

**Kernspintomografische in vivo Bildgebung disseminierter
Tumorzellen im aviären embryonalen Xenograftmodell**

Fabian Meyersieck

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Schrappe)
Im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
An der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Kernspintomografische in vivo Bildgebung disseminierter
Tumorzellen im aviären embryonalen Xenograftmodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Fabian Meyersieck

aus Ostercappeln

Kiel 2016

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Denis Martin Schewe
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Claus-Christian Glüer
Klinik für Diagnostische Radiologie / MOINCC
Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung.....	4
1.1.	Grundidee der Arbeit	4
1.2.	Modellsysteme für Metastasierungsvorgänge verschiedener Tumorentitäten.....	5
1.2.1.	Klinische Bedeutung von Metastasierung	5
1.2.2.	Metastasierungsmechanismen bei soliden Tumoren	5
1.2.3.	Disseminierte Tumorzellen und residuale Tumorerkrankung bei Leukämien – Parallelen zwischen zwei Konzepten	6
1.3.	Experimentelles Vorgehen im Überblick	7
1.4.	Das aviäre embryonale Xenograftmodell als innovativer Modellorganismus	9
1.4.1.	Eigenschaften des aviären embryonalen Modells.....	9
1.4.2.	Die Chorioallantoismembran des aviären Modells – eine wachstumsperrmissive Umgebung für solide Tumorzellen	10
1.5.	Kernspintomografische Detektion eisenmarkierter Tumorzellen.....	12
1.5.1.	Theoretische Grundlagen der Magnetresonanztomografie	12
1.5.2.	Anwendung von Eisenoxidpartikeln als Kontrastmittel.....	13
1.5.3.	Markierung von Tumorzellen mit Eisenoxidpartikeln.....	13
1.5.4.	In ovo Bildung von markierten Tumorzellen	14
2.	Material, Methoden und Versuchstiere	15
2.1.	Materialien	15
2.1.1.	Chemikalien, Reagenzien und Analysekits	15
2.1.2.	Verwendete Eisenoxidpartikel.....	16
2.1.3.	Medien, Lösungen, Puffer	16
2.1.4.	Färbekits	17
2.1.5.	Apparative Einrichtungen.....	18
2.1.6.	Verbrauchs- und Hilfsmaterial.....	18
2.1.7.	Software.....	19
2.1.8.	Zelllinien.....	20
2.1.9.	Versuchstiere	20
2.2.	Methoden	20
2.2.1.	Zellkultur	20
2.2.2.	Zellquantifizierung und Zellvitalität	20
2.2.3.	Markierung der T-HEp3 eGFP-Zelllinie mit Eisenoxidpartikeln.....	21

2.2.4.	Markierung der 697-Zelllinie mit Eisenoxidpartikeln.....	21
2.2.5.	Elektroporation zur Steigerung der zellulären Eisenaufnahme.....	21
2.2.6.	Poly-L-Lysin zur Steigerung der zellulären Eisenaufnahme.....	22
2.2.7.	Nachweis von intrazellulären Eisenoxidpartikeln mittels Berliner-Blau-Färbung und Bestimmung der Markierungseffektivität	22
2.2.8.	Überführen von eisenmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen in einen Agaroseblock	24
2.2.9.	Messbedingungen für in vitro Magnetresonanztomografie	24
2.2.10.	Übersicht der kernspintomografischen in vivo Versuche	26
2.2.11.	Inkubation der Versuchstiere	26
2.2.12.	Inokulation der aviären Embryos mit T-HEp3 eGFP-Zellen	26
2.2.13.	Ruhigstellung der Versuchstiere	29
2.2.14.	Messbedingungen für in vivo Magnetresonanztomografie.....	29
2.2.15.	Euthanasie und Organentnahme	32
2.2.16.	Aufarbeitung und Analyse des Primärtumors.....	32
2.2.17.	Aufarbeitung, Analyse und Kultivierung des Knochenmarks.....	32
2.2.18.	Aufarbeitung und Analyse der Leber.....	32
2.2.19.	Aufarbeitung, Analyse und Kultivierung der Lunge	33
2.2.20.	Fluoreszenzmikroskopie	33
2.2.21.	Histologische Färbungen	33
3.	Ergebnisse.....	35
3.1.	In vitro Markierung einer soliden Tumorzelllinie mit Eisenoxidpartikeln	35
3.1.1.	Abhängigkeit der Markierungseffektivität von der verwendeten Partikelart.....	35
3.1.2.	Abhängigkeit der Markierungseffektivität von der Partikelkonzentration im Zeitverlauf	37
3.1.3.	Einfluss der Partikel auf die Proliferationsrate und Viabilität.....	38
3.2.	In vitro Markierung einer Suspensionszelllinie mit Eisenoxidpartikeln	41
3.2.1.	Abhängigkeit der Markierungseffektivität von der Partikelart.....	41
3.2.2.	Elektroporation und Poly-L-Lysin-Inkubation zur Steigerung der Markierungseffektivität	43
3.3.	In vitro Magnetresonanztomografie einer partikelmarkierten Tumorzelllinie.....	46
3.3.1.	Abhängigkeit der Signalintensität von der Partikelart.....	46
3.3.2.	Abhängigkeit der Signalintensität von der Höhe der zellulären Markierungseffektivität	48

3.4.	In vivo Magnetresonanztomografie von partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen.....	51
3.4.1.	Testgruppen.....	51
3.4.2.	Primärtumor – in vivo Magnetresonanztomografie	52
3.4.3.	Primärtumor – Korrelation von in vivo Magnetresonanztomografie und post mortem Analyse	56
3.4.4.	Knochenmark – in vivo Magnetresonanztomografie	61
3.4.5.	Knochenmark – Korrelation von in vivo Magnetresonanztomografie und post mortem Analyse	63
3.4.6.	Leber – Korrelation von in vivo Magnetresonanztomografie und post mortem Analyse	68
3.4.7.	Lunge – Korrelation von in vivo Magnetresonanztomografie und post mortem Analyse	73
4.	Diskussion.....	78
4.1.	Markierung von Tumorzellen mit Eisenoxidpartikeln	78
4.1.1.	Beurteilung der angewandten Quantifizierungsmethode für die Markierungseffektivität und mögliche Alternativen	79
4.1.2.	Mögliche Ursachen für die geringe Markierungseffektivität bei Suspensionszellen und Optimierungsmöglichkeiten	80
4.2.	In vitro Magnetresonanztomografie von partikelmarkierten Tumorzellen.....	81
4.2.1.	Sensitivität der Messmethode im Kontext der Tumorzelldisseminierung	81
4.3.	In vivo Detektion einer Tumorzellmetastasierung mittels Magnetresonanztomografie	82
4.3.1.	Inokulation von partikelmarkierten Tumorzellen in aviäre Organismen – Modifizierung einer etablierten Methodik	82
4.3.2.	Ein neues Modell für longitudinales Monitoring der Tumorzellmetastasierung.....	83
4.3.3.	Abhängigkeit der Ergebnisse vom Kompartiment der Disseminierung und mögliche Optimierungsansätze	84
5.	Zusammenfassung	86
6.	Abkürzungsverzeichnis	87
7.	Literaturverzeichnis.....	89
8.	Danksagung	99
9.	Lebenslauf	100

1. Einleitung

1.1. Grundidee der Arbeit

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlung durch Wilhelm Conrad Röntgen im Jahr 1895 haben bildgebende Verfahren die Medizin in vielen Bereichen revolutioniert. Ein Meilenstein der diagnostischen Radiologie war die Etablierung der Schnittbildverfahren Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT). Zwei entscheidende Vorteile der MRT sind die detaillierte Darstellung der Weichteile des Körpers und die fehlende Belastung des Patienten durch ionisierende Strahlung. So wird dieses Schnittbildverfahren in der Onkologie bei soliden Tumorentitäten in Diagnostik, Staging und Therapiekontrolle eingesetzt. Bei hämatologischen Erkrankungen beschränkt sich der Einsatz der MRT auf spezielle Fragestellungen. So kann die Kernspintomografie Hinweise auf eine Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Akuter Lymphoblastischer Leukämie (ALL) geben. Auch in der Krebsforschung wird die Kernspintomografie zunehmend genutzt, um maligne Prozesse, wie zum Beispiel Tumorproliferation, Angiogenese und Metastasierung, *in vivo* darzustellen (Serres et al., 2014). Diese Arbeit legt die methodischen Grundlagen für eine experimentelle Anwendung der Kernspintomografie zur Detektion einer Tumorzellmetastasierung im aviären Modell. Die Methodik wurde an Hühnerembryos (*Gallus gallus domesticus*) etabliert, die mit einer Tumorzelllinie inokuliert wurden. Ziel war die Visualisierung dieser Tumorzellen mittels MRT in verschiedenen Umgebungen des aviären Organismus. Um eine höhere Empfindlichkeit der Kernspintomografie bei der Detektion der Tumorzellen zu erreichen, wurden diese zunächst mit einem MRT-Kontrastmittel markiert. Die Markierung erfolgte mit Eisenoxidpartikeln, die von der Tumorzelllinie effektiv in den Intrazellularraum aufgenommen wurden. In einem nächsten Schritt wurden die markierten Tumorzellen in den aviären Modellorganismus eingebracht. Dabei erfolgte die Inokulation über die Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos am Entwicklungstag E10. Es handelt sich bei der Chorioallantoismembran um einen am Entwicklungstag E10 bis E12 vollständig entwickelten arteriovenösen Plexus, auf dem lokal inokulierte solide Tumorzellen anwachsen können (Adam et al., 2009; Deryugina und Quigley, 2008; Schewe und Aguirre-Ghiso, 2008; Ossowski und Reich, 1983). Am Entwicklungstag E17 wurden von den inokulierten Hühnerembryos in Zusammenarbeit mit dem *Molecular Imaging North Competence Center* (MOIN-CC) Aufnahmen im Kleintier-MRT angefertigt. Die Ergebnisse der MRT-Messungen wurden mit *post mortem* Analysen korreliert.

1.2. Modellsysteme für Metastasierungsvorgänge verschiedener Tumorentitäten

1.2.1. Klinische Bedeutung von Metastasierung

In den vergangenen Jahren konnten bei der Behandlung von Krebserkrankungen große Fortschritte erzielt werden. Bei häufigen Malignitäten, wie dem Mammakarzinom oder dem Kolonkarzinom, ist es gelungen, die Überlebenszeiten der Patienten durch verbesserte Früherkennung und wirksamere Therapieverfahren zu steigern. So erhöhte sich die 5-Jahres-Überlebensrate von Patientinnen mit Brustkrebs im Vereinigten Königreich von 74,8 % im Zeitraum 1995 bis 1999 auf 81,6 % in den Jahren 2005 bis 2007 (Coleman et al., 2011). Trotz dieser Fortschritte ist die Prognose bei den meisten soliden Tumoren im metastasierten Stadium nach wie vor schlecht. Für die bei weitem meisten krebsbedingten Todesfälle können Metastasierungsvorgänge verantwortlich gemacht werden (Bragado et al., 2012). Daher gehören die Mechanismen der Tumorzellmetastasierung zu den entscheidenden Feldern des aktuellen onkologischen Forschungsinteresses. Ein wichtiger Schritt ist dabei die Entwicklung von Modellsystemen, die den Prozess der Tumorzellmetastasierung abbilden. Letztendlich ist das Ziel aller Bemühungen, in den Prozess der Metastasierung einzugreifen, um diese effektiv zu verhindern.

1.2.2. Metastasierungsmechanismen bei soliden Tumoren

Laut TNM-Klassifikation gibt es drei Formen von Metastasen (Wittekind et al., 2005). Es werden lokale Metastasen, regionäre Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen unterschieden. Fernmetastasen entstehen in der Regel durch hämatogene Metastasierung, die im Folgenden erläutert werden soll. Der hämatogene Metastasierungsprozess ähnelt einer Kaskade, die aus vielen Einzelschritten besteht. Zunächst kommt es zur Tumorzellproliferation im Primärtumor. Anschließend folgt die Verteilung von Tumorzellen im Organismus über den Blutkreislauf. Intravasation bezeichnet dabei den Übertritt von Tumorzellen in ein Blutgefäß. Es folgt die Extravasation, die die Penetration von Tumorzellen durch die Gefäßwand in ein Zielorgan der hämatogenen Metastasierung beschreibt. Der erläuterte Prozess ist im Allgemeinen auf alle soliden Tumorentitäten übertragbar. Zum besseren Verständnis von Metastasierungsprozessen wurde der Begriff *isolierte Tumorzellen/isolated tumor cells* (ITCs) von soliden Metastasen abgegrenzt. Während Mikrometastasen aus

mehreren tausend Tumorzellen mit maximal 0,2 cm Durchmesser bestehen, handelt es sich bei ITCs um Einzelzellen, beziehungsweise Zellcluster aus wenigen Zellen (Hermanek et al., 1999). Weiterhin zeichnen sich ITCs durch eine sehr geringe Proliferationsrate, keinen Blutgefäßkontakt sowie eine nicht stattfindende Extravasation von Tumorzellen aus (Hermanek et al., 1999). Weiterhin lassen sich ITCs in *zirkulierende Tumorzellen/circulating tumor cells* (CTCs) im Blutkreislauf und in *disseminierte Tumorzellen/disseminated tumor cells* (DTCs) in Organen einteilen. Auch wenn das biologische Verhalten von ITCs weitgehend unbekannt ist, liegt die Vermutung nahe, dass ITCs bei Metastasierungsprozessen eine bedeutende Rolle spielen (Bragado et al., 2012; Sosa et al., 2014). Es ist zudem zu vermuten, dass ITCs durch ihre kaum messbare Proliferationsrate für klassische Zytostatika unzureichend erreichbar sind (Bragado et al., 2012; Sosa et al., 2014). Letztendlich stellt sich die Frage nach Detektionsmethoden für DTCs beziehungsweise CTCs. Die Herausforderung bei CTCs liegt unter anderem darin, einige wenige Tumorzellen unter Millionen von gesunden Blutzellen nachzuweisen, was eine hohe Sensitivität erfordert. Bei aktuell genutzten Nachweismethoden für CTCs wird daher zunächst eine Anreicherung von Tumorzellen durchgeführt. Dies kann durch die Eliminierung von Erythrozyten und Leukozyten aus dem Untersuchungsmaterial erfolgen (Joosse und Pantel, 2013). Die Detektion der CTCs erfolgt meist durch den Expressionsnachweis von Proteinen oder mRNA der tumorzellspezifischen Zytokeratine. So lassen sich CTCs durch den Nachweis diverser zirkulierender Tumorzellmarker (zum Beispiel: EpCAM, MUC1, ERBB2) mittels real-time PCR detektieren (Joosse et al., 2015).

1.2.3. Disseminierte Tumorzellen und residuale Tumorerkrankung bei Leukämien – Parallelen zwischen zwei Konzepten

Bei hämatologischen Neoplasien wie der ALL im Kindesalter ist bekannt, dass auch ein geringfügiger Nachweis von Leukämiezellen die Prognose der Erkrankung entscheidend beeinflusst (Teachey und Hunger, 2013). Mittels Durchflusszytometrie und PCR-Analysen lässt sich beispielsweise eine Leukämiezelle in mehr als zehntausend normalen Zellen nachweisen. Für derart geringe Leukämiezellkonzentrationen weit unter der zytologischen Nachweisgrenze wurde der Begriff der *minimalen Resterkrankung/minimal residual disease* (MRD) eingeführt. Ein persistierender Nachweis von MRD erhöht bei der ALL des Kindesalters signifikant die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit und verschlechtert somit die Prognose (Campana, 2012). Die regelmäßige Bestimmung der MRD ist somit fester Bestandteil

aktueller ALL-Therapieschemata, wobei das Therapieansprechen die Patientenprognose bestimmt. Sowohl das DTC-Konzept als auch das MRD-Modell lassen den Schluss zu, dass Tumorzellkonzentrationen nahe der Nachweisgrenze die Metastasierungs- beziehungsweise Rezidiv-Wahrscheinlichkeit entscheidend beeinflussen und somit prognosebestimmend sein können. Weiterhin vereint beide Modelle eine geringe Proliferationsrate der malignen Zellen (Hermanek et al., 1999; Hauwel und Matthes, 2014), die möglicherweise ursächlich für Chemotherapie-Resistenzen ist.

1.3. Experimentelles Vorgehen im Überblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines *in vivo* MRT-Bildgebungsverfahren, das zum Verständnis der beschriebenen Metastasierungsmechanismen beitragen kann. Allerdings sind geringe Tumorzellkonzentrationen, wie sie beispielsweise bei den beschriebenen Modellen ITC und MRD erwartet werden, in der klassischen MRT-Bildgebung nicht erfassbar. Somit war es sinnvoll, die Tumorzellen zunächst mit Eisenoxidpartikeln zu markieren, um die Empfindlichkeit der Detektion zu erhöhen. In einem ersten Schritt sollte die Markierung einer Tumorzelllinie mit Eisenoxidpartikeln etabliert werden. Anschließend erfolgte die *in vitro* Bildgebung dieser eisenmarkierten Zellen im MRT. Im Vordergrund des Interesses stand dabei die Frage, inwiefern sich eisenmarkierte Zellen mittels Kernspintomografie von unmarkierten Zellen abgrenzen lassen. Zuletzt wurden die eisenmarkierten Tumorzellen in ein wachstumsperrmissives *in ovo* Modell eingebracht. Dabei sollte die *in vivo* Detektion von eisenmarkierten Tumorzellen mittels MRT etabliert werden. Die Ergebnisse aus der *in vivo* MRT-Bildgebung wurden schließlich mit *post mortem* Analysen verifiziert (Abbildung 1-1).

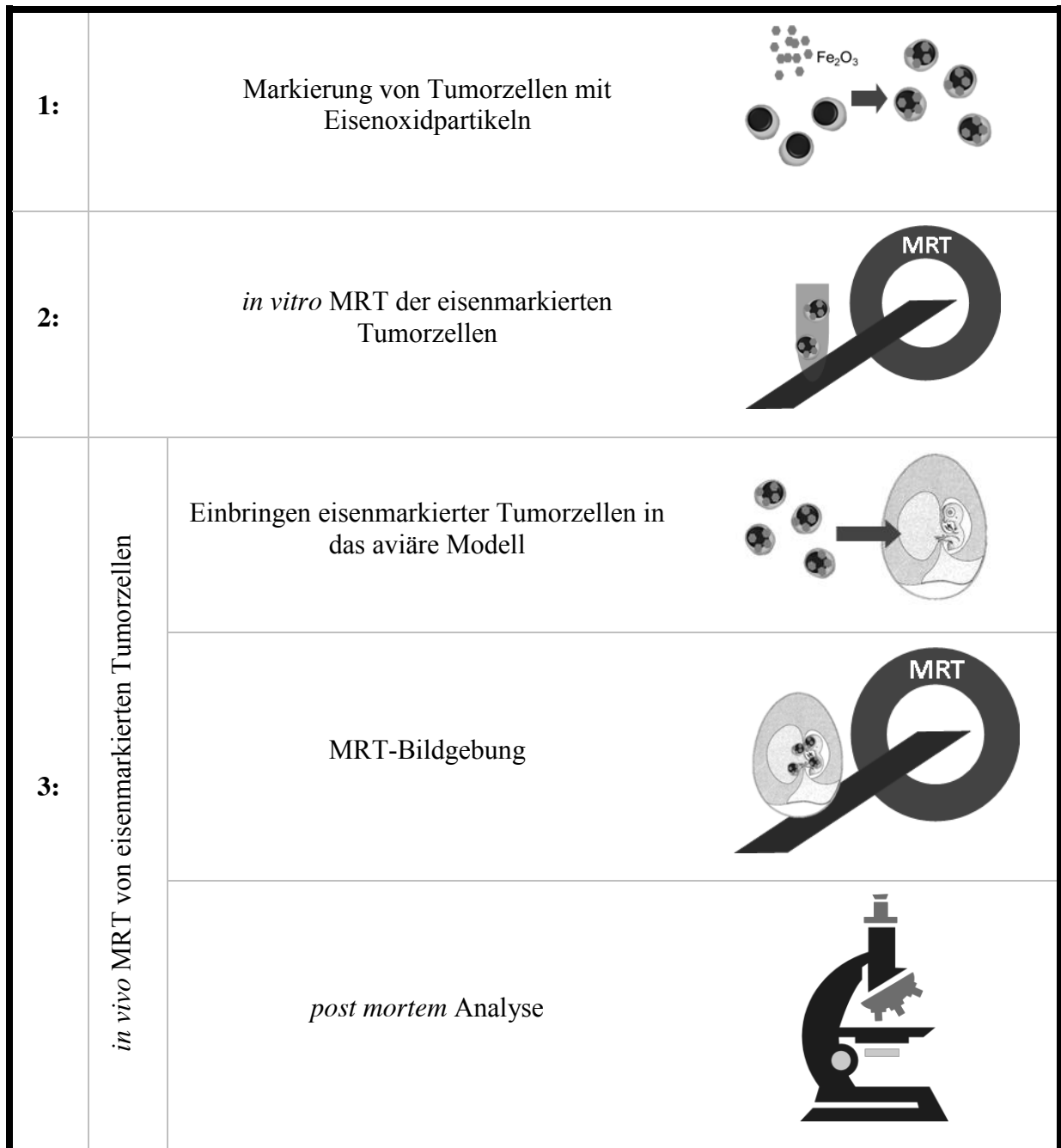


Abbildung 1-1: **Grafische Übersicht des experimentellen Vorgehens in der vorliegenden Arbeit.** Fe_2O_3 : Eisen(III)-oxid.

1.4. Das aviäre embryonale Xenograftmodell als innovativer Modellorganismus

1.4.1. Eigenschaften des aviären embryonalen Modells

Zur Etablierung der *in ovo* MRT-Bildgebung wurden befruchtete Eier der Spezies *Gallus gallus domesticus* (Haushuhn) verwendet. Bisher wurden aviäre embryonale Modelle vorwiegend in der Entwicklungsbiologie verwendet. Des Weiteren wurden B-Zellen und T-Zellen als Lymphozyten-Subpopulationen in aviären Embryonen entdeckt (Stern, 2005). Die Entwicklung von *Gallus gallus domesticus* bis zum Schlüpfen dauert in der Regel 21 Tage. Die Chorioallantoismembran entsteht im Zeitraum von Entwicklungstag E4 und E5 durch den Zusammenschluss von Chorion und Allantois (Melkonian et al., 2002). Am Entwicklungstag E12 umhüllt die CAM den gesamten Embryo und ist voll funktionsfähig (Abbildung 1-2). Der aviäre Embryo ist permissiv für ein Xenografting humaner Tumoren, weil das Immunsystem noch nicht voll funktionsfähig ist. So fehlen zum Zeitpunkt eines Xenograftings am Entwicklungstag E10 funktionale B- und T-Lymphozyten sowie diverse Immunglobulin-Subklassen (Janse und Jeurissen, 1991). Das relativ kurze Engraftment-Zeitfenster zwischen der Inokulation am Tag E10 und dem Schlüpfen des Embryos am Tag E21 bei *Gallus gallus domesticus* kann durch die Nutzung der Gattung *Meleagris gallopavo* (Truthuhn) auf bis zu zwölf Tage gesteigert werden (Farnoushi et al., 2011; Grinberg et al., 2009). Weiterhin ist anzumerken, dass aviäre Embryonen einfach zu beschaffen sind und deren Anwendung durch tierschutzrechtliche Vorgaben bisher kaum eingeschränkt ist.

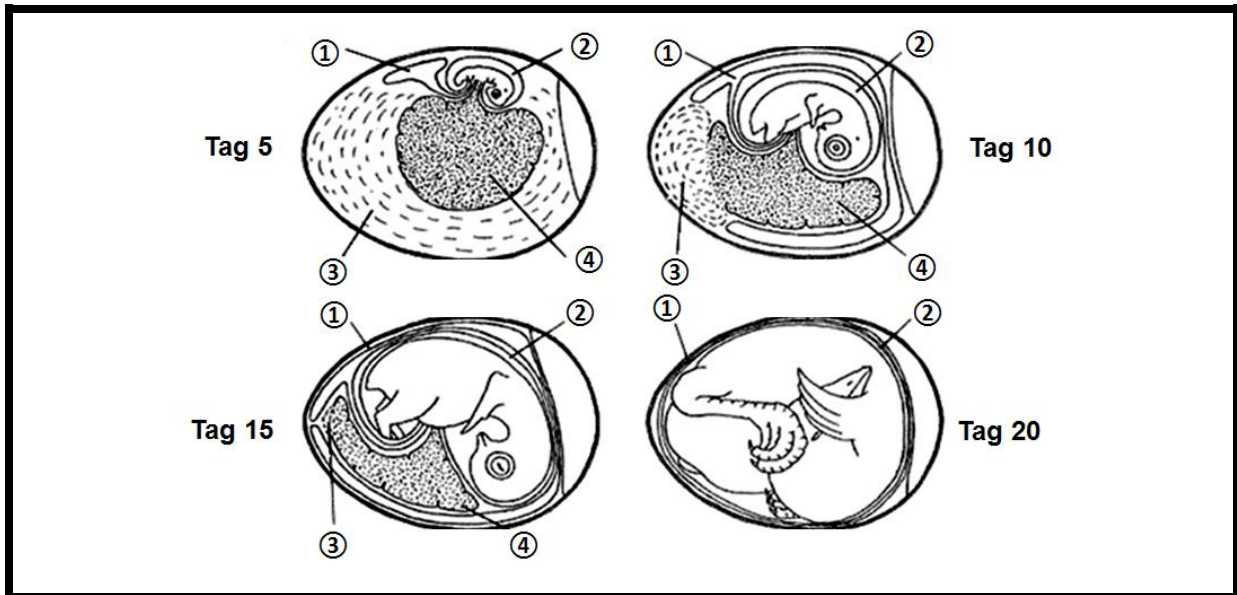


Abbildung 1-2: **Ausgewählte Entwicklungsstadien eines Hühnerembryos und seiner Fruchthüllen.** (1) Allantois, (2) Amnion (innen) und Chorion (außen), (3) Eiweißreiches Nährgewebe, (4) Dottersack, Grafik modifiziert nach Romanoff (1939).

1.4.2. Die Chorioallantoismembran des aviären Modells – eine wachstumspermissive Umgebung für solide Tumorzellen

Die unter der Eischale liegende CAM dient dem Hühnerembryo hauptsächlich als Gasaustauschfläche und ist somit vergleichbar mit der Plazenta von Säugetieren (Rizzo und DeFouw, 1993). Sie spielt zudem in den letzten Entwicklungstagen des Embryos eine entscheidende Rolle bei der Kalziumversorgung. Die CAM sorgt für den Transport von Kalzium aus der Eischale in den Embryo, das hauptsächlich zur Ossifikation benötigt wird (Gabielli und Accili, 2010). Nach lokaler Tumorzell-Inokulation auf die CAM kommt es zur Bildung eines soliden Tumors, wobei der Tumor Anschluss an das verzweigte Gefäßsystem der CAM erhält (Abbildung 1-3). Im zeitlichen Verlauf ist über das Gefäßsystem eine hämatogene Metastasierung in verschiedene Organe (unter anderem Leber, Lunge und Knochenmark) des ungeschlüpften Kükens möglich (Deryugina und Quigley, 2008). Zusammengefasst handelt es sich beim CAM-Modell um eine etablierte Methode zur Untersuchung diverser tumorassoziierter Prozesse. Dazu zählen das lokale Wachstum, die Invasion in umliegendes Gewebe, Intravasation, Disseminierung und Metastasierung. Auch das *in ovo* Ansprechen neuer therapeutischer Verfahren kann mithilfe des CAM-Modells erprobt werden (Deryugina und Quigley, 2008).

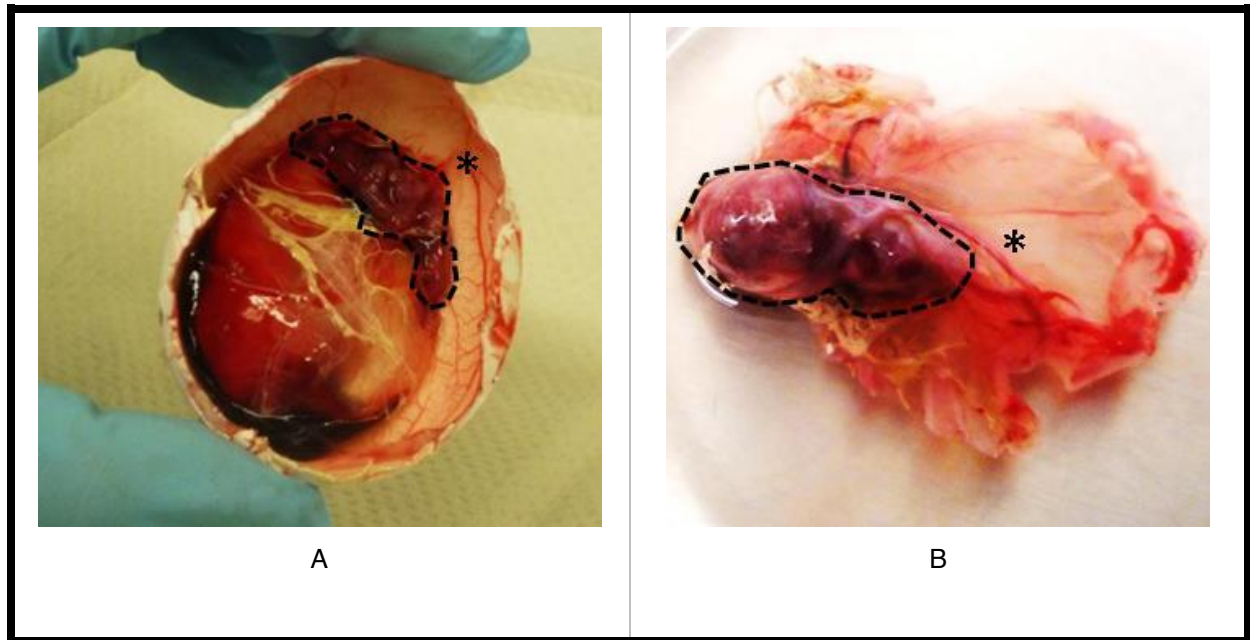


Abbildung 1-3: **Sicht auf die Chorioallantoismembran (CAM) eines Hühnerembryos mit gewachsenem Tumor am Entwicklungstag E22 nach lokaler Tumorzell-Inokulation. (A) Bei geöffneter Eischale. (B) Herauspräparierte CAM mit Tumor. (A, B) Die Umrisse des gewachsenen Tumors sind durch die Strichellinie hervorgehoben. (*) Gefäßversorgung des Tumors durch die CAM.**

1.5. Kernspintomografische Detektion eisenmarkierter Tumorzellen

1.5.1. Theoretische Grundlagen der Magnetresonanztomografie

Bei der MRT handelt es sich um ein Schnittbildverfahren, das die magnetischen Eigenschaften von Wasserstoffatomen nutzt, aus denen jeder Organismus zum Großteil besteht. Die physikalische Grundlage der Methode ist, dass Wasserstoffkerne eine als Kernspin bezeichnete Rotationsbewegung vollziehen und dadurch einen magnetischen Dipol darstellen. Im Inneren des MRT-Gerätes wird zunächst ein starkes statisches Magnetfeld aufgebaut, in dem sich die Wasserstoffkerne des zu messenden Objektes in ihrer Rotationsachse ausrichten, wodurch sich ein Gleichgewichtszustand einstellt. Durch das Einschalten eines zusätzlichen hochfrequenten magnetischen Wechselfeldes wird die Ausrichtung der Wasserstoffkerne aus dem Gleichgewicht gebracht. Nach Abschalten des Wechselfeldes kommt es erneut zur Einstellung des Gleichgewichtszustandes. Die Zeit bis zum Erreichen dieses Zustandes wird als Relaxationszeit bezeichnet. Da verschiedene Körpergewebe charakteristische Relaxationszeiten aufweisen, kann durch deren Messung und anschließende computergestützte Datenverarbeitung eine Gewebedarstellung im Schnittbild erzeugt werden. Für die Messung der Relaxationszeiten gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, woraus sich die Unterscheidung in T1- und T2-Messesequenzen ergibt.

Sowohl für die *in vitro* als auch für die *in vivo* Messungen wurden zwei Messesequenzen verwendet. Zunächst wurde die BLADE-Sequenz angewandt, um hochauflösende Schnittbilder zu generieren. Diese Messesequenz ist speziell darauf ausgelegt, bei unruhigen Patienten Bewegungsartefakte zu minimieren und so aussagekräftiges Bildmaterial zu liefern. In einer Studie der pädiatrischen Radiologie konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der BLADE-Sequenz die Sedierung von Kindern im Schädel-MRT immer häufiger überflüssig macht (Heyer et al., 2012). Vor dem Hintergrund, dass auch bei den *in vivo* MRT-Messungen der Hühnerembryos trotz Sedierung Bewegungsartefakte auftreten können, wurde die BLADE-Sequenz in dieser Arbeit zur anatomischen Darstellung der Versuchstiere verwendet. Mit der T2*-Sequenz wurde des Weiteren eine Messesequenz genutzt, die eine hohe Eisensensitivität aufweist. So kann diese auf der T2-Relaxation basierende Messesequenz beispielweise zur Darstellung von malignen Lebertumoren mithilfe von Eisenoxidpartikeln als Kontrastmittel angewandt werden (Ishiyama et al., 2008). Da die Detektion von Eisenoxidpartikeln auch in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund des Interesses stand, wurde die T2*-Sequenz sowohl bei den *in vitro* als auch *in vivo* Messungen angewandt.

1.5.2. Anwendung von Eisenoxidpartikeln als Kontrastmittel

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden superparamagnetische Eisenoxidpartikel als MRT-Kontrastmittel angewandt. Superparamagnetismus beschreibt die speziellen Eigenschaften ferromagnetischer Teilchen, die diese unterhalb einer bestimmten Größe aufweisen. Die Partikel bestehen aus einem eisenhaltigen Kern (Fe_3O_4 oder $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) und haben eine hydrophile Ummantelung aus Polysacchariden, synthetischen Polymeren oder anderen funktionellen Gruppen (Mahmoudi et al., 2011). Durch ihre superparamagnetischen Eigenschaften führen Eisenoxidpartikel zu einer Verkürzung der T2-Relaxationszeit (Bulte et al., 1999). Des Weiteren weisen eisenhaltige Nanopartikel durch ihre Ummantelung in der Regel eine hohe Biokompatibilität auf (Mahmoudi et al., 2011).

