

**Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. C. D. Claussen**

**Nachweis von eisenmarkierten hämatopoietischen  
Vorläuferzellen im Agarphantom  
mittels hochauflösender MR-Tomographie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Sebastian Johannes Kramberg**

**aus  
Esslingen a. N.**

**2011**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Herr Professor Dr. I. B. Autenrieth

Herr Privatdozent Dr. J. Wiskirchen

Frau Professor Dr. U. Ernemann

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
1.1. Magnetfeldresonanztomographie .....	5
1.2. Einsatz von Kontrastmitteln .....	6
1.3. Molekulare Bildgebung mittels superparamagnetischer Kontrastmittel .....	7
1.4. Transfektionsagenzien .....	8
1.5. Fragestellung .....	9
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Material für das Zellkultursystem.....</b>	<b>10</b>
2.1.1. Zellen.....	10
2.1.2. Kulturmedium .....	11
2.1.3. Trypanblau.....	11
<b>2.2. Methoden für das Zellkultursystem .....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Kultivierung / Subkultivierung .....	11
2.2.2. Vitalitätsprüfung.....	12
<b>2.3. Material für die Versuche.....</b>	<b>12</b>
2.3.1. Kernspinkontrastmittel .....	12
2.3.2. Transfektionsagenzien.....	12
2.3.2.1. Kationisches Lipid.....	12
2.3.2.2. Polyethylenimin-Derivat.....	12
2.3.3. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS <sup>-</sup> ) .....	13
2.3.4. Agarphantome .....	13
2.3.5. Fluorochrom für die Durchflusszytometrie.....	13
2.3.6. Apoptoseinduktor .....	13
2.3.7. Elektronischer Zellcounter .....	13
2.3.8. Photometrisches Testsystem zur quantitativen Eisenbestimmung .....	14
<b>2.4. Methoden der Versuche.....</b>	<b>14</b>
2.4.1. Proliferationskinetiken.....	14
2.4.1.1. Proliferationskinetiken / Vitalität mit Resovisteisen .....	15
2.4.1.2. Proliferationskinetiken / Vitalität mit Resovisteisen plus Transfektionsagenzien .....	16
2.4.2. Durchflusszytometrie .....	16
2.4.3. Elektronenmikroskopie.....	18
2.4.4. Quantitative Eisenbestimmung .....	18
2.4.5. Dosiskurven.....	19
2.4.5.1. Resovisteisen .....	19
2.4.5.2. Resovisteisen plus Transfektionsagenzien .....	19
2.4.6. Auswaschversuche .....	20
2.4.7. Agarphantome für die Kernspintomographie .....	20
2.4.8. Messung im Kernspintomographen .....	21
2.4.9. Quantifizierung der Signalauslöschung mittels EDV .....	22
2.4.10. Graphische Auswertung und statistische Berechnungen .....	22
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Proliferationskinetiken und Vitalitätsbestimmung mit Resovisteisen.....</b>	<b>23</b>

<b>3.2. Proliferationskinetiken und Vitalitätsbestimmung mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3. Apoptoseprüfung mit Resovisteisen .....</b>	<b>29</b>
<b>3.4. Quantitative Eisenbestimmung .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5. Bildgebung der markierten Zellen mit Dosiskurven .....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Bildgebung mit Resovisteisen .....	36
3.5.2. Dosiskurven mit Resovisteisen .....	39
3.5.3. Bildgebung mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien.....	40
3.5.4. Dosiskurven mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien.....	41
3.5.5. Vergleich der Signalauslöschung ohne / mit Verwendung von Transfektionsagenzien ....	42
<b>3.6. Auswaschversuche.....</b>	<b>43</b>
<b>3.7. Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>47</b>
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
4.1. Durchgeführte Untersuchungen.....	49
4.2. Bisheriger klinischer Einsatz von dextranecoateten SPIOs und Ausweitung des Einsatzes auf die molekulare Bildgebung.....	50
4.3. Bildgebung markierter Zellen im MRT .....	51
4.4. Toxizitätsprüfung .....	53
4.5. Zelluläre Eisenladung und Nachweis der Zellen mittels Hochfeld-MR.....	55
4.6. Auswaschversuch und Zellmarkierung.....	59
4.7. Migration und Differenzierung .....	60
<b>5. FAZIT .....</b>	<b>61</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>63</b>
<b>7. LITERATUR.....</b>	<b>66</b>

## Abkürzungen, Größen und Einheiten

CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
CD	Cluster of Differentiation
d	Tag(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Analysis And Sorting
FCS	Fetal Calve Serum
Fe	Eisen
FISP3D	Fast Imaging With Steady-State Precession
FSC	Forward Light Scatter
GRE	Gradient-Recalled Echo
h	Stunde(n)
MION	Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles
N	Stickstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Positron Emission Tomography
R <sub>1</sub>	Longitudinale Relaxationsrate
R <sub>2</sub>	Transversale Relaxationsrate
RES	Retikuloendotheliales System
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Zellkulturmedium
SPECT	Singel Photon Emission Computer Tomography
SPIO	Super Paramagnetic Iron Oxide
SSC	Sideward Light Scatter
T	Tesla (Einheit der magnetischen Feldstärke)
t	Zeit
T <sub>1</sub>	Spin-Gitter-Relaxationszeit
T <sub>2</sub>	Spin-Spin-Relaxationszeit
TA	Transfektionsagens
TE	Time Echo
TMRE	Tetramethyrrhodaninethylester
TR	Time Repeat
USPIO	Ultras-small Particles of Iron Oxide

## 1. Einleitung

Zelluläre Therapien gehören in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen schon seit längerer Zeit zu den Standardverfahren.

Nach myeloablativer Behandlung des Empfängers durch Chemotherapie und / oder Radiatio erhält dieser in der Regel  $2,5 \times 10^6$  hämatopoietische Stammzellen intravenös. Innerhalb von 10-20 Tagen nach Infusion lässt sich im Blutbild an der Thrombozytenzahl der Erfolg oder Misserfolg der Transplantation erkennen.<sup>(29)</sup> Bei keiner bzw. nicht ausreichender Ansiedlung hämatopoietischer Stammzellen im Knochenmark kann die Transplantation wiederholt werden. Es besteht folglich ein diagnostisch blindes Fenster von bis zu 20 Tagen, in dem die Ansiedlung und (regelrechte) Proliferation des Transplantats im Knochenmark nicht beurteilt werden kann. Zwar ist nach Lage des Blutbildes bei misslungener Transplantation eine Retransplantation durchführbar, jedoch bestehen erhebliche Nachteile für den Patienten, da sich die Zeit, in der er sich in potentiell lebensbedrohlicher Panzytopenie befindet, entsprechend verlängert.

Deshalb ist ein Verfahren erstrebenswert, mit dem sich der Erfolg bzw. Misserfolg einer Knochenmarktransplantation ohne relevante Zeitverzögerung nachweisen lässt.

Eine interessante Möglichkeit zur Nachverfolgung der Zellen bieten dabei die bildgebenden Verfahren, insbesondere die Magnetresonanztomographie in Verbindung mit molekularen Markern. Sie ist schnell durchführbar, problemlos verfügbar in allen Zentren mit hämatologischer Maximalversorgung und nicht invasiv. Es ist möglich, in relativ kurzer Zeit Ganzkörperbilder zu gewinnen und damit eine zuverlässige Aussage über den Therapieverlauf zu treffen.<sup>(21, 37)</sup>

Dazu ist die Markierung der zu transplantierenden Zellen in vitro mit einem Marker/Kontrastmittel erforderlich. Das Transplantat kann dann in vivo per Bildgebung nachgewiesen werden und eine Beurteilung des Stammzell-Homings in den Markraum der Knochen sowie der Proliferation im Markraum wäre möglich. Neu ist, dass nicht mehr anatomisch-morphologische Auffälligkeiten im Vordergrund der Betrachtung stehen, sondern Aussagen über

den Krankheits- bzw. Therapieverlauf auf molekularer und zellulärer Ebene getroffen werden.<sup>(28)</sup>

In neueren Untersuchungen werden CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen nicht nur im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen untersucht, sondern es werden zunehmend auch Erfolge beim Einsatz nach Myokardinfarkt beschrieben. Auch hier ist eine effektive Markierung der Stammzellen zur Kontrolle der zellulären Therapie notwendig.<sup>(9, 13, 47)</sup>

Außer zur Darstellung und Verfolgung von Transplantaten werden Methoden der Molekularen Bildgebung auch zum Nachweis von Lymphknotenmetastasen<sup>(50)</sup> und Tumorgewebe<sup>(7, 44)</sup> eingesetzt. Außerdem werden Substanzen untersucht, die gleichzeitig als Kontrastmittel und Zytostatikatransporter dienen.<sup>(33)</sup> Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Markierung dendritischer Zellen zur Stimulation einer Immunantwort gegen maligne Zellen.<sup>(56)</sup>

## 1.1. Magnetfeldresonanztomographie

Lauterbur und Mansfield gelang es erstmals, die magnetischen Eigenschaften von Atomkernen in der Bildgebung zu nutzen.<sup>(36, 41, 42)</sup> Grundlage bildet der Eigendrehimpuls von Atomkernen (Spin). Dieser kann mit einem äußeren Magnetfeld in Wechselwirkung treten. Im Magnetresonanztomographen besteht ein konstantes, statisches Magnetfeld  $B_0$ , welches die Drehachse der Protonen, die normalerweise in zufälligem Winkel im Raum steht, entlang des Feldes  $B_0$  ausrichtet, also in einen geordneteren Zustand überführt.

Wird dieser geordnete Zustand durch einen von außen über eine Spule angelegten Hochfrequenzradioimpuls gestört, entsteht ein Resonanzeffekt und die Drehachsen der Atomkerne werden aus der Ebene  $B_0$  ausgelenkt. Nach Ende des Impulses richten sich die Achsen wieder entlang  $B_0$  aus.<sup>(51)</sup> Dies wird als Relaxation bezeichnet und bildet die Grundlage der Bildgewinnung. Man unterscheidet zwischen Spin-Spin ( $T_2$ ) und Spin-Gitter Relaxation ( $T_1$ ).

## 1.2. Einsatz von Kontrastmitteln

Ziel der molekularen bzw. zellulären Bildgebung ist die Darstellung von mikroskopischen (Zellen) bzw. submikroskopischen (Moleküle) Strukturen. Um diese von umgebenden Strukturen *in vitro* und *in vivo* unterscheiden zu können, müssen sie sich in ihrem Signal deutlich von der Umgebung abheben. Dies wird mit dem Einsatz von zellulären Signalamplifikationsmechanismen, z. B. Kontrastmitteln erreicht. Durch einen komplexen Mechanismus beeinflussen Kontrastmittel die Spinrelaxationszeiten der sie umgebenden Atome. Grundsätzlich unterscheidet man bei Kontrastmitteln die Auswirkungen auf  $T_1$ - und auf  $T_2$ -gewichtete Aufnahmen. Maß dafür ist die Relaxivität. Sie definiert das Ausmaß, in dem die Kontrastmittel die Relaxationsrate der Protonen beeinflussen. Eine Verringerung von  $T_1$  führt zu einer Signalanhebung auf  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen, während eine Verringerung von  $T_2$  zu einer Signalabschwächung führt.

Das in dieser Arbeit verwendete Kontrastmittel Resovist<sup>®</sup> gehört zu den superparamagnetischen Kontrastmitteln (SPIOs, super paramagnetic iron oxides). Superparamagnetismus beschreibt die Eigenschaft von Stoffen, ein sehr großes magnetisches Moment zu entwickeln, wenn sie mit äußeren Magnetfeldern in Wechselwirkung treten. Fällt das externe Magnetfeld weg, endet auch der magnetische Effekt der superparamagnetischen Substanz. SPIOs werden in der Regel als negative  $T_2$ -Kontrastmittel eingesetzt, d. h. sie erzeugen auf  $T_2$ -gewichteten Aufnahmen eine Signalabschwächung. Im Gegensatz dazu führen die herkömmlichen paramagnetischen Kontrastmittel mit Gadoliniumchelatkomplexen (z. B. Magnevist<sup>®</sup>) zu einer Signalanhebung auf  $T_1$ -gewichteten Aufnahmen. Der Vorteil von SPIOs gegenüber gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln liegt in ihren ca. fünffach höheren Relaxationsraten ( $R_1$  und  $R_2$ ) mit entsprechend höheren kontrastgebenden Eigenschaften.<sup>(25)</sup> SPIO-Kristalle haben die Summenformel  $Fe_2^{3+}O_3M^{2+}O$  (M ist ein Metallion, z. B. Eisen, Nickel, Cobalt oder Magnesium). Sowohl  $T_1$  als auch  $T_2/T_2^*$  wird durch SPIOs verkürzt, wobei der  $T_2$ -Effekt ca. 6mal stärker ist.<sup>(57)</sup> Resovist besitzt ein  $R_1$  von 151 l/mmol/s und ein  $R_2$  von 25,4 l/mmol/s. Das erklärt seinen vorwiegenden Einsatz als  $T_2$ -Kontrastmittel mit charakteristischer



Signalauslöschung im Kernspinbild; jedoch sind bei geeigneter Sequenzwahl auch T<sub>1</sub>-gewichtete Aufnahmen möglich.

Entwickelt wurde Resovist als leberspezifisches Kontrastmittel zur Detektion von fokalen Leberläsionen.<sup>(46)</sup> Nach i. v. Applikation reichern sich die Partikel innerhalb von wenigen Minuten durch Phagozytose der Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) in Leber und Milz an.<sup>(49)</sup> Zur Herstellung der Biokompatibilität liegt der kristalline Eisenkern der SPIOs nicht frei, sondern wird von einer Dextranhülle, im Falle von Resovist von einer Carboxydextranhülle umgeben.

Eine neuere Entwicklung im Bereich der superparamagnetischen Kontrastmittel stellen USPIOs (ultrasmall particles of iron oxide) dar. Sie sind kleiner als SPIOs und können aufgrund ihrer geringen Größe das Kapillarbett verlassen und sich im Interstitium anreichern. Von dort werden sie über Lymphgefäße drainiert; deshalb können sie in der MR-Lymphangiographie eingesetzt werden.<sup>(57)</sup> In der Molekularen Bildgebung wird ihr Einsatz geprüft. Allerdings scheint die Markierung mit USPIOs weniger effektiv zu sein als die Markierung mit SPIOs.<sup>(20)</sup>

### 1.3. Molekulare Bildgebung mittels superparamagnetischer Kontrastmittel

Eisenmarkierte Zellen wurden in vitro mittels MRT erstmals von Weissleder et al. nachgewiesen.<sup>(58)</sup> Grundsätzlich wird zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung von Zellen unterschieden. Eine spezifische Markierung gelingt z. B. mittels covalenter Bindung des SPIO an ein Tat-Peptid des HIV-Virus, das die Internalisierung über Oberflächenrezeptoren vermittelt<sup>(37)</sup> oder durch die Bindung eines USPIO an einen monoklonalen Anti-Transferrin-Antikörper.<sup>(15)</sup> Unspezifische Markierung geschieht mittels Internalisierung des SPIO in die Zelle durch unselektive Endocytose. Der Vorteil der spezifischen Aufnahme ist die Möglichkeit, gezielt einen Zelltyp und auch nicht-phagozytierende Zellen zu markieren. Allerdings stehen dem die aufwendige und teure Herstellung des Markers und die fehlende Erfahrung in der Bildgebung bei klinischen Feldstärken gegenüber, da zur Detektion Feldstärken

von 4,7 T<sup>(15)</sup> bis 14 T<sup>(37)</sup> verwendet wurden. Diese Hochfeldtomographen erlauben zwar eine quasi-mikroskopische Auflösung, allerdings ausschließlich unter Laborbedingungen.<sup>(7)</sup> In Tierversuchen liegen erste Erfahrungen vor, u. a. mit mesenchymalen Stammzellen<sup>(35)</sup>, neuronalen Vorläuferzellen<sup>(15)</sup> und hämatopoietischen Stammzellen<sup>(21)</sup>.

In der vorliegenden Arbeit werden die Zielzellen durch in-vitro-Inkubation mit klinisch zugelassenen SPIOs unspezifisch markiert. Ein aufwendiger Präparationsprozess entfällt und eine in vitro Inkubation unter kontrollierten Bedingungen ist möglich. Zudem ist Resovist klinisch zugelassen und breit verfügbar. Zu beachten ist die potentielle Toxizität der aufgenommenen SPIOs. Durch lysosomalen Abbau der Dextranhülle besteht die Gefahr der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in einer Haber-Weiss-Reaktion.<sup>(26)</sup> Deshalb ist eine Toxizitätsprüfung hinsichtlich Vitalität, Proliferationsfähigkeit und Apoptoseinduktion notwendig.

#### 1.4. Transfektionsagenzien

Durch Kombination von SPIOs mit Transfektionsagenzien kann die Inkubationszeit verkürzt, die benötigte Eisenmenge reduziert und die Exposition der Stammzellen mit potentiell toxischen Substanzen minimiert werden, bei gleichzeitiger Erhöhung der Beladungseffektivität.<sup>(26)</sup> Bisher wurden Transfektionsagenzien zum Transport von DNA, RNA und Oligonucleotiden ins Zellinnere eingesetzt.

Es stehen liposomale und nichtliposomale Agenzien zur Verfügung. Der Wirkungsmechanismus der schon längere Zeit etablierten liposomalen Agenzien beruht auf der Bildung von Liposomen, die das Transfektionsmaterial umschließen und durch Fusion mit der Zellmembran ins Zytoplasma einschleusen. Die gemeinsame Verwendung zusammen mit dextranumhüllten SPIOs und USPIOs stellt ein neues Einsatzgebiet dar. Grundlage dafür sind die elektrischen Eigenschaften von DNA und dextranumhüllten SPIOs. Beide Makromoleküle besitzen eine negative Oberflächenladung, die mit dem positiv geladenen Teil des kationischen Transfektionsagens wechselwirkt und durch elektrostatische Kräfte zur Bildung von Liposomen führt. Die Lipidketten des

Transfektionsagens zeigen dabei nach außen und ermöglichen durch Fusion mit der Zellmembran eine vereinfachte Aufnahme des Kontrasmittels in die Zelle.<sup>(22)</sup>

Ähnliches gilt für die neuere Klasse der nichtliposomalen Transfektionsagenzien. Es handelt sich um polykationische Polymere, die mit DNA positiv geladene Komplexe bilden. Diese verbinden sich mit ubiquitär vorhandenen negativ geladenen Proteoglykanen der Zelloberfläche und werden dann per Endocytose aufgenommen.<sup>(48)</sup> Die Transfektionseffizienz wird durch die Wirkung eines Puffers im Endolysosom gesteigert. Nach erfolgter Endocytose puffert das Polyethylenimin den sauren pH im Lysosom ab und verhindert den schnellen Abbau des transfizierten Materials.<sup>(10)</sup>

## 1.5. Fragestellung

Den Experimenten liegt ein in-vitro-Modell CD<sup>34+</sup> hämatopoietischer Stammzellen zugrunde, das den Nachweis eisenmarkierter Zellen in vivo mittels hochauflösender Magnetresonanztomographie in einem 3T-Scanner simulieren soll. Zur Bildgebung werden hochauflösende, aber alltagstaugliche Spulen eingesetzt. Die Messprotokolle beinhalten eine T<sub>2</sub>\*-gewichtete FISP3D-Sequenz.

Folgende Fragen sollen mit den Versuchen beantwortet werden:

- Lassen sich hämatopoietische Vorläuferzellen effektiv mit dextranummantelten SPIOs beladen ?
- Können die markierten Zellen mittels hochauflösender Magnetfeldresonanztomographie bei klinischen Feldstärken nachgewiesen werden?
- Welchen Einfluss auf die Effektivität der Eisenbeladung haben Inkubationszeit und Eisendosis?

- Lässt sich mit dem Einsatz unterschiedlicher Transfektionsagenzien die Eisenbeladung effizienter gestalten?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen zellulärem Eisengehalt und Signalstärke und wie wirkt sich dieser auf die Bildgebung im Hochfeldtomographen aus?
- Wie lange lassen sich proliferierende markierte Zellen kernspintomographisch nachweisen?
- Hat die Beladung mit Eisen Einfluss auf Vitalität, Proliferationsfähigkeit und Apoptoserate der Vorläuferzellen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material für das Zellkultursystem

#### 2.1.1. Zellen

Als Modell für hämatopoietische Stammzellen diente die CD34-positive Zelllinie KG-1A.<sup>(32)</sup> Dabei handelt es sich um Zellen einer akuten myeloischen Leukämie. Die Zellen wurden aus der Zelllinie KG-1 isoliert, besitzen aber im Gegensatz zu dieser den für hämatopoietische Vorläuferzellen charakteristischen Oberflächenmarker CD34, ein Ausdruck für nähere zytogenetische Verwandtschaft mit hämatopoietischen Stammzellen.

Der Grundstock der Zellen lagert in flüssigem N<sub>2</sub> bei -192°C in Cryo-Vials zu jeweils ca. 1x10<sup>6</sup> Zellen in Einfriermedium (Kulturmedium plus 20% FCS und 5% DMSO (Dimethylsulfoxid, Gibco BRL)).

Alle Zellkulturversuche wurden unter Verwendung steriler Einmalpipetten unter einer Sterilbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt.

### 2.1.2. Kulturmedium

Kulturmedium war das Standardmedium für leukämische Zellen RPMI 1640 + GlutaMax als Fertigmischung (Gibco BRL) mit einem Zusatz von 10% FCS (Gibco, Invitrogen) als Lieferant für Wachstumsfaktoren und 1% Penicillin/Streptomycin mit 10000 I.E. / 10000 µg/ml (Biochrom, Berlin) zur Prävention mikrobieller Kontamination.

### 2.1.3. Trypanblau

Trypanblau wird zur Bestimmung des Anteils der vitalen Zellen verwendet. Es ist ein kationischer Farbstoff, für den die Membran intakter Zellen impermeabel ist. Membranen (sub-)lethal geschädigter Zellen lassen den Farbstoff passieren und die Zelle färbt sich tiefblau.

## 2.2. Methoden für das Zellkultursystem

### 2.2.1. Kultivierung / Subkultivierung

Zum Auftauen wurde das Cryo-Vial bis zum Schmelzen des Eises bei 37°C im Wasserbad erwärmt, anschließend in 5 ml 37°C warmem Grundmedium plus 20% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und danach in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche für fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Die Vitalität der aufgetauten Zellen wurde an d=5 nach dem Auftauen mit der Trypanblaumethode bestimmt.

Anschließend erfolgte die Routinesubkultivierung (=Passage): die Zellen wurden mittels elektronischem Zellcounter (CASY, Innovatis GmbH, Reutlingen) gezählt, für 5 Min. bei 280 g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit einer entsprechenden Menge an frischem Medium resuspendiert, um eine Zelldichte von  $3 \times 10^5$ /ml zu erreichen. Davon wurden jeweils 15 ml in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen eingebracht und im Brutschrank bei 37°C, >95% Luftfeuchtigkeit und 3,5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. An d=2 und d=5 wurde jeweils 20 ml frisches Medium auf die Zellsuspension gegeben. An d=7 erfolgte die erneute Subkultivierung: Zellen aus vorhandenen Kulturflaschen

wurden gepoolt, um eine homogene Zellpopulation zu erhalten und wie oben gezählt und resuspendiert. Bei jeder 3.- 4. Passage wurde die Vitalität der Zellen mit der Trypanblaumethode bestimmt.

Nach sechs Monaten wurde für die Versuche eine neue Zellpopulation aufgetaut und subkultiviert, um Seneszenzeffekte zu vermeiden.

