

Molekulare Markierungsstrategien für die optische und magnetresonanztomographische zelluläre Visualisierung

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Klaus Kruttwig

aus Haarlem, Niederlande

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Martin Zenke
 Universitätsprofessor Dr. Lothar Elling
 Professor Dr. Mathias Hoehn

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Himmelreich, U., Kruttwig, K., Hoehn, M. (2007): MR-Bildgebung in der experimentellen Neurologie. Bioforum 02

Hoehn, M., Wiedermann, D., Justicia, C., Ramos-Cabrer, P., Kruttwig, K., Farr, T., Himmelreich, U. (2007): Cell tracking using Magnetic Resonance Imaging. The J. Physiol. 584,1, 25-30.

Hoehn, M., Himmelreich, U., Kruttwig, K., Wiedermann, D. (2007): Molecular MR Imaging: Potentials and Challenges for Neurological Applications. J. Magn. Reson. Imaging, 27, 5, 941-945

Kruttwig, K., Brüggemann, C., Kaijzel, E., Vorhagen, S., Hilger, T., Löwick, C., Hoehn, M. (2009): Development of a 3-dimensional in vitro model for longitudinal observation of cell behaviour: monitoring by magnetic resonance imaging and optical imaging. Mol. Imaging Biol. [Epub ahead of print]

Danksagung

- Diese Dissertation entstand in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Mathias Hoehn, dem ich herzlich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und die Betreuung danke.
- Herrn Professor Dr. Martin Zenke danke ich herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens.
- Herrn Professor Dr. Lothar Elling danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Herrn Professor Dr. Clemens Loewik, LUMC Leiden, Niederlande, danke ich herzlich für die Zusammenarbeit, die Unterstützung und die Möglichkeit zur Durchführung des Forschungsaufenthaltes in seinem Labor.
- Frau Dr. Chantal Brüggemann, MPI Köln, möchte ich herzlich für die Unterstützung, Betreuung und Zusammenarbeit danken.
- Herrn Dr. Eric Kaijzel, LUMC Leiden, Niederlande, möchte ich herzlich für die Unterstützung und Zusammenarbeit danken.
- Herrn Professor Dr. Rob Hoeben, LUMC Leiden, Niederlande, möchte ich herzlich für die Möglichkeit zur Durchführung der virologischen Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe und die Unterstützung danken.
- Herrn Professor Dr. Klaus Addicks, Institut für Anatomie I, Uniklinik Köln, danke ich herzlich für die Unterstützung und die Möglichkeit zur Nutzung seines Labors für Elektronenmikroskopie und histologische Präparationen
- Herrn Professor Dr. Wilhelm Stoffel und Erika Binczek, Institut für Biochemie, Uniklinik Köln, danke ich herzlich für die Diskussionen und Zusammenarbeit bei den liposomalen Präparationen.
- Herrn Dr. Franz-Joseph Klinz, Institut für Anatomie I, Uniklinik Köln, danke ich herzlich für die Zusammenarbeit.
- Herrn Professor Dr. Ludwig Aigner, Universität Salzburg, Österreich, und Herrn Dr. Sebastian Couillard-Despres, Universität Regensburg, danke ich herzlich für die Bereitstellung des DCX-Plasmids und die Zusammenarbeit.
- Frau Professor Dr. Michal Neeman, Weizmann Institut of Science, Israel, danke ich herzlich für die Bereitstellung der HA-Ferritin cDNA und die Zusammenarbeit.
- Bei Herrn Dr. Christoph Piechaczek und bei Herrn Manuel Kernbach, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit bedanken.

- Herrn Professor Dr. Stefan Arnhold, Institut für Veterinäranatomie, Giessen, möchte ich für die Gespräche und Diskussionen herzlich danken.
- Herrn Dr. Oliver Coquoz, Caliper Life Science, Xenogen Corp., Alameda, USA möchte ich für die Diskussionen danken.
- Herzlichen Dank an Herrn Dr. Dirk Wiedermann, MPI Köln; Herrn Professor Dr. Uwe Himmelreich, Universität Leuven, Belgien; Daniel Kalthoff, MPI Köln; Jörg Seehafer, MPI Köln; Jan Jikeli, MPI Köln für die Einführung und Unterstützung bei den MRT-Experimenten.
- Herzlichen Dank für die Unterstützung und Zusammenarbeit in den Arbeitsgruppen molekulare Zellbiologie und Endokrinologie des LUMC Leiden, Niederlande. Besonders möchte ich Martijn Rabelink, Herrn Dr. Harald Mikkers, Hetty Sipps, Razvan Mikeli und Yvo Que danken.
- Herzlichen Dank für die Unterstützung und Zusammenarbeit in den Arbeitsgruppen im MPI Köln, besonders Julia Scholzen, Gabi Schneider, Andreas Beyrau, Dilek Güneri, Michael Diedenhoven, Melanie Nelles, Cordula Schäfer, Christiane Sprenger, Yannic Waerzeggers, Philipp Boehm-Sturm, Herrn Professor Dr. Andreas Jacobs und Herrn Dr. Roland Ullrich.
- Bei Jolanta Kozlowski, Christian Hoffmann und Evelin Jansen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Klaus Addicks, Institut für Anatomie I der Uniklinik Köln und Frau Dr. Catherin Niemann, ZMMK-Nachwuchsgruppe, Uniklinik Köln, möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfe herzlich bedanken.
- Bei Herrn Dr. Tomo Saric, Institut für Physiologie, Uniklinik Köln, möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bei den FACS Experimenten bedanken.
- Bei Herrn Professor Dr. Agapios Sachinidis und Rita Hippler-Altenburg, Institut für Physiologie, Uniklinik Köln, möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung der CGR8-Zellen und die Unterstützung bedanken.
- Bei Herrn Professor Dr. Zaal Kokaia, Lund Strategic Research Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund, Schweden, möchte ich mich für die Bereitstellung der humanen neuralen Vorläuferzellen bedanken.
- Herrn Professor Dr. Konstantin Hossmann, MPI Köln möchte ich für die kritische Durchsicht meiner Dissertation und die hilfreiche Diskussion danken.
- Den Firmen Guerbet, Frankreich, und BioSpace Lab, Frankreich, möchte ich für die Zusammenarbeit danken.
- Bei Herrn Dr. Thomas Hilger, Klinik für Strahlentherapie, Uniklinik Köln möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit bedanken.

-
- Bei Herrn PD Dr. Christian Andressen, AG Neuroembryologie des Instituts für Anatomie, Universität Rostock, möchte ich mich für die Erweckung des Interesses an Karbohydratepitopen der Laktoserie und die Unterstützung bedanken.
 - Herzlichen Dank an meine Hiwi Studentin Susanne Vorhagen und an Indra Thielen für ihre Freundschaft, Unterstützung und unsere Zusammenarbeit.
 - Für die Freude, den Rückhalt und alle fachfremden Gespräche möchte ich meinen Freunden danken. Besonders möchte ich Monika Petersson, Chantal Brüggemann, Sandra Witzel, Markus Klein, Jolanta Kozlowski, Hans-Joachim Stratmann, Boris Koslowski, Tanja Grau, Ricarda Reinhartz, Birgit Umbreit und meiner Oma Frau Margarete Kruttwig für ihre Geduld und den Rückhalt danken.
 -

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	6
Darstellungverzeichnis	15
Abkürzungsverzeichnis	24
1 Zusammenfassung/Summary	26
2 Einleitung	30
2.1 Molekulare Bildgebung	30
2.2 Magnet-Resonanztomographie	30
2.2.1 Positiv und negativ wirkende Kontrastmittel	32
2.3 <i>In vivo</i> optische Bildgebungsmethoden	34
2.4 Glioblastoma multiforme	36
2.5 Neurale Stammzellen	37
2.6 Zielsetzung	39
3 Material und Methoden	40
3.1 Chemikalien, Biochemikalien und Geräte	40
3.1.1 Wasser	40
3.1.2 Ethanol	40
3.2 Organismen und Zelllinien	41
3.3 Zellkultur	42
3.3.1 Wachstumsfaktoren	42
3.3.2 Puffer und Stammlösungen	42
3.3.3 Beschichtungen der Zellkulturschalen und Deckglächen	42
3.3.3.1 Poly-L-Ornithin und humanes Fibronectin	42
3.3.3.2 Poly-L-Ornithin und Laminin	43
3.3.3.3 Poly(2-Hydroxyethyl)-Methacrylat	43
3.3.3.4 Gelatine	43
3.3.3.5 Kollagen I	43
3.3.4 Kultivierung der Zellen	44
Die Differenzierung fand in 10 % KSR-Medium oder B27/Euro-Medium statt.	47
3.3.4.1 Einfrieren der Zellen und erneutes Auftauen	48
3.3.4.2 Bestimmung der Zellzahl	48

3.3.4.3	Berechnung der Generationsverdopplungen und der Generationszeit.....	48
3.3.4.4	Einzelzellklonierung	49
3.3.4.5	Agarosephantome.....	49
3.4	Inkubation mit Kontrastmittel	50
3.5	MACS	51
3.6	Gamma-Bestrahlung.....	51
3.7	Molekularbiologische Methoden	51
3.7.1	DNA-Isolierung	51
3.7.2	Isolierung von Gesamt-RNA	52
3.7.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	52
3.7.4	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	53
3.7.5	Agarose-Gelelektrophorese	54
3.7.6	Synthese von cDNA.....	54
3.7.7	Sequenzanalysen	55
3.7.8	Herstellung von Vektoren	55
3.7.8.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden bei der Herstellung von Vektoren	55
3.7.8.2	Verwendete Plasmide	56
3.7.8.3	Sequenzierungen.....	56
3.7.9	Kultivierung und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	57
3.7.10	Plasmidpräparation.....	57
3.7.10.1	Minipräparation	58
3.7.10.2	Midipräparation	58
3.7.11	Transfektion von eukaryotischen Zellen	58
3.7.11.1	Lipofektion.....	58
3.7.11.2	Nukleofektion	59
3.8	HIV-1-basierendes lentivirales System der 3. Generation	59
3.8.1.1	Generierung der infektiösen Viruspartikel.....	61
3.8.1.2	p24 HIV-1-ELISA zur Bestimmung der Viruskonzentration	61
3.8.1.3	Transduktion mit den infektiösen Partikeln	61
3.8.1.4	Überprüfung der Infektion	62
3.9	Biochemische Methoden.....	62
3.9.1	Isolierung von Antikörpern	62
3.9.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
3.9.3	Western Blot	63
3.9.4	PEGylierung.....	65
3.9.5	Spektralphotometrische Eisenbestimmung	65

3.9.6	Messung der Luziferaseaktivität	66
3.9.7	Liposomenherstellung.....	66
3.9.8	Kopplungsreaktionen	66
3.9.8.1	Eisenpartikel	66
3.9.8.2	Fluoreszein	67
3.10	Immunzytochemie.....	67
3.10.1	Prinzip der Immunzytochemie und Durchführung der Methode.....	67
3.10.2	Übersicht über die Proteine, die von den verwendeten Antikörpern erkannt werden	70
3.11	FACS	72
3.12	Verarbeitung und Analyse von Geweben	73
3.12.1	Fixierung und Anfertigung von Gefrierschnitten	73
3.12.2	Paraffin-Einbettung	73
3.12.3	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	74
3.12.4	Berliner Blau-Färbung.....	74
3.13	Elektronenmikroskopie	74
3.14	Mikroskopie und Software	75
3.15	Messungen mit den Photonen-Bildgebungssystemen	76
3.15.1.1	Auswertung der optischen Bildgebungsexperimente	76
3.16	MRT	77
3.16.1	MRT-Systeme	77
3.16.2	35 mm Phantomspule	77
3.16.3	Auswertung der MRT-Daten.	78
3.16.4	Verwendete Messsequenzen	79
3.16.4.1	Messungen mit der 35 mm Spule: Gradienten-Echo-Sequenz.....	79
3.16.4.2	Messungen mit der 35 mm Spule: Spin-Echo-Sequenz	81
3.16.4.3	7 mm Phantomspule	81
3.16.4.4	Tierexperimentelle Messungen mit dem Bruker BioSpec 70/30 USR	82
3.16.4.4.1	Gradienten-Echo-Sequenz	82
3.16.4.4.2	Spin-Echo-Sequenz	83
3.16.4.4.3	Spin-Echo-Sequenz	83
3.17	Tierexperimentelle Studien	84
4	Ergebnisse	85
4.1	Zelluläre Visualisierung mit optischen und MRT Bildgebungsmethoden	85
4.1.1	Entwicklung einer Untersuchungsplattform für die verbesserte Akquisition des Photonenfluxes	85
4.1.2	Validierung der Sensitivität anhand eines zellulären Systems.....	89

4.2 Kombination von Fluoreszenz- und MRT-Bildgebung im zellulären System:	
Erstellung einer fluoreszierenden Tumorzelllinie.....	90
4.2.1 Erstellung des Expressionsplasmids pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry und der Zelllinie Gli36ΔEGFR-CMV-mCherry	90
4.2.2 3D-multizelluläre Aggregate für die optische- und MRT-Bildgebung.....	92
4.2.3 Visualisierung von Endorem-markierten Zellen mit dem MRT: Bestimmung der maximal detektierbaren Zellmenge	94
4.2.4 Quantifizierung des aufgenommenen Eisengehaltes mittels spektralphotometrischen Methoden	97
4.2.5 Kultivierung und Visualisierung der multizellulären Aggregate (Spheroide) im Aggregatmodell	98
4.2.5.1 Kultur der Zellen im Suspensionsmodell und Inkubation mit Endorem.....	98
4.2.5.2 Immunzytochemische Lokalisation und Verteilung von Endorempartikeln	100
4.2.5.3 Koregistrierung von Fluoreszenz- und MRT-Bildgebung	102
4.2.5.4 Korrelation des Fluoreszenzsignals mit dem Aggregatvolumen	104
4.2.5.5 Longitudinale Proliferationsanalyse mittels Photonenflux-Determinierung	105
4.2.5.6 Gamma-Bestrahlung multizellulärer Tumoraggregate zur Simulation einer Strahlenbehandlung	110
4.2.6 Ermittlung der minimal detektierbaren Zellmenge multizellulärer mCherry ⁺ -Aggregate.....	112
4.2.6.1 Korrelation von Photonenflux und absoluter Zellzahl multizellulärer Aggregate.....	112
4.2.6.2 Korrelation von Photonenflux, Signalintensität im MRT, Aggregatvolumen und absoluter Zellzahl im 35 mm-Agarosephantom	113
4.2.7 Kultivierung der multizellulären Aggregate im modifizierten Agarosephantom zur Simulation optischer Absorption.....	117
4.2.7.1 Fluoreszenz- und MRT-Bildgebungseigenschaften von in humanem Blut eingebetteten Zellaggregaten.....	117
4.2.7.2 Quantifizierung des Fluoreszenzsignals von standardisierten Mikropartikeln	118
4.2.8 Langzeitkultivierung der multizellulären Aggregate in Gegenwart von Endorem	120
4.3 Erstellung lentiviraler Plasmide und Viren für die Überexpression optischer Reportergene	124
4.3.1 Erstellung des Vektors pLV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin.....	124

4.3.2	Erstellung des Vektors pLV-CMV-mCherry-IRES-GFP	127
4.3.3	Erstellung des Vektors pLV-CMV-Luziferase-IRES-Puromycin.....	129
4.4	Herstellung und Funktionsüberprüfung eines liposomalen Systems für den effektiven Transport von superparamagnetischen Eisenpartikeln.....	131
4.4.1.1	Erstellung der Liposomenpräparationen	131
4.4.1.2	Liposomal vermittelter Transport von superparamagnetischen Partikeln in PC12-Zellen.....	134
4.4.1.3	Aufnahme der superparamagnetischen Partikel in menschliche 293T-Zellen	137
4.4.2	Konjugation des Fluorochroms 5- (und 6-)-Karboxyfluoreszein-Succinimidylester an Liposomen und superparamagnetische Partikel	139
4.5	Überexpression der modifizierten schweren Kette des Ferritinmoleküls für die MRT-Bildgebung	140
4.5.1	Erstellung des Vektors pcDNA3.1-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase	140
4.5.2	Erstellung der Vektoren pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-Puromycin und pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP.....	141
4.5.3	Erstellung des Vektors pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase	143
4.5.4	Supplementation von Eisen(III)-Ammoniumzitat zu MRT-Bildgebungszwecken	148
4.5.4.1	Intrazerebrale Transplantation von Gli36 Δ EGFR-2/C3-Zellen.....	150
4.5.5	Histologische Analyse der mit HA-Ferritin ⁺ - und Luziferase ⁺ -Gli36 Δ EGFR-Zellen transplantierten Nacktmaus.....	157
4.5.6	Einzelzellklonierung der Gli36 Δ EGFR-2/C3-Zelllinie	161
4.5.7	Immunzytochemische Charakterisierung der Expression von HA-Ferritin, Luziferase und der Intermediärfilamente in den Gli36 Δ EGFR-HA-Ferritin-IRES-Luziferase Zellen.....	162
4.5.8	Überexpression des HA-Ferritin-Proteins	166
4.5.9	Proliferation der HA-Ferritin ⁺ - und Luziferase ⁺ -Gli36 Δ EGFR-Zellen in Abhängigkeit exogener Supplementation mit Eisen(III)-Ammoniumzitat	166
4.5.10	Supplementation von exogenem Eisen(III)-Ammoniumzitat zu Bildgebungszwecken bei den Klonen #5 und #15 der Zelllinie Gli36 Δ EGFR	168
4.5.10.1	<i>In vitro</i> Validierung der Eisenaufnahme	168
4.5.10.2	Intrazerebrale Transplantation der HA-Ferritin ⁺ - und Luziferase ⁺ -Zelllinie Gli36 Δ EGFR Klon #5.....	173
4.6	Überexpression des humanen ΔCD4-Rezeptors in 293T-Zellen zur extrazellulären MRT-Bildgebung.....	174

4.6.1	Klonierung der Expressionsplasmide und transiente Transfektion in menschlichen 293T-Tumorzellen	174
4.6.2	Einzelzellklonierung und Charakterisierung der Reporterexpression des Klon 293T-K79- Δ CD4-K201 #5	178
4.6.2.1	Immunzytochemische Analyse der 293T-K79- Δ CD4-K201-Klon #5-Zellen:.....	180
4.6.2.2	Minimal detektierbare Zellmengenbestimmung nach SPIO gekoppelter Antikörperinkubation mittels MRT	183
4.6.3	Kultivierung der 293T-K79- Δ CD4-K201 Zellen im Aggregatmodell	184
4.6.3.1	Expression des Δ CD4 Rezeptors und Inkubation mit SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörpern	184
4.6.3.2	FACS-Analyse der Δ CD4 ⁺ -Zellen zur quantitativen Analyse der Rezeptorexpression	187
4.6.3.3	Multimodale Bildgebung von multizellulären Aggregaten im 35 mm-Agarosephantom	190
4.6.3.4	Quantifizierung der Aggregate anhand der unterschiedlichen Bildgebungsmethoden	192
4.6.4	Subkutane Implantation der Δ CD4 ⁺ -Luziferase ⁺ und mCherry ⁺ -Zelllinie 293T-K79- Δ CD4-K201-Klon #5	193
4.6.4.1	Untersuchung der minimal detektierbaren Zellmenge nach Ausbildung von Tumoren <i>in vivo</i>	193
4.6.4.2	Erweiterte Biolumineszenzbildgebung bei subkutanen Tumoren mit einer initialen Zellmenge von 5×10^6 Zellen	194
4.7	Ultrahochaufgelöste Visualisierung von Endorem oder anti-CD4-SPIO markierten Einzelzellen mittels MRT	197
4.7.1	Untersuchung der Aufnahme von Endorem Partikeln in 293T Zellen im zeitlichen Verlauf	197
4.7.1.1	Hochaufgelöste MRT-Bildgebung von 293T-Zellen nach Inkubation mit Endorem mittels 5 mm Spule	198
4.7.2	Visualisierung von Δ CD4 überexprimierenden 293T Zellen mit der 5 mm Spule und Applikation von Gd-DTPA	200
4.8	EGF-Rezeptorexpression und Erstellung eines gekoppelten Antikörpers	204
4.8.1	Antikörperproduktion, Reinigung und Kopplungsreaktion	204
4.8.2	<i>In vitro</i> Validierung der Antikörperspezifität und SPIO-Antikörper Konjugierung in PC12-Zellen	205
4.8.3	Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge mittels MRT	209

4.8.4	Bestimmung der EGF-Rezeptorexpression im Mausegewebe mittels semiquantitativer PCR:	210
4.9	PEGylierung von Makromolekülen als Modifikation für effiziente <i>in vivo</i>-Applikation	210
4.9.1	PEGylierung von PC12-Zellen zur Funktionsüberprüfung der Reaktion und Überprüfung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers zur Detektion.	211
4.9.2	Konzentrationsabhängige PEGylierung von Rinderserumalbumin	212
4.9.3	PEGylierung des monoklonalen Antikörpers 151-IgG (anti-EGF-Rezeptor).	213
4.9.4	Immunzytochemische Detektion der konjugierten Makromoleküle nach einer Lebendzellinkubation	214
4.10	Neurale Differenzierung der embryonalen Stammzelllinie CGR8.....	215
4.10.1	Proliferations- und Differenzierungsbedingungen.....	215
4.10.2	Kultivierung der Zelllinie CGR8 im undifferenzierten Zustand	215
4.10.2.1	Immunzytochemische Analyse der Expression von Differenzierungsmarkern	215
4.10.2.2	RT-PCR-Analyse der ES-Zellen im undifferenzierten Zustand	216
4.10.3	Induktion der neuralen Differenzierung.....	217
4.10.3.1	Entwicklung eines neuralen Differenzierungsprotokolls und Charakterisierung der Zellen	217
4.10.3.2	Charakterisierung der Expression von Kohlenhydraten der Laktoserie II	220
4.10.4	Differenzierung der ES-Zelllinie CGR8 im Suspensionsmodell	222
4.10.5	Generierung einer stabilen neuralen Vorläuferzelllinie aus den prädifferentiierten CGR8-Zellen	226
4.10.5.1	Entwicklung und Charakterisierung der Kulturbedingungen	226
4.10.5.2	Semiquantitative Analyse der Expression von Markerproteinen der neuralen Vorläuferzelllinie	226
4.10.5.3	Charakterisierung der Zelllinie N2/Euro #1 in der adhärenen Kulturform aufgrund der Expression neuraler Markerproteine	227
4.10.5.4	Proliferation und Differenzierung der Zelllinie N2/Euro #1 im Sphäroidmodell.....	229
4.10.6	Charakterisierung der Proliferation und Differenzierung der Aggregate.....	231
4.10.7	Nukleofektion der multizellulären Aggregate	233
4.10.7.1	Charakterisierung der N2/Euro #1-Zellen in der adhärenen Kulturform aufgrund der Expression neuraler Markerproteine: Differenzierung.....	235

4.10.8	Expression von CD15 und HNK-1 unter proliferativen und differenzierenden Kulturbedingungen	237
4.10.8.1	Aufnahme von Endorem und MRT-Visualisierung der Zelllinie N2/Euro #1	239
4.10.8.2	Detektion von HNK-1 in neuralen Vorläuferzellen mit SPIO-konjugierten Antikörpern	242
4.10.8.2.1	Markierung der Zelllinie N2/Euro #1 mit SPIO-konjugierten anti-CD15 und anti-HNK-1 Antikörpern für die MRT-Visualisierung	244
4.11	Applikation des Oberflächenrezeptors robo3 aus <i>Drosophila melanogaster</i> für die MRT-Bildgebung	246
4.11.1	Sequenzanalyse und speziesübergreifende Homologieanalyse der robo3 Rezeptoren.....	246
4.11.2	Produktion, biochemische Reinigung und Konjugation von superparamagnetischen Partikeln an den anti-robo3-Antikörper.....	249
4.11.3	Deletion der am 3'-Ende der cDNA lokalisierten zytoplasmatischen Domänen des robo3-Proteins aus <i>D. melanogaster</i>	250
4.11.3.1	Generierung von Δ robo3- und Luziferase überexprimierenden CGR8 Zellen unter Kontrolle der CMV- und Doublecortin-Promotoren.....	251
5	Diskussion	253
5.1	Zelluläre Visualisierung mit optischen und MRT Bildgebungsmethoden	253
5.2	HIV-1 basierende lentivirale Systeme zur effektiven Transduktion unterschiedlicher Zelltypen	264
5.3	Herstellung und Funktionsüberprüfung eines liposomalen Systems für den effektiven Transport von superparamagnetischen Partikeln	266
5.4	Überexpression polycistronischer mRNA mittels lentiviraler Transduktion	268
5.5	Überexpression der schweren Kette des Ferritinmoleküls in humanen Gli36 Δ EGFR Glioblastomzellen.....	269
5.6	Überexpression des humanen Δ CD4-Rezeptors in 293T-Zellen zur extrazellulären MRT-Bildgebung.....	279
5.7	EGF-Rezeptorexpression und Generierung SPIO-konjugierter Antikörper ...	285
5.8	PEGylierung von Makromolekülen als Modifikation für effiziente <i>in vivo</i> Anwendungen	286
5.9	Neurale Differenzierung der embryonalen Stammzelllinie CGR8.....	287
5.9.1	Differenzierung der ES-Zelllinie CGR8 im Suspensionsmodell	290
5.9.2	Generierung einer stabilen neuralen Vorläuferzelllinie aus den prädiffenzierten CGR8-Zellen	291
5.9.3	Proliferation und Differenzierung der Zelllinie N2-Euro #1 im Sphäroidmodell.	292

5.9.4	Nukleofektion der multizellulären Aggregate	294
5.9.5	Applikation des Oberflächenrezeptors robo3 aus <i>Drosophila melanogaster</i> für die MRT-Bildgebung	299
6	Literaturverzeichnis	302
	Lebenslauf.....	319
	Anhang	I
I	Konstruktion der Illuminationsplattform	I
II	Oligonukleotidliste.....	III
III	Vergleich der Robo3 Aminosäuresequenzen.....	V

Darstellungsverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 2–1: Beschreibung der Signaldetektion einer <i>in vivo</i> platzierten, lumineszierenden Probe:.....	35
Abbildung 3–1: Schematischer Aufbau des Agarosephantoms, das für die zellulären Untersuchungen mittels MRT und optischen Systemen verwendet wurde:.....	49
Abbildung 3–2: Plasmidkarte von K79:	56
Abbildung 3–3: Schematischer Aufbau des lentiviralen Vektorsystems:.....	59
Abbildung 3–4: Vektorkarten der verwendeten prälentiviralen Plasmide:	60
Abbildung 3–5: Ermittlung des Spulenprofils durch Berechnung der Signalintensität.....	78
Abbildung 3–6: Schematische Darstellung zur Ermittlung des Verhältnisses Kontrast: Gelrauschen:.....	79
Abbildung 4–1: Untersuchungsplattform für <i>in vitro</i> Experimente für den Einbau in das Biospace Lab-Photonen-Bildgebungssystem:	85
Abbildung 4–2: Untersuchung der homogenen Beleuchtung des Untersuchungsbereiches .	86
Abbildung 4–3: Quantitative Auswertung des Photonенfluxes von Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich mittels des Photonен-Bildgebungssystem:.....	87
Abbildung 4–4: Vergleichende Untersuchung der Photonенemission einer Mikropartikellösung bei drei verschiedenen Positionen:	88
Abbildung 4–6: Vektorkarte von pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry:	90
Abbildung 4–7: Determination der Photonенemission bei vier stabil mCherry ⁺ exprimierenden Gli36ΔEGFR Zelllinien:	91
Abbildung 4–8: Ermittlung des Detektionslimits von Gli36ΔEGFR-mCherry ⁺ - Einzelzellsuspensionen mit optischer Bildgebung:	92
Abbildung 4–9: Quantitative Korrelation zwischen Photonенflux und Zellzahl im Suspensionsmodell:	93
Abbildung 4–10: Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge im Suspensionsmodell mittels MRT:	94
Abbildung 4–11: Quantitative Auswertung der Endorem- markierten Gli36ΔEGFR-Zellen im Suspensionsmodell in Abhängigkeit von der Echozeit TE:	95
Abbildung 4–12: Spektralphotometrische Quantifizierung der intrazellulären Eisenkonzentration:.....	97
Abbildung 4–13: Lokalisation und Verteilung der Einzelzellen im multizellulären Aggregat: .	98
Abbildung 4–14: Histologische Färbung der mit Endorem inkubierten Gli36ΔEGFR-mCherry Zellen:	99