Aufgrund der geschilderten Vorteile finden eisenhaltige Kontrastmittel heute in verschiedenen klinischen Bereichen eine Anwendung. Neben der bereits geschilderten Darstellung von Leberläsionen kann nach oraler Kontrastmittelgabe auch eine KM-Darstellung des Gastrointestinaltrakts erfolgen (Mahmoudi et al., 2011). Eine experimentelle Anwendung von eisenhaltigen Partikeln als Kontrastmittel ist die Detektion von Makrophagen sowohl im gesunden Gewebe (z.B. in Lymphknoten) als auch bei verschiedenen Entzündungsprozessen wie Multipler Sklerose, Transplantatabstoßung und Rheumatoider Arthritis (Vellinga et al., 2009; Bonnemain, 2008). Um eine spezifische Bindung von Eisenoxidpartikeln mit bestimmten Tumorentitäten zu ermöglichen, können die Partikel mit verschiedenen Liganden versehen werden. Die Verbindung zwischen Ligand und tumorspezifischem Zielmolekül führt im Idealfall zur selektiven Eisenmarkierung eines Tumors. Eine experimentelle Anwendung findet dieses Verfahren beim Mammakarzinom über den HER-2/neu Rezeptor (Lee et al., 2007) und beim Kolonkarzinom über den Tumorfaktor CEA (Tiefenauer et al., 1996).

1.5.3. Markierung von Tumorzellen mit Eisenoxidpartikeln

Über die Zellmembran können Eisenoxidpartikel passiv in den Intrazellularraum aufgenommen werden. Die zelluläre Partikelaufnahme wurde bereits an mesenchymalen Stammzellen erprobt. So konnte an aus humanem Nabelschnurblut gewonnenen Stammzellen (UC-MS-C-Zelllinie) gezeigt werden, dass eine effektive *in vitro* Markierung durch Inkubation mit Eisenoxidpartikeln möglich ist (Sibov et al., 2014). Dabei wurden die intrazellulären Eisenoxidpartikel in den UC-MS-C-Zellen durch die Berliner-Blau-Eisenfärbung nachgewiesen. Weiterhin konnten die markierten UC-MS-C-Zellen mit einem 3-Tesla-MRT-Gerät *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Sibov et al.,

2014). Die Viabilität und Proliferationsrate der markierten Zellen zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe unveränderte Werte (Sibov et al., 2014). In mehreren weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine effektive magnetische Markierung von diversen Zelllinien durch Eisenoxidpartikel möglich ist (Bridot et al., 2013; El Haj et al., 2012; Markides et al., 2013).

Entscheidend für eine zuverlässige Zellmarkierung ist die Frage, welche Partikeleigenschaften Einfluss auf die zelluläre Partikelaufnahme haben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Partikelgröße und die Partikelbeschichtung wichtige Einflussfaktoren für die Zellmarkierung darstellen (Taylor et al., 2014). Weiterhin erscheint es naheliegend, dass eine ausreichende Partikelkonzentration und Inkubationszeit für die zelluläre Partikelaufnahme wichtig sind. Es ist zudem denkbar, dass eine Inkubationsoptimierung durch Elektroporation oder Ko-Kulturbedingungen die Partikelaufnahme verbessern können. Zu den zuletzt genannten Parametern sind allerdings nur bedingt belastbare vorpublizierte Daten vorhanden.

1.5.4. In ovo Bildgebung von markierten Tumorzellen

Eine *in vivo* MRT-Bildgebung von partikelmarkierten Tumorzellen konnte am Mausmodell bereits etabliert werden. Dazu wurde die Prostatakarzinom-Zelllinie CT1258 genutzt, wobei das Tumorwachstum über 28 Tage longitudinal untersucht wurde (Sterenczak et al., 2012). Eine *in ovo* MRT-Bildgebung von partikelmarkierten Tumorzellen ist dagegen bisher nicht in der Literatur beschrieben. Die vorliegende Studie hat nicht nur das Ziel, ein mögliches Primärtumorwachstum zu detektieren. Vielmehr soll zusätzlich untersucht werden, inwiefern eine Streuung von partikelmarkierten Tumorzellen in andere Organe kernspintomografisch nachweisbar ist. Entscheidend in diesem Zusammenhang ist die Frage, ab welcher Konzentration von partikelmarkierten Zellen eine *in ovo* Detektion mittels MRT möglich ist. Zusätzlich ergibt sich aus der zwangsläufig etwa einstündigen MRT-Messdauer der Bedarf nach einer suffizienten Sedierung, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine kurzfristige Kühlung zur Sedierung weder zu einem Verlust an Vitalität noch zu Entwicklungsverzögerungen von Hühnerembryonen führt (Bain et al., 2007; Xu et al., 2012). Die Anwendung von Narkotika ist demgegenüber mit einer signifikant erhöhten Mortalität der Versuchstiere verbunden (Heidrich et al., 2011). Die Etablierung eines speziell an das *in ovo* Modell angepassten Kühlprotokolls gehört somit zu den Zielen der vorliegenden Arbeit.

2. Material, Methoden und Versuchstiere

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Reagenzien und Analysekits

Die verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und sind zusammen mit Reagenzien und Analysekits in Tabelle 2.1. angegeben.

Chemikalien, Reagenzien und Analysekits	Bezugsquelle
Accutase [®]	Biowest, Nuaillé (Frankreich)
Agarose	FMC Bio Products, Philadelphia (USA)
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Collagenase	GE Healthcare (PAA), Little Chalfont (GB)
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Färbekit <i>Hematognost Fe</i> [®]	Merck KGaA, Darmstadt
FCS	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Formaldehydlösung (4 %)	Merck Millipore, Billerica (USA)
Kaliumbicarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Milli-Q [®] Wasser	Merck Millipore, Billerica (USA)
PBS (1x, mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺) → PBS (+/+)	Biochrom, Berlin
PBS (1x, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺) → PBS (-/-)	Biochrom, Berlin
PLL (10 mg/ml)	BioPAL, Worcester (USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco, Carlsbad (USA)
Zellkulturmedium RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Zellkulturmedium DMEM	Biochrom, Berlin

Tabelle 2-1: Chemikalien, Reagenzien, Analysekits.

2.1.2. Verwendete Eisenoxidpartikel

Die verwendeten Eisenoxidpartikel sind in der Tabelle 2-2 aufgeführt.

Abkürzung*:	Größe: (in nm)	Beschichtung:	Hersteller:
BNF	100	Dextran	micromod Partikeltechnologie, Rostock
BNF-NH ₂	100	Aminogruppen (-NH ₂)	micromod Partikeltechnologie, Rostock
EST	700-1300	Polystyren	Merck KGaA, Darmstadt
MIRB	35	Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B	BioPAL, Worcester (USA)
NAN	100	Dextran	micromod Partikeltechnologie, Rostock
NAN-NH ₂	100	Aminogruppen (-NH ₂)	micromod Partikeltechnologie, Rostock

Tabelle 2-2: **Übersicht der verwendeten Eisenoxidpartikel.** *Die in der Tabelle eingeführten Abkürzungen werden im Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 6) erläutert.

2.1.3. Medien, Lösungen, Puffer

Die verwendeten Medien, Lösungen und Puffer sind der Tabelle 2-3 zu entnehmen.

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
Collagenase/BSA Lösung	PBS 1x (+/+) mit: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,15 % Collagenase ▪ 2,5 % BSA
PBS (-/-) 1x (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 140 mM NaCl ▪ 2,7 mM KCl ▪ 8,1 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O ▪ 1,5 mM KH₂PO₄
PBS (+/+) 1x (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Wie PBS (-/-) mit: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,5 mM MgCl₂ x 6H₂O ▪ 0,45 mM CaCl₂ x 2H₂O

RBC Lysepuffer	Milli-Q® Wasser mit: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,82 % Ammoniumchlorid ▪ 0,1 % Kaliumbicarbonat ▪ 0,04 % EDTA-Lösung (0,5 M)
Trypsin-EDTA (1x)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 500 mg/l Trypsin ▪ 200 mg/l EDTA 4Na 2H₂O ▪ 10 mg/l Phenol Red
Zellkulturmedium 1 (für T-HEp3 eGFP-Zelllinie)	DMEM (high glucose) Fertigmedium mit: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 10 % FCS ▪ 100 U/ml Penicillin ▪ 100 µg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium 2 (für 697-Zelllinie)	RPMI1640 Fertigmedium mit: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 20 % FCS ▪ 100 U/ml Penicillin ▪ 100 µg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium 3 (für MSC-Zelllinie)	RPMI1640 Fertigmedium mit: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 10 % FCS ▪ 100 U/ml Penicillin ▪ 1µM Hydrocortison ▪ 100 µg/ml Streptomycin

Tabelle 2-3: Medien, Lösungen, Puffer.

2.1.4. Färbekits

Das in der vorliegenden Arbeit für die histologischen Färbungen verwendete Kit ist in der Tabelle 2-4 aufgeführt.

Färbekit	Zusammensetzung
Färbekit für Berliner-Blau-Färbung: Hematognost Fe [®]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 4,73 % Kaliumhexacyanoferrat(II) <i>Reagenz 1</i> ▪ 5 % HCl <i>Reagenz 2</i> ▪ Kernechtrotlösung <i>Reagenz 3</i>

Tabelle 2-4: Zusammensetzung des verwendeten Färbekits.

2.1.5. Apparative Einrichtungen

Die verwendeten apparativen Einrichtungen sind der Tabelle 2-5 zu entnehmen.

Apparat	Bezugsquelle
Brutschrank für Hühnerembryos	Hemel Brutgeräte, Verl
Brutschrank für Zellkultur INC 153	Memmert, Schwabach
Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
Cytospin [®] 3	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dremel	Robert Bosch, Gerlingen
Elektroporator EPI 2500	Dr. L. Fischer, Heidelberg
FACS-Gerät BD Accuri [®] C6	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop ECLIPSE TS100	Nikon Instruments, Düsseldorf
Kleintier MRT ClinScan A 7 T	Bruker, Billerica (USA)
Laborabzug Scanlaf Mars Safety Class 2	Labogene, Lyngø (Dänemark)
Lichtmikroskop Axioskop 40	Zeiss, Oberkochen
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Schierlampe	Hemel Brutgeräte, Verl
Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Wasserbad	Thermo Fisher scientific, Waltham (USA)

Tabelle 2-5: **Apparative Einrichtungen.**

2.1.6. Verbrauchs- und Hilfsmaterial

In dieser Arbeit genutztes Verbrauchs- und Hilfsmaterial ist in der Tabelle 2-6 aufgelistet.

Verbrauchs- und Hilfsmaterial	Bezugsquelle
Filtriercarton 25 mm x 75 mm	Th. Geyer, Renningen
Klebestreifen	Tesa, Hamburg
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Pipetten 10 µl - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl - 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	Feather, Osaka (Japan)
Spritzen 15 ml	BD, Franklin Lakes (USA)
Zellkultur Platten (adhärente Zellen)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Platten (Suspensionszellen)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (adhärente Zellen)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (Suspensionszellen)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb Nylon 70 µm	BD, Franklin Lakes (USA)

Tabelle 2-6: **Verbrauchs- und Hilfsmaterial.**

2.1.7. Software

In der vorliegenden Arbeit wurde die in der Tabelle 2-7 aufgelistete Software verwendet.

Software	Bezugsquelle
Citavi 4	Swiss Academic Software, Wädenswill (Schweiz)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla (USA)

Tabelle 2-7: **Software.**

2.1.8. Zelllinien

In dieser Studie wurde mit den in der Tabelle 2-8 spezifizierten Zelllinien gearbeitet.

Zelllinie	Spezifität	Bezugsquelle/Zitat	Zellkulturmedium
697	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen	Dr. M. Cooper, Alabama, USA	RPMI1640 + 20 % FCS
MSC	Immortalisierte mesenchymale Stammzellen	(Mihara et al., 2003)	RPMI1640 + 10 % FCS
T-HEp3 eGFP	Kopf-Hals-Karzinom Zellen, fluoreszierend durch Transfektion mit eGFP-Gen (enhanced Green Fluorescent Protein)	(Ossowski und Reich, 1983); (Bragado et al., 2013)	DMEM + 10 % FCS

Tabelle 2-8: **Verwendete Tumorzelllinien.**

2.1.9. Versuchstiere

Der verwendete Modellorganismus ist in der Tabelle 2-9 aufgeführt.

Versuchstier	Spezifität	Bezugsquelle
SPF-Hühner-Eier	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Charles River Laboratories, Wilmington (USA)

Tabelle 2-9: **Versuchstiere.**

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Kultivierung der T-HEp3 eGFP-Zelllinie erfolgte nach dem Protokoll von Aguirre-Ghiso et al., 2003. Die 697-Zelllinie wurde nach den Empfehlungen der *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* kultiviert. Die Kulturbedingungen für die MSC-Zelllinie wurden dem Protokoll von Mihara et al., 2003 entnommen.

2.2.2. Zellquantifizierung und Zellvitalität

Die Quantifizierung der Zellen erfolgte in einer Neubauerzählkammer mit dem Kammerfaktor ($\times 10^4$). Zur Vitalitätsbestimmung wurde die Färbung mit Trypanblau gewählt.

2.2.3. Markierung der T-HEp3 eGFP-Zelllinie mit Eisenoxidpartikeln

Die Partikelmarkierung der T-HEp3 eGFP-Zelllinie erfolgte in 6-well-Zellkulturplatten. Dabei wurden Eisenkonzentrationen zwischen 0,03 mg/ml und 0,3 mg/ml erprobt. Im ersten Schritt wurden die Eisenoxidpartikel zu den abgelösten Zellen hinzugefügt. Anschließend wurde die Zell-Partikel-Suspension gründlich resuspendiert, um ein Verklumpen der Partikel zu verhindern. Zuletzt wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml mit entsprechend zugesetzter Partikelmenge ausgesät.

Die Partikelinkubationszeit im Brutschrank unter Zellkulturbedingungen betrug 24 h. Anschließend wurden die T-HEp3 eGFP-Zellen mit Trypsin-EDTA (1x) für 5 min abgelöst. Um extrazelluläre, also nicht von den Zellen aufgenommene, Eisenoxidpartikel aus der Zellsuspension zu entfernen, wurden die Zellen anschließend zweifach mit PBS (-/-) gewaschen. Nach Entfernen der extrazellulären Partikel konnten die markierten Zellen unter den im Kapitel 2.2.1. beschriebenen Bedingungen erneut in Kultur genommen werden.

2.2.4. Markierung der 697-Zelllinie mit Eisenoxidpartikeln

Die Zellmarkierung der 697-Zelllinie erfolgte in 6-well Zellkulturplatten. Zunächst wurde eine Zellsuspension im Zellkulturmedium angefertigt. Für die Zellmarkierung wurde eine Eisenkonzentration der Partikel von 0,3 mg/ml genutzt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in partikelsupplementiertem Medium ausgesät. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zur Markierung der T-HEp3 eGFP-Zelllinie (vgl. Kapitel 2.2.3.), wobei der Schritt der Zellablösung mit Trypsin-EDTA (1x) entfiel.

2.2.5. Elektroporation zur Steigerung der zellulären Eisenaufnahme

Die Elektroporation wurde an der 697-Zelllinie mit den Partikelsorten EST, NAN und BNF erprobt. Zunächst wurden die Eisenoxidpartikel, wie im Kapitel 2.2.4. beschrieben, zur Zellsuspension gegeben. Die im *well* vorgelegte Zell-Partikel-Suspension wurde in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und diese anschließend in den Elektroporator eingesetzt. Der verwendete Elektroporator erzeugte eine Rechteckspannung mit einer Frequenz von 50 Hz. Es wurden Elektroporationszeiten zwischen 1 ms und 40 ms sowie Elektroporationsspannungen zwischen 50 und 250 V erprobt. Nach der Elektroporation wurde die Zell-Partikel-Suspension gründlich resuspendiert und wie im vorherigen Kapitel (vgl. Kapitel 2.2.4.) beschrieben in einer 6-well-Zellkulturplatte für 24 h inkubiert.

2.2.6. Poly-L-Lysin zur Steigerung der zellulären Eisenaufnahme

Die Nutzung von Poly-L-Lysin (PLL) bei der Partikelinkubation von 697-Zellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll *Protocol for Cell Labeling with CL-30Q02-6 Treated with Polylysine* des Partikelherstellers BioPAL, Worcester (USA). Dazu wurden BNF-Partikel vor der 24-stündigen Inkubation mit PLL in unterschiedlichen Konzentrationen vorbehandelt. Dabei wurden die Partikel mit bis zu 30 µl/ml PLL Lösung präinkubiert. Nach einer Stunde Präinkubationszeit bei 37 °C wurden die Partikel der Zellsuspension hinzugefügt. Im nächsten Schritt erfolgte die Aussaat der Zell-Partikel-Suspension bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml und einer Partikeleisenkonzentration von 0,3 mg/ml. Die anschließende Inkubation für 24 h und das weitere Vorgehen erfolgte wie im Kapitel 2.2.4. beschrieben.

2.2.7. Nachweis von intrazellulären Eisenoxidpartikeln mittels Berliner-Blau-Färbung und Bestimmung der Markierungseffektivität

Von den markierten Zellen wurden zunächst zytologische Präparate angefertigt. Dabei wurden jeweils $0,05 \times 10^6$ (T-HEp3 eGFP) bzw. $0,2 \times 10^6$ (697) Zellen in je 200 µl PBS (-/-) für 3 min bei 800 rpm auf einen Objektträger zentrifugiert (Zytozentrifugationsverfahren). Für die Färbung wurde das *Hematognost Fe[®]* Färbekit verwendet, wobei das Färbeprotokoll des Herstellers wie im Folgenden beschrieben abgeändert wurde. Die fixierten Objektträger wurden zunächst für 30 min in *Reagenz 1+2* und für 8 min in *Reagenz 3* des *Hematognost Fe[®]* Färbekits gefärbt. Die Berliner-Blau-Färbung ist eine sensitive Methode zum Eisennachweis und somit gut zur histologischen Anfärbung von Eisenoxidpartikeln geeignet (Sykova und Jendelova, 2007). Es werden sowohl intra- als auch extrazelluläre Eisenoxidpartikel blau angefärbt. Die Gegenfärbung mit *Reagenz 3* lässt das Zytoplasma und die Zellkerne in einem Rot-Ton erscheinen (Abbildung 2-1).

Um die Effektivität der Eisenmarkierung objektiv beurteilen zu können, wurde eine Quantifizierungsmethode angewendet. Von den erstellten zytologischen Präparaten wurden je drei lichtmikroskopische Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung an zufälliger Position im zytologischen Präparat angefertigt. In den Aufnahmen wurden anschließend alle markierten und nicht markierten Zellen ausgezählt und der Anteil an markierten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt. Schließlich wurde der Mittelwert aus drei gezählten Aufnahmen gebildet. Nicht beurteilbare Zellen (zum Beispiel am Bildrand oder bei nicht eindeutiger Partikelbeladung) wurden nicht in die Berechnung einbezogen (Abbildung 2-1, B).

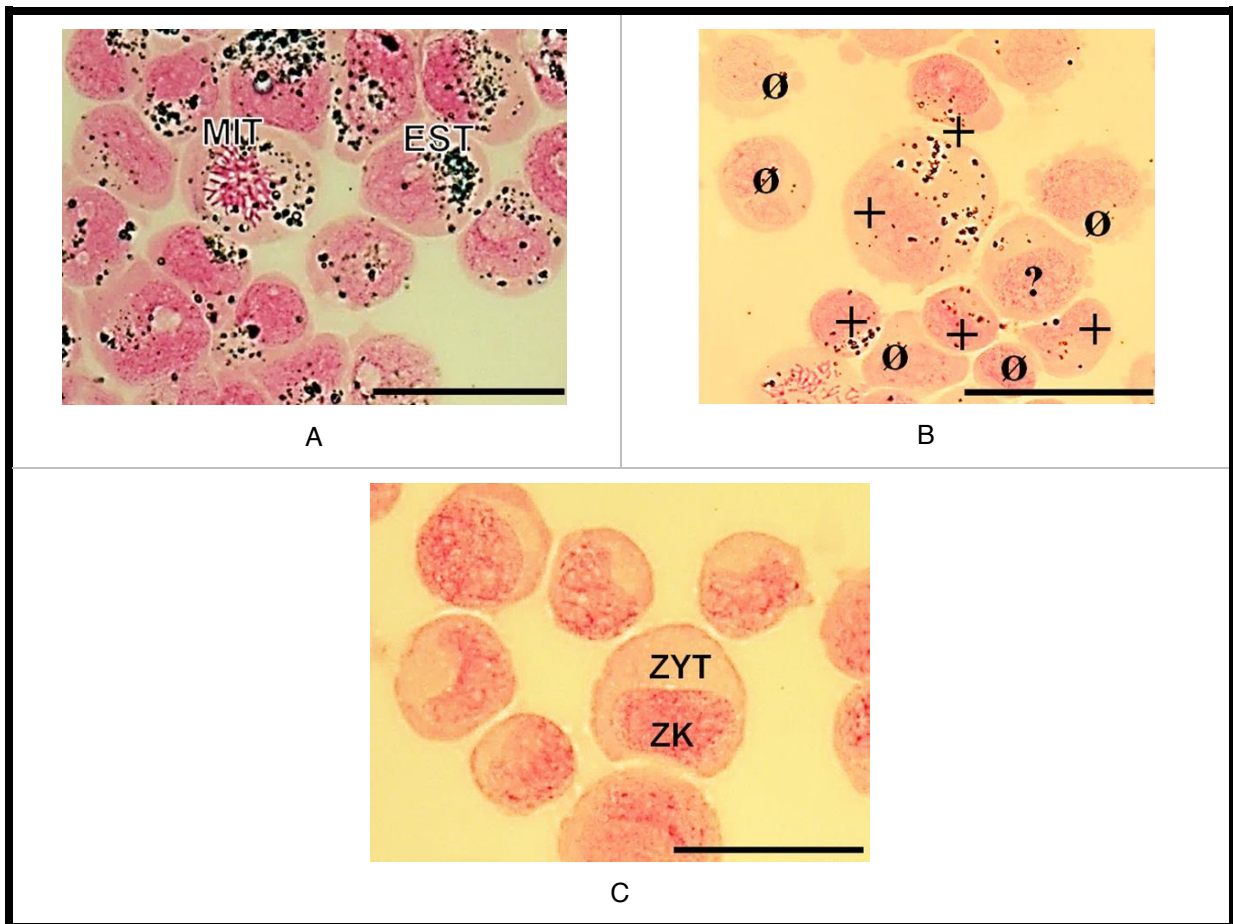


Abbildung 2-1: **Zytologische Präparate von T-HEp3 eGFP-Zellen mit und ohne Markierung durch EST-Eisenoxidpartikel.** **(A):** Inkubation mit EST-Partikeln, Zeit nach Inkubation: 0 Tage, Anteil an partikelmarkierten Zellen: 100 %, EST: intrazelluläre Eisenoxidpartikel, MIT: Mitose einer T-HEp3 eGFP-Zelle **(B):** Inkubation mit EST-Partikeln, Zeit nach Inkubation: 6 Tage, Anteil an partikelmarkierten Zellen: 50 %, +: Zellen mit intrazellulären Partikeln, Ø: Zellen ohne intrazelluläre Partikel, ?: nicht beurteilbare Partikelbeladung, **(C):** Kontrolle, keine Partikelinkubation, Anteil an partikelmarkierten Zellen: 0 %, ZK: Zellkern, ZYT: Zytoplasma, **(A,B):** Inkubationszeit: 24 h, Partikelkonzentration: 0,3 mg/ml, **(A-C):** Berliner-Blau-Färbung, Länge des Maßstabalkens: 50 μm .

2.2.8. Überführen von eisenmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen in einen Agaroseblock

Die Markierung der T-HEp3 eGFP-Zelllinie für das nachfolgend beschriebene Vorgehen erfolgte mit EST-Partikeln bei einer Eisenkonzentration von 0,2 mg/ml. Diese Eisenkonzentration zeigte bei der *in vitro* Zellmarkierung das beste Verhältnis aus hoher Markierungseffektivität über mehrere Tage bei gleichzeitig geringem Einfluss auf die Zellproliferation und -viabilität (vgl. Kapitel 3.1.2. und 3.1.3.). Die markierten Zellen wurden in 1 % Agarose in 2 ml-Reaktionsgefäßen resuspendiert. Daraufhin wurden die Agaroseblöcke für maximal 24 h bei 4 °C gelagert und anschließend im Kleintier-MRT gemessen.

2.2.9. Messbedingungen für *in vitro* Magnetresonanztomografie

Die Bildgebung erfolgte mit einem 7 Tesla MRT-Gerät (ClinScan™) des Herstellers Bruker Biospin. Dabei wurde für die Zellproben ein *birdcage* Resonator zur Anregung und eine 4-Kanal-phasengesteuerte Spule zur Signaldetektion genutzt. Die Aufnahme der T2*-gewichteten 3D-GRE-Bilder erfolgte bei einer Pulswiederholzeit (TR) von 150 ms und Echozeiten (TE) zwischen 2,45 ms und 27,94 ms. Die Echozeit bezeichnet die Dauer zwischen dem abgegebenen elektromagnetischen Puls und dem Messzeitpunkt des MRT-Signals. Der Winkel zwischen dem magnetischen Vektor des hochfrequenten Wechselfeldes und des statischen Magnetfeldes (flip angle) betrug 8 °. Es wurden 56 Schichten in der Koronarebene und 40 Schichten in der Transversalebene aufgenommen.

Um die T2*-Relaxationszeit der Zellprobe quantitativ zu bestimmen, wurde ein Messbereich/region of interest (ROI) in der Zellprobe manuell ausgewählt (Abbildung 2-2, A, B). In diesem Messbereich wurde für jedes Bildpixel die T2*-Relaxationszeit nach der Formel $S=A \cdot e^{-TE/T2^*} + c$ (S: Signalintensität; A: Magnetisierungskonstante; TE: Echozeit; c: Konstante – Grundrauschen des Signals) bestimmt. Wie in Abbildung 2-2, C dargestellt, wurde die Intensität des MRT-Signals bei verschiedenen Echozeiten aufgezeichnet, wobei sich die daraus resultierende T2*-Relaxationszeit als exponentiell abfallende Kurve zeigt. Letztendlich wurde der Mittelwert der T2*-Relaxationszeiten aller Bildpixel des Messbereiches bestimmt.

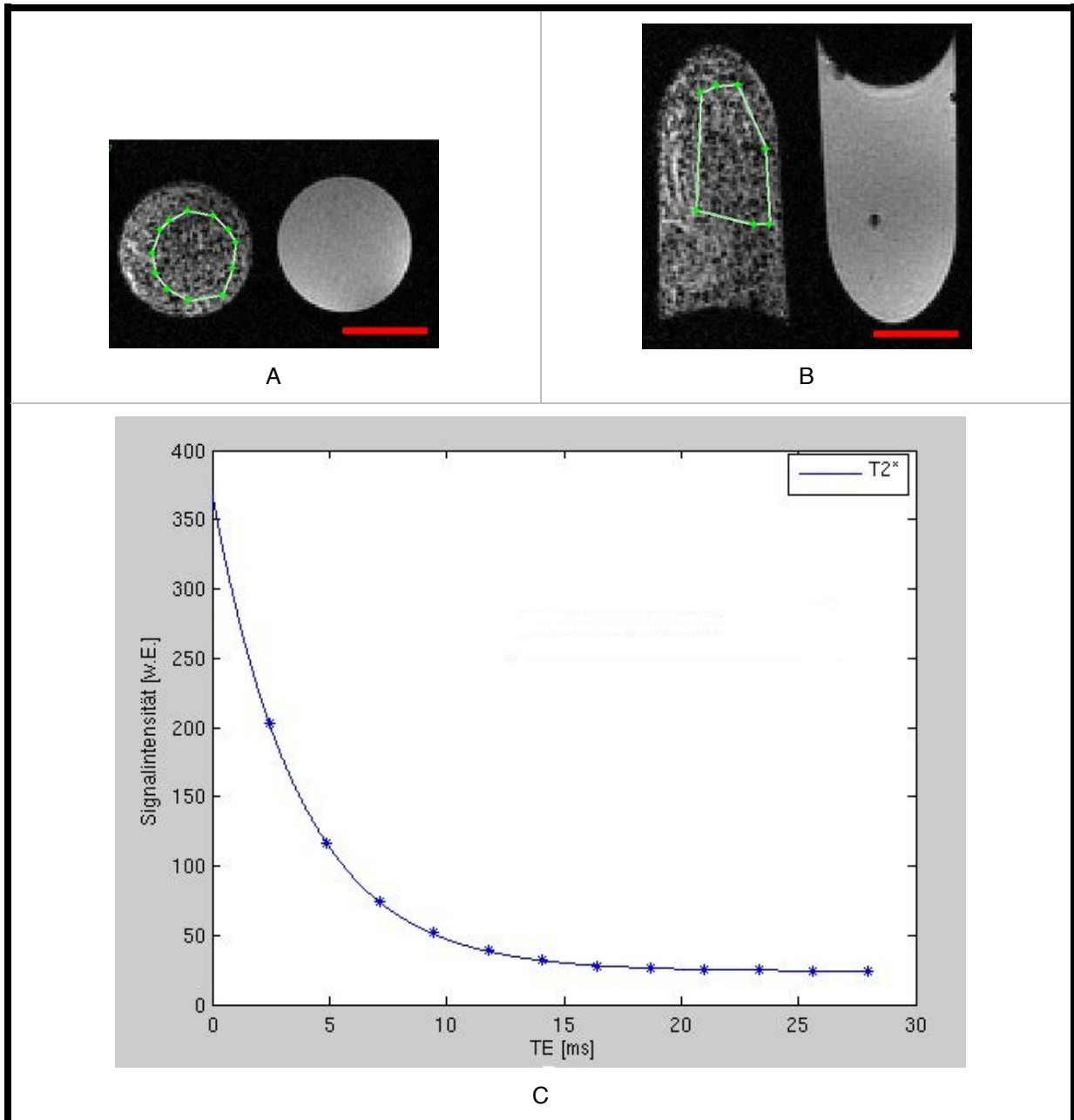


Abbildung 2-2: **Darstellung des Messbereichs (ROI) im *in vitro* MRT und Abhängigkeit der T2*-Relaxationszeit von der Echozeit (TE).** (A): Schnitt in der Frontalebene bei ausgewähltem Messbereich/region of interest (ROI), (B): Schnitt in der Horizontalebene bei ausgewähltem Messbereich/region of interest (ROI). (C): Diagramm für die T2*-Messsequenz bei 10 % partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen, Abhängigkeit der gemessenen MRT-Signalintensität (S) von der Echozeit (TE). (A,B): T2*-gewichtete MRT-Aufnahme, links: 10 % partikelmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, rechts: Kontrolle, Länge des Maßstabbalkens: 0,5 cm.

2.2.10. Übersicht der kernspintomografischen *in vivo* Versuche

Die Tabelle 2-10 gibt eine Übersicht über das experimentelle Vorgehen, das in den folgenden Kapiteln erläutert wird.

Entwicklungstag (E) der Embryonen	Experimentelle Schritte
E0 bis E9	Inkubation der Embryonen
E10	Inokulation mit T-HEp3 eGFP-Zellen (markiert/unmarkiert)
E11 bis E16	Inkubation der Embryonen
E17	Bildgebung im 7 Tesla Kleintier-MRT
E18	Euthanasie und <i>post mortem</i> Analyse

Tabelle 2-10: Übersicht – *in vivo* MRT.

2.2.11. Inkubation der Versuchstiere

Die Inkubation der SPF-Eier erfolgte nach der Anlieferung am Entwicklungstag E0 nach den Vorgaben des Herstellers (*Technical guidelines – SPF eggs, Charles river*) im Brutschrank für Hühnerembryos. Es erfolgten regelmäßige Viabilitätskontrollen mit einer Schierlampe.

2.2.12. Inokulation der aviären Embryos mit T-HEp3 eGFP-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl markierte als auch unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen am Entwicklungstag E10 auf die CAM der aviären Versuchstiere inokuliert. Die Eisenmarkierung erfolgte mit EST-Partikeln bei einer Eisenkonzentration von 0,2 mg/ml (vgl. Kapitel 2.2.3.), wobei die Inokulation unmittelbar nach der 24-stündigen Partikel-Inkubationszeit stattfand.

Vor der Inokulation wurde die CAM in einem speziellen Verfahren abgesenkt (Abbildung 2-3). Am unteren Eipol befindet sich eine luftgefüllte Kammer, die bei Durchleuchtung mittels Schierlampe ausfindig gemacht werden kann. Mit einem spitzen Dorn wurde am unteren Eipol die Eischale perforiert, wodurch die beschriebene Kammer geöffnet wurde. Anschließend erfolgte in einem zweiten Schritt eine weitere Perforation durch die Eischale im Bereich des Ei-Äquators. Unter Durchleuchtung wurde dazu ein CAM-Bereich mit Gefäßen gewählt, wobei das Loch nicht direkt über einem Blutgefäß lokalisiert sein sollte. Nach

erfolgter Markierung einer geeigneten Stelle wurde die Eischale mit einem DREMEL-Schleifgerät behutsam bis zur darunterliegenden Eihaut abgetragen. Es ist zu beachten, dass das bearbeitete Ei im Folgenden ausschließlich horizontal und mit dem abgeschliffenen Bereich nach oben zeigend gelagert werden muss. Nachfolgend erfolgte eine Perforation der Eihaut mit einer anatomischen Pinzette, ohne die direkt darunter anliegende CAM zu verletzen. Mit einem Saugball wurde die Luft aus der Kammer am unteren Eipol über die zuvor geschaffene Perforationsstelle abgesaugt. Durch den entstandenen Unterdruck im Ei löste sich die CAM im Bereich der zuvor perforierten Eihaut am Ei-Äquator und es kam zur Absenkung der CAM um einige Millimeter. Anschließend wurde der Bereich über der neu entstandenen Luftkammer mit dem DREMEL-Schleifgerät gefensterter, wobei die Öffnung ca. 0,5 cm x 1,0 cm groß sein sollte. Nach durchgeführter Öffnung erfolgten die nachfolgenden Arbeitsschritte unter einem sterilen Laborabzug. Die Öffnung wurde mit einem Stück transparentem Klebefilm abgedeckt, um ein Austrocknen des Eies über die künstlich geschaffene Öffnung zu verhindern.