### 2.2.2. Vitalitätsprüfung

Die Prüfung der Zellvitalität erfolgte mit dem Trypanblautest. 50 µl Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau gemischt und die Suspension lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt. Es wurden 100 Zellen ausgewertet und die Vitalität in % errechnet.

## 2.3. Material für die Versuche

### 2.3.1. Kernspinkontrastmittel

Als Kernspinkontrastmittel wurden kleine paramagnetischen Eisenoxide (SPIOs= superparamagnetic iron oxides) verwendet (Resovist, Bayer-Schering AG). Die Stammlösung enthält 540 mg Ferucarbotran pro ml entsprechend einer Eisenkonzentration von 0,5 mmol/l (28 mg/ml) und wird in Fertigspritzen zu 1,4 ml Lösung plus Sterilfilter für den klinischen Einsatz geliefert.

### 2.3.2. Transfektionsagenzien

#### 2.3.2.1. Kationisches Lipid

Das liposomale Transfektionsagens Dospers<sup>®</sup> (Roche) wird vom Hersteller in Fläschchen zu je 400 µl in Argonatmosphäre geliefert, um die Oxidation der Lipidmoleküle zu verhindern.

#### 2.3.2.2. Polyethylenimin-Derivat

jetPEI<sup>®</sup> (Poly Plus Transfections) wird in Vials zu 1000 µl bezogen.

### 2.3.3. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS<sup>-</sup>)

Zum Befreien der Zellen von verbliebenem Resovisteisen bzw. Transfektionsagenskomplex nach Inkubation wurden die abzentrifugierten Zellpellets mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS<sup>-</sup> (Gibco BRL) gewaschen.

### 2.3.4. Agarphantome

Für die kernspintomographischen Aufnahmen wurden Phantomboxen mit 1%igem Agar verwendet. Mit einem Stempel wurden 12 Vertiefungen zur Aufnahme von Zellpellets geschaffen. Die Vertiefungen wurden nach Einbringen der Pellets mit Agar verschlossen, um eine möglichst homogene Matrix zu erhalten.

### 2.3.5. Fluorochrom für die Durchflusszytometrie

Als Fluorochrom zur Apoptoseprüfung wurde Tetramethylrhodaninethylester (TMRE, Molecular Probes) mit einer Konzentration von 2,5 mM in der Stammlösung verwendet.

### 2.3.6. Apoptoseinduktor

Apoptoseinduktor für die Totkontrolle der FACS-Analysen war Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP, Molecular Probes).

### 2.3.7. Elektronischer Zellcounter

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität in den Proliferationskinetiken wurde ein elektronischer Zellcounter (CASY TT, Innovatis GmbH) verwendet. Alle Messungen erfolgten als 3fach-Bestimmung mit jeweils 400 µl Messvolumen.

### 2.3.8. Photometrisches Testsystem zur quantitativen Eisenbestimmung

Das Testsystem (Eisen Ferene S Plus, Rolf Greiner BioChemica) wird als Kit für den klinischen Einsatz, bestehend aus Reagenz Eisen I, Reagenz Eisen II sowie einem Eisenstandard zur Kalibrierung der Messungen vom Hersteller geliefert.

## 2.4. Methoden der Versuche

### 2.4.1. Proliferationskinetiken

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt; eine Kinetik zur Abschätzung der Auswirkung von alleinigem Resovisteisen auf Proliferation, Vitalität und Apoptoseverhalten, eine weitere zur Abschätzung von Proliferation und Vitalität bei einer Kombination von Resovisteisen mit Transfektionsagenzien.

Mittels elektronischer Pulsflächenanalyse ermittelt der Zellcounter über einen Kristall das Membranpotential jeder einzelnen vorbeifließenden Zelle und ordnet jeder Potentialänderung ein Zählereignis zu. Dadurch können die Zellen gezählt und vitale von nicht vitalen Zellen unterschieden werden. Die Zellmembran nicht vitaler Zellen ist perforiert, was zu einer Abnahme des Membranpotentials führt. Anstelle des Membranpotentials der Zellmembran misst der Kristalldetektor dann das sehr viel kleinere Potential der Zellkernmembran und ordnet dieses Ereignis einer nicht vitalen Zelle zu. Zur Kalibrierung der Vitalitätsbestimmungsfunktion des Counters wurde bei jeder Versuchsreihe ein Vorversuch durchgeführt: Eine vitale Probe (Vit. >90%) der KG-1A wurde gemessen und danach ein Aliquot der Probe (100µl) mit 400 µl Ethanol versetzt und für 2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert (Totkontrolle). Dann wurde die Probe mit 10 ml isotonem Zählmedium (CASYton, Innovatis GmbH) gemischt und 1 Min. inkubiert. Sieben ml der bereits gemessenen vitalen Probe wurden mit 3 ml der Totkontrolle versetzt und im Zellcounter gemessen; dann wurden die entsprechenden Parameter für Gesamtzellzahl, Zelltrümmer, Vital- und Totzellzahl eingestellt (Abb. 1).



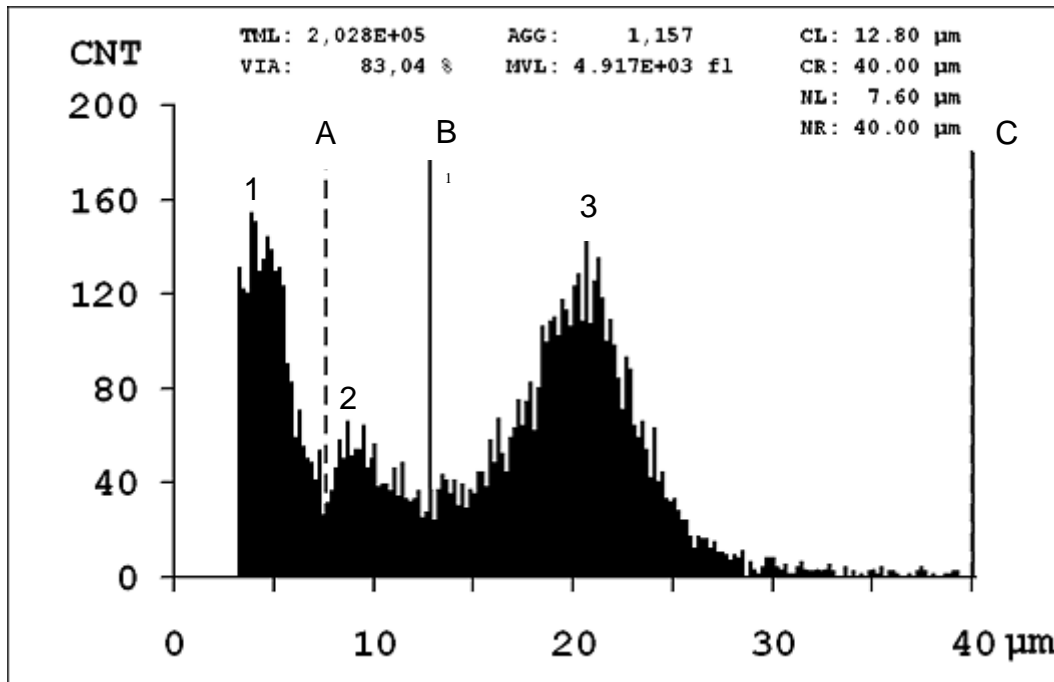


Abb. 1

Graphische Anzeige des CASY Model TT Cellcounter. Gipfel (1) zeigt die Zelltrümmer, Gipfel (2) die toten Zellen, Gipfel (3) die lebenden Zellen. (VIA) gibt den Anteil der vitalen Zellen in % an. Der Bereich zwischen (A) und (B) umfasst die toten Zellen, der Bereich zwischen (B) und (C) die vitalen Zellen.

#### 2.4.1.1. Proliferationskinetiken / Vitalität mit Resovisteisen

An d=-2 wurden auf 5 Wells einer 6-well-plate je 2 ml mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgebracht und für 24h im Brutschrank vorinkubiert. An d = -1 erfolgte die Zugabe von Lösungen mit Resovistkonzentrationen von 50, 100, 200 und 400 µg/ml sowie eine Negativkontrolle durch Aufpipettieren auf die Zellsuspensionen in den Wells. Die Zellen wurden 24h inkubiert. An d=0 wurden die Zellen resuspendiert, elektronisch gezählt, bei 280 g abzentrifugiert, der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium resuspendiert, auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$ /ml eingestellt und je 1ml auf 12-well-plates ausgebracht. Stopptage waren d=2, d=6, d=10, d=12 und d=14. Für jeden Stopptag wurde eine separate 12-well-Platte angesetzt. Am jeweiligen Stopptag wurden die Zellen resuspendiert, es wurde ein Meßvolumen von 100 µl an d=0 und d=2, 50 µl an d=6 und d=10 und 25 µl an d=12 und d=14 abgenommen und

mit dem elektronischen Zellcounter Vitalität und Zellzahl analysiert. An d=6 wurde auf die Platten je 1 ml frisches Medium aufgebracht.

#### 2.4.1.2. Proliferationskinetiken / Vitalität mit Resovisteisen plus Transfektionsagenzien

An d=-2 wurden auf einer 24-well-Platte 9 Wells mit  $3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und für 24h vorinkubiert. An d=-1 wurden die 24h-Werte (50 µg/ml und 200µg/ml) mit Eisen beladen. An d=0 erfolgte die Eisenbeladung der restlichen Bedingungen (s. Tab. 1).

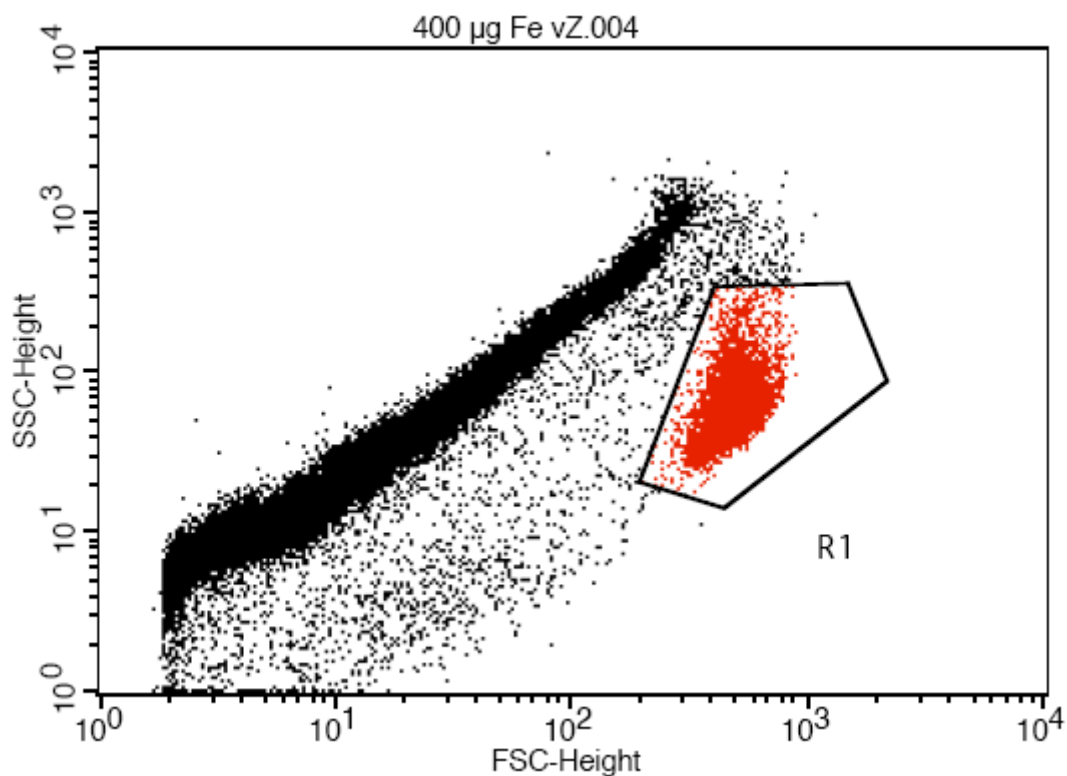
Nach 4h Inkubation wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$ /ml eingestellt und in die Vertiefungen einer 24-well-Platte ausgebracht. Zu den Stopptagen (d=2, 6, 10, 12, 14) wurden die Zellen resuspendiert, ein geeignetes Messvolumen abgenommen und Vitalität und Zellzahl im Zellcounter gemessen.

#### 2.4.2. Durchflusszytometrie

An d=0, d=2 und d=6 wurde die Apoptoseaktivität durchflusszytometrisch analysiert. Das Verfahren entwickelten Crissman et al. 1975 zur Analyse und Sortierung von Säugetierzellen.<sup>(19)</sup> Dabei macht man sich die Eigenschaft bestimmter Fluorochrome zunutze, die Licht einer diskreten Wellenlänge aussenden, wenn sie mit einem Laser bestrahlt werden. Die Fluorochrome werden entweder durch spezifische (Sekundär-)Antikörper an zelluläre Strukturen gebunden oder reichern sich durch Stoffwechselprozesse in bestimmten Zellkompartimenten bzw. Strukturen der Zelle an. Der verwendete Ester des Farbstoffs Tetramethylrhodamin (TMRE) wird wegen seiner lipophilen und kationischen Eigenschaft proportional zum Transmembranpotential der inneren Mitochondrienmembran ( $\Delta\psi_M$ ) im Matrixraum und entlang der inneren Mitochondrienmembran angereichert. Diese Akkumulation des Farbstoffs im Mitochondrium bewirkt eine verminderte Intensität seiner Fluoreszenzeigenschaften durch Selbstauslöschung. Die detektierbare Veränderung durch Akkumulation ist an aktive, vitale Mitochondrien gebunden. Bei im Zuge der Apoptose geschädigten Mitochondrien bricht  $\Delta\psi_M$  zusammen,

der Farbstoff verteilt sich im Zytoplasma und seine Fluoreszenzeigenschaften ändern sich.

Für den Versuch wurden je 500 µl Zellsuspension jeder Versuchsbedingung sowie zusätzlich Zellen für Positiv- und Negativkontrolle in ein FACS-Röhrchen überführt, bei 280 g abzentrifugiert, dekantiert und mit 500 µl TMRE (Proben) bzw. Medium (Negativkontrolle) oder TMRE/CCCP (Positivkontrolle) gemischt. Nach 30 Min. Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Proben am FACS (FACSort, Becton Dickinson) mit einer Flußrate von ca. 150 Zellen/s gemessen, was einer Gesamtzahl von ca.  $10^4$  Zellen entspricht. Das Gating erfolgte im Punktwolkendiagramm FSC-Height gegen SSC-Height (Abb. 2), die Ermittlung der Apoptoserate im Histogramm TMRE (Laser FL2-H bei  $\lambda = 488$  nm) gegen Zählereignisse (Counts). Durchgeführt und ausgewertet wurden die Versuche mit dem Programm CellQuest Pro (BD).



**Abb. 2**

**Punktwolkendiagramm zum Gating. R1 (rot) = KG-1A-Zellen. Aufgetragen Vorwärtsstreuung (FSC-Height) gegen Seitwärtsstreuung (SSC-Height).**

### 2.4.3. Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie dient der qualitativen Analyse des zellulären Eisengehalts. Auf zwei 24-well-plates wurde je Bedingung 4x1ml mit  $3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgebracht und 24h vorinkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit 50 µg/ml und 200 µg/ml Resovisteisen für 4h und 18h sowie mit 50 µg/ml Fe und zusätzlich Dosper bzw. jetPEI für 4h. Außerdem wurde als Auswaschversuch die selbe Anzahl Zellen 4h lang mit Fe und zusätzlich Dosper bzw. jetPEI inkubiert, in PBS gewaschen und 6 Tage lang in eisenfreiem Medium weiterinkubiert. Danach wurden die Zellen gepoolt, 3x in PBS gewaschen und in 2,5%igem in Cacodylat-Puffer (pH 7,2-7,4) gelöstem Glutaraldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Proben 2x mit Cacodylat-Puffer gewaschen und bis zur extern durchgeführten Elektronenmikroskopie im Kühlschrank gelagert.

### 2.4.4. Quantitative Eisenbestimmung

Für die quantitative Bestimmung des zellulären Eisengehalts wurden aus den mit Eisen inkubierten Proben je  $3 \times 10^5$  Zellen abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen, das Zellpellet mit einer Pasteurpipette trockengelegt und für 2h im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Danach wurde das Pellet, je nach zu erwartender Eisenkonzentration, mit 100 bzw. 200 µl einer Lösung aus 70%iger Perchlor- und 100%iger Salpetersäure im Verhältnis 3:1 über Nacht bei Raumtemperatur angesetzt, um die Zellen aufzulösen, die Dextranhülle zu zerstören und das molekulare Eisen freizulegen. Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden im Wärmeschrank bei 60°C homogenisiert. Für den photometrischen Ansatz musste die Probe mindestens 1:4 verdünnt werden, da die Säure in höherer Konzentration die chemische Reaktion stört bzw. unmöglich macht. Standardmäßig wurden die Proben zunächst 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, bei Bedarf entsprechend höher. Die Messung am Photometer erfolgte mit Hilfe des fertigen chemischen Testsystems, dessen Reagenzien vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht wurden. Zur Messung wurden 100 µl Probenvolumen in eine Küvette überführt und mit 1000 µl Reagenz Eisen I (Greiner Biochemica) gemischt. Zusätzlich zu den Proben wurde zur

Kalibrierung ein Eisenstandard (Flacht) und ein Reagenzienleerwert geführt. Die photometrische Messung erfolgte im Photometer (BioTechnica) als Absorptionsmessung bei  $\lambda=600$  nm. Nach 5 min. wurde die Extinktion  $E_1$  bestimmt. Dann wurden 250  $\mu$ l Reagenz Eisen II zugegeben und nach weiteren 15 min. Inkubation die Extinktion  $E_2$  bestimmt. Die Berechnung des Eisengehalts erfolgte mit Gleichung (I):

$$(I) \quad \text{Eisen } [\mu\text{g/dl}] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times C_{\text{Standard}}$$

$$[\Delta E = (E_2 - E_1 \text{ Probe oder Standard}) - (E_2 - E_1 \text{ Reagenzienleerwert})]$$

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Säuremenge, der Verdünnung und der Zellzahl in der Probe lässt sich der absolute Eisengehalt pro Zelle berechnen.

## 2.4.5. Dosiskurven

### 2.4.5.1. Resovisteisen

In je vier wells pro Bedingung wurden  $3 \times 10^5$  Zellen/ml auf 24-well-plates für 24h vorinkubiert, pro well je 100  $\mu$ l Resovisteisen-Lösung mit entsprechender Eisenmenge / ml auf die Wells pipettiert und für die entsprechenden Zeiträume inkubiert (s. Tab. 9). Anschließend wurden die Zellen gepoolt, gezählt, entsprechende Zellzahlen eingestellt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in Agarphantome eingebracht und ein Aliquot für die photometrische Eisenbestimmung aufgearbeitet.

### 2.4.5.2. Resovisteisen plus Transfektionsagenzien

In je vier wells pro Bedingung wurden  $3 \times 10^5$  Zellen/ml auf 24-well-plates für 24h vorinkubiert und danach mit 100  $\mu$ l Resovist-TA-Lösung versetzt. Für die Herstellung der Resovist-TA-Lösung wurden analog den Herstellerangaben zur DNA-Transfektion 50  $\mu$ g Resovist mit PBS auf 50  $\mu$ l Volumen eingestellt.

Außerdem wurden 10 µl Transfektionsagens + 40 µl PBS gemischt. Beide Ansätze wurden anschließend 30 Min. unter wiederholtem Vortexen vorinkubiert. Danach wurden je 100 µl des entstandenen Resovist-TA-Gemisches auf die Wells gegeben und für 2h bzw. 4h inkubiert (vgl. Tab. 9). Die Aufarbeitung für die photometrische Eisenbestimmung bzw. die Agarphantome erfolgte wie unter 1.4.5.1 beschrieben.

#### 2.4.6. Auswaschversuche

Die Zellen wurden wie unter 2.4.5.1. bzw. 2.4.5.2. beschrieben mit Eisen und Transfektionsagenzien inkubiert und danach zweimal in PBS gewaschen. In Vorversuchen wurden zur Abschätzung des verbliebenen Eisens parallel zum obigen 24h-Ansatz bei  $t = 4h, 8h$  und  $24h$  die restlichen Zellen zweimal in PBS gewaschen und auf je 2 ml mit  $1,5 \times 10^5$  bzw.  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in 6-well plates ausgesät. Nach 7d wurde der intrazelluläre Fe-Gehalt bestimmt und die Anzahl der Teilungen errechnet. Mit zwei TA-Ansätzen wurde ebenso verfahren.

Zur Sondierung der Auswaschungsergebnisse in der Bildgebung wurden danach zwei TA-Ansätze inkubiert, gewaschen, und mit  $3 \times 10^5/ml$  für 7d weitergezogen, der Fe-Gehalt photometrisch bestimmt und die Zellen in Phantome eingebracht. Zur Übersicht über die zeitliche Entwicklung des Fe-Gehalts und der kernspintomographischen Darstellbarkeit wurden abschließend wie unter 1.4.5.2. beschrieben Zellen inkubiert, ihr Fe-Gehalt bestimmt und je  $2 \times 10^5$  Zellen pro Bedingung in ein Phantom eingebracht. Die restlichen Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^5/ml$  eingestellt und mit 2 ml Kulturmedium auf je eine 6-well-plate pro Stopptag neu ausgebracht. An  $d=3$  und  $d=7$  wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen abgenommen und in ein Phantom eingebracht sowie der Fe-Gehalt bestimmt.

#### 2.4.7. Agarphantome für die Kernspintomographie

Zur kernspintomographischen Messung wurden die eisenbeladenen Zellen in Agarphantome eingebracht. 1%ige Agarlösung wurde 40 Min. lang bei  $100^\circ C$  autoklaviert und in Phantomboxen gegossen. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden per Pipette abgezogen um Artefakte zu vermeiden. Mit einem Stempel

mit 12 genormten Platzhaltern wurden 12 Vertiefungen für die Zellpellets geschaffen. Das Phantom wurde im Kühlschrank bei 7°C abgekühlt, wobei sich der Agar verfestigte. Die trockengelegten, eisenbeladenen Zellpellets wurden in 20 µl 8%iger flüssiger Gelatine (Sigma) resuspendiert und per Pipette in die gekühlten Phantome eingebracht. Nach 15 Min. im Kühlschrank wurden die Vertiefungen mit 1%igem Agar verplombt und die Phantome bei 7°C im Kühlschrank aufbewahrt.

#### 2.4.8. Messung im Kernspintomographen

Die Agarphantome wurden unter Verwendung einer hochauflösender Handgelenksspule bei 3,0T im klinischen Kernspintomographen TimTrio (Siemens) gemessen.

Die Meßreihen umfassten coronare Serien mit einer  $T_2^*$  gewichteten FISP3D-Sequenz, einer modifizierten GRE-Sequenz. Diese ist besonders empfindlich für die durch SPIOs erzeugten Magnetfeldinhomogenitäten. Die Sequenzparameter waren:

FISP3D ( $T_2^*$ ): TR=30, TE=20, Flipwinkel=20°, Aquisitionsmatrix=256x256, Schichtdicke 0,5mm.