Abbildung 4–15: Immunzytochemische Analyse der Lokalisation und Verteilung der Endorempartikel nach 20 h Inkubation:.....	100
Abbildung 4–16: Ermittlung des Einflusses der intrazellulären Endorempartikel auf die Photonenemission und Detektion:	101
Abbildung 4–17: Koregistrierung des detektierten Photonenfluxes und der MRT-Aufnahmen:	102
Abbildung 4–18: Detaillierter Vergleich von Fluoreszenzbildgebung, MRT-Signal und mikroskopischer Phasenkontrastaufnahme:	103
Abbildung 4–19: 3-dimensionale Rekonstruktion der MRT-Daten aus Abbildung 4–18:.....	104
Abbildung 4–20: Korrelation zwischen sphärischem Aggregatvolumen und Photonenflux:..	104
Abbildung 4–21: Longitudinale Proliferationsanalyse des Photonenfluxes:	106
Abbildung 4–22: Korrelation von Photonenflux und Aggregatvolumen über vier Tage:.....	107
Abbildung 4–23: Vergleichende Analyse der Proliferationscharakteristika multizellulärer Aggregate in einem Zeitraum von vier Tagen:	107
Abbildung 4–24: Analyse der MRT-Signalintensität über einen Zeitraum von vier Tagen: ..	108
Abbildung 4–25: Bestrahlung der Tumorzellaggregate mit Gammastrahlen zur Simulation einer Strahlentherapie:.....	110
Abbildung 4–26: Quantitative Auswertung des Photonenfluxes nach Gamma-Bestrahlung:	111
Abbildung 4–27: Korrelation absoluter Zellmenge mit dem emittierten Photonensignal:	112
Abbildung 4–28: Korrelation aller Bildgebungsmodalitäten:.....	114
Abbildung 4–29: Quantitative Analyse zur Korrelation der unterschiedlichen Bildgebungsmodalitäten:	115
Abbildung 4–30: Vergleich unterschiedlicher Echozeiten zur Detektion multizellulärer Aggregate:.....	116
Abbildung 4–31: Visualisierung der multizellulären Tumoraggregate im modifizierten Agarosephantom:.....	117
Abbildung 4–32: Bestimmung des Fluoreszenzsignals mit Fluoreszenzpartikeln:	118
Abbildung 4–33: Inhibierung des Fluoreszenzsignals durch humanes Blut:	119
Abbildung 4–34: Langzeitkultivierung multizellulärer Aggregate in Gegenwart von Endorem:	121
Abbildung 4–35: Vergleichende Analyse hyperintensiver Bereiche in multizellulären Aggregaten:.....	122
Abbildung 4–36: Korrelation zwischen mikroskopisch ermittelten Strukturen und den MRT-Daten:.....	123
Abbildung 4–37: Vektorkarte von pLV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:	124

Abbildung 4–38: Lentivirale Transduktion der murinen Brustkrebszelllinie SMF mit LV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:.....	125
Abbildung 4–39: Transduktion einer humanen neuronalen Vorläuferzelllinie und einer humanen Glioblastomzelllinie mit LV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:	126
Abbildung 4–40: Vektorkarte von pLV-CMV-mCherry-IRES-GFP:	127
Abbildung 4–41: Intrazerebrale Transplantation und immunzytochemische Analyse von mCherry ⁺ und GFP ⁺ -293T Zellen:	128
Abbildung 4–42: Transduktion von 293T-Zellen mit LV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:...	128
Abbildung 4–43: Vektorkarte des Plasmids pLV-CMV-Luziferase-IRES-Puromycin:	129
Abbildung 4–44: Einzelzellklonierung und Charakterisierung des Photonenflusses von 10 Klonen der Zelllinie Gli36ΔEGFR-CMV-Luziferase:.....	130
Abbildung 4–45: Präparation von Liposomen für den intrazellulären Transport von superparamagnetischen Partikeln und DNA:	132
Abbildung 4–46: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Liposomen.....	133
Abbildung 4–47: Histologische Untersuchung des Transportes superparamagnetischer Partikel:	133
Abbildung 4–48: Analyse der intrazellulären Aufnahme von superparamagnetischen Partikeln bei Verwendung von DOPE und DC-Chol:	135
Abbildung 4–49: Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Detektion der superparamagnetischen Partikel in den Zellen:	136
Abbildung 4–50: Analyse der intrazellulären Aufnahme von SPIOs bei 293T-Zellen:	138
Abbildung 4–51: Konjugation der Kopfgruppen des Dioleylphosphatidylethanolamins mit einem Fluoreszein-Derivat:	139
Abbildung 4–52: Konjugation des Fluoreszein-Derivats an superparamagnetische Partikel:	139
Abbildung 4–53: Vektorkarte der Plasmide pcDNA3.1(+)-IRES-Luziferase und pcDNA3.1(-)-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase:	140
Abbildung 4–54: Vektorkarte der Plasmide pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-Puromycin und pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP:.....	141
Abbildung 4–55: Funktionsüberprüfung des Virus LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP und der prälentiviralen DNA in 293T-Zellen:	142
Abbildung 4–56: Vektorkarte des Vektors pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase:.....	143
Abbildung 4–57: Nachweis und Quantifizierung der Luziferaseexpression bei LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase transduzierten Gli36ΔEGFR-Zellen:	144
Abbildung 4–58: Verändertes Adhäsionsverhalten der mit LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase transduzierten Gli36ΔEGFR Tumorzellen:	144

Abbildung 4–59: Immunzytochemische Analyse der HA-Ferritin-Expression in Abhängigkeit von der initialen Viruspartikelkonzentration:.....	145
Abbildung 4–60: Detektion von HA-Ferritin und Quantifizierung der Luziferaseaktivität bei der 2/C3-Zelllinie:	146
Abbildung 4–61: Quantifizierung der Luziferaseexpression bei der Zelllinie 2/C3 und dem Klon 4/2:.....	147
Abbildung 4–62: Histologischer Nachweis von zweiwertigem Eisen nach exogener Eisensupplementation:.....	148
Abbildung 4–63: MRT-Untersuchung der HA-Ferritin ⁺ - und Luziferase ⁺ -2/C3-Zellen nach Inkubation mit 2 mM Eisen(II)-Ammoniumzitat:	149
Abbildung 4–64: Intrazerebrale Transplantation der Gli36ΔEGFR-2/C3-Zelllinie:	151
Abbildung 4–65: MRT-Analyse von Tier #1, 4 h nach Transplantation:	152
Abbildung 4–66: MRT-Analyse von Tier #1 sechs Tage nach Transplantation:	153
Abbildung 4–67: MRT-Analyse von Tier #1 zehn Tage nach Transplantation und subkutaner Applikation von Gd-DTPA:	154
Abbildung 4–68: Quantifizierung der <i>in vivo</i> ermittelten Signalintensitätsveränderungen der Tumoren über den Untersuchungszeitraum:.....	155
Abbildung 4–69: Ermittlung von T ₂ Werten des Gehirns von Maus #1:	155
Abbildung 4–70: Signalauslöschung und Ermittlung von T2 bei Tier #2, am 10. Untersuchungstag nach Transplantation der HA-Ferritin ⁺ und Luziferase ⁺ -Gli36ΔEGFR-Zellen:	156
Abbildung 4–71: Übersicht über die Lokalisation von Berlinerblau ⁺ -Zellen in beiden Tumoren:	157
Abbildung 4–72: Detaillierte morphologische Analyse der Berlinerblau ⁺ -Zellen im HA-Ferritin- und Luziferase exprimierenden Tumor:	158
Abbildung 4–73: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin und GFAP:	159
Abbildung 4–74: Immunhistochemischer Nachweis der Expression des HA-Fusionsproteins:	160
Abbildung 4–75: Determination der Luziferaseaktivität von 10 HA-Ferritin-IRES-Luziferase ⁺ -Gli36ΔEGFR-Klonen:	161
Abbildung 4–76: Kinetische Untersuchung der Luziferasereaktion:	162
Abbildung 4–77: Immunzytochemischer Nachweis der Hämagglutininexpression:	163
Abbildung 4–78: Immunzytochemischer Nachweis der Luziferaseexpression:.....	163
Abbildung 4–79: Immunzytochemischer Nachweis der Intermediärfilamente anhand einer Vimentinfärbung:	164
Abbildung 4–80: Immunzytochemischer Nachweis der schweren Kette des Ferritinmoleküls:	165

Abbildung 4–83: Effekte der exogenen Eisen(III)-Ammoniumzitratsupplementierung auf die Proliferation der HA-Ferritin ⁺ - und Luziferase ⁺ -Gli36ΔEGFR-Klone:.....	167
Abbildung 4–84: Untersuchung der Eisenspeicherung nach Inkubation mit Eisen(III)-Ammoniumzitratsupplementierung:	168
Abbildung 4–85: Detektion der mit FAC inkubierten Kontrollzellen 4/2N und HA-Ferritin ⁺ - und Luziferase ⁺ -Gli26ΔEGFR-Zellen:	169
Abbildung 4–86: MRT-Untersuchung der beiden Zelllinien Gli36ΔEGFR- Klon 4/2N und Klon #5 nach exogener Eisensupplementierung:.....	170
Abbildung 4–87: Ermittlung der Eisenkonzentration mittels quantitativem Eisentest in vergleichenden Experimenten:.....	171
Abbildung 4–88: Vergleichende Untersuchung von FAC inkubierten Zellen mittels MRT: ..	172
Abbildung 4–89: Intrazerebrale Transplantation der Zelllinie GLi36ΔEGFR Klon #5 in eine Nacktmaus:	173
Abbildung 4–90: Klonierung der Expressionsplasmide pK79-ΔCD4 und pK79-ΔCD4-K201:	174
Abbildung 4–91: Immunzytochemische Analyse der ΔCD4-Expression in 293T-Zellen:	175
Abbildung 4–92: MRT-Visualisierung der ΔCD4 ⁺ -293T Zellen nach Inkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper:.....	176
Abbildung 4–93: Vergleichende Quantifizierung der Expression von mCherry und der <i>firefly</i> -Luziferase nach Transfektion von 293T-Tumorzellen:	177
Abbildung 4–94: Immunzytochemische Analyse der mCherry-, <i>firefly</i> -Luziferase- und der ΔCD4-Expression in 293T-Tumorzellen, die mit dem Plasmid pK79-ΔCD4-K201 transfiziert wurden:.....	178
Abbildung 4–95: Luziferaseaktivität der ΔCD4 ⁺ - und Luziferase ⁺ -293T-Einzelzellklone: ...	179
Abbildung 4–96: Ermittlung der Eisenkonzentration nach spezifischer- und unspezifischer Antikörper-Rezeptor-Interaktionen mittels spektralphotometrischem Eisentest:.....	180
Abbildung 4–97: Immunzytochemische Analyse der 293T-ΔCD4 ⁺ -Klon #5-Tumorzellen nach Inkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper:.....	181
Abbildung 4–98: Quantifizierung der minimal detektierbaren Zellmenge mittels MRT:.....	183
Abbildung 4–99: Expression des trunkierten ΔCD4-Rezeptors in 293T-K79-ΔCD4-K201-Klon#5 Aggregaten:	184
Abbildung 4–100: Immunzytochemische Lokalisation der Antikörper-SPIO-Komplexe:	185
Abbildung 4–101: Untersuchung der Antikörper-SPIO-Komplexe nach 1 h und 5 h Inkubation mittels LSM:	186
Abbildung 4–102 Membranassoziierte Lokalisation der superparamagnetischen Partikel nach 5 h Inkubation mit dem Antikörper:	187

Abbildung 4–103: FACS-Analyse der $\Delta CD4^+$ -Zellen zur quantitativen Analyse der Rezeptorexpression und der Bindung der SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper:	188
Abbildung 4–104: Multimodale Bildgebung im Agarosephantom von 293T- $\Delta CD4$ überexprimierenden Zellen:	190
Abbildung 4–105: Detaillierte Analyse der MRT-Untersuchungen nach SPIO-konjugierter Antikörperinkubation von $\Delta CD4^+$ -multizellulären Aggregaten:	191
Abbildung 4–106: Quantitative Analyse der unterschiedlichen Bildgebungsreporter im Tumoraggregatmodell:	192
Abbildung 4–107: Subkutane Implantation von 293T-K79- $\Delta CD4$ -K201 Zellen in eine Nacktmaus:	193
Abbildung 4–108: Subkutane Implantation der 293T-K79- $\Delta CD4$ -K201-Klon #5 Zellen in Nacktmäuse:	195
Abbildung 4–109: Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Untersuchung an explantierten Tumoren:	196
Abbildung 4–110: Bestimmung des Eisengehaltes von 293T-Zellen nach Inkubation mit Endorem mittels quantitativem Eisentest und MRT:	197
Abbildung 4–111: Analyse der Signalintensität der 5 mm Spule und Erstellung eines Spulenprofils:	198
Abbildung 4–112: Lokalisation Endorem markierter Zellen mittels 5 mm Spule:	199
Abbildung 4–113: Lokalisation der untersuchten Zellen innerhalb des Probengefäßes für die 5 mm Spule:	200
Abbildung 4–114: Quantitative Auswertung der Signalintensität nach Zugabe von Gd-DTPA:	201
Abbildung 4–115: Vergleichende Visualisierung $\Delta CD4$ überexprimierender 293T-Zellen nach Inkubation mit dem anti-CD4-SPIO-Antikörper:	202
Abbildung 4–116: Lokalisation und Identifikation der einzelnen Zellen in aufeinander folgenden Schichten:	203
Abbildung 4–117: Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese des EGFR-Antikörpers:	204
Abbildung 4–118: Visualisierung der EGF-Rezeptorexpression in PC12 Zellen:	206
Abbildung 4–119: MRT-Untersuchung nach Inkubation der PC12-Zellen mit dem SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper:	206
Abbildung 4–120: Inkubation von PC12-Zellen mit dem SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper:	207
Abbildung 4–121: Immunzytochemische Analyse der EGFR-Expression und Spezifität der SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper:	208

Abbildung 4–122: Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge nach Markierung des EGF-Rezeptors:	209
Abbildung 4–123: Semiquantitative PCR von PC12 Zellen zur Quantifizierung der EGF-Rezeptorexpression:	210
Abbildung 4–124: Schematische Darstellung der PEGylierung eines Moleküls mittels N-Hydroxysuccimid (NHS) Ester-Aktivierung:.....	211
Abbildung 4–125: Nachweis der PEGylierung von PC12 Zellen mittels immunzytochemischer Markierung:	211
Abbildung 4–126: Proteinbiochemischer Nachweis der PEGylierung mittels Zink-Imidazol-Färbung:.....	212
Abbildung 4–127: PEGylierung des monoklonalen Antikörpers 151-IgG und Verifizierung nach SDS-PAGE mit der Zink-Imidazol-Färbung:.....	213
Abbildung 4–128: Immunzytochemische Detektion des PEGylierten Antikörpers 151-IgG und BSA-PEG nach Lebendzellinkubation:.....	214
Abbildung 4–129: Expression von CD15 und Oct 3/4 bei CGR8- und D3-ES-Zellen:	215
Abbildung 4–130: RT-PCR-Analyse von Markertranskripten der ES-Zellen im undifferenzierten Zustand:	216
Abbildung 4–131: Phasenkontrastmikroskopische Dokumentation nach Einleitung der neuralen Differenzierung:.....	217
Abbildung 4–132: Immunzytochemische Analyse der ES-Zelllinien nach neuraler Induktion:	218
Abbildung 4–133: Detaillierte Untersuchung der Aktivität des β -Aktin Promotors unter Differenzierungsbedingungen der D3 ^{GFP} -ES-Zellen:.....	219
Abbildung 4–134: Expression von A2B5, CD15 und HNK-1 im undifferenzierten Zustand und nach neuraler Differenzierung:.....	220
Abbildung 4–135: Detaillierte Analyse der HNK-1-Expression nach neuraler Differenzierung:	221
Abbildung 4–136: Schematische Übersicht über die Differenzierungsbedingungen in Suspension:	222
Abbildung 4–137: Differenzierung der ES-Zellen CGR8 im Suspensionsmodell:	223
Abbildung 4–138: Visualisierung der Neuritogenese der differenzierten Aggregate:.....	223
Abbildung 4–139: Differenzierung der multizellulären Aggregate:	224
Abbildung 4–140: Immunzytochemische Analyse der differenzierten Aggregate:	225
Abbildung 4–141: Kultur der neuralen Vorläuferzellen N2/Euro #1:.....	226
Abbildung 4–142: mRNA-Expressionsprofil der Zelllinie N2/Euro #1 unter proliferativen Bedingungen:	227

Abbildung 4–143: Expression von Markerproteinen während der Proliferation der N2/Euro #1- Zellen in adhärenter Kultur:.....	228
Abbildung 4–144: Hochaufgelöste Mikroskopie zur Lokalisation von MAP-2 _{a,b,c} im Zytoplasma der neuralen Vorläuferzellen:	228
Abbildung 4–145: Morphologische Größenunterschiede nach 4 d Aggregationskultur:	229
Abbildung 4–146: Bestimmung der minimalen Durchmesser der Aggregate nach einer 4 tägigen Kultivierungszeit:	230
Abbildung 4–147: Charakterisierung der Doublecortin- und β 3-Tubulinexpression der Aggregate:.....	231
Abbildung 4–148: Markerexpression nach 4 d Differenzierung in dem Medium B27/Euro:	232
Abbildung 4–149: Markerexpression nach 4 d Differenzierung in dem Medium 10 % KSR:.....	233
Abbildung 4–150: Nukleofektion von Aggregaten der Zelllinie N2/Euro #1:.....	234
Abbildung 4–151: Überprüfung der Luziferaseexpression mittels optischem Bildgebungssystem:	234
Abbildung 4–152: Immunzytochemischen Analyse nach der viertägigen Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen:	235
Abbildung 4–153: Detaillierte Untersuchung DCX-exprimierenden Zellen in der Differenzierungsphase mit 10 % KSR-Medium:.....	236
Abbildung 4–154: Immunzytochemische Charakterisierung der Doublecortin-Expression nach Differenzierung in B27 / Euro und 10 % KSR:.....	236
Abbildung 4–155: Lokalisation der beiden Kohlenhydratepitope HNK-1 und CD-15:.....	237
Abbildung 4–156: Expression der Kohlenhydratepitope CD15 und HNK-1 unter Differenzierungsbedingungen:	237
Abbildung 4–157: Immunzytochemische Analyse der Expression von HNK-1 und GFAP:	238
Abbildung 4–158: Quantifizierung der vitalen Zellzahl nach Endoreminkubation:	239
Abbildung 4–159: Immunzytochemische Analyse der Endoremaufnahme und Verteilung nach 14 h Inkubation:.....	240
Abbildung 4–160: Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge der mit Endorem markierten Zellen mittels MRT:	241
Abbildung 4–162: Immunzytochemische Analyse von drei unterschiedlichen anti-HNK1-Antikörpern, die mit einem superparamagnetischen Partikel konjugiert wurden:.....	243
Abbildung 4–163: Minimum-Intensitäts-Projektion des MRT der mit HNK-1 oder CD 15 inkubierten N2/Euro #1 und den in 10 % KSR differenzierten Zellen:	244
Abbildung 4–164: Minimum-Intensitäts-Projektion des MRT der Magnet-Chromatographie von N2/Euro #1 Zellen mit HNK-1 und CD 15:.....	245
Abbildung 4–165: Sequenzvergleich der Aminosäuren der Antigenbindestelle des Rezeptors robo3:.....	248

Abbildung 4–166: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der biochemischen Antikörperreinigung:	249
Abbildung 4–167: Deletion der am 3'-Ende der cDNA lokalisierten zytoplasmatischen Domänen des robo3-Proteins:	250
Abbildung 4–168: Genkarten der Plasmide pcDNA3.1(+)-CMV-K79- Δ robo3-IRES-Luziferase und pcDNA3.1(+)-DCX-K79- Δ robo3-IRES-Luziferase:.....	251
Abbildung 4–169: Luziferaseexpression der transfizierten CGR8-Zellen:.....	252
Abbildung 4–170: Nachweis des Δ robo3-Gens in der nukleären DNA der CGR8-Zellen: ...	252

Tabellen

Tabelle 4–1: Bestimmung des Regressionskoeffizienten R-Quadrat:	96
Tabelle 4–2: Funktionen und Regressionskoeffizienten R^2 für die longitudinale Messung der MRT-Signalintensitäten:	109
Tabelle 4–3: Ermittlung der Funktionen und Regressionskoeffizienten R^2 für die vergleichende Analyse unterschiedlicher Echozeiten:	116
Tabelle 4–4: Übersicht über die ermittelten Messwerte:	196
Tabelle 4–5: Übersicht über die verwendeten Akquisitionspamerer:	200
Tabelle 4–6: Speziesvergleich der Antikörperbindung und Auswahl eines geeigneten Testsystems anhand semiquantitativer immunzytochemischer Untersuchungen:.....	205
Tabelle 4–7: Reinigung von HNK-1-Antikörpern.	243
Tabelle 4–8: Speziesübergreifende und vergleichende Homologieanalyse der robo3 Rezeptoren:.....	246
Tabelle 4–9: Vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen der Antigenbindestelle: ..	247

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A _{xyz}	Absorption bei xyz Nanometern
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	centi 10 ⁻¹
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA, durch Reverse Transkription aus RNA entstandene komplementäre DNA
CIAP	Alkaline Phosphatase aus Kälberdarm ([engl.]: <i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DC-Chol	3β-[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-Carbamoyl]-Cholesterol
DCX	Doublecortin
DCTA	1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
CMV	Zytomegalie Virus ([engl.]: <i>Cytomegalo Virus</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DMEM	von Dulbecco modifiziertes Eagle Medium ([engl.]: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E	Embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors
ELISA	([engl.]: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ES	Embryonale Stammzelle
<i>et al</i>	und andere ([lat.]: <i>et alii</i>)
FAC	Eisen(III)-Ammoniumzitat ([engl.]: <i>Ferric Ammonium Citrate</i>)
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FBS	Fötales Kälberserum ([engl.]: <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FGF-2	Fibroblasten Wachstumsfaktor-2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G418	Antibiotikum Geneticin
Gd	Gadolinium
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ([engl.]: <i>Green Fluorescent Protein</i>)
Gy	Durch ionisierende Strahlen verursachte Energiedosis ([engl.]: <i>Gray</i>)
h	Stunde
HEMA	Poly-(2-Hydroxyethyl)-Methacrylat
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus-1 ([engl.]: <i>Human Immunodeficiency Virus-1</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase ([engl.]: <i>Horse Radish Peroxidase</i>)
IMDM	von Iscove modifiziertes Dulbecco Medium ([engl.]: <i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>)
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
k	Kilo 10 ³

kb	Kilobase(n)
KSR	([engl.]: <i>Knockout Serum Replacment Factor</i>)
L	Liter
LIF	Leukemie Inhibitionsfaktor
LSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
μ	Mikro 10 ⁻⁶
LB	Luria Bertani (Medium)
LV	Lentivirus
M	Molar (mol·L ⁻¹)
M	Mega 10 ⁶
m	Meter
m	Milli 10 ⁻³
MCS	Multiple Klonierungsstelle ([engl.]: <i>Multiple Cloning Site</i>)
min	Minute
MOI	Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro Zelle ([engl.]: <i>Multiplicity of Infection</i>)
mol	Mol
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
n	als Präfix: Nano 10 ⁻⁹
n	Stichprobengröße
OD	optische Dichte
p	Pico 10 ⁻¹²
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Puffer ([engl.]: <i>Phosphat Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimine
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pLV	prälentiviral
POFI	kombinierte Beschichtung aus Poly-L-Ornithin und Fibronectin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR: Synthese von cDNA aus RNA, von der anschließend eine PCR zum Nachweis des Transkripts dient.
s	Sekunde
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal Broth mit Kataboliten-Repression (Medium)
SPIO	Superparamagnetisches Eisenpartikel
SV40	([engl.]: <i>Simian Virus 40</i>)
t _E	Elongationszeit
T ₁	Zeitkonstante T ₁ ; beschreibt die longitudinale Magnetisierung
T ₂	Zeitkonstante T ₂ ; beschreibt die transversale Magnetisierung
T ₂ [*]	effektive Relaxationszeit
T _m	Anlagerungstemperatur
TBS	Puffer ([engl.]: <i>Tris Bufered Saline</i>)
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
u. a.	unter anderem
U	Unit
U.E.	Unabhängige Einheiten
U.L.E.	Unabhängige Lichteinheiten
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor ([engl.]: <i>Vascular Endothelial Growth factor</i>)
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Nach dem Entwurf und der Konstruktion einer Illuminationsplattform für das Photonen-Bildgebungssystem der Firma Biospace Lab konnte die Sensitivität und Auflösung der gemessenen Proben erheblich verbessert werden. Für das Ziel, kleine Zellmengen zu verwenden, war dieses von deutlichem Vorteil und wurde für weitere Versuche verwendet.

Es wurde eine Gli36 Δ EGFR-mCherry-Zelllinie generiert, die das Fluoreszenzprotein mCherry überexprimiert und sich für die Analyse der Fluoreszenzemission im Photonen-Bildgebungssystem gut eignete. Die Einbettung der Zellen in Agarose wurde für die Arretierung der Einzelzellen oder Zellaggregate verwendet, um detaillierte Untersuchungen einzelner Bereiche mit mehreren Bildgebungsverfahren durchführen zu können. Die Weiterentwicklung dieses Modells konnte auch die Voraussetzungen für longitudinale Untersuchungen mittels MRT und optischen Bildgebungsverfahren schaffen und schloss die Untersuchung der zellulären Proliferationsdynamik nach Gamma-Bestrahlung mit ein.

Die Detektion der mCherry-überexprimierenden Zellen wurde in Suspension und im Aggregatmodell mit dem Photonen-Bildgebungssystem untersucht. Ein linearer Zusammenhang zwischen Photonenflux und Aggregatvolumen, bzw. Zellzahl konnte ermittelt werden. Die Bestimmung des Photonenfluxes erwies sich als Parameter, der verlässlich die Zellanzahl, aber auch die Vitalität der Aggregate angibt, was nach Bestrahlungsexperimenten beobachtet wurde.

Nach Präinkubation der Gli36 Δ EGFR-mCherry-Zellen mit Endorem als MRT-Kontrastmittel wurde erneut der Vergleich zwischen Suspensionskultur und Aggregatkultur gezogen. Ein linearer Zusammenhang wurde zwischen MRT-Signalverlust und Aggregatvolumen in Abhängigkeit von der gewählten Echozeit bestimmt. Das Aggregatmodell erwies sich sowohl für die optische Bildgebung als auch für das MRT als sensibles Modell für die Visualisierung sehr kleiner Zellmengen.