Die T-HEp3 eGFP-Zellen wurden vor der Inokulation zweifach mit PBS (+/+) gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit Accutase[®] für 5 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Tumorzellen über die Öffnung am Eiäquator auf die abgesenkte CAM pipettiert, wobei pro Ei eine Zellsuspension mit $0,15 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$ PBS (+/+) eingebracht wurde. Die inokulierten Eier wurden erneut mit Klebefilm verschlossen und unter den im Kapitel 2.2.11. beschriebenen Bedingungen im Brutschrank bis zur MRT-Bildgebung am Entwicklungstag E17 inkubiert. Die Wendemechanik des Brutschranks wurde ausgeschaltet, um eine ausschließlich horizontale Lagerung der inokulierten Eier zu gewährleisten. Kompensatorisch wurden die Eier täglich per Hand behutsam geschwenkt.

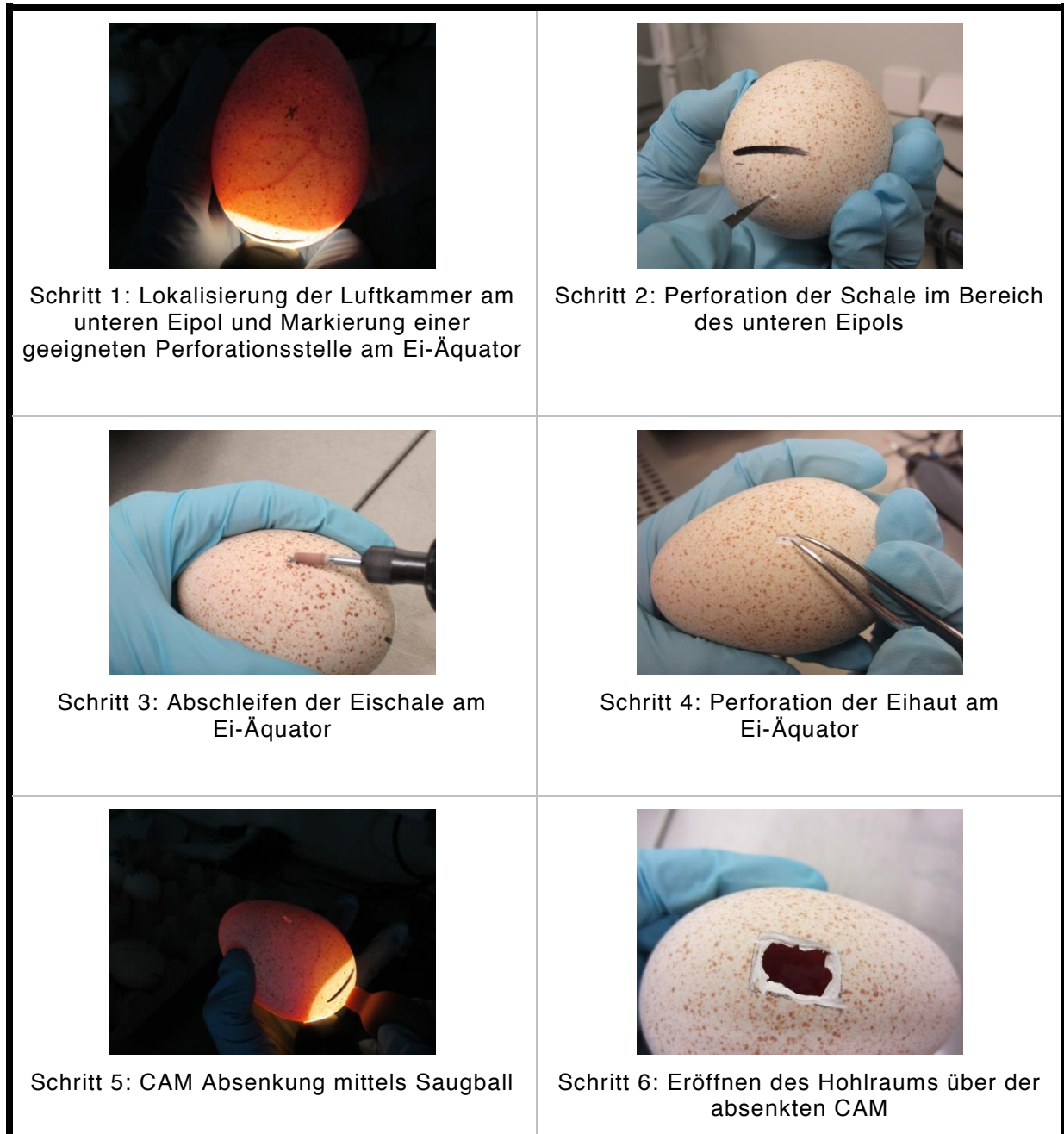


Abbildung 2-3: **Schrittfolge zur Absenkung der Chorioallantoismembran (CAM).**

2.2.13. Ruhigstellung der Versuchstiere

Vor der MRT-Bildgebung wurde das zu messende Ei für 15 min vollständig mit zerstoßenem Eis umgeben. Unmittelbar danach erfolgten die rund 45-minütigen Messungen im Kleintier-MRT, wobei die Umgebungstemperatur im klimatisierten Messbereich etwa 15 °C betrug. Sofort nach der Messung wurde das Ei zurück in den Brutschrank transferiert.

2.2.14. Messbedingungen für in vivo Magnetresonanztomografie

Die *in vivo* MRT-Bildgebung erfolgte mit dem im Kapitel 2.2.9. beschriebenen Gerät. Zur anatomischen Übersicht wurde eine T2-gewichtete 2D BLADE-Sequenz durchgeführt, wobei die Pulswiederholzeit (TR) bei 2830 ms und die Echozeit (TE) bei 28 ms lag (Abbildung 2-4). Es wurde eine räumliche Auflösung von $195 \times 195 \mu\text{m}^2$ gewählt, wobei die Schichtdicke 500 μm betrug. Insgesamt wurden 80 Schnittbilder pro Messung in koronarer Ebene erzeugt. Zusätzlich zur anatomischen Messsequenz wurden 112 Schnittbilder in der Koronarebene als T2*-Messsequenz, wie im Kapitel 2.2.9. beschrieben, aufgezeichnet.

Die Quantifizierung der T2*-Relaxationszeit erfolgte analog zu dem Vorgehen der *in vitro* MRT-Versuche (Kapitel 2.2.9.), wobei die ROI abhängig von der anatomischen Struktur des zu messenden Organs ausgewählt wurde (Abbildung 2-5). Die Vitalität der aviären Embryonen wurde mittels einer spezifischen T1-Messsequenz (living scan) überprüft. Dazu wurde eine sehr kurze Pulswiederholzeit (TR) genutzt, was eine vollständige Relaxation des Gewebes in der Messebene verhindert. Bei bestehendem Blutfluss kann jedoch vollständig relaxiertes Blut von außerhalb in die Messebene gelangen. Dieses Blut führt zur charakteristisch hellen Darstellung von Gefäßen bei vitaler Zirkulation.

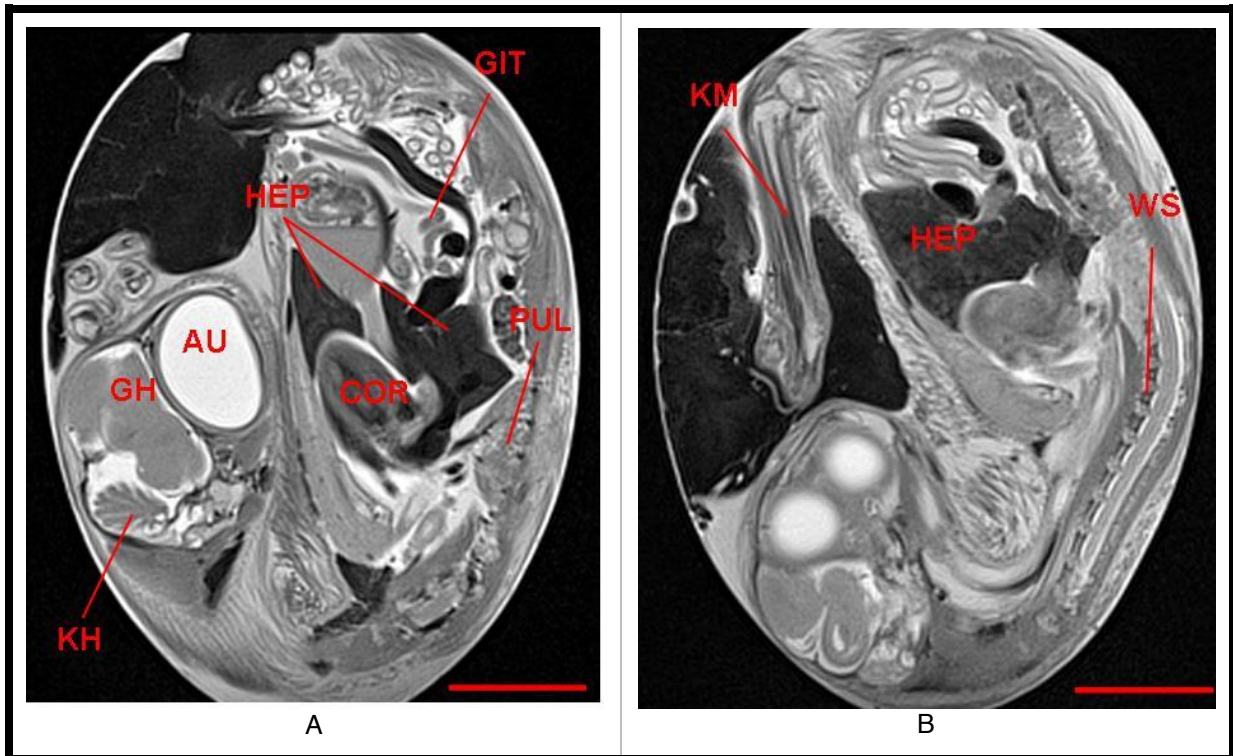


Abbildung 2-4: **MRT-Übersichtsaufnahmen eines Hühnerembryos am Entwicklungstag E17.** **(A):** GIT: Gastrointestinal Trakt, HEP: Leber, PUL: Lunge, COR: Herz, AU: Auge, GH: Großhirn, KH: Kleinhirn, **(B):** HEP: Leber, WS: Wirbelsäule, KM: Knochenmarkraum der Tibia, **(A,B):** BLADE Messequenz, Echozeit: 28,0 ms, Länge des Maßstabalkens entspricht 1 cm.

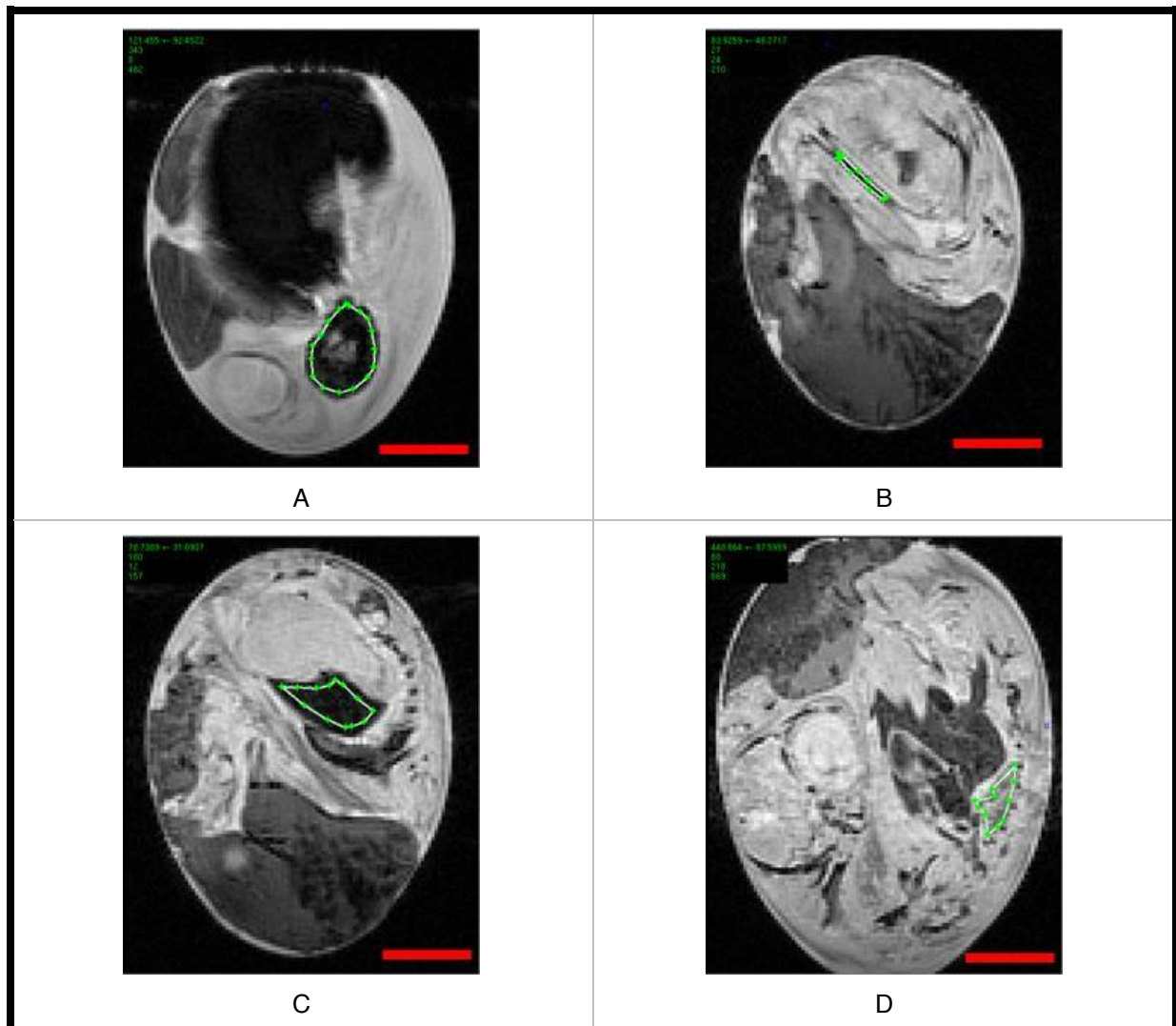


Abbildung 2-5: T2*-Messsequenzen zur Bestimmung des Messbereiches (ROI) verschiedener Strukturen des aviären Embryos. (A): Primärtumor, (B): Knochenmarkraum, (C): Leber, (D): Lunge, (A-D): Länge des Maßstabbalkens: 1 cm.

2.2.15. Euthanasie und Organentnahme

Am Entwicklungstag E18 wurden die Eier mit einer Schere geöffnet und die Versuchstiere durch Enthauptung euthanasiert. Anschließend wurde jedes Versuchstier ohne Kopf gewogen. Die Organentnahme erfolgte durch eine mediane Öffnung von Abdomen und Thorax. Zunächst wurde vom linken und rechten Leberlappen je eine Gewebeprobe entnommen. Anschließend wurden die im dorsalen Thorax befindlichen Lungen beidseits freipräpariert und *in toto* entnommen. Im letzten Präparationsschritt erfolgte die paarweise Entnahme von Femur und Tibia. Alle entnommenen Organe und Knochen wurden unmittelbar nach der Entnahme in 3,5 cm Petrischalen mit 5 ml PBS (-/-) gegeben und auf Eis gelagert.

2.2.16. Aufarbeitung und Analyse des Primärtumors

Nach der Freipräparation des Primärtumors erfolgte die Bestimmung seiner Größe und Masse. Eine Gewebeprobe des Tumors wurde gekühlt und in PBS (-/-) mechanisch zerkleinert. Nach anschließender Zentrifugation und Entfernung des Überstands wurde je nach Größe der Tumorpellets 5-10 ml Collagenase/BSA-Lösung zum enzymatischen Aufschluss von Zellaggregaten hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die in der Tumorzellsuspension enthaltenen T-HEp3 eGFP-Zellen, wie im Kapitel 2.2.20. beschrieben, quantifiziert. Weiterhin wurden zytologische Präparate nach dem im Kapitel 2.2.7. für T-HEp3 eGFP-Zellen beschriebenen Verfahren erstellt.

2.2.17. Aufarbeitung, Analyse und Kultivierung des Knochenmarks

Der Markraum von zwei entnommenen Knochen (1x Femur, 1x Tibia) wurde mittels einer dünnen Kanüle mit PBS (-/-) ausgespült, um das Knochenmarkgewebe zu extrahieren. Die enthaltenen Zellen wurden nach Zentrifugation und Entfernung des Überstands in 3 ml Zellkulturmedium 1 resuspendiert und auf 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte wie im Kapitel 2.2.1. für die T-HEp3 eGFP-Zelllinie beschrieben.

2.2.18. Aufarbeitung und Analyse der Leber

Eine Gewebeprobe der Leber wurde zur mechanischen Zerkleinerung durch ein 70 µm Zellsieb gegeben. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstands erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit 10 ml RBC-Lysepuffer bei 37 °C. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstands wurde das Pellet in PBS (-/-) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Zytologische Präparate wurden wie im Kapitel 2.2.7. erstellt.

2.2.19. Aufarbeitung, Analyse und Kultivierung der Lunge

Eine Gewebeprobe der Lunge wurde gekühlt gelagert und in PBS (-/-) mechanisch zerkleinert. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die im Pellet enthaltenen Zellen in 3 ml Zellkulturmedium 1 resuspendiert und auf 6-well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte wie im Kapitel 2.2.1. für die T-HEp3 eGFP-Zelllinie beschrieben.

2.2.20. Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem ECLIPSE TS100-Mikroskop von Nikon Instruments erstellt. Die Detektion von T-HEp3 eGFP-Tumorzellen in den *post mortem* entnommenen Geweben von Primärtumor, Lunge und Knochenmark erfolgte anhand der charakteristischen Zellform in Kombination mit dem emittierten grünen eGFP-Fluoreszenzsignal. Die Zellquantifizierung im Primärtumorgewebe wurde nach der Gewebeaufarbeitung (vgl. Kapitel 2.2.16.) in der Neubauerzählkammer mit dem Kammerfaktor ($\times 10^4$) durchgeführt. Die Detektion von T-HEp3 eGFP-Zellen in der Lunge und im Knochenmark erfolgte direkt aus den angelegten Zellkulturen (vgl. Kapitel 2.2.17. und 2.2.19, Abbildung 2-6).

2.2.21. Histologische Färbungen

Nach Euthanasie wurden von jedem Versuchstier Gewebeproben des Primärtumors sowie der Organe Leber, Lunge und Knochen (1x Femur, 1x Tibia) in Formalaldehydlösung fixiert. Die anschließende Erstellung der histologischen Schnitte sowie deren Färbung erfolgten in der Sektion für Kinderpathologie am Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Dr. C. Vokuhl). Von jeder Gewebeprobe wurden eine Berliner-Blau-Färbung und eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt.

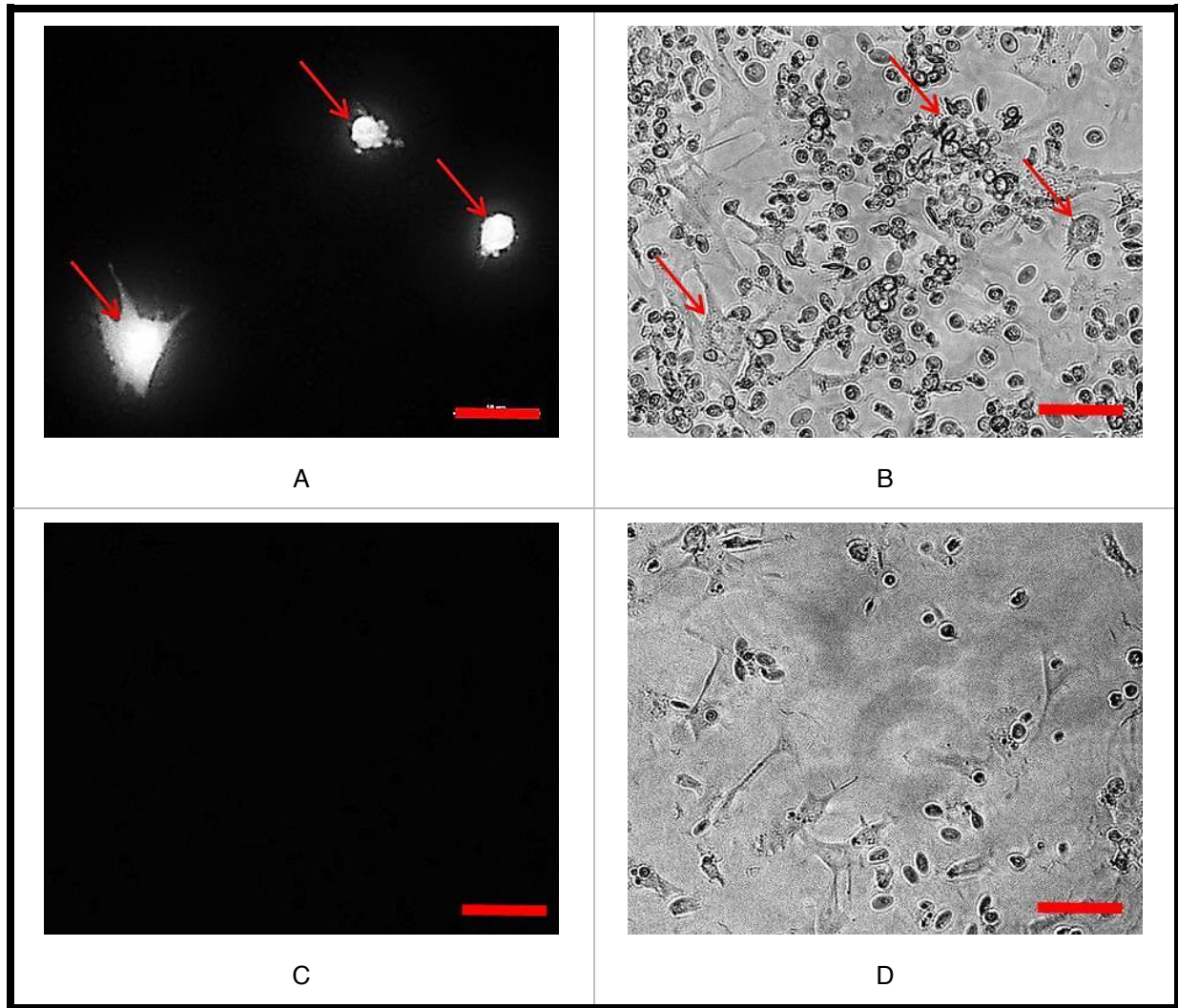


Abbildung 2-6: **Aufnahmen aus der *post mortem* Zellkultur des Knochenmarks.** (A): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Inokulation mit eisenmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen, (B): Lichtmikroskopisches Korrelat von A, (C): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Kontrolle, (D): Lichtmikroskopisches Korrelat von C, (A, B): Die Pfeile zeigen die T-HEp3 eGFP-Zellen. (A-D): Länge des Maßstabsbalkens entspricht 50 μm .

3. Ergebnisse

3.1. In vitro Markierung einer soliden Tumorzelllinie mit Eisenoxidpartikeln

Im Folgenden soll untersucht werden, ob die Tumorzelllinie T-HEp3 eGFP mit Eisenoxidpartikeln markiert werden kann. Zudem stellt sich die Frage, welche Parameter Einfluss auf die Effektivität der Zellmarkierung haben.

3.1.1. Abhängigkeit der Markierungseffektivität von der verwendeten Partikelart

Im Versuch dieses Kapitels sollte untersucht werden, ob die Markierungseffektivität bei T-HEp3 eGFP-Zellen von der genutzten Partikelentität abhängig ist. Zudem sollte festgestellt werden, ob sich die getesteten Eisenoxidpartikel von außen an die Zellmembran anlagern, oder in den Intrazellularraum aufgenommen werden. Dazu wurde die Zelllinie mit den Partikelentitäten EST und BNF inkubiert. Mit der Grundannahme, dass der Partikeldurchmesser bei der zellulären Aufnahme eine Rolle spielt, wurden zwei Partikelarten mit möglichst unterschiedlichen Durchmessern zur Evaluation ausgewählt (EST: $\text{Ø}=700\text{-}1300\ \mu\text{m}$; BNF: $\text{Ø}=100\ \mu\text{m}$). Die Inkubation erfolgte für 24 h bei einer Partikel-Eisenkonzentration von 0,3 mg/ml. Die Markierungseffektivität wurde unmittelbar nach der Inkubation (0 h) und erneut nach 4 Tagen (96 h) bestimmt.

Sowohl nach 0 h als auch nach 96 h konnten in jeder Einzelzelle der EST-Probe Eisenoxidpartikel detektiert werden, womit die Markierungseffektivität 100 % betrug (Abbildung 3-1, A). Zudem waren die EST-Partikel intrazellulär lokalisiert (Abbildung 3-1, B und C). Auch die BNF-Partikel wurden von den T-HEp3 eGFP-Zellen bei einer Markierungseffektivität von 71,67 % nach 0 h in den Intrazellularraum aufgenommen (Abbildung 3-1, A, D). Der Wert nahm jedoch innerhalb von 4 Tagen auf 4,67 % ab (Abbildung 3-1, E). Diese Daten zeigen, dass sich T-HEp3 eGFP-Zellen mit Eisenoxidpartikeln markieren lassen. Zudem lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Partikelentität EST die T-HEp3 eGFP-Zellen effektiver markiert als die BNF-Partikel.

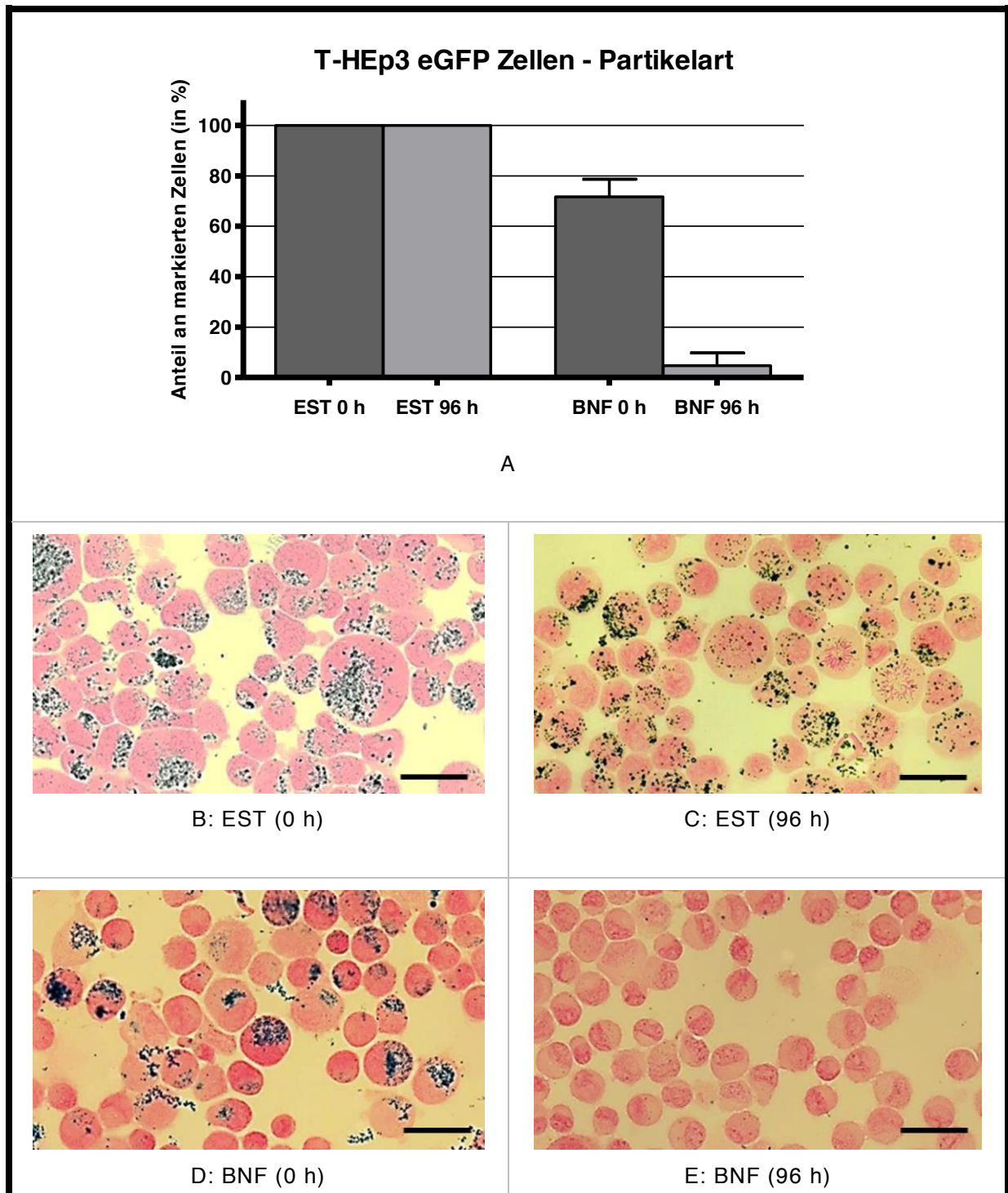


Abbildung 3-1: **Darstellung der Markierungseffektivität von partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen in Abhängigkeit von der Partikelart und exemplarische Aufnahmen der zugehörigen zytologischen Präparate.** (A): Anteil an partikelmarkierten Zellen in % in Abhängigkeit von der Partikelart, Partikelinkubation für 24 h bei 0,3 mg/ml Partikel-Eisenkonzentration, EST: EST-Partikel, BNF: BNF-Partikel, 0 h: unmittelbar nach Partikelinkubation, 96 h: 96 Stunden nach Partikelinkubation, (B): EST-Partikel, Aufnahmezeitpunkt: nach 0 h, (C): EST-Partikel, Aufnahmezeitpunkt: nach 96 h, (D): BNF-Partikel, Aufnahmezeitpunkt: nach 0 h, (E): BNF-Partikel, Aufnahmezeitpunkt: nach 96 h, (B-E): Berliner-Blau-Färbung, 24 h Inkubationszeit, Partikelkonzentration: 0,3 mg/ml, Länge des Maßstabballens: 50 μm .

3.1.2. Abhängigkeit der Markierungseffektivität von der Partikelkonzentration im Zeitverlauf

Im Versuch dieses Kapitels sollte untersucht werden, wie lange die EST-Markierung bei T-HEp3 eGFP-Zellen anhält. Weiterhin sollte eruiert werden, welchen Einfluss die Partikelkonzentration während der 24-stündigen Inkubation auf die Dauer der Partikelmarkierung hat. Dazu wurde die Markierungseffektivität bei unterschiedlichen EST-Partikelkonzentrationen über einen Zeitraum von 8 Tagen an der T-HEp3 eGFP-Zelllinie untersucht. Die geplanten *in vivo* MRT-Versuche, bei denen der Zeitraum zwischen Zellmarkierung und MRT-Messung 7 Tage betragen sollte, machen eine suffiziente Partikelmarkierung über einen solchen Zeitraum notwendig. Die EST-Partikel wurden verwendet, da diese auch 96 Stunden nach Inkubation eine hohe Markierungseffizienz aufwiesen (vgl. Kapitel 3.1.1.).

Unmittelbar nach der Zellmarkierung (Tag 0) lag die Markierungseffektivität bei allen untersuchten Partikelkonzentrationen bei ca. 100 % (Abbildung 3-2). Im Zeitverlauf zeigte sich, dass die Markierungseffektivität bei höheren Partikelkonzentrationen weniger stark abfällt als bei niedrigeren Partikelkonzentrationen (Abbildung 3-2). Vier Tage nach der Partikelinkubation lag die Markierungseffektivität der höchsten angewandten Partikelkonzentration (0,3 mg/ml) weiterhin bei 100 % (Abbildung 3-2). Bei einer Partikelkonzentration von 0,03 mg/ml verringerte sich die Markierungseffektivität nach 4 Tagen auf 85,33 % (Abbildung 3-2). Nach 8 Tagen waren bei den beiden höchsten untersuchten Partikelkonzentrationen weiterhin ca. zwei Drittel der Zellen partikelmarkiert (0,3 mg/ml: 65,67 % und 0,2 mg/ml: 70,33 %) (Abbildung 3-2). Bei einer geringeren Partikelkonzentration von 0,1 mg/ml waren nach 8 Tagen 24 % der Zellen partikelmarkiert (Abbildung 3-2). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die EST-Partikel eine suffiziente Markierung der T-HEp3 eGFP-Zellen über mehrere Tage ermöglichen. Die Markierungseffektivität blieb in den ersten 4 Tagen bei allen Partikelkonzentrationen relativ konstant. Zwischen Tag 4 und Tag 8 war der Abfall der Markierungseffektivität bei geringeren Partikelkonzentrationen deutlich stärker ausgeprägt als bei höheren Partikelkonzentrationen.