### 2.4.9. Quantifizierung der Signalauslöschung mittels EDV

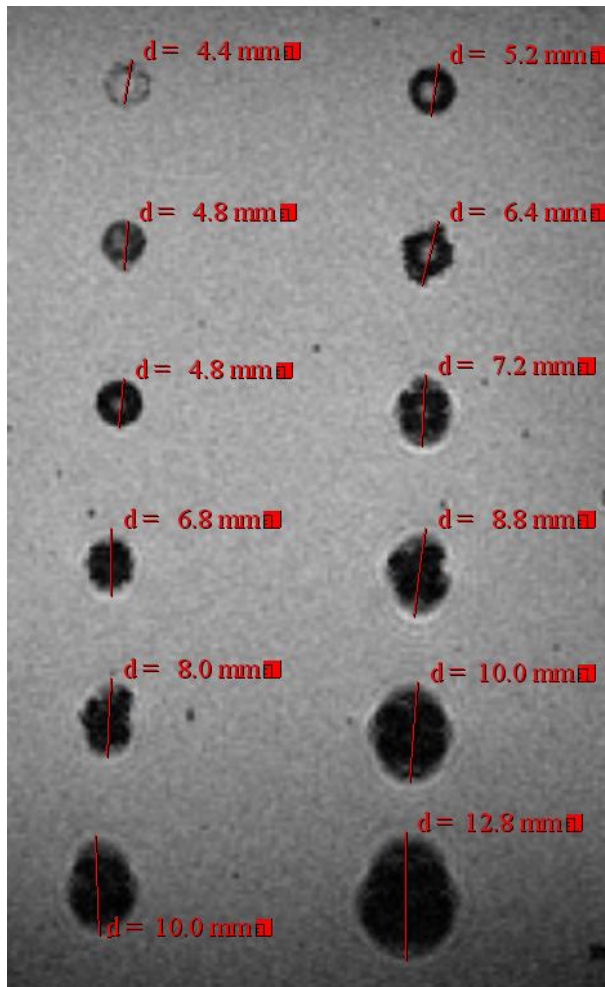


Abb. 3

**Auswertungsbeispiel eines Agarphantoms.  
2h mit TAs und 50 µg Fe inkubierte Zellen,  
gemessen bei 3,0T und FISP3D-Sequenz.**

Aus den gemessenen Achsensequenzen wurden die coronaren Serien ausgewählt und die durch das Resovisteisen entstandene Signalauslöschung (=Suszeptibilitätsartefakte) an der Workstation mit dem Programm Osiris 4 vermessen. Gemessen wurde der größte coronare Durchmesser (vgl. Abb. 3). Die Messgenauigkeit betrug 0,2 mm. Durch die Vermessung konnten die verschiedenen Versuchsbedingungen in Schaubildern (Dosiskurven) verglichen werden.

### 2.4.10. Graphische Auswertung und statistische Berechnungen

Die Schaubilder wurden mit dem Programm SigmaPlot der Firma SPSS erstellt, statistische Berechnungen erfolgten mit SigmaStat des gleichen Herstellers.

In Abschnitt 3.1. wurde zur Feststellung signifikanter Unterschiede der Student-t-Test verwendet. Der Fehler 1. Art wurde auf 0,05 festgelegt ( $\alpha=0,05$ ).

Die Varianzen in Abschnitt 3.2. waren zwar ungleich, aber die Stichprobengröße war mit  $n=2$  gleich und die Variablen normalverteilt, so dass die Anwendung des t-Tests ohne Einschränkung der Aussagekraft möglich war.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Proliferationskinetiken und Vitalitätsbestimmung mit Resovisteisen

Ausgewertet wurden vier Ansätze mit KG-1A Zellen (n=4) an jeweils sechs Messtagen (d=0 bis d=14). Ein Ansatz beinhaltet für jeden Messtag vier verschiedene Dosierungen Resovisteisen (50, 100, 200 und 400 µg Fe /ml) sowie eine unbehandelte Kontrolle. Der Untersuchungszeitraum betrug 14 Tage.

	d=0	d=2	d=6	d=10	d=12	d=14
Ansatz 1	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	FACS ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.
Ansatz 2	FACS ZZ / Vit.	FACS ZZ / Vit.	FACS ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.
Ansatz 3	FACS ZZ / Vit.	FACS ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.
Ansatz 4	FACS ZZ / Vit.	FACS ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.	ZZ / Vit.

**Tab. 1**

**Übersicht über die durchgeführten Zellzahlbestimmungen (ZZ) / Vitalitätsbestimmungen (Vit.) sowie Durchflusszytometrie (FACS) für Resovisteisen. Alle Ansätze beinhalteten pro Messstag jeweils Bedingungen mit 0 (Kontrolle), 50, 100, 200 und 400 µg Fe/ml.**

In Abb. 4 wird der Anteil der vitalen eisenbeladenen Zellen mit den unbehandelten Kontrollzellen über einen Zeitraum von 14 Tagen verglichen, d. h. 100% vitale Zellen bezieht sich auf die Vitalität der Kontrollzellen.

Die Schaubilder in Abb. 4 zeigen einen gleichmäßigen Verlauf der Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Tab. 2 zeigt die zugehörigen p-Werte. An d=2 zeigen alle Dosisgruppen einen statistisch signifikanten Abfall der Vitalität im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser Effekt tritt isoliert an d=2 auf. Es zeigt sich eine maximale Schwankung in der Vitalität zwischen d=0 und d=14 von 5% bei 50 µg Eisen und 100 µg Eisen, 4% bei 200 µg Eisen und 5% bei 400 µg Eisen. Einzig die Werte bei 400 µg Eisen weisen in den letzten Tagen eine größere Schwankung auf, wie aus den Standardabweichungen ersichtlich ist. Dies

könnte auf die hohen Eisenkonzentrationen und dadurch hervorgerufene Messfehler im Zellcounter zurückzuführen sein.

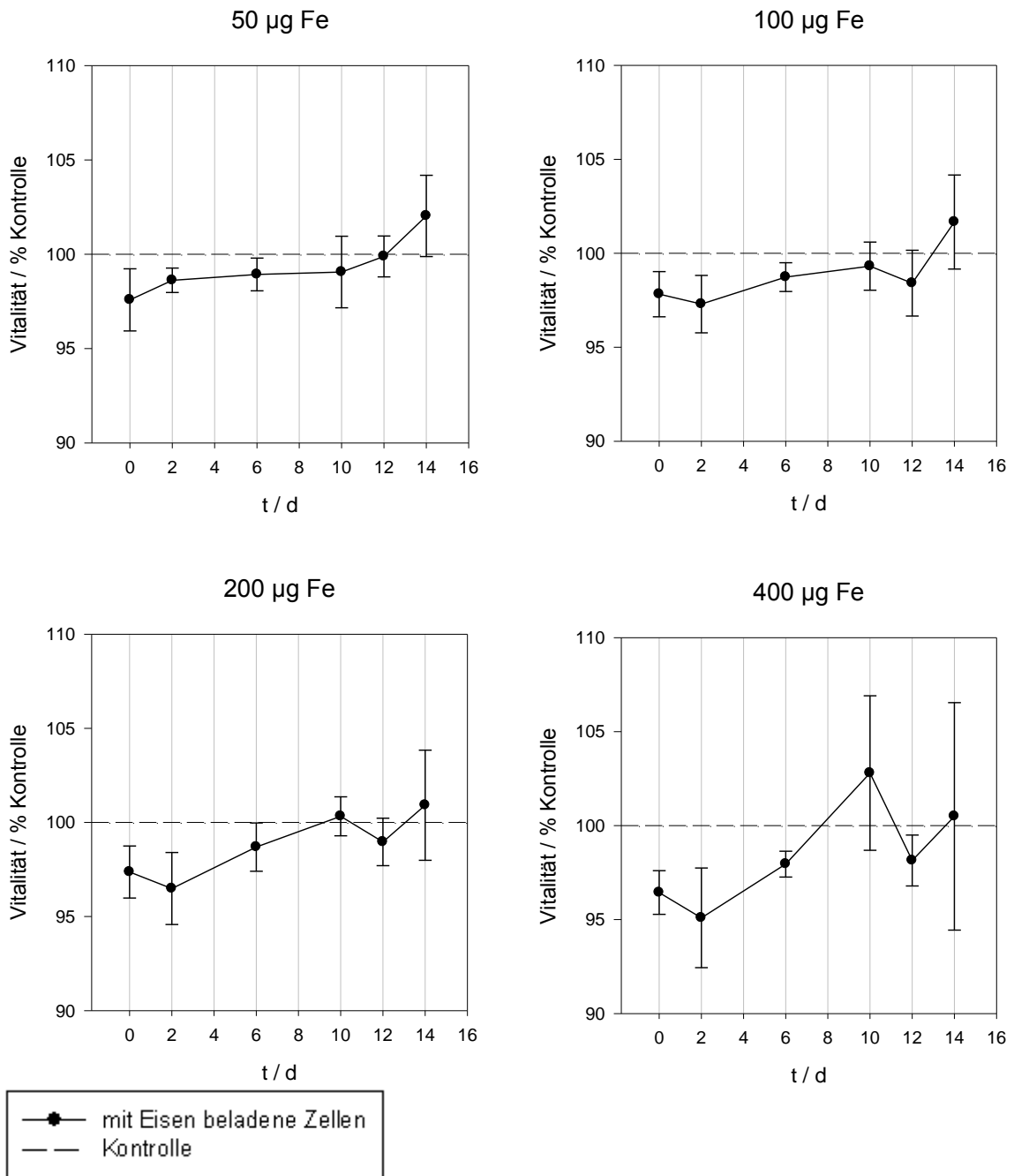


Abb. 4

Vitalität der KG-1A im 14-tägigen Verlauf nach 24h Inkubation mit Resovisteisen. Die unbehandelte Kontrolle entspricht stets 100% vitalen Zellen. Darstellung der Punkte mit Standardabweichungen vom Mittelwert.

p	d=0	d=2	d=6	d=10	d=12	d=14
50 µg Fe	0,158	<b>0,021</b>	0,43	0,877	0,976	0,693
100 µg Fe	0,22	<b>0,02</b>	0,359	0,908	0,679	0,749
200 µg Fe	0,17	<b>0,018</b>	0,458	0,95	0,803	0,872
400 µg Fe	0,124	<b>0,017</b>	0,275	0,543	0,606	0,948

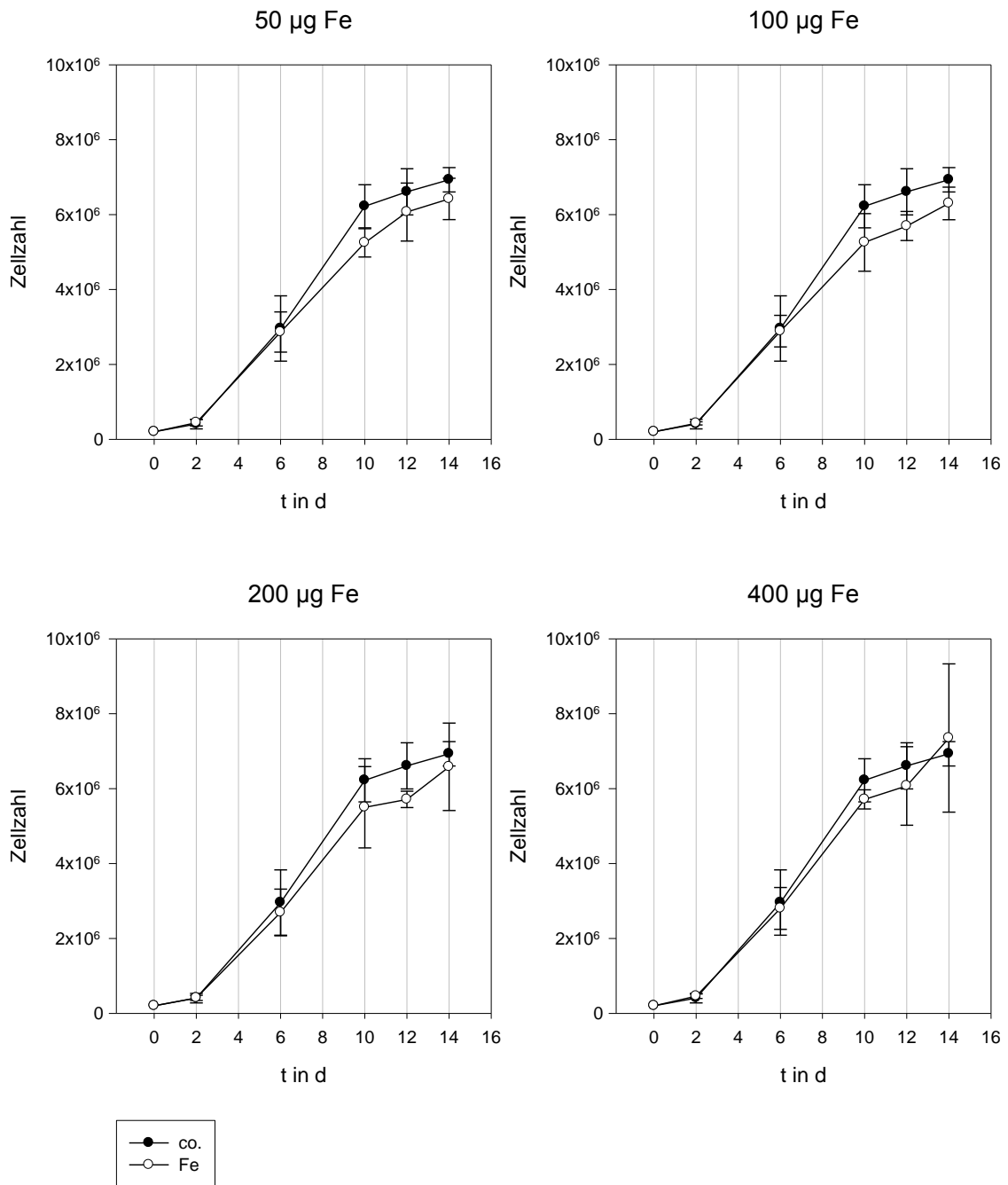
**Tab. 2**

**p-Werte zu den Stoppzeitpunkten der Vitalitätsbestimmung. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der Zellvitalität im Vergleich zur Kontrolle sind fett gedruckt.**

In Abb. 5 wird das Proliferationsverhalten der Vorläuferzellen graphisch dargestellt. Am Anfang der Kurven steht eine durch Passagestress und die geringe Anfangszellzahl im Verhältnis zum Medium begründete Phase verzögerten Wachstums (lag-Phase bis  $d=2$ ), die von einer Phase der raschen Proliferation abgelöst wird (log-Phase bis  $d=10$ ) und zum Ende hin in eine Plateauphase des dynamischen Gleichgewichts mündet, wenn die Proliferation der Zellen durch den Verbrauch des Mediums beziehungsweise toxische Stoffwechselprodukte gebremst wird. Bei allen vier Dosisgruppen treten diese Phasen synchron auf.

Die durchgeführten t-Tests (Tab. 3) weisen statistisch signifikante Unterschiede in den Zellzahlen auf bei 50 µg Fe an  $d=10$ , bei 100 µg Fe an  $d=12$  und bei 200 µg Fe an  $d=12$  ( $p < 0,05$ ). Bei der Dosisgruppe 400 µg bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Fe-behandelter Gruppe.

Insbesondere in den letzten vier Tagen der Kinetik kommt es zu kleineren Schwankungen der Zellzahlen. Dies lässt sich durch die Verdunstung des Mediums und den hohen gemessenen Zellzahlen erklären, die ein bis zu vierfach kleineres Probenvolumen notwendig machten. Das Resovisteisen führte mutmaßlich auch hier zu geringfügigen Messfehlern.



**Abb. 5**

**Proliferationskinetik der eisenbeladenen Zellen. Gezeigt ist jeweils die Kurve der Kontrollzellen (co., schwarz) sowie die Kurve der eisenbeladenen Zellen (Fe, weiße Kurve).**

	d=0	d=2	d=6	d=10	d=12	d=14
50 µg Fe	-	0,645	0,96	<b>0,03</b>	0,316	0,161
100 µg Fe	-	0,78	0,888	0,091	<b>0,046</b>	0,06
200 µg Fe	-	0,938	0,639	0,285	<b>0,033</b>	0,587
400 µg Fe	-	0,498	0,774	0,155	0,411	0,689

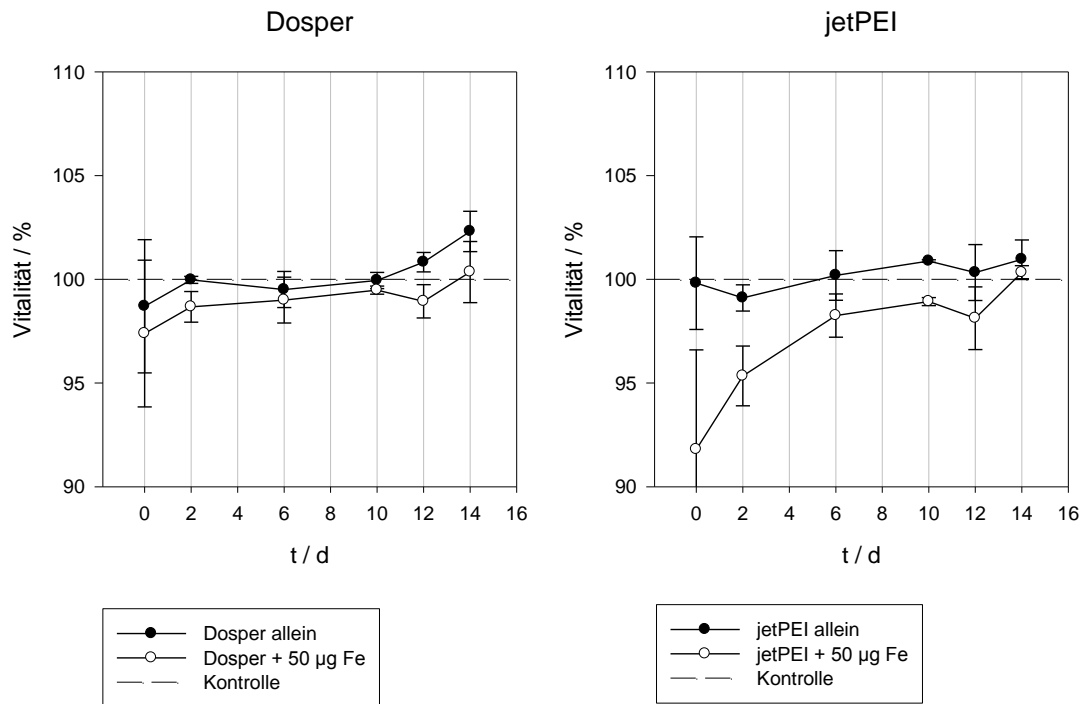
Tab. 3

**p-Werte zu den Stoppzeitpunkten der Proliferationskinetik. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle sind fett gedruckt. An  $d=0$  keine Bestimmung, da die Zellzahlen für die Kinetik auf  $2 \times 10^5$  eingestellt wurden.**

### 3.2. Proliferationskinetiken und Vitalitätsbestimmung mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien

Die Vitalitätskurve (Abb. 6) verläuft bei allen gemessenen Bedingungen (Kontrolle, Dosper, jetPEI sowohl mit als auch ohne 50 µg Resovisteisen) gleichmäßig. Auffallend ist die relativ große, aber nicht signifikante Schwankungsbreite an  $d=0$ . In Tab. 4 sind die zugehörigen p-Werte aufgeführt. Es fällt der isoliert signifikante Abfall der Vitalität bei jetPEI an  $d=10$  auf.

Die Proliferationskinetiken (Abb. 7) zeigen eine annähernd sigmoidale Wachstumskurve. In Tab. 5 sind die p-Werte abgebildet. Ab  $d=6$  ist die Vitalität der eisenbehandelten Zellen geringfügig niedriger als die der Kontrolle. Am größten fällt die Differenz mit ca. einer Million Zellen an  $d=10$  aus. Zwischen Zellen, die ausschließlich mit Transfektionsagenzien behandelt wurden und Zellen, die mit Transfektionsagenzien und Eisen inkubiert wurden, gibt es keinen signifikanten Unterschied. An  $d=6$  fällt die signifikant erniedrigte Zellzahl auf. Danach sind die Zellzahlen bis zum Ende der Messung wieder normal.



**Abb. 6**

**Vitalität der Vorläuferzellen im 14-tägigen Verlauf nach 4h Inkubation mit TAs mit/ohne zusätzlichem Resovisteisen. 100% entspricht der Vitalität der unbehandelten Kontrollzellen (Kontrolle). n=2.**

d =	0	2	6	10	12	14
Dosper + 50 µg Fe	0,523	0,185	0,375	0,104	0,202	0,851
jetPEI + 50 µg Fe	0,184	0,052	0,174	<b>0,028</b>	0,221	0,826

**Tab. 4**

**p-Werte der Proliferationskinetik mit Transfektionsagenzien. Verglichen wird die Vitalität der Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe mit derjenigen der mit TAs und 50 µg/ml Eisen behandelten Zellen. Signifikante Unterschiede (p<0,05) der Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle sind fett gedruckt. n=2.**

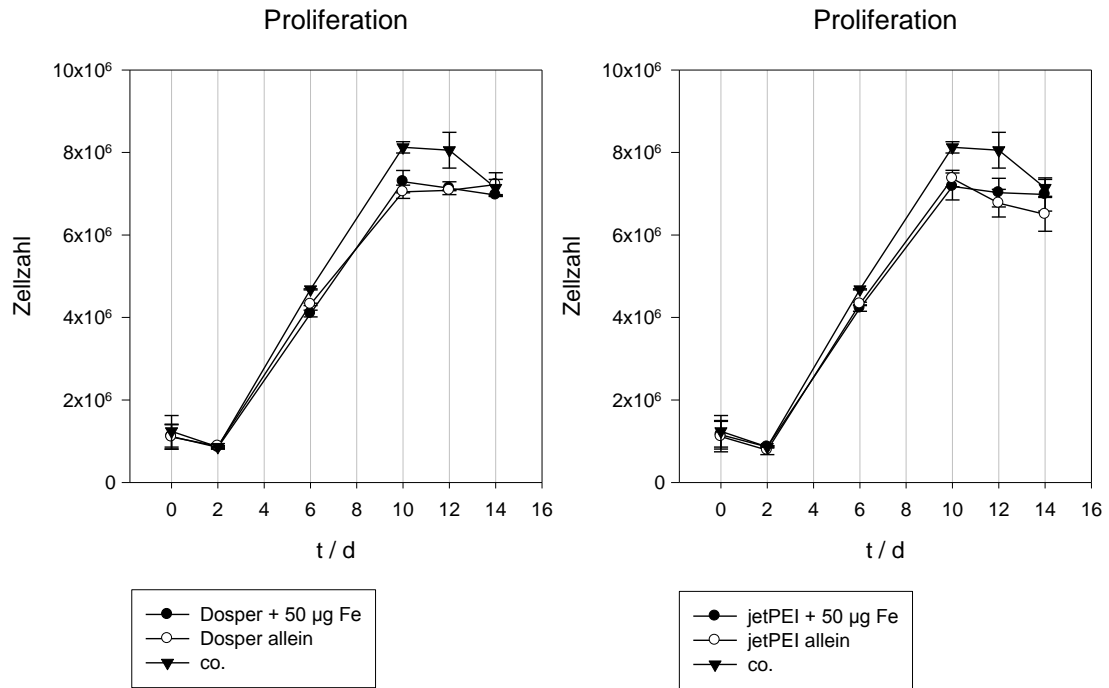


Abb. 7

Proliferationskinetik im 14-tägigen Verlauf nach 4h Inkubation mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien. Tab. 5 enthält die zugehörigen p-Werte. n=2.