Für die Integration von Reportergenen wurde ein lentivirales System verwendet, welches sich als hocheffizientes Transduktionssystem herausstellte. Es wurde durch die Integration einer IRES-Sequenz in das Plasmid die Translation mehrerer Proteine in der transduzierten Zelle gewährleistet, welche für unterschiedliche Bildgebungsverfahren verwendet werden können. Zum ersten Mal konnte die Verwendung zweier IRES-Elemente für die Translation dreier Proteine erfolgreich gezeigt werden.

Es wurde ein liposomales Transfersystem für superparamagnetische Partikel hergestellt, optimiert und detailliert charakterisiert. Die Aufnahme von SPIOs in Zellen durch Liposomentransfer ist eine effektive Methode, diese für die MRT-Bildgebung zu markieren. Der Vorteil selbst hergestellter Liposomen lässt weitere Konjugationen, wie Fluorochrome oder PEG zu,

was für weitere *in vivo*-Applikationen sinnvoll erscheint und die histologische Analyse vereinfacht

Die Überexpression der schweren Kette des Ferritins in Verbindung mit der *firefly*-Luziferase in Gli36 Δ EGFR-Zellen erbrachte nachweisbar eine Anreicherung der Ferritinproteine in verschiedenen Klonen. Die überexprimierenden Zellen zeigten eine verminderte Proliferation und eine erhöhte Adhäsion im Vergleich zu Kontrollzellen, was durch die Supplementation mit externem Eisen (FAC) aufgehoben werden konnte. Nach Präinkubation mit FAC konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung von Eisen in den überexprimierenden Zellen sehr variabel war. Erste *in vivo*-Untersuchungen waren erfolgreich und die überexprimierenden Zellen wiesen einen höheren Signalverlust im MRT auf als die Kontrollzellen, was mit histologischen Ergebnissen übereinstimmte.

Als Möglichkeit mit superparamagnetischen Partikeln einen zellspezifischen Signalverlust im MRT zu erzielen, wurde die extrazelluläre Zelloberflächen-Markierung gewählt. Der humane CD4-Rezeptor wurde in Verbindung mit Luziferase und mCherry in 293T-Tumorzellen überexprimiert. SPIO-gekoppelte Antikörper wurden verwendet, um eine spezifische Bindung an CD4 überexprimierenden Zellen zu erzielen. Die Verwendung von Zellaggregaten und die hochaufgelösten MRT-Daten von markierten Einzelzellen lassen den Schluss zu, dass die SPIO-Antikörper sich auf der Zelloberfläche anreichern. Dieses wurde fluoreszenzmikroskopisch bestätigt.

Als weitere Möglichkeit wurden endogene Rezeptoren oder Proteine für die Markierung mit SPIOs betrachtet. Der EGF-Rezeptor in PC12-Zellen oder verschiedene Kohlenhydratepitope der Laktoserie 2 von neuronalen Zellen dienten als Zielproteine für SPIO-gekoppelte Antikörper. Die Markierung mit SPIOs an der Zelloberfläche ist spezifisch und effizient.

Als Grundlage für eine effektive *in vivo* Anwendung wurde eine PEGylierungsstrategie von Zellen und Antikörpern etabliert.

Um weiterführende Untersuchungen an neuronalen Zellen durchführen zu können, wurde die murine ES-Zelllinie CGR8 in neurale Zelltypen differenziert. Dazu wurde ein Protokoll etabliert, welches zu einer effizienten Expression des neuronalen Markerproteins Doublecortin (DCX) führte. Darüber hinaus wurde die Expression der Kohlenhydratepitope A2B5, CD15 und HNK-1 während der neuronalen Differenzierung der ES-Zellen detailliert untersucht. Der humane Promotor von DCX wurde für die zelltypspezifische Expression des signalinkompetenten Oberflächenproteins Robo3 aus *Drosophila melanogaster* verwendet und stabil überexprimierende ES-Zellen hergestellt.

Summary

The generation of an illumination platform for the photon imager from Biospace Lab led to a higher sensitivity and resolution. Thus very small cell amounts could be detected and the platform was used for further studies.

A Gli36 Δ EGFR-mCherry cell line was generated for analyzing fluorescence emission in the photon imager by overexpressing mCherry as reporter gene. The adjustment of cells or cell aggregates in an agarose matrix was used to analyze cell regions with different imaging modalities. A further development was the multimodal in vitro analysis of proliferational behavior of multicellular spheroids in longitudinal studies with multiple measurements and coregistration.

The fluorescence of the mCherry overexpressing cells was examined in suspension and in aggregate culture. A linear correlation between photon flux and aggregate volume or cell amount was calculated. Due to irradiation studies not only cell amount but vitality of cells could be considered by observing fluorescence.

Incubating the cells with Endorem as contrast agent for MRI studies suspension and cell aggregate culture had been compared. A linear correlation between MRI signal loss, cell volume or absolute cell amount of cellular aggregates was ascertained depending on the echo time of measurement. Culturing cells as aggregates is a sensitive model for observing small cell amounts by optical imaging and MRI.

A liposomal based transfection system was established and optimized for highly efficient intracellular transport of superparamagnetic particles. Conjugation strategies could be expanded like PEG, fluorochromes, etc. for further in vivo studies or to simplify histological analyses.

A lentiviral system was used to integrate reporter genes into the genome of cells with high efficacy. For different imaging modalities the expression of more than one gene was achieved via introducing an IRES element. The use of two IRES elements for the expression of three genes was established.

The heavy chain of the ferritin molecule was overexpressed in combination with firefly-luciferase in Gli36 Δ EGFR cells. Overexpressing cells showed a reduced proliferation rate and a higher adhesion by comparison with control cells which could be compensated with supplementation of ferric ammonium citrate (FAC). The iron accumulation after incubation with FAC as an external iron source in overexpressing cells was very variable. Preliminary in vivo results showed an accumulation of iron only in the cortex, where injected ferritin overexpressing cells were located. Acquired MRI and optical images could be correlated to histological results.

Another strategy for cell specific accumulation of iron for signal loss in MRI is labeling extracellular receptors at the cell surface. Human CD4-receptor in combination with

luciferase and mCherry was overexpressed in 293T cells. For detection of the receptor with MRI the specific anti-CD4 antibody has been coupled to superparamagnetic particles (SPIO). SPIO conjugated antibodies are localized at the cell surface which was examined with fluorescence microscopy and high resolution MRI by labeling cell aggregates or single cells and further quantified with high resolution MRI techniques.

Another possibility is labeling endogenous receptors or proteins as target for SPIO antibodies like the EGF receptor on PC12 cells or carbohydrate epitopes on neural cells. Extracellular labeling was highly specific and efficient.

For future in vivo application the PEGylation of cells and antibodies was established.

A neural differentiation protocol was developed and established for the generation of neuronal cells expressing the neuronal markerprotein Doublecortin from murine embryonic stem cells. The expression of the different carbohydrate epitopes A2B5, CD15 and HNK-1 during neural differentiation of ES-cells were analyzed and used for magnetchromatography and high resolution MRI visualization.

2 Einleitung

2.1 Molekulare Bildgebung

Molekulare Bildgebungsmethoden weisen mit direkten oder indirekten Methoden die räumliche und zeitliche Verteilung von molekularen und zellulären Prozessen für biochemische, biologische, diagnostische, oder therapeutische Anwendungen nach [1]. Die Wahl der Bildgebungsmethode hängt sowohl von der Fragestellung, als auch von dem Anwendungsgebiet ab. In einer groben Übersicht weisen alle verwendeten Methoden einen gemeinsamen Nenner auf: Sie ermöglichen die räumliche und zeitliche Beschreibung des zu untersuchenden Prozesses auf eine nicht-invasive Weise. Zu den modernen Bildgebungstechniken zählen Computertomographie (CT), Magnet-Resonanztomographie (MRT), Gammazintigraphie, optische Bildgebungstechniken, Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Ultraschall-Bildgebung. Die beiden Methoden MRT und optische Bildgebung werden detaillierter beschrieben.

2.2 Magnet-Resonanztomographie

Die Magnet-Resonanz-Tomographie und Magnet-Resonanz-Spektroskopie basieren auf dem kernmagnetischen Resonanzeffekt, der im Jahre 1946 beschrieben wurde [2-3]. Typische Kerne, die eine wesentliche Rolle für die Bestimmung des Kernmagnetischen Resonanzeffektes (NMR) spielen sind ^{31}P , ^{13}C , ^{23}Na , ^{19}F und ^1H , wobei ^1H mit die größte Bedeutung für biomedizinische Applikationen besitzt, da es in allen biologischen Proben in hohem Anteil vorhanden ist und von allen Kernen das größte gyromagnetische Verhältnis aufweist. Ohne die Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes B_0 befinden sich die individuellen magnetischen Momente (Spins) der Wasserstoffkerne in einem ungeordneten Zustand und orientieren sich nach Einwirkung des externen Magnetfeldes parallel oder vorzugsweise antiparallel abhängig von der Richtung des angelegten Magnetfeldes. Dies stellt die Grundlage für NMR-Experimente dar, die nur auf diesem geringen Besetzungsunterschied beruht und die Spins aus der antiparallelen in die parallele Ausrichtung umklappt. Bei der Bestimmung eines NMR-Signals wird elektromagnetische Energie der Frequenz ν in die zu untersuchende Probe eingestrahlt. Wenn die eingestrahlte Energie E exakt dem Energieunterschied zwischen der parallelen und antiparallelen Ausrichtung entspricht, findet ein Umklappen statt, wobei die bei diesem Prozess aufgenommene Energie E als Funktion der eingestrahlten Frequenz ν und dem Planckschen Wirkungsquantum h dargestellt werden kann.

Dies wird durch die Plancksche Formel:

$$E = h * \nu$$

beschrieben. Für den Zusammenhang zwischen der Magnetfeldstärke B_0 und der Energiedifferenz ΔE der beiden Spinausrichtungen gilt:

$$\Delta E = \gamma * \frac{h}{2\pi} * B_0$$

Wobei γ eine gyromagnetische Konstante darstellt. Eine Verstärkung des externen Magnetfeldes führt damit zu einer Vergrößerung der Energiedifferenz zwischen beiden Zuständen und damit zu einem höheren NMR-Signal. Der Zusammenhang zwischen der atomaren Resonanzfrequenz des Atomkerns und der externen magnetischen Feldstärke wird durch die Lamor-Beziehung:

$$\nu_0 = \gamma * \frac{1}{2\pi} * B_0$$

beschrieben [4]. Aufgrund der geringen Empfindlichkeit wird das NMR-Signal von starkem Hintergrundrauschen überlagert, was durch mehrfach durchgeführte Mittelungen der NMR-Signal-Messung verbessert werden kann. Durch das bestehende externe Magnetfeld befinden sich die Spins in einem charakteristischen Gleichgewichtszustand der durch die Einstrahlung von Radiofrequenzenergie über eine Spule verändert wird. Einige parallel orientierte Kerne werden in die energiereichere antiparallele Orientierung angehoben bis eine Gleichgewichtsverteilung erreicht ist. Nach Abschaltung der Radiofrequenzenergie wird von den Spins erneut der Gleichgewichtszustand angestrebt, was mit einem Energieverlust einhergeht. Dieser Vorgang wird Spin-Gitter-Relaxation genannt und durch die charakteristische Zeitkonstante T_1 beschrieben. Sie bestimmt zusammen mit der Repetitionszeit T_R die Signalintensität eines NMR-Signals. Zwischen der Zunahme der Signalintensität und T_R besteht ein exponentieller Zusammenhang, der durch:

$$S = S_0 * \left[1 - \exp\left(-\frac{T_R}{T_1}\right) \right]$$

beschrieben wird.

Neben der Zeitkonstante T_1 , welche die longitudinale Magnetisierung beschreibt, muss ein weiterer Relaxationsmechanismus, der die transversale Magnetisierung durch die Zeitkonstante T_2 beschreibt, berücksichtigt werden. Der T_2 - oder Spin-Spin-Relaxationsmechanismus basiert auf dem Energietransfer zwischen benachbarten Atomkernen und ist nahezu unabhängig von der Feldstärke. Der transversale Relaxationsprozess kann durch makroskopische und mikroskopische Feldinhomogenitäten verstärkt werden, was als effektive Relaxationszeit T_2^* beschrieben wird [5].

Bei der Messung des NMR-Signals wird die Abgabe der Energie, die mit einer Sendespule in die Probe eingestrahlt wird, mittels einer Empfangsspule gemessen. Das in der Spule empfangene Signal fällt unmittelbar nach der Anregung mit der Zeitkonstante T_2 ab:

$$S = S_0 * \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right)$$

Die Änderung der Signalintensität wird hier als Funktion der Zeit beschrieben und wird mittels der Fourier-Transformation in die Beziehung Signalintensität als Funktion der Frequenz überführt.

2.2.1 Positiv und negativ wirkende Kontrastmittel

Kontrast definiert die relative Signalintensitäts-Differenz zwischen zwei benachbarten Regionen innerhalb einer zu untersuchenden Probe. Der Kontrast eines MRT-Bildes ist das Ergebnis von vielen unterschiedlichen Faktoren. Dazu gehören intrinsische Faktoren, zu denen unter anderem die longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten und die Protonendichte zählen. Zu den extrinsischen Faktoren gehören unter anderem die Feldstärke des externen magnetischen Feldes und die Art der verwendeten Pulssequenz. Kontrastmittel verändern die intrinsischen Parameter und führen damit zu einer Erhöhung der Signalintensitäts-Differenz zwischen benachbarten Regionen einer Probe. Durch eine Verkürzung der Protonen-Relaxationszeiten erhöhen positiv wirkende Kontrastmittel die Signalintensität, während negativ wirkende Kontrastmittel die Signalintensität verringern.

Die Signalverstärkung (positiv oder negativ), die durch das Kontrastmittel ausgeübt wird, hängt von der Relaxivität (r_1 und r_2) ab, welche definiert ist als die Erhöhung der Relaxationsrate ($R_1 = 1/T_1$ der; $R_2 = 1/T_2$), die durch $1 \text{ mmol}^{-1} \text{ L}^{-1}$ des Kontrastmittels hervorgerufen wird. Für ein positiv wirkendes Kontrastmittel, wie paramagnetische Substanzen, wird die Relaxationsrate R_1 beschrieben durch:

$$R_{1(\text{gegeben})} = \frac{1}{T_{1(\text{gegeben})}} = \frac{1}{T_{1(\text{vorher})}} + r_1 * C$$

R_1 und $1/T_{1(\text{gegeben})}$ beschreiben dabei die globale Relaxationsrate; $T_{1(\text{vorher})}$ beschreibt die Relaxationszeit vor der Addition des Kontrastmittels; C beschreibt die Kontrastmittelkonzentration und r_1 beschreibt die Relaxivität.

Für ein negativ wirkendes Kontrastmittel, wie superparamagnetische Substanzen, wird die Relaxationsrate R_2 beschrieben durch:

$$R_{2(\text{gegeben})} = \frac{1}{T_{2(\text{gegeben})}} = \frac{1}{T_{2(\text{vorher})}} + r_2 * C$$

R_2 und $1/T_{2(\text{gegeben})}$ beschreiben dabei die globale Relaxationsrate; $T_{2(\text{vorher})}$ beschreibt die Relaxationszeit vor der Addition des Kontrastmittels; C beschreibt die Kontrastmittelkonzentration und r_2 beschreibt die Relaxivität.

Die meisten paramagnetischen Substanzen sind Komplexe des Lanthanoids Gadolinium(III) (Gd), die mit hydrophilen Poly-(Aminocarboxylat)-Liganden cheliiert wurden, um die Toxizität des Schwermetalls zu reduzieren. Eine oft verwendete Komponente ist Gd-DTPA

(Handelsname: Magnevist), das eine Relaxivität von $r_1 = 3,3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ und $r_2 = 3,9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (bestimmt mit einem 1,5 T MRT bei einer Temperatur von 37 °C in H_2O) aufweist [6].

Negativ wirkende Kontrastmittel (superparamagnetische Kontrastmittel) bestehen gewöhnlich aus Eisenoxid Nanopartikeln (Fe_3O_4) oder Maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Aufgrund der Durchmesser, Kristallstruktur, Oberflächenbeschichtung und Organisation lassen sich die superparamagnetisch wirkenden Eisenoxid Partikel in verschiedene Klassen einteilen. SPIOs weisen einen Durchmesser zwischen 4 bis 50 nm auf. Weitere Klassen sind die ultrakleinen SPIOs (USPIO), sehr kleine SPIOs (VSOP), monokristalline Eisenoxid-Partikel (MION), kreuzvernetztes Eisenoxid (CLIO) [7-8]. Das Kontrastmittel Endorem weist eine hydrodynamische Größe von 120 bis 180 nm auf und besitzt eine Relaxivität von $r_1 = 10,1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ und $r_2 = 120 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (bestimmt mit einem 1,5 T MRT bei einer Temperatur von 37°C in H_2O und Blutplasma) [6].

Die Kontrastmittel können einleitend in vier Gruppen eingeteilt werden:

- extrazelluläre Gadolinium Chelate, die sich relativ unspezifisch intravaskulär oder interstitiell im Gewebe verteilen. Dennoch haben die meisten eine Präferenz für die Anreicherung in einem Gewebe. Magnevist (Schering AG) akkumuliert bevorzugt in der Niere während Gadophrin spezifisch für nekrotische Bereiche zu sein scheint [9-10].
- Kontrastmittel, die unspezifisch von Zellen aufgenommen werden. Meist werden diese von RES-Zellen (Zellen des Retikuloendothelial-Systems) nach intravenöser Injektion aufgenommen und nach Passage der Lysosomen als zelleigenes Eisen erkannt. Kontrastmittel wie Endorem (Guerbet GmbH) oder Resovist (Schering AG) werden demnach bevorzugt für Makierungen der Leber oder Milz verwendet [8]. Kontrastmittel, bestehend aus kleineren Eisenoxidpartikeln, wie Sinerem (Guerbet GmbH) oder NC 100150 (Amersham Health), verbleiben länger im Blut bevor sie in der Leber akkumulieren. Diese können für die MR-Bildgebung der Lymphknoten verwendet werden [11]. Diese Kontrastmittel können für *in vitro* Experimente für die Markierung vieler Zelltypen verwendet werden, haben allerdings den Nachteil, sich auf Tochterzellen zu verteilen und somit exponentiell abzunehmen.
- Durch aktivierbare Kontrastmittel besteht die Möglichkeit, ein zell- oder gewebspezifisches Signal zu erreichen. EgaMe beinhaltet Gadolinium, welches durch Galaktopyranose blockiert wird. Erst nach enzymatischer Spaltung des Kontrastmittels mit β -Galaktosidase wird die Konformation erreicht, die das Gadolinium mit Wasser in Verbindung bringt und so T_1 verstärkt [12].
- Kontrastmittel, die nur die Zielzellen erreichen sollen oder durch Überexpression bestimmter Proteine ein Signal im MRT erzielen können, liegen im Hauptinteresse dieser Arbeit. Die Überexpression des Transferrinrezeptors ist untersucht worden, um eisengebundenes Transferrin an den überexprimierten Rezeptor zu binden und somit die

endogene Eisenkonzentration zu erhöhen [13]. Auch die Überexpression von Ferritin, dem intrazellulären Eisenspeicherprotein, wurde durchgeführt [14]. Antikörper oder DNA als Eisenträger zu benutzen, ist eine andere Möglichkeit, eine ausreichende Signalintensitätsveränderung für eine T₂-gewichtete Messung zu erhalten [15-16].

2.3 *In vivo* optische Bildgebungsmethoden

Optische Bildgebung kann grob in zwei Hauptgebiete eingeteilt werden: Die Modalitäten, in denen eine externe Lichtquelle benötigt wird und Biolumineszenz-Bildgebung, wobei durch eine enzymatische Reaktion Licht gebildet wird [17].

Die meisten der angewandten optischen Bildgebungstechniken stellen planare Techniken dar. Durch die Anwendung mathematischer Modelle oder durch die Veränderung der Positionierung des zu untersuchenden Objektes konnten allerdings auch tomographische Techniken entwickelt werden [18]. Eine der Schwierigkeiten bei Verwendung von Licht für Visualisierungstechniken *in vivo* stellt die Tatsache dar, dass mehrere Gewebeschichten penetriert werden müssen. Hauptsächlich sind bei Verwendung von Licht für Bildgebungszwecke zwei physikalische Effekte zu beachten, die charakteristischerweise im Gewebe auftreten: Die Absorption der Photonen durch Chromophore in dem Gewebe und die Streuung der Photonen durch zelluläre Komponenten.

Hämoglobin, Melanin und Wasser weisen niedrige Absorptionskoeffizienten in den Wellenlängenbereichen zwischen 650 bis 900 nm auf und absorbieren hauptsächlich in der Region bis zu 600 nm [19-20]. Für $\lambda > 600$ nm beträgt die e⁻¹ Absorptionslänge etwa 2 cm, während die Länge für die Streuung mit etwa 0,05 cm wesentlich geringer ist [21-22]. Bei der Detektion eines Biolumineszenzsignals kann die Emission zwar mittels eines Bildgebungsgerätes detektiert werden, eine exakte Lokalisation ist allerdings nicht mehr möglich. Dies ist schematisch in Abbildung 2-1 dargestellt.

Für eine Voraussage der Signalstärke und räumlichen Auflösung in Abhängigkeit der Tiefe kann ein quantitatives Modell verwendet werden, das auf der Voraussetzung beruht, dass die Streuungslänge kleiner als die Absorptionslänge ist. In diesem Modell gilt für kontinuierliche Wellen, dass die Photonenfluenz Φ exponentiell von einem Punktstrahler hinweg abnimmt, was durch:

$$\Phi(r) = \frac{P}{4\pi Dr} \exp(-\mu_{\text{eff}} r)$$

beschrieben wird. Dabei ist r die Distanz zur emittierenden Probe, P ist die Ausgangsleistung des Punktstrahlers, D ist der Diffusionskoeffizient, der durch:

$$D = \frac{1}{3(\mu'_s + \mu_a)}$$

beschrieben wird. Dabei stellt:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_{\alpha}(\mu'_s + \mu_{\alpha})}$$

den reduzierten Streuungskoeffizienten dar und μ_{α} ist der Streuungskoeffizient [21].

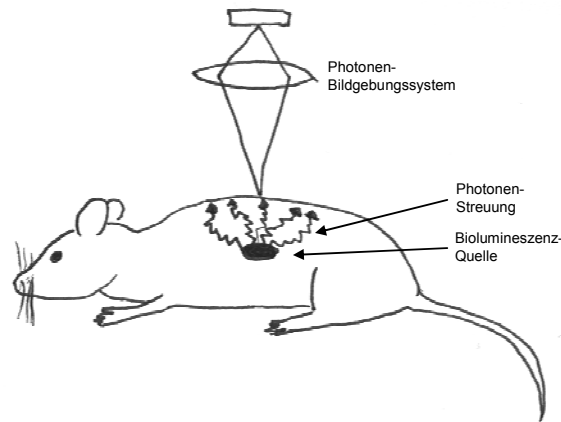


Abbildung 2–1: Beschreibung der Signaldetektion einer *in vivo* platzierten, lumineszierenden Probe:

Mittels eines optischen Kamerasystems können die von der *in vivo* lokalisierten Biolumineszenzquelle ausgestrahlten Photonen detektiert werden (Abbildung verändert nach [21]).

In Abbildung 2–1 wird das Prinzip der Lichtdetektion mittels eines optischen Bildgebungssystems *in vivo* verdeutlicht. Die Probenlokalisierung, die aufgrund der geringen räumlichen Auflösung anhand der Biolumineszenz-Aufnahmen nicht exakt beschrieben werden kann, kann durch die Verwendung einer weiteren Bildgebungsmodalität, wie z. B. die Computertomographie oder Magnet-Resonanztomographie deutlich präzisiert werden.

Neben der Entwicklung von kombinierten PET- und CT-Bildgebungstechniken, welche die hohe räumliche Auflösung der Computertomographie mit der hohen Sensitivität der Gamma-Strahldetektion verbinden, wurden auch kombinierte MRT, PET und Biolumineszenzstudien durchgeführt, um die Stärken der verschiedenen Bildgebungstechniken miteinander zu kombinieren [23-26].

Für die Biolumineszenz-Messungen werden hauptsächlich Luziferasen, die aus *Renilla reniformis* (Rluc) und *Photinus pyralis* (Fluc) isoliert wurden, verwendet [27-28]. Aufgrund der ATP- und O₂-Abhängigkeit der von Fluc katalysierten enzymatischen Reaktion, die D-Luziferin als Substrat benötigt, sind quantitative Bestimmungen der vitalen Zellmenge möglich. Aufgrund der Biologie und Enzymologie der Luziferasen besitzen diese Einschränkungen in der Verwendbarkeit als genetische Reporter und wurden durch gezielte Veränderungen optimiert [29]. Dazu gehören unter anderem die Entfernung der peroxisomalen Translokationssequenz, die Optimierung von regulatorischen Sequenzen und die Addition eines Degradierungssignals [29]. Eine Kombination der Expression von Fluc und der MRT-Bildgebung sind besonders wertvoll, da aufgrund entweder positiv oder negativ wirkender Kontrastmittel keine Vitalitätsbestimmung durchgeführt werden kann.

2.4 Glioblastoma multiforme

Das hochgradig maligne Glioblastom ist einer der aggressivsten primären Gehirntumoren des zentralen Nervensystems und durch eine extensive Gewebsinfiltration und zellulär hohe proliferative Aktivität charakterisiert. Aufgrund der hohen Malignität des Glioblastoms beträgt die mittlere Überlebenszeit der Patienten weniger als 12 Monate [30-32]. Gliome stellen eine Gruppe der am häufigsten vorkommenden intrakraniellen Neoplasien dar, die ihren Ursprung in neuroglialen Zellen besitzen [33]. Gliale Tumoren können sich aus einer transformierten glialen-oligodendroglialen Zelle oder einer glialen Vorläuferzelle entwickeln, die nicht mehr der lokalen Wachstumskontrolle unterliegt [34]. In der klinischen Diagnostik werden Gliome aufgrund der WHO Klassifikation in Astrozytome, Oligodendrogliome, gemischte Oligoastrozytome und Ependyome eingeteilt, wobei die Glioblastome äquivalent mit Astrozytom Grad IV bezeichnet werden können [35]. Glioblastome können sich *de novo* oder aus Astrozytomen mit niedrigerem Grad entwickeln [34-35]. In den vergangenen Jahren konnte eine Population von Zellen in Gliomen identifiziert werden, die Charakteristika einer Stammzellpopulation aufweisen und daher als Krebs-Stammzellen bezeichnet werden [36]. Diese Zellpopulation exprimiert bekannte neurale Stammzellmarker, wie das Protein Prominin-1 (CD 133) und das Intermediärfilament Nestin. Die Zellen können nach Differenzierungseinleitung Marker für Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten aufweisen [37]. Nach einer Strahlentherapie von Gliomen konnte eine Zunahme der CD133⁺-Population festgestellt werden, die auf einer präferentiellen Aktivierung des DNA-Reperaturmechanismus beruht [38]. Die CD133⁺-Expression scheint allerdings nicht ein universelles Merkmal für die Identifizierung einer Stammzellpopulation darzustellen, da auch CD133⁻-Zellen Tumore nach der Transplantation in Nacktmäuse und Nacktratten bilden können [39-40].

Die therapeutischen Möglichkeiten bei Glioblastomen beinhalten eine operative Resektion des Tumorgewebes, um durch die Reduktion der Tumormasse und Beseitigung der vorhandenen Raumforderung günstigere Voraussetzungen für eine anschließende Chemotherapie und Strahlenbehandlung zu ermöglichen [41]. Aufgrund des infiltrativen Charakters des Glioblastoms ist die operative Entfernung des Tumorrandbereiches schwierig. Bei der präoperativen Applikation von 5-Aminolävulinsäure kann unter intraoperativer Fluoreszenzbestrahlung eine makroskopisch vollständigere Resektion durchgeführt werden [42]. Die Magnet-Resonanz-Therapie und andere bildgebende Verfahren wie die Positronen-Emissionstomographie nehmen in der neuroradiologischen Diagnostik eine zentrale Rolle ein [43].

