1988;336:89-90.
48. Leblans P, Vandenbroucke D, Willems P. Storage Phosphors for Medical Imaging. *Materials (Basel)*. 2011;4(6):1034-86.
49. Nicklaus E, Fischer F. F-Centres of Two Types in BaFCl Crystals. *physica status solidi (b)*. 2006;52(2):453-60.
50. van der Born D, Pees A, Poot AJ, Orru RVA, Windhorst AD, Vugts DJ. Fluorine-18 labelled building blocks for PET tracer synthesis. *Chem Soc Rev*. 2017;46(15):4709-73.
51. Hartenbach M, Delker A, Hartenbach S, Schlichtiger J, Niedermoser S, Wangler C, et al. Dose-dependent uptake of 3'-deoxy-3'-[(18)F]fluorothymidine by the bowel after total-body irradiation. *Mol Imaging Biol*. 2014;16(6):846-53.
52. Reshef A, Shirvan A, Waterhouse RN, Grimberg H, Levin G, Cohen A, et al. Molecular imaging of neurovascular cell death in experimental cerebral stroke by PET. *J Nucl Med*. 2008;49(9):1520-8.
53. Sobrio F, Medoc M, Martial L, Delamare J, Barre L. Automated radiosynthesis of [(18)F]ML-10, a PET radiotracer dedicated to apoptosis imaging, on a TRACERLab FX-FN module. *Mol Imaging Biol*. 2013;15(1):12-8.
54. Lee WW, Group KS. Clinical Applications of Technetium-99m Quantitative Single-Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography. *Nucl Med Mol Imaging*. 2019;53(3):172-81.
55. Crisan G, Moldovean-Cioroianu NS, Timaru DG, Andries G, Cainap C, Chis V. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9).
56. Bourguignon MH, Pauwels EKJ, Loc'h C, Mazière B. Iodine-123 labelled radiopharmaceuticals and single-photon emission tomography: a natural liaison. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1997;24:331-44.
57. Velikyan I. Prospective of 68Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics*. 2013;4(1):47-80.
58. Borchers A, Pieler T. Programming pluripotent precursor cells derived from Xenopus embryos to generate specific tissues and organs. *Genes (Basel)*. 2010;1(3):413-26.
59. Sabongi JG, Goncalves MC, Alves CD, Alves J, Scapulatempo-Neto C, Moriguchi SM. Lutetium 177-DOTA-TATE therapy for esthesioneuroblastoma: A case report. *Exp Ther Med*. 2016;12(5):3078-82.
60. Tu Z, Mach RH. C-11 Radiochemistry in Cancer Imaging Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2010;10(11):1060-95.
61. Dahl K, Halldin C, Schou M. New methodologies for the preparation of carbon-11 labeled radiopharmaceuticals. *Clin Transl Imaging*. 2017;5(3):275-89.
62. Lindner S, Wangler C, Bailey JJ, Jurkschat K, Bartenstein P, Wangler B, et al. Radiosynthesis of [(18)F]SiFAlin-TATE for clinical neuroendocrine tumor positron emission tomography. *Nat Protoc*. 2020;15(12):3827-43.
63. Lindner T, Altmann A, Giesel F, Kratochwil C, Kleist C, Kramer S, et al. (18)F-labeled tracers targeting fibroblast activation protein. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2021;6(1):26.
64. Liu Y, Liu G, Hnatowich D. A Brief Review of Chelators for Radiolabeling Oligomers. *Materials*. 2010;3(5):3204-17.
65. Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*. 2014;43(1):260-90.