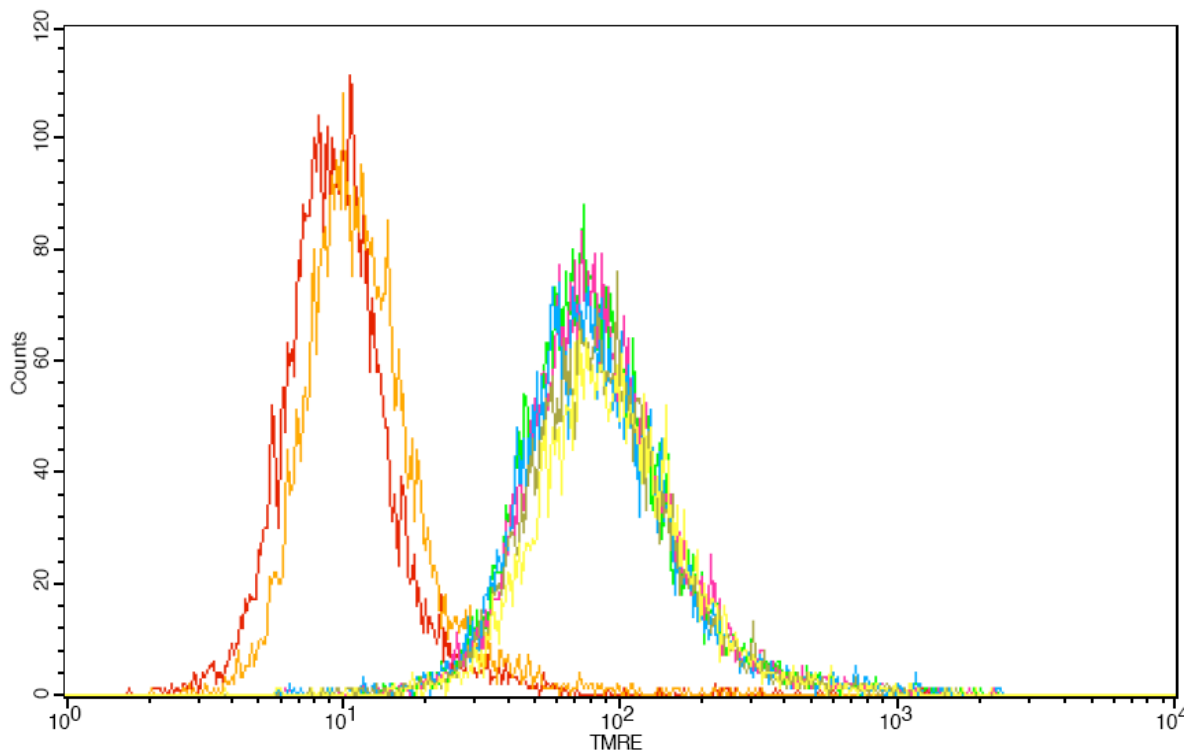
d=	0	2	6	10	12	14
Dosper + 50 µg Fe	0,747	0,780	<b>0,001</b>	0,061	0,106	0,355
jetPEI + 50 µg Fe	0,838	0,906	<b>0,014</b>	0,064	0,120	0,667

Tab. 5

p-Werte der Proliferationskinetik mit Transfektionsagenzien. Verglichen werden die Zellzahlen der unbehandelten Kontrolle mit denjenigen der mit 50 µg/ml Eisen + TAs behandelten Gruppen. n=2.

### 3.3. Apoptoseprüfung mit Resovisteisen

Die vorhandenen Ansätze der Proliferationskinetiken wurden an drei Stoptagen mittels FACS-Analyse ausgewertet (vgl. Tab. 1). Zusätzlich wurde je eine Positiv- und eine Negativkontrolle gemessen.



Key	Name	Parameter
—	Negativkontrolle	FL2-H
—	Positivkontrolle	FL2-H
—	Kontrolle	FL2-H
—	50 µg Fe	FL2-H
—	100µg Fe	FL2-H
—	200 µg Fe	FL2-H
—	400 µg Fe	FL2-H

**Abb. 8**

**Durchflusszytometrisches Overlayhistogramm der Kinetik 2 an d=0.**

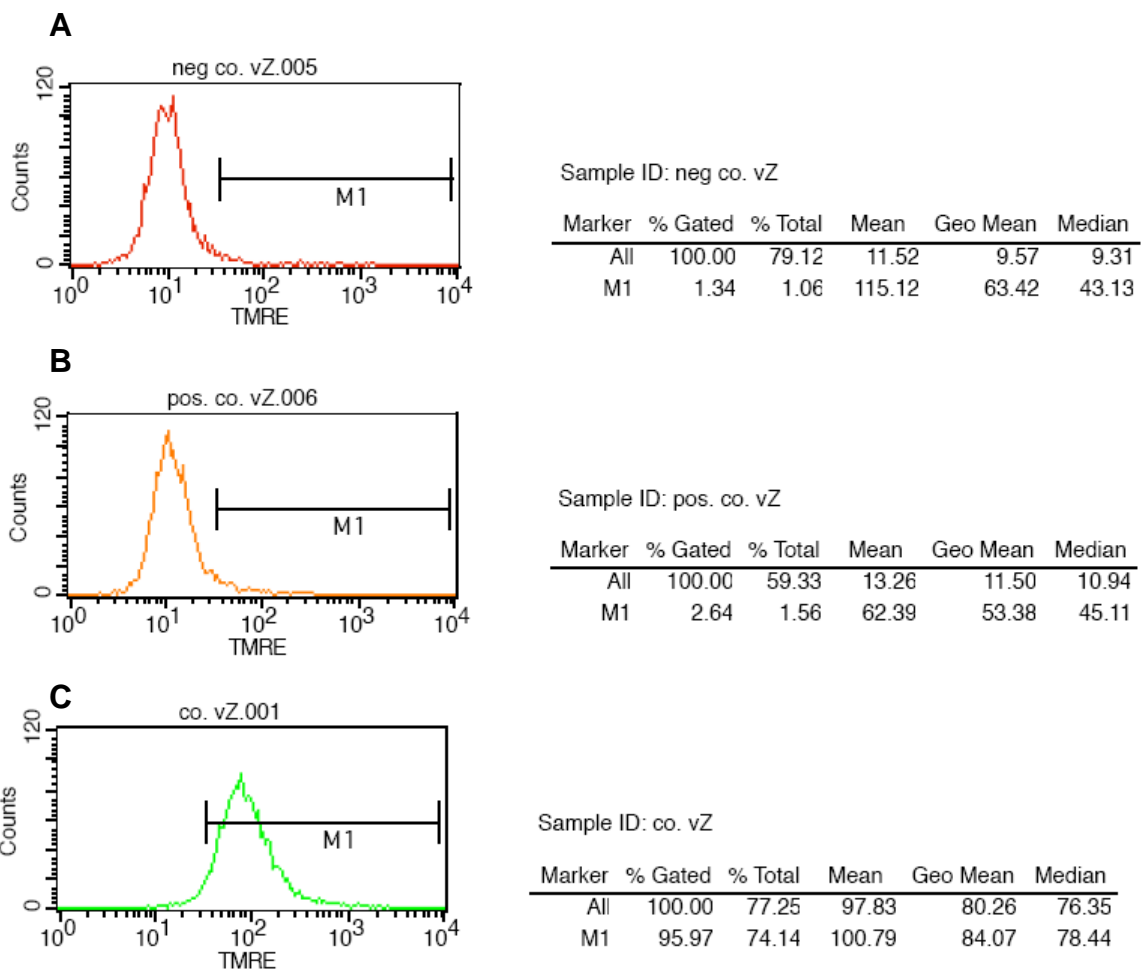
Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Dosisgruppen zeigen sich im Overlayhistogramm (Abb. 8) annähernd deckungsgleiche Fluoreszenzmuster der Fe-behandelten Ansätze mit denen der unbehandelten Kontrolle. Die Statistiken der Einzelhistogramme (Abb. 9, Abb. 10) zeigen eine apoptotische Zellpopulation von deutlich unter 5% (M1). Eine Zunahme apoptotischer Ereignisse bei 24h mit Fe-behandelten Zellen wurde nicht beobachtet.

Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10 sind exemplarisch; auf die Darstellung der übrigen Kinetiken als Histogramme wurde verzichtet. Die Daten aller Kinetiken sind in Tab. 6, Tab. 7 und Tab. 8 dargestellt. Der Gipfel der behandelten Ansätze und



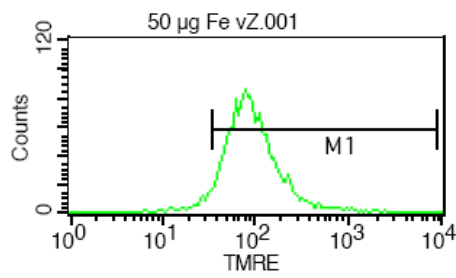
der unbehandelten Kontrolle liegt bei ca.  $8 \times 10^3$  TMRE, der Gipfel der Negativkontrolle und der Positivkontrolle bei ca.  $1 \times 10^1$  TMRE.

Sämtliche Kinetiken weisen eine apoptotische Zellpopulation von weniger als 1% auf (d. h. eine Differenz von weniger als 1% zwischen den Kontrollzellen ohne Eisen und den mit Eisen behandelten Zellen).



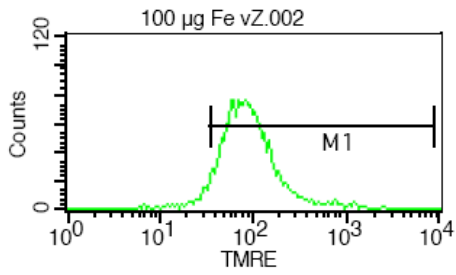
**Abb. 9**

**Histogramme (links) und Einzelstatistiken (rechts) der Durchflusszytometrie von Kinetik 2, d=0. A=Negativkontrolle (Zellen ohne TMRE), B=Positivkontrolle (TMRE+CCCP), C=unbehandelte Kontrolle (mit TMRE, ohne Eisen). Der Marker M1 definiert die nicht apoptotische Zellpopulation (in der Einzelstatistik % gated gegen M1).**



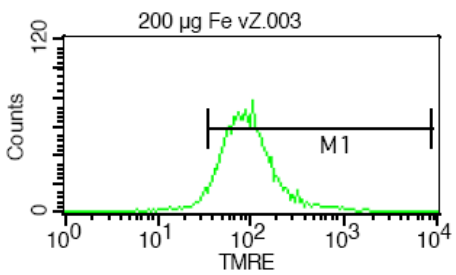
Sample ID: 50 µg Fe vZ

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	100.00	61.19	101.07	82.99	79.15
M1	96.11	58.81	104.09	87.02	81.31



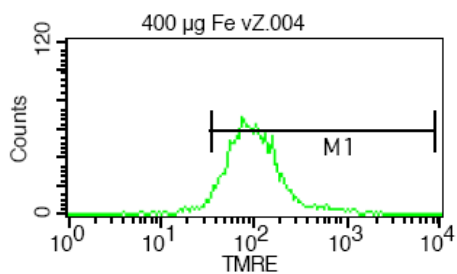
Sample ID: 100 µg Fe vZ

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	100.00	37.50	99.62	80.57	76.35
M1	95.50	35.81	103.04	84.98	79.15



Sample ID: 200 µg Fe vZ

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	100.00	28.91	101.37	83.49	80.58
M1	96.25	27.82	104.28	87.41	82.79



Sample ID: 400 µg Fe vZ

Marker	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	100.00	19.58	108.48	89.66	86.60
M1	97.26	19.04	110.79	92.92	88.17

Abb. 10

Histogramme und Einzelstatistiken der Fe-behandelten Ansätze aus Kinetik 2, d=0.

**d=0**

% gated M1	co. (0 µg Fe)	50 µg Fe	100 µg Fe	200 µg Fe	400 µg Fe
Kinetik 2	95,97	96,11	95,5	96,25	97,26
Kinetik 3 I	96,66	96,81	97,26	97,57	97,74
Kinetik 3 II	98,27	98,8	98,97	99,15	98,81
% GeoMean					
Kinetik 2	84,07	87,02	84,98	87,41	92,92
Kinetik 3 I	125,74	148,5	144,76	155,76	158,37
Kinetik 3 II	129,3	154,95	155,44	173,46	170,89

**Tab. 6**

Ergebnisse der FACS-Analysen an d=0. Gezeigt sind die Ereignisse für alle Dosisgruppen von 0 bis 400 µg Fe innerhalb des Markers M1 als % der Gesamtereignisse (% gated M1) sowie als % des geometrischen Mittels (% GeoMean).

**d=2**

% gated M1	co. (0 µg Fe)	50 µg Fe	100 µg Fe	200 µg Fe	400 µg Fe
Kinetik 2	99,94	99,95	99,94	99,96	99,95
Kinetik 3 I	98,03	98,07	98,32	98,47	98,82
Kinetik 3 II	97,43	97,78	97,94	98,05	97,83
% GeoMean					
Kinetik 2	489,49	492,73	520,72	512,55	555,78
Kinetik 3 I	136,72	143,36	142,44	145,64	147,69
Kinetik 3 II	141,59	140,73	133,52	140,64	145,61

**Tab. 7**

Ergebnisse der FACS-Analysen an d=2. Gezeigt sind die Ereignisse für alle Dosisgruppen von 0 bis 400 µg Fe innerhalb des Markers M1 als % der Gesamtereignisse (% gated M1) sowie als % des geometrischen Mittels (% GeoMean).

**d=6**

% gated M1	co. (0 µg Fe)	50 µg Fe	100 µg Fe	200 µg Fe	400 µg Fe
Kinetik 1	98,78	97,95	98,63	99,18	98,83
Kinetik 2	94,23	93,18	93,16	93,05	92,27
% GeoMean					
Kinetik 1	141,93	114,32	128,41	141,87	138,17
Kinetik 2	127,83	132,58	125,22	125,72	125,27

**Tab. 8**

Ergebnisse der FACS-Analysen an d=6. Gezeigt sind die Ereignisse für alle Dosisgruppen von 0 bis 400 µg Fe innerhalb des Markers M1 als % der Gesamtereignisse (% gated M1) sowie als % des geometrischen Mittels (% GeoMean).

### 3.4. Quantitative Eisenbestimmung

Der zelluläre Eisengehalt wurde aus den Ansätzen für die Agarphantome abgenommen bzw. separat in eigenen Ansätzen ermittelt (Tab. 9).

	2h	4h	8h	16h	24h
Kontrolle					n=1
50 µg Fe	n=1	n=3	n=2	n=1	n=4
100 µg Fe	n=1	n=5	n=1		n=3
200 µg Fe	n=2	n=3	n=3	n=1	n=4
400 µg Fe	n=4	n=4	n=2		n=3
Dosper + 50 µg Fe	n=4	n=4			
jetPEI + 50 µg Fe	n=4	n=4			

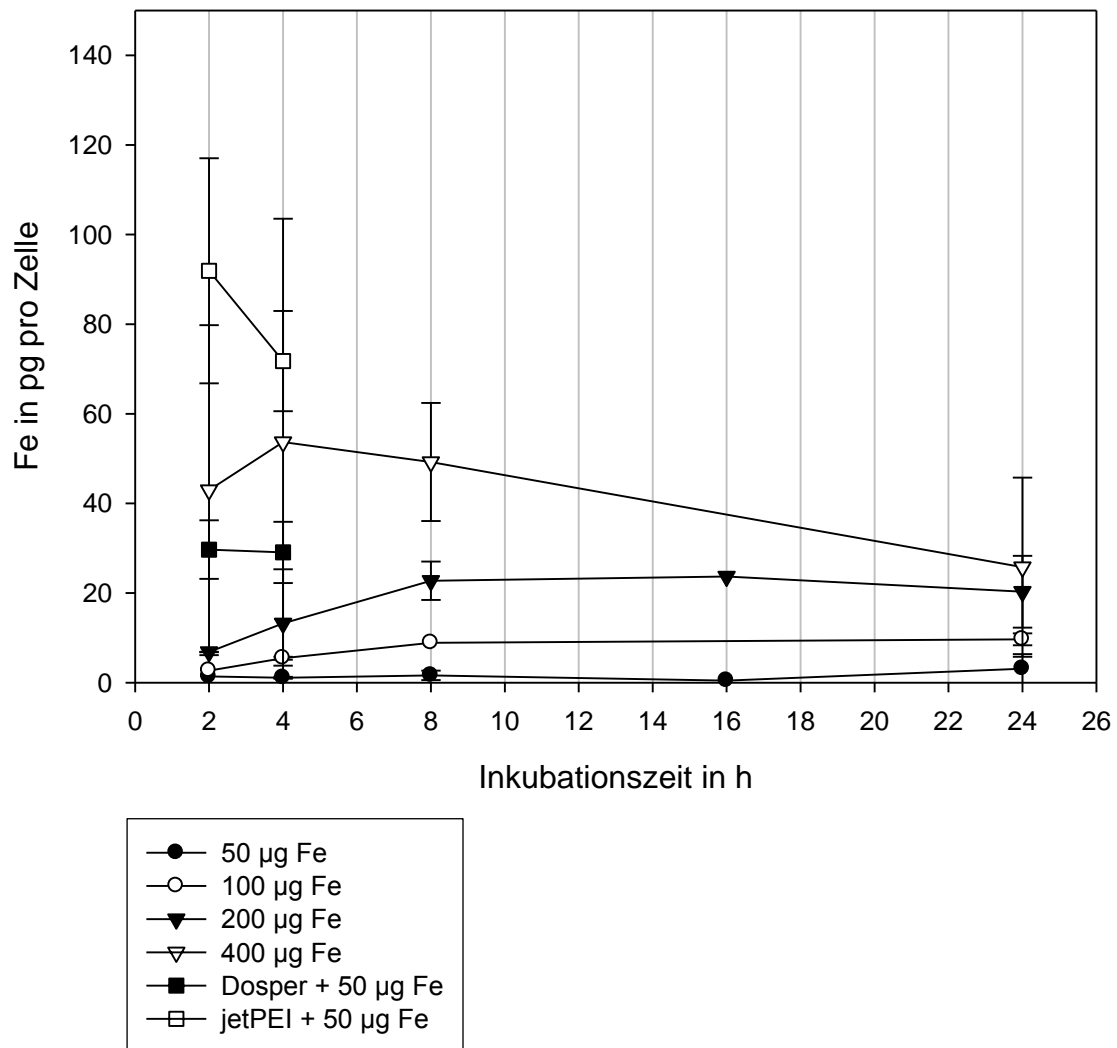
**Tab. 9**

**Versuche zur quantitative Eisenbestimmung. n=Anzahl der Versuche.**

In Abb. 11 ist der Eisengehalt der Zellen dargestellt. Sämtliche Zellen haben Eisen aufgenommen. Die mit Abstand stärkste Eisenaufnahme zeigen Zellen, die 2h mit 50 µg Eisen und Polyethylenimin (jetPEI) behandelt wurden (91,91 +/- 25,10 pg).

Auffallend ist, dass die zelluläre Eisenaufnahme bei einigen Bedingungen ein Maximum erreicht und danach wieder abnimmt, am ausgeprägtesten bei jetPEI + 50 µg Fe und bei 400 µg Resovisteisen. Die Dosisgruppen mit 200, 100 und 50 µg Eisen zeigen ebenso wie die Gruppen mit dem liposomalen Transfektionsagens Dosper eine Sättigung ab 8h Inkubation.

## Gesamteisengehalt



**Abb. 11**

**Gesamteisengehalt der Vorläuferzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Dargestellt sind die verschiedenen Inkubationsbedingungen (50 µg Fe bis 400 µg Fe, Transfektionsagenzien) als Punkte mit Standardabweichung vom Mittelwert.**

### 3.5. Bildgebung der markierten Zellen mit Dosiskurven

In Abb. 12, Abb. 13 und Abb. 14 sind exemplarisch kernspintomographisch gewonnene Bilder der eisenbeladenen Zellen dargestellt. Die darin vermessenen vertikalen Artefaktdurchmesser der Zellen (vgl. 2.4.9.) sind als Dosiskurven abgebildet. Tab. 10 gibt eine Übersicht über die als Dosiskurven abgebildeten Zeit- und Dosisbedingungen.

	2h	4h	8h	16h	24h
50 µg Fe	n=1	n=3	n=2	n=1	n=3
100 µg Fe	n=1	n=1	n=1		n=1
200 µg Fe	n=3	n=1	n=3	n=1	n=1
400 µg Fe	n=2	n=1	n=2		n=1
Dosper + 50 µg Fe	n=3	n=3			
jetPEI + 50 µg Fe	n=3	n=3			

**Tab. 10**  
**Übersicht der im Kernspintomographen gemessenen Anordnungen. n=Anzahl der Versuche.**

### 3.5.1. Bildgebung mit Resovisteisen

Abb. 12 zeigt Zellen im Agarphantom, die mit steigenden Eisendosen 2h inkubiert wurden. Je höher die Eisendosis, desto größer sind die Artefaktdurchmesser. Bei sehr geringen Zellzahlen bzw. Eisenmengen in der Agarmatrix tritt statt des T2-Kontrastmitteleffekts der T1-Effekt durch eine Aufhellung des Artefakts in den Vordergrund.

Abb. 13 und Abb. 14 zeigen die kernspintomographischen Bilder nach steigender Inkubationszeit der Zellen. Es wurden steigende Zellzahlen von  $1 \times 10^4$  bis  $50 \times 10^4$  in die Phantome eingebracht.

In Abb. 13 wurden die Zellen mit 100 µg Fe inkubiert. Je länger die Inkubationszeit, desto ausgeprägter sind die Artefakte.

In Abb. 14 wurden die Zellen mit 50 µg und 200 µg Fe inkubiert. Die Zellen wurden aus einem einzigen gemeinsamen Zellansatz gewonnen, um eine größtmögliche Homogenität und Aussagekraft der Bilder zu gewährleisten. Bei 200 µg Eisen werden zwischen 2h und 4h die Suszeptibilitätsartefakte größer, zu den übrigen Stoppzeitpunkten in dieser Dosisgruppe bleiben die Artefakte unverändert. Bei der niedrigen Dosisgruppe von 50 µg Eisen zeigt sich bei sehr hohen Zellzahlen von  $50 \times 10^4$  Zellen eine verstärkte Signalauslöschung der Artefakte über 24h hinweg. Außerdem läßt sich bei Zellzahlen von  $20 \times 10^4$  bis hinab zu  $1 \times 10^4$  ein ausgeprägter T<sub>1</sub>-Effekt beobachten.

In allen Bildern sind vor der hellen Agarmatrix, die wasserreiches Gewebe simuliert, deutlich die schwarzen Suszeptibilitätsartefakte der mit Eisen beladenen Zellen zu erkennen. Steigende Zellzahlen führen grundsätzlich zu größeren Artefakten.

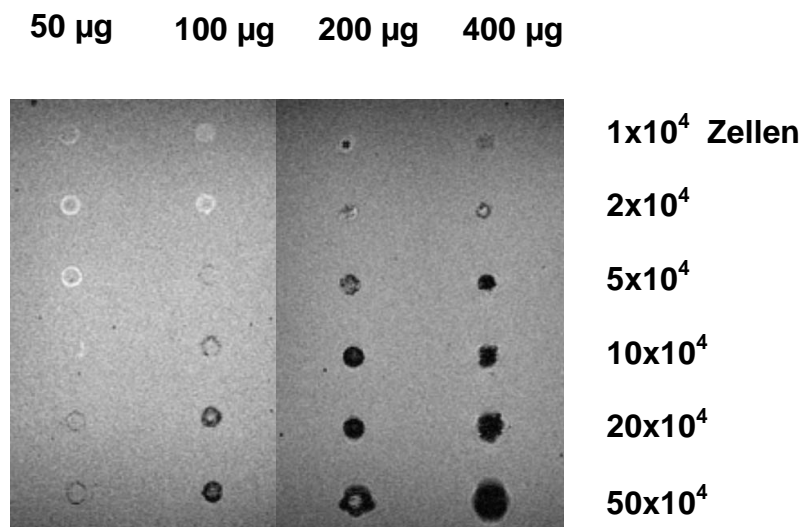


Abb. 12

Kernspintomographische Bilder der eisenbeladenen Zellen in Agarphantomen bei steigenden Eisendosen. Erkennbar ist die Dosisabhängigkeit der Artefakte. Inkubation der Zellen mit Resovisteisen jeweils 2h.