2.5 Neurale Stammzellen

Stammzellen können asymmetrische und symmetrische Zellteilungen durchführen, was die Fähigkeit einer extensiven Selbsterneuerung und der Bildung differenzierter Nachkommen beinhaltet. Vorläuferzellen dagegen sind in ihrer Entwicklungskapazität bereits eingeschränkt und in der Differenzierungsrichtung spezialisiert [44].

Die Kapazität einer Zelle verschiedene Zelltypen hervorzubringen, lässt sich in vier Kategorien einordnen, die bereits aus dem hämatopoetischen System bekannt sind [45]. Totipotente Zellen besitzen die Fähigkeit alle Zell- und Gewebetypen eines Organismus hervorzubringen und damit auch diesen Organismus komplett zu generieren. Zu diesen Zelltypen zählen Keimbahnzellen und embryonale Stammzellen (ES-Zellen). Aus embryonalen totipotenten Stammzellen können neurale pluripotente Stammzellen hervorgehen [46], die sich dann *in vitro* oder nach Transplantation in den Embryo weiterdifferenzieren und unterschiedliche terminal differenzierte Zelltypen hervorbringen können [47-50].

Ausgehend von der Totipotenz findet dann eine progradiente Reduktion der Entwicklungsfähigkeit statt. Diese Restriktion führt im folgenden Schritt zu einer pluripotenten (multipotenten) Stammzelle, die noch unterschiedliche Zelltypen hervorbringen kann, aber nicht mehr alle. Diese Fähigkeit besitzen oligopotente Stammzellen im nächsten Schritt dann nur noch in sehr eingeschränktem Maße. Ein Beispiel für diesen Zelltyp stellen Glia-Melanozyten und Glia-Myofibroblasten dar, welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen aber in ihrer Differenzierungsrichtung stark eingeschränkt sind [51]. Unipotente Zellen können nur noch in einen definierten Zelltyp differenzieren, wie zum Beispiel neuronale Vorläuferzellen [52] oder im hämatopoetischen System die unipotenten Vorläufer, die T- und B-Zellen generieren [53].

Stammzellen können in den Geweben in einem mitotisch ruhenden Zustand vorliegen oder sich mit unterschiedlich schneller Geschwindigkeit teilen [54-55]. Zum Beispiel teilen sich Knochenmarkstammzellen langsam und selten [56], wohingegen somatische Stammzellen von *Drosophila* und intestinale Krypten-Stammzellen, mit einer Generationszeit von 12 Stunden, eine vergleichsweise schnelle Zellteilungsrate aufweisen [57-58].

Die Aktivierung und anschließende Proliferation der Stammzellen kann unter anderem durch eine Gewebeschädigung hervorgerufen werden. Werden die sensorischen Epithelien im Innenohr [59] oder der Nase [60] geschädigt, werden diese nach einem einsetzenden Regenerationsprozess wieder ersetzt. Solche Prozesse sind auch im Zentralnervensystem beschrieben worden. Eine Ischämie im Vorderhirn von Nagetieren, führt zu einer gesteigerten Zellproliferation und Genese von immaturren Neuronen in der ipsilateralen subventrikulären Zone [61-63]. Eine Migration von gebildeten Neuroblasten konnte nach einer Zeit von 2 Wochen nach dem Schlaganfall in den geschädigten striatalen Arealen

nachgewiesen werden [64-65]. Die asymmetrische Zellteilung stellt eine der wichtigsten Eigenschaften der Stammzellen dar. Sie beschreibt eine unterschiedliche Verteilung von Determinanten auf die beiden, aus der Mitose hervorgehenden Tochterzellen, wodurch die Entwicklungsrichtung der Zellen festgelegt wird. In multipotenten Neuroblasten und neuralen Stammzellen konnten asymmetrische Zellteilungen nachgewiesen werden. Aus diesen geht eine Tochterzelle hervor, welche weiterhin Vorläufereigenschaften besitzt, während die andere entstandene Tochterzelle nur noch restringierte Eigenschaften aufweist [66-68]. Zu den intrazellulären Determinanten, die asymmetrisch in neuroepithelialen Zellen der Maus verteilt werden, zählt zum Beispiel ein Proteinkomplex aus den Komponenten ASIP¹, mPAR-6 und einer atypischen Proteinkinase C. In einer jüngeren Arbeit konnte eine asymmetrische Verteilung des EGF-Rezeptors auf die beiden Tochterzellen nachgewiesen werden, welches ebenfalls das Entwicklungsschicksal der Tochterzellen fundamental beeinflusst [69].

Neurale Vorläuferzellen konnten inzwischen aus unterschiedlichen Spezies, wie dem Menschen, der Maus oder der Ratte, zu verschiedenen Zeitpunkten und aus verschiedenen Gehirnregionen isoliert werden. Die Eigenschaften der kultivierten Zellen sind dabei allerdings nicht direkt vergleichbar. Neurale Vorläuferzellen der Ratte weisen im Vergleich mit Vorläuferzellen aus der Maus ein eingeschränktes Wachstumspotential auf [70].

Obwohl der größte Teil der Zellen des ZNS während der embryonalen und frühen postnatalen Periode entsteht, finden sich auch im adulten Gehirn Regionen, in denen kontinuierlich Neurone entstehen. Die ersten Beobachtungen dieses Prozesses konnten schon 1962 mit ³H-Thymidin-Einbaustudien gemacht werden [71] und führten zur Identifizierung von zwei Regionen im adulten Gehirn. Proliferierende Vorläuferzellen der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels migrieren zum Bulbus olfactorius, wo sie in lokale Interneurone differenzieren [72-73]. Eine weitere identifizierte Region ist die subgranuläre Zone des Hippokampus, in der eine Differenzierung von Vorläuferzellen zu Körnerzellen im Gyrus dentatus stattfindet [74-76]. Die Neurogenese im adulten Hippokampus nimmt mit zunehmendem Alter der Tiere ab, dennoch lässt sie sich bis zu einem Alter von 27 Monaten bei Fischer-Ratten nachweisen [74]. Eine vergleichende Arbeit zwischen humanen fötalen und adulten Stammzellen konnte *in vitro* ähnliche Proliferationseigenschaften und durch die Analyse von 30 Genen mittels RT-PCR-Analyse auch ähnliche molekulare Eigenschaften nachweisen [77]. Während man den Hippokampus und die Ventrikelwand zu den neurogenen Regionen zählt, ist es in den letzten Jahren gelungen, neurale Vorläuferzellen auch aus den nicht-neurogenen Regionen, wie dem Septum, dem Nervus opticus, dem Neocortex und dem Rückenmark zu isolieren [78-85].

¹ ASIP = „atypical PKC isotype-specific interacting protein“, ein Homolog des *Caenorhabditis elegans* Polaritätsproteins PAR-3.

2.6 Zielsetzung

In vorliegender Arbeit sollen zelluläre Markierungsstrategien für die molekulare, multimodale Bildgebung entwickelt und validiert werden. Besonders soll dabei die Verbindung zwischen optischer und MRT-Visualisierung berücksichtigt werden, um die Möglichkeit quantitativer zweidimensionaler optischer Untersuchungen mit dreidimensionaler MRT-Bildgebung zu verbinden. Besonderes Interesse liegt darin, methodische Voraussetzungen zu schaffen, um kleine Zellmengen, unter 1000 Zellen mittels MRT und optischen Bildgebungsmethoden zu detektieren und zu quantifizieren.

Für die optische Bildgebung wurden zum einen Fluoreszenz Reportergene verwendet, die nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge eine effiziente Fluoreszenzmission aufweisen, zum anderen kann die *firefly*-Luziferase für eine starke Biolumineszenz gewählt werden. Da die Untersuchungen die Grundlage für nachfolgende *in vivo*-Studien schaffen können, sollte bei Verwendung von Fluoreszenz-Reportergenen darauf geachtet werden, die Emission im langen Wellenlängenbereich zu gewährleisten.

Für die MRT-Bildgebung soll auf superparamagnetische Kontrastmittel zurückgegriffen werden und unabhängig davon die Überexpression eines genetischen Reporters untersucht werden. Neben der Inkubation mit Kontrastmitteln, die unspezifisch von Zellen aufgenommen werden können, kann durch Integration von genetischen Reportern ins Genom der Zellen, eine spezifische, mittels MRT detektierbare Signalveränderung erzielt werden, die zell- oder gewebsspezifisch reguliert werden kann. Der Schwerpunkt in dieser Arbeit soll auf der kombinierten Expression mit einem optischen Reporter gelegt werden, um die multimodale Bildgebung zu realisieren.

Weiterhin können Herangehensweisen für eine spezifische Markierung mit superparamagnetischen Substanzen entwickelt und analysiert werden. Dabei kann ein Schwerpunkt auf die spezifische extrazelluläre Markierung mittels superparamagnetischen Partikeln gelegt werden, um die Möglichkeit von magnetchromatographischen Sortierungsverfahren mit einzuschließen.

Als Untersuchungsobjekt dienen vor allem Glioblastomzellen als Tumormodell für die intrazerebrale Bildgebung. Weitere Analysen können mit neuronalen Zellen durchgeführt werden, um möglicherweise spezifische Bereiche oder Zelltypen des Zentralen Nervensystems zu visualisieren. Für die Integration von Reportergenen ins Genom der Zellen sollen geeignete Methoden gefunden werden, die Zielgene möglichst effizient in die Zellen einzubringen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Biochemikalien und Geräte

Handelsübliche Chemikalien in p. A.-Qualität wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Biochemikalien und Enzyme stammten von Fermentas (St. Leon-Rot), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt/Main), PAA (Cölbe), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim) oder Sigma-Aldrich. Für Zentrifugationen kleiner Volumina bei Raumtemperatur (RT) wurde eine Tischzentrifuge der Firma Heraeus (Hanau) Modell Biofuge A oder der Firma Eppendorf (Hamburg) Modell 5424 verwendet; für Zentrifugationen kleiner Volumina bei 4 °C wurde das Modell Sigma 2K15, Rotor Nr. 12148 der Firma Sigma Laborzentrifugen (Osterode) verwendet. Für Zentrifugationen größerer Volumina stand eine Kühlzentrifuge Multifuge 1S-R (Heraeus) mit dem schwenkbaren Rotor TTH-400 zur Verfügung. Zentrifugationen bei RT wurden bei größeren Volumina in einer Hitac CT6E (Hitachi, München) mit dem Rotor T5SS durchgeführt.

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Hera Cell-Brutschrank (Heraeus) kultiviert.

3.1.1 Wasser

Für biochemische Methoden wurde entsalztes Wasser verwendet (dH₂O), für zellbiologische und molekularbiologische Experimente wurde Reinstwasser (ddH₂O) verwendet (Millipore, Schwalbach). Für Versuche, die unter RNase-freien Bedingungen durchzuführen waren, wurde mit 0,1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetztes, Reinstwasser verwendet, welches nach Zugabe von DEPC für 20 min bei 120 °C autoklaviert wurde (Varioklav Dampfsterilisator, H + P, München).

3.1.2 Ethanol

Zur Desinfektion der Sterilbank wurde 70 % vergälltes Ethanol (Schmittmann GmbH, Düsseldorf) benutzt. Unvergälltes Ethanol wurde für die Nukleinsäurereinigung, und die histologischen Untersuchungen bei Verwendung von Paraffin eingesetzt.

3.2 Organismen und Zelllinien

- Gli36 Δ EGFR wurde von Prof. Dr. Andreas Jacobs, MPI für neurologische Forschung, Köln zur Verfügung gestellt.
- SMF-Zellen wurden von Prof. Clemens Loewick, LUMC Leiden, Niederlande zur Verfügung gestellt.
- Die humane neurale Vorläuferzelllinie hc-NSC-F7b wurde von Prof. Zaal Kokaia, Lund Strategic Research Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund, Schweden zur Verfügung gestellt.
- 293T-Zellen wurden von Prof. Dr. Rob Hoeben, LUMC Leiden, Niederlande zur Verfügung gestellt.
- PC12-Zellen wurden von Prof. Dr. Wilhelm Stoffel, Institut für Biochemie, Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt.
- CGR8-Zellen wurden von Prof. Dr. Agapios Sachinidis, Institut für Neurophysiologie der Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt.
- D3/Klon7 wurden von Professor Dr. Klaus Addicks, Institut für Anatomie I der Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt.
- 14C9 anti-Robo3 (hergestellt von Goodman, C.) wurde von der Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA) bezogen.
- 151-IgG (hergestellt von Hubbard, A.) wurde ebenfalls von der Developmental Studies Hybridoma Bank bezogen.
- Die Hybridomzelllinie TIB 200 wurde von Professor Dr. Klaus Addicks, Institut für Anatomie I der Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt.
- Primäre neurale Vorläuferzellen, isoliert aus dem embryonalen Kortex von Mäusen wurden von Professor Dr. Ludwig Aigner, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Die Isolation der Zellen erfolgte zum embryonalen Zeitpunkt E13,5.
- Primäre neurale Vorläuferzellen, die aus dem postnatalen Rattengehirn isoliert wurden, wurden von Professor Dr. Klaus Addicks, Institut für Anatomie I der Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt. Die Isolation der Zellen erfolgte innerhalb von 24 h nach der Geburt der Tiere [86].
- C6-Glioma-Zellen wurden von Professor Dr. Klaus Addicks, Institut für Anatomie I der Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Wachstumsfaktoren

Rekombinanter humaner basis Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF-2):

Stammkonzentration $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in ddH₂O

Rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF):

Stammkonzentration $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in ddH₂O

Die verwendeten Wachstumsfaktoren wurden bei einer Temperatur von $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Das eingesetzte ddH₂O wurde vor Verwendung steril filtriert.

Rekombinanter humaner Leukämie Inhibitions Faktor (LIF):

Stammkonzentration $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in ddH₂O.

Die Lagerung von LIF erfolgte bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.2 Puffer und Stammlösungen

PBS (0,1 M):

Für die Zellkultur wurde PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (PAA) verwendet.

TBS (0,05 M):

50 mM	Tris
150 mM	Natriumchlorid
in dH ₂ O lösen, einstellen auf pH 7,6	

Paraformaldehyd (PFA):

4 % (w/v) Paraformaldehyd in 0,1 M PBS unter Erwärmung lösen. Filtrieren pH 7,6,

Die gebrauchsfertige Lösung wurde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und nach dem Auftauen nicht länger als sieben Tage verwendet.

3.3.3 Beschichtungen der Zellkulturschalen und Deckglächen

Für immuncytochemische Analysen wurden die Zellen auf beschichteten, sterilen Deckgläschen (Durchmesser 12mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen) kultiviert.

3.3.3.1 Poly-L-Ornithin und humanes Fibronectin

Die Oberflächenbeschichtung der Zellkulturschalen besteht aus einer kombinierten Poly- L-Ornithin-Fibronectin-Beschichtung [87].

$15 \mu\text{g mL}^{-1}$ Poly-L-Ornithin/dH₂O wurde für 2 h im Brutschrank auf den Schalen belassen. Ein anschließender Waschschrift mit PBS wurde zur Entfernung von nicht

gebundenem Poly-L-Ornithin durchgeführt. Anschließend wurden die Schalen mit $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ humaner Fibronectin-Lösung/PBS für durchschnittlich 4 h im Brutschrank inkubiert, bevor ein erneuter Waschschrift mit PBS^{-/-} kurz vor Verwendung der Schalen erfolgte.

Neben dieser beschriebenen Beschichtungsform wurden Zellkulturschalen- und Glasplättchen für 4 h mit $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ Poly-L-Ornithin und $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ humaner Fibronectinlösung in PBS inkubiert. Diese Beschichtungsvariante wurde nicht für primäre neurale Zellen, die aus dem Gehirn isoliert wurden verwendet, da ein negativer Effekt auf die Adhäsion der Zellen beobachtet werden konnte.

3.3.3.2 Poly-L-Ornithin und Laminin

Auf die Schalen wurde wiederum $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ Poly-L-Ornithin für 2 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Laminin (Roche) für 4 h im Brutschrank belassen. Neben dieser beschriebenen Beschichtungsform wurden Zellkulturschalen- und Glasplättchen für 4 h mit $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ Poly-L-Ornithin und $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ humaner Fibronectinlösung in PBS inkubiert. Diese Beschichtungsvariante wurde nicht für primäre neurale Zellen, die aus dem Gehirn isoliert wurden verwendet, da ein negativer Effekt auf die Adhäsion der Zellen beobachtet werden konnte.

3.3.3.3 Poly(2-Hydroxyethyl)-Methacrylat

2 % Poly(2-Hydroxyethyl)-Methacrylat (Poly-HEMA) wurde in 95 % Ethanol gelöst. Die Beschichtung der Schalen mit der Substanz wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schale wurde mit der gebrauchsfertig hergestellten Lösung so lange inkubiert, bis das Ethanol verdunstet war. Anschließend wurde durch zweimaliges Waschen mit sterilem PBS ungebundene Substanz entfernt. Die Schalen können über einen Zeitraum von 2 Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.3.3.4 Gelatine

0,2 % Gelatine in PBS mit Kalzium und Magnesium (PAA) wurde für mindestens 30 min auf die Schalen gegeben und kurz vor Gebrauch entfernt.

3.3.3.5 Kollagen I

Für eine Kollagen-Beschichtung wurden die Zellkulturschalen mit 3 ‰ Kollagen Bornstein und Traub Typ I in PBS^{-/-} für mind. 4 h beschichtet. Anschließend wurden die Schalen mit PBS gewaschen.

3.3.4 Kultivierung der Zellen

Für die Passagierung der adhärennten Zellen wurden enzymatische Methoden angewandt.

Für die Passagierung der Zellen wurde Accutase (PAA) verwendet. Accutase besteht aus einer Mischung von proteolytischen- und kollagenolytischen Enzymen und 0,5 mM EDTA. Für die Passage der embryonalen Stammzellen wurde Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) verwendet.

Die Zellen wurden passagiert, wenn 90 % der Kulturschalenoberfläche bedeckt waren. Das Kulturmedium im ersten Schritt entfernt worden. Anschließend wurde ein Waschschrift mit PBS⁻ angewendet, da die in der Accutase oder im Trypsin/EDTA enthaltenen Proteasen durch die im Kulturmedium vorhandenen Ca²⁺- und Mg²⁺-Kationen inhibiert werden. Eine Inkubation des Enzymes (Accutase, bzw. Trypsin/EDTA) bei 37 °C für 2 min reichte aus, um die Zellen von der Oberfläche abzulösen. Die Zellen wurden in 3 mL Kulturmedium aufgenommen und bei einer Geschwindigkeit von 100 x g für 5 min zentrifugiert.

Die Passagierung der nicht adhärennten Kulturen (Sphäroiden, Hybridomzellen) wurde ohne enzymatischen Verdau durchgeführt, indem das gesamte Kulturmedium gesammelt und zentrifugiert wurde. Sphäroidkulturen wurden dabei bei 20 x g zentrifugiert.

Primäre neurale Vorläuferzellen aus dem Kleinhirn, die auf Poly-L-Ornithin- und Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert wurden, konnten ohne Verwendung eines Enzyms, durch mechanische Einwirkung von der Oberfläche abgelöst werden.

Das Medium für Gli36ΔEGFR-, SMF- und 293T-Zellen bestand aus:

Tumorzellmedium:		DMEM High
		Glucose mit
		Glutamin
	10 %	FBS
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin

Für eine Kultivierung der Zellen als Aggregate wurden 4 10⁵ Zellen pro Loch einer mit Poly-HEMA beschichteten 6-Loch-Platte in 1 mL Medium kultiviert.

Die PC12-Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

PC12-Medium:		RPMI 1640
	10 %	Pferdeserum
	5 %	FBS
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin

Die Zellen wurden auf Kollagen beschichteten Schalen kultiviert.

Verwendete Medien für Hybridomzellen:

14C2 anti-Robo3:		RPMI 1640
	5 %	FBS
	2 mM	L-Glutamin
	50 µg mL ⁻¹	Gentamycin
151-IgG:		IMDM
	10 %	FBS
	2 mM	L-Glutamin
	50 µg mL ⁻¹	Gentamycin
Serumfreies Hybridommedium:		Hybridom Express Plus
	5 %	Hybridom Klonierungszusatz
	2 mM	L-Glutamin

Die Kultivierung und anschließende Adaptierung an serumfreies Medium der Hybridomzellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

Für zwei Passagen wurden die Zellen in serumhaltigen Medium kultiviert, wobei spätestens alle drei Tage das Medium und die Kulturflasche ausgetauscht wurden. Mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen mL⁻¹ in 75 % serumhaltigen Medium und 25 % serumfreien Medium wurden die Zellen bis zu einer Dichte von mindestens 1×10^5 Zellen mL⁻¹ wachsen gelassen. Die anschließende Reduktion des serumhaltigen Mediums auf 50 % erfolgte mit einer Kultivierung von 3×10^5 Zellen mL⁻¹ bis zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen mL⁻¹. Die Kultivierung von 5×10^5 Zellen mL⁻¹ in 25 % serumhaltigen Medium war bis zu $1-5 \times 10^6$ Zellen nötig, um diese dann in einer Dichte von 3×10^5 Zellen mL⁻¹ im serumfreien Medium zu belassen. Spätestens alle drei Tage ist ein Mediumwechsel durchzuführen. Der Überstand der Kulturen wurde für eine spätere Antikörperisolierung gesammelt.

Das Medium für die CGR8-Zellen bestand aus:

15%-KSR:		DMEM <i>knockout</i>
	15 %	<i>Knockout</i> Serumersatz
	1 x	Nicht essentielle Aminosäuren* ¹
	50 µM	β-Mercaptoethanol
	10 ng mL ⁻¹	LIF
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin

*¹aus 100x Lösung (PAA): 890 µg mL⁻¹ L-Alanin, 1320 µg mL⁻¹ L-Asparagin, 1330 µg mL⁻¹ L-Asparaginsäure, 1470 µg mL⁻¹ L-Glutaminsäure, 750 µg mL⁻¹ L-Glycin, 1150 µg mL⁻¹ L-Prolin, 1050 µg mL⁻¹ L-Serin.

Die CGR8-Zellen wurden jeden zweiten Tag mit 8×10^5 Zellen auf eine T25-Flasche passagiert, die mit Gelatine beschichtet war.

Für die Differenzierung der CGR8-Zellen wurde N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium und 10 %-KSR-Medium verwendet:

N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal:	50 %	DMEM/F-12
	50 %	Neurobasal
	1 x	N2-Supplement* ²
	1 x	B27-Supplement* ³
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin
	50 µg mL ⁻¹	BSA
25 µg mL ⁻¹	Insulin human	
10 %-KSR:		DMEM <i>knockout</i>
	15 %	<i>Knockout</i> Serumersatz
	1 x	Nicht essentielle Aminosäuren* ¹
	50 µM	β-Mercaptoethanol
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin

*²aus 100x Lösung (Invitrogen): 1 mM humanes Transferrin, 86,1 µM Insulin, 2 µM Progesteron, 10 mM Putrescin, 3 µM Selenit.

*³aus 50x Konzentrat (Invitrogen). Zusammensetzung rechtlich geschützt.

Für die Differenzierung im Suspensionsmodell wurden die Medien 10 %-KSR (s. o.) und ITSFn verwendet, welches sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

ITSFn:		DMEM/F-12
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin
	1 x	ITS ^{*4}

^{*4}aus 100x Lösung (Sigma): 1,0 mg mL⁻¹ Insulin, 0,55 mg mL⁻¹ humanes Transferrin, 0,5 µg mL⁻¹ Natriumselenit in gepufferter Salzlösung nach Earle (EBSS).

Es wurden $1,5 \times 10^6$ CGR8-Zellen in 10 % KSR-Medium auf eine unbeschichtete bakteriologische 10 cm-Schale für 7 Tage gegeben. Bei Bedarf wurde frisches Medium hinzugegeben. Anschließend erfolgte bei einem Teil der Sphäroiden ein Mediumwechsel auf ITSFn für 3 Tage. Dazu wurde das Medium mit 100 ng mL⁻¹ Fibronectin versetzt.

Die Kultivierung der neuralen Vorläuferzelllinie N2/Euro #1 erfolgte in N2/Euro-Medium:

N2/Euro:		Euromed
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin
	1 x	N2 Supplement ^{*2}
	50 µg mL ⁻¹	BSA
	25 µg mL ⁻¹	Insulin human
	5 ng mL ⁻¹	EGF
	10 ng mL ⁻¹	FGF-2

Die Differenzierung fand in 10 % KSR-Medium oder B27/Euro-Medium statt.

B27/Euro:		Euromed
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin
	1 x	B27 Supplement ^{*3}

Primäre neurale Zellen, die aus dem postnatalen Kleinhirn isoliert wurden, wurden in N2/DMEM-F12 Medium mit der Supplementation von 20 ng mL⁻¹ EGF kultiviert. Bei

primären neurale Zellen, die aus dem embryonalen Kortex isoliert wurden, wurde zusätzlich eine Supplementation von 20 ng mL⁻¹ FGF-2 vorgenommen.

N2/DMEM-		DMEM-F12
F12:		
	2 mM	L-Glutamin
	100 U mL ⁻¹	Penicillin
	100 µg mL ⁻¹	Streptomycin
	1 x	N2 Supplement* ³
	20 ng mL ⁻¹	EGF
	20 ng mL ⁻¹	FGF-2

3.3.4.1 Einfrieren der Zellen und erneutes Auftauen

Das Einfriermedium besteht aus dem Kulturmedium, in dem die Zellen kultiviert wurden, supplementiert mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und innerhalb eines Einfriercontainers für mindestens 12 h bei einer Temperatur von -80°C belassen. Die Kryoröhrchen wurden in der flüssigen Stickstoffphase dauerhaft aufbewahrt.

3.3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels einer Zählkammer nach Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen), die eine Tiefe von 0,1 mm aufweist verwendet. Zur Diskreminierung der lebenden Zellen von toten Zellen wurde eine Inkubation mittels Trypanblau (Sigma-Aldrich) angewendet.

Wenn die Trypanblau-Färbung nicht angewendet werden musste, wurde die Zellzahl mit dem Partikelzählgerät Particle Counter Z1 (Beckmann Coulter, Fullerton, USA) bestimmt. Es wurde eine Ausschlussgrenze von 8 µm verwendet.

3.3.4.3 Berechnung der Generationsverdopplungen und der Generationszeit

Die Generationsverdopplung und die Generationszeit wurden mit den Formeln

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2 \text{ und}$$

$$t_G = t/n$$

berechnet.

(n=Generationsverdopplung; N=Zellzahl; N₀=Zellzahl bei Ausplattierung; t_G=Generationszeit)

3.3.4.4 Einzelzellklonierung

Zur Isolierung einzelner Klone wurden zwei Möglichkeiten zur Einzelzellklonierung genutzt. Entweder wurden nach Ablösen und Zählen der Zellen 100 Zellen in 5 mL Medium auf eine 96-Loch-Platte verteilt (mit je 50 μ L pro Loch) oder die Klone mit Scienceware Cloning Disks (Sigma-Aldrich), die in Accutase getränkt waren, von der Schale abgetrennt. Diese wurden separiert voneinander in Medium weiterkultiviert.

3.3.4.5 Agarosephantome

Die Phantome wurden in Polyesterol-Zellkulturschalen mit einem Aussendurchmesser des Bodens von 34,7 mm erstellt. In den Schalen befindet sich eine Gitter mit den Dimensionen 2 mm x 2 mm. Als erste Schicht auf dem Boden wurde eine 1 % Agarose (Fluka) Lösung in PBS aufgebracht. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde die Agarose in einem Ultraschall-Reinigungsbad (max. Leistung: 50 W, Tchibo, Bremen) für 30 s plaziert.