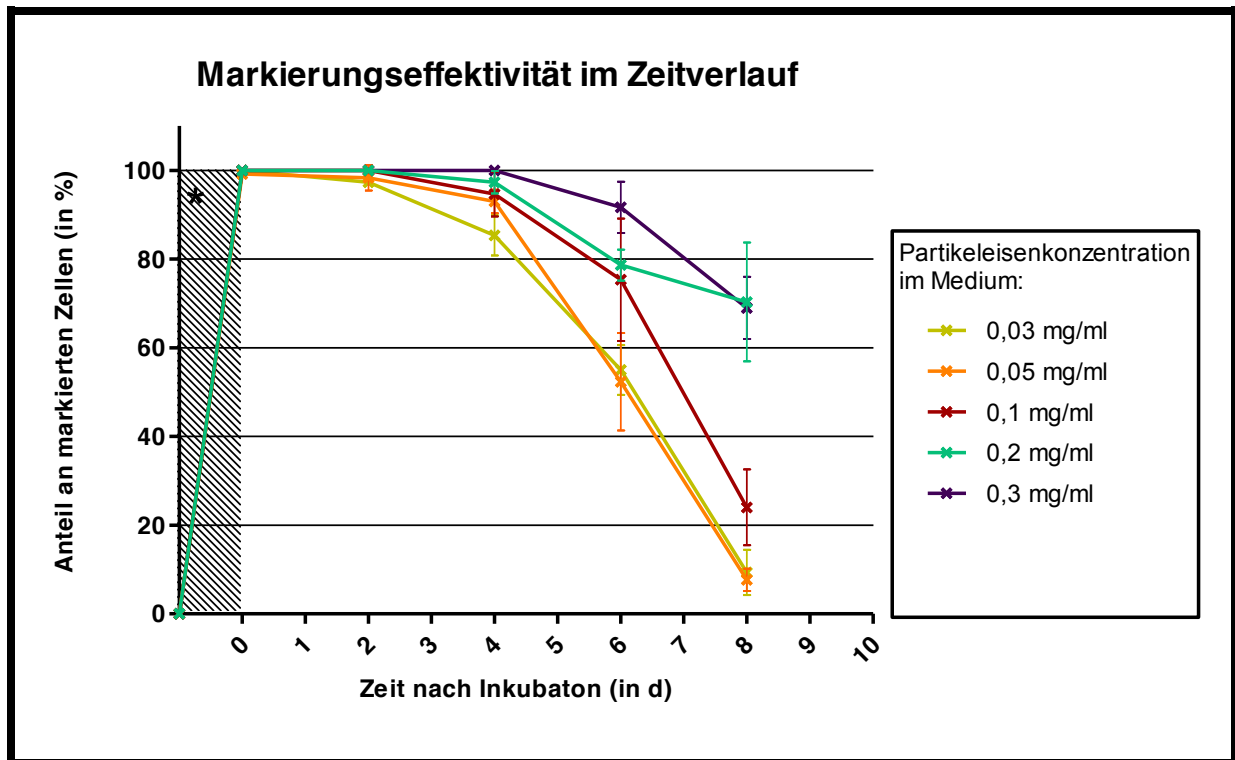


Abbildung 3-2: **Abhängigkeit der Markierungseffektivität von der Partikeleisenkonzentration im Zeitverlauf.** *Der schraffierte Bereich markiert die Partikelinkubationszeit von 24 Stunden.

3.1.3. Einfluss der Partikel auf die Proliferationsrate und Viabilität

Im nächsten Schritt sollte eruiert werden, inwiefern EST-Eisenpartikel Auswirkungen auf die Zellproliferation und -viabilität haben. Dazu wurden T-HEP3 eGFP-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von EST-Partikeln für 24 h inkubiert, wobei die Spanne der Partikeleisenkonzentration zwischen 0,03 mg/ml und 0,6 mg/ml lag. Die initial ausgesäte Zellzahl betrug $0,25 \times 10^6$ pro Ansatz. Nach der Inkubation wurden Zellzahl und Zellviabilität alle 48 h über insgesamt 8 Tage bestimmt. Alle 48 h wurde jede Zellprobe bei einer Dichte von $0,25 \times 10^6$ Zellen pro 2 ml neu ausgesät.

Die mit 0,6 mg/ml höchste getestete Partikelkonzentration führte innerhalb von 48 Stunden zu einem vollständigen Absterben der Zellpopulation (Abbildung 3-3). Bei allen anderen Partikelkonzentrationen, sowie bei der Kontrolle konnte im Beobachtungszeitraum eine Zellproliferation beobachtet werden (Abbildung 3-3). Am Tag 8 nach Inkubation lag die Zellzahl der Kontrolle bei $63,24 \times 10^6$ (Abbildung 3-3). Bei einer Partikeleisenkonzentration von 0,3 mg/ml wurde am Tag 8 eine Zellzahl von $16,23 \times 10^6$ detektiert (Abbildung 3-3). Diese Daten zeigen, dass die T-HEP3 eGFP-Zellen bei allen getesteten Partikelkonzentrationen

(ausgenommen 0,6 mg/ml) im Beobachtungszeitraum exponentiell gewachsen sind. Des Weiteren kam es bei höheren Partikelkonzentrationen (0,2 mg/ml und 0,3 mg/ml) zu einem kurzzeitigen (Tag 0 bis Tag 2 nach Inkubation) negativen Einfluss auf die Zellproliferation (Abbildung 3-3), wobei dieser Effekt ab Tag 2 nicht mehr zu beobachten war. Die Zellviabilität lag bei einer Partikeleisenkonzentration von bis zu 0,1 mg/ml im Untersuchungszeitraum bei durchgängig etwa 95 % (Abbildung 3-4). Bei den untersuchten Partikeleisenkonzentrationen 0,2 mg/ml und 0,3 mg/ml kam es unmittelbar nach der 24-stündigen Inkubation (entspricht Tag 0 nach Inkubation) zu einem Abfall der Zellviabilität auf 86,33 % bzw. 81,00 % (Abbildung 3-4). Im weiteren Verlauf lagen die Viabilitätsraten bei diesen Partikeleisenkonzentrationen ebenfalls bei ca. 95 % (Abbildung 3-4). Bei einer Partikeleisenkonzentration von 0,6 mg/ml kam es zu einem Abfall der Zellviabilität auf 45,33 % am Tag 0 und im weiteren Verlauf zu einem vollständigen Absterben der Zellpopulation (Abbildung 3-4).

Zusammenfassend belegen die Daten, dass EST-Eisenoxidpartikel die Proliferation von T-HEp3 eGFP-Zellen initial konzentrationsabhängig hemmen ohne die Zellviabilität dauerhaft zu beeinflussen (ausgenommen: Partikeleisenkonzentration von 0,6 mg/ml). Zudem zeigte sich, dass die höchste erprobte Partikeleisenkonzentration von 0,6 mg/ml eine toxische Wirkung auf die Zellpopulation hatte.

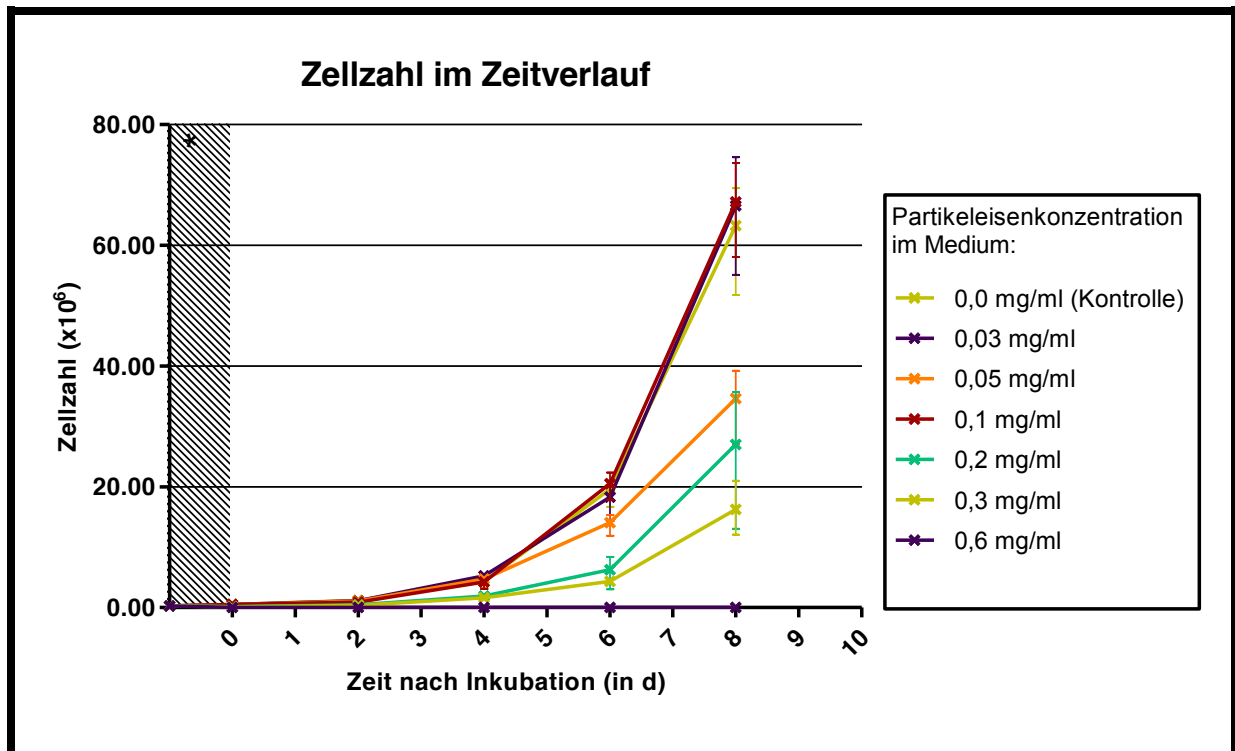


Abbildung 3-3: **Abhängigkeit der Zellproliferation von der Partikeleisenkonzentration.** *Der schraffierte Bereich markiert die Partikelinkubationszeit von 24 Stunden.

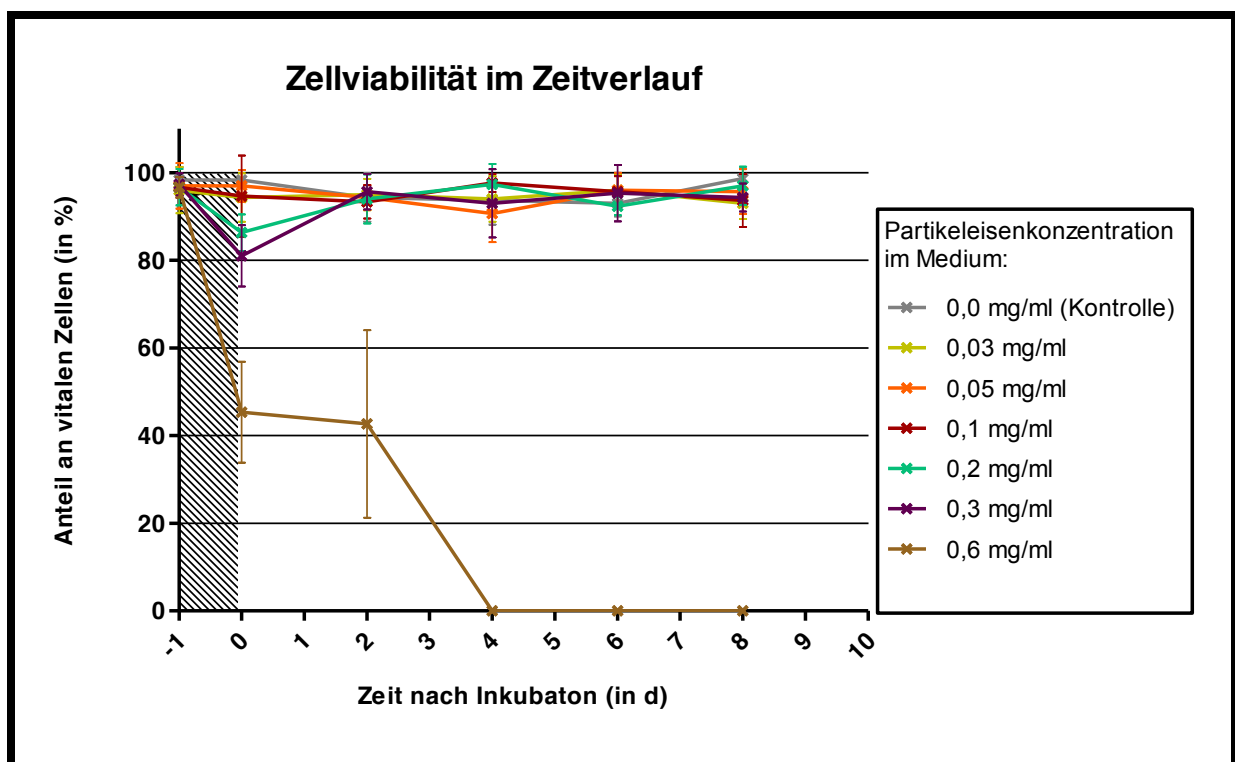


Abbildung 3-4: **Abhängigkeit der Zellviabilität von der Partikeleisenkonzentration.** *Der schraffierte Bereich markiert die Partikelinkubationszeit von 24 Stunden.

3.2. In vitro Markierung einer Suspensionszelllinie mit Eisenoxidpartikeln

3.2.1. Abhängigkeit der Markierungseffektivität von der Partikelart

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine suffiziente Partikelmarkierung von ALL-Zellen, die in Suspensionskulturen wachsen, möglich ist. Dazu wurde die 697-Zelllinie mit 6 verschiedenen Partikelarten bei 0,3 mg/ml Partikel-Eisenkonzentration inkubiert. Für den Versuch wurde die 697-Zelllinie genutzt, weil für diese ALL-Zelllinie ein *in ovo* Wachstum nachgewiesen werden konnte (Alsadeq et al., 2015). Die Markierungseffektivität wurde unmittelbar nach Inkubation (0 h) und 2 Tage nach Inkubation (48 h) bestimmt.

Bei 5 von 6 getesteten Partikelsorten konnte eine geringfügige Aufnahme von Eisenoxidpartikeln in den Intrazellularraum beobachtet werden (Abbildung 3-5, A). Der Anteil an markierten Zellen lag unmittelbar nach der Inkubation (0 h) bei den auch an der T-HEp3 eGFP-Zelllinie erprobten EST-Partikeln bei 7,33 % (Abbildung 3-5, A und B). Bei den Partikelentitäten NAN, NAN-NH₂, BNF und BNF-NH₂ lag die Markierungseffektivität unmittelbar nach Inkubation bei unter 40 % (Abbildung 3-5, A). Die getesteten MIRB-Partikel erreichten unmittelbar nach der Inkubation mit 96,67 % partikelmarkierten Zellen die höchste Markierungseffektivität (Abbildung 3-5, A und D). Innerhalb von 2 Tagen nahm der Anteil an MIRB-markierten Zellen auf 23,33 % ab (Abbildung 3-5, A und E).

Die Daten zeigen, dass keine der getesteten Partikelsorten eine effektive Markierung der 697-Zelllinie über mehrere Tage ermöglichte.

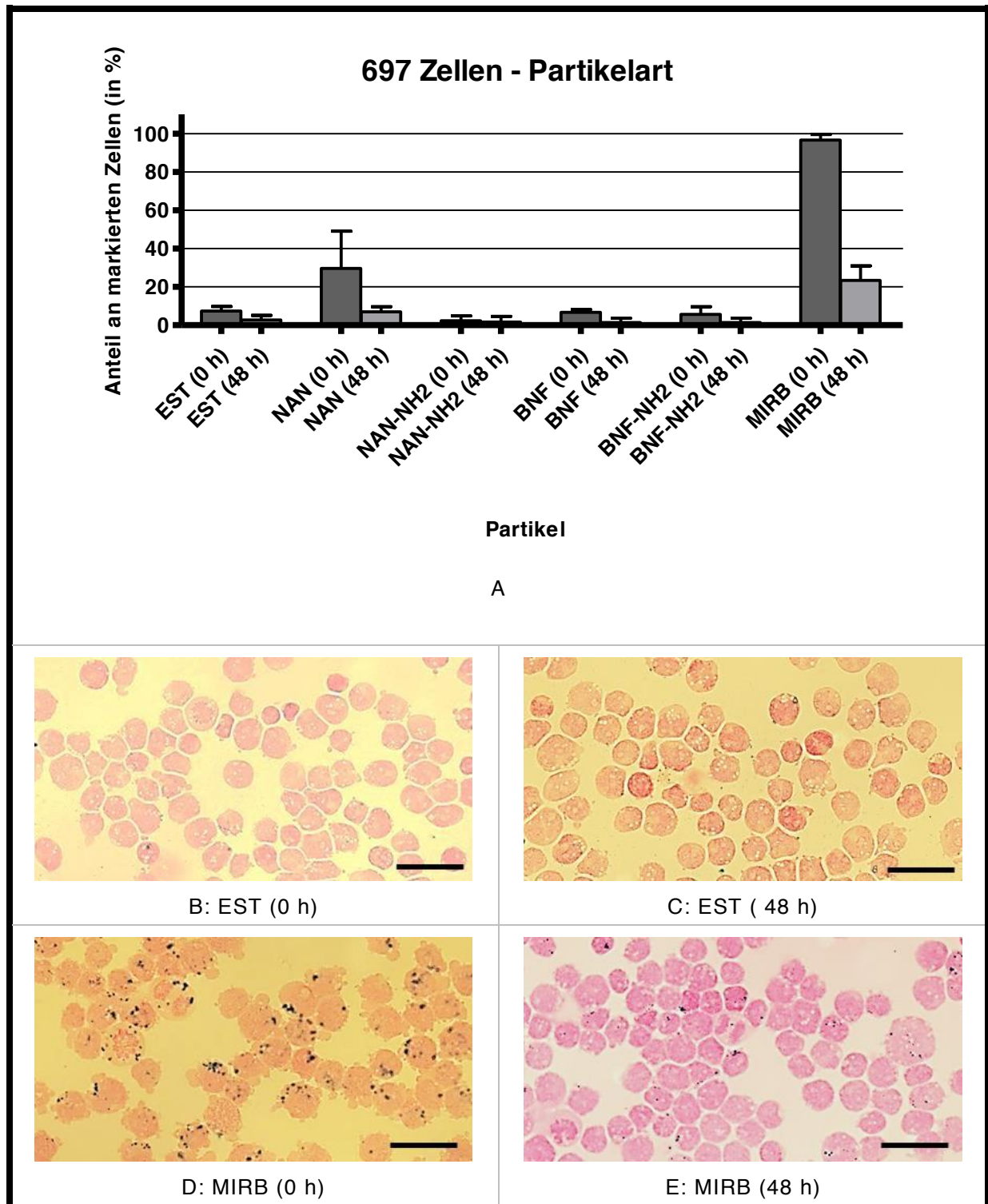


Abbildung 3-5: **Darstellung der Markierungseffektivität von 697-Zellen in Abhängigkeit von der Partikelart und exemplarische Aufnahmen der zugehörigen zytologischen Präparate.** (A): Markierungseffektivität in Abhängigkeit von der Partikelart, (B-E): Mikroskopische Aufnahmen der zugehörigen zytologischen Präparate, (A-E): Partikelinkubation für 24 h bei 0,3 mg/ml Partikel-Eisenkonzentration, die Zeitangabe in Klammern entspricht dem Messzeitpunkt/Aufnahmezeitpunkt nach erfolgter Partikelinkubation. EST: EST-Partikel, NAN: NAN-Partikel, NAN-NH₂: NAN-NH₂-Partikel, BNF: BNF-Partikel, BNF-NH₂: BNF-NH₂-Partikel, MIRB: MIRB-Partikel, (B-E): Berliner-Blau-Färbung, Länge des Maßstab-balkens: 50 μ m.

3.2.2. Elektroporation und Poly-L-Lysin-Inkubation zur Steigerung der Markierungseffektivität

Der folgende Versuch sollte die Frage beantworten, ob sich die zelluläre Partikelaufnahme bei 697-Zellen durch Elektroporation und PLL steigern lässt. Dazu wurden 697-Zellen bei verschiedenen Spannungen elektroporiert beziehungsweise mit verschiedenen Konzentrationen von PLL inkubiert. Es ist bekannt, dass die Zellmembran von eukaryotischen Zellen durch kurzzeitiges Anlegen eines elektrischen Feldes permeabilisiert werden kann. Dieses Verfahren wird bereits vielfach in der Molekularbiologie zur Transfektion (Einschleusung) von DNA genutzt (Golzio et al., 2010). So lässt sich vermuten, dass die Elektroporation auch die zelluläre Aufnahme anderer Strukturen, wie zum Beispiel Eisenoxidpartikel, steigern könnte. PLL ist ein positiv geladenes Polymer der Aminosäure L-Lysin mit hydrophilem Charakter. Die Zellmarkierung mittels PLL beschichteter Eisenoxidpartikel wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Riggio et al., 2012; Babič et al., 2014).

Die Elektroporation wurde bei Spannungen zwischen 50 V und 250 V an der 697-Zelllinie erprobt, wobei die Partikel EST, NAN und BNF verwendet wurden. Es wurde eine Elektroporationsdauer von 10 ms gewählt. Bei allen getesteten Partikelsorten und Spannungen führte die Elektroporation zu keiner effektiven Zellmarkierung (Abbildung 3-6, A). Der höchste Anteil an partikelmarkierten Zellen wurde mit NAN-Partikeln bei 50 V Elektroporationsspannung ermittelt und lag bei 31,67 % (Abbildung 3-6). Nach alleiniger Partikelinkubation über 24 h ohne Elektroporation wurde mit NAN-Partikeln eine Markierungseffektivität von 29,67 % erreicht (vgl. Kapitel 3.2.1., Abbildung 3-5, A). Daraus lässt sich schließen, dass eine Elektroporation unter den erprobten Bedingungen zu keiner nennenswerten Steigerung der Markierungseffektivität führte. Des Weiteren zeigte sich, dass die Höhe der Elektroporationsspannung die zelluläre Aufnahme von Eisenoxidpartikeln kaum beeinflusst.

Um die Wirksamkeit von PLL zur Steigerung der Markierungseffektivität zu untersuchen, wurden 697-Zellen mit BNF-Partikeln bei einer Partikeleisenkonzentration von 0,3 mg/ml inkubiert. Die BNF-Partikel wurden verwendet, weil sie den Partikeln aus Vorpublikationen zur PLL-Nutzung in Durchmesser (ca. 100 nm) und Oberflächenbeschaffenheit (Glucose-Moleküle) ähneln (Riggio et al., 2012). Während der Inkubationszeit wurde die Zell-Partikel-Suspension mit bis zu 30 µl/ml PLL supplementiert. Die Zugabe von PLL führte zu einem Anstieg der Markierungseffektivität. So lag der Anteil an partikelmarkierten Zellen unmittel-

bar nach Inkubation (0 h) mit PLL-Konzentrationen von 15 $\mu\text{l/ml}$ bzw. 30 $\mu\text{l/ml}$ bei über 90 % (Abbildung 3-6, B). Zudem zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der supplementierten PLL-Konzentration und der Höhe der Markierungseffektivität (Abbildung 3-6, B). Die Markierungseffektivität bei 30 $\mu\text{l/ml}$ PLL-Konzentration wurde außerdem im Zeitverlauf untersucht. Dabei zeigte sich ein Abfall der Markierungseffektivität in den ersten 96 h nach Inkubation auf unter 10 % (Abbildung 3-6, C).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass durch die Nutzung von PLL eine kurzfristige Steigerung der Markierungseffektivität bei der 697-Zelllinie ermöglicht wurde. Eine langfristige Erhöhung der Markierungseffektivität konnte weder durch PLL noch durch Elektroporation unter den erprobten Bedingungen erreicht werden.

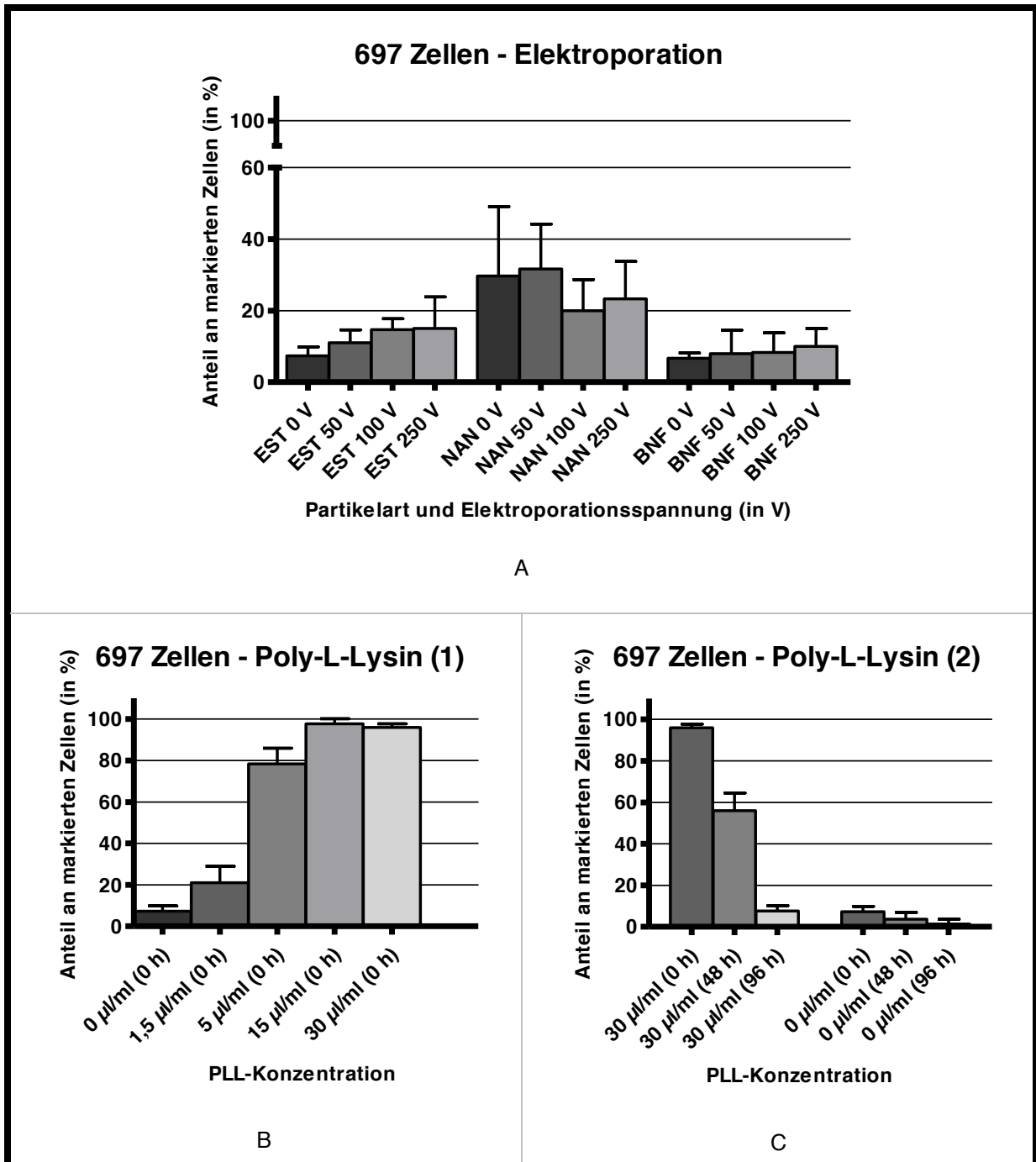


Abbildung 3-6: **Darstellung der Markierungseffektivität für 697-Zellen bei der Nutzung von Elektroporation und PLL. (A):** Elektroporation, Markierungseffektivität in Abhängigkeit von Partikelart (EST, NAN, BNF) und Elektroporationsspannung (0 V (Kontrolle), 50 V, 100 V, 250 V), Elektroporationsdauer: 10 ms; Inkubation der 697-Zelllinie nach Elektroporation für 24 h bei 0,3 mg/ml Partikeleisenkonzentration, EST: EST-Partikel; NAN: NAN-Partikel; BNF: BNF-Partikel, **(B):** Darstellung der Markierungseffektivität in Abhängigkeit von der PLL-Konzentration, **(C):** Darstellung der Markierungseffektivität bei 30 µl/ml und 0 µl/ml (Kontrolle) PLL-Konzentration im Zeitverlauf, **(B, C):** Inkubation der 697-Zelllinie mit BNF-Partikeln für 24 h bei 0,3 mg/ml Partikeleisenkonzentration; Zeitangabe in Klammern (0 h, 48 h, 96 h) entspricht dem Messzeitpunkt nach Partikelinkubation.

3.3. In vitro Magnetresonanztomografie einer partikelmarkierten Tumorzelllinie

3.3.1. Abhängigkeit der Signalintensität von der Partikelart

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob partikelmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen *in vitro* zu einer MRT-Signalabschwächung führen. Zudem stellte sich die Frage, ob eine möglicherweise beobachtete Signalabschwächung von der verwendeten Partikelart abhängig ist. Dafür wurden die T-HEp3 eGFP-Zellen mit den Partikelarten EST und BNF inkubiert. Unmittelbar nach der Inkubation erfolgte eine *in vitro* MRT-Messung der partikelmarkierten Zellen im Agaroseblock, wobei unterschiedliche Zellzahlen (0 – 50 000 Zellen pro Block) verwendet wurden. Als Kontrolle wurden 10 000 unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen in einen Agaroseblock überführt. Die Partikelarten EST und BNF wurden ausgewählt, da diese bereits im Markierungsversuch des Kapitels 3.1.1. an T-HEp3 eGFP-Zellen erprobt wurden. Bei der Auswertung ist somit zu beachten, dass der Anteil an partikelmarkierten Zellen für EST-Partikel initial bei 100 % und für BNF-Partikel bei 71,67 % lag (Abbildung 3-1, A). Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 3-7 zusammengefasst, wobei die Signalintensität im dargestellten MRT-Versuch subjektiv abgeschätzt und nicht quantifiziert wurde.

Die EST-markierten Zellproben zeigten im MRT ein im Vergleich zur Kontrollprobe dunkleres Aussehen, was einer Verminderung des MRT-Signals entspricht (Abbildung 3-7, A-D). Mit zunehmender Zahl an EST-markierten Zellen nahm die MRT-Signalintensität ab (Abbildung 3-7, A-D). Insbesondere bei 5 000 und 10 000 EST-markierten Zellen fiel zudem eine inhomogene Abschwächung der Signalintensität auf (Abbildung 3-7, B, C). Bei den BNF-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen war nur eine geringe Abschwächung der MRT-Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle erkennbar (Abbildung 3-7, E-H). Bei 50 000 BNF-markierten Zellen ließ sich eine geringfügige und inhomogene Signalabschwächung im Vergleich zur Kontrolle feststellen (Abbildung 3-7, H).

Schlussfolgernd zeigen die Daten, dass eine Partikelmarkierung von T-HEp3 eGFP-Zellen zu einer Verminderung des *in vitro* gemessenen MRT-Signals führt. Weiterhin zeigte sich, dass die EST-markierten Zellen eine stärkere Abschwächung des *in vitro* ermittelten MRT-Signals hervorrufen als die BNF-markierten Zellen.

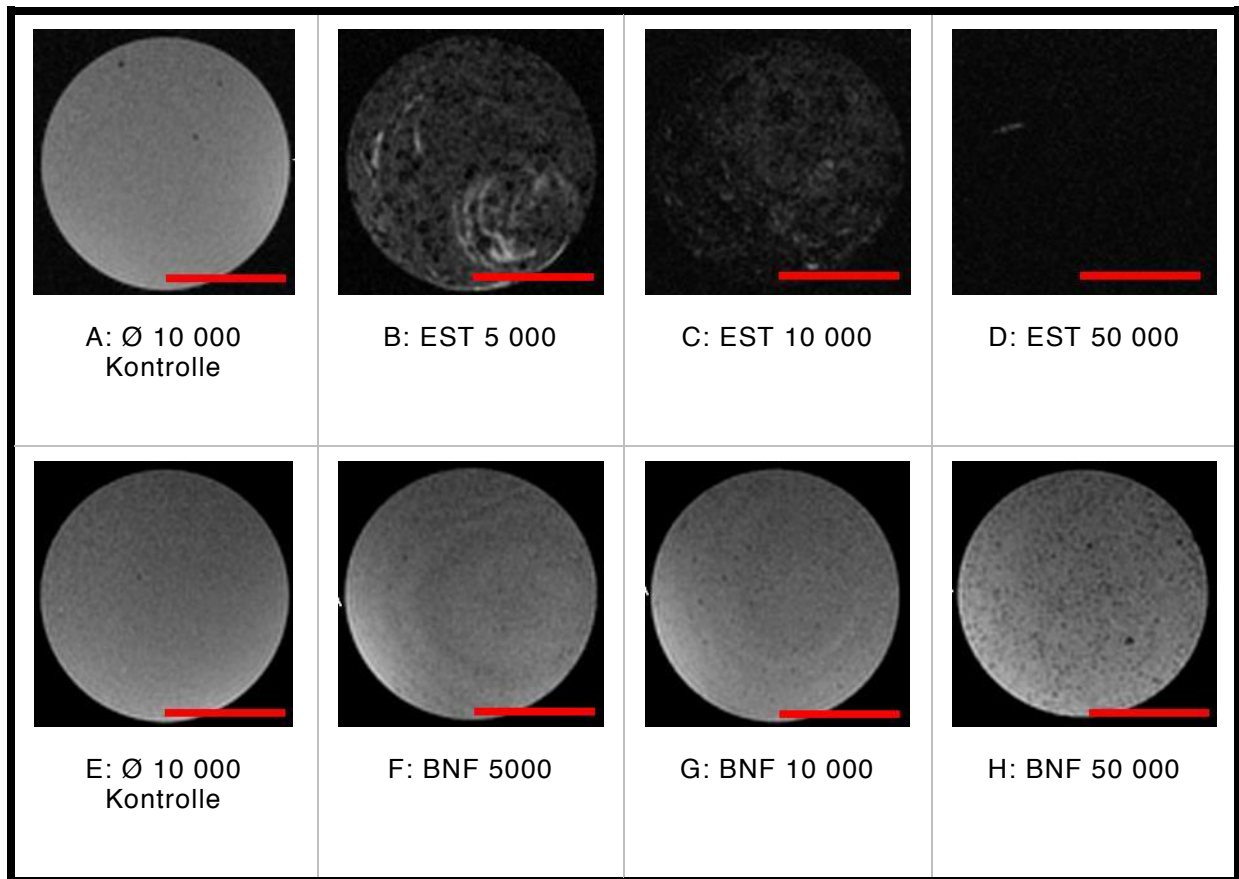


Abbildung 3-7: Vergleich der MRT-Signalintensität von *in vitro* Zellsuspensionen (partikelmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen) bei unterschiedlichen Zellzahlen. (A,E): Kontrolle – 10 000 unmarkierte Zellen, (B-D und F-H): EST: EST-Partikel, BNF: BNF-Partikel, Inkubation bei 0,3 mg/ml für 24 h, Die Zahl hinter der Partikelangabe entspricht der Zahl an partikelmarkierten Zellen. (A-H): T2*-gewichtete MRT-Aufnahmen, Die Länge des Maßstabbalkens entspricht 0,5 cm.