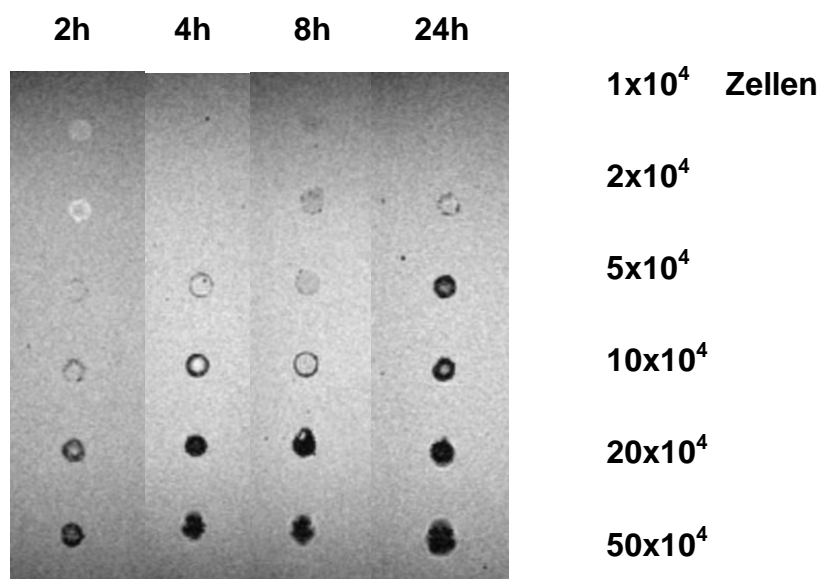


Abb. 13

Unterschiedliche Inkubationszeiten im Vergleich. Von links 2, 4, 8 und 24h Inkubation mit 100 µg Resovisteisen.

Bei Eisendosen von 200 µg Fe nimmt im Gegensatz zu Dosen von 100 µg Fe die Signalauslöschung und der Artefakt Durchmesser im Bereich von 2-4h schneller zu, allerdings wird auch schneller eine Sättigung erreicht. In Abb. 15 ist dies als steiler Anstieg zwischen 2h und 4h in der Dosiskurve 200 µg Fe zu erkennen. Dagegen ist der Anstieg in der 100 µg-Gruppe deutlich geringer, hält aber länger (bis 8h) an.

Niedrige Dosen von 50µg lassen sich nicht kernspintomographisch vermessen. In den Abb. 14 u. 15 kann dennoch ein geringer Kontrastgewinn in den Pellets zu  $50 \times 10^4$  Zellen sowie eine Abschwächung des  $T_2$ -Effekts bei  $20 \times 10^4$  Zellen beobachtet werden. Höhere Eisendosen und längere Inkubationszeiten führen zu ausgeprägteren Artefakten.

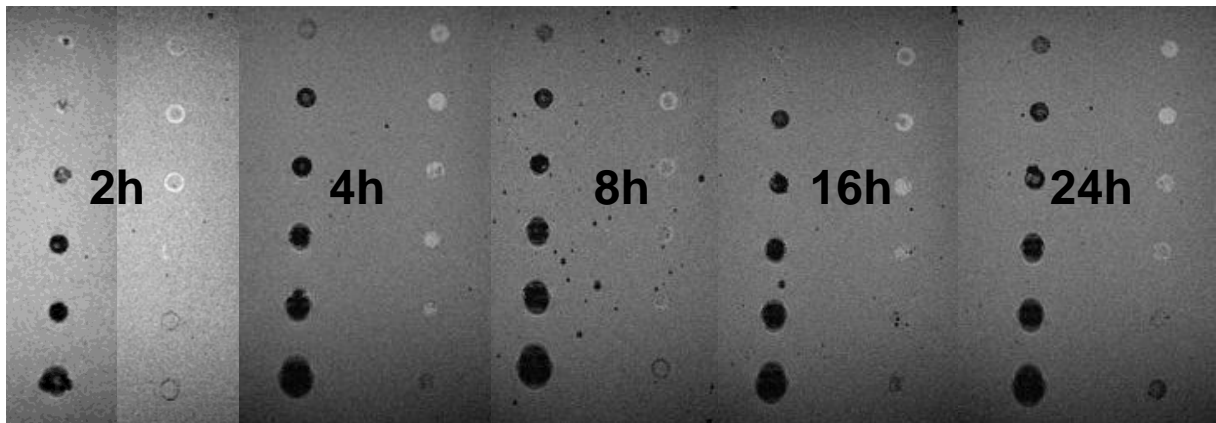


Abb. 14

**Einfluss der Inkubationszeit auf Artefaktgröße.** Jeweils steigende Zellzahlen (vgl. Abb. 12 ) von oben nach unten von  $1 \times 10^4$  bis  $50 \times 10^4$  Zellen. Linke Reihe immer 200 µg Fe, rechte Reihe 50 µg Fe.

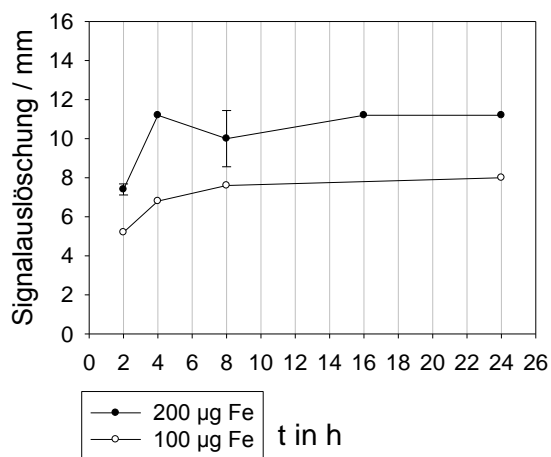


Abb. 15

**Vergleich von mit 100 µg und 200 µg Fe inkubierten Zellen im Verlauf von 24h.**  
**x-Achse: Inkubationszeit in h,**  
**y-Achse: Artefakt Durchmesser in mm.**



### 3.5.2. Dosiskurven mit Resovisteisen

Die Dosiskurven bei Inkubation mit Resovisteisen (Abb. 16 und Abb. 17) zeigen die Artefaktdurchmesser je Inkubationsdauer (Bilder der vermessenen Phantome sind nicht gezeigt). In der Legende sind die zellulären Eisengehalte in pg aufgeführt.

Die Dosiskurven für 100 µg und 400 µg Fe sind bei Inkubationszeiten von 2h (Abb. 16) und 4h (Abb. 17) nahezu identisch, während sich die Kurve für 200 µg Fe bei 4h Inkubation deutlich nach oben verschiebt. Die Artefaktdurchmesser bei 200 µg Fe sind insbesondere bei höheren Zellzahlen größer. Die Zellen haben zwischen 2h und 4h noch Eisen aufgenommen.

Die Dosiskurven für 8h und 24h Inkubation (Abb. 18 u. Abb. 19) zeigen Differenzen bei großen Zellzahlen mit 400 µg Fe. Die Gruppen 100 µg und 200 µg Fe ändern sich kaum. Abb. 19 zeigt zusätzlich die 50 µg-Dosisgruppe. Diese kann nur bei hohen Zellzahlen und 24h Inkubation vermessen werden und dient dem späteren Vergleich der Dosiskurven bei zusätzlicher Verwendung von Transfektionsagenzien. Der zelluläre Eisengehalt korreliert mit dem Artefaktdurchmesser.

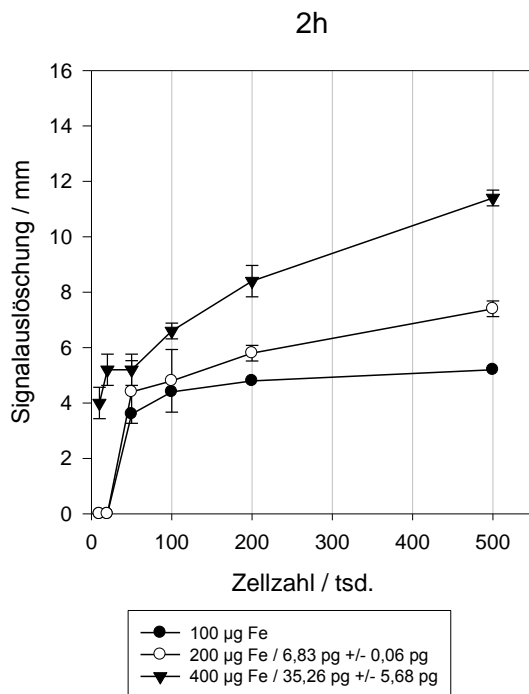


Abb. 16

Dosiskurve für 2h Inkubation mit Resovisteisen. Für 200 und 400 µg Fe n=3, für 100 µg Fe n=1. Die x-Achse zeigt die eingesetzte Zellzahl in tausend Zellen, die y-Achse den graphisch bestimmte Artefaktdurchmesser (=Signalauslöschung) in mm.

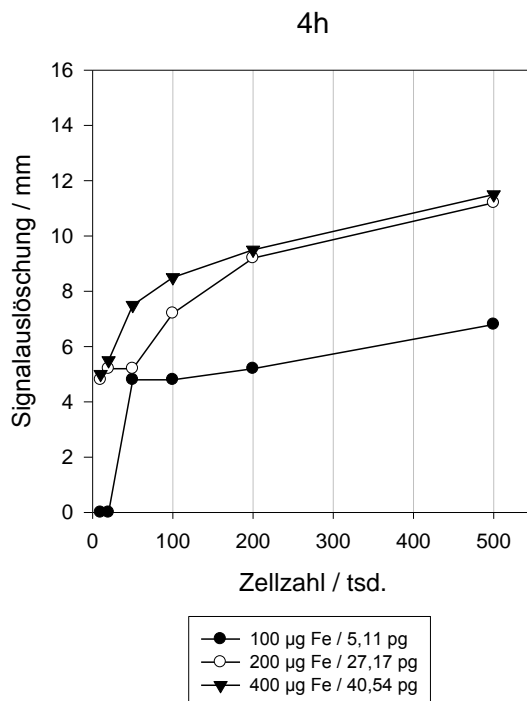
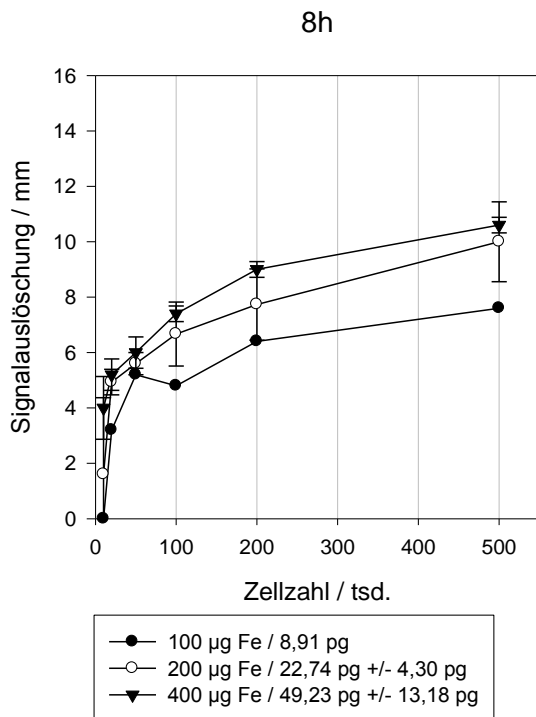
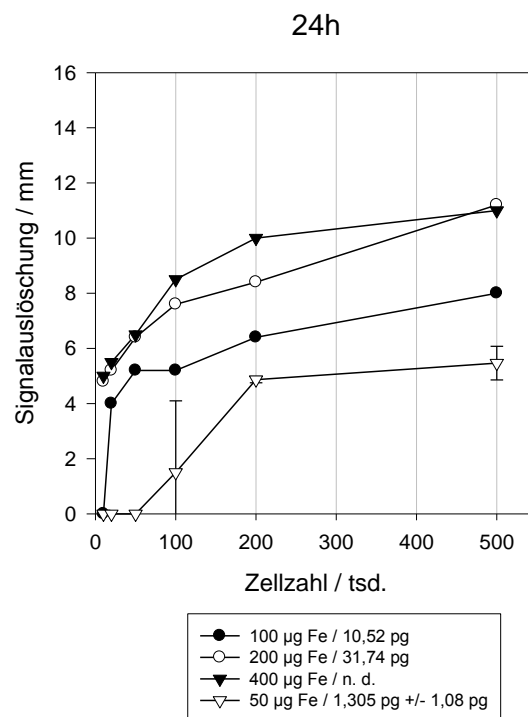


Abb. 17

Dosiskurve für 4h Inkubation mit Resovisteisen. Die x-Achse zeigt die Zellzahl in tausend. Die y-Achse zeigt die Artefaktgröße (=Signalauslöschung) in mm. n=1.



**Abb. 18**  
**Dosiskurve 8h Inkubation mit Resovisteisen.**  
**Für 200 und 400 µg Fe n=2.**

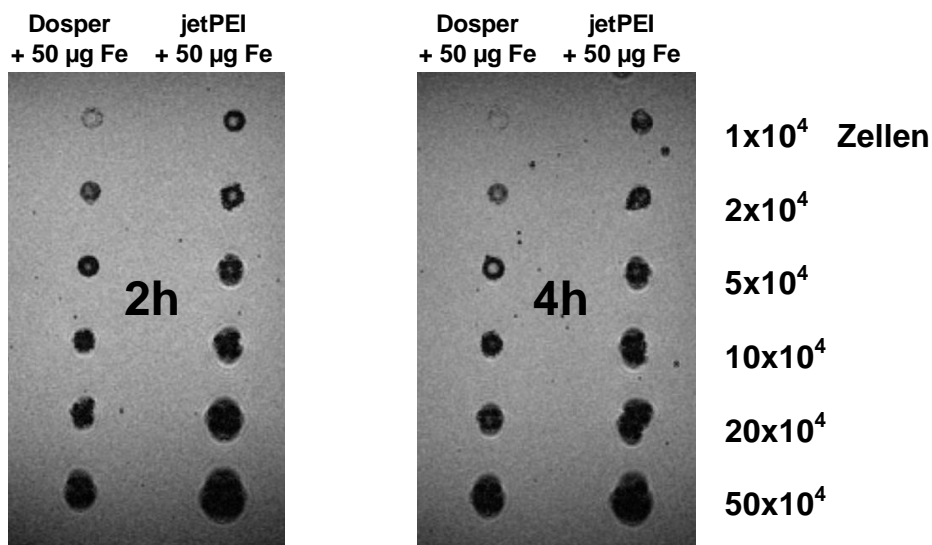


**Abb. 19**  
**Dosiskurve 24h Inkubation.**

### 3.5.3. Bildgebung mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien

Unter dem zusätzlichen Einsatz von Transfektionsagenzien mit Resovisteisen entstehen sehr gut sichtbare Suszeptibilitätsartefakte (siehe Abb. 20). Ihre Größe ist abhängig von der Zellzahl und der zellulären Eisenladung.

Die Artefakte der mit Polyethylenimin (jetPEI) und Eisen behandelten Zellen sind durchschnittlich um ca. 20% oder 2 mm größer als die korrespondierenden Artefakte der mit liposomalem Agens (Dosper) + Eisen inkubierten Zellen.



**Abb. 20**  
**Phantome bei Inkubation mit Resovisteisen und TAs.**  
**Links 2h inkubiert, rechts 4h inkubiert.**

### 3.5.4. Dosiskurven mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien

Mit jetPEI + Fe markierte Zellen zeigen durchgehend einen größeren Artefakt Durchmesser als das liposomale Agens in Verbindung mit Resovisteisen (Abb. 21, Abb. 22 u. Abb. 23).

Eine kürzere Inkubationszeit von 2h bewirkt kaum eine Reduktion der Signalauslöschung gegenüber 4h. Lediglich bei Zellzahlen im Pellet von unter  $1 \times 10^5$  lässt sich ein kleiner zeitlicher Effekt nachweisen. Der zelluläre Eisengehalt korreliert mit dem Artefakt Durchmesser.

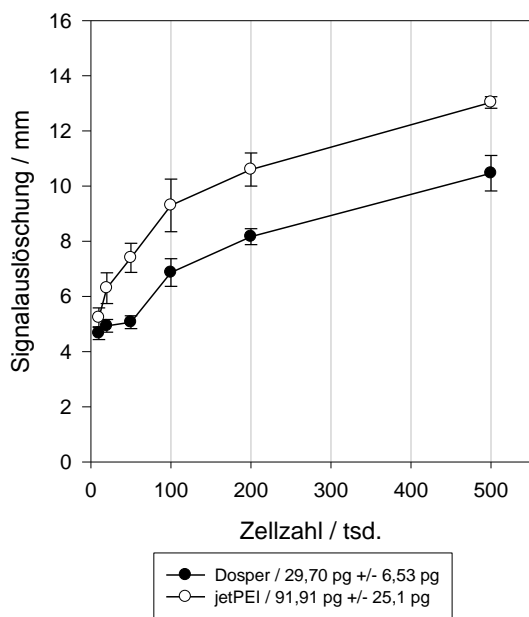


Abb. 21

Dosiskurve 2h Inkubation mit 50 µg Resovisteisen und TAs. n=3.

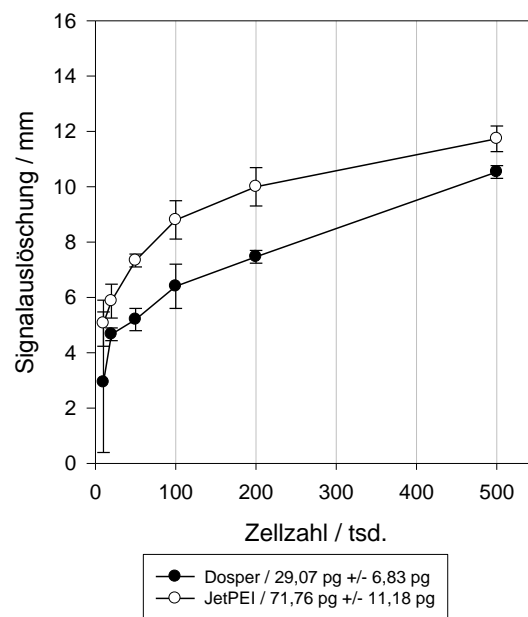


Abb. 22

Dosiskurve 4h Inkubation mit 50 µg Resovisteisen und TAs. n=3.

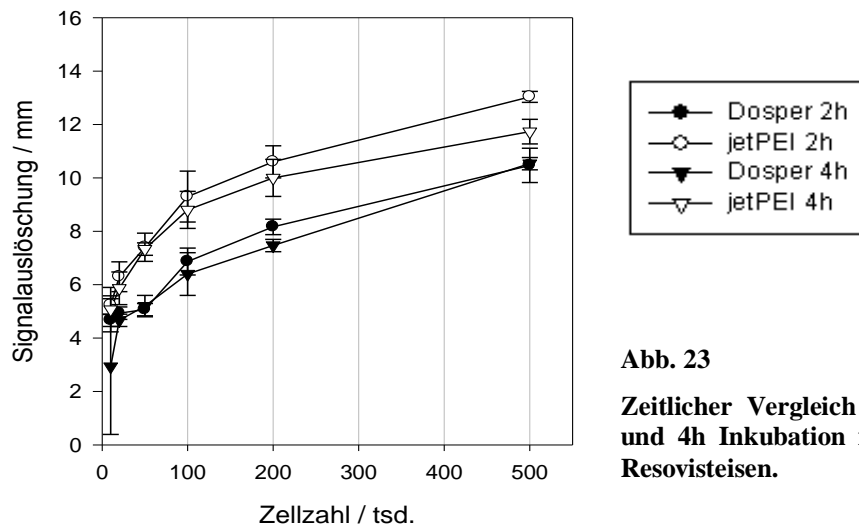


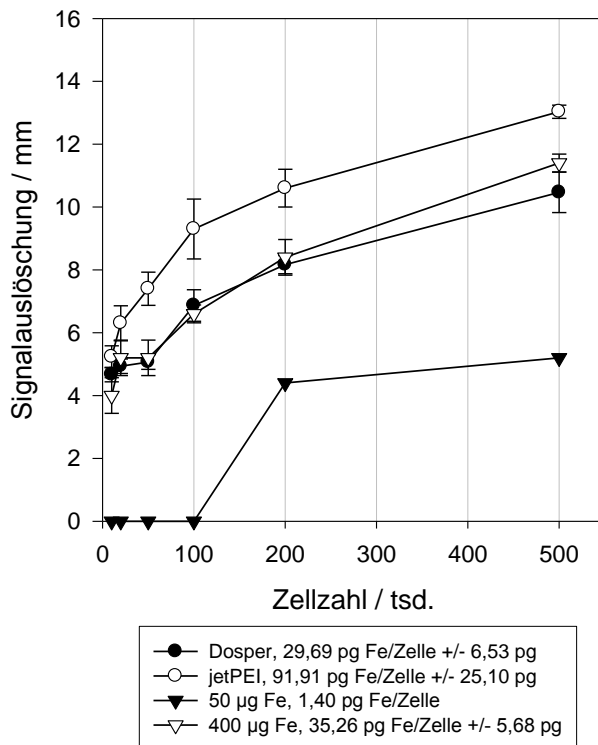
Abb. 23

Zeitlicher Vergleich zwischen 2h und 4h Inkubation mit TAs und Resovisteisen.

### 3.5.5. Vergleich der Signalauslöschung ohne / mit Verwendung von Transfektionsagenzien

Abb. 24 vergleicht Dosiskurven mit und ohne Verwendung von Transfektionsagenzien in einem Inkubationszeitraum von 2h. Die Eisendosen für die Versuche ohne Transfektionsagenzien wurden am unteren und oberen Ende einer sinnvollen Eisendosis für die Inkubation gewählt (50 µg bzw. 400 µgFe/ml).

Die 50µg-Dosisgruppe ohne TAs zeigt erwartungsgemäß die geringste Signalauslöschung. Die 400µg Dosisgruppen zeigen ein den Gruppen mit liposomalem Transfektionsagens + 50µg Eisen vergleichbares Signalverhalten. Mit Hilfe des nichtliposomalen Transfektionsagens lässt sich die größte Signalauslöschung erzielen. Beim direkten Vergleich zwischen der Kurve mit 50 µg Fe und den Kurven beider Transfektionsagenzien zeigt sich, dass bei zusätzlicher Verwendung von Transfektionsagenzien eine Reduktion der Eisendosis um mindestens das 8fache bei gleicher Inkubationszeit möglich ist.