Bei der Erstellung von Phantomen, in denen Einzelzellsuspensionen untersucht werden sollten, wurde die entsprechende Zellmenge mit einer Agaroselösung (Typ VII, Sigma-Aldrich) mit der Konzentration 0,5 % in PBS in einem Reaktionsgefäß suspendiert und auf die erkaltete Bodenschicht aufgebracht. Nach dem Erkalten der Zellsuspension fand eine mikroskopische Kontrolle statt, bevor eine zweite Schicht mit einem Volumen von 1 ml der Agaroselösung Typ VII aufgebracht wurde. Die Lagerung der Agarosephantome erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C. Bei der Untersuchung von bereits fixierten multizellulären Aggregaten wurden diese mit 1 mL Agaroselösung Typ VII in TBS suspendiert und auf die Bodenschicht aufgebracht. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 3–1 dargestellt.

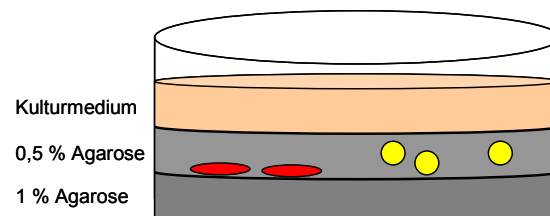


Abbildung 3–1: Schematischer Aufbau des Agarosephantoms, das für die zellulären Untersuchungen mittels MRT und optischen Systemen verwendet wurde:

Die untere Agaroseschicht weist eine Konzentration von 1 % Agarose auf. Auf dem Boden der zweiten Schicht Agarose befinden sich entweder Zellsuspensionen (rote Symbole) oder multizelluläre Aggregate (gelbe Symbole). Auf diese zweite Schicht wurde zur Kultivierung der Zellen das Kulturmedium aufgebracht.

Bei der Untersuchung von lebenden multizellulären Aggregaten wurde die Agarose Typ VII in Kalzium- und Magnesiumionen freiem PBS gelöst und nach dem Abkühlen

mit 2 x konzentrierten, FCShaltigen Kulturmedium gemischt. Die Präparation des Mediums erfolgte in einem Phenolrot-freien DMEM-Basalmedium (Invitrogen). Zur Kultivierung der Zellen wurde 1 ml Kulturmedium^{-Phenolrot} auf die Agaroseoberfläche aufgebracht und vor den MRT-Untersuchungen und Aufnahmen mit dem Photonen-Bildgebungssystem entfernt. Ein Mediumwechsel erfolgte bei längerer Kulturzeit alle 24 bis 48 h. Zur Fixierung wurde 4 % Paraformaldehyd auf die Agarose-Oberfläche gegeben und bei einer Temperatur von 4 °C über Nacht inkubiert.

3.4 Inkubation mit Kontrastmittel

Die Inkubation von Gli36ΔEGFR Klon#17-Zellen oder N2/Euro #1-Zellen mit 112 µg mL⁻¹ oder 224 µg mL⁻¹ Endorem erfolgte für 20-24 h. Eine Ausnahme ist die zeitliche Untersuchung der Aufnahme von Endorem, bei der die Inkubationsdauer denen im Ergebnisteil beschriebenen Zeiten entspricht. Für die Inkubation wurden 4 x 10⁵ Zellen mL⁻¹ verwendet.

Die Inkubationsdauer von Liposomen und Eisenpartikeln sowie mit Lipofectamin (Invitrogen) als Vergleich erfolgte für 3 h bei 37 °C. Es wurden zunächst 15 µg Partikel mit etwa 15 µg Liposomen (bzw. Lipofectamin) für 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Für 1 x 10⁶ Zellen wurde ein Inkubationsvolumen von 1 mL gewählt.

Wenn im Ergebnisteil nicht anders beschrieben, erfolgten alle Inkubationen mit Partikel gekoppelten Antikörpern mit einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers in Medium für 1 h bei 37 °C. Dabei wurde für 1 x 10⁶ Zellen 100 µL Inkubationsvolumen gewählt. Als Kontrolle diente eine Inkubation von Kontrollzellen mit dem Antikörper oder eine Inkubation der rezeptorpositiven Zellen mit SPIOs in einer 1:100 Verdünnung unter gleichen Bedingungen.

Der Eisengehalt der Kontrastmittel und Antikörper wurde mittels spektralphotometrischem Eisentest (siehe Kapitel 3.9.5) bestimmt (Tabelle 3–1).

Tabelle 3–1: Eisenkonzentration der verwendeten Kontrastmittel und SPIO-Antikörper:

Die Konzentrationen wurden mittels des spektralphotometrischen Eisentests ermittelt.

	Eisenkonzentration (mM)
50 nm SPIO	59,4 (± 14)
Endorem	99.6 (± 17,8)
Anti-CD4	1,3
151-IgG	13,2
HNK-1	18,6
HNK-1 (Miltenyi)	0,6

3.5 MACS

Für eine magnetchromatographische Sortierung mit einer MACS-Säule (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach), wurde folgender Puffer in sterilem PBS hergestellt:

2	mM	EDTA
0,5	%	BSA

Die Zellen wurden mit SPIO-konjugierten Antikörpern für 1 h bei 37 °C inkubiert (s. Kapitel 3.4) und anschließend mit Puffer zweimal gewaschen. Nach Äquilibration der Säule mit Puffer und Magnetisierung durch einen Säulenadapter wurden die Zellen in einem Volumen von 500 µL auf die Säule gegeben und diese dann 3x mit Puffer gewaschen. Die Zellzahl der nicht-gebundenen Zellen wurde bestimmt. Die gebundenen Zellen wurden in 1 mL Medium ohne Säulenadapter eluiert und erneut die Zellzahl bestimmt.

3.6 Gamma-Bestrahlung

Zellkulturen wurden durch Hochenergie-Bestrahlung, die durch einen Elektronen-Linearbeschleuniger Typ SL 75/5 Elektra, Crawley, England erzeugt wurden, bestrahlt. Die erzeugten Elektronen wurden durch Wolfram abgeschwächt, wodurch Bremsstrahlung mit einer maximalen Energie von 5 MeV entstand. Das Bestrahlungsfeld wies eine Fläche von 20 cm x 20 cm auf, wodurch eine homogene Verteilung der Strahlung gewährleistet wurde. Die Distanz zwischen der verwendeten Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 35 mm und der Strahlenquelle betrug 100 cm. Zusätzlich wurde eine 2 cm dicke Polymethyl Metacrylat Platte oberhalb der Zellkulturschale positioniert. Die Bestrahlung wurde mit 20 Gy und 50 Gy durchgeführt.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 DNA-Isolierung

DNA aus Zellen wurde mit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Für die Bestimmung der DNA-Menge und –Reinheit wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 300 nm spektralphotometrisch bestimmt und mit folgender Formel errechnet:

$$E_{260\text{ nm}} - E_{300\text{ nm}} \cdot 50\text{ ng } \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{Verdünnung} = \text{RNA-Gehalt (ng } \mu\text{L}^{-1})$$

Die Zahl 50 stellt einen spezifischen Faktor für doppelsträngige DNA dar, der einer Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht, die ungefähr 50 ng µL⁻¹ dsDNA enthält. Das Verhältnis $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ sollte für reine DNA zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.7.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurden $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen lysiert und homogenisiert. Gewebe wurden in einem, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zerkleinert und die Zellen somit aufgeschlossen.

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mithilfe des Qiazol-Reagenzes (Qiagen) und den dazugehörigen Protokollen der Firma Invitrogen. Die Arbeiten wurden mit RNase-freien Lösungen und Materialien durchgeführt.

Die Probe wurde mit 1 mL Qiazol Reagenz gemischt und für 5 min bei RT zur Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 20 min bei $20\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 200 μL Chloroform versetzt, kräftig vermennt, für 10 min bei RT inkubiert und wiederum für 20 min bei $20\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 μL Isopropanol versetzt, vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 20 min bei $20\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und es folgte ein Waschvorgang mit 1,2 mL 75 % Ethanol, welches dann, nach erneuter Zentrifugation für 5 min, wiederum sorgfältig entfernt wurde. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 50–75 μL DEPC-Wasser bei $68\text{ }^\circ\text{C}$ gelöst. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurden durch die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 300 nm im Spektralphotometer Biophotometer (Eppendorf) gemessen. Für eine ausreichende Reinheit liegt der Faktor $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ zwischen 1,8 und 2. Zudem wurde der RNA-Gehalt wie folgt berechnet:

$$E_{260\text{ nm}} - E_{300\text{ nm}} \cdot 40\text{ ng } \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{Verdünnung} = \text{RNA-Gehalt (ng } \mu\text{L}^{-1})$$

Die Zahl 40 stellt einen RNA-spezifischen Faktor dar, der einer Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht, die ungefähr $40\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ RNA enthält. Aufbewahrt wurde die RNA bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für PCR-Amplifikationen von DNA-Fragmenten wurde ein Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) verwendet. Die Reaktionen wurden mit thermostabiler DNA-Polymerase mit Taq-Exonukleaseaktivität der Firma Invitrogen oder ohne Taq-Exonukleaseaktivität (Genecraft, Köln) durchgeführt. Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ (Berlin) hergestellt. Die Sequenzen, Anlagerungstemperaturen sowie eine kurze Beschreibung der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang II. Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten eingesetzt:

Stammlösung	Pro 25 µL Ansatz	Konzentration im Ansatz
10 x Puffer*	2,5 µL	
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 10 mM	0,5 µL	je 0,2 mM
Oligonukleotid 1, 50 µM	0,5 µL	1 µM
Oligonukleotid 2, 50 µM	0,5 µL	1 µM
Taq-Polymerase, 5 U µL ⁻¹	0,1 µL	0,5 unit
Matrize s.u.		

*Puffer (Invitrogen): 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂
oder Puffer (Genecraft): 160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 15 mM MgCl₂, 0.1 % Tween 20

Für das Testen einzelner Bakterienkolonien wurde als Matrize mit einer Pipettenspitze in die Kolonie und dann in den Reaktionsansatz gestochen. Von gereinigten Plasmiden wurden etwa 1 ng DNA als Matrize verwendet, von DNA-Gemischen etwa 100 ng DNA.

Die Länge der Elongationszeit (t_E) richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Es wurde angenommen, dass in einer Minute etwa 1 kbp amplifiziert werden kann. Die geeignete Anlagerungstemperatur (T_m) wurde für die verwendeten Oligonukleotide mithilfe der Formel

$$T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)$$

berechnet [88].

Die benutzten PCR-Programme liefen folgendermaßen ab:

PCR-Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vordenaturierung	96 °C	180 s	1
Denaturierung	96 °C	30 s	
Anlagerungsphase	T_m °C	30 s	30
Elongationsphase	68 °C	t_E s	
Nachelongation	68 °C	300 s	1

3.7.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Wenn nötig wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mit einem Kit der Firma Qiagen (QiAquick) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Mit diesem Kit wurden auch die Reinigungen nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Dieses war bei großen Mengen DNA nötig, z. B. nach Inkubation eines Plasmides mit einem Restriktionsenzym (s. u.) oder nach Inkubation mit CIAP.

3.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte, Restriktionsverdaue und RT-PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese auf deren Größe und Reinheit überprüft. Es wurde 1–2 % Agarose in TBE-Puffer (89 mM Tris pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) erhitzt, mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ethidiumbromid versehen und in einer horizontalen Gelkammer bis zum Erstarren abgekühlt. Das Gel wurde in einer Gelkammer mit TBE-Puffer bedeckt. Der Auftrag wurde mit 10 x Probenpuffer (Fermentas) versehen und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandards für DNA-Fragmente wurde MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Die Gellaufzeit betrug etwa eine Stunde bei einer Spannung von 100 V. Das Gel wurde mit Hilfe eines UV_B-Transilluminators (Universal Hood II, Biorad) fotografiert.

3.7.6 Synthese von cDNA

Bei dieser Methode wurde ein Oligo(dT)-Nukleotid eingesetzt, das im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisiert. Die durch die RNA-Extraktion erhaltene mRNA wird dadurch aus der Gesamt-RNA selektiv in cDNA umgeschrieben. Es wurde 3–5 μg isolierter RNA mit 2,5 μM Oligo(dT)-Nukleotid versetzt. Mit DEPC-Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 11,4 μL aufgefüllt. Dabei wurden immer die gleichen Gesamt-RNA Mengen umgeschrieben. Es folgte der Schmelzvorgang bei 65 °C für 10 min. Die Proben wurden auf Eis aufbewahrt, bevor dann folgende Substanzen nacheinander hinzugefügt wurden:

Stammlösung	20 μL Ansatz	Konzentration im Ansatz
5 x Puffer*	4 μL	
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 10 mM	2 μL	je 1 mM
DTT	1 μL	5 mM
RNase Inhibitor 40 U/ μL	0,5 μL	20 units
Reverse Transkriptase 9 U/ μL	1,1 μL	10 units

* Puffer (Roche): 250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH ca. 8.5

Der Ansatz wurde bei 55 °C für 60 min inkubiert. Danach folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 85 °C für 5 min. Die gewonnene cDNA konnte nun als Matrize in PCRs verwendet werden.

3.7.7 Sequenzanalysen

Die Suche nach Genen, zu denen die Sequenzen oder Sequenzabschnitte von Interesse Homologien aufweisen, erfolgte *via* Internet in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) über das Suchprogramm BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“ [89]). Die Sequenzvergleiche können dabei auf Nukleotidebene (BLASTn) oder auf Aminosäureebene (BLASTx und BLASTp) durchgeführt werden, wobei die eingegebene Sequenz mit den Sequenzen der Datenbank verglichen wird. Die Angabe über die Höhe der Homologie erfolgt entsprechend als Anzahl gleicher Nukleotide bzw. identischer und ähnlicher Aminosäuren in Bezug auf den homologen Sequenzabschnitt. Die Homologie der beiden Sequenzen (Such- und Treffersequenz) wird anhand von Score- und E-Wert definiert. Der Score-Wert gibt die Qualität der Übereinstimmung an, ist aber nicht normiert und somit abhängig von der eingegebenen Sequenzlänge. Der E-Wert berechnet sich aus dem Score-Wert und der Länge der Sequenz. Er gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die gefundene Sequenz nur zufällig mit der vorgegebenen Sequenz übereinstimmt. Je kleiner also der E-Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit dass zwei Sequenzen miteinander verwandt sind. Für einen Vergleich mehrerer Sequenzen untereinander (Multiples Sequenzalignment) wurden die Aminosäuresequenzen im Server des Bioinformatik Centers der Universität Kyoto (<http://align.genome.jp/>) mit dem ClustalW-Programm analysiert. Anhand des multiplen Alignments werden die identischen Aminosäuren von je zwei Sequenzen als Score-Wert (%) angegeben und es lassen sich homologe Bereiche und Lücken aller Sequenzen zueinander erkennen. Für eine Suche von bekannten Proteindomänen oder Motiven in den Sequenzen wurde die PROSITE-Datenbank des ExpASy Proteomics-Servers (<http://www.expasy.org/prosite/>) genutzt.

3.7.8 Herstellung von Vektoren

3.7.8.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden bei der Herstellung von Vektoren

Für molekularbiologische Arbeiten wurden folgende Enzyme nach Herstellerangaben verwendet:

- T4 DNA-Ligase für die enzymatische Verknüpfung von DNA-Molekülen
- CIAP für Dephosphorylierungen von DNA-Enden
- T4 DNA Polymerase

- Mung Bohnen Nuklease
- verschiedene Restriktionsenzyme zum spezifischen Schneiden von DNA

3.7.8.2 Verwendete Plasmide

Für die Herstellung geeigneter Vektoren wurden folgende Plasmide verwendet:

Name	Beschreibung	Resistenzgen für Eukaryoten	für	Resistenz für Prokaryoten	für	Herkunft
pcDNA3.1 (+)	CMV-Promotor, MCS	Neomycin Phosphotransferase II		β -Lactamase		Invitrogen
pMACS4.1	SV 40, Δ CD4	-		β -Lactamase		Miltenyi Biotech
pOT2-robo	<i>Drme-robo3</i>	-		Chloroamphenicol		DGRC, Bloomington

Für einige Klonierungen wurde das Plasmid K79 verwendet, das im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde (Abbildung 3–2):

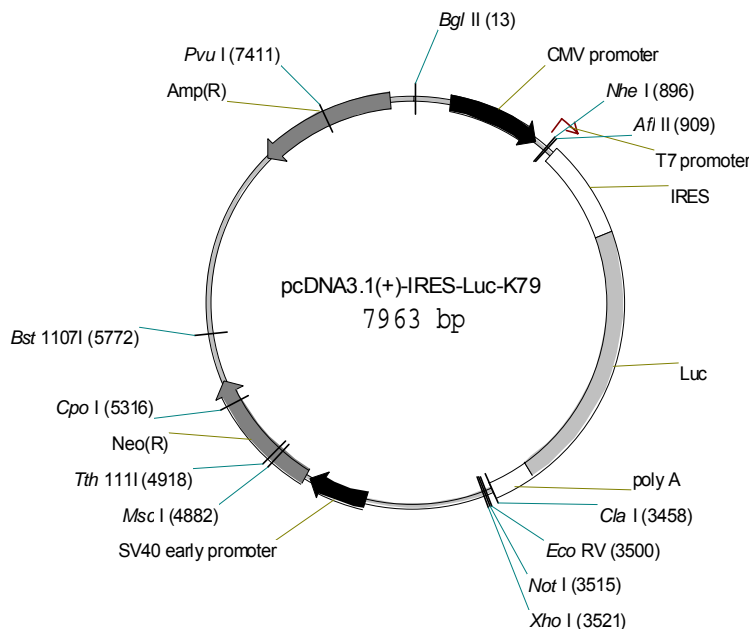


Abbildung 3–2: Plasmidkarte von K79:

In pcDNA3.1(+) wurde die IRES-Sequenz sowie die cDNA-Sequenz für die *firefly*-Luziferase eingefügt. Dieses Plasmid wurde für einige, in den Ergebnissen hergestellten Plasmiden, als Grundgerüst verwendet. CMV: Zytomegalovirus Promotor; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle; Luc: Luziferase; SV40: SV40 Promotor; Neo: Resistenzgen für Neomycin; Amp: Resistenzgenkassette für Ampicillin.

3.7.8.3 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen von generierten Plasmiden wurden bei der Firma GATC Biotech, Konstanz, im Zentrum für molekulare Medizin der Universität Köln oder im LUMC Leiden, Niederlande in Auftrag gegeben.

3.7.9 Kultivierung und Transformation von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden folgende Medien verwendet:

Konzentration	Substanz
LB-Flüssigmedium	LB Broth Base (Invitrogen)
LB-Festmedium	LB Agar (Invitrogen)
SOC:	LB Flüssigmedium
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
2,5 mM	KCl
0,4 %	Glucose

Hitzeschock-Transformation

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* TZ101 α -Zellen (Trenzyme, Konstanz) geschah mittels Hitzeschock. Dazu wurden 2-5 μ L des Vektors mit 20 μ L chemisch kompetenten Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s bei 42 °C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Die erkalteten Zellen wurden mit 300 μ L SOC-Medium (37 °C) gemischt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C belassen. Die Konzentrationen der Antibiotika im Medium (Fest- oder Flüssigmedium), waren folgende:

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 μ g mL ⁻¹
Kanamycin	30 μ g mL ⁻¹
Chloroamphenicol	80 μ g mL ⁻¹

3.7.10 Plasmidpräparation

Für eine Plasmidvermehrung und anschließende Isolierung wurde die *E. coli*-Kolonie ü.N. bei 37 °C mit einer Pipettenspitze abgenommen und in 5 mL LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben. Aus dieser Kultur wurde das Plasmid in einer Minipräparation gereinigt oder für eine Maxipräparation in 100 mL LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum weiterkultiviert.

3.7.10.1 Minipräparation

Kleine Mengen Plasmid wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Eingesetzt wurden 2 mL einer dicht gewachsenen LB-Kultur.

3.7.10.2 Midipräparation

Die Vermehrung der bakteriellen Klone erfolgte in 100 mL LB-Medium mit Antibiotikum ü.N. bei 37 °C und stetigem Schütteln (ca. 200 rpm) mit einem Inokulum von 0,5 % (v/v). Die Kultur wurde bei 6000 x g und 4 °C in einer Heraeus Multifuge 1S-R für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid mit dem Pure Link HiPure Plasmid Filter Purification Kit (Invitrogen) aus den Zellen isoliert.

3.7.11 Transfektion von eukaryotischen Zellen

3.7.11.1 Lipofektion

$2,5 \times 10^5$ Tumorzellen wurden pro Loch einer 24-Loch-Platte zum Transfizieren in DMEM ohne Zusätze ausplattiert und entweder sofort oder am nächsten Tag transfiziert. Dazu wurde 0,25-0,5 µg Plasmid DNA und 2,25 µL Metafectene (Biontex Laboratories, Martinsried) in 50 µL DMEM für 20 min bei RT inkubiert, bevor es langsam zu den Zellen getropft wurde. Am nächsten Tag fand ein Mediumwechsel auf 10 % FCS-DMEM statt und ein weiterer mit Antibiotikazusatz am darauffolgenden Tag. Die Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika waren:

Antibiotikum	Konzentration
G418	800 µg mL ⁻¹
Puromycin	5 µg mL ⁻¹

Für die Lipofektion von CGR8-Zellen war es nötig, das Protokoll zu optimieren. Die höchste Transfektionseffizienz ergab das Transfektionsmittel Metafectene Pro (Biontex Laboratories) in OptiPro Medium (Invitrogen). Die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben. Für eine vorhergehende Bindung der DNA an Polyethylenimin (PEI, MW 25 kDa, Polysciences Inc., Eppelheim) wurde ein 7:1 molares Verhältnis von PEI und DNA verwendet, welches für 20 min bei RT inkubiert wurde.

Die Lipofektion von Eisenpartikeln mit in dieser Arbeit hergestellten Liposomen ist in Kapitel 3.4 beschrieben.

3.7.11.2 Nukleofektion

Die Nukleofektion wurde mit dem Maus NSC Kit von Lonza (Lonza, Köln) mit dem Programm A-33 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden pro Ansatz 5×10^6 Zellen mit $5 \mu\text{g}$ zirkulärem Plasmid nukleofektiert.

3.8 HIV-1-basierendes lentivirales System der 3. Generation

Das verwendete Vektorsystem ist ein lentivirales Vektorsystem der 3. Generation mit erhöhter Sicherheit, das auch als selbst inaktivierendes Vektorsystem (SIN) bezeichnet wird. SIN-Vektoren verlieren ihre Promotoraktivität, der in der U3-Region des 5'LTR vorhanden ist nach der Replikation und Integration in das Genom der Wirtszelle [90]. Das *rev*-responsive Element wird durch das virale Rev Protein erkannt und übt eine essentielle Rolle bei der Regulation der viralen mRNA-Produktion aus [91]. Die Retention des zentralen Polypurin Traktes von HIV-1 (cPPT) in der *pol* Region führt zu einem erhöhten nukleären Transport des Virus und erhöht die Transduktionseffizienz [92-93]. Die Integration des posttranslationalen Regulationselements (PRE) des Hepatitis B Virus führt zu einer erhöhten Expression des Transgens. Dieser Prozess basiert vermutlich auf einem verbesserten nukleären Export der mRNA [94].

Die in dieser Dissertation verwendeten Vektoren sind Derivate des Vektors pRRL-cPPT-X-PRE-SIN [95-96].

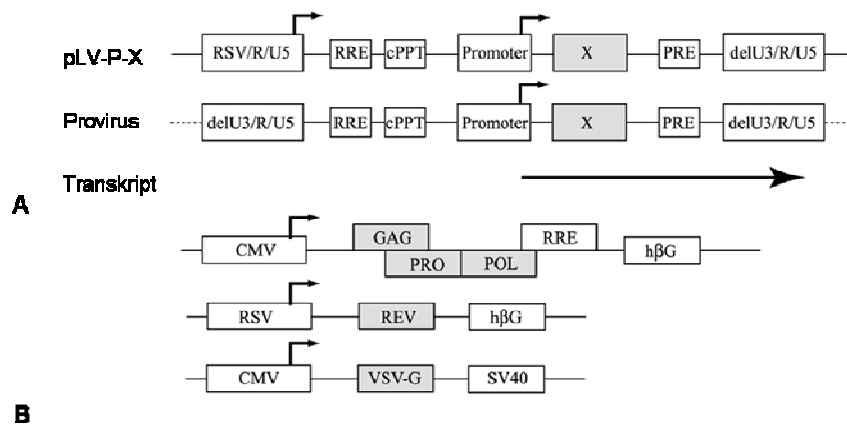


Abbildung 3–3: Schematischer Aufbau des lentiviralen Vektorsystems:

In die prälentivirale DNA (pLV-P-X) können die Reportergene (X) durch Klonierung eingefügt werden, wobei die Expression von dem stromaufwärts gelegenen Promotor (P) nach der Integration des Provirus reguliert wird (Bild A). Der Pfeil in Bild A zeigt die Transkription an. Bild B zeigt den schematischen Aufbau der drei Helferplasmide, die zur Produktion der Viren benötigt werden. RSV: Rous Sarcoma Virus-Promotor; RRE: Rev-responsives Element; cPPT: zentraler Polypurintrakt; PRE: posttranskriptionales regulatorisches Element; CMV: Cytomegalovirus-Promotor; VSV-G: Vesikular Stomatitis Virus Glykoprotein. Die Polyadenylierungssignale stammen vom Simian Virus 40 (SV 40) und vom humanen β-Globinen (hβG). Abbildung verändert nach [90].

Für die Herstellung der infektiösen Partikel wurden 293T-Zellen mittels der Kalziumphosphat-Methode mit dem Transfervektor, dem HIV-1 *gag/pol* Verpackungskonstrukt und dem *rev*-Expressionsplasmid transfiziert [96-99]. Abbildung 3–3 zeigt schematisch den Aufbau des lentiviralen Vektorsystems.

Die für die Klonierungen verwendeten Vektorsysteme wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Rob Hoeben, LUMC, Leiden, Niederlande zur Verfügung gestellt (Abbildung 3–4).