3.3.2. Abhängigkeit der Signalintensität von der Höhe der zellulären Markierungseffektivität

Der in diesem Kapitel dargestellte Versuch sollte untersuchen, inwiefern die MRT-Signalintensität mit steigender Markierungseffektivität abnimmt. Zudem sollte eruiert werden, wie hoch der Anteil an partikelmarkierten Zellen sein muss, um noch eine messbare MRT-Signalabschwächung zu detektieren, wobei dies der Sensitivität der Messmethode entspricht. Die Sensitivität ist insbesondere vor dem Hintergrund der zu erwartenden geringen Tumorzellkonzentrationen bei den einleitend angesprochenen Konzepten DTC und MRD im Kontext der *in vivo* Versuche dieser Arbeit von Interesse. Es wurden T-HEp3 eGFP-Zellen mit EST-Partikeln markiert, weil die im Versuch des vorangehenden Kapitels beobachtete *in vitro* Signalabschwächung dieser Partikelentität näher quantifiziert werden sollte. Es wurden Zellproben mit 1×10^6 Zellen (T-HEp3 eGFP) untersucht, wobei der Anteil an partikelmarkierten Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl in den Zellproben, zwischen 0 % und 100 % lag. Je Probe wurden fünf MRT-Schnittbilder zur Quantifizierung herangezogen, wobei für jede Probe der Mittelwert der T2*-Relaxationszeit ermittelt wurde.

Mit steigendem Anteil an partikelmarkierten Zellen nahm die MRT-Signalintensität (T2*-Relaxationszeit) ab (Abbildung 3-8, A). Eine messbare Abnahme der Signalintensität kann ab einer Markierungseffektivität von 0,5 % detektiert werden, was einer partikelmarkierten Zelle auf 200 Zellen entspricht (Abbildung 3-8, A). Bei 4 Zellproben (100 %, 0,1 %, 0,01 %, 0 %) konnte die Quantifizierung der Signalintensität nicht erfolgen. Bei den im Versuch angewandten Echozeiten (diese wurden analog zu den *in vivo* Messungen gewählt, vgl. Kapitel 2.2.14.) lagen die T2*-Relaxationszeiten dieser Zellproben außerhalb des Messbereiches. Aufgrund dessen konnte der Wert für die Kontrollprobe (0 %) nicht direkt bestimmt werden, sondern wurde mittels der gemessenen Werte interpoliert (Abbildung 3-8, A).

Zusammenfassend zeigen die Daten der quantifizierten T2*-Relaxationszeiten, dass die Signalintensität zwischen 0,5 % und 10 % Markierungseffektivität vom Anteil an partikelmarkierten Zellen abhängig ist (Abbildung 3-8, A). Auch in den kernspintomografischen Schnittbildern ist eine Abnahme der Signalintensität bei steigendem Anteil an partikelmarkierten Zellen erkennbar (Abbildung 3-8, B-G). Im Gegensatz zur quantifizierten Signalintensität ist in den Schnittbildern eine inhomogene Signalabschwächung bis zu einer Markierungseffektivität von 0,1 % erkennbar (Abbildung 3-8, C). Es lässt sich somit vermuten, dass

die Sensitivität der angewandten Quantifizierungsmethode für die MRT-Signalintensität (vgl. Kapitel 2.2.9.) bei den angewandten Echozeiten nicht ausreichte, um kleine, mit dem menschlichen Auge sichtbare Signalabschwächungen zu detektieren. Ein Grund dafür könnte sein, dass es sich um keine homogene Signalabschwächung in der gesamten Probe handelt, sondern um kleine punktuelle Signalabschwächungen. Da die angewandte Quantifizierungsmethode jedoch die durchschnittlich gemessene Signalintensität im festgelegten Messbereich (ROI) angibt, ist es denkbar, dass punktuelle Signalabschwächungen einen zu geringen Einfluss auf die durchschnittlich gemessene Signalintensität haben.

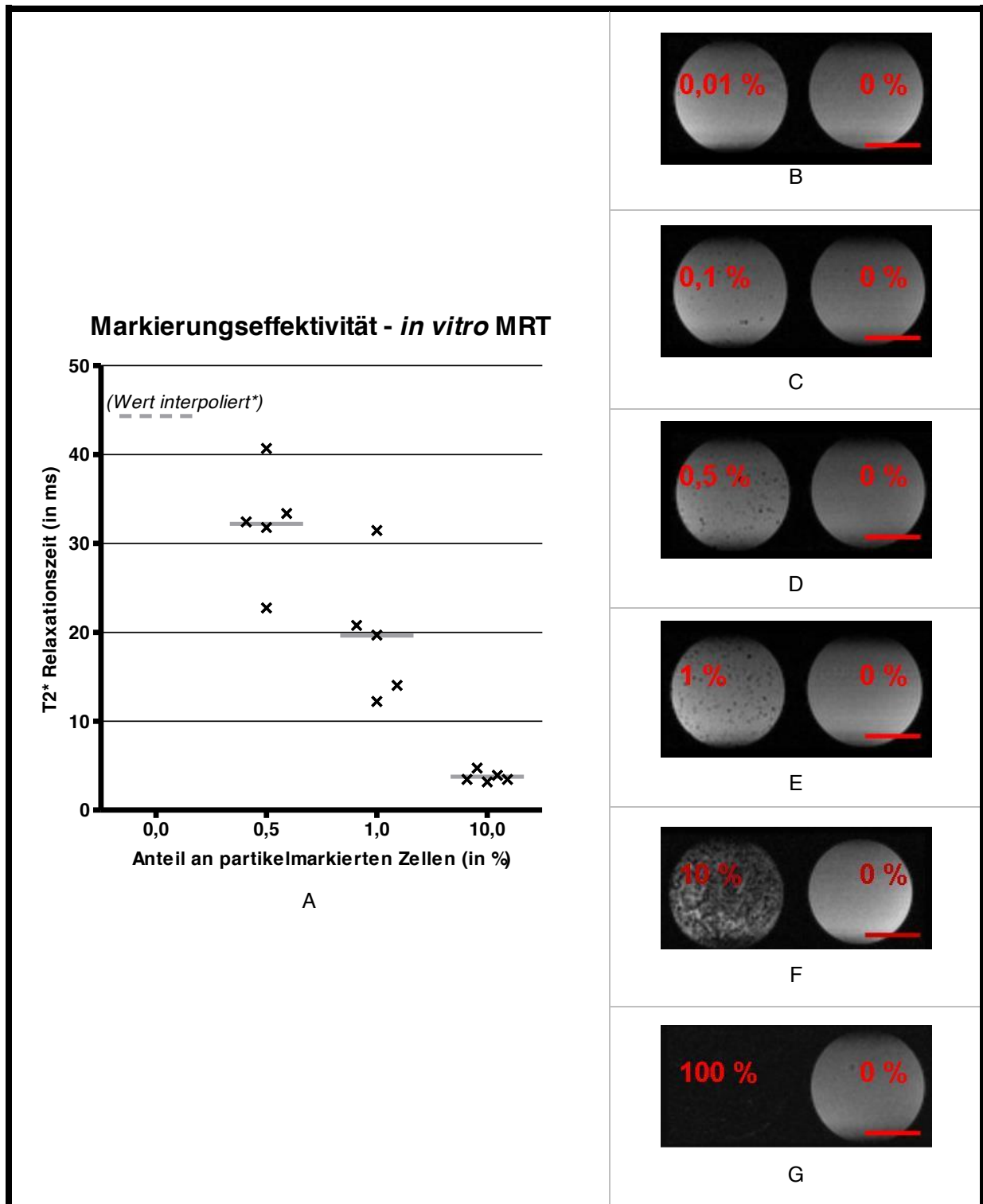


Abbildung 3-8: Vergleich der T2*-Relaxationszeiten von *in vitro* Zellsuspensionen mit unterschiedlicher Markierungseffektivität und zugehörige MRT-Aufnahmen. (A): Quantitativer Vergleich der T2*-Relaxationszeiten, *Die Werte für die Kontrollprobe (0 %) wurden interpoliert, Kreuze: Einzelmesswerte, graue Balken: Mittelwerte, (A-G): Gesamtzellzahl: 1×10^6 Zellen (T-HEp3 eGFP) in 1 ml, Zellmarkierung mit EST-Partikeln, Inkubation bei 0,3 mg/ml für 24 h, (B-G): T2*-gewichtete MRT-Aufnahmen der untersuchten Zellproben, Prozentangaben: Anteil an partikelmarkierten Zellen, Länge des Maßstabbalkens entspricht 0,5 cm.

3.4. In vivo Magnetresonanztomografie von partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob partikelmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, wie *in vitro* beobachtet, auch *in vivo* zu einer MRT-Signalabschwächung führen.

3.4.1. Testgruppen

Für die *in vivo* MRT-Versuche wurden 3 Testgruppen gebildet. Bei Testgruppe 1 (TG1), bestehend aus 15 Individuen, erfolgte die Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen. Es wurde eine Partikeleisenkonzentration von 0,2 mg/ml ausgewählt, weil die Zellmarkierung bei diesen Bedingungen das beste Verhältnis aus hoher Markierungseffektivität und hoher Zellproliferationsrate zeigte (Abbildung 3-2 und 3-3). In TG1 überlebten insgesamt 6 von 15 Individuen, wobei von 5 lebenden Individuen MRT-Aufnahmen angefertigt wurden (Tabelle 3-1). Testgruppe 2 (TG2), ebenfalls aus 15 Individuen bestehend, wurde mit $0,15 \times 10^6$ unmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen inokuliert (Tabelle 3-1). Es überlebten 6 von 15 Individuen. Eine MRT-Messung konnte bei 4 lebenden Individuen durchgeführt werden (Tabelle 3-1). Bei Testgruppe 3 (TG3), bestehend aus 4 Individuen, erfolgte die Inokulation mit 50 μ l PBS (+/+ ohne darin enthaltene Zellen (Tabelle 3-1). Alle Individuen in TG3 überlebten bis zum Tag E18 des Versuches, wobei 3 Individuen im MRT gemessen wurden (Tabelle 3-1). Die nicht vitalen Individuen wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

TG	Inokulierte T-HEp3 eGFP-Zellen (in $\times 10^6$)	Markierung mit EST-Partikeln (0,2 mg/ml)	Anzahl an inokulierten Individuen (Tag E0)	Anzahl an lebenden Individuen bei Euthanasie gesamt (Tag E18)	Anzahl an lebenden Individuen mit MRT Messung (Tag E17)
1	0,15	+	15	6	5
2	0,15	-	15	6	4
3	-	-	4	4	3

Tabelle 3-1: **Übersicht der Testgruppen.** EST: EST-Eisenoxidpartikel, TG: Testgruppe.

3.4.2. Primärtumor – in vivo Magnetresonanztomografie

Im *in vivo* MRT-Versuch dieses Kapitels sollte eruiert werden, inwiefern sich die MRT-Signalintensität eines aus partikelmarkierten Zellen bestehenden Primärtumors im Vergleich zu einem Tumor, bestehend aus unmarkierten Zellen, unterscheidet. Dazu wurden die T2*-Relaxationszeiten der Primärtumoren von TG1 (Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen) mit der Kontrollgruppe (Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ unmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen) verglichen. Zunächst wurden alle erhobenen Messwerte von TG1 zusammengefasst und mit den ebenfalls zusammengefassten Messwerten der Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 3-9). Anschließend wurden die Messwerte jedes einzelnen Individuums von TG1 mit den zusammengefassten Messwerten der Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 3-10). Die Inokulation erfolgte mit $0,15 \times 10^6$ T-HEp3 eGFP-Zellen in Anlehnung an vorpublizierte Daten (Schewe und Aguirre-Ghiso, 2008; Aguirre-Ghiso et al., 2001; Aguirre-Ghiso et al., 1999). Durch Messung der Tumoren in verschiedenen Schnitthöhen konnten für TG1 insgesamt 27 Messwerte und für TG2 (Kontrolle) 19 Messwerte für die T2*-Relaxationszeit ermittelt werden, wobei pro gemessenem Tumor mindestens 4 Messwerte ermittelt wurden.

Die mediane T2*-Relaxationszeit der Primärtumoren von TG2 (Kontrolle) lag bei 4,74 ms (range: 3,17 ms – 49,03 ms), (Abbildung 3-9). Die mediane T2*-Relaxationszeit der gemessenen Primärtumoren von TG1 lag bei 2,63 ms (range: 0,10 ms – 4,78 ms), was einer statistisch signifikanten Verminderung um 44,51 % im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht (Abbildung 3-9). Auch bei einem Einzelvergleich der Primärtumoren jedes untersuchten Individuums von TG1 mit der Kontrollgruppe wird eine statistisch signifikante Verminderung der T2*-Relaxationszeit zwischen 32,98 % (TG1-1 vs. TG2) und 65,36 % (TG1-5 vs. TG2) deutlich (Abbildung 3-10). Bei 3 der 4 gemessenen Tumoren von TG2 lagen die T2*-Relaxationszeiten zwischen 3,17 ms und 5,19 ms (Abbildung 3-10). Ein Tumor von TG2 (TG2-2) zeigte jedoch wesentlich höhere T2*-Relaxationszeiten (Median: 38,47 ms, range: 30,59 ms - 49,03 m, Abbildung 3-10). Wie zu erwarten wurde bei keinem Individuum der TG3 ein Tumor in der kernspintomografischen Untersuchung detektiert. Bei TG1 und TG2 konnten dagegen in allen Fällen Primärtumoren im Bereich der CAM nachgewiesen werden (Abbildung 3-11). Beim Betrachten der T2*-Aufnahmen der Tumoren aus TG1 fällt zudem die verminderte MRT-Signalintensität durch das dunklere Aussehen im Vergleich zu einem Tumor aus TG2 auf (Abbildung 3-11).

Diese Daten zeigen, dass auf die CAM inokulierte T-HEp3 eGFP-Zellen mit Partikelmarkierung *in ovo* anwachsen und zu einer statistisch signifikanten MRT-Signalintensitätsverminderung des Primärtumors führen. Die deutlich höhere T2*-Relaxationszeit des Tumors von TG2-2 weist auf eine große Variabilität im kernspintomografischen Verhalten der Primärtumoren hin, die möglicherweise durch tumorassoziierte Vorgänge wie Nekrosenbildung oder Einblutungen hervorgerufen wird.

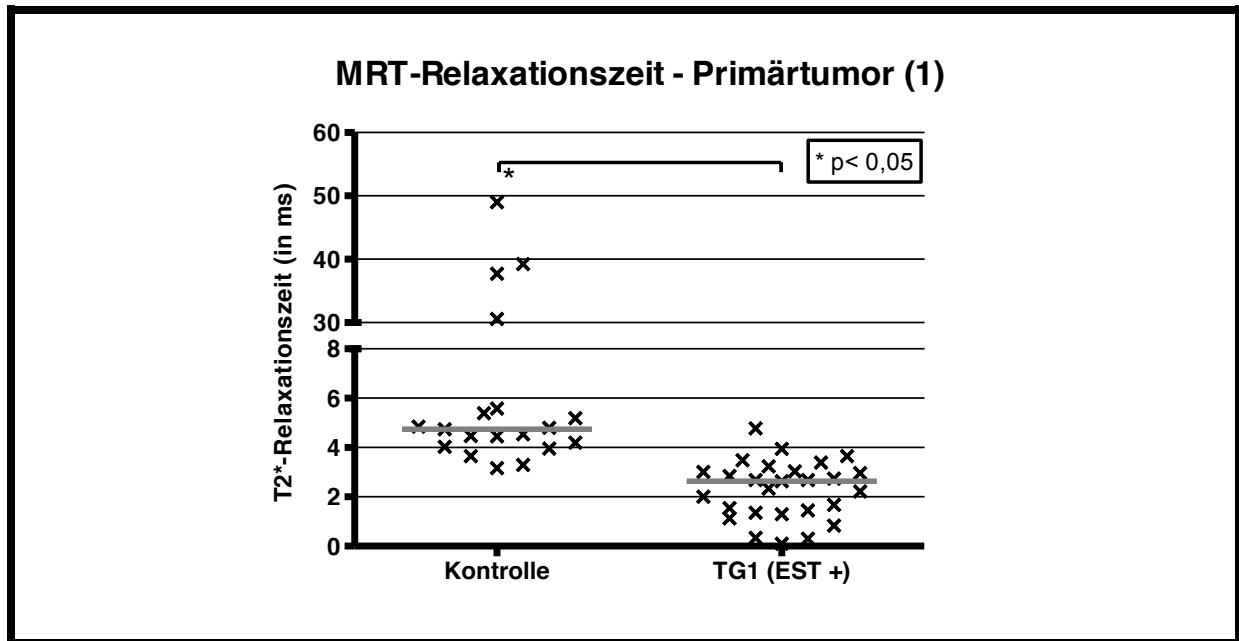


Abbildung 3-9: T2*-Relaxationszeiten der Primärtumoren (Individuen zusammengefasst). Kontrolle → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP Zellen, TG1 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.

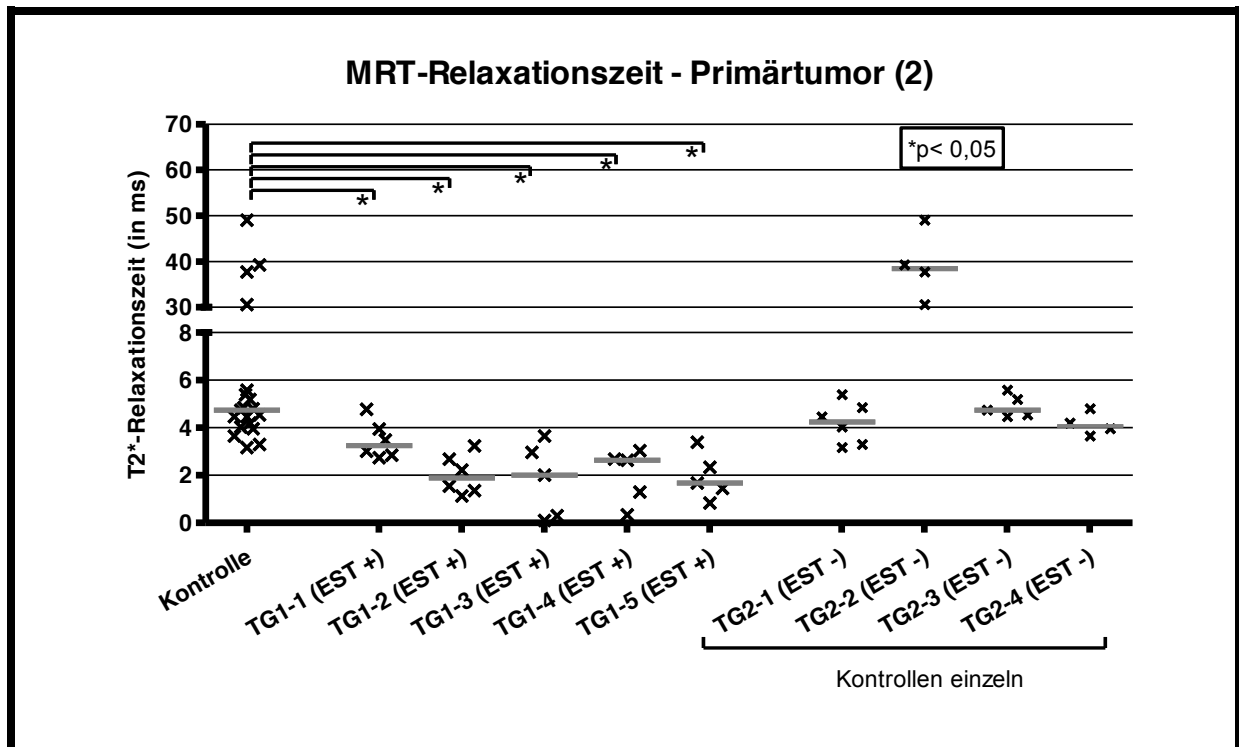


Abbildung 3-10: **T2*-Relaxationszeiten der Primärtumoren (Individuen einzeln)**. Kontrolle (TG2-1 bis TG2-4 zusammengefasst, EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, TG1-1 bis TG1-5 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, TG2-1 bis TG2-4 (EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.

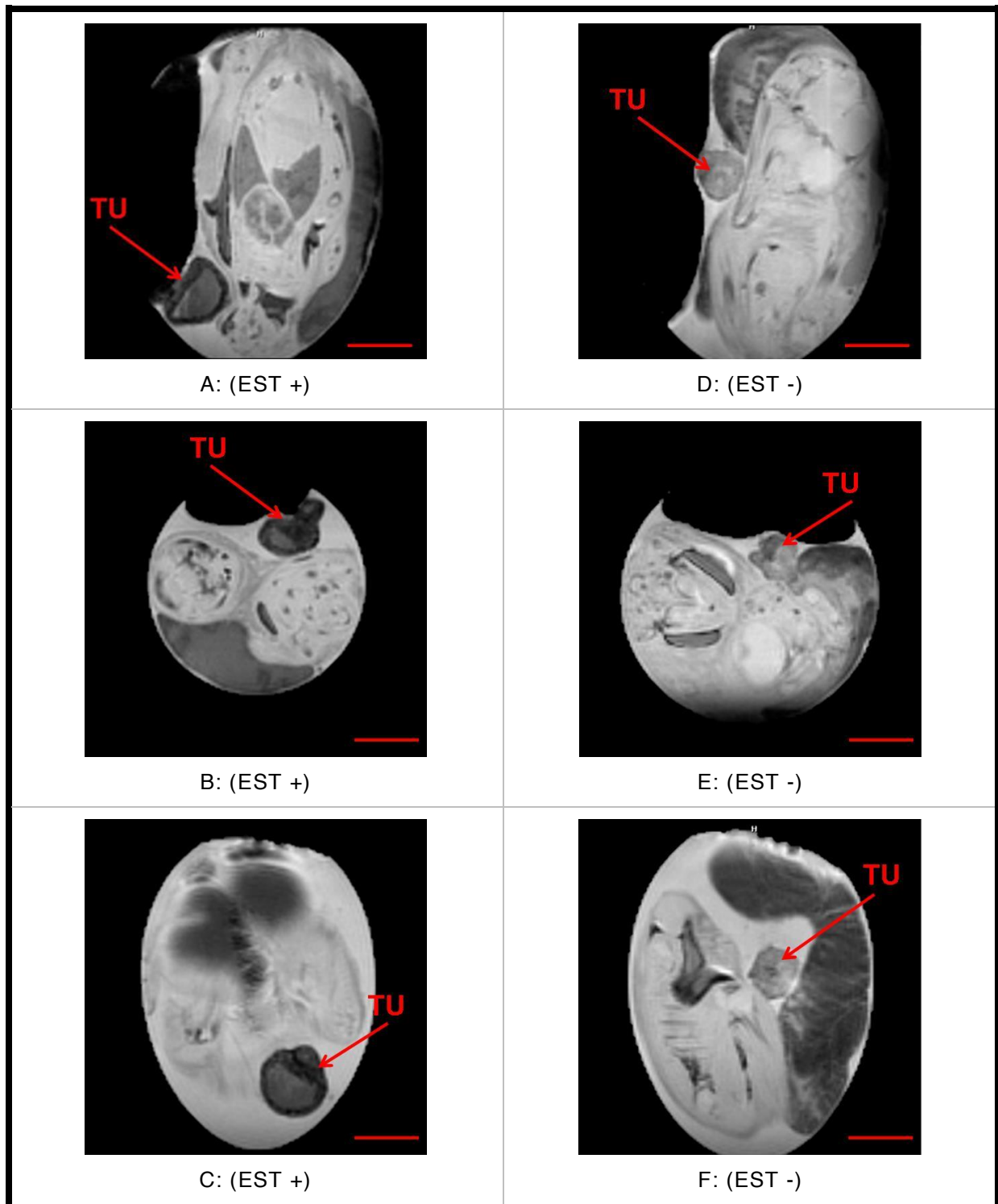


Abbildung 3-11: Gegenüberstellung der MRT-Aufnahmen eines Primärtumors aus Testgruppe 1 (links) mit einem Tumor aus Testgruppe 2 (Kontrolle, rechts). (A-C): (EST+): Testgruppe 1 → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, (D-F): (EST -): Testgruppe 2 → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, (A-F): Lokalisation des Primärtumors auf der abgesenkten CAM, T2*-Messesequenz, Aufnahme in allen 3 Ebenen des Raums, TU: Primärtumor, Länge des Maßstabalkens: 1 cm.

3.4.3. Primärtumor – Korrelation von *in vivo* Magnetresonanztomografie und *post mortem* Analyse

Um beweisen zu können, dass es sich bei den im MRT visualisierten Raumforderungen tatsächlich um Tumoren der inokulierten T-HEp3 eGFP-Zellen handelt, wurden die Primärtumoren am Entwicklungstag E18 entnommen und aufgearbeitet. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern die Partikelmarkierung die Tumorcharakteristika, wie Tumorgewicht und Zellzahl, beeinflusst. Von jedem Tumor wurden dafür Gewicht, Volumen und Zellzahl bestimmt (Abbildung 3-12, A-D). Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Partikelmarkierung *in vivo* für mehrere Tage anhält. Die erhobenen Daten wurden anschließend mit den MRT-Befunden korreliert. Dabei sollte herausgestellt werden, ob MRT-Signalintensitätsverminderung und *post mortem* Partikelnachweis in TG1 miteinander einhergehen.

Das Körpergewicht lag für TG1 bei durchschnittlich 13,56 g (range: 10,78 g – 16,19 g), für TG2 bei durchschnittlich 16,10 g (range: 13,85 g – 17,17 g) und für TG3 bei durchschnittlich 15,63 g (range: 14,38 g – 16,34 g) (Abbildung 3-12, A). Beim Körpergewicht ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Testgruppen (Abbildung 3-12, A). Bei allen Individuen von TG1 und TG2 konnten im Bereich der CAM makroskopisch solide Tumoren ausgemacht werden. Demgegenüber fanden sich bei TG3 keine Tumoren. Das durchschnittliche Gewicht der freipräparierten Tumoren von TG1 lag bei 0,58 g (range: 0,39 g – 0,75 g, Abbildung 3-12, B). Das durchschnittliche Gewicht der Tumoren von TG2 lag bei 0,54 g (range: 0,33 g – 0,87 g), (Abbildung 3-12, B). Ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Tumormasse konnte zwischen TG1 und TG2 nicht beobachtet werden (Abbildung 3-12, A). Auch beim Tumolvolumen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Testgruppen (Abbildung 3-12, C). Fluoreszenzmikroskopisch konnten in allen aufgearbeiteten Tumoren von TG1 und TG2 T-HEp3 eGFP-Zellen ausgemacht werden (Abbildung 3-12, D). Die T-HEp3 eGFP-Zellzahlen lagen bei TG1 zwischen $6,8 \times 10^6$ und $23,7 \times 10^6$ (Abbildung 3-12, D). Bei TG2 lagen die T-HEp3 eGFP-Zellzahlen zwischen $2,9 \times 10^6$ und $18,7 \times 10^6$, wobei sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TG1 und TG2 zeigte (Abbildung 3-12, D). In allen Primärtumoren von TG1 konnten mikroskopisch Eisenpartikel nachgewiesen werden (Abbildung 3-13, A-E). In den Primärtumoren von TG2 fanden sich dagegen keine Eisenpartikel (Abbildung 3-13, A-E).

Sowohl kernspintomografisch als auch *post mortem* konnten in allen Individuen von TG1 und TG2 Primärtumoren nachgewiesen werden (Tabelle 3-2). In TG3 konnten sowohl im MRT als auch *post mortem* keine Primärtumoren gefunden werden (Tabelle 3-2). Des Weiteren konnten in den Primärtumoren von TG1, die eine statistisch signifikante MRT-Signalintensitätsverminderung aufwiesen, auch Eisenpartikel *post mortem* nachgewiesen werden (Tabelle 3-2).

Diese Daten zeigen, dass es sich bei den im MRT visualisierten Raumforderungen um Tumoren, bestehend aus T-HEp3 eGFP Zellen handelt. Des Weiteren lässt sich aus den gewonnenen Daten schlussfolgern, dass das Gesamtkörpergewicht sowie die Tumormasse, Tumorgröße und Tumorzellzahl nicht signifikant durch die Partikelmarkierung beeinflusst werden. Zudem belegen die Daten, dass die Partikelmarkierung der an Tag E10 inokulierten T-HEp3 eGFP-Zellen bis Tag E18, und somit für mindestens 8 Tage, *in vivo* anhält. Es lässt sich außerdem eine Korrelation zwischen der MRT-Signalabschwächung und dem Eisenpartikelnachweis bei allen Individuen von TG1 feststellen. Dies unterstützt die Hypothese, dass die MRT-Signalabschwächung bei TG1 auf die Partikelmarkierung der T-HEp3 eGFP-Zellen zurückzuführen ist.

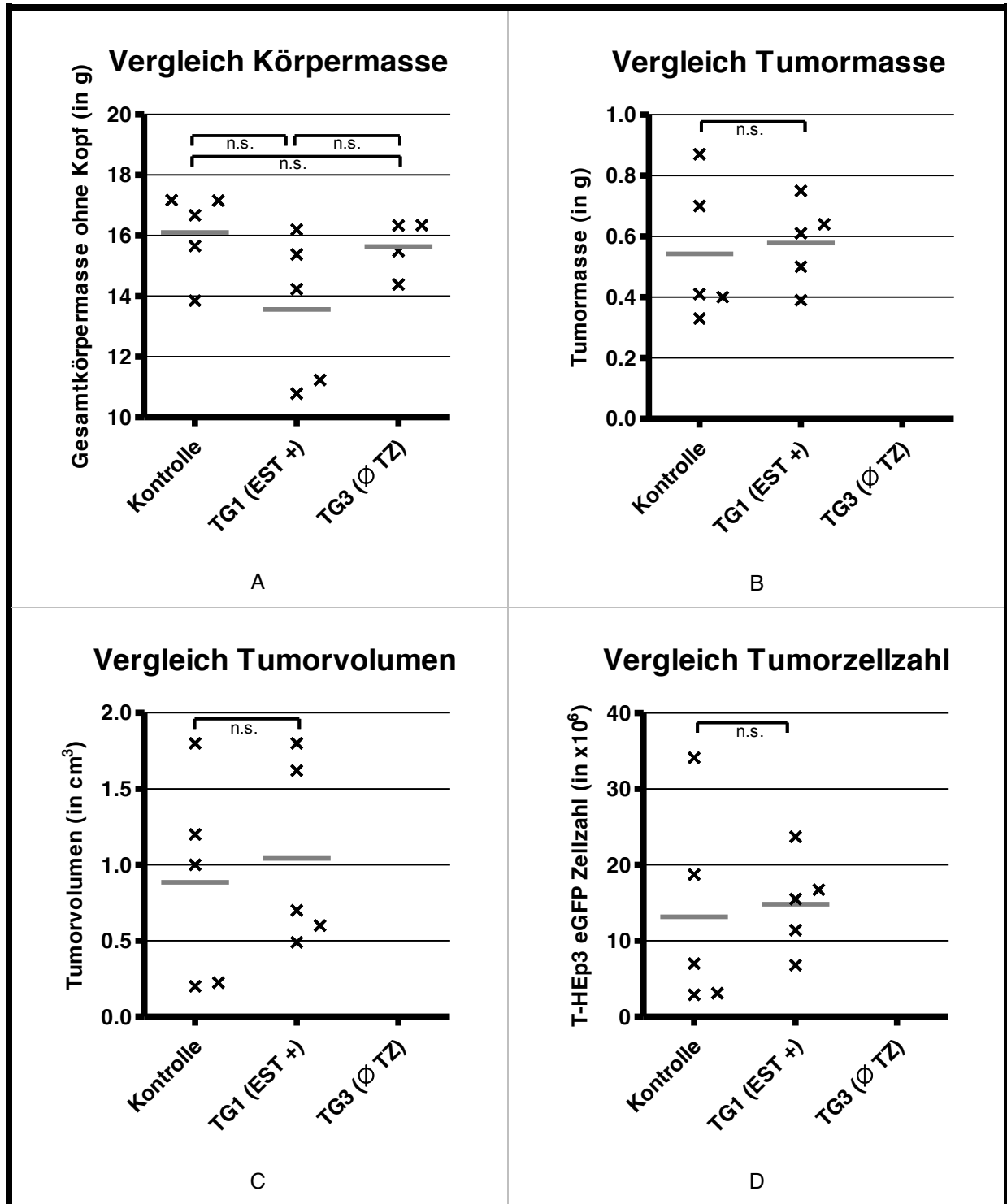


Abbildung 3-12: **Zusammenfassung: *post mortem* Analyse der Primärtumoren.** (A): Gesamtkörpermasse, (B): Tumormasse, (C): Tumorummen, (D): Tumorzellzahl, (A-D): TG: Testgruppe, EST: EST-Eisenoxidpartikel, TZ: Tumorzellen, n.s.: nicht signifikant, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.