66. Tippayamontri T, Betancourt-Santander E, Guérin B, Lecomte R, Paquette B, Sanche L. Estimation of the Internal Dose Imparted by ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose to Tissues by Using Fricke Dosimetry in a Phantom and Positron Emission Tomography. *Frontiers in Nuclear Medicine*. 2022;2.
67. Luurtsema G, Pichler V, Bongarzone S, Seimbille Y, Elsinga P, Gee A, et al. EANM guideline for harmonisation on molar activity or specific activity of radiopharmaceuticals: impact on safety and imaging quality. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2021;6(1):34.
68. Coenen HH, Gee AD, Adam M, Antoni G, Cutler CS, Fujibayashi Y, et al. Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry - Setting the record straight. *Nucl Med Biol*. 2017;55:v-xi.
69. Roesch F. Maturation of a Key Resource - The Germanium-68/Gallium-68 Generator: Development and New Insights. *Current Radiopharmaceuticals*. 2012;5:202-11.
70. Molinski VJ. A review of ^{99m}Tc generator technology. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 1982;33(10):811-9.
71. Nelson BJB, Andersson JD, Wuest F, Spreckelmeyer S. Good practices for (⁶⁸Ga) radiopharmaceutical production. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2022;7(1):27.
72. Wild D, Wicki A, Mansi R, Behe M, Keil B, Bernhardt P, et al. Exendin-4-based radiopharmaceuticals for glucagonlike peptide-1 receptor PET/CT and SPECT/CT. *J Nucl Med*. 2010;51(7):1059-67.
73. Fujita H, Morii T, Fujishima H, Sato T, Shimizu T, Hosoba M, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int*. 2014;85(3):579-89.
74. Buitinga M, Cohrs CM, Eter WA, Claessens-Joosten L, Frielink C, Bos D, Sandker G, Brom M, Speier S, Gotthardt M. Noninvasive Monitorin of Glycemia-Induced Regulation of GLP-1R Expression in Murine and Human Islets of Langerhans. *Diabetes* 2020;69:2246-2252.
75. Dinnyes A, Schnur A, Muenthaisong S, Bartenstein P, Burcez CT, Burton N, et al. Integration of nano- and biotechnology for beta-cell and islet transplantation in type-1 diabetes treatment. *Cell Prolif*. 2020;53(5):e12785.
76. Jansen TJP, Buitinga M, Boss M, Nijhoff MF, Brom M, de Galan BE, van der Graff M, van Koeverden S, Vantuyghem M, Beron A, Pattou F, Engelse MA, Velikyan I, Eriksson O, de Koning EJP, Gotthardt M. Monitorin β -Cell Survival After intraheptic Islet Transplantation Using Dynamic Exendin PET Imaging: A Proof-of-Concept Study in Individuals With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2023;72:898-907.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich zuerst bei allen Beteiligten bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dies betrifft Prof. Seißler und sein Team, Prof. Wolf, Dr. Elisabeth Kemter und die Kollegen der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des LMU Klinikums Dr. Franz Josef Gildehaus, PD Dr. Simon Lindner und Frau Rosel Oos. Ein besonderer Dank geht hierbei an Frau Prof. Sibylle Ziegler für die Unterstützung beim Schreiben der Publikationen, Herrn Prof. Peter Bartenstein für die Motivation und Dr. Lena Lindner und Maria Meindl für die Weitergabe ihres Know-Hows.

Auch möchte ich den aktuellen wie ehemaligen Kollegen der Radiopharmazie Conny Neudecker, Steffi Neubaur, Manu Hoffmann, Bianca Steinbauer, Andi Harbach, Emanuel Joseph, Johannes Toms, Milan Çoporda, Myra Cheropoulou und besonders Monireh Shojaei, Rebecca Schäfer, Marcel Simmet und Benni Kugelmann meinen Dank für die gemeinsamen vergangenen Jahre im Team ausdrücken. Für die gute, klinikinterne Atmosphäre danke ich außerdem Giovanna Palumbo, Melissa Joy Antons, Adi Zounek, Guido Böning, Christian Zach, Astrid Delker und Andi Bollenbacher und Michi Götz mit Team sowie allen weiteren Mitarbeitern der Klinik. Auch meinen iNanoBIT-Mädeln Nicol Gloddek und Johanna Pilz möchte ich für die Zusammenarbeit in Freud und Leid im Rahmen des iNanoBIT-Projekts danken und ihnen viel Erfolg bei ihren eigenen Projekten wünschen.

Für hervorragende akademische und teilweise ebenso menschliche Unterstützung während des Studiums möchte ich Prof. Andreas Dreuw, Prof. Peter Comba, Prof. Luise Krauth-Siegel der Ruperto Carola Heidelberg, Prof. Gerardo Hernandez-Sosa des Karlsruher Instituts für Technologie und Prof. Chris Orvig der University of British Columbia danken sowie Dr. Max Ackermann für die kompetente Betreuung und Prof. Dr. Clemens Cyran (LMU München) für die Betreuung der Doktorarbeit. Auch möchte ich mich bei den vielen Kommilitonen und Menschen bedanken, die ich in dieser Zeit kennen und schätzen gelernt habe. Dies betrifft Vera Cornet, Nici Mertes, Hannah Veelmann, Nico Balzer und Andi Hüllen. Hervorheben möchte ich dabei den Rest der Tipprunde mit Christoph Hendrich und Daniel Englert mit denen man immer was Cooles erlebt und speziell Dominik Zetschok und Kai Kohler mit denen mich seit Jahren eine tiefe Freundschaft verbindet. Außerdem möchte ich meinen Freundschaften aus Münchner Zeit Jennifer Teichert, Daniel Pilot sowie Marcus und Sabine Steudner danken.

Des Weiteren möchte ich meinen Freunden aus der Heimat Miri Sagner, Nils Mößner, Steffi Deckert, Lena Roth, Sebi Weber und Michi Ziegler danken, gerade dass man sich über die Jahre nie aus den Augen verloren hat und einiges miteinander erleben durfte.

Ein wichtiger Dank geht auch an Frau Eleni Sachs für die tollen Erlebnisse die wir miteinander teilen und für ihre komplizierte und wunderbare Art ein Mensch zu sein den ich sehr schätze und mit dem mir v.a. nie langweilig wird.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Zum einen bei meinen Geschwistern Daniel Lindheimer und Katrin Baumgarten mit Eric, meiner Nichte Frida und dem kleinen Jakob und zum anderen bei meinen Eltern Petra und Heinz für ihre immerwährende Unterstützung und dafür, dass sie meine sportlichen, kulturellen und naturwissenschaftlichen Interessen stets gefördert haben und mich zu einem objektiven, offenen und interessierten Menschen erzogen haben.