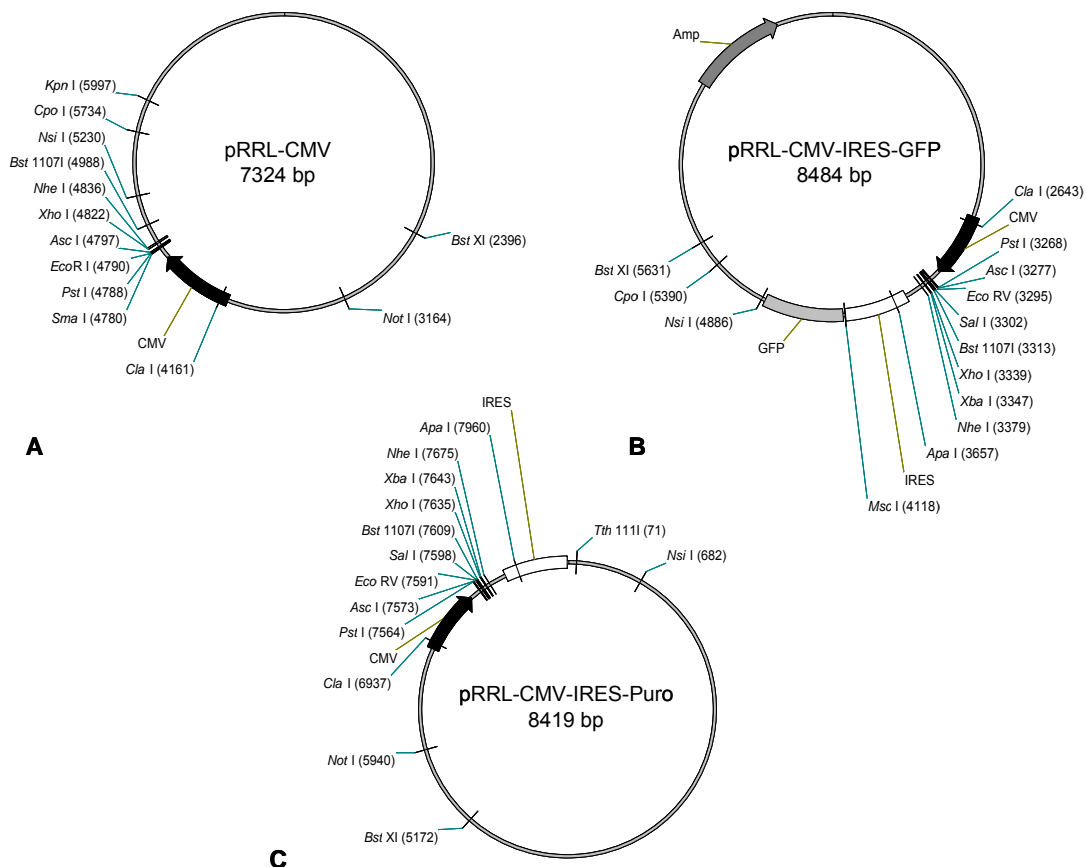


Abbildung 3–4: Vektorkarten der verwendeten prä-lentiviralen Plasmide:

Schematisch dargestellt sind die drei Plasmide, die zur Generierung der Lentiviren verwendet wurden. Das Plasmid pRRL-CMV weist eine Größe von 7324 bp auf (A). Neben dem CMV Promotor beinhaltet das Plasmid pRRLV-CMV-IRES-GFP neben dem CMV Promotor zusätzlich eine interne Ribosomale Eintrittsstelle und die cDNA für den Fluoreszenzreporter GFP (B). Die Gesamtgröße beträgt 8484 bp. In dem Plasmid pRRL-CMV-IRES-Puro wurde die cDNA für die Puromycin-N-Acetyltransferase kloniert ((Puro) C).

3.8.1.1 Generierung der infektiösen Viruspartikel

Die Prälentivirale DNA wurde zusammen mit den drei Helferplasmiden mit der Kalziumphosphat-Methode in 293T-Zellen transfiziert, die über Nacht in T125-Flaschen ausplattiert wurden. Nach 24 h fand ein Mediumwechsel statt, um die überschüssigen Plasmide und eventuell nach der Transfektion abgestorbenen Zellen zu entfernen. Das Medium wurde 48 h und 72 h nach der Transfektion gesammelt und anschließend mittels Spritzenvorsatzfiltern mit einer Porengröße von 0,45 µm Durchmesser gefiltert (Acrodisk-Spritzenvorsatzfilter, Pall, USA). Die gereinigten Mediumüberstände wurden bei -80 °C gelagert.

In Einzelfällen wurde eine Konzentrierung der infektiösen Partikel vorgenommen. Dazu wurde eine Ultrazentrifugation des Kulturüberstandes bei 50 000 x g für 90 min durchgeführt und das Viruspellet bei einer Temperatur von 4°C gelöst.

3.8.1.2 p24 HIV-1-ELISA zur Bestimmung der Viruskonzentration

Innerhalb der viralen Hülle von HIV-1 befindet sich das Nukleokapsid, in dem sich die zwei einzelnen RNA-Stränge des HIV-Genoms befinden. Die äußere Schicht des Nukleokapsids ist aus p17 Proteinen aufgebaut, während die innere Schicht p24 Proteine enthält [100].

Für die Bestimmung des Virustiters wurde der HIV-1 p24 Antigen ELISA-Test der Firma Zeptometrix, New York, USA nach Angaben des Herstellers verwendet. Prinzip: Mikrowells wurden mit einem monoklonalen Antikörper versehen, der spezifisch mit dem p24 gag Protein von HIV-1 reagiert. Bei der Inkubation der Kulturüberstände binden die viralen Antigene an den immobilisierten Antikörper und können mit einem hochtitrierten humanen anti-HIV-1 Antikörper, der biotinyliert ist, detektiert werden. Zur Detektion wird eine abschließende Inkubation mit der Streptavidin-Peroxidase vorgenommen und die OD₄₅₀ kann mittels photometrischem Verfahren bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden. Die resultierende OD₄₅₀ ist proportional zur Menge des HIV-1 p24 Antigens in der Probe.

3.8.1.3 Transduktion mit den infektiösen Partikeln

Die zu transduzierenden Zellen wurden in 24-Lochplatten über Nacht mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen $500 \mu\text{L}^{-1}$ ausplattiert. Für die Transduktion wurden die viralen Partikel zusammen mit $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ Polybren zu frischem Kulturmedium hinzugegeben und für 24 h inkubiert.

Die Berechnung der Virusmenge folgte einer Näherung. Die „multiplicity of infection rate“ (MOI) wurde als 1 definiert, wenn 1 ng virale Partikel mit 1500 Zellen inkubiert wurden.

3.8.1.4 Überprüfung der Infektion

24 bis 48 h nach der Transduktion konnte bei Verwendung von Fluoreszenzreportern die entsprechende Fluoreszenzemission mikroskopisch dokumentiert werden. Die Ermittlung der Transduktionseffizienz folgte nach Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Fluoreszenzreporter⁺-Zellzahl.

Bei Expression der *firefly*-Luziferase wurden die Zellen in 250 µL Lysepuffer aufgenommen, der die folgende Zusammensetzung hat:

25 mM	Trisphosphat, pH = 7,8
2 mM	DCTA
2 mM	DTT
10 %	Glycerol
1 %	Triton X-100

Nach der Supplementation von 10 µL Luziferase-Assay Reagenz (Promega) wurde die Lichtreaktion mit dem Luminometer Lumat LB9501, Berthold Technologies, Bad Wildbad bestimmt.

3.9 Biochemische Methoden

3.9.1 Isolierung von Antikörpern

Der 14C2 Robo3-Kulturüberstand wurde mit einer Amicon Ultrafiltrationssäule (Millipore) mit einer Porengröße von 10 000 Da 10 fach konzentriert. Die Antikörper wurden mit einer Protein A-Säule (Pierce) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Der Überstand von 151-IgG wurde mit einer Amicon Ultrafiltrationssäule mit einer Porengröße von 100 000 Da ebenfalls 10 fach konzentriert. Die Isolierung des Antikörpers erfolgte mittels einer Melongel-Säule (Pierce).

Der Proteingehalt wurde mit einem BCA-Protein-Kit (Pierce), im Vergleich zu BSA als Standard, bestimmt.

3.9.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Gelen durchgeführt, die aus Sammelgel mit 4 %

und Trenngel mit 15 % einer Polyacrylamidlösung (Acrylamid/Bisacrylamid 37:1) bestanden [101]. Die Proben (Proteingemische jeweils 30 µg Protein; gereinigte Antikörper jeweils maximal 5 µg Protein) wurden vor dem Auftragen 5 min mit Auftragspuffer (Fermentas) und 1x Reduktionsreagenz (Fermentas) gekocht. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem vertikalen Elektrophoresesystem der Firma Biorad (München) bei 200 V für 1 h in Lauffpuffer (25 mM Tris; 190 mM Glycin; 5 mM SDS). Als Molekulargewichtsmarker wurde das Proteingemisch Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder im Western Blot weiterverarbeitet oder über Nacht in einer Coomassie-Blau-Färbelösung (0,25 % Coomassie Brillant Blau R-250 in 40 % Methanol und 7 % Eisessig) gefärbt und anschließend 3 h in 40 % Methanol und 7 % Eisessig entfärbt. Die Gele wurden zwischen zwei Zellulosemembranen eingespannt und über Nacht getrocknet. Die molekularen Massen der denaturierten Proteine wurden anhand der Eichproteine im Gel ermittelt. Für eine sensitivere Anfärbung der Proteine im SDS-Gel und für die Detektion PEGylierter Proteine wurde eine reverse Färbung mit Zink-Imidazol verwendet [102-103].

3.9.3 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose Membran (Protran BA 85, Whatman, Dassel) transferiert. Die für den Western Blot benötigten Lösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Lösung	Konzentration	Substanz
Transferpuffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol
TBST, pH 7,6:	10 mM	Tris
	130 mM	NaCl
	1 %	Tween 20
Stammlösungen für die Chemilumineszenz-Detektion:	30 %	H ₂ O ₂
	250 mM	Luminol/DMSO
	90 mM	p-Coumarinsäure/DMSO
	100 mM	Tris, pH 8,5

Dazu wurde die Membran kurz mit Wasser benetzt und für mindestens 15 min in Transferpuffer inkubiert. In einem Mini-Trans Blot System (BioRad) wurden zwischen jeweils zwei Lagen mit Transferpuffer getränktem 3MM Filterpapier (Whatman), die Membran und das Gel gelegt und in die Apparatur gespannt. Bei einer konstanten Spannung von 100 V wurden die Proteine für 1 h auf die Membran transferiert. Zum Anfärben der Proteine wurde die Membran zunächst mit 5 % fettreduziertem Milchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell) für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in 5 % Milchpulver für 2 h bei RT auf jeweils eine Membran gegeben. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter Antikörper in 5 % Milchpulver eingesetzt. Die Detektion der Meerrettichperoxidase wurde mit einer Detektionslösung (12 mL Tris, pH 8,5; 3,8 µL H₂O₂; 60 µL Luminol; 26,6 µL Coumarinsäure) für eine Minute inkubiert. Diese wurde aus den Stammlösungen frisch angesetzt. Ein Röntgenfilm (Sigma-Aldrich) wurde auf den Blotmembranen für eine Minute exponiert und in einer AGFA Curix 60 Entwicklungsmaschine (AGFA, Köln) im Dunkeln entwickelt.

Für die Überprüfung der Proteinmenge auf dem Blot wurde dieser mit einem Antikörper gefärbt, der ein konstitutiv exprimiertes Protein erkennt. Dazu war es notwendig, die Antikörper der ersten Färbung zu entfernen. Die dafür benötigten Lösungen waren folgende:

Glycin Puffer, pH 2,5:	0,2 M	Glycin
Tris, pH 7,5:	1 M	Tris
TBST (s.o.)		

Die bereits gefärbte Blotmembran wurde ü. N. in TBST gewaschen und anschließend in Glycin-Puffer für 2 x 15 min gegeben. Nach zwei Waschschritten für je 15 min mit Tris-Puffer konnte die Blotmembran mit TBST äquillibriert und erneut mit Milchpulverlösung geblockt werden. Für den Ladekontrollnachweis wurde der anti- α -Tubulin-Antikörper (Klon DM1A, Calbiochem, Darmstadt) 1:3000 für eine Stunde inkubiert, der Blot gewaschen und mit einem anti-Maus-HRP-Antikörper (Amersham) 1:2000 für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis wurde wie schon bei der ersten Antikörperfärbung durchgeführt.

3.9.4 PEGylierung

Zur Kopplung von PEG an BSA oder 151-IgG wurde 1 mg mL^{-1} PEG-NHS (Rapp Polymers, Tübingen) in PBS gelöst und mit der gleichen Menge Protein für 2-3 h inkubiert. Zum Entfernen unkonjugierten PEGs wurde die Lösung über eine Zeba Entsalzungssäule (Pierce) umgepuffert.

3.9.5 Spektralphotometrische Eisenbestimmung

Für eine quantitative Bestimmung des Eisengehaltes der Zellen wurden diese mit 50 mM NaOH für 2 h lysiert. Wenn im Ergebnisteil nicht anders beschrieben, wurden 25 000 Zellen in $1 \text{ }\mu\text{L}$ NaOH verwendet. Das Volumen betrug zwischen 16 und $20 \text{ }\mu\text{L}$. Für die Bestimmung des Eisengehaltes von eisenhaltigen Antikörpern oder Partikeln wurden diese ebenfalls mit 50 mM NaOH verdünnt. Die Inkubationszeit entfiel hierbei.

Zur Quantifizierung wurde als Standard Eisen-(III)-Ammoniumzitat (FAC) in einer Konzentrationsreihe von 0-500 μM im jeweils gleichen Volumen verwendet.

Die Eisenbestimmung wurde nach Riemer et al verändert durchgeführt [104]. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 10 mM HCl und einem Volumen einer Kaliumpermanganat Lösung gemischt (frisch angesetzte Lösung: 4,5 % KMnO_4 in H_2O und 1,4 M HCl im gleichen Verhältnis). Die Proben wurden für 2 h bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Schütteln inkubiert und nach Abkühlung auf RT mit einer Eisendetektions-Lösung (10 % (v/v)) für 30 min inkubiert.

Die Eisendetektions-Lösung bestand aus:

Konzentration	Substanz
2,5 M	Ammoniumacetat
1 M	Ascorbinsäure
6,5 mM	Ferrozin
6,5 mM	Neocuproin

$50 \text{ }\mu\text{L}$ der Probe wurde in eine 96 well Platte gegeben und die Absorption bei 570 nm im LB 940 Multimode Reader Mithras (Berthold Technologies, Bad Wildbad) bestimmt.

3.9.6 Messung der Luziferaseaktivität

Die Messung der Luziferasereaktion im Berthold Plattenleser Mithras LB 940 erfolgte mit $2,5 \times 10^5$ Zellen in 250 μL PBS versetzt mit $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ Luziferin. Die Luziferaseaktivität nach Zugabe von Luziferin wurde ebenfalls mittels des Photon ImagerTM der Firma Biospace, Paris, Frankreich (s. Kapitel 3.15) ermittelt.

3.9.7 Liposomenherstellung

5,9 mg 3β -[*N,N,N*-Dimethylaminoethan]-Carbamoyl]-Cholesterol (DC-Chol) und 4,6 mg Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE) wurden unabhängig voneinander in 500 μL Chloroform gelöst, gemischt und unter N_2 -Bedampfung und Erwärmung getrocknet. Das Pellet wurde in 7 mL 20 mM HEPES-Puffer mit pH 7,8 gelöst und anschließend 1 mL der Lösung für 7-10 min sonifiziert. Die errechnete Konzentration betrug $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.9.8 Kopplungsreaktionen

3.9.8.1 Eisenpartikel

Für die Kopplung von Eisenpartikeln an Antikörpern wurden folgende Lösungen verwendet:

	Konzentration	Substanz
Kopplungspuffer	50 mM	MES, pH 5,2
	0,05 %	Proclin 300
Waschpuffer	10 mM	Tris, pH 8,0
	0,05 %	BSA
	0,05 %	Proclin 300
EDC-Lösung	1 mM	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid

500 μL Eisenpartikel (Micromod, Rostock) mit 50 nm Durchmesser wurden bei 20 000 g für 10 min zentrifugiert und mit 400 μL Kopplungspuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μL Kopplungspuffer resuspendiert und mit 20 μL EDC-Lösung für 30 min unter Schütteln aktiviert. 100 μg Antikörper wurde hinzugegeben und ü. N. Bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die nicht gekoppelten Antikörper wurden nach

Zentrifugation mit dem Überstand entfernt. Nach einmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde das Pellet in 100 μ L Waschpuffer resuspendiert.

3.9.8.2 Fluoreszein

10 mg mL⁻¹ Fluoreszein-NHS (Pierce) wurde mit der gleichen Menge Liposomen oder SPIOs 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Umpufferung in 20 mM Hepes.

3.10 Immunzytochemie

Mit der immunzytochemischen Technik können Proteine durch spezifische Antikörper- Reaktionen erkannt werden. Der bei der Antigen-Antikörperreaktion entstandene Komplex kann durch indirekte Nachweismethoden detektiert werden. Gegen den unmarkierten primären Antikörper wurde ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter sekundärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch gegen die Spezies, aus welcher der Primärantikörper gewonnen wurde, gerichtet war.

3.10.1 Prinzip der Immunzytochemie und Durchführung der Methode

Die auf Glasplättchen kultivierten Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde 1x für 4 min mit 0,05 M TBS gewaschen, um die überschüssige Fixierlösung gründlich aus den Schalen zu entfernen. Die fixierten und mit Puffer gewaschenen Präparate wurden vor der immunzytochemischen Untersuchung teilweise bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde für 10 min mit 0,25 % Triton-X-100 in TBS inkubiert. Dieser Permeabilisierungsschritt entfiel bei Verwendung der Oberflächenantikörper. Die Zellen wurden anschließend 3x für 5 min mit 0,05 M TBS gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit einer 5 % Rinderserumalbumin- Lösung für einen Zeitraum von 30-60 min inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 2 h bei RT oder für einen Zeitraum von 10 h (über Nacht) bei 4 °C. Die Verdünnung des Antikörpers wurde dabei in einer 0,8 % BSA- Lösung in TBS vorgenommen. Nach drei- bis viermaligem Auswaschen des ungebundenen primären Antikörpers mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 60 min bei RT im Dunkeln. Die verwendeten Antikörper befinden sich in Tabelle 3–2 und Tabelle 3–3.

Tabelle 3–2: Verwendete primäre Antikörper in der Immunzytochemie oder für Western Blots

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Anti-Vimentin	Sigma-Aldrich	Monoklonal Maus	1:100
Anti-Nestin	Milipore	Monoclonal Maus	1:125
Anti- β 3-Tubulin	Covance	Polyclonal Kaninchen	1:1000
Anti-Doublecortin (C-term)	Santa Cruz	Polyclonal Ziege	1:150
Anti-GFAP	Sigma	Monoclonal Maus	1:1000
Anti-GFAP	DAKO	Polyclonal Kaninchen	1:100
Anti-MAP-2 _{a,b,c}	Sigma	Monoclonal Maus	1:1000
Anti-Oct 3/4	Santa Cruz	Polyclonal Kaninchen	1:200
Anti-CD15	DSHB	Monoclonal Maus	1:10
Anti-HNK-1	DSHB	Monoclonal Maus	1:10
Anti-A2B5	DSHB	Monoclonal Maus	1:10
Anti-Hämagglutinin	Roche	Polyklonal Ratte	IC: 1:100 WB: 1:200
Anti-Ferritin (schwere Kette)	Santa Cruz	Polyclonal Kaninchen	IC: 1:100 WB: 1:200
Anti-Luziferase	*	Polyclonal Kaninchen	1:100
Anti-FAK (pY397)	Biosource	Polyclonal Kaninchen	1:100
Anti-alpha-Tubulin	Calbiochem	Monoklonal Maus	WB: 1:3000
Anti-PEG	Epitomics		1:10
Anti-EGFR (151-IgG)	DSHB	Monoclonal Maus	1:10
Anti-CD4-FITC	Miltenyi Biotec	Monoclonal Maus	1:10
Anti-CD4-SPIO	Miltenyi Biotec	Monoclonal Maus	1:10
Anti-CD11b-SPIO	Miltenyi Biotec	Monoclonal Maus	1:10
Anti-CD57-SPIO	Miltenyi Biotec	Monoclonal Maus	1:10
Anti-Dextran-FITC	StemCells	Monoclonal Maus	1:20
Anti-Dextran-PE	**	Monoklonal Maus	1:10
Anti-robo3	DSHB	Monoclonal Maus	

*zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Jacobs, MPI für neurologische Forschung, Köln

** zur Verfügung gestellt von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Tabelle 3–3: Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundärer Fluoreszenzantikörper		Verdünnung
Ziege anti-Maus IgG (H + L); DyLight 488	Pierce	1:1000
Ziege anti-Maus IgG (H + L); DyLight 549	Pierce	1:1000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H + L); DyLight 488	Pierce	1:1000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H + L); DyLight 549	Pierce	1:1000
Esel anti-Ziege IgG (H + L); Cy3	Jackson	1:150
	ImmunoResearch	
Esel anti-Ziege IgG (H + L); FITC	Jackson	1:125
	ImmunoResearch	
Ziege anti-Maus IgG (H + L); HRP	Amersham	1:2000
Ziege anti-Ratte IgG (H + L); HRP		1:3000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H + L); HRP	Cell Signaling	1:2000

Für eine Inkubation mit zwei Antikörpern wurden diese so ausgewählt, dass es bei den Spezies, aus der die Antikörper gewonnen wurden, zu keinen Übereinstimmungen kam.

Bei diesen Doppelinkubationen folgte nach dem Auswaschen des ersten sekundären Antikörpers 30 min Inkubation mit 5 % BSA. Die darauf folgende Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper, der in 50 mM TBS gelöst wurde, erfolgte wieder über einen Zeitraum von 10 h bei 4 °C oder für 2 h bei RT. Die weiteren Schritte sind identisch zu der Prozedur, die bereits nach der Inkubation des ersten primären Antikörpers angewendet wurde.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen zur Darstellung der Zellkerne mit dem Bisbenzimid Hoechst Dye 33342 in der Endkonzentration von 1 µg mL⁻¹ in TBS inkubiert. Hoechst Dye 33342 ist ein spezifischer Farbstoff, der in adenosin- und thymidinreichen Regionen von doppelsträngiger DNA interkaliert. Nach dem Auswaschen wurden die mit Zellen bewachsenen Rundgläschen mit dem wässrigen Eindeckmedium Aqua Poly/Mount (Polysciences Europa GmbH, Eppelheim) auf Objektträgern fixiert. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C.

Die Lagerung der Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben entweder bei 4 °C oder -20 °C.

- Für die Visualisierung der Aktinfilamente wurde Promofluor488-konjugiertes Phalloidinkonjugat (Promocell, Heidelberg) und Alexa644 konjugiertes Phalloidin verwendet. Vor der Inkubation wurde eine Permeabilisierung mit 0,28 % Triton X-100 durchgeführt. Die Inkubation mit den konjugiertem-Phalloidin wurde für 30-60 min durchgeführt.

- Zur Visualisierung der DNA wurden Einzelzellen für 10 min und Tumorzellaggregate bis zu 60 min mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Sytox green (Sigma-Aldrich) inkubiert.

3.10.2 Übersicht über die Proteine, die von den verwendeten Antikörpern erkannt werden

- **Anti-Vimentin:** Vimentin ist ein Intermediärfilament des Zytoskeletts und ist aus zwei alpha Helices aufgebaut [105]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Gliome eine starke Vimentinexpression aufweisen und nur in Einzelfällen GFAP exprimieren [106].
- **Anti-Nestin:** Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein, welches in neuronalen Vorläuferzellen, radialen Gliazellen, Myoblasten, und in Zellen des Nebennierenmarks exprimiert wird. Nestin wird als Marker für neurale Vorläuferzellen, neuroepitheliale Zellen und Gliomzellen verwendet [107-109].
- **Anti β 3-Tubulin:** wird als neuronales Markerprotein verwendet. Die β 3-Tubulin mRNA ist exklusiv in den Zellkörpern vorhanden, während das Protein sich sowohl in Axonen, als auch in Dendriten befindet. β 3-Tubulin gehört zu den neuronalen Markerproteinen, die schon früh in der Neurogenese nachgewiesen werden konnten. Die Expression beginnt erst kurz vor oder während der terminalen Mitose der Vorläuferzellen. Diese Expression wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert, die bei der Determinierung der neuronalen Differenzierungsrichtung und bei frühen morphogenetischen Prozessen beteiligt sind [110-111]. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass eine β 3-Tubulin-Expression auch bei nicht-neuronalen Zellen detektiert werden kann [112-113].
- **Anti-Doublecortin (DCX):** DCX spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Der Klon C-18 erkennt den C-terminalen Teil des humanen DCX-Proteins. Dieses mikrotubuliassoziierte Protein wurde in migratorisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen und konnte keine Koexpression mit den Proteinen Nestin und NeuN nachgewiesen werden [114].
- **Anti-GFAP:** Dieses Intermediärfilamentprotein wird als Astrozytenmarker verwendet [115].
- **Anti-MAP-2:** Die mRNA und das Protein sind häufig in den Dendriten von Neuronen lokalisiert. Es existieren drei MAP-2 Isoformen. Während sich MAP2a während der frühen postnatalen Periode nachweisen lässt, kann

MAP2b während der gesamten Gehirnentwicklung nachgewiesen werden. Die Expression von MAP2c findet sich in früheren Stadien der neuronalen Entwicklung [116]. Der hier in dieser Dissertation verwendete Antikörper erkennt alle drei MAP2-Isoformen.

- **Anti Oct 3/4:** Oct 3/4 ist ein Transkriptionsfaktor, der in frühen embryonalen Zellen und Keimzellen exprimiert wird. Oct 3/4 ist ein Marker für die Pluripotenz von Mammalienzellen [117].
- **Anti-SSEA-1 / anti CD15:** Das „*stage-specific embryonic antigen 1*“ (SSEA-1) ist das Antigen eines monoklonalen Antikörpers, der durch die Immunisierung mit den embryonalen Karzinomazellen F9 entwickelt wurde [118]. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des anti-SSEA-1 Antikörpers durch ein Oligosaccharid, das die Lewis x-Struktur [Le^x: Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNac β -] aufweist inhibiert wird [119]. SSEA-1 wird auch als CD15 bezeichnet.
- **Anti-HNK-1 / anti CD57:** Das „*human natural killer protein 1*“ Antigen ist ein Kohlenhydratantigen, dessen Struktur als HSO₃-3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc identifiziert wurde [120-121]. HNK-1 ist ein Zelloberflächenmarker, der im Nervensystem exprimiert wird und bei der Migration von Neuralrohrzellen essentiell beteiligt ist [122-123]. Der Antikörper des Klons TB03, der partiell in dieser Arbeit verwendet wurde, ist spezifisch für humanes HNK-1, kreuzreagiert aber auch mit HNK-1 aus Mäusen.
- **Anti-A2B5:** A2B5 ist ein monoklonaler Antikörper, der von Eisenbarth et al 1979 entwickelt wurde [124]. Die Antigene, die durch diesen Antikörper erkannt werden werden als Ganglioside der c-Serie bezeichnet und schließen GQ1c, GT1c und GT3 ein [125-126].
- **Anti-Hämagglutinin:** Das HA-Epitop stellt ein 11 Aminosäuren langes Peptid dar, das als Fusionsprotein im Leseraster des fusionierten Proteins eingefügt wird und damit exprimiert wird [127]. Dadurch kann das fusionierte Protein entweder mit einem spezifischen Antikörper identifiziert, oder mittels affinitätschromatographischen Methoden isoliert werden.
- **Anti-Ferritin:** Ferritin übernimmt durch Speicherung von Eisen die Rolle eines Eisenpuffers in Mammalienzellen. Der Antikörperklon H-53 erkennt die schwere Kette des Ferritinmoleküls der Spezies Maus, Ratte und Mensch [128].
- **Anti-Luziferase:** Balb/c Mäuse wurden mit der *firefly*-Luziferase immunisiert und die Milzzellen anschließend mit einer Myelomzelllinie zur Herstellung der Hybridomzelllinie LUC-1 fusioniert [129].