**Abb. 24**

**Vergleich der Signalauslöschung mit/ohne Verwendung von TAs. 2h Inkubation.**

### 3.6. Auswaschversuche

Die Auswaschversuche belegen die Nachhaltigkeit der Eisenmarkierung. Die Zellen wurden nach Inkubation mit Eisen und Transfektionsagenzien für 7 Tage in eisenfreiem Medium kultiviert, in ein Phantom (Abb. 26) eingebracht und dann der zelluläre Eisengehalt bestimmt. Zum direkten Vergleich der Artefakte wurden an d=0 Zellen entnommen und in ein Phantom eingebracht (Abb. 25). In Abb. 26 ist die Signalabnahme aller Artefakte an d=7 deutlich zu erkennen. Beim liposomalen Agens (Reihe „Dosper“) erkennt man nur noch bei  $50 \times 10^4$  Zellen ein Artefakt, beim nichtliposomalen Agens (Reihe „jetPEI“) hingegen noch bis  $5 \times 10^4$  Zellen. Die Dosiskurven (Abb. 27 u. Abb. 28) bestätigen den optischen Eindruck.

Nach Bestimmung der Zellzahlen wurde die Anzahl der Teilungen von d=0 bis d=7 errechnet. Die Zellen hatten sich bis dahin ca. viermal geteilt. Diese Beobachtung korrespondiert mit den gemessenen Eisengehalten an d=7, die ungefähr  $2^4=16$ mal geringer waren als an d=0. Beim nichtliposomalen TA lassen sich Artefakte mit T1-Effekt bis zu 50 000 Zellen beobachten; beim liposomalen TA ist der T1-Effekt bis zu 200 000 Zellen beobachtbar, danach setzt bis 20 000 Zellen ein T2-Effekt ein.

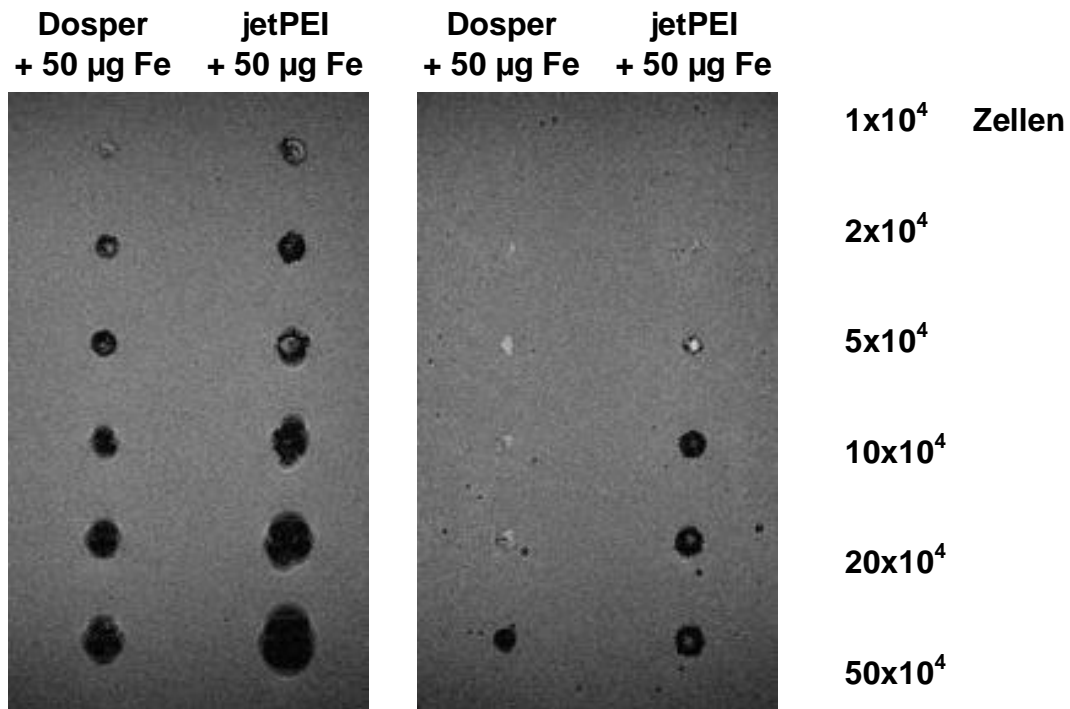


Abb. 25

2h Inkubation mit 50 µg Resovisteisen und TAs. d=0.

Abb. 26

Auswaschversuch 2h TAs. d=7. Deutliche Abnahme der Artefakte.

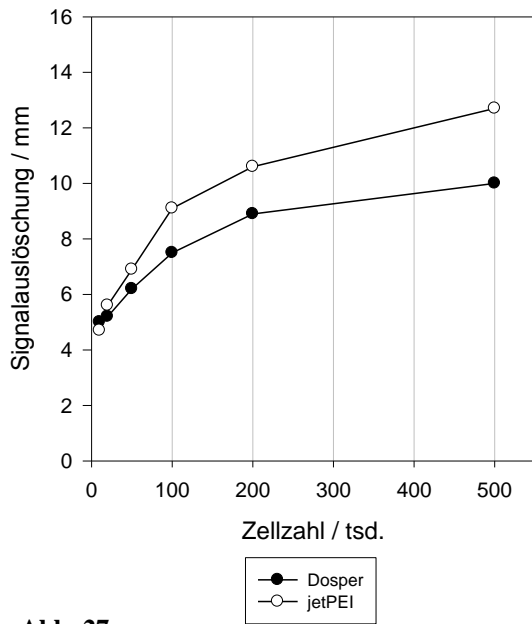


Abb. 27

**Auswaschversuch 2h Inkubation mit 50 µg Resovisteisen und TAs. d=0.**  
**Eisengehalt Dosper: 29,93 pg Fe/Zelle,**  
**jetPEI: 72,0 pg Fe/Zelle.**

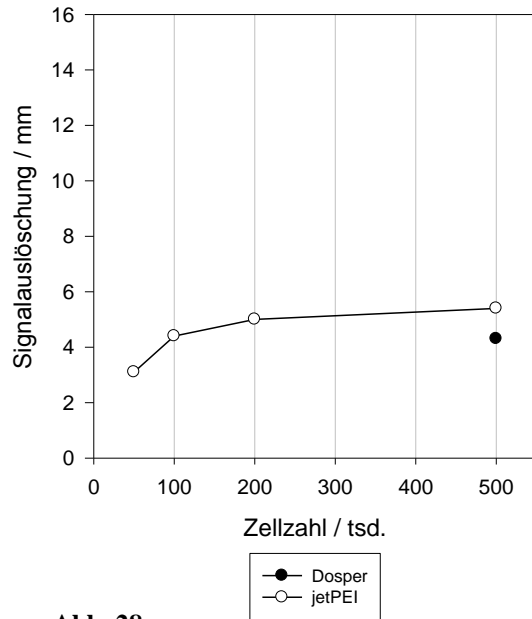


Abb. 28

**Auswaschversuch 2h TAs d=7.**  
**Eisengehalt Dosper: 1,2 pg, jetPEI 4,46 pg.**

Der Auswaschversuch wurde zusätzlich noch mit einer anfänglichen Inkubationsdauer von 4h durchgeführt, um eventuelle Änderungen der Signalauslöschung bzw. des Eisengehalts aufzudecken, die sich erst beim Auswaschen bemerkbar machen (Abb. 29, Abb. 30). Es lassen sich keine Änderungen zur Inkubationsdauer von 2h erkennen.

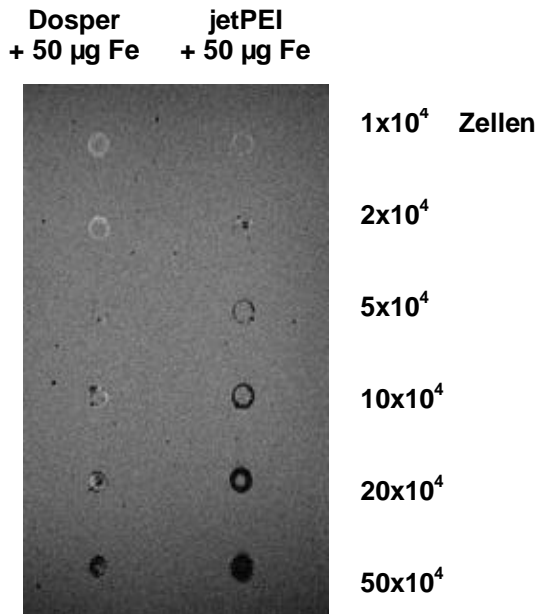


Abb. 29

**Auswaschversuch 4h Inkubation mit 50 µg Resovisteisen und TAs. d=7.**

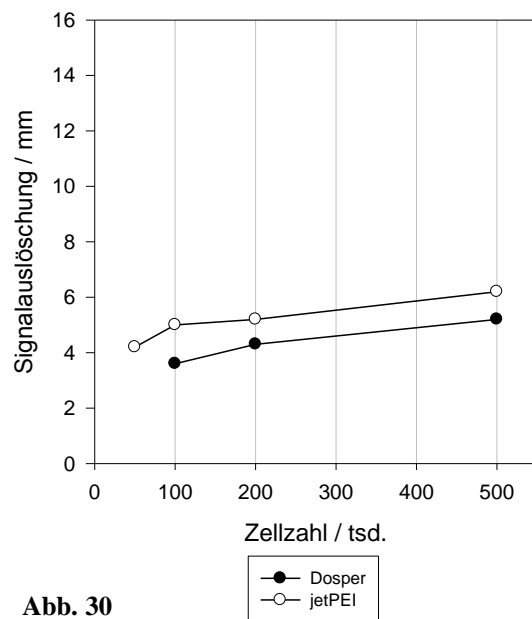


Abb. 30

**Auswaschversuch 4h d=7.**

In einem weiteren Versuch wurde der Beobachtungszeitraum auf 10 Tage ausgedehnt. Eine konstante Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen wurde herausgegriffen, für 2h inkubiert und zu den Zeitpunkten d=0, d=3, d=7 u. d=10 nach dem Auswaschen jeweils in ein Phantom eingebracht (Abb. 31, Abb. 32). Auch bei einem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen zeigte das nichtliposomale Agens wieder durchgehend größere Artefakte als das liposomale Agens. Insgesamt ließen sich aber unter beiden Bedingungen Artefakte bis d=10 beobachten. T<sub>2</sub>-Effekte waren auch hier bei den niedrigsten Zellzahlen beobachtbar.

Die Abschwächung des Signals verläuft nicht linear sondern degressiv (Abb. 32). Dies ist ein Hinweis auf die tatsächliche Aufnahme bzw. feste Verbindung der SPIOs mit den hämatopoietischen Vorläuferzellen.

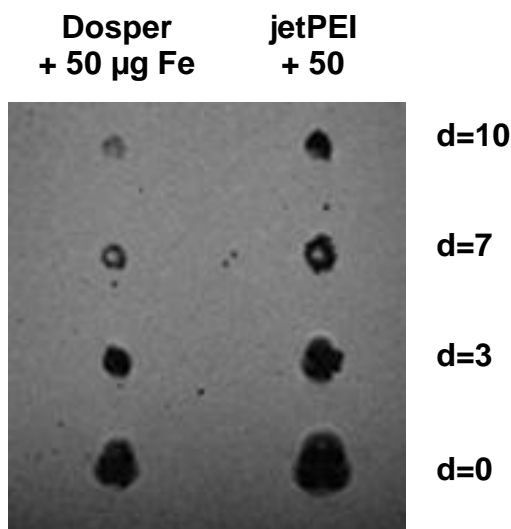


Abb. 31

Auswaschversuch 2h Inkubation mit 50 µg Resovisteisen und TAs. d=0, 3, 7, 10. Immer  $2 \times 10^5$  Zellen.

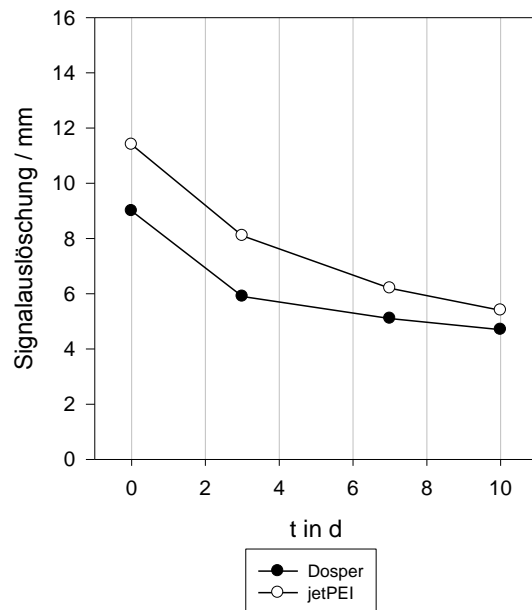
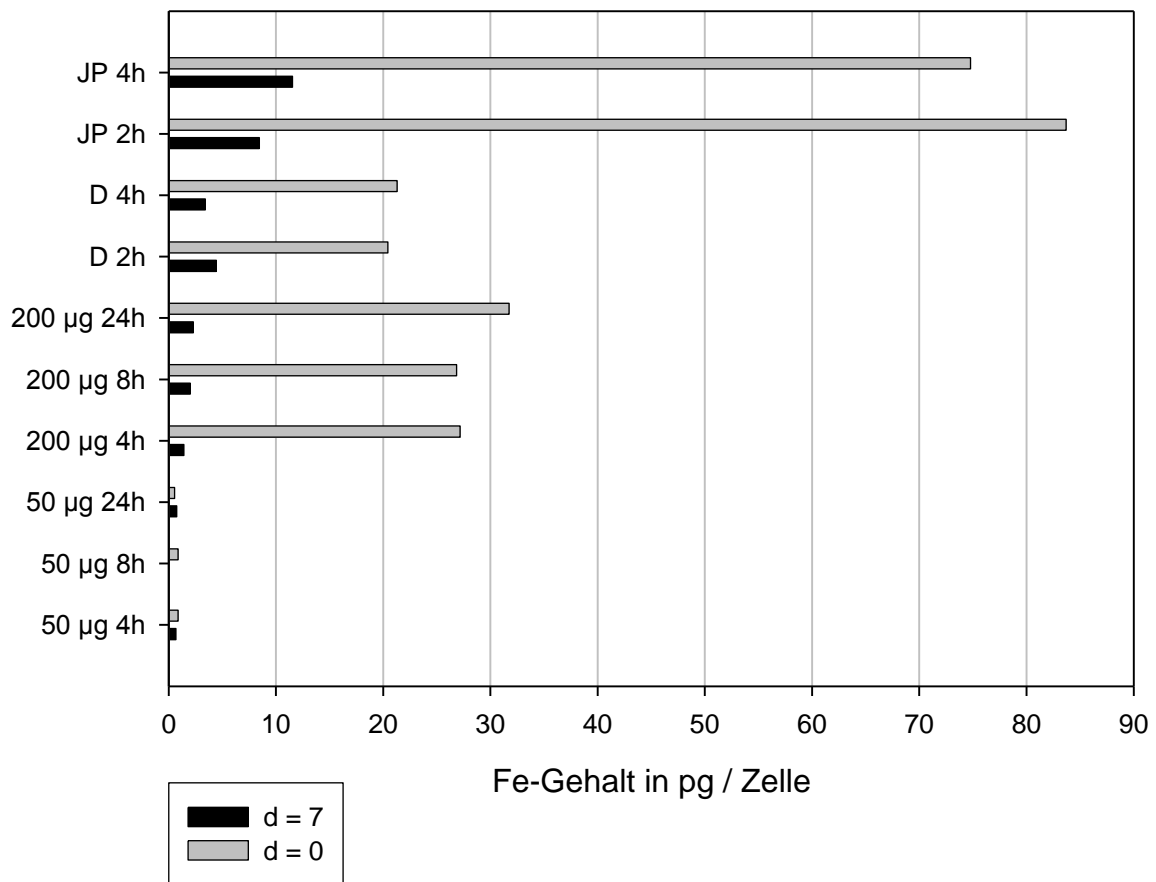


Abb. 32

Auswaschversuch im zeitlichen Verlauf, jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen, 50 µg Resovisteisen und TAs. An d=0 2h Inkubation.

Abb. 33 zeigt eine Zusammenstellung der Eisengehalte in den Auswaschversuchen, jeweils an d=0 und d=7. In sämtliche Zellen geht der Eisengehalt im Beobachtungszeitraum durchschnittlich um 80-90% zurück. Die mit dem nichtliposomalen Agens behandelten Zellen enthalten 2- bis 3-mal mehr Eisen als die mit einem liposomalem Agens behandelten. Bei den Transfektionsagenzien zeigt sich, dass eine längere Inkubationszeit nicht mit einer deutlich größeren Eisenaufnahme einhergeht.



**Abb. 33**

**Eisengehalt der Zellen in den Auswaschversuchen.**



### 3.7. Elektronenmikroskopie

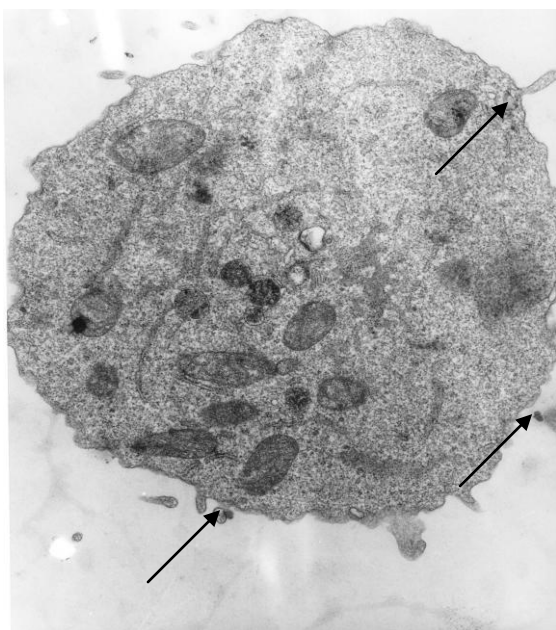


Abb. 34

4h Inkubation mit 200 µg Fe.

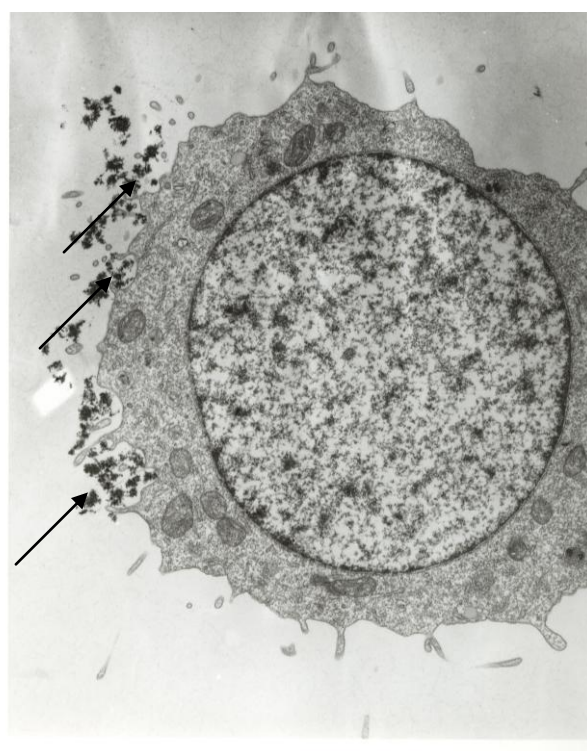


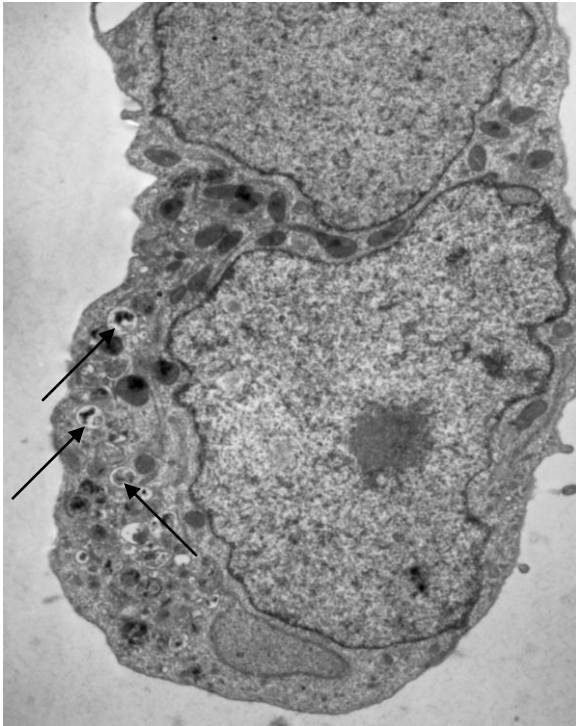
Abb. 35

4h Inkubation mit Dospers + 50 µg Fe.

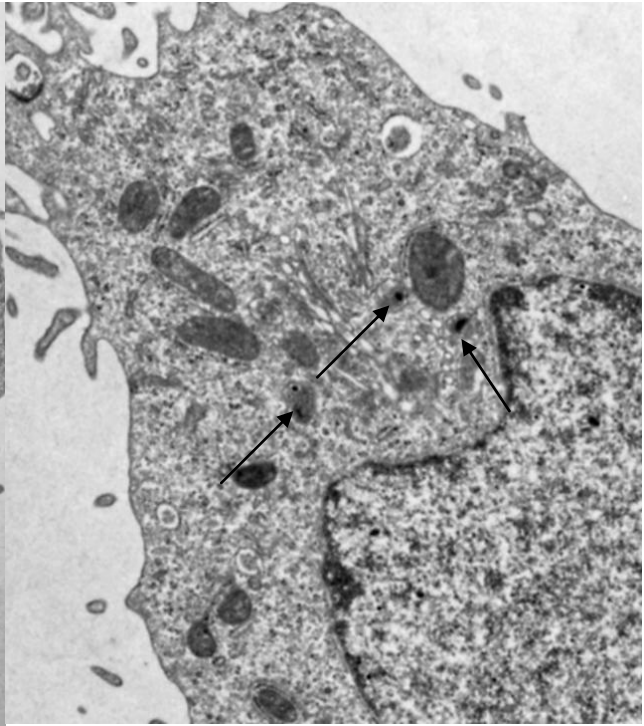


Abb. 36

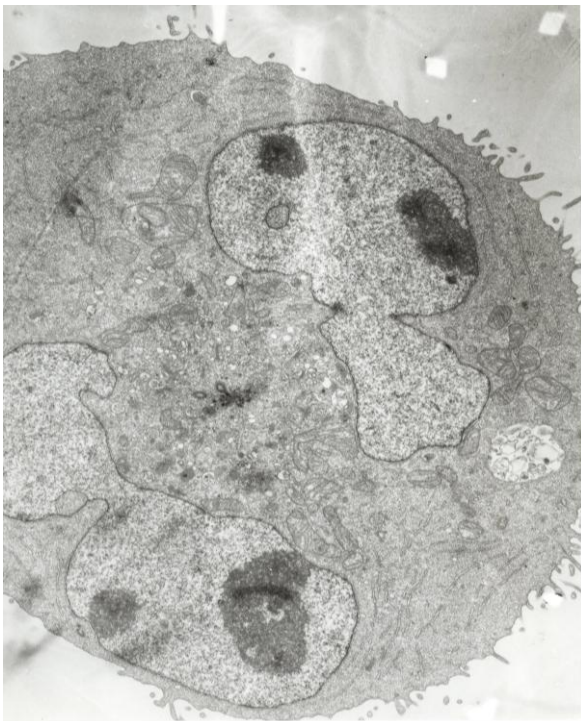
4h Inkubation mit jetPEI + 50 µg Fe.