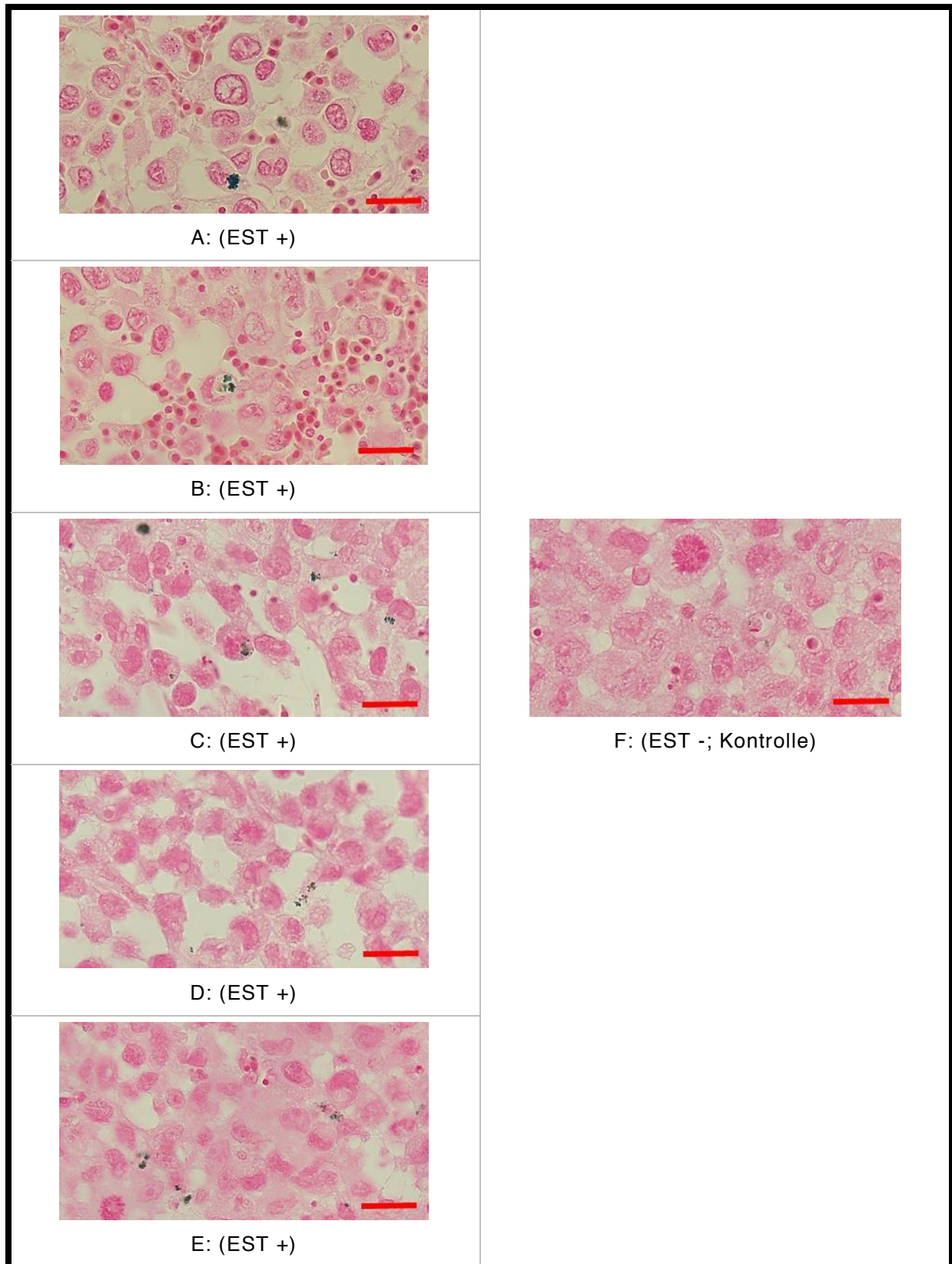


Abbildung 3-13: **Gewebeschnitte der Primärtumoren.** (A): TG1-1, (B): TG1-2, (C): TG1-3, (D): TG1-4, (E): TG1-5, (F): TG2-1 (Kontrolle), (A-F): Berliner-Blau-Färbung, angefertigt durch die Sektion für Kinderpathologie, Institut für Pathologie der CAU Kiel, Dr. C. Vokuhl, TG: Testgruppe, EST: EST-Eisenoxidpartikel, Länge des Maßstab balkens: 20 μm .

TG	Individuum	Tumor MRT	Tumor <i>post mortem</i>	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP)	A: Signifikante MRT-Signalabschwächung	B: Nachweis Eisenpartikel (EST)	Korrelation A=B
1	gesamt	+	+	+	+	+	+
	TG1-1	+	+	+	+	+	+
	TG1-2	+	+	+	+	+	+
	TG1-3	+	+	+	+	+	+
	TG1-4	+	+	+	+	+	+
	TG1-5*	+	+	+	+	+	+
2	gesamt	+	+	+	Kontrolle	-	X
	TG2-1	+	+	+		-	
	TG2-2	+	+	+		-	
	TG2-3	+	+	+		-	
	TG2-4	+	+	+		-	
	TG2-5*	+	+	+		-	
3	gesamt	-	-	X	X	X	
	TG3-1	-	-				
	TG3-2	-	-				
	TG3-3	-	-				
	TG3-4*	-	-				

Tabelle 3-2: Korrelation von *in vivo* MRT und *post mortem* Analyse der Primärtumoren. TG: Testgruppe, *Bestimmung der T2*-Relaxationszeit aufgrund von Bewegungsartefakten nicht möglich (betrifft alle Organe außer den Primärtumor bei TG1-5).

3.4.4. Knochenmark – in vivo Magnetresonanztomografie

Im Versuch dieses Kapitels sollte untersucht werden, ob sich eine Disseminierung von partikelmarkierten Tumorzellen in das Knochenmark im *in vivo* MRT nachweisen lässt. Dazu wurde die MRT-Signalintensität des Knochenmarkraums von Femur und Tibia aus TG1 (Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen) mit der Kontrollgruppe (TG3: keine Tumorzellen) verglichen. Der mögliche Nachweis einer MRT-Signalabschwächung bei TG1 im Vergleich zur Kontrollgruppe könnte dabei auf partikelmarkierte dissemierte Tumorzellen im Knochenmark zurückzuführen sein. Um zu verdeutlichen, dass nicht die Tumorzellen selbst, sondern deren Eisenmarkierung die MRT-Signalintensitätsverminderung bewirkt, wurde TG2 (Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ unmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen) mit der Kontrollgruppe verglichen. Zunächst wurden alle erhobenen Messwerte von TG1 und TG2 zusammengefasst und mit den zusammengefassten Messwerten der Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 3-14). Anschließend wurden die Messwerte jedes einzelnen Individuums von TG1 und TG2 mit den zusammengefassten Messwerten der Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 3-15). Durch die Messung in verschiedenen Schnitthöhen konnten pro Markraum mindestens 3 Messwerte für die T2*-Relaxationszeit ermittelt werden (Ausnahme: Für KM 1 konnten aufgrund der anatomischen Verhältnisse nur 2 Messwerte ermittelt werden). Aufgrund von Bewegungsartefakten konnten für die Individuen TG1-5, TG2-5 und TG3-4 keine T2*-Relaxationszeiten bestimmt werden.

Die mediane T2*-Relaxationszeit der Kontrollgruppe (TG3) lag bei 3,51 ms (range: 2,33 ms – 5,67 ms, Abbildung 3-14). Die mediane T2*-Relaxationszeit von TG1 lag bei 2,49 ms (range: 1,00 ms – 2,74 ms), was einer statistisch signifikanten Verminderung um 29,06 % im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht (Abbildung 3-14). Die mediane T2*-Relaxationszeit von TG2 lag bei 3,53 ms (range: 1,40 ms – 5,71 ms), was keiner statistisch signifikanten Verminderung im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht (Abbildung 3-14). Auch bei einem Einzelvergleich der Markräume jedes untersuchten Individuums von TG1 mit der zusammengefassten Kontrollgruppe wurde jeweils eine statistisch signifikante Verminderung der T2*-Relaxationszeit deutlich (Abbildung 3-15). Bei der Auswertung der einzelnen Individuen von TG2 zeigte sich in keinem Fall eine statistisch signifikante T2*-Relaxationszeitverminderung im Vergleich zur zusammengefassten Kontrollgruppe (Abbildung 3-15). Es lässt sich schlussfolgern, dass es bei TG1 sowohl bei zusammengefassten Individuen (Abbildung 3-14) als auch in der Einzelbetrachtung der Individuen (Abbildung 3-15) zu einer signifikanten

Verminderung der MRT-Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Bei TG2 wurde dagegen kein statistisch signifikanter Unterschied der MRT-Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Abbildung 3-14, 3-15).

Die Daten zeigen, dass eine Inokulation mit partikelmarkierten Zellen zu einer statistisch signifikanten MRT-Signalabschwächung des Knochenmarkraums führt. Da TG2 keine MRT-Signalabschwächung im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die T2*-Signalverminderung nicht durch die Tumorzellen selbst, sondern durch deren Partikelmarkierung hervorgerufen wurde. Die Daten unterstützen somit die Hypothese, dass eine Tumorzell dissemination von partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen in das Knochenmark im *in vivo* MRT nachweisbar ist, vorausgesetzt die Tumorzell dissemination wird in der *post mortem* Analyse nachgewiesen. Des Weiteren lässt sich schlussfolgern, dass ein *in vivo* MRT-Nachweis einer Knochenmark-Disseminierung von unmarkierten Tumorzellen unter den getesteten Bedingungen nicht möglich ist.

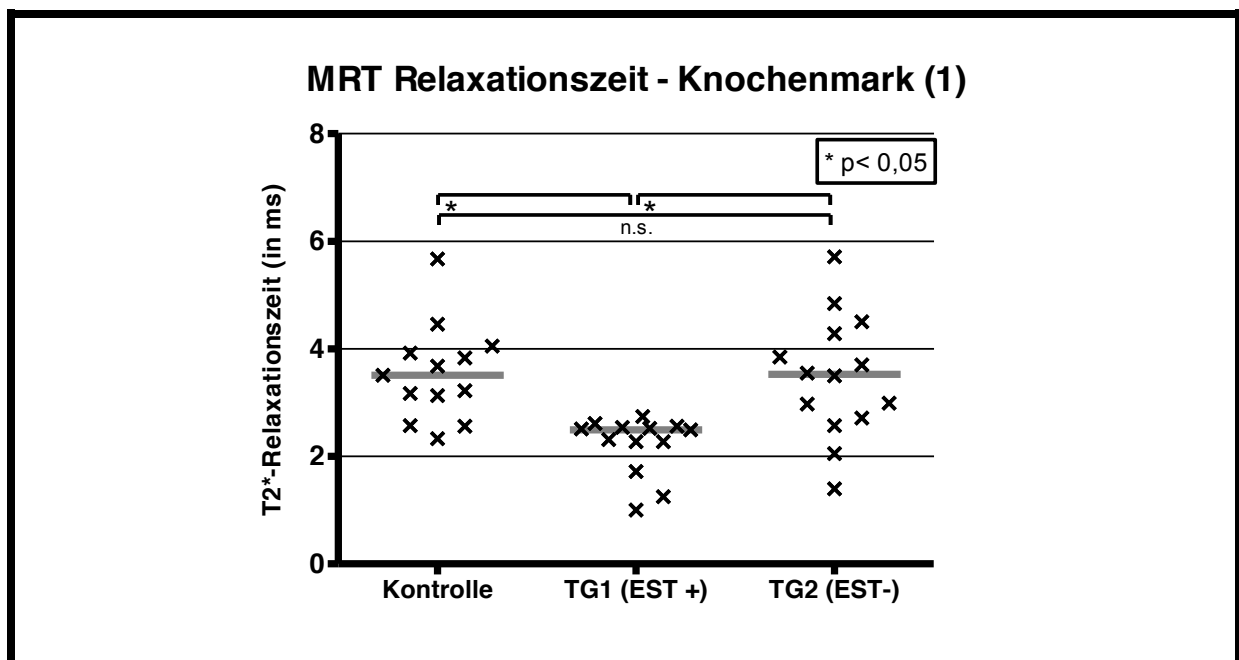


Abbildung 3-14: **Vergleich der T2*-Relaxationszeiten der Markräume von Femur und Tibia (Individuen zusammengefasst)**. Kontrolle → keine Inokulation von Tumorzellen, TG1 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, TG2 (EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, n.s.: Nicht signifikant, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.

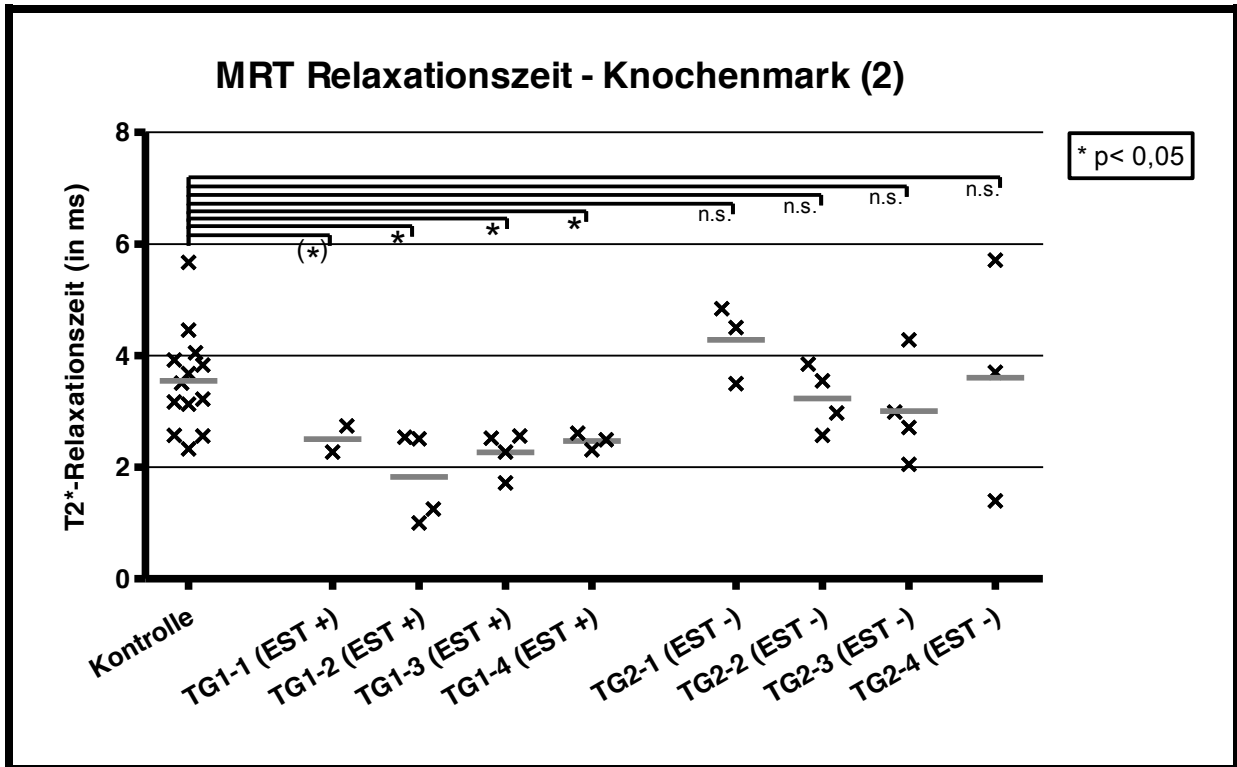


Abbildung 3-15: Vergleich der T2*-Relaxationszeiten der Markräume von Femur und Tibia (Individuen einzeln). Kontrolle → keine Inokulation von Tumorzellen, TG1 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, TG2 (EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, n.s.: Nicht signifikant, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig, (*): Das Signifikanzniveau bei TG1-1 ist aufgrund von nur 2 Messwerten eingeschränkt aussagekräftig.

3.4.5. Knochenmark – Korrelation von in vivo Magnetresonanztomografie und post mortem Analyse

Um eine Knochenmark Disseminierung von Tumorzellen *post mortem* nachzuweisen, sollten im Knochenmark vorhandene T-HEp3 eGFP-Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Tabelle 3-3). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die in das Knochenmark disseminierten Tumorzellen ihre Partikelmarkierung beibehalten und somit für die beobachtete MRT-Signalabschwächung der Knochenmarkräume von TG1 verantwortlich sind. Dazu wurde ein Eisenpartikelnachweis mittels Berliner-Blau-Färbung durchgeführt (Tabelle 3-4). Die erhobenen Daten aus der *post mortem* Analyse wurden anschließend mit den *in vivo* MRT-Befunden verglichen. Dabei sollte untersucht werden, ob MRT-Signalintensitätsverminderung und *post mortem* Partikelnachweis miteinander korrelieren (Tabelle 3-5).

Fluoreszenzmikroskopisch konnten in allen aufgearbeiteten Knochenmarksproben von TG1 und TG2 T-HEp3 eGFP-Zellen ausgemacht werden (Tabelle 3-3). In den Proben von TG3

konnten dagegen keine Tumorzellen detektiert werden (Tabelle 3-3). Der mikroskopische Nachweis von Eisenpartikeln war bei allen untersuchten Individuen von TG1 positiv (Tabelle 3-4). In den Gewebeschnitten von TG1 wurden allerdings wenige Eisenpartikel ausgemacht (Tabelle 3-4, A). Das deutet auf eine geringe Partikelkonzentration im Knochenmark von TG1 *post mortem* hin. Der Eisennachweis in TG2 und TG3 war negativ (Tabelle 3-4, B, C). Zusammenfassend wurden Tumorzellen in allen Individuen von TG1 und TG2 nachgewiesen. Eisenpartikel konnten in allen Individuen von TG1 in geringer Menge nachgewiesen werden. Bei allen Individuen von TG1 konnte somit eine MRT-Signalabschwächung in Verbindung mit einem positiven *post mortem* Partikelnachweis beobachtet werden (Tabelle 3-5). Bei TG2 waren MRT-Signalabschwächung und Partikelnachweis jeweils negativ (Tabelle 3-5). Es liegt somit bei allen untersuchten Individuen eine Korrelation zwischen MRT-Signalabschwächung und *post mortem* Partikelnachweis vor.

Die Daten belegen, dass bei allen Individuen von TG1 und TG2 eine Tumorzell dissemination in das Knochenmark stattgefunden hat. Zudem unterstützt die Korrelation zwischen MRT-Signalabschwächung und positivem Partikelnachweis in TG1 die Hypothese, dass die beobachtete T2*-Relaxationszeitverminderung durch die partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen hervorgerufen wurde. Das lässt den Schluss zu, dass eine Tumorzell dissemination von partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen in das Knochenmark *in vivo* kernspintomografisch nachweisbar ist. Der positive Nachweis von T-HEp3 eGFP-Zellen in TG2 bei gleichzeitig nicht vorhandener MRT-Signalveränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe spricht gegen einen direkten Einfluss der (unmarkierten) T-HEp3 eGFP-Zellen auf die kernspintomografische Signalintensität.

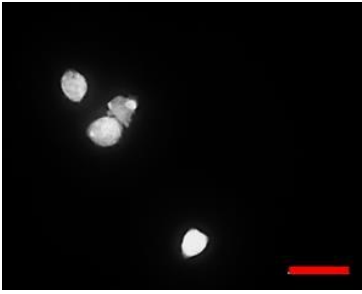
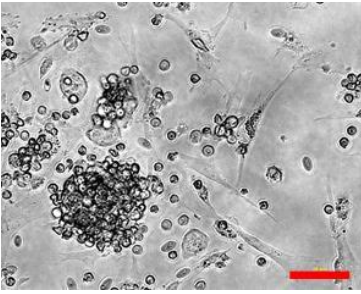

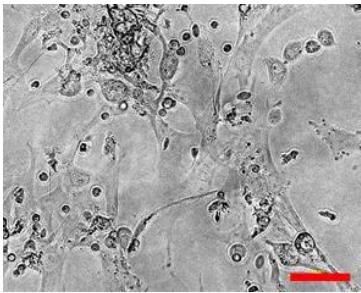

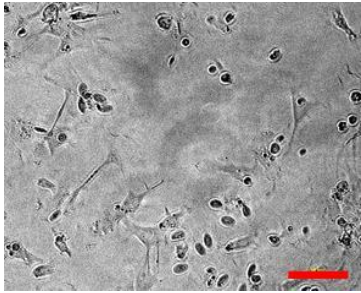
TG	Individuum	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP)	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP): Exemplarische Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie	
1	TG1-1	+	 <p>A</p>	 <p>B</p>
	TG1-2	+		
	TG1-3	+		
	TG1-4	+		
	TG1-5	+		
2	TG2-1	+	 <p>C</p>	 <p>D</p>
	TG2-2	+		
	TG2-3	+		
	TG2-4	+		
	TG2-5	+		
3	TG3-1	-	 <p>E</p>	 <p>F</p>
	TG3-2	-		
	TG3-3	-		
	TG3-4	-		

Tabelle 3-3: **Übersicht – *post mortem* Nachweis von T-HEp3 eGFP-Zellen im Knochenmark.** (A): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TG1-1, (B): Lichtmikroskopische Aufnahme von TG1-1, (C): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TG2-1, (D): Lichtmikroskopische Aufnahme von TG2-1, (E): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TG3-1 (Kontrolle, keine Tumorzellen vorhanden), (F): Lichtmikroskopische Aufnahme von TG3-1, (A-F): TG: Testgruppe, Länge des Maßstabbalkens entspricht 50 μm .

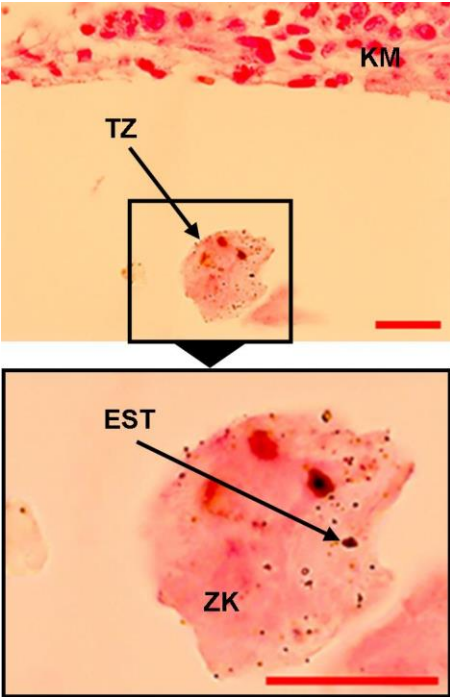
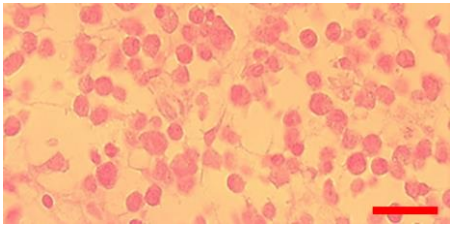
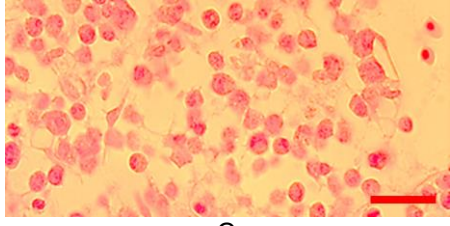
TG	Individuum	Nachweis Eisenpartikel (EST)	Nachweis Eisenpartikel (EST): Exemplarische Aufnahmen der Gewebeschnitte
1	TG1-1	(+)	 <p style="text-align: center;">A</p>
	TG1-2	(+)	
	TG1-3	(+)	
	TG1-4	(+)	
	TG1-5	(+)	
2	TG2-1	-	 <p style="text-align: center;">B</p>
	TG2-2	-	
	TG2-3	-	
	TG2-4	-	
	TG2-5	-	
3	TG3-1	-	 <p style="text-align: center;">C</p>
	TG3-2	-	
	TG3-3	-	
	TG3-4	-	

Tabelle 3-4: **Übersicht – *post mortem* Nachweis von EST-Partikeln im Knochenmark.** (A): Aufnahme von TG1-4 mit Vergrößerung einer EST-markierten Tumorzelle, EST: EST-Eisenoxidpartikel, TZ: Tumorzelle, ZK: Zellkern, KM: Knochenmark, (B): Aufnahme von TG2-1, (C): Aufnahme von TG3-2, (A-C): TG: Testgruppe, Länge des Maßstabalkens entspricht 20 μm .

TG	Individuum	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP)	A: signifikante MRT Signalabschwächung	B: Nachweis Eisenpartikel (EST)	Korrelation A=B
1	gesamt	+	+	(+)	+
	TG1-1	+	(+)**	(+)	+
	TG1-2	+	+	(+)	+
	TG1-3	+	+	(+)	+
	TG1-4	+	+	(+)	+
	TG1-5*	+	Bewegungsartefakte	(+)	?
2	gesamt	+	-	-	+
	TG2-1	+	-	-	+
	TG2-2	+	-	-	+
	TG2-3	+	-	-	+
	TG2-4	+	-	-	+
	TG2-5*	+	Bewegungsartefakte	-	?
3	gesamt	-	Kontrolle	-	X
	TG3-1	-		-	
	TG3-2	-		-	
	TG3-3	-		-	
	TG3-4*	-		Bewegungsartefakte	

Tabelle 3-5: **Zusammenfassung – Korrelation von *in vivo* MRT und *post mortem* Analyse des Knochenmarks.** TG: Testgruppe, *Bestimmung der T2*-Relaxationszeit aufgrund von Bewegungsartefakten nicht möglich (ausgenommen Primärtumor bei TG1-5), **das Signifikanzniveau bei TG1-1 ist aufgrund von nur zwei erhobenen Messwerten eingeschränkt aussagekräftig.

3.4.6. Leber – Korrelation von in vivo Magnetresonanztomografie und post mortem Analyse

Es stellt sich die Frage, ob eine hepatische Disseminierung von partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen kernspintomografisch nachweisbar ist. Dazu wurden die MRT-Signalintensitäten der Leberaufnahmen, wie im Kapitel 3.4.4. beschrieben, gegenübergestellt (Abbildung 3-16 und 3-17). Zudem sollte die möglicherweise stattgefundenen hepatische Tumorzeldisseminierung *post mortem* nachgewiesen werden. Dazu wurden histologische Schnitte der entnommenen Lebern ausgewertet (angefertigt durch das Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Dr. C. Vokuhl, Tabelle 3-6). Es wurde zudem die Hypothese untersucht, dass hepatisch disseminierte T-HEp3 eGFP-Zellen ihre Partikelmarkierung beibehalten und somit eine messbare MRT-Signalabschwächung der Leber hervorrufen. Dazu wurden die MRT-Daten aus TG1 mit den Ergebnissen des *post mortem* Eisennachweises korreliert (Tabelle 3-6, 3-7).

Die mediane T2*-Relaxationszeit der Lebern von TG3 (Kontrolle) lag bei 3,51 ms (range: 2,58 ms – 6,74 ms, Abbildung 3-16). Die mediane T2*-Relaxationszeit von TG1 lag bei 2,95 ms (range: 2,08 ms – 4,91 ms), was einer nicht statistisch signifikanten Verminderung um 15,95 % ($p=0,0588$) im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht (Abbildung 3-16). Ein statistisch signifikanter Unterschied der T2*-Relaxationszeiten zwischen TG2 und der Kontrollgruppe konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Abbildung 3-16). Es konnte allerdings eine statistisch signifikante T2*-Relaxationszeitabnahme bei TG1 im Vergleich zu TG2 beobachtet werden (Abbildung 3-16). Bei einem Einzelvergleich der Lebern von TG1 und TG2 mit der zusammengefassten Kontrollgruppe zeigte sich bei den Individuen TG1-2 und TG2-3 eine statistisch signifikante Verminderung der T2*-Relaxationszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3-17). Es lässt sich zusammenfassen, dass eine Tendenz zu verminderten T2*-Relaxationszeiten bei TG1 im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu TG2 besteht. In der Einzelbetrachtung der Individuen lässt sich diesbezüglich nicht durchgehend eine statistische Signifikanz nachweisen. Mikroskopisch konnten in allen aufgearbeiteten Lebern von TG1 und TG2 T-HEp3 eGFP-Zellen ausgemacht werden (Tabelle 3-6). In den Lebern von TG3 konnten dagegen keine Tumorzellen detektiert werden (Tabelle 3-6). Der mikroskopische Nachweis von Eisenpartikeln war bei allen untersuchten Individuen von TG1 positiv (Tabelle 3-7). Dagegen war der Eisennachweis in TG2 und TG3 negativ (Tabelle 3-7).

Die Daten zeigen, dass eine hepatische Disseminierung von T-HEp3 eGFP-Zellen stattgefunden hat. Zudem lassen die Daten den Schluss zu, dass die disseminierten Tumorzellen von TG1 ihre Partikelmarkierung beibehalten haben. Der kernspintomografische Nachweis der hepatischen Disseminierung von partikelmarkierten Tumorzellen konnte allerdings nicht mit statistischer Signifikanz erbracht werden. Es besteht eine Tendenz zu verminderten T2*-Relaxationszeiten in den Lebern von TG1, die auf die dort nachgewiesenen partikelmarkierten Tumorzellen zurückzuführen sein könnten.

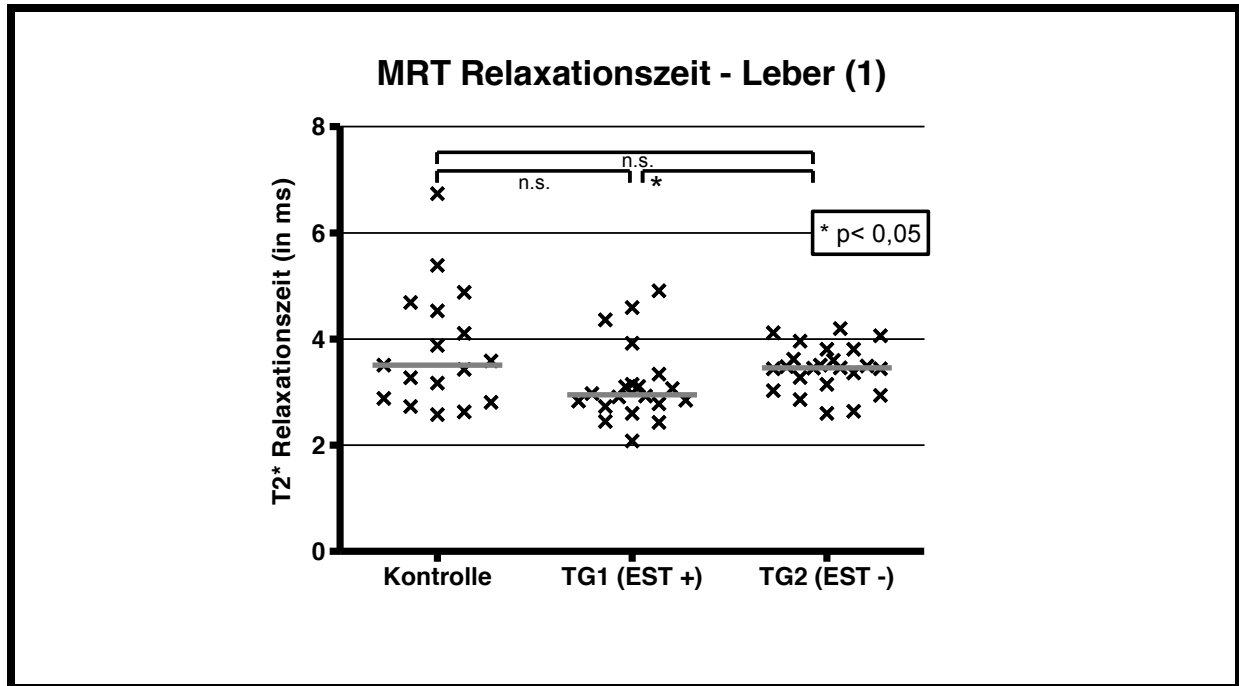


Abbildung 3-16: **Vergleich der T2*-Relaxationszeiten der Lebern (Individuen zusammengefasst)**. Kontrolle → keine Inokulation von Tumorzellen, TG1 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, TG2 (EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, n.s.: Nicht signifikant, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.

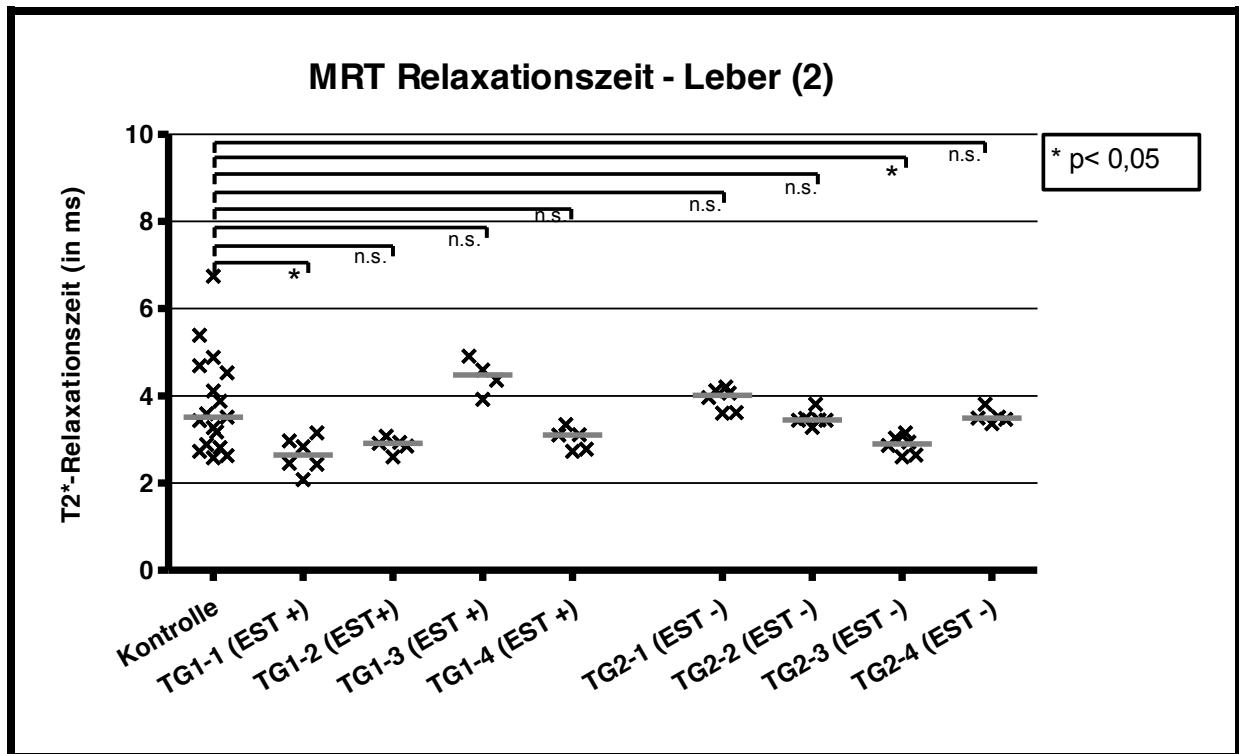


Abbildung 3-17: **Vergleich der T2*-Relaxationszeiten der Lebern (Individuen einzeln).** Kontrolle → keine Inokulation von Tumorzellen, TG1 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen), TG2 (EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, n.s.: Nicht signifikant, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.