- **Anti-FAK:** Die fokale Adhensionskinase ist eine Nicht-Rezeptortyrosinkinase mit einem Molekulargewicht von 125 kDa, die eine wesentliche Rolle bei der integrinvermittelten Signaltransduktion aufweist [130]. Die Autophosphorylierung an Tyrosin 397 führt zur Ausbildung einer hochaffinen Bindungsstelle für Src-Homologie-2 (SH2) Domänen [131].
- **Anti-alpha-Tubulin:** α - und β -Tubulin bilden Heterodimere, welche sich zu Mikrotubuli zusammenlagern. Die Markierung mit anti- α -Tubulin-Antikörpern ist durch die konstitutive Expression eine geeignete interne Kontrolle.
- **Anti-PEG:** Polyethylenglykole sind eine Familie von langkettigen Polymeren, die an Glycerin gebunden sind und für die Modifikation von Biomolekülen verwendet werden [132]. KLH-PEG mit einer terminalen Methoxygruppe wurde als Immunogen für die Herstellung dieses Antikörpers verwendet. Der Antikörper erkennt spezifisch die terminale Methoxygruppe von unterschiedlich langen Polymeren (Datenblatt Epitomics).
- **Anti-EGFR:** Das N-Octylglucosid-Protein aus der Plasmamembran von PC12-Zellen wurde als Immunogen für Balb/c-Mäuse verwendet. Die Zellen wurden mit der Myelomzelllinie Sp2/0-Ag14 fusioniert und somit die Hybridomzelllinie 151-IgG generiert [133].
- **Anti-CD4:** Auf humanen T-Helferzellen und Thymozyten stark exprimiert, während die Expression auf Monozyten und Dendritischen Zellen schwach ist.
- **Anti-CD11b:** In Mäusen wird das CD11b-Antigen auf Monozyten, Macrophagen und Mikroglia exprimiert.
- **Anti-Dextran:** Der Antikörper des Klons DX1 wurde durch Immunisierung von C58/J Mäusen mit Stearyl-Isomaltotetraose und anschließender Fusionierung der Milzzellen mit der Maus-Myelomzelllinie PAI-O generiert (Datenblatt StemCell Technologies).
- **Anti-Robo3:** Der Antikörper wurde durch Klonierung eines extrazellulären Teils der robo3-Sequenz aus *Drosophila melanogaster* (Aminosäuren 317-732), fusioniert an eine Sequenz für ein sechsfaches Histidin, generiert. Durch Immunisierung mit dem Plasmid und anschließender Fusionierung der Milzzellen mit Myelomzellen aus Maus, wurde die Hybridomzelllinie 14C9 erstellt [134].

3.11 FACS

Für die FACS-Analytik wurden die unfixierten Zellen durch Accutasebehandlung vereinzelt und mit den entsprechenden primären Antikörpern für 30 min bei 37 °C

inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurden die DyLight488 konjugierten Antikörper der Firma Pierce in der Verdünnung 1:1000, oder bereits FITC-konjugierte primäre Antikörper verwendet (Tabelle 3–2 und Tabelle 3–3). Zur Visualisierung der toten Zellen wurde während der Durchführung der FACS-Analytik eine Inkubation mit Propidium Iodid durchgeführt. Die Analysen wurden mit dem Gerät FACScan der Firma BD-Bioscience, Heidelberg durchgeführt, wobei mindestens 1×10^4 Zellen bei jeder Untersuchung berücksichtigt wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest (BD Biosciences).

3.12 Verarbeitung und Analyse von Geweben

3.12.1 Fixierung und Anfertigung von Gefrierschnitten

Methode 1: Gehirne wurden nach Perfusion der Tiere mit 4 % PFA entnommen und mit 4 % PFA über Nacht bei 4°C nachfixiert. Durch die Einwirkung einer 30 % Succroselösung wurde eine Gefrierprotektion vorgenommen. Die anschließende Lagerung erfolgte in einer Aluminiumverpackung bei -80 °C.

Methode 2: Gehirne und Tumore wurden nach Tötung des Tieres chirurgisch entnommen und in einer -80 °C kalten Isopentanolösung über flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Gefrierschnitte wurden mit einer Schichtdicke von 12 µm mittels eines Gefriermikrotoms Modell CM 3050 der Firma Leica angefertigt und auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern durch Wärmeeinwirkung immobilisiert. In Einzelfällen wurden die Gehirne mittels eines Mikrotoms Modell SM 200012 der Firma Leica, dessen Klinge mit Trockeneis gekühlt wurde, geschnitten. Die Aufbewahrung der 50 µm dicken Schnitte erfolgte bei 4 °C in einer Mischung von Ethylenglykol und Glycerol.

3.12.2 Paraffin-Einbettung

Die Paraffineinbettung von explantierten Tumoren wurde in einem Einbettautomat Modell Shandon Excelsior der Firma ThermoFisher in entsprechenden Einbettkassetten vorgenommen. Durch Entwässerung mittels aufsteigender alkoholischer Reihe und Paraffineinbettung wurde durch ein automatisches Verfahren reguliert, dass 6 h dauerte. Die histologischen Schnitte wurden mit einer Schichtdicke von 8 µm an einem Mikrotom Modell HM355 der Firma Microm, das mit einem gekühlten Messer ausgerüstet war, durchgeführt. Schnittbänder wurden bei Raumtemperatur gelagert oder auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträgern immobilisiert.

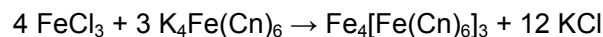
3.12.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Zellkulturen wurden nach der PFA-Fixierung in PBS bei 4 °C gelagert. Nach mehrfach wiederholten Waschschritten mit dH₂O wurde für maximal 30 s eine wässrige Eosinlösung inkubiert und durch mehrfach wiederholte Waschschrritte mit dH₂O ausgewaschen. Zur kombinierten Hämatoxylin- und Eosinfärbung wurden Gefrierschnitte für etwa 3 min mit wässriger Hämatoxylinlösung und anschließender Inkubation mit Leitungswasser behandelt. Durch 30 s Inkubation mit Eosin wurde eine rötliche zytoplasmatische Färbung erlangt. Nach mehrfach wiederholten Waschschrritten mit dH₂O wurde eine Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %) und Xylol erreicht. Die Konservierung erfolgte mit dem Einbettmedium Entellan.

3.12.4 Berliner Blau-Färbung

Die Reaktion ist ein histochemischer Nachweis für dreiwertiges Eisen und wurde bereits 1867 beschrieben [135].

Die Reaktion folgt der Formel:



Angelehnt an dieses Protokoll wurde die Färbung wie folgt durchgeführt:

Die fixierten Zellen/Gewebeschnitte wurden für 15 min mit Leitungswasser und anschließend für 3 x 5 min mit dH₂O gewaschen. Eine K₄Fe(Cn)₆-Lösung (47 mM K₄Fe(Cn)₆ in H₂O in einem 1:1 Verhältnis mit 2 % HCl) wurde für 30 min auf die Zellen/Gewebeschnitte gegeben und die blaue Färbung eisenhaltiger Zellen dokumentiert [136].

Zur Verstärkung des Signals, kann die Färbung nach dreimaligen Waschen für 5 min mit dH₂O mit 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) und H₂O₂ (1,9 mM DAB; 30 % H₂O₂, Tabletten, Sigma Aldrich) verstärkt werden. Die DAB-Reaktion verläuft im Dunkeln bis zur deutlichen Braunfärbung (etwa 10 min) und wird mit dH₂O gestoppt.

3.13 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Analyse wurde eine Negativkontrastierung mit einer 2 %igen wässriger Uranylazetatlösung für 10 min bei RT durchgeführt. Die Präparation erfolgte auf Netzen, die mittels Formvar (Polyvinyl Formal) beschichtet wurden. Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem Elektronenmikroskop EM 901

der Firma Zeiss. Digitale Bilder wurde mit dem Kamerasystem Megaview III der Firma Olympus Soft Imaging Solutions, Münster aufgenommen und mittels ImageJ prozessiert.

3.14 Mikroskopie und Software

Die Immunfluoreszenzen wurden mittels eines Konfokalen-Laser-Scanning Mikroskops Modell DMRE der Firma Leica analysiert. Die Epifluoreszenzaufnahmen wurden mittels einer monochromen CCD-Kamera Modell DFC340 der Firma Leica aufgenommen.

Phasenkontrast und Fluoreszenz von lebenden Zellen wurden mit dem Mikroskop Axiovert 40 CFL, Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera Leica DFC300FX (Leica, Solms) aufgenommen.

Die Datenakquisition erfolgte mittels des Programm Application Suite Version 2.8.1 der Firma Leica. Die Nachbearbeitung der Bilder wurde mit dem Programm ImageJ Version 1.38n (National Institutes of Health, USA (<http://rsb.nih.gov/ij/>)) vorgenommen.

MRT-Daten wurden mittels des Programms Paravision 4, Bruker BioSpin akquiriert und mit dem Programm ImageJ prozessiert.

Die Berechnung der T_2 -Relaxationszeiten erfolgte mit dem Program IDL, Version 6.4, ITT Visual Information Solutions, USA. Der verwendete Algorithmus MPFIT basiert auf der Markwardt IDL Bibliothek [137].

Die 3-dimensionale Rekonstruktion der MRT-Daten erfolgte mit dem Software-Packet Amira, Version 3.1 (Mercury Systems Inc., Chelmsford, USA).

Statistische Analysen und Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm Origin, Version 8 (OriginsLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

Für molekularbiologische Analysen wurden die Programme Chromas Lite, Version 2.01, Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australien; AiO, Version 8, Konstanz; DNA Baser, Version 2.75.0, Heracle Software, Lilienthal verwendet

3.15 Messungen mit den Photonen-Bildgebungssystemen

Innerhalb der hier vorgelegten Dissertation wurden drei unterschiedliche Photonen-Bildgebungsgeräte verwendet:

1.) Photon Imager™ der Firma Biospace Lab, Paris, Frankreich:

Dieses Bildgebungssystem verwendet eine CCD-Kamera (1×10^6 Pixel, Pixelgröße beträgt $7,4 \mu\text{m}$). Die Objektivlinse weist einen Durchmesser von 24 mm auf. Die Blendenöffnung ist regulierbar zwischen 1,4 mm bis 22 mm. Die Illumination erfolgt mittels einer 150 W Halogenlampe. Zur Lichtverstärkung wird eine Gallium(III)-Arsenide enthaltende Bildverstärkungskomponente verwendet. Zur Lichtstreuung sind am Ende der Kaltlichtleiter Diffusoren installiert, die Licht in einem Winkel von 60° abstrahlen. Die Bildakquisition wurde mit dem Programm Photo Acquisition Version 2.6.4 vorgenommen. Die Nachbearbeitung erfolgte mit dem Programm PhotovisionPlus. Die erhaltenen Aufnahmen wurden in dem Dateiformat „textimage“ gespeichert und mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

2.) NightOwl LC981 der Firma Berthold Technologies, Bad Wildbad:

Es handelt sich um ein achromatisches, digitales Kamerasystem. Bei der Beleuchtung der in dieser Arbeit untersuchten *in vitro* Präparate wurde eine Ringbeleuchtung mit einem faseroptischen Kaltlichtleiter an die Kaltlichtquelle angeschlossen. Dies führte zu einer homogeneren Ausleuchtung des Blickfeldes. Genauere Untersuchungen zur Signaldetektion wurden von J. Scholzen durchgeführt [138].

3.) IVIS 200, Caliper Lifescience, Hopkinton, USA. Dieses Kamerasystem wurde für alle in dieser Dissertation erstellten Tierversuche verwendet.

3.15.1.1 Auswertung der optischen Bildgebungsexperimente

Zur Analyse der mit den Photonen-Bildgebungs-Systemen NightOwl und Photon Imager™ akquirierten Aufnahmen wurden die innerhalb einer Messzeit detektierten Photonen verwendet. Die dargestellten Werte wurden in Photonen x Fläche dargestellt, wobei die verwendete Akquisitionszeit bei der Fluoreszenzbildgebung, wenn nicht anders vermerkt immer 30 s und bei der Biolumineszenzbildgebung, wenn nicht anders vermerkt immer 120 s betrug. Bei der Fluoreszenzbildgebung wurde, wenn nicht anders vermerkt eine Blendenöffnung von 2,8 verwendet. Diese Daten wurden innerhalb der hier vorgelegten Arbeit als Photonenflux [U.L.E.] definiert.

3.16 MRT

Die in dieser Arbeit vorgestellten MRT-Experimente wurden an zwei horizontalen MRT-Systemen der Firma Bruker BioSpin, Ettlingen durchgeführt. Die Systeme unterscheiden sich in der Feldstärke, der Gradientenstärke und der verwendeten Hochfrequenzspulen.

Für tierexperimentelle Studien wurde eine kontrolliert temperierbare Tierliege mit elektronischer Kontrolle der Atemfunktion verwendet (Medres, Köln). Die Dokumentation von Temperatur und Atemfrequenz wurde mit dem Programm DaisyLab durchgeführt.

3.16.1 MRT-Systeme

Bruker Biospec 117/16 USR ist ein aktiv abgeschirmter, supraleitender Magnet mit einem Innendurchmesser für Proben und Kleintiere von 155 mm. Die Feldstärke beträgt 11,7 Tesla und die Resonanzfrequenz 500 MHz. Der Innendurchmesser des Gradienten beträgt 90 mm mit einer Gradientenstärke von 750 mT m^{-1} . Das digitale Signalverarbeitungssystem arbeitet bei der ^1H -Resonanzfrequenz von 500 MHz und verwendet eine digitale Filterung, digitale Quadratur Demodulation und eine digitale Kontrolle zur Radiofrequenzstabilisierung. Die Empfangsbandbreite beträgt 5 Mhz.

Bruker BioSpec 70/30 USR ist ein aktiv abgeschirmter, supraleitender Magnet mit einem Innendurchmesser für Proben und Kleintiere von 399 mm. Die Feldstärke beträgt 7,0 Tesla und die Resonanzfrequenz 200 MHz. Der Innendurchmesser des Gradienten beträgt 116 mm mit einer Gradientenstärke von 200 mT m^{-1} . Das digitale Signalverarbeitungssystem arbeitet bei der ^1H -Resonanzfrequenz von 500 MHz und verwendet eine digitale Filterung, digitale Quadratur Demodulation und eine digitale Kontrolle zur Radiofrequenzstabilisierung. Die Empfangsbandbreite beträgt 5 Mhz.

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurde zur Hochfrequenzanregung eine lineare Helmholzspule mit einem Innendurchmesser von 80 mm verwendet. Der Hochfrequenzempfang wurde durch eine Oberflächenspule mit einem Durchmesser von 30 mm realisiert.

3.16.2 35 mm Phantomspule

Die Oberflächenspule wurde im MPI für neurologische Forschung hergestellt und besteht aus einer kombinierten Sende- und Empfangsspule, die einen Innendurchmesser von 35 mm aufweist.

Anhand eines Agarosephantoms, wie es für die in dieser Arbeit für die Probenanalyse verwendet wurde, wurde ein Signalintensitätsprofil der Oberflächenspule über eine Distanz von 280 mm erstellt (Abbildung 3–5 A und C). Die bestimmte Signalintensität wurde aufgrund von Minimum-Intensitäts-Projektionen aus einem 3D-Datensatz erstellt, in der 10 Schichten projiziert wurden (Abbildung 3–5 B und C).

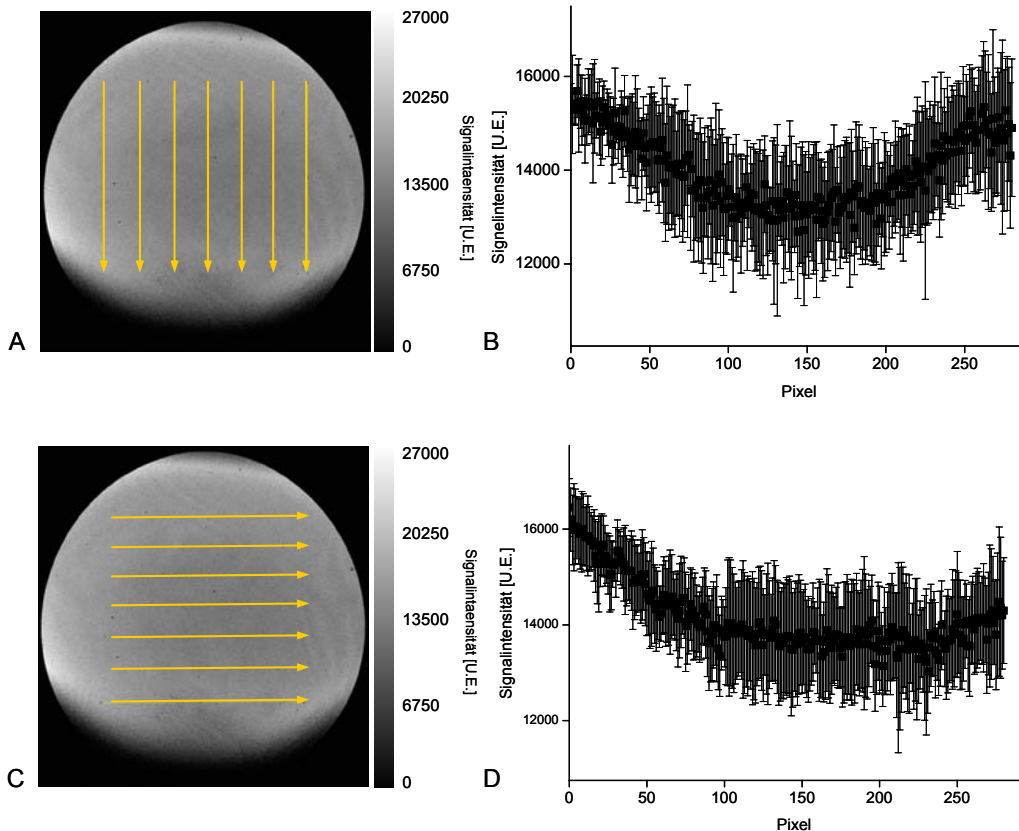


Abbildung 3–5: Ermittlung des Spulenprofils durch Berechnung der Signalintensität. Die Signalintensität in einem Agarosephantom mit den zwei Schichten 1,5 mL Agarose in der Konzentration 1 % in PBS auf den Boden aufgebracht wurden. 1 mL Agarose in der Konzentration 0,5 % wurde anschließend auf diese Schicht aufgebracht.

3.16.3 Auswertung der MRT-Daten.

- Für die Anfertigung der Minimum-Intensitäts-Projektionen (MIP) bei T2*-gewichteten Messungen wurde die erste Schicht, in der ein von der zu untersuchenden Probe detektierter Signalverlust beobachtet wurde, ausgewählt. Alle Schichten, zwischen dieser ersten Schicht und der letzten Schicht, in der noch ein Signalverlust detektierbar war, wurden für die Erstellung der MIP mittels des Programms ImageJ verwendet.

- Zur quantitativen Erfassung der mittels MRT erhobenen Daten, wurde die Signalintensität [U. E.] ermittelt. Dabei wurde eine Subtraktion von unspezifischen Hintergrundsignalen vorgenommen, wobei die auszuwertenden Flächen, oder die ausgewerteten Volumina identisch waren.
- Zur Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Kontrast : Gelrauschen} = \frac{SI_{\text{Probe}} - SI_{\text{Hintergrund}}}{\sigma_{\text{Hintergrund}}}$$

Wobei SI die Signalintensität darstellt und $\sigma_{\text{Hintergrund}}$ die Standardabweichung von $SI_{\text{Hintergrund}}$ ist.

Die Anwendung der Formel ist exemplarisch in Abbildung 3–6 bei der Analyse von, in Agarose eingeschlossenen Zellen dargestellt.

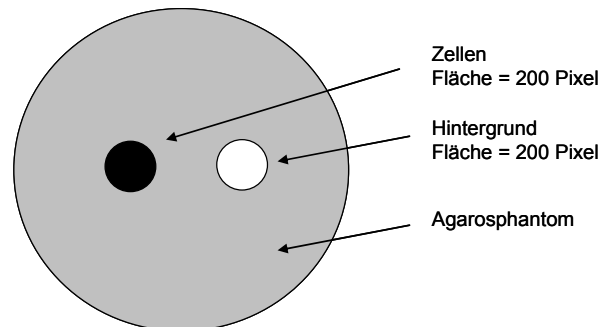


Abbildung 3–6: Schematische Darstellung zur Ermittlung des Verhältnisses Kontrast: Gelrauschen:

Die gesamte Fläche, in der ein Signalverlust sichtbar ist, wird als ROI gewählt und das Signal bestimmt. Die gleiche Fläche wurde vom zellfreien Hintergrund für die Ermittlung des Signals gewählt.

3.16.4 Verwendete Messsequenzen

Nach der Positionierung der Spule im Isozentrum des Magneten erfolgte ein manueller Abgleich der der Sende- und Empfangsspule. Der Shim und, die Stärke des Resonanzfrequenzpulses und des Empfangsverstärkung wurden nach einem Protokoll von Bruker Biospin (Rheinstetten) in einer ersten Messung eingestellt. Die geometrischen Charakteristika wurden anhand der ersten Messung für alle Folgemessungen festgelegt.

3.16.4.1 Messungen mit der 35 mm Spule: Gradienten-Echo-Sequenz

Wenn im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurden die folgenden Einstellungen für die T_2^* -gewichtete Sequenz bei Messungen mit dem Bruker Biospec 117/16 USR verwendet:

Einstellungen	Parameter
Echozeit TE	Im Text angegeben
Repetitionszeit TR	100 ms/200 ms
Mittelungen	1
Repetitionen	1
Matrix	512 x 512 x 64
FOV (<i>field of view</i>)	36 mm x 37,93 mm x 5 mm
Auflösung	70 μm x 74 μm x 78 μm
Bandweite	100 000 Hz
Flipwinkel	30°
Encoding: <i>zero fill acceleration</i>	2

Durch die Verwendung des *zero filling acceleration* verkürzt sich die Messzeit um 50 %. Es wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt.

3.16.4.2 Messungen mit der 35 mm Spule: Spin-Echo-Sequenz

Zur Berechnung der T_2 -Relaxationszeiten wurde eine T_2 -Mappe erstellt. Die benötigte Messzeit betrug 21 min und 22 s.

Es wurde die „*multi slice, multi echo*“-Sequenz (MSME) bei Messungen mit dem Bruker Biospec 117/16 USR mit den folgenden Parametern verwendet:

Einstellungen	Parameter
Echozeit TE	11 ms, 22 ms, 33 ms, 44 ms, 55 ms, 66 ms, 77 ms, 88 ms, 99 ms, 110 ms, 121 ms, 132 ms, 143 ms, 154 ms, 165 ms, 176 ms
Echos	16
Repetitionszeit TR	5000 ms
Mittelungen	1
Repetitionen	1
Matrix	256 x 256
FOV (<i>field of view</i>)	37 mm x 37,9 mm x 6 mm
Auflösung	72 μm x 74 μm x 94 μm
Bandweite	50000,0 Hz
Flipwinkel	90,0°/ 180°
Encoding: <i>zero fill</i>	2
<i>acceleration</i>	
DummyScans	2

3.16.4.3 7 mm Phantomspule

Die Oberflächenspule wurde im MPI für neurologische Forschung hergestellt und besteht aus einer kombinierten Sende- und Empfangsspule, die einen Innendurchmesser von 7 mm aufweist. Details und Spulenprofil: siehe Kapitel 3.6.1.2. Die Proben wurden in Reaktionsgefäßen mit einem Durchmesser von 5 mm und einem maximalen Volumen von 200 μL für die Messungen verwendet.

Wenn im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurden die folgenden Einstellungen für die T_2^* -gewichtete Sequenz bei Messungen mit dem Bruker Biospec 117/16 USR verwendet:

Einstellungen	Parameter
Echozeit TE	Im Text angegeben
Repetitionszeit TR	100 ms
Mittelungen	1
Repetitionen	1
Matrix	256 x 256 x 128
FOV (<i>field of view</i>)	4 mm x 4,85 mm x 4 mm
Auflösung	20 μm x 20 μm x 31 μm
Bandweite	50000 Hz
Flipwinkel	30°
Encoding: <i>zero fill acceleration</i>	Im Text angegeben

3.16.4.4 Tierexperimentelle Messungen mit dem Bruker BioSpec 70/30 USR

3.16.4.4.1 Gradienten-Echo-Sequenz

Für die T_2^* gewichtete Messsequenz wurden die folgenden Parameter verwendet:

Einstellungen	Parameter
Echozeit TE	20 ms
Repetitionszeit TR	180 ms
Mittelungen	1
Repetitionen	1
Matrix	256 x 128 x 64
FOV (<i>field of view</i>)	16 mm x 16 mm x 12 mm
Auflösung	62 μm x 125 μm x 188 μm
Schichtdicke	12 mm
Bandweite	69444 Hz
Flipwinkel	30°

Die benötigte Messzeit betrug 24 min, 34 s.

3.16.4.4.2 Spin-Echo-Sequenz

Für die T_1 gewichtete Messsequenz wurden die folgenden Parameter mit der „*multi slice, multi echo*“-Sequenz (MSME) verwendet: Die benötigte Messzeit betrug 27 min, 18 s.

Einstellungen	Parameter
Echozeit TE	10,1 ms oder 11,0 ms
Repetitionszeit TR	100,0 ms oder 150 ms
Mittelungen	2
Repetitionen	1
Matrix	128 x 128 x 64
FOV (<i>field of view</i>)	25,5 mm x 18 mm x 10 mm
Auflösung	199 μm x 141 μm x 156 μm
Schichtdicke	10 mm
Bandweite	50505 Hz
Flipwinkel	90,0/180°

3.16.4.4.3 Spin-Echo-Sequenz

Zur Berechnung der T_2 -Relaxationszeiten wurde eine T_2 -Mappe erstellt. Die benötigte Messzeit betrug 8 min, 32 s.

Es wurde die „*multi slice, multi echo*“-Sequenz (MSME) mit den folgenden Parametern verwendet:

Einstellungen	Parameter
Echozeit TE	9 ms, 18,1 ms, 27,1 ms, 36,1 ms, 45,1 ms, 54,2 ms, 63,2 ms, 72,2 ms, 81,3 ms, 90,3 ms, 99,3 ms, 108,4 ms, 117,4 ms, 126,4 ms, 135,4 ms, 144,5 ms
Echos	16
Repetitionszeit TR	4000 ms
Mittelungen	1
Repetitionen	1
Matrix	96 x 128
FOV (<i>field of view</i>)	16,9 mm x 16,8 mm
Auflösung	199 μm x 141 μm x 156 μm
Schichtdicke	0,501 mm
Bandweite	39062,0 Hz
Flipwinkel	90,0°/ 180°

3.17 Tierexperimentelle Studien

Die Tierhaltung erfolgte in einem kontrollierten 12 h Hell- und 12 h Dunkelrhythmus. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Nahrung und Flüssigkeit.

Es wurden Nacktmäuse des Stammes *nu/nu* (Haarlan Winkelmann, Borcheln) für die intrakraniellen und subkutanen Injektionen verwendet. Die intrakraniellen Injektionen von Zellen wurden in den Kortex oder das Striatum der Versuchstiere mittels einer stereotaktischen Halterung (World Precision Instruments, Sarasot, USA) vorgenommen, wobei die jeweiligen Koordinaten anhand eines stereotaktischen Atlas bestimmt wurden [139]. Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 80 mg kg^{-1} Ketanest und 16 mg kg^{-1} Romun anästhesiert. Die Injektion erfolgte mittels einer Hamilton Mikroliter-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Die Injektion der Zellen erfolgte in PBS mit einer elektronisch gesteuerten Mikropumpe (Type: Micron 4, World Precision Instruments) über einen Zeitraum von 20 min mit einer Flussrate von 100 nL min^{-1} .

Bei den Untersuchungen mittels Magnet-Resonanz-Tomographie und optischen Bildgebungsmethoden wurde eine Anästhesie mit Isofluran 0,5 %–1,5 % durchgeführt. Die Isofluran-konzentration wurde anhand der ermittelten Vitalfunktionen des Versuchstieres individuell angepasst.

Für die Durchführung von T_1 -gewichteten MRT-Messungen wurde in Einzelfällen eine peritoneale Injektion mit Magnevist (Schering, Berlin) durchgeführt. Dabei wurden $80 \mu\text{l}$ der gebrauchsfertigen Lösung verwendet.