**Abb. 37**  
**4h Inkubation mit Dospers und Resovisteisen,**  
**danach 6 Tage in eisenfreiem Medium.**



**Abb. 38**  
**4h Inkubation mit jetPEI und Resovisteisen,**  
**danach 6 Tage in eisenfreiem Medium.**



**Abb. 39**  
**Negativkontrolle**

Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen jeweils Einzelaufnahmen der mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien behandelten KG-1A Zellen. Man erkennt unter allen Dosisbedingungen eine gut erhaltene zelluläre Feinstruktur. Die Kerne sind regelmäßig, das Cytosol homogen und die Organellen erhalten.

Abb. 34 zeigt eine Zelle mit guter Strukturerhaltung, die 4h mit 200 µg Fe inkubiert wurde. Es ist diskret Eisen an der Zelloberfläche zu erkennen (Pfeile).

Die in Abb. 35 abgebildete Zelle wurde 4h mit Dosper und 50 µg Resovisteisen inkubiert. Auch hier ist die Strukturhaltung gut. Intrazellulär sind keine Eisendepots zu erkennen, an der Zelloberfläche findet sich jedoch reichlich Resovisteisen in elektronendichten schwarzen, relativ plumpen Aggregaten (Pfeile).

Abb. 36 zeigt bei 4h Inkubation mit jetPEI und 50 µg Resovisteisen ein ähnliches Bild. Man erkennt kaum eine Eisenaufnahme in die Zellen, an der Zelloberfläche jedoch wiederum reichlich Resovisteisen, diesmal in feinen, teilweise netzartig ausgezogenen schwarzen Aggregaten (Pfeile).

Die in Abb. 37 gezeigte Zelle wurde 4h mit Dosper und 50 µg Resovisteisen inkubiert, anschließend gewaschen und 6 Tage lang in eisenfreiem Kulturmedium inkubiert. Es zeigt sich reichlich intrazelluläres Eisen in Endozytosevesikeln (Pfeile).

Abb. 38 zeigt eine Zelle, die mit jetPEI behandelt wurde. Es ist intrazelluläres Eisen erkennbar, allerdings weniger als in Abb. 37.

Die Negativkontrolle ist in Abb. 39 zu sehen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Durchgeführte Untersuchungen

In der vorliegenden in-vitro-Studie wurde die Möglichkeit zur Markierung von CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Vorläuferzellen mittels dextranecoateter SPIOs unter zusätzlicher Verwendung liposomaler bzw. nichtliposomaler Transfektionsagenzien untersucht. Hierzu wurden proliferierende Zellen mit Dosen von 50-400 µg/ml SPIO sowohl ohne als auch mit Transfektionsagenzien über Zeiträume von 2-24h inkubiert und kernspintomographisch bei klinischer Feldstärke dargestellt. Der intrazelluläre Eisengehalt wurde photometrisch bestimmt.

Um die endozytotische Aufnahme der Nanopartikel zu bestimmen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der eisenbeladenen Zellen angefertigt.

Die Nachhaltigkeit der Eisenmarkierung wurde mittels Auswaschversuchen quantifiziert.

Ferner wurde der Effekt von dextranumhüllten SPIOs und Transfektionsagenzien auf Vitalität, Proliferations- und Apoptoseverhalten der Vorläuferzellen untersucht.

#### 4.2. Bisheriger klinischer Einsatz von dextrangecoateten SPIOs und Ausweitung des Einsatzes auf die molekulare Bildgebung

Gegenwärtig werden vor allem drei verschiedene Verfahren zum Nachweis von Geweben, Zellen oder Zellbestandteilen eingesetzt: Detektion von gadolinium- oder eisenhaltigen Nanopartikeln im Magnetresonanztomographen, Detektion von radioaktiven Sonden mittels PET- oder SPECT-Technik<sup>(8)</sup> und Bildgebung mit optischen Systemen wie Biolumineszenz.<sup>(14, 23)</sup>

Die nuklearmedizinische Technik mit radioaktiven Sonden bietet eine hohe Sensitivität. Sehr geringe molare Konzentrationen der Radionuklide können detektiert und direkt quantifiziert werden. Im Monitoring der Stammzelltherapie spielt die Toxizität der eingesetzten Kontrastmittel/Sonden eine entscheidende Rolle. Können bei konventionellen PET/SPECT-Untersuchungen die Auswirkungen der Radioaktivität vernachlässigt werden, müssen diese bei der Markierung von empfindlichen Stammzellen beachtet werden.<sup>(13)</sup>

Die kurzen Halbwertszeiten der radioaktiven Stoffe von wenigen Minuten beziehungsweise Stunden bereiten Probleme bei der notwendigen längerfristigen Bewertung der Effizienz von Stammzelltherapien und der Nachverfolgung von in vivo migrierenden Zellen. Die Aktivität der radioaktiven Sonden nimmt zu schnell ab, um über längere Zeiträume zuverlässig detektierbar zu sein. Neueste Verfahren versuchen deshalb eine Synthese von PET und MRT, um die Vorteile beider Techniken in der Molekularen Bildgebung zu vereinen.<sup>(54, 60)</sup>

Die Magnetresonanztomographie ist um den Faktor  $10^4$ - $10^6$  weniger sensitiv.<sup>(28)</sup> Allerdings hat sie im Vergleich mit den anderen genannten Verfahren eine deutlich höhere Auflösung, die bei klinischen Geräten im Bereich von ca. 200 Mikrometern liegt. Außerdem ist in der Kernspintomographie gleichzeitig eine

anatomische und/oder physiologische (z. B. Perfusionsstudien) Beurteilung möglich.<sup>(12)</sup>

Optische Verfahren benutzen zur Bildgebung Infrarotproben<sup>(1, 40)</sup> und andere Fluoreszenzfarbstoffe, um biologische Vorgänge in vivo und in Echtzeit sichtbar zu machen.<sup>(45, 59)</sup> Hauptnachteil der optischen Bildgebung sind hohe Kosten für die Farbstoffe, lange Zeiträume zur Bildgewinnung und insbesondere die begrenzte Eindringtiefe, was sie zur Ganzkörperbildgebung bisher ungeeignet macht.<sup>(24)</sup>

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Resovist wurde klinisch routinemäßig bisher als RES-spezifisches Kernspinkontrastmittel in der Bildgebung von Leber und Milz eingesetzt. Die Erweiterung der Anwendung auf die molekulare Bildgebung wird durch die bereits bestehende klinische Zulassung und seine industrielle Verfügbarkeit attraktiv. Eine aufwendige Synthese im Labor mit zwangsweise daraus resultierenden Qualitätsschwankungen entfällt.

Die neueren, noch kleineren *ultrasmall particles of iron oxide* (USPIOs) wurden als Fortentwicklung der SPIOs als aussichtsreiche Kontrastmittel für die molekulare Bildgebung diskutiert. Zahlreiche Untersuchungen haben aber inzwischen gezeigt, dass die Markierungseffektivität der USPIOs selbst bei zusätzlicher Verwendung von Transfektionsagenzien derjenigen der SPIOs deutlich unterlegen ist.<sup>(11, 20, 55)</sup>

#### 4.3. Bildgebung markierter Zellen im MRT

SPIOs bzw. USPIOs sind nicht die einzigen Marker in der MR-Bildgebung, auch wenn sie in aktuellen Studien die am häufigsten verwendete Substanzklasse darstellen. Bisher wurden in der MR-Bildgebung zellulärer bzw. molekularer Vorgänge verschiedenste Nanopartikel eingesetzt. Das Spektrum reicht von Gadoliniumkomplexen zur Darstellung der Expression von  $\beta$ -Galactosidase<sup>(38)</sup> über die Darstellung von Glucose-Rezeptoren mittels verschiedener Niosomen (*nonionic vesicles*) in Verbindung mit paramagnetischen Kontrastmitteln<sup>(39)</sup> bis zur gesteigerter Eisenanreicherung durch eingebrachte Tyrosinase-Reporter-Gene<sup>(2)</sup>.

Reporter gene zur kernspintomographischen Bildgebung sind im Labor von Interesse, kommen aber bei der Darstellung von empfindlichen Stammzellen nicht in Betracht. Die DNA der Stammzellen müsste verändert werden, was bei der Therapie schwerer Erkrankungen Risiken für den Empfänger bedeuten kann. Es würden Gene exprimiert, die in normalen Stammzellen nicht vorkommen und die schlimmstenfalls die Funktion der Zellen beeinträchtigen könnten. Selbst beim Einsatz von Reporter genen, die eine regulierte Genexpression erlauben, bestünden noch erhebliche Risiken.

Zur Zellmarkierung verwendete Niosomen wurden durch Oberflächenmodifikationen speziell auf die molekulare Bildgebung von Tumorgewebe abgestimmt. Dazu wurden NPG-Liganden, die Glucoserezeptoren auf Tumorzellen erkennen, mit den Niosomen verbunden. Um die Anreicherung in Tumorgewebe zu verbessern, wurden pegylierte Niosomen verwendet.<sup>(39)</sup> Allerdings war die erreichte Eisenladung relativ niedrig und eine Darstellung von Tumorgewebe nur bis zu 24h nach Kontrastmittelapplikation möglich. Für die Bildgebung von transplantierten Stammzellen ist diese Technik nicht geeignet.

Daneben gibt es Studien, die transferringebundene magnetische Nanopartikel untersucht haben.<sup>(17, 20)</sup> Diese Methode der spezifischen, rezeptorvermittelten endozytotischen Eisenaufnahme über den ubiquitären Transferrin-Rezeptor ist jedoch noch experimentell und nicht für klinische Studien zugelassen.

Als weitere Methode der spezifischen Eisenaufnahme wurde ein SPIO-Protaminsulfat-Komplex vorgeschlagen.<sup>(6)</sup> Die Eisenaufnahme war mit ca. 17 pg/Zelle bei Makrophagen und 2 pg/Zelle bei CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Stammzellen eher gering, obwohl relativ lange Inkubationszeiträume (über Nacht) angesetzt wurden. Bei klinischen Feldstärken sind diese zellulären Eisengehalte nicht ausreichend, um ein sichtbares Artefakt abzubilden, weshalb experimentelle Feldstärken von 7,0T zur Bildgebung erforderlich waren.<sup>(6)</sup> Für

schnell proliferierende (Stamm)Zellen ist eine Verwendung dieser Technik deshalb noch kritisch zu sehen, denn hier sind initial hohe Eisenladungen wünschenswert, um eine ausreichend lange Nachverfolgung zu ermöglichen.

Ein weiterer Ansatz zur effizienten rezeptorvermittelten Markierung von Zellen ist die Bindung von kurzen HIV-Proteinen, den Transaktivator-Transkriptionsproteinen (Tat), an die Oberfläche der Dextranhülle der SPIOs, sogenannte CLIO-Tat (*cross linked iron oxides*) oder MION-Tat (*monocrystalline iron-oxide nanocompounds*). Diese Tat-Proteine weisen aber ihrer viralen Natur gemäß eine hohe Affinität zum Zellkern auf, wo dann während der Degradation der SPIOs zeitweise reaktive Sauerstoffspezies zu DNA-Schäden führen könnten.<sup>(53)</sup>

Auch Magnetodendrimere wurden in einigen Arbeiten zur unspezifischen Zellmarkierung verwendet. Dabei handelt es sich um SPIOs, die mit einer Kapsel aus Dendrimeren ummantelt sind, baumartig verzweigten Makromolekülen, die ähnliche Eigenschaften wie Transfektionsagenzien aufweisen.<sup>(15)</sup> Eine Nachverfolgung der Zellen war bis zu sechs Wochen möglich. Allerdings war ein aufwendiger Syntheseprozess im Labor notwendig.

#### 4.4. Toxizitätsprüfung

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Eisenmarkierung die Vitalitätsparameter der Zellen nicht nachhaltig beeinflusst. Vitalität, Proliferationsfähigkeit und Apoptoseverhalten der Zellen verändern sich auch bei sehr hohen Eisendosen von 400 µg/ml und langen Inkubationszeiten bis 24h kaum.

Die an d=2 bei allen Dosisgruppen aufgetretenen signifikanten Änderungen der Vitalität ( $p < 0,05$ ) sind zu hinterfragen. Es besteht die Möglichkeit, dass das eingesetzte Eisen in der Frühphase nach der Eisenbeladung die Vitalität der Zellen beeinträchtigt. Dafür spräche die Dosisabhängigkeit des Effekts. Andere Untersuchungen zeigen ebenfalls geringe kurzzeitige Beeinträchtigungen der Zellvitalität zu frühen Zeitpunkten nach Inkubation.<sup>(3)</sup> Diese Beobachtungen

stehen im Einklang mit ähnlichen Arbeiten, die bei mesenchymalen Stammzellen einen Abfall der Vitalität mit steigender Eisenkonzentration und verlängerter Inkubationszeit festgestellt haben.<sup>(4)</sup> Allerdings scheint hochdosiertes Eisen die Vitalität zu späteren Zeitpunkten eher positiv zu beeinflussen, und die absolute Beeinträchtigung der Zellvitalität von ca. 3% im Vergleich zur Kontrolle ist gering. Außerdem zeigen sich bei den Proliferationskinetiken an d=2 keinerlei signifikante Beeinträchtigungen. Ein systematischer Fehler könnte daher das Ergebnis ebenfalls erklären.

An einzelnen Stopptagen ergeben sich bei den Proliferationskinetiken statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Allerdings sind diese zeitlich nicht einheitlich verteilt und nicht dosisabhängig. Außerdem treten bei einer hohen Eisendosis von 400 µg/ml keine signifikanten Änderungen im Proliferationsverhalten der Zellen auf. Eine Erklärung könnte ein systematischer Fehler sein, der durch die Passage der Zellen bei der Aufbereitung nach Inkubation mit Resovisteisen bedingt ist.

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss die lange Inkubationszeit der Zellen mit Eisen von 24h beachtet werden. Im klinischen Einsatz wäre die Inkubationszeit deutlich kürzer und eventuelle toxische Effekte entsprechend geringer.

In Kombination mit Transfektionsagenzien sind die Beeinträchtigungen gering. Allerdings zeigt sich ein Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den eisenbeladenen Zellen bei Vitalität und Proliferation an isolierten Stopzeitpunkten, jedoch nur in den ersten Tagen nach Inkubation. Nach 14 Tagen ist der Effekt kaum mehr zu erkennen.

Bei den untersuchten Proliferationskinetiken mit Transfektionsagenzien zeigte sich an d=6 für beide Transfektionsagenzien eine statistisch signifikant niedrigere Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Alle anderen Meßpunkte waren unauffällig und die Vitalität zum gleichen Zeitpunkt war nicht beeinträchtigt. Allerdings waren die untersuchten Stichproben klein (n=2). Beachtet werden muss die relativ lange Inkubationszeit der Vorläuferzellen von 4h mit Transfektionsagenzien und Eisen im Vergleich zu ähnlichen Studien.<sup>(20)</sup> Vier



Stunden Inkubation mit Transfektionsagens stellen das Maximum der vom Hersteller empfohlenen Inkubationszeit dar.

Die Vitalität war an d=10 bei jetPEI signifikant geringer als die der Kontrolle. Um endgültige Aussagen treffen zu können, müssen größere Stichproben untersucht werden.

Die mit Resovisteisen durchgeführten Apoptoseprüfungen zeigten zu allen Zeitpunkten und in allen Dosisgruppen ein im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändertes Apoptoseverhalten. Diese Beobachtung stützt die These, dass durch die Eisenbeladung keine schädlichen Folgen für die Zellen zu erwarten sind.

Auch in der Elektronenmikroskopie zeigt sich nach langer Eisenexposition über 18h kein Schaden an Zellkern, Organellen oder Zellmembran, ebensowenig bei Inkubation mit Resovisteisen und Transfektionsagenzien.

Insgesamt können größere Beeinträchtigungen für die Vorläuferzellen ausgeschlossen werden.

Untersucht werden sollten in Zukunft die Auswirkungen der Eisenmarkierung auf die Differenzierungsfähigkeit von Stammzellen. Es gibt Arbeiten, die Auswirkungen auf die Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen gefunden haben.<sup>(34)</sup>

#### 4.5. Zelluläre Eisenladung und Nachweis der Zellen mittels Hochfeld-MR

Ein Vorteil dieser Arbeit gegenüber bisherigen Studien, in denen die Zellpellets in Eppendorfcups vermessen wurden, ist die Vermessung der durch die SPIOs erzeugten Artefakte in Agarphantomen. Durch das direkte Einbringen der Pellets in die isodense Agarmatrix ließen sich Störartefakte durch zusätzliche Grenzflächen zwischen Eppendorfbehälter und Matrix vermeiden, wie sie in anderen Studien auftraten.<sup>(20, 43)</sup> Die Vermessung der Artefakte an der Workstation zur Quantifizierung der Eisenmarkierung ließ sich dadurch optimieren. Die Beladung von hämatopoietischen Vorläufern mit zur kernspintomographischen Detektion ausreichenden Mengen an SPIOs ist möglich.

Der zelluläre Eisengehalt hängt von der Eisendosis ab (vgl. Dosiskurven). Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein.<sup>(56)</sup>

Bei hohen Eisendosen von 200 bzw. 400 µg/ml Fe lassen sich schon bei kurzen Inkubationszeiten von 2-4h geringe Zellzahlen von 10 000 kernspintomographisch im Agarphantom nachweisen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Arbeiten.<sup>(43)</sup>

Die aufgenommene Eisenmenge ist zeitabhängig. Die Eisenaufnahme ist zwischen 2-8h Inkubation linear, bei ca. 4h bis 8h Inkubation erreicht sie ein Maximum, danach bleibt sie konstant bzw. sinkt wieder.

Die Abnahme des zellulären Eisengehalts bei höheren Eisendosen ab 8h Inkubationszeit (trotz fortdauernder Inkubation) könnte verschiedene Ursachen haben. Eine Elimination des aufgenommenen Eisens durch aktive Vorgänge wie z. B. Exocytose bei sich schnell teilenden Zellen kommt genauso in Frage<sup>(4)</sup> wie eine Degradation in Endolysosomen. Bei längeren Inkubationszeiten über 4h hinaus ist hingegen keine Größenzunahme der Artefaktdurchmesser im Phantom mehr erkennbar.

Bei geringeren Eisendosen von 50 und 100 µg/ml Fe ist die Zeitabhängigkeit der Eisenbeladung noch deutlicher sichtbar. Hier nimmt die Signalauslöschung im Tomographen bei längerer Inkubation im 24h-Verlauf stetig zu.

Andere Arbeiten kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Markierung von Stammzellen bzw. Stammzellmodellen. Die Inkubation ausschließlich mit SPIOs ohne Transfektionsagenzien zeigte dort bei CD34<sup>+</sup> Zellen keine Eisenaufnahme; unter Verwendung von liposomalen Transfektionsagenzien wurde eine Eisenaufnahme ins Zytoplasma beobachtet.<sup>(21)</sup> Einschränkend muss allerdings auf die dort verwendeten Stammzellen verwiesen werden, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden, was die Vergleichbarkeit einschränkt. Außerdem herrschen nach wie vor einige Unklarheiten über die Aufnahmemechanismen, durch die SPIOs ins Zellinnere gelangen.<sup>(20)</sup>

Zu klären bleibt die Frage welche Rolle das in dieser Studie an der Zelloberfläche nachgewiesene Eisen spielt und welcher Zusammenhang zwischen dem Eisen an der Zelloberfläche und dem nach längeren Inkubationszeiten zellulär aufgenommenen Eisen besteht. Ein sicherer objektiver Nachweis von intrazellulären Eisenpartikeln ist schwierig. Die Elektronenmikroskopie stellt den Goldstandard für den Nachweis von Eisenpartikeln dar. Betrachtet man die elektronenmikroskopischen Bilder nach 4h Inkubation und anschließender weiterer Proliferation über 6 Tage, so kann eine Eisenaufnahme belegt werden (vgl. Abb. 37 u. Abb. 38).

Die Ergebnisse der Auswaschversuche stützen diese Beobachtung, da die mit Eisen und Transfektionsagenzien inkubierten Zellen in der Bildgebung zehn Tage lang nachgewiesen werden konnten, also eine nachhaltige Eisenmarkierung erfolgt sein muss.

In einer Untersuchung zur zellulären Verstoffwechslung von SPIOs in mesenchymalen Stammzellen konnte nach Inkubation über Nacht mit 25 µg Eisen plus Transfektionsagens eine endosomale Anreicherung von Eisen dokumentiert werden.<sup>(4)</sup> Dass in dieser Arbeit der untersuchte Zeitraum von 4h Inkubation der Zellen mit dem Eisen-Transfektionsagens-Gemisch wesentlich kürzer ist, liegt an der Toxizität der eingesetzten Transfektionsagenzien. Der Großteil der vorliegenden Arbeiten kann nach diesen kurzen Inkubationszeiträumen keinen sicheren Nachweis einer intrazellulären Markierung erbringen.<sup>(4, 21, 43)</sup>

Entscheidend für die nachhaltige Eisenmarkierung der Zellen ist nicht die intrazelluläre Anreicherung des Kontrastmittels, sondern die feste Verbindung des Eisens mit den Zellen. Ob sich die Nanopartikel intrazellulär oder an der Oberfläche befinden, ist allerdings für die Zellfunktionalität wie z. B. die Migration der Stammzellen von Bedeutung. Dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die zelluläre Eisenmenge von bis zu 54 pg Fe/Zelle bei Inkubation mit SPIOs allein ist mit anderen Untersuchungen gut vereinbar.<sup>(17, 43, 52)</sup> Bei zusätzlicher Verwendung von Transfektionsagenzien steigt diese sogar auf bis zu

130 pg / Zelle an. Auch hier scheint der Eisengehalt der Zellen im weiteren Verlauf durch längere Inkubationszeiten wieder abzunehmen.<sup>(4, 17)</sup>

Der zelluläre Eisengehalt korreliert innerhalb gewisser Grenzen mit den Kernspinbildern. Die größte Zunahme der Artefaktdurchmesser erfolgt bei zellulären Eisengehalten zwischen 1,5 pg und 15 pg, insgesamt wachsen die Durchmesser bis 90 pg. Noch höhere Eisengehalte führen kaum noch zu größeren Artefaktdurchmessern im MRT (Ceiling-Effekt). Allerdings zeigen die Auswaschversuche, dass höhere Eisenladungen für die Nachverfolgung über längere Zeiträume absolut notwendig sind.

Insgesamt bedingt eine höhere Eisendosis eine erhöhte Signalauslöschung. Eine kurze Inkubation mit hohen Eisendosen ist effektiver als eine längere Inkubation mit niedrigeren Kontrastmitteldosen.

Besonders effektiv bezüglich einer verbesserter Eisenbeladung scheint der Einsatz von Transfektionsagenzien zu sein. Die Markierungseffizienz in zeitlicher Hinsicht stimmt mit anderen Untersuchungen überein, die ähnliche Inkubationszeiten von 2h bis 4h unter Verwendung von Transfektionsagenzien angeben.<sup>(21, 26)</sup> Teilweise wurden in anderen Arbeiten aber auch bedeutend längere Inkubationszeiten zwischen 16-18h gewählt.<sup>(3, 4)</sup>

Eine mögliche Reduktion der Eisendosis um das 8fache durch beide Transfektionsagenzien bei gleichen Artefaktdurchmessern in der Bildgebung machen den Einsatz attraktiv. Formal kann außerdem von einer Reduktion der Inkubationszeit bei Verwendung von Transfektionsagenzien um den Faktor 12 gesprochen werden, da selbst eine 24stündige Inkubation mit 50 µg Eisen nicht annähernd die Artefaktdurchmesser einer Inkubation von lediglich 2h mit Eisen plus Transfektionsagenzien erreicht. Die dadurch erzielte hohe initiale Eisenladung der Zellen ermöglicht den Nachweis der markierten proliferierenden Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg bis zu mindestens zehn Tagen nach Inkubation. Dies ist ein entscheidender Gesichtspunkt im Hinblick auf die mögliche klinische Anwendung, denn eine längere Nachverfolgung der Stammzellen in vivo soll Aufschluss über das Homing- und Proliferationsverhalten der Zellen geben.