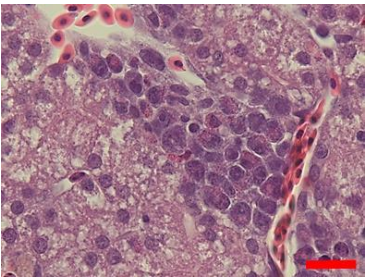
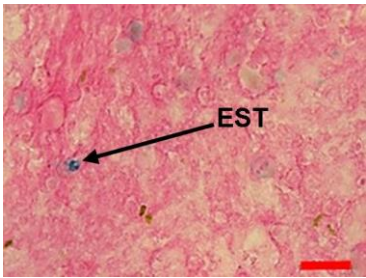
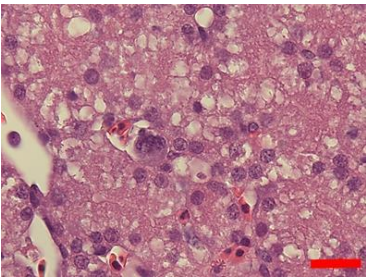
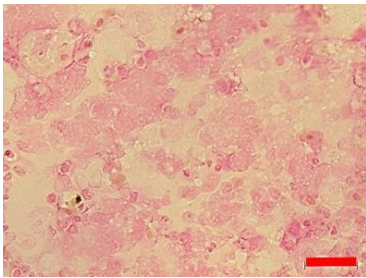
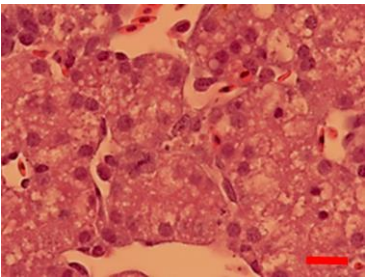
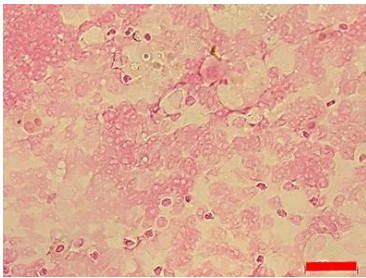
TG	Individuum	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP)	Nachweis Eisenpartikel (Cytospin)	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP): Exemplarische Aufnahmen der Gewebeschnitte	Nachweis Eisenpartikel (EST): Exemplarische Aufnahmen der zytologischen Präparate
1	TG1-1	+	+	 A	 D
	TG1-2	+	+		
	TG1-3	+	+		
	TG1-4	+	+		
	TG1-5	+	+		
2	TG2-1	+	-	 B	 E
	TG2-2	+	-		
	TG2-3	+	-		
	TG2-4	+	-		
	TG2-5	+	-		
3	TG3-1	-	-	 C	 F
	TG3-2	-	-		
	TG3-3	-	-		
	TG3-4	-	-		

Tabelle 3-6: **Übersicht – post mortem Nachweis von T-HEp3 eGFP-Zellen und EST-Partikeln in der Leber.** (A): Aufnahme von TG1-1, (B): Aufnahme von TG2-1, (C): Aufnahme von TG3-1, (A-C): Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Gewebeschnitte angefertigt durch das Institut für Pathologie der CAU Kiel, Dr. C. Vokuhl, (D): Aufnahme von TG1-1, (E): Aufnahme von TG2-1, (F): Aufnahme von TG3-1, (D-F): Berliner-Blau-Färbung zytologischer Präparate (Cytospin), (A-F): TG: Testgruppe, EST: EST-Partikel, Länge des Maßstabalkens entspricht 20 μm .

TG	Individuum	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP)	A: signifikante MRT- Signalabschwächung	B: Nachweis Eisenpartikel (EST)	Korrelation A=B
1	gesamt	+	-	+	-
	TG1-1	+	+	+	+
	TG1-2	+	-	+	-
	TG1-3	+	-	+	-
	TG1-4	+	-	+	-
	TG1-5*	+	Bewegungsartefakte	+	?
2	gesamt	+	-	-	+
	TG2-1	+	-	-	+
	TG2-2	+	-	-	+
	TG2-3	+	+	-	-
	TG2-4	+	-	-	+
	TG2-5*	+	Bewegungsartefakte	-	?
3	gesamt	-	Kontrolle	-	X
	TG3-1	-		-	
	TG3-2	-		-	
	TG3-3	-		-	
	TG3-4*	-	Bewegungsartefakte	-	

Tabelle 3-7: **Zusammenfassung – Korrelation von *in vivo* MRT und *post mortem* Analyse der Leber.** TG: Testgruppe, *Bestimmung der T2*-Relaxationszeit aufgrund von Bewegungsartefakten nicht möglich (ausgenommen Primärtumor bei TG1-5).

3.4.7. Lunge – Korrelation von *in vivo* Magnetresonanztomografie und *post mortem* Analyse

Analog zu Knochenmark und Leber sollte auch bei der Lunge untersucht werden, ob eine pulmonale Streuung von partikelmarkierten T-HEp3 eGFP-Zellen im *in vivo* MRT nachweisbar ist. Dafür wurden die T2*-Relaxationszeiten der drei Testgruppen, wie im Kapitel 3.4.4. beschrieben, verglichen (Abbildung 3-18, 3-19). Durch die Messung in verschiedenen Schnitthöhen konnten pro Individuum mindestens 3 Messwerte für die pulmonale T2*-Relaxationszeit ermittelt werden. Auch die Lunge wurde als Zielorgan einer möglichen Tumorzellmetastasierung untersucht, wobei der *post mortem* Tumorzellnachweis fluoreszenzmikroskopisch erfolgte. Eine mögliche Partikelmarkierung der disseminierten Tumorzellen von TG1 wurde mittels Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen.

Die mediane T2*-Relaxationszeit der Kontrolle lag bei 13,25 ms (range: 9,51 ms – 16,01 ms) (Abbildung 3-18). Die mediane T2*-Relaxationszeit von TG1 wich mit 12,12 ms (range: 7,02 ms – 22,15 ms) nicht statistisch signifikant von der Kontrolle ab (Abbildung 3-18). Auch zwischen TG2, Median bei 11,98 ms (range: 8,76 ms – 17,50 ms), und der Kontrolle war kein signifikanter Unterschied der kernspintomografischen Signalintensität feststellbar (Abbildung 3-18). Die Auswertung der Einzelwerte von TG1 und TG2 im Vergleich zur zusammengefassten Kontrolle erbrachte kein durchgehend statistisch signifikantes Ergebnis (Abbildung 3-19). So zeigten TG1-3 und TG2-1 eine signifikante MRT-Signalverstärkung, während es bei TG1-4 zu einer entsprechenden Verminderung kam (Abbildung 3-19). Es zeigte sich zudem, dass die mediane T2*-Relaxationszeit der Lunge (Median aller Werte: 12,47 ms) insgesamt über den medianen Werten der anderen quantifizierten Organe lag (Primärtumor – Median aller Werte: 3,02 ms; Knochenmark – Median aller Werte: 2,86 ms; Leber – Median aller Werte: 3,35 ms, Abbildungen 3-9 bis 3-19). In der Fluoreszenzmikroskopie konnten in allen aufgearbeiteten Lungen von TG1 und TG2 T-HEp3 eGFP-Zellen ausgemacht werden (Tabelle 3-8). In den Lungen von TG3 konnten dagegen keine Tumorzellen nachgewiesen werden (Tabelle 3-8). Der Nachweis von Eisenpartikeln war bei allen untersuchten Individuen von TG1 positiv (Tabelle 3-8). Keine Eisenoxidpartikel fanden sich hingegen in den Präparaten von TG2 und TG3 (Tabelle 3-8).

Die Daten belegen, dass eine pulmonale Disseminierung von T-HEp3 eGFP-Zellen stattgefunden hat. Es konnte zudem gezeigt werden, dass pulmonal disseminierte Tumorzellen ihre Partikelmarkierung beibehalten. Der *in vivo* MRT-Nachweis einer Streuung von partikelmar-

kierten Tumorzellen in die Lunge konnte allerdings aufgrund der nicht aussagekräftigen MRT-Ergebnisse nicht erbracht werden (Tabelle 3-9). Die vergleichsweise hohen pulmonalen T2*-Relaxationszeiten weisen darauf hin, dass die Struktur des aviären Lungengewebes zu abweichenden kernspintomografischen Eigenschaften im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen führt. Dieser Umstand könnte möglicherweise dazu geführt haben, dass die pulmonale Tumorzell dissemination nicht im *in vivo* MRT nachweisbar war.

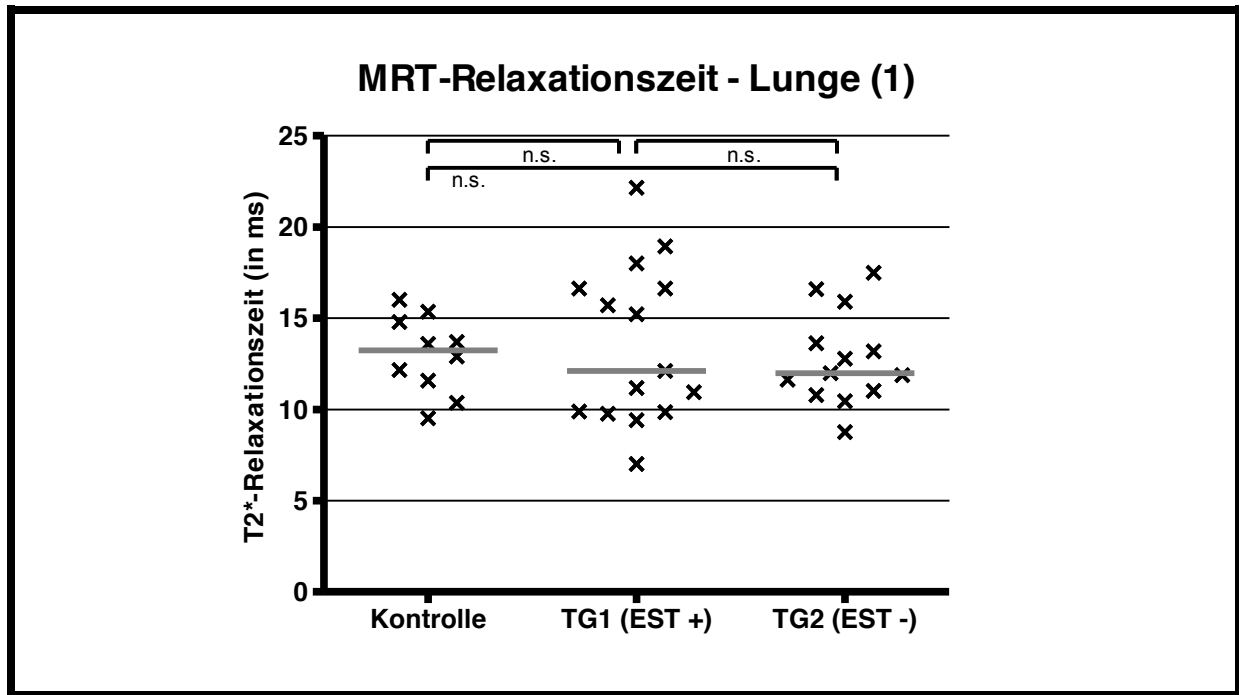


Abbildung 3-18: **Vergleich der T2*-Relaxationszeiten der Lunge (Individuen zusammengefasst)**. Kontrolle → keine Inokulation von Tumorzellen, TG1 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, TG2 (EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen), Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, n.s.: Nicht signifikant, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.

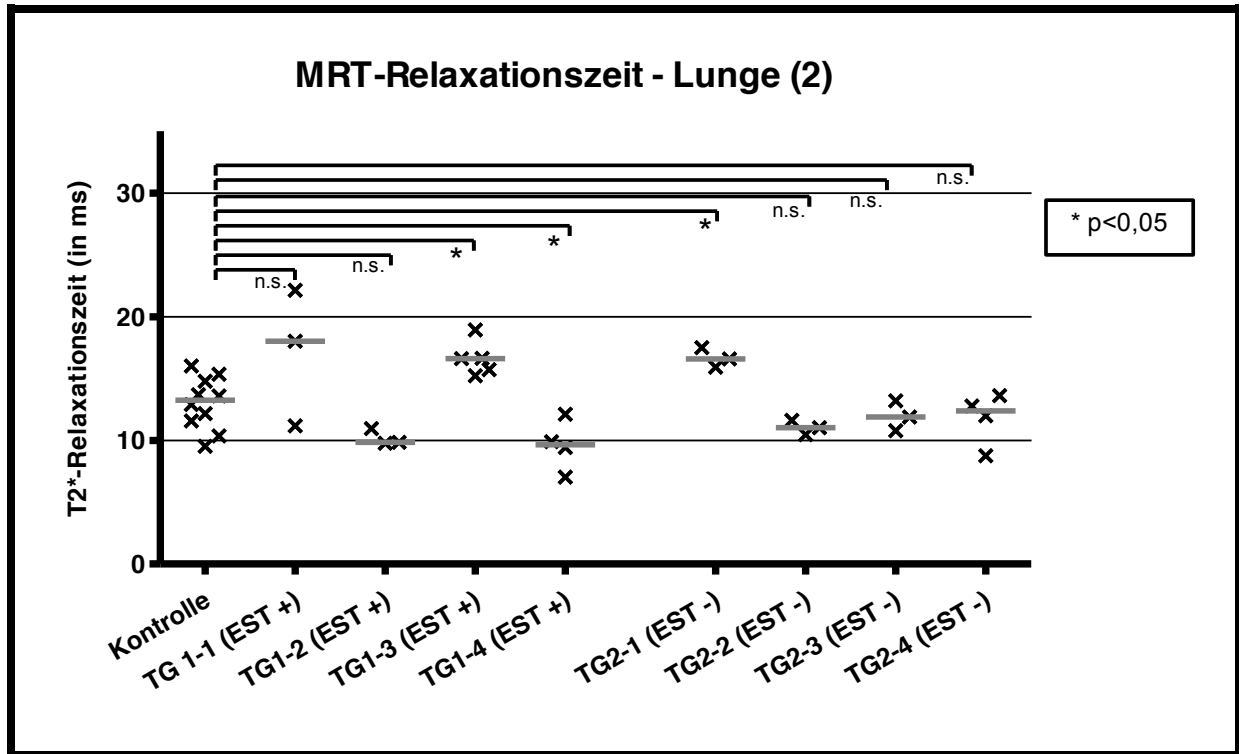


Abbildung 3-19: **Vergleich der T2*-Relaxationszeiten der Lunge (Individuen einzeln).** Kontrolle → keine Inokulation von Tumorzellen, TG1 (EST +) → Inokulation mit $0,15 \times 10^6$ EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen, TG2 (EST -) → $0,15 \times 10^6$ unmarkierte T-HEp3 eGFP-Zellen, Kreuze: Einzelwerte, graue Balken: Median, TG: Testgruppe, n.s.: Nicht signifikant, Berechnung des P-Wertes mit dem "Mann Whitney U-Test", zweiseitig.


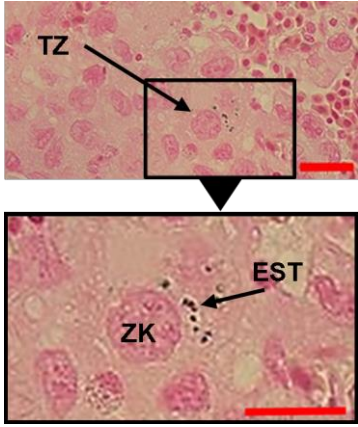
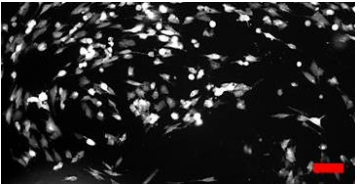
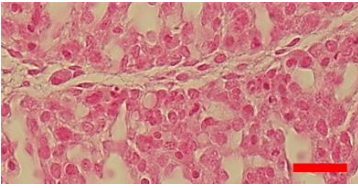

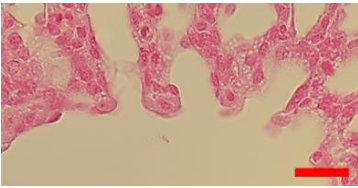
TG	Individuum	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP)	Nachweis Eisenpartikel (EST)	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP): Exemplarische Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie aus Zellkultur	Nachweis Eisenpartikel (EST): Exemplarische Aufnahmen der Gewebeschnitte
1	TG1-1	+	+	 A	 D
	TG1-2	+	+		
	TG1-3	+	+		
	TG1-4	+	+		
	TG1-5*	+	+		
2	TG2-1	+	-	 B	 E
	TG2-2	+	-		
	TG2-3	+	-		
	TG2-4	+	-		
	TG2-5*	+	-		
3	TG3-1	-	-	 C	 F
	TG3-2	-	-		
	TG3-3	-	-		
	TG3-4*	-	-		

Tabelle 3-8: Übersicht – *post mortem* Nachweis von T-HEp3 eGFP-Tumorzellen und EST-Partikeln in der Lunge. (A): TG1-1, (B): TG2-1, (C): TG3-1, (A-C): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, (D): TG1-1, (E): TG2-1, (F): TG3-1, (D-F): Histologische Schnitte (Berliner-Blau-Färbung), (A-F): TG: Testgruppe (A-C): Länge des Maßstabalkens entspricht 20 µm, (D-F): Länge des Maßstabalkens entspricht 100 µm.

TG	Individuum	Nachweis Tumorzellen (T-HEp3 eGFP)	A: signifikante MRT- Signalabschwächung	B: Nachweis Eisenpartikel (EST)	Korrelation A=B
1	gesamt	+	-	+	-
	TG1-1	+	-	+	-
	TG1-2	+	-	+	-
	TG1-3	+	-	+	-
	TG1-4	+	+	+	+
	TG1-5*	+	Bewegungsartefakte	+	?
2	gesamt	+	-	-	+
	TG2-1	+	-	-	+
	TG2-2	+	-	-	+
	TG2-3	+	-	-	+
	TG2-4	+	-	-	+
	TG2-5*	+	Bewegungsartefakte	-	?
3	gesamt	-	Kontrolle	-	X
	TG3-1	-		-	
	TG3-2	-		-	
	TG3-3	-		-	
	TG3-4*	-	Bewegungsartefakte	-	

Tabelle 3-9: **Zusammenfassung – Korrelation von *in vivo* MRT und *post mortem* Analyse der Lunge.** TG: Testgruppe, *Bestimmung der T2*-Relaxationszeit aufgrund von Bewegungsartefakten nicht möglich (ausgenommen Primärtumor bei TG1-5).

4. Diskussion

4.1. Markierung von Tumorzellen mit Eisenoxidpartikeln

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die solide Tumorzelllinie T-HEp3 eGFP langfristig mit Eisenoxidpartikeln markieren lässt. Die Konzentration der Eisenoxidpartikel bei der Zellmarkierung hatte Einfluss auf die Markierungseffektivität, die Zellproliferation und die Zellviabilität. Die Partikelkonzentration konnte so angepasst werden, dass eine anhaltende Zellmarkierung ohne messbaren Einfluss auf die langfristige Zellproliferation und Zellviabilität erreicht wurde. Dies bestätigt die Beobachtungen weiterer Studien, in denen die Markierung von soliden Tumorzellen erprobt wurde. So konnte an weiteren Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (UT-SCC-60A und UT-SCC-60B) eine effektive Partikelmarkierung etabliert werden (Lindemann et al., 2014). Zudem wurde bei steigender Konzentration der Eisenoxidpartikel ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum und das Zellüberleben beobachtet (Lindemann et al., 2014). Die systematische Untersuchung diverser Zelllinien und Partikelentitäten ergab, dass Zellproliferation und -viabilität von der Partikelkonzentration abhängig sind (Soenen et al., 2011). Eine weitere Studie weist auf die biologische Wirkung von Eisenoxidpartikeln im zentralen Nervensystem hin. Konkret konnte gezeigt werden, dass Eisenoxidpartikel das Zellwachstum und die Zellviabilität von Nervenzellen und Mikrogliazellen beeinflussen (Neubert et al., 2015). Es lässt sich zusammenfassen, dass bei dem Ziel einer effektiven Zellmarkierung der Einfluss der exogen zugeführten Eisenpartikel auf die Zellbiologie nicht außer Acht gelassen werden darf.

Eine alternative Methode zur Zellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln ist die endogene Synthese des MRT-Kontrastmittels durch die zu markierenden Zellen selbst. Die genetische Überexpression des endogenen Eisenspeicherproteins Ferritin ermöglicht beispielsweise eine effektive Zellmarkierung (Naumova et al., 2014). Eine weitere Methode, um Zellen mit magnetischen Eigenschaften auszustatten, ist die Nutzung des Gens *MagA* aus dem magnetotaktischen Bakterium *Magnetospirillum magneticum* (Zurkiya et al., 2008). So konnte das *in vivo* Wachstum von *MagA*-exprimierenden und somit kontrastreichen Tumorzellen kernspintomografisch dargestellt werden (Rohani et al., 2014).

Perspektivisch ist auch eine klinische Anwendung der Zellmarkierung durch Eisenoxidpartikel denkbar. Möglich wäre beispielsweise die intravenöse Gabe eines MRT-Kontrastmittels,

das sich selektiv in Tumorzellen anreichert. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit Knochenmarkmetastasierung zu einer verstärkten Aufnahme von Eisenoxidpartikeln in den befallenen Arealen kommt (Kotoura et al., 2011). Weiterhin konnte am Patienten die Demaskierung von Entzündungsherden mithilfe von Eisenoxidpartikeln demonstriert werden, die möglicherweise auf einer erhöhten Phagozytoseaktivität von Makrophagen beruht. So zeigte sich bei Patienten mit septischer Arthritis und Osteomyelitis eine MRT-Signalabschwächung im infizierten Gewebe durch die Nutzung von magnetischen Eisenpartikeln (Neuwelt et al., 2015). Schließlich konnten eisenmarkierte Makrophagen bei Patienten mit Myokardinfarkt im Infarktareal kernspintomografisch nachgewiesen werden (Yilmaz et al., 2013).

4.1.1. Beurteilung der angewandten Quantifizierungsmethode für die Markierungseffektivität und mögliche Alternativen

Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Zellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln verlangte nach einer objektiven Quantifizierungsmethode für die Effektivität der Markierung. Die gewählte Methode unterschied dabei zwischen *nicht markierten* und *markierten* Zellen. Alle Zellen, in denen sich im histologischen Präparat keine zytoplasmatischen Eisenoxidpartikel zeigten, wurden als *nicht markiert* deklariert. Als *markiert* wurden alle Zellen gezählt, die Eisenoxidpartikel enthielten, unabhängig von der Partikelmenge pro Zelle. Es lässt sich vermuten, dass die Markierung einer Zelle mit einer großen Partikelmenge einen größeren Einfluss auf das MRT-Signal hat, als die Markierung einer Zelle mit einer geringen Partikelmenge. Schlussfolgernd bedeutet dies, dass die gewählte Quantifizierungsmethode die tatsächliche Partikelbeladung der Zellen nicht exakt misst, sondern der orientierenden Schätzung dieser Menge dient. Ein weiterer Aspekt ist die zum Teil nicht eindeutige Lokalisation der Eisenoxidpartikel im histologischen Präparat. In den meisten Fällen konnte dennoch lichtmikroskopisch zwischen intrazellulär und extrazellulär gelegenen Partikeln unterschieden werden. In Folgestudien könnten elektronenmikroskopische Aufnahmen einen Lösungsansatz für die angesprochene Problematik bieten. Die Darstellung von Eisenoxidpartikeln in Makrophagen mittels Elektronenmikroskopie ist bereits erprobt (Alam et al., 2015). Weiterhin muss beachtet werden, dass eine lichtmikroskopische Aufnahme von Gewebe einem zweidimensionalen Schnitt entspricht. So können dem Betrachter intrazelluläre Eisenoxidpartikel entgehen, die in axialer Richtung vor beziehungsweise hinter der Abbildungsebene liegen. Die Konfokalmikroskopie ermöglicht die vollständige Abbildung der zu

untersuchenden Zelle in allen drei Ebenen des Raums und bietet sich somit als Optimierungsmöglichkeit für die angesprochene Problematik an. Die Darstellung von partikelmarkierten Mammakarzinom-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie ist bereits erprobt (Zhang et al., 2015).

Trotz der angesprochenen Schwächen wurde die in der vorliegenden Arbeit gewählte Quantifizierungsmethode in mehreren Studien in abgewandelter Form angewendet (Wang und Cuschieri, 2013; Cai et al., 2015). Eine Optimierungsmöglichkeit für die Beurteilung der Markierungseffektivität ist die Nutzung von fluoreszenzmarkierten Eisenoxidpartikeln, die eine Quantifizierung der partikelmarkierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie ermöglicht (He et al., 2014). Als weiteres Verfahren bietet sich die Bestimmung des intrazellulären Eisens an, das auf die Partikelbeladung der Zelle schließen lässt (Barrow et al., 2015). Letztlich ermöglicht das physikalische Verfahren der Atom-Absorptionsspektroskopie die Bestimmung des zellulären Partikelgehaltes mit hoher Messgenauigkeit (Salamon et al., 2014).

4.1.2. Mögliche Ursachen für die geringe Markierungseffektivität bei Suspensionszellen und Optimierungsmöglichkeiten

Im Gegensatz zur erfolgreichen Markierung der soliden Tumorzelllinie T-HEp3 eGFP konnte für die 697-Zelllinie (ALL) keine suffiziente Markierung etabliert werden. Eine mögliche Ursache für den ausgebliebenen Markierungserfolg ist der geringere Kontakt zwischen den frei im Zellkulturmedium schwimmenden Lymphozyten und den am Boden der Zellkulturplatte abgelagerten Eisenoxidpartikeln während der *in vitro* Markierung. Durch die Adhäsion der T-HEp3-Zellen am Grund der Zellkulturplatte ergibt sich dagegen ein engerer räumlicher Kontakt zu den ebenfalls abgelagerten Eisenoxidpartikeln. Eventuell bietet eine Inkubation unter Kokulturbedingungen einen Lösungsansatz für die angesprochene Problematik. So könnte eine Kokultur von 697-Zellen mit adhärenen Zellen (z. B. MSC-Zelllinie) zu einer vermehrten Ablagerung der 697-Zellen am Grund der Zellkulturplatte führen. Die Kokultivierung von ALL-Zellen mit MSC-Zellen ist bereits erprobt (Rodríguez-Pardo et al., 2013). Eine weitere mögliche Ursache für die Diskrepanz der Markierungseffektivität zwischen der 697-Zelllinie und der T-HEp3-Zelllinie könnte das unterschiedliche Endozytoseverhalten der Zelllinien sein. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass T-Lymphozyten, die zu den nicht phagozytierenden Suspensionszellen gehören, in der Lage sind, Nanopartikel aufzunehmen

(Zupke et al., 2015). Zudem belegen Vorpublikationen, dass eine Eisenmarkierung sowohl von T-Lymphozyten (Liu et al., 2012) als auch von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen (England et al., 2013) generell möglich ist. Des Weiteren könnte durch die Modifikation der Eisenpartikeloberfläche eine verstärkte zelluläre Aufnahme erreicht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Ummantelung von Eisenoxidpartikeln mit einer Lipidschicht (*lipid coating*) zu einer verstärkten Partikelaufnahme in Hepatozyten und Kupffer-Zellen führt. Erwähnenswert ist, dass die Partikelaufnahme unter anderem von der Anwesenheit des Rezeptors für *Low Density Lipoprotein* (LDL) abhängig ist (Heine et al., 2014). Die in der vorliegenden Arbeit erprobten Verfahren Elektroporation und PLL führten zu keiner verstärkten Partikelaufnahme (vgl. Kapitel 3.2.2.).

4.2. In vitro Magnetresonanztomografie von partikelmarkierten Tumorzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EST-markierte T-HEp3 eGFP-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Abschwächung der Signalintensität im *in vitro* MRT führen. Die kernspintomografische *in vitro* Bildgebung im Agaroseblock wurde auch in vorhergehenden Studien erfolgreich angewandt (Sterenczak et al., 2012; Ramaswamy et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit ist die Messung eines zentrifugierten Zellpellets, sodass die Messung bei einer höheren Zelldichte erfolgt (Reddy et al., 2010).

4.2.1. Sensitivität der Messmethode im Kontext der Tumorzell-disseminierung

Im Rahmen der *in vitro* Messungen wurde eine messbare Abschwächung des MRT-Signals bis zu einer Verdünnung der markierten Zellen auf 1:200 beobachtet. Rein morphologisch zeigten sich punktuelle MRT-Signalabschwächungen im Vergleich zur Kontrolle bis zu einer Verdünnung von 1:1000. Damit liegt die Nachweisgrenze der erprobten kernspintomografischen Bildgebung theoretisch bei ca. einer Tumorzelle auf 1000 gesunden Zellen. Aktuell klinisch angewandte MRD-Nachweismethoden, wie PCR und Durchflusszytometrie, erreichen demgegenüber eine Sensitivität von bis zu einer Tumorzelle auf 100000 gesunde Zellen (Schrappe, 2014). Trotzdem ist die beobachtete Sensitivität von 0,1 % für ein bildgebendes Verfahren beachtlich. Zudem bietet die Bildgebung neben der quantitativen Information eine zusätzliche Aussage über die Lokalisation eventuell vorhandener Tumorzell-

len. Außerdem ist die Detektion disseminierter Tumorzellen *in vivo* für präklinische Versuche zu therapeutischem Targeting der minimalen Resterkrankung relevant. Ob die Sensitivität zum DTC-Nachweis ausreicht, könnte Inhalt weiterführender Studien sein, wobei im Rahmen von DTC mit geringen Tumorzellzahlen zu rechnen ist (Hermanek et al., 1999). Nicht zuletzt die fortlaufende Entwicklung neuer Eisenoxidpartikel und die stete Verbesserung der MRT-Technik könnten zukünftig noch niedrigere kernspintomografische Nachweisgrenzen erlauben. Mithilfe von Magnetresonanzmikroskopie wurde bereits eine Signalabschwächung durch eine einzelne partikelmarkierte Zelle erreicht (Chen et al., 2011). Auch wenn das Verfahren der Magnetresonanzmikroskopie keine *in vivo* Aufnahmen ermöglicht, zeigt es dennoch das mögliche Potenzial zukünftiger kernspintomografischer Bildgebung auf.

4.3. In vivo Detektion einer Tumorzellmetastasierung mittels Magnetresonanztomografie

Bei der Interpretation der *in vivo* MRT-Daten muss beachtet werden, dass für die vorliegende Studie eine geringe Fallzahl (n) pro Testgruppe verwendet wurde. Die Ergebnisse sollten daher im Sinne einer Pilotstudie aufgefasst werden, die eine Grundlage für weitere Studien zur kernspintomografischen *in ovo* Bildgebung bildet.

4.3.1. Inokulation von partikelmarkierten Tumorzellen in aviäre Organismen – Modifizierung einer etablierten Methodik

Zum aktuellen Zeitpunkt liegen keine veröffentlichten Studien zur *in ovo* Inokulation von aviären Embryonen mit partikelmarkierten Tumorzellen vor. Die vorliegende Studie betritt damit in zweierlei Hinsicht wissenschaftliches Neuland. Zum einen wurde die etablierte Methode der CAM-Inokulation erstmals erfolgreich mit partikelmarkierten Tumorzellen angewandt. Zum anderen lieferten die anschließenden *in vivo* MRT-Messungen und *post mortem* Analysen erste vielversprechende Daten mithilfe dieser neu etablierten Vorgehensweise. Die einzige vergleichbare und zum aktuellen Zeitpunkt veröffentlichte Studie verwendete nicht markierte Mammakarzinom-Zellen als Xenograft, wobei das Tumorstadium *in ovo* kernspintomografisch visualisiert wurde (Zuo et al., 2015). In der hier vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus erste Daten zum Metastasierungsverhalten von *in ovo* inokulierten Tumorzellen mittels kernspintomografischer Bildgebung gewonnen. Die in der

Bildgebung ermittelten Daten wurden wiederum mit etablierten Methoden der *post mortem* Analyse korreliert.

Welche Schlüsse lassen sich aus den Ergebnissen der in der Arbeit durchgeführten *in ovo* Inokulation ziehen? Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich aviäre Embryonen mit EST-markierten T-HEp3 eGFP-Zellen inokulieren lassen. Weiterhin zeigten Embryonen, die mit partikelmarkierten Tumorzellen inokuliert wurden in Bezug auf deren Viabilität, Körpermasse, Tumormaße und Tumor-Zellzahl keine Unterschiede zu Embryonen, die mit nicht markierten Tumorzellen inokuliert wurden. Sowohl durch EST-positive, als auch durch EST-negative Tumorzellen kam es zu Tumorwachstum und zur Tumorzell-Disseminierung. Die gewonnenen Daten weisen somit darauf hin, dass die getesteten EST-Eisenoxidpartikel die inokulierten Tumorzellen *in ovo* nicht beeinflussen. Dieser Umstand ist für eventuelle Folgestudien zum kernspintomografischen *in ovo* Tumor-Monitoring besonders relevant. Die zahlreichen Studien zu der biologischen Wirkung von Eisenoxidpartikeln *in vitro* wurden bereits in vorhergehenden Kapiteln aufgegriffen. Im Gegensatz dazu liegen zum aktuellen Zeitpunkt keine entsprechenden *in vivo* Daten für partikelmarkierte Tumorzellen vor. Zusammenfassend bildet die durchgeführte Pilotstudie somit eine wertvolle Grundlage für die weitere Anwendung der *in ovo* Kernspintomografie zum Monitoring von partikelmarkierten Tumorzellen.