Die untersuchten Transfektionsagenzien können eine Alternative zum häufig eingesetzten Poly-L-Lysin (PLL)<sup>(3, 4, 26, 30, 31)</sup> sein. PLL hat den Nachteil, dass es temporär zu einem Anstieg von potentiell DNA-toxischen reaktiven Sauerstoffspezies in den markierten Zellen führt.<sup>(4)</sup> Zwar sind zellschädigende Effekte bei Markierung mittels PLL-SPIOs erst ab Eisenkonzentrationen im Medium von mindestens 250 µg/ml festgestellt worden. Bei den in diesen Studien eingesetzten geringeren Eisenmengen sind allerdings die kernspintomographischen Bilder weniger leistungsfähig hinsichtlich der nachhaltig über längere Zeiträume hin sichtbaren Signalauslöschungsartefakte.<sup>(4, 26)</sup> Ein weiterer Nachteil des PLL besteht in langen Inkubationszeiträumen von bis zu 18h, die zur Markierung erforderlich sind.<sup>(3)</sup>

Interessant ist der beobachtete Inversionseffekt. In sehr geringen Konzentrationen können SPIOs als positives Kontrastmittel wirken. Die Stärke des T<sub>1</sub>-Effekts ist außer von der Eisenkonzentration auch von der gewählten Sequenz abhängig.<sup>(18)</sup>

#### 4.6. Auswaschversuch und Zellmarkierung

Angesichts der klinischen Zielsetzung ist die Nachhaltigkeit der Eisenbeladung und der kernspintomographische Nachweis der proliferierenden Zellen über längere Zeiträume von mindestens zehn Tagen entscheidend. Das Ziel ist eine zu Beginn hohe zelluläre Eisenladung, um bei Proliferation der Stammzellen genügend Reserven an Eisen vorzuhalten.

Am effektivsten gelingt dies durch den Einsatz von Transfektionsagenzien, wodurch hohe Eisenladungen nach kurzer Inkubationszeit erreicht werden.

Die Ergebnisse der zellulären Eisengehalte bei den Auswaschversuchen stützen die kernspintomographischen Ergebnisse. Eine Inkubation mit Transfektionsagenzien ist sinnvoll, um nach sieben Tagen ausreichend zellulär gebundenes Eisen für eine erneute Bildgebung in Reserve zu haben. Für die sichere Darstellung von 50x10<sup>4</sup> Zellen im Tomographen sind an d=7 bei Dosper noch 1,2 pg Eisen/Zelle und für jetPEI 4,6 pg Eisen/Zelle enthalten und ausreichend für die Bildgebung.

Die Auswaschversuche sind gleichzeitig ein Nachweis der effektiven Eisenbeladung der Zellen. Wäre das Eisen nicht fest an die Zellen gebunden, könnte sich kein charakteristischer Verlauf im Signalverhalten der Zellen im Phantom ergeben.

Gleiches gilt für die Kinetik der zellulären Eisengehalte. Diese nehmen entsprechend des Zellteilungsindex ab. Dieser Zusammenhang kann nur bestehen, wenn die Zellen fest mit Eisen markiert wurden. Der Eisengehalt nach vier Teilungen ist  $4^2=16$  mal geringer als der zelluläre Eisengehalt an  $d=0$ . Wäre das Eisen nicht fest mit den Zellen verbunden, müsste der Eisengehalt nach vier Teilungen wesentlich geringer sein als berechnet. Diese Beobachtung wird durch die angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen gestützt. Nach 6 Tagen Proliferation der markierten Zellen in eisenfreiem Medium konnte intrazellulär Eisen nachgewiesen werden. Weshalb das liposomale Agens scheinbar zu mehr intrazellulärem Eisen führt als das Polyetylenimin, obwohl dieses im Tomographen zu größeren Artefakten führt ist ein Widerspruch, der durch die methodischen Begrenzungen der Elektronenmikroskopie als qualitatives Verfahren erklärt werden könnte. Noch eingehendere Untersuchungen der Eisenaufnahmekinetik würden allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen und sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Andere Arbeiten belegen bereits die Nachweisbarkeit eisenmarkierter Zellen im Kernspintomographen über längere Zeiträume<sup>(15)</sup>, allerdings nicht für die schnell proliferierenden hämatopoietische Vorläuferzellen.

Weitere Untersuchungen erscheinen hier sinnvoll, um den Effekt der Proliferation über längere Zeiträume von mindestens 10 Tagen in vivo zu untersuchen.

#### 4.7. Migration und Differenzierung

Von klinischer Bedeutung ist die Frage, ob die hämatopoietischen Stammzellen durch die Eisenmarkierung ihr Migrations- und Differenzierungsverhalten verändern. Erste Untersuchungen zur Differenzierung von eisenmarkierten mesenchymalen und hämatopoietischen Stammzellen kommen zu

unterschiedlichen Ergebnissen. Für die Eisenmarkierung von mesenchymalen und hämatopoietischen Vorläuferzellen fand eine Arbeitsgruppe keine Beeinträchtigung der Differenzierungsfähigkeit<sup>(5, 6)</sup>, während von anderen Arbeitsgruppen die Beeinträchtigung der Chondrogenese aus mesenchymalen Stammzellen beobachtet wurde<sup>(16)</sup>.

In einer Studie gelang die Markierung von CD34<sup>+</sup> Zellen, allerdings mit klinisch nicht zugelassenen SPIOs.<sup>(21)</sup> Außerdem wurden die in-vivo Versuche nur über 48h geführt und somit zwar die prinzipielle Nachweisbarkeit der Migration, nicht aber die für die Transplantation hämatopoietischer Zellen geforderte Nachhaltigkeit der Eisenmarkierung und des Transplantats nachgewiesen.

Andere Untersuchungen konnten langsam proliferierende neuronale Vorläuferzellen in vivo bis zu 42 Tagen nach Applikation nachweisen, allerdings basierend auf anderen Kontrastmitteln,<sup>(15)</sup> weshalb ein Vergleich mit hämatopoietischen Vorläuferzellen wenig aussagekräftig ist.

Untersuchungen zum Homingverhalten von mesenchymalen Stammzellen im Tiermodell bei Nephropathie brachten interessante Ergebnisse. Die Zellen migrierten normal und waren bei 4,7T und 9,4T Feldstärke nachweisbar.<sup>(27)</sup> Einschränkend müssen hier aber die hohen Feldstärken der MR-Bildgebung im Laborscanner erwähnt werden. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf klinische Anwendungen ist daher kaum möglich.

## 5. Fazit

Ziel dieser Arbeit war die Klärung folgender Fragen:

- Lassen sich hämatopoietische Vorläuferzellen effektiv mit dextranummantelten SPIOs beladen?

Die Beladung der Zellen mit SPIOs ist effektiv und insbesondere auch nachhaltig. Damit erfüllen die SPIOs eine Voraussetzung zum möglichen zukünftigen Einsatz im Monitoring zellulärer Therapien.

- Können die markierten Zellen mittels hochauflösender Magnetfeldresonanztomographie bei verschiedenen klinischen Feldstärken nachgewiesen werden?

Es gelang der Nachweis der eisenbeladenen Zellen ab einer Zellzahl von  $10^5$  im klinischen Kernspintomographen.

- Welchen Einfluss auf die Effektivität der Eisenbeladung haben Inkubationszeit und Eisendosis?

Eisendosis und Inkubationszeit beeinflussen die Eisenbeladung der Zellen. Eine hohe Eisendosis führt in kurzer Zeit zu einem hohen zellulären Eisengehalt, längere Inkubationszeiten führen zu einer höheren zellulären Eisenbeladung und entsprechend zu einem stärkeren Signal im Tomographen. Allerdings ist eine höhere Eisendosis effektiver zur Eisenbeladung als längere Inkubationszeiten.

- Lässt sich mit dem Einsatz unterschiedlicher Transfektionsagenzien die Eisenbeladung effizienter gestalten?

Unterschiedliche Transfektionsagenzien erhöhen die Effizienz der Eisenbeladung beträchtlich. Sowohl Inkubationszeit als auch eingesetzte Eisendosis können erheblich reduziert werden. Dabei ist bei gleicher Inkubationszeit und Eisendosis das nichtliposomale Agens jetPEI dem liposomalen Dospo überlegen.

- Besteht ein Zusammenhang zwischen zellulärem Eisengehalt und Signalstärke und wie wirkt sich dieser auf die Bildgebung im Hochfeldtomographen aus?



Ein höherer Eisengehalt resultiert in einem größeren Artefaktdurchmesser. Allerdings kommt es zu einem Ceiling-Effekt ab etwa 15 pg Fe/Zelle. Eine weitere Eisenaufnahme führt dann nur noch zu wenig größeren Artefakten.

- Wie lange lassen sich proliferierende markierte Zellen kernspintomographisch nachweisen?

In Auswaschversuchen ließen sich proliferierende markierte Zellen für mindestens 10 Tage eindeutig im Tomographen nachweisen.

- Hat die Beladung mit Eisen Einfluss auf Vitalität, Proliferationsfähigkeit und Apoptoserate der Stammzellen?

Die Apoptoserate wird auch durch hohe Dosen an SPIOs nicht beeinträchtigt. Vitalität und Proliferation sind ebenfalls nicht durch die Eisenbeladung verändert.

Ob die Zellfunktionalität beeinträchtigt wird (z. B. die Migration) muss Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende in-vitro-Studie befasst sich mit dem Nachweis von eisenmarkierten CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Vorläuferzellen mittels hochauflösender Magnetresonanztomographie.

Ein Modell für humane hämatopoietische Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup> KG-1A-Zellen) wurde mit verschiedenen Dosen und Inkubationszeiten carboxydextranecoateter superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel (Resovist) beladen. Die markierten Zellen wurden im klinischen 3,0T-Scanner dargestellt, der zelluläre Eisengehalt photometrisch bestimmt.

Zusätzlich wurden die Zellen mit Hilfe von Transfektionsagenzien mit Eisen beladen und mit der Beladungseffektivität bei alleiniger Verwendung von SPIOs verglichen. Erwartungsgemäß ergaben sowohl höhere Eisendosen als auch längere Inkubationszeiten größere Artefaktdurchmesser.

Die Inkubation mit Hilfe von Transfektionsagenzien macht die Eisenbeladung der Zellen wesentlich effektiver. Unter zusätzlicher Verwendung eines nichtliposomalen Transfektionsagens (JetPEI) lässt sich - bei gleicher kernspintomographischer Signalauslöschung - die Eisenmenge im Medium um das 8fache und die Inkubationszeit um mindestens das 12fache reduzieren. Auch bei Einsatz eines liposomalen Agens (Dospo) kann das Kontrastmittel um das 8fache und die Inkubationszeit um mindestens das 12fache reduziert werden.

Außerdem wurde nach toxischen Auswirkungen des eingesetzten superparamagnetischen Kernspinkontrastmittels gesucht. Bei den Kinetiken mit Resovisteisen allein traten signifikante Abweichungen von der Kontrollgruppe an einem einzelnen Tag auf, allerdings waren Vitalität und Proliferation in keinem Fall deutlich verändert. Diese signifikanten Werte können als systematische Fehler interpretiert werden.

Bei den Kinetiken mit Resovisteisen und zusätzlich Transfektionsagenzien traten isolierte signifikante Abweichungen auf.

Außerdem wurde das Apoptoseverhalten der eisenmarkierten Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hier wurde keine Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt.

Elektronenmikroskopische Bilder zeigten bei längeren Inkubationszeiten ohne Transfektionsagenzien intrazelluläre Eisenpartikel. Bei kürzeren Inkubationszeiten ohne Transfektionsagenzien befand sich das Eisen vor allem an der Zelloberfläche. Bei Inkubation mit Transfektionsagenzien war Eisen an der Zelloberfläche vorhanden und wurde bei Auswaschversuchen auch intrazellulär aufgenommen.

Eisenbeladene, proliferierende Zellen konnten bis zu zehn Tage nach Inkubation nachgewiesen werden. Sechs Tage nach Inkubation konnte intrazelluläres Eisen elektronenmikroskopisch in proliferierenden Zellen nachgewiesen werden.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich die Eisenbeladung von hämatopoietischen Vorläuferzellen optimieren und auf die Bedürfnisse der in-vivo-Bildgebung abstimmen. Kenntnisse der erforderlichen Inkubationszeiten,

Eisendosen und eingesetzten Transfektionsagenzien sowie des Verhältnisses zwischen Eisengehalt und Artefaktgrößen im kernsintomographischen Bild können zukünftige in-vivo-Studien erleichtern.

Im Tiermodell muss geklärt werden, ob die zelluläre Eisenmarkierung intrazellulär oder an der Zelloberfläche erfolgt. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Migration der Zellen die Eisenmarkierung beeinflusst bzw. ob umgekehrt die Eisenmarkierung auf die Migration und die Differenzierung der Stammzellen Einfluss nimmt.

Das Ziel ist die regelrechte Markierung, die Transplantation und der kernspintomographische Nachweis von hämatopoietischen Stammzellen im Tiermodell. Dies kann in der Zukunft MR-Untersuchungen bei autologen und allogenen Knochenmarktransplantation und bei Stammzelltherapien nach Myokardinfarkt ermöglichen. Außerdem könnten maligne Tumoren, die Migration von neuronalen Vorläuferzellen im ZNS und genetisch modifizierte Stammzellen dargestellt werden.

## 7. Literatur

1. Akers W, Lesage F, Holten D, Achilefu S.  
In vivo resolution of multiexponential decays of multiple near-infrared molecular probes by fluorescence lifetime-gated whole-body time-resolved diffuse optical imaging.  
Mol Imaging 2007; 6:237-246.
2. Alfke H, Stoppler H, Nocken F, Heverhagen JT, Kleb B, Czubayko F, Klose KJ.  
In vitro MR imaging of regulated gene expression.  
Radiology 2003; 228:488-492.
3. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA.  
Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques.  
Transplantation 2003; 76:1123-1130.
4. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA.  
Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging.  
Radiology 2003; 229:838-846.
5. Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA.  
Feride-protamine sulfate labeling does not alter differentiation of mesenchymal stem cells.  
Blood 2004; 104:3412-3413.
6. Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, Khakoo AY, Fellowes V, Read EJ, Frank JA.  
Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells.  
NMR Biomed 2005:553-559.
7. Atri M.  
New technologies and directed agents for applications of cancer imaging.  
J Clin Oncol 2006; 24:3299-3308.
8. Blasberg RG, Tjuvajev JG.  
Molecular-genetic imaging: current and future perspectives.  
J Clin Invest 2003; 111:1620-1629.

9. Blocklet D, Toungouz M, Berkenboom G, Lambermont M, Unger P, Preumont N, Stoupel E, Egrise D, Degaute JP, Goldman M, Goldman S. Myocardial homing of nonmobilized peripheral-blood CD34+ cells after intracoronary injection. *Stem Cells* 2006; 24:333-336.
10. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:7297-7301.
11. Bowen CV, Zhang X, Saab G, Gareau PJ, Rutt BK. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells. *Magn Reson Med* 2002; 48:52-61.
12. Bremer C, Weissleder R. In Vivo Imaging of Gene Expression: MR and Optical Technologies. *Acad Radiol* 2001:15-23.
13. Brenner W, Aicher A, Eckey T, Massoudi S, Zuhayra M, Koehl U, Heeschen C, Kampen WU, Zeiher AM, Dimmeler S, Henze E. <sup>111</sup>In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med* 2004; 45:512-518.
14. Brutkiewicz S, Mendonca M, Stantz K, Comerford K, Bigsby R, Hutchins G, Goebel M, Harrington M. The expression level of luciferase within tumour cells can alter tumour growth upon in vivo bioluminescence imaging. *Luminescence* 2007; 22:221-228.
15. Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19:1141-1147.
16. Bulte JW, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides. *Blood* 2004; 104:3410-3412; author reply 3412-3413.

17. Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, Herynek V, Jordan EK, Duncan ID, Frank JA.  
Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination.  
Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:15256-15261.
18. Chambon C, Clement O, Le Blanche A, Schouman-Claeys E, Fria G.  
Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence.  
Magn Reson Imaging 1993; 11:509-519.
19. Crissman HA, Mullaney PF, Steinkamp JA.  
Methods and applications of flow cytometry systems for analysis and sorting of mammalian cells.  
Methods Cell Biol 1975:179-246.
20. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, Settles M, Piontek G, Metz S, Rosenbrock H, Keller U, Heinzmann U, Rummeny EJ, Schlegel J, Link TM.  
Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents.  
Radiology 2003; 228:760-767.
21. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Piontek G, Metz S, Brauer R, Debus G, Corot C, Schlegel J, Link TM, Peschel C, Rummeny EJ, Oostendorp RA.  
Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment.  
Radiology 2005; 234:197-205.
22. Dass CR.  
Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection.  
J Mol Med 2004; 82:579-591.
23. Doyle TC, Burns SM, Contag CH.  
In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection.  
Cell Microbiol 2004; 6:303-317.
24. Du W, Wang Y, Luo Q, Liu BF.  
Optical molecular imaging for systems biology: from molecule to organism.  
Anal Bioanal Chem 2006; 386:444-457.
25. Ferrucci JT, Stark DD.  
Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first 5 years.  
AJR Am J Roentgenol 1990; 155:943-950.

26. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zywicke HA, Jordan EK, Lewis BK, Bryant LH, Jr., Bulte JW.  
Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents.  
*Radiology* 2003; 228:480-487.
27. Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, Deminiere C, Xue R, Delmas Y, Combe C, Moonen CT, Grenier N, Bulte JW.  
MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy.  
*Radiology* 2006; 238:200-210.
28. Högemann D, Basilion JP, Weissleder R.  
Molekulare Bildgebung in der Magnetresonanztomographie und der Nuklearmedizin.  
*Radiologe* 2001:116-120.
29. Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP.  
Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood.  
*J Cell Mol Med* 2005; 9:37-50.
30. Ju S, Teng G, Zhang Y, Ma M, Chen F, Ni Y.  
In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood.  
*Magn Reson Imaging* 2006; 24:611-617.
31. Kalish H, Arbab AS, Miller BR, Lewis BK, Zywicke HA, Bulte JW, Bryant LH, Jr., Frank JA.  
Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition.  
*Magn Reson Med* 2003; 50:275-282.
32. Koeffler HP, Billing R, Lusic AJ, Sparkes R, Golde DW.  
An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1).  
*Blood* 1980; 56:265-273.
33. Kohler N, Sun C, Wang J, Zhang M.  
Methotrexate-Modified Superparamagnetic Nanoparticles and Their Intracellular Uptake into Human Cancer Cells.  
*Langmuir* 2005:8858-8864.
34. Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW.  
Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis.  
*NMR Biomed* 2004; 17:513-517.

35. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JW.  
In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction.  
Circulation 2003; 107:2290-2293.
36. Lauterbur PC.  
Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973.  
Clin Orthop Relat Res 1989:3-6.
37. Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R.  
Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells.  
Nat Biotechnol 2000; 18:410-414.
38. Louie AY, Huber MM, Ahrens ET, Rothbacher U, Moats R, Jacobs RE, Fraser SE, Meade TJ.  
In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging.  
Nat Biotechnol 2000; 18:321-325.
39. Luciani A, Olivier JC, Clement O, Siauve N, Brillet PY, Bessoud B, Gazeau F, Uchegbu IF, Kahn E, Frija G, Cuenod CA.  
Glucose-receptor MR imaging of tumors: study in mice with PEGylated paramagnetic niosomes.  
Radiology 2004; 231:135-142.
40. Mahmood U.  
Near infrared optical applications in molecular imaging. Earlier, more accurate assessment of disease presence, disease course, and efficacy of disease treatment.  
IEEE Eng Med Biol Mag 2004; 23:58-66.
41. Mansfield P.  
Multi-planar image formation using NMR spin echoes.  
J Phys C 1977:10:L55.
42. Mansfield P, Grannell PK.  
NMR Diffraction in solids?  
J Phys C Solid State Phys 1973:L422.
43. Matuszewski L, Persigehl T, Wall A, Schwindt W, Tombach B, Fobker M, Poremba C, Ebert W, Heindel W, Bremer C.  
Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection, particle size, and surface coating on labeling efficiency.  
Radiology 2005; 235:155-161.



44. Montet X, Montet-Abou K, Reynolds F, Weissleder R, Josephson L. Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells. *Neoplasia* 2006; 8:214-222.
45. Persigehl T, Heindel W, Bremer C. MR and optical approaches to molecular imaging. *Abdom Imaging* 2005; 30:342-354.
46. Reimer P, Balzer T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol* 2003; 13:1266-1276.
47. Riviere C, Boudghene FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, Allaire E, Michel JB, Letourneur D, Deux JF. Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology* 2005; 235:959-967.
48. Roche. jetPEI Transfection reagent data sheet.
49. Saini S, Stark DD, Hahn PF, Wittenberg J, Brady TJ, Ferrucci JT, Jr. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* 1987; 162:211-216.
50. Saokar A, Braschi M, Harisinghani M. Lymphotropic nanoparticle enhanced MR imaging (LNMRI) for lymph node imaging. *Abdom Imaging* 2006; 31:660-667.
51. Schick F. Grundlagen der Magnetresonanztomographie. *Radiologe* 2005:69-88.
52. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med* 2006; 55:242-249.
53. Shen T, Weissleder R, Papisov M, Bogdanov A, Jr., Brady TJ. Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med* 1993; 29:599-604.

54. Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A.  
An Orthotopic Model of Pancreatic Somatostatin Receptor (SSTR)-Positive Tumors Allows Bimodal Imaging Studies Using 3T MRI and Animal PET-Based Molecular Imaging of SSTR Expression. *Neuroendocrinology* 2007.
55. Sun R, Dittrich J, Le-Huu M, Mueller MM, Bedke J, Kartenbeck J, Lehmann WD, Krueger R, Bock M, Huss R, Seliger C, Grone HJ, Misselwitz B, Semmler W, Kiessling F.  
Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison. *Invest Radiol* 2005; 40:504-513.
56. Verdijk P, Scheenen TW, Lesterhuis WJ, Gambarota G, Veltien AA, Walczak P, Scharenborg NM, Bulte JW, Punt CJ, Heerschap A, Figdor CG, de Vries IJ.  
Sensitivity of magnetic resonance imaging of dendritic cells for in vivo tracking of cellular cancer vaccines. *Int J Cancer* 2007; 120:978-984.
57. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP.  
Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 2001; 11:2319-2331.
58. Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A.  
Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997:258-263.
59. Wu JC, Chen IY, Sundaresan G, Min JJ, De A, Qiao JH, Fishbein MC, Gambhir SS.  
Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography. *Circulation* 2003; 108:1302-1305.
60. Zaidi H, Mawlawi O, Orton CG. Point/counterpoint. Simultaneous PET/MR will replace PET/CT as the molecular multimodality imaging platform of choice. *Med Phys* 2007; 34:1525-1528.

Ich danke Herrn Professor Dr. C. D. Claussen für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu promovieren.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. J. Wiskirchen für die gute Betreuung während der Arbeit.

Besonders hervorheben möchte ich Herrn Dr. R. Kehlbach und Herrn Dr. R. Bantleon, die mich stets mit außergewöhnlichem Engagement bei der praktischen Umsetzung unterstützt und mir viele wertvolle Tipps gegeben haben.

Danken möchte ich außerdem Herrn Professor Dr. H. Wolburg für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.