4.3.2. Ein neues Modell für longitudinales Monitoring der Tumorzellmetastasierung

Die Daten der *post mortem* Analyse zeigten eine Metastasierung der inokulierten T-HEp3 eGFP-Zellen mit Eisenmarkierung in die Organe Knochenmark, Leber und Lunge. Kernspintomografisch konnte eine statistisch signifikante Tumorzell-Disseminierung im Knochenmark nachgewiesen werden. Zudem sprechen die erhobenen MRT-Daten tendenziell für eine hepatische Metastasierung, hier wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. In der vorliegenden Arbeit wird damit erstmals eine *in ovo* Tumorzellmetastasierung kernspintomografisch untersucht. Der große Vorteil des kernspintomografischen *in ovo* Monitorings liegt darin, dass der Disseminierungsprozess longitudinal (zu verschiedenen Zeiten im selben Organismus) dargestellt werden kann. Mehrere Messzeitpunkte können den dynamischen Prozess der Tumorzellmetastasierung detailreich abbilden, wohingegen sich *post mortem* Analysen immer auf eine Momentaufnahme beschränken. Ein weiterer Vorteil ist, dass

mehrere Organe zeitgleich untersucht werden können. So ist es möglich mehr Informationen pro Versuchstier zu ermitteln. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten dadurch dazu beitragen, den Bedarf an Versuchstieren in zukünftigen Studien zu verringern. Ein weiterer positiver Aspekt ist, dass die MRT-Daten für die Knochenmarkmetastasierung ein signifikantes Ergebnis lieferten, obwohl die *post mortem* Knochenmark-Analyse eine geringe Tumorzellzahl vermuten ließ. Das spricht in diesem Zusammenhang für eine hohe Sensitivität der angewandten MRT-Bildgebung in diesem Kompartiment.

Neben der in der vorliegenden Arbeit genutzten Magnetresonanztomografie wurden weitere Bildgebungsmethoden für das longitudinale *in vivo* Tumor-Monitoring etabliert. Es erfolgten beispielweise Studien an humanen Glioblastom-Zellen als Xenograft im Mausmodell mittels Mikro-CT (Kirschner et al., 2015) und Positronenemissionstomografie (Nedergaard et al., 2014). Zur Visualisierung von Tumorwachstum und Metastasierungsverhalten einer Pankreaskarzinom-Zelllinie wurde die Methodik der Biolumineszenz beschrieben (Shannon et al., 2015). Mit hoch auflösender *in vivo* Fluoreszenz ist es zudem gelungen Mikrometastasen des Ovarialkarzinoms nachzuweisen (Zhong et al., 2009). Die vorausgegangene Literatursammlung soll verdeutlichen, dass bildgebende Verfahren zum longitudinalen Tumor-Monitoring großes Potenzial haben und Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen sind.

4.3.3. Abhängigkeit der Ergebnisse vom Kompartiment der Disseminierung und mögliche Optimierungsansätze

Wie bereits erwähnt, fielen die MRT-Daten bezüglich des Zielorgans der Metastasierung uneinheitlich aus. Es stellt sich die Frage, warum die in allen drei *post mortem* untersuchten Organen nachgewiesenen partikelmarkierten Tumorzellen im Knochenmark zu einer signifikanten MRT-Signalabschwächung führten, in der Leber und Lunge jedoch keine Signalabschwächung bewirkten. Für diese scheinbar paradoxen Ergebnisse sind folgende Ursachen denkbar: Zum einen sollte beachtet werden, dass verschiedene Gewebeentitäten die MRT-Signalstärke unterschiedlich beeinflussen, was den Effekt der kontrastierten Darstellung von anatomischen Strukturen erst ermöglicht. Beispielsweise lag die MRT-Signalintensität in der Lunge generell um ein Vielfaches höher als im Knochenmark. So ist es denkbar, dass die unterschiedlichen Gewebearten in Knochenmark, Leber und Lunge die theoretisch zu erwartende, partikelbedingte Verminderung der MRT-Signalintensität in unterschiedlicher Ausprägung beeinflussen oder vollständig aufheben. Dies würde bedeuten, dass die ange-

wandte Methode nur in bestimmten Organen eine Tumorzell dissemination nachweisen kann. Es ist auch möglich, dass das in den Erythrozyten enthaltene Eisen eine entscheidende Störgröße darstellt. So kommt es auch in stark durchbluteten Arealen und Hämatomen zu einer Abschwächung des MRT-Signals.

5. Zusammenfassung

Fragestellung: Tumorwachstum und Tumorzelldisseminierung sind dynamische Prozesse. Die vorliegende Studie präsentiert ein *in vivo* Bildgebungsverfahren zur Darstellung von Tumorzellen im aviären embryonalen Xenograftmodell (*Gallus gallus*).

Material und Methoden: Green fluorescent protein-exprimierende T-HEP3-Zellen (Kopfhals-Plattenepithelkarzinom) wurden mit Eisenoxid-Nanopartikeln (Merck Estapor®), einem kernspintomografischen Kontrastmittel, markiert. Die Evaluation der zellulären Partikelaufnahme und Zellviabilität erfolgte mittels Berliner-Blau-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie. Die partikelmarkierten Tumorzellen wurden auf der Chorioallantoismembran, einem arteriovenösen Plexus des aviären Embryos, ausgesät. Sieben Tage nach Inokulation erfolgten *in vivo* Aufnahmen im Magnetresonanztomographen, die mit *post mortem* Analysen verglichen wurden. Bewegungsartefakte wurden durch eine 15-minütige Kühlung der Eier unterbunden.

Ergebnisse: Durch Titration der Eisenoxidpartikel konnte eine effiziente Tumorzellmarkierung ohne Einfluss auf die langfristige Zellviabilität und -proliferation erreicht werden. Markierte Tumorzellen konnten in Reaktionsgefäßen mit hoher Sensitivität detektiert werden. *In ovo* induzierten die partikelmarkierten Tumorzellen ein Tumorwachstum und eine Tumorzelldisseminierung. Ein kernspintomografischer *in vivo* Nachweis von disseminierten Tumorzellen gelang im Knochenmark der aviären Embryos. In der *post mortem* Analyse zeigten sich Tumorzellen in Knochenmark, Leber und Lunge.

Schlussfolgerungen: Unsere Daten zeigen, dass die dynamischen Prozesse Tumorwachstum und Tumorzelldisseminierung in das Knochenmark mittels *in ovo* Kernspintomografie visualisiert werden können. Die vorliegende Studie bildet damit eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur *in vivo* Bildgebung von primären Tumoren und disseminierten Tumorzellen im aviären embryonalen Modell.

6. Abkürzungsverzeichnis

3D-GRE	Three Dimensional Gradient Recalled Echo
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
BNF	BNF (Bionisiertes NanoFerrit) Dextran plain
BNF-NH ₂	BNF (Bionisiertes NanoFerrit) starch NH ₂
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Chorioallantoismembran
CEA	carcinoembrionales Antigen
CT	Computertomografie
CTCs	circulating tumor cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTCs	disseminated tumor cells
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
EST	Estapor [®] MI 070/60
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
ITCs	isolated tumor cells
KM	Kontrastmittel

LDL	Low Density Lipoprotein
MIRB	Molday ION Rhodamine B
MRD	minimal residual disease
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomografie
MSC	mesenchymal stem cells
MUC1	Mucin-1
NAN	Nanomag D spio plain
NAN-NH ₂	Nanomag D spio NH ₂
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLL	Poly-L-Lysin
RBC	red blood cell
ROI	region of interest
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SPF	specific pathogen-free
TE	echo time
TG	Testgruppe
TR	repetition time
UC-MSC	mesenchymal stem cells from umbilical cord blood

7. Literaturverzeichnis

Anmerkung: Für ausschließlich online erschienene Zeitschriftenartikel werden durch den Verlag zum Teil keine Seitenzahlen mehr vergeben. In diesem Fall wurde anstatt der Seitenzahlen der Digital Object Identifier (doi) angegeben.

1. Adam, A. P., George, A., Schewe, D., Bragado, P., Iglesias, B. V., Ranganathan, A. C., Kourtidis, A., Conklin, D. S., Aguirre-Ghiso, J. A. (2009): Computational identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. *Cancer Res*, 69, S. 5664–5672.
2. Aguirre-Ghiso, J. A., Estrada, Y., Liu, D., Ossowski, L. (2003): ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res*, 63, S. 1684–1695.
3. Aguirre-Ghiso, J. A., Kovalski, K., Ossowski, L. (1999): Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol*, 147, S. 89–104.
4. Aguirre-Ghiso, J. A., Liu, D., Mignatti, A., Kovalski, K., Ossowski, L. (2001): Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERKMAPK to p38MAPK activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell*, 12, S. 863–879.
5. Alam, S. R., Tse, G. H., Stirrat, C., MacGillivray, T. J., Lennen, R. J., Jansen, M. A., Newby, D. E., Marson, L., Henriksen, P. A. (2015): Nanoparticle enhanced MRI scanning to detect cellular inflammation in experimental chronic renal allograft rejection. *Int J Mol Imaging*, 2015, doi: 10.1155/2015/507909.
6. Alsadeq, A., Strube, S., Krause, S., Carlet, M., Jeremias, I., Vokuhl, C., Loges, S., Aguirre-Ghiso, J. A., Trauzold, A., Cario, G., Stanulla, M., Schrappe, M., Schewe, D. M. (2015): Effects of p38 α/β inhibition on acute lymphoblastic leukemia proliferation and survival in vivo. *Leukemia*, 29, S. 2307–2316.
7. Babič, M., Schmiedtová, M., Poledne, R., Herynek, V., Horák, D. (2014): In vivo monitoring of rat macrophages labeled with poly(l-lysine)-iron oxide nanoparticles. *J*

-
- Biomed Mater Res B Appl Biomater (Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials), 103, S. 1141–1148.
8. Bain, M. M., Fagan, A. J., Mullin, J. M., McNaught, I., McLean, J., Condon, B. (2007): Noninvasive monitoring of chick development in ovo using a 7T MRI system from day 12 of incubation through to hatching. *J Magn Reson Imaging*, 26, S. 198–201.
 9. Barrow, M., Taylor, A., Nieves, D. J., Bogart, L. K., Mandal, P., Collins, C. M., Moore, L. R., Chalmers, J. J., Lévy, R., Williams, S. R., Murray, P., Rosseinsky, M. J., Adams, D. J. (2015): Tailoring the surface charge of dextran-based polymer coated SPIONs for modulated stem cell uptake and MRI contrast. *Biomater Sci*, 3, S. 608–616.
 10. Bonnemain, B. (2008): Nanoparticules. Le point de vue d'un industriel; applications en imagerie diagnostique. *Ann Pharm Fr*, 66, S. 263–267.
 11. Bragado, P., Estrada, Y., Parikh, F., Krause, S., Capobianco, C., Farina, H. G., Schewe, D. M., Aguirre-Ghiso, J. A. (2013): TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. *Nat Cell Biol*, 15, S. 1351–1361.
 12. Bragado, P., Sosa, M. S., Keely, P., Condeelis, J., Aguirre-Ghiso, J. A. (2012): Microenvironments dictating tumor cell dormancy. *Recent Results Cancer Res*, 195, S. 25–39.
 13. Bridot, J.-L., Stanicki, D., Laurent, S., Boutry, S., Gossuin, Y., Leclère, P., Lazzaroni, R., Vander Elst, L., Muller, R. N. (2013): New carboxysilane-coated iron oxide nanoparticles for nonspecific cell labelling. *Contrast Media Mol Imaging*, 8, S. 466–474.
 14. Bulte, J. W., Brooks, R. A., Moskowitz, B. M., Bryant, L. H., Frank, J. A. (1999): Relaxometry and magnetometry of the MR contrast agent MION-46L. *Magn Reson Med*, 42, S. 379–384.
 15. Cai, Y., Cao, C., He, X., Yang, C., Tian, L., Zhu, R., Pan, Y. (2015): Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size. *Int J Nanomedicine*, 10, S. 2619–2634.
 16. Campana, D. (2012): Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol*, 19, S. 313–318.

17. Chen, C.-L., Zhang, H., Ye, Q., Hsieh, W.-Y., Hitchens, T. K., Shen, H.-H., Liu, L., Wu, Y.-J., Foley, L. M., Wang, S.-J., Ho, C. (2011): A new nano-sized iron oxide particle with high sensitivity for cellular magnetic resonance imaging. *Mol Imaging Biol*, 13, S. 825–839.
18. Coleman, M. P., Forman, D., Bryant, H., Butler, J., Rachet, B., Maringe, C., Nur, U., Tracey, E., Coory, M., Hatcher, J., McGahan, C. E., Turner, D., Marrett, L., Gjerstorff, M. L., Johannesen, T. B., Adolfsson, J., Lambe, M., Lawrence, G., Meechan, D., Morris, E. J., Middleton, R., Steward, J., Richards, M. A. (2011): Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995–2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data. *Lancet*, 377, S. 127–138.
19. Deryugina, E. I., Quigley, J. P. (2008): Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol (Histochemistry and cell biology)*, 130, S. 1119–1130.
20. El Haj, A. J., Glossop, J. R., Sura, H. S., Lees, M. R., Hu, B., Wolbank, S., van Griensven, M., Redl, H., Dobson, J. (2012): An in vitro model of mesenchymal stem cell targeting using magnetic particle labelling. *J Tissue Eng Regen Med*, 9, S. 724–733.
21. England, T. J., Bath, P. M. W., Abaei, M., Auer, D., Jones, D. R. E. (2013): Hematopoietic stem cell (CD34+) uptake of superparamagnetic iron oxide is enhanced by but not dependent on a transfection agent. *Cytherapy*, 15, S. 384–390.
22. Farnoushi, Y., Cipok, M., Kay, S., Jan, H., Ohana, A., Naparstek, E., Goldstein, R. S., Deutsch, V. R. (2011): Rapid in vivo testing of drug response in multiple myeloma made possible by xenograft to turkey embryos. *Br J Cancer (British journal of cancer)*, 105, S. 1708–1718.
23. Gabrielli, M. G., Accili, D. (2010): The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J Biomed Biotechnol*, 2010, doi: 10.1155/2010/940741.

-
24. Golzio, M., Escoffre, J.-M., Portet, T., Mauroy, C., Teissie, J., Dean, D. S., Rols, M.-P. (2010): Observations of the mechanisms of electromediated DNA uptake--from vesicles to tissues. *Curr Gene Ther*, 10, S. 256–266.
 25. Grinberg, I., Reis, A., Ohana, A., Taizi, M., Cipok, M., Tavor, S., Rund, D., Deutsch, V. R., Goldstein, R. S. (2009): Engraftment of human blood malignancies to the turkey embryo: a robust new in vivo model. *Leuk Res*, 33, S. 1417–1426.
 26. Hauwel, M., Matthes, T. (2014): Minimal residual disease monitoring: the new standard for treatment evaluation of haematological malignancies? *Swiss Med Wkly*, 144, doi: 10.4414/smw.2014.13907.
 27. He, T., Wang, Y., Xiang, J., Zhang, H. (2014): In vivo tracking of novel SPIO-Molday ION Rhodamine-B-labeled human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after lentivirus-mediated COX-2 silencing. A preliminary study. *CGT*, 14, S. 136–145.
 28. Heidrich, A., Würbach, L., Opfermann, T., Saluz, H. P. (2011): Motion-artifact-free in vivo imaging utilizing narcotized avian embryos in ovo. *Mol Imaging Biol*, 13, S. 208–214.
 29. Heine, M., Bartelt, A., Bruns, O. T., Bargheer, D., Giemsa, A., Freund, B., Scheja, L., Waurisch, C., Eychmüller, A., Reimer, R., Weller, H., Nielsen, P., Heeren, J. (2014): The cell-type specific uptake of polymer-coated or micelle-embedded QDs and SPIOs does not provoke an acute pro-inflammatory response in the liver. *Beilstein J Nanotechnol*, 5, S. 1432–1440.
 30. Hermanek, P., Hutter, R. V., Sobin, L. H., Wittekind, C. (1999): International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer*, 86, S. 2668–2673.
 31. Heyer, C. M., Lemburg, S. P., Sterl, S., Holland-Letz, T., Nicolas, V. (2012): Verzicht auf Sedierungen bei pädiatrischen MRT-Untersuchungen des Kopfes: Was ist machbar? *Rofo*, 184, S. 1034–1042.
 32. Ishiyama, K., Hashimoto, M., Izumi, J.-I., Watarai, J., Shibata, S., Sato, T., Yamamoto, Y. (2008): Tumor-liver contrast and subjective tumor conspicuity of respiratory-triggered T2-weighted fast spin-echo sequence compared with T2*-weighted gradient

-
- recalled-echo sequence for ferucarbotran-enhanced magnetic resonance imaging of hepatic malignant tumors. *J Magn Reson Imaging*, 27, S. 1322–1326.
33. Janse, M. E., Jeurissen, S. H. (1991): Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo. *Immunobiology*, 182, S. 472–481.
 34. Joosse, S. A., Gorges, T. M., Pantel, K. (2015): Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*, 7, S. 1–11.
 35. Joosse, S. A., Pantel, K. (2013): Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res*, 73, S. 8–11.
 36. Kirschner, S., Felix, M. C., Hartmann, L., Bierbaum, M., Maros, M. E., Kerl, H. U., Wenz, F., Glatting, G., Kramer, M., Giordano, F. A., Brockmann, M. A. (2015): In vivo micro-CT imaging of untreated and irradiated orthotopic glioblastoma xenografts in mice: capabilities, limitations and a comparison with bioluminescence imaging. *J Neurooncol (Journal of neuro-oncology)*, 122, S. 245–254.
 37. Kotoura, N., Sakamoto, K., Fukuda, Y., Ishikura, R., Enoki, T., Yamashita, T., Nakae, Y. (2011): Evaluation of magnetic resonance signal intensity in bone marrow after administration of super paramagnetic iron oxide (SPIO). *Jpn J Radiol Technol (Japanese Journal of Radiological Technology)*, 67, S. 212–220.
 38. Lee, J.-H., Huh, Y.-M., Jun, Y.-w., Seo, J.-w., Jang, J.-t., Song, H.-T., Kim, S., Cho, E.-J., Yoon, H.-G., Suh, J.-S., Cheon, J. (2007): Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med*, 13, S. 95–99.
 39. Lindemann, A., Lüdtkke-Buzug, K., Fräderich, B. M., Gräfe, K., Pries, R., Wollenberg, B. (2014): Biological impact of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging of head and neck cancer cells. *Int J Nanomedicine*, 9, S. 5025–5040.
 40. Liu, L., Ye, Q., Wu, Y., Hsieh, W.-Y., Chen, C.-L., Shen, H.-H., Wang, S.-J., Zhang, H., Hitchens, T. K., Ho, C. (2012): Tracking T-cells in vivo with a new nano-sized MRI contrast agent. *Nanomedicine*, 8, S. 1345–1354.
 41. Mahmoudi, M., Sahraian, M. A., Shokrgozar, M. A., Laurent, S. (2011): Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *ACS Chem Neurosci*, 2, S. 118–140.

42. Markides, H., Kehoe, O., Morris, R. H., El Haj, A. J. (2013): Whole body tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labelled cells--a rheumatoid arthritis mouse model. *Stem Cell Res Ther*, 4, doi: 10.1186/scrt337.
43. Melkonian, G., Munoz, N., Chung, J., Tong, C., Marr, R., Talbot, P. (2002): Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *J Exp Zool*, 292, S. 241–254.
44. Mihara, K., Imai, C., Coustan-Smith, E., Dome, J. S., Dominici, M., Vanin, E., Campana, D. (2003): Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br J Haematol*, 120, S. 846–849.
45. Naumova, A. V., Balu, N., Yarnykh, V. L., Reinecke, H., Murry, C. E., Yuan, C. (2014): Magnetic resonance imaging tracking of graft survival in the infarcted heart: iron oxide particles versus ferritin overexpression approach. *J Cardiovasc Pharmacol Ther (Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics)*, 19, S. 358–367.
46. Nedergaard, M. K., Kristoffersen, K., Michaelsen, S. R., Madsen, J., Poulsen, H. S., Stockhausen, M.-T., Lassen, U., Kjaer, A. (2014): The use of longitudinal ¹⁸F-FET MicroPET imaging to evaluate response to irinotecan in orthotopic human glioblastoma multiforme xenografts. *PloS one*, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0100009.
47. Neubert, J., Wagner, S., Kiwit, J., Bräuer, A. U., Glumm, J. (2015): New findings about iron oxide nanoparticles and their different effects on murine primary brain cells. *Int J Nanomedicine*, 10, S. 2033–2049.
48. Neuwelt, A., Sidhu, N., Hu, C.-A. A., Mlady, G., Eberhardt, S. C., Sillerud, L. O. (2015): Iron-based superparamagnetic nanoparticle contrast agents for MRI of infection and inflammation. *AJR Am J Roentgenol*, 204, doi: 10.2214/AJR.14.12733.
49. Ossowski, L., Reich, E. (1983): Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell*, 35, S. 611–619.
50. Peng, X.-H., Qian, X., Mao, H., Wang, A. Y., Chen, Z., Nie, S., Shin, D. M. (2008): Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int J Nanomedicine*, 3, S. 311–321.

51. Ramaswamy, S., Greco, J. B., Uluer, M. C., Zhang, Z., Zhang, Z., Fishbein, K. W., Spencer, R. G. (2009): Magnetic resonance imaging of chondrocytes labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles in tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng Part A*, 15, S. 3899–3910.
52. Reddy, A. M., Kwak, B. K., Shim, H. J., Ahn, C., Lee, H. S., Suh, Y. J., Park, E. S. (2010): In vivo tracking of mesenchymal stem cells labeled with a novel chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles using 3.0T MRI. *J Korean Med Sci*, 25, S. 211–219.
53. Riggio, C., Calatayud, M. P., Hoskins, C., Pinkernelle, J., Sanz, B., Torres, T. E., Ibarra, M. R., Wang, L., Keilhoff, G., Goya, G. F., Raffa, V., Cuschieri, A. (2012): Poly-l-lysine-coated magnetic nanoparticles as intracellular actuators for neural guidance. *Int J Nanomedicine*, 7, S. 3155–3166.
54. Rizzo, V., DeFouw, D. O. (1993): Macromolecular selectivity of chick chorioallantoic membrane microvessels during normal angiogenesis and endothelial differentiation. *Tissue Cell*, 25, S. 847–856.
55. Rodríguez-Pardo, V. M., Aristizabal, J. A., Jaimes, D., Quijano, S. M., los Reyes, I. de, Herrera, M. V., Solano, J., Vernot, J. P. (2013): Mesenchymal stem cells promote leukaemic cells aberrant phenotype from B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 6, S. 89–100.
56. Rohani, R., Figueredo, R., Bureau, Y., Koropatnick, J., Foster, P., Thompson, R. T., Prato, F. S., Goldhawk, D. E. (2014): Imaging tumor growth non-invasively using expression of MagA or modified ferritin subunits to augment intracellular contrast for repetitive MRI. *Mol Imaging Biol*, 16, S. 63–73.
57. Romanoff, A. L. (1939): Successive changes in the position of the chick embryo and its embryonic membranes. *Cornell Rural School Leaflet*, 33, S. 57–63.
58. Salamon, J., Wicklein, D., Didié, M., Lange, C., Schumacher, U., Adam, G., Peldschus, K. (2014): Magnetic resonance imaging of single co-labeled mesenchymal stromal cells after intracardial injection in mice. *Rofo*, 186, S. 367–376.

-
59. Schewe, D. M., Aguirre-Ghiso, J. A. (2008): ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, S. 10519–10524.
 60. Schrappe, M. (2014): Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014, S. 244–249.
 61. Serres, S., O'Brien, E. R., Sibson, N. R. (2014): Imaging angiogenesis, inflammation, and metastasis in the tumor microenvironment with magnetic resonance imaging. *Adv Exp Med Biol*, 772, S. 263–283.
 62. Shannon, H. E., Fishel, M. L., Xie, J., Gu, D., McCarthy, B. P., Riley, A. A., Sinn, A. L., Silver, J. M., Peterman, K., Kelley, M. R., Hanenberg, H., Korc, M., Pollok, K. E., Territo, P. R. (2015): Longitudinal bioluminescence imaging of primary versus abdominal metastatic tumor growth in orthotopic pancreatic tumor models in NSG mice. *Pancreas*, 44, S. 64–75.
 63. Sibov, T. T., Pavon, L. F., Miyaki, L. A., Mamani, J. B., Nucci, L. P., Alvarim, L. T., Silveira, P. H., Marti, L. C., Gamarra, L. (2014): Umbilical cord mesenchymal stem cells labeled with multimodal iron oxide nanoparticles with fluorescent and magnetic properties: application for in vivo cell tracking. *Int J Nanomedicine*, 9, S. 337–350.
 64. Soenen, S. J. H., Himmelreich, U., Nuytten, N., Cuyper, M. de (2011): Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, 32, S. 195–205.
 65. Sosa, M. S., Bragado, P., Aguirre-Ghiso, J. A. (2014): Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*, 14, S. 611–622.
 66. Sterenczak, K. A., Meier, M., Glage, S., Meyer, M., Willenbrock, S., Wefstaedt, P., Dorsch, M., Bullerdiek, J., Murua Escobar, H., Hedrich, H., Nolte, I. (2012): Longitudinal MRI contrast enhanced monitoring of early tumour development with manganese chloride (MnCl₂) and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs) in a CT1258 based in vivo model of prostate cancer. *BMC cancer*, 12, doi: 10.1186/1471-2407-12-284.

-
67. Stern, C. D. (2005): The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell*, 8, S. 9–17.
 68. Sykova, E., Jendelova, P. (2007): In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res*, 161, S. 367–383.
 69. Taylor, A., Herrmann, A., Moss, D., Sée, V., Davies, K., Williams, S. R., Murray, P. (2014): Assessing the efficacy of nano- and micro-sized magnetic particles as contrast agents for MRI cell tracking. *PloS one*, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0100259.
 70. Teachey, D. T., Hunger, S. P. (2013): Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 162, S. 606–620.
 71. Tiefenauer, L. X., Tschirky, A., Kuhne, G., Andres, R. Y. (1996): In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI. *Magn Reson Imaging*, 14, S. 391–402.
 72. Vellinga, M. M., Vrenken, H., Hulst, H. E., Polman, C. H., Uitdehaag, Bernard M J, Pouwels, Petra J W, Barkhof, F., Geurts, Jeroen J G (2009): Use of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (USPIO)-enhanced MRI to demonstrate diffuse inflammation in the normal-appearing white matter (NAWM) of multiple sclerosis (MS) patients: an exploratory study. *J Magn Reson Imaging*, 29, S. 774–779.
 73. Wang, Z., Cuschieri, A. (2013): Tumour cell labelling by magnetic nanoparticles with determination of intracellular iron content and spatial distribution of the intracellular iron. *Int J Mol Sci*, 14, S. 9111–9125.
 74. Wittekind, Ch.; Sobin, L. H.; Klimpfinger, M. (2005): *TNM-Atlas*. Springer, Berlin, Heidelberg.
 75. Xu, J., Delproposto, Z., Zhou, Z., Shen, H., Xuan, S. Y., Li, Q. H., Haacke, E. M., Hu, J. (2012): In ovo monitoring of smooth muscle fiber development in the chick embryo: diffusion tensor imaging with histologic correlation. *PloS one*, 7, doi: 10.1371/journal.pone.0034009.
 76. Yilmaz, A., Dengler, M. A., van der Kuip, H., Yildiz, H., Rösch, S., Klumpp, S., Klingel, K., Kandolf, R., Helluy, X., Hiller, K.-H., Jakob, P. M., Sechtem, U. (2013): Imaging of myocardial infarction using ultrasmall superparamagnetic iron oxide nano-

-
- particles: a human study using a multi-parametric cardiovascular magnetic resonance imaging approach. *Eur Heart J (European heart journal)*, 34, S. 462–475.
77. Zhang, Q., Rajan, S. S., Tyner, K. M., Casey, B. J., Dugard, C. K., Jones, Y., Paredes, A. M., Clingman, C. S., Howard, P. C., Goering, P. L. (2015): Effects of iron oxide nanoparticles on biological responses and MR imaging properties in human mammary healthy and breast cancer epithelial cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater (Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials)*, doi: 10.1002/jbm.b.33450.
78. Zhong, W., Celli, J. P., Rizvi, I., Mai, Z., Spring, B. Q., Yun, S. H., Hasan, T. (2009): In vivo high-resolution fluorescence microendoscopy for ovarian cancer detection and treatment monitoring. *Br J Cancer (British journal of cancer)*, 101, S. 2015–2022.
79. Zuo, Z., Syrovets, T., Genze, F., Abaei, A., Ma, G., Simmet, T., Rasche, V. (2015): High-resolution MRI analysis of breast cancer xenograft on the chick chorioallantoic membrane. *NMR Biomed*, 28, S. 440–447.
80. Zupke, O., Distler, E., Jürchott, A., Paiphansiri, U., Dass, M., Thomas, S., Hartwig, U. F., Theobald, M., Landfester, K., Mailänder, V., Herr, W. (2015): Nanoparticles and antigen-specific T-cell therapeutics: a comprehensive study on uptake and release. *Nanomedicine (Lond)*, 10, S. 1063–1076.
81. Zurkiya, O., Chan, A. W. S., Hu, X. (2008): MagA is sufficient for producing magnetic nanoparticles in mammalian cells, making it an MRI reporter. *Magn Reson Med*, 59, S. 1225–1231.

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2013 bis zum Oktober 2016 in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel verfasst. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Leiter der Max-Eder-Nachwuchsgruppe, Herrn PD Dr. med. Denis Schewe. Ich danke Herrn Schewe für die Überlassung des interessanten und innovativen Forschungsthemas und sein außerordentliches Engagement bei der Beantragung des Promotionsstipendiums der Medizinischen Fakultät. Weiterhin möchte ich mich für die produktiven Diskussionen und Anregungen sowie die zahlreichen detaillierten Korrekturen bei Herrn Schewe bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Schrappe danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein anfertigen zu dürfen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Susann Boretius (ehemals Abteilungsleiterin am Molecular Imaging North Competence Center - MOIN CC) für die Möglichkeit der Durchführung der umfangreichen Messungen im Kleintier-MRT. Ich danke Frau Boretius und Frau Kristin Kötz zudem für die konstruktiven Anregungen und Diskussionen. Bei Herrn Dr. med. Christian Vokuhl vom Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich mich herzlich für die Anfertigung von zahlreichen Gewebeschnitten bedanken.

Im Folgenden möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Max-Eder-Nachwuchsgruppe für ihre Hilfe und das gute Arbeitsklima danken. Ich danke Frau Dr. rer. nat. Susanne Strube und Frau Dipl. Biol. Sarah Habig für die persönliche Einarbeitung in das Thema. Für ihre tatkräftige Hilfe im Labor danke ich Frau Dr. rer. nat. Ameera Alsadeq, Frau Katrin Timm-Richert, Frau Katrin Neumann und Frau Wiebke Laasch.

Der größte Dank gilt meinen Töchtern Hilda und Frida sowie meiner Ehefrau Ronja Meyersieck. Ich danke ihr von ganzem Herzen für ihre großartige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und meines Medizinstudiums. Ohne ihre zahlreichen Korrekturen wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Zum Schluss möchte ich meinen lieben Eltern, Helga Meyersieck und Gerhard Meyersieck, sowie meiner Schwester Annika Heuermann für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums danken.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Fabian Meyersieck

Geburtstag: 21.01.1989

Geburtsort: Ostercappeln

Schulbildung:

1996 – 2000 Besuch der Martin-Andersen-Nexö Grundschule in Greifswald

2000 - 2008 Besuch des Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasiums in Greifswald

07/2008 Abitur am Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium in Greifswald
Gesamtnote: 1,3
Leistungskurse: Physik und Deutsch

Studium und praktische Tätigkeiten:

08/2008 – 12/2008 Studium im Fach Maschinenbau an der Dualen Hochschule Baden-Württemberg, Stuttgart
Ausbildungspartner: Daimler AG, Werk Sindelfingen

01/2009 – 02/2009
07/2009 – 08/2009 Praktikum im Jugendpfarramt Greifswald

03/2009 – 06/2009 Pflegepraktikum in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Chirurgische Orthopädie der Universitätsmedizin Greifswald

10/2009 – 09/2011 Studium im Fach Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

09/2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: 1,0

10/2011 – 12/2015 Studium im Fach Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

10/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: 2,0

12/2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: 1,0

Bestehen der Ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote: 1,33

seit 09/2016

Assistenzarzt in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am Evangelischen Krankenhaus Oldenburg

Dissertation:

01/2013 – 10/2016

In der Max-Eder-Nachwuchsgruppe der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Leitung: Dr. med. Denis Schewe)

04/2013 – 08/2013

Förderung durch das Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Stipendium:

2010 – 2015

Stipendiat beim Evangelischen Studienwerk e.V. Villigst, dem Begabtenförderungswerk der Evangelischen Kirchen in Deutschland

Auslandsaufenthalte:

02/2011 – 04/2011

Praktikum bei der Nichtregierungsorganisation (NGO) Wola Nani, Kapstadt, Südafrika

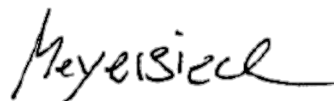
08/2012 – 10/2012

Famulatur in der Precious life clinic, Salaga, Ghana

06/2015 – 10/2015

Ein Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik für Gynäkologie & Geburtshilfe des Luzerner Kantonspitals Sursee, Schweiz (Lehrkrankenhaus der Universität Zürich)

Kiel, den 03.10.2016



Fabian Meyersieck

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im folgenden Abstract veröffentlicht:

Meyersieck, F., Vokuhl, C., Strube, S., Habig, S., Schrappe, M., Boretius, S., Schewe, D.M. (2016): Kernspintomografische in vivo Bildgebung disseminierter Tumorzellen im aviären embryonalen Xenograftmodell. Abstractband - 47. Jahrestagung der DGMP und 19. Jahrestagung der ISMRM-DS, 47, S. 360-361.