Zur Visualisierung der Luziferaseaktivität wurden 2 mg D-Luciferin intraperitoneal injiziert. Die Bildgebungsexperimente wurden 10 min nach der Injektion durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Zelluläre Visualisierung mit optischen und MRT Bildgebungsmethoden

4.1.1 Entwicklung einer Untersuchungsplattform für die verbesserte Akquisition des Photonenflusses

Bei der Akquisition von emittierten Photonen aufgrund einer Fluoreszenzreporterexpression mittels eines Ganzkörper-Photonen-Bildgebungssystems stellen die Parameter Einstrahlung des Lichtes und der Abstand zum Kamerasystem kritische Faktoren dar.

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Illuminationsplattform entwickelt, welche die maximal von der Firma Biospace Lab erreichte Auflösung und Fluoreszenzeinstrahlung verbessert. Die Plattform weist eine Bodenfläche von $8,5 \times 8,5 \text{ cm}^2$ auf, in deren Zentrum die zu untersuchende Probe platziert wurde. Es wurden für alle multimodalen *in vitro* Visualisierungsexperimente Zellkulturschalen mit dem Durchmesser von 35 mm verwendet. Die Fluoreszenzeinstrahlung wurde von insgesamt 12 Lichtfaserleitern, wie vom Hersteller vorgegeben, auf vier Lichtfaserbündel konzentriert. Der Abstand zur Kameralinse wird durch die Plattform um 10 cm verringert (Anhang I und Abbildung 4–1).



Abbildung 4–1: Untersuchungsplattform für *in vitro* Experimente für den Einbau in das Biospace Lab-Photonen-Bildgebungssystem:

Die entwickelte Untersuchungsplattform verringert den Abstand zur Kameralinse des Photon-Photonenbildgebungssystems um 10 cm. Schematische Übersicht der drei Tischpositionen (A). Das eingestrahelte Fluoreszenzlicht wird auf vier Kaltlichtleiter verteilt, um die im Mittelpunkt der Einstrahlung platzierte Probe optimal zu illuminieren (B). Eine nähere Ansicht verdeutlicht die Position der vier Kaltlichtleiter (C). Maßstab: Lineal mit einer Skalierung von 1 mm.

Für die Funktionsüberprüfung und den Vergleich zur maximal vom Hersteller erreichbaren Detektion von Photonen wurde die Fluoreszenz- und Biolumineszenz-Bildgebung untersucht. Es wurde der maximal- und minimal erreichbare Abstand zur Kameralinse durch einen höhenverstellbaren Tisch verglichen und photographische Aufnahmen einer reflektierenden Oberfläche erstellt: Dadurch konnte eine qualitative Analyse des Lichtflusses jedes einzelnen Kaltlichtleiters erstellt werden.

Die Aufnahmen der Tischpositionen und der Illuminationsplattform sind quantitativ nicht vergleichbar, da für beide Untersuchungen aufgrund der kleineren Plattformfläche unterschiedlich reflektierende Materialien verwendet werden mussten. Bei der unteren Position des Tisches (maximaler Abstand zur Kamera) findet sich eine inhomogene Ausleuchtung des Untersuchungsbereichs durch die Kaltlichtleiter (Abbildung 4–2 A), bei denen die Differenz der Lichtabstrahlung zwischen der schwächsten- und der stärksten Abstrahlung um 76,87 % verringert war. Der Einsatz der Illuminationsplattform mit vier Lichtleitern führte zu einer homogenen Abstrahlung des Lichtes. Die Differenz zwischen dem höchsten- und niedrigsten Wert lag dort bei 16,37 %.

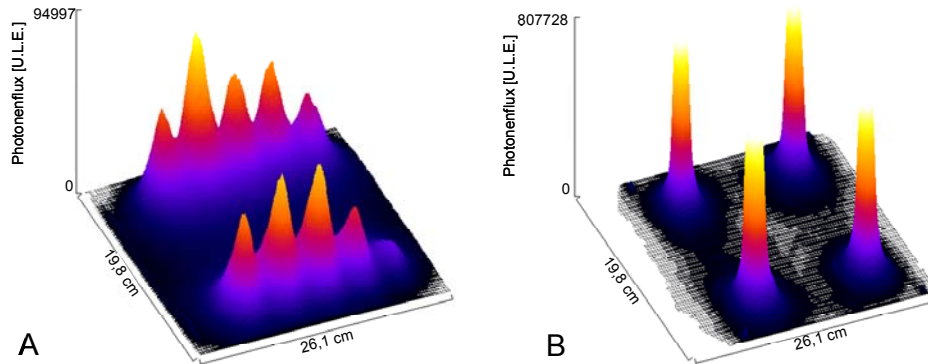


Abbildung 4–2: Untersuchung der homogenen Beleuchtung des Untersuchungsbereiches

Für die Analyse wurde die Tischposition des Photonen-Bildgebungssystems in der unteren Position (A), und nach Einbau der Illuminationsplattform (B) untersucht. Um die Charakteristika jedes einzelnen Kaltlichtleiters zu überprüfen, wurde die Reflektion von sichtbarem Licht auf der horizontalen, reflektierenden Oberfläche nach 4 s Beleuchtungszeit untersucht. Die Skalierung der Bilder richtet sich nach dem maximal ermittelten Photon flux der Aufnahme, bei denen die absoluten Werte durch die Verwendung unterschiedlicher Materialien nicht vergleichbar sind.

Durch die Verwendung einer schwarzen Unterlage aus Pappe wurde eine diffuse Verteilung des Lichtes in allen drei untersuchten Positionen über den Untersuchungsbereich erhalten (Abbildung 4–3). Der Vergleich der Auflösung in den drei Positionen führt zu den Werten 0,29 μm / Pixel auf der unteren Stufe (Abbildung 4–3 A1), 0,60 μm / Pixel auf der oberen Stufe (Abbildung 4–3 B1) und 1,1 μm / Pixel bei Verwendung der Illuminationsplattform (Abbildung 4–3 C1). Zur Verdeutlichung der Probenplatzierung wurde ein Pfeil mit einer Länge von 3,5 cm in Abbildung 4–3 eingezeichnet, der eindimensional die 35 mm Kulturschalen repräsentiert. Entlang dieses Pfeils wurde die Lichtintensität bestimmt, um einen Vergleich der Ausleuchtung in allen drei Positionen erzielen zu können. Deutlich wird, dass die Werte über die Distanz von 3,5 cm bei der oberen Tischposition im Vergleich zur unteren die höchste Schwankungsbreite aufweisen (Abbildung 4–3 A2 und B2). Bei Verwendung der Illuminationsplattform konnte eine erhöhte Illumination innerhalb des Blickfeldes festgestellt werden, und somit ein 3,5facher Anstieg der detektierten Photonen (Abbildung 4–3 C2).

Für die Fluoreszenzuntersuchung wurde eine Suspension von Mikropartikeln verwendet, die einen Durchmesser von 5 μm aufweisen und mit einem rot fluoreszierenden Fluorochrom konjugiert wurden (Abbildung 4–4).

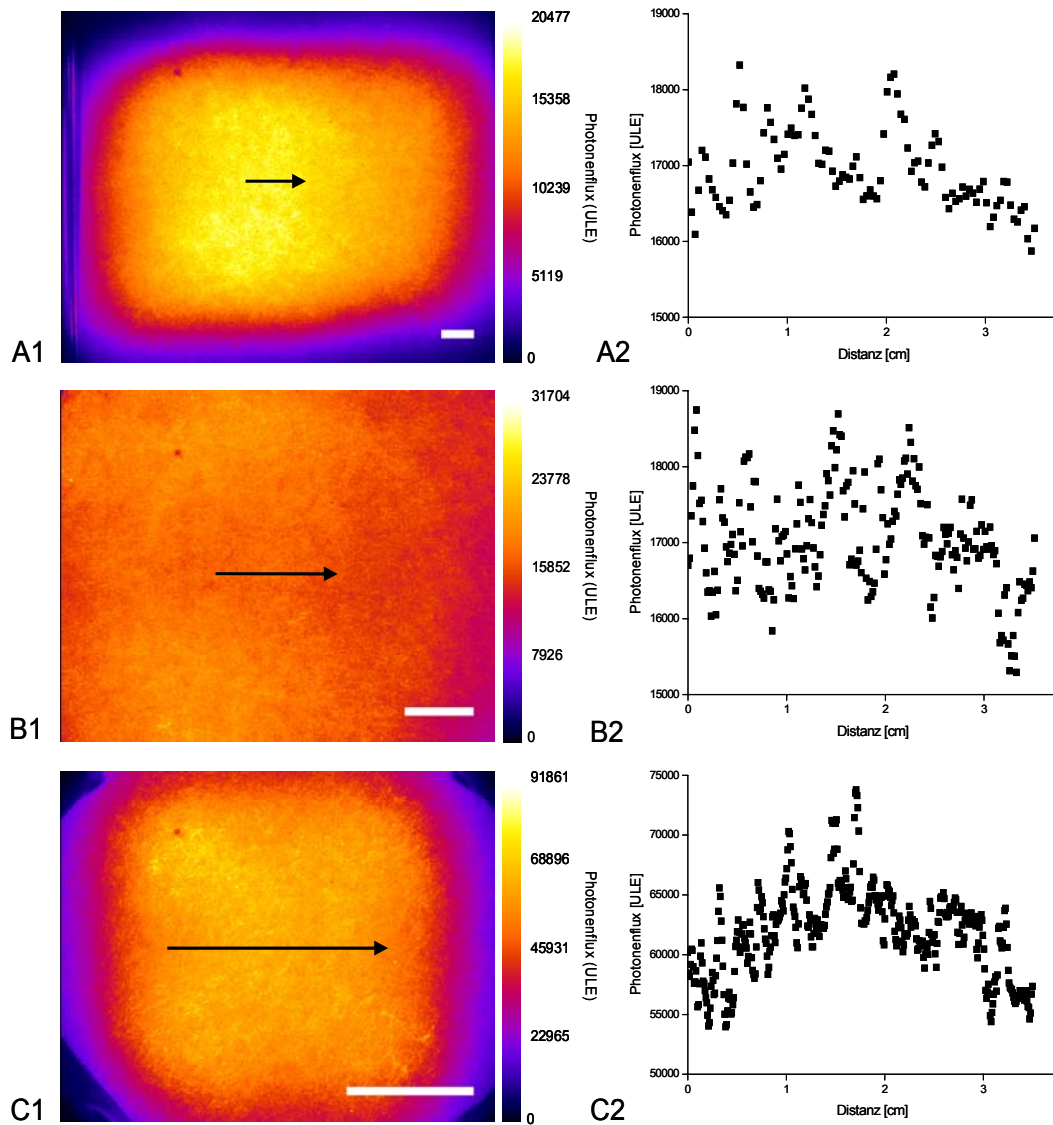


Abbildung 4–3: Quantitative Auswertung des Photonenflusses von Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich mittels des Photonen-Bildgebungssystem:

Verglichen wurden die Anzahl der detektierten Photonen in unabhängigen Lichteinheiten (U.L.E.) mit der unteren Tischposition (A), der oberen Position (B) und bei Verwendung der Illuminationsplattform (C). Aufgrund der vergleichenden quantitativen Analyse eines Bereiches, der eindimensional den Bereich anzeigt, in dem die Probenplatzierung stattfindet, konnte bei allen drei Positionen kein Unterschied in der homogenen Ausleuchtung festgestellt werden (A2, B2, C2). Die detektierten Werte bei Verwendung der Illuminationsplattform waren um den Faktor 3,5 höher. Maßstab in A1, B1, C1: 2 cm.

Es konnte bei einer Mikropartikelkonzentration von $> 16,8 \times 10^6$ Partikeln in einem Volumen von 20 μL PBS bei Verwendung der Illuminationsplattform eine Sättigung der detektierten Werte beobachtet werden. Eine vergleichende Analyse mehrerer Verdünnungsreihen mit Mikropartikelkonzentrationen zwischen $5,3 \times 10^5$ und $16,8 \times 10^6$ Partikeln in einem

identischen Gesamtvolumen bei den drei unterschiedlichen Probenpositionen zeigte deutlich, dass zwischen der unteren und oberen, vom Hersteller vorgegebenen Tischposition kein signifikanter Unterschied in der Anzahl detektierter Photonen beobachtet werden konnte (Abbildung 4–4). Aufgrund einer Regressionsanalyse wurde für die untere Tischposition $R^2 = 0,862$ und für die obere Position $R^2 = 0,884$ ermittelt.

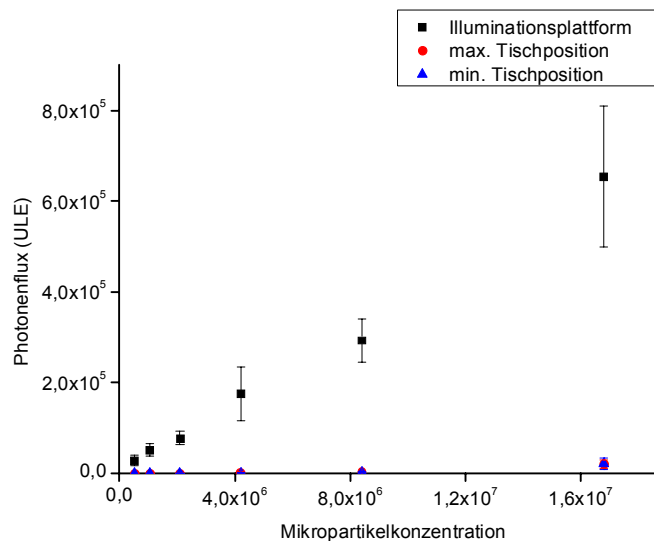


Abbildung 4–4: Vergleichende Untersuchung der Photonenemission einer Mikropartikellösung bei drei verschiedenen Positionen:

Verdünnungsreihen zwischen $5,3 \times 10^5$ und $16,8 \times 10^6$ Partikeln wurden in einem Volumen von $20 \mu\text{L}$ untersucht. Die Platzierung erfolgte in den Positionen, die in Abbildung 4–3, A1, B1 und C1 angegeben sind. Die Expositionszeit erfolgte für 1 s mit maximaler Fluoreszenzeinstrahlung. Als Anregungswellenlänge wurden 569 nm, für die Emissionswellenlänge wurde 585 nm verwendet. Anzahl der Stichproben betrug $n = 4$.

Bei beiden Positionen konnte keine Photonendetektion bei Partikelkonzentrationen zwischen $5,3 \times 10^5$ und $2,1 \times 10^6$ festgestellt werden. Bei Verwendung der Illuminationsplattform konnten Partikelkonzentrationen zwischen $5,3 \times 10^5$ und $16,8 \times 10^6$ eindeutig detektiert werden.

4.1.2 Validierung der Sensitivität anhand eines zellulären Systems

Um einen Vergleich mit einem zellulären System durchzuführen, wurden multizelluläre Aggregate der Zelllinie Gli36 Δ EGFR-CMV-mCherry-Klon17 (Kapitel 4.2.1) in einem Agarosephantom auf der oberen Tischposition und auf der Illuminationsplattform platziert. Die Zelllinie weist die Expression des Fluoreszenzreporters mCherry unter Kontrolle des CMV-Promotors auf. Die Photonemission wurde nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 585 nm detektiert (Abbildung 4–5). Wie bei den fluoreszierenden Mikropartikeln konnte eine Zunahme der Sensitivität und der Auflösung bei Verwendung der Illuminationsplattform festgestellt werden. Die höhere Auflösung führte zu einer präziseren Abgrenzung einzelner Aggregate (weiße Pfeile in Abbildung 4–5). Einzelne, kleine multizelluläre Aggregate konnten ohne Verwendung der Plattform nicht visualisiert werden (gelber Pfeil in Abbildung 4–5 D).

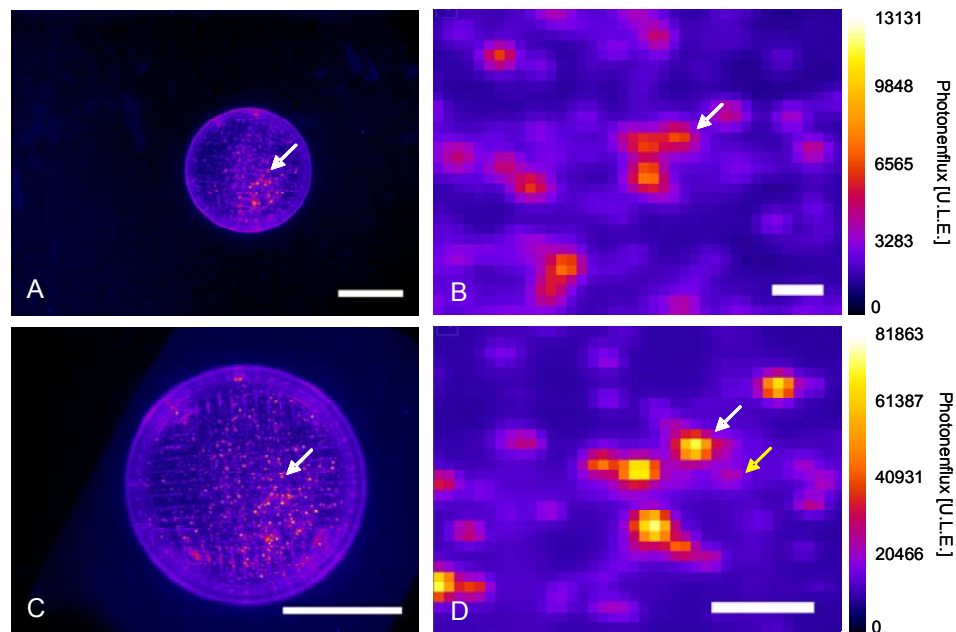


Abbildung 4–5: Vergleichende Untersuchungen zur Detektion emittierter Fluoreszenzstrahlung:

Gli36 Δ EGFR-CMV-mCherry-Klon17 wurden als multizelluläre Aggregate in einer Zellkulturschale in Agarose eingebettet kultiviert. Der Durchmesser der Schale beträgt 35 mm. Zur vergleichenden Untersuchung wurde die Probe auf der oberen Tischposition (A) und auf der Illuminationsplattform (C) platziert. Zur Verdeutlichung der höheren Sensitivität und Auflösung wurde ein Bereich (weißer Pfeil in allen vier Bildern) aus der Probe vergrößert dargestellt (B, D). Der gelbe Pfeil in D weist auf ein Aggregat, welches nur mittels Verwendung der Illuminationsplattform von den benachbarten Aggregaten zu diskriminieren ist Maßstab: A, C: 2 cm, B, D: 100 mm. Die Kalibrationsbalken definieren die maximal und minimal detektierten Photonen in unabhängigen Lichteinheiten (U.L.E.).

4.2 Kombination von Fluoreszenz- und MRT-Bildgebung im zellulären System: Erstellung einer fluoreszierenden Tumorzelllinie

4.2.1 Erstellung des Expressionsplasmids pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry und der Zelllinie Gli36 Δ EGFR-CMV-mCherry

Aus dem Vektor pRSET-B-mCherry wurde das mCherry Gen durch eine Inkubation mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) integriert (Abbildung 4–6).

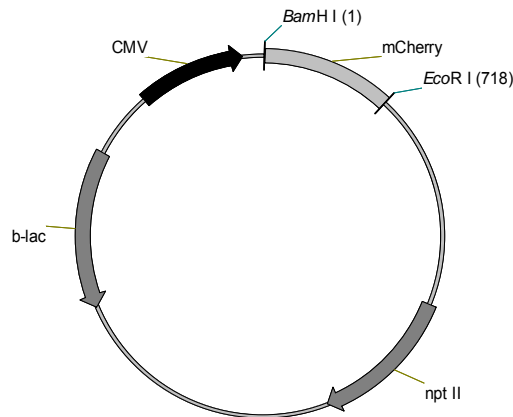


Abbildung 4–6: Vektorkarte von pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry:

Stromabwärts des CMV Promotors wurde das 718 bp lange Gen für mCherry eingefügt. Die Antibiotikaselektion wurde durch die β -Lactamase (b-lac) im prokaryotischen System ermöglicht. Nach der Transfektion in eukaryotische Zellen wurde eine Selektion aufgrund der Neomycin-Phosphotransferase II (npt II) mit G418 durchgeführt. Die endgültige Plasmidgröße beträgt 6122 bp.

Nach transients Transfektion in Gli36 Δ EGFR-Zellen und anschließender Selektion mit G418 wurden stabil exprimierende, G418 resistente Zellen erhalten, die durch Einzelzellklonierung in 96-Lochplatten vereinzelt wurden. Es konnten n = 56 verschiedene G418-resistente Zellklone isoliert werden, die sich in ihrer Expressionsstärke und teilweise auch in der Morphologie deutlich unterschieden. Bei 10,7 % der Klone konnte keine mCherry-Expression nachgewiesen werden.

Die Expression des mCherry-Proteins wurde von den drei Klonen #8, #17 und #26 im Photonen-Bildgebungs-System NightOwl überprüft, nachdem 5000 Zellen in einem Volumen von 5 μ L auf schwarzen Testfilm aufgebracht und für 1 s angeregt wurden. Als Vergleichspräparationen dienten PBS und die initiale, G418-resistente Zelllinie Gli36 Δ EGFR-13-t1, von der die Einzelzellklonierungen durchgeführt wurden.

Die transformierte Zelllinie Gli36 Δ EGFR-13-t1 wies einen 325 (\pm 62) % höheren Photonenfluss im Vergleich zur PBS-Kontrolle auf. Bei Klon #17 konnte eine Erhöhung des Photonenflusses von 997 (\pm 196) % im Vergleich zur PBS-Kontrolle detektiert werden (Abbildung 4–7).

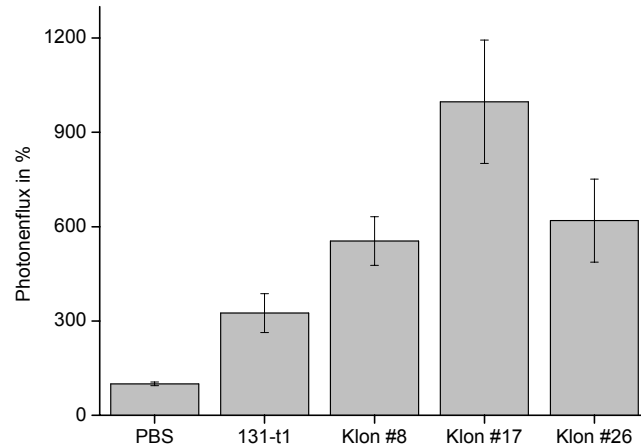


Abbildung 4–7: Determination der Photonenemission bei vier stabil mCherry⁺exprimierenden Gli36 Δ EGFR Zelllinien:

Der Photonenfluss der drei G418 resistenten Einzelzellklonen #8, #17 und #26 wurde im Vergleich zu der initialen, G418 resistenten Zelllinie Gli36 Δ EGFR-13-t1 und PBS als Kontrolle bestimmt. Die Werte wurden normalisiert auf die Photonenemission der PBS-Kontrolle. 100 % entsprechen somit 5,9 Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$. Anzahl unabhängiger Stichproben: $n = 3$. Verwendetes Visualisierungssystem: Berthold NightOwl.

4.2.2 3D-multizelluläre Aggregate für die optische- und MRT-Bildgebung

Gli36 Δ EGFR-mCherry exprimierende Zellen wurden in Suspension und als multizelluläre Aggregate kultiviert und mit optischen und MRT Methoden untersucht, um die minimal diskriminierbare Zellmenge und die Detektionscharakteristika zu ermitteln.

Es wurde eine Einzelzellsuspension in PBS auf der Illuminationsplattform ausgebracht und für einen Zeitraum von 30 s mit maximaler Fluoreszenzstrahlung angeregt. Als Kontrolle diente das gleiche Volumen an PBS ohne Zellen.

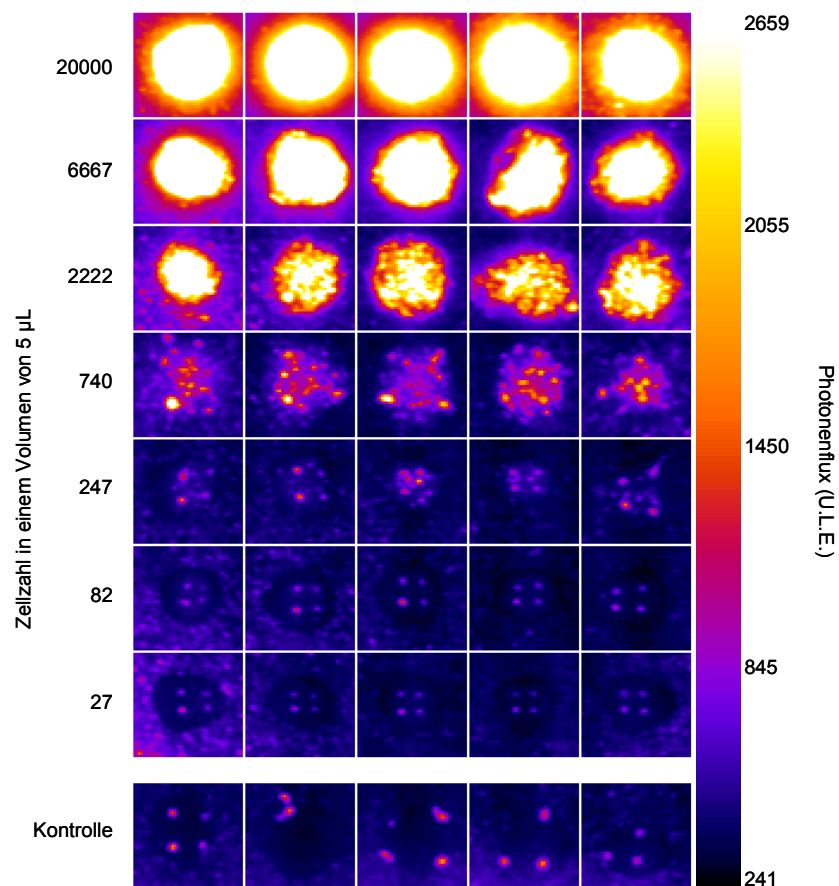


Abbildung 4–8: Ermittlung des Detektionslimits von Gli36 Δ EGFR-mCherry⁺-Einzelzellsuspensionen mit optischer Bildgebung:

Verdünnungen der Einzelzellsuspensionen wurden für einen Zeitraum von 30 s auf der Illuminationsplattform bestrahlt. In der Abbildung wurden pro Messung fünf Proben, die gleichmäßig auf der Plattform verteilt wurden, akquiriert und für die Quantifizierung verwendet. Als Kontrollbedingung wurde das identische Volumen PBS verwendet (unterste Reihe). Für die Analyse wurden die Pixelwerte an die kleinste Zellmenge angeglichen. Details: 30 s Exposition, Blende 2,8.

Zur graphischen Visualisierung wurden die Helligkeitswerte der Pixel an die Aufnahme der niedrigsten Zellzahl angeglichen. Bei Zellzahlen über 247 Zellen $5 \mu\text{L}^{-1}$ ist eine eindeutige Diskriminierung des emittierten Lichtes von den Kontrollpräparaten möglich (Abbildung 4–8).

Die quantitative Analyse bestätigt den visuellen Eindruck und zeigt darüber hinaus einen linearen Zusammenhang bei der Korrelation zwischen Zellzahl (z) und Photonenflux (P ; Abbildung 4–9 A). Die Regressionsfunktion wird durch

$$P(z) = 715,6z(\pm 9,5) - 119859,9(\pm 76250,7)$$

beschrieben. Der Korrelationskoeffizient beträgt $R^2 = 0,999$. Zur eindeutigen Visualisierung des Bereiches zwischen 27 und 247 Zellen wurde dieser Bereich gesondert dargestellt (Abbildung 4–9 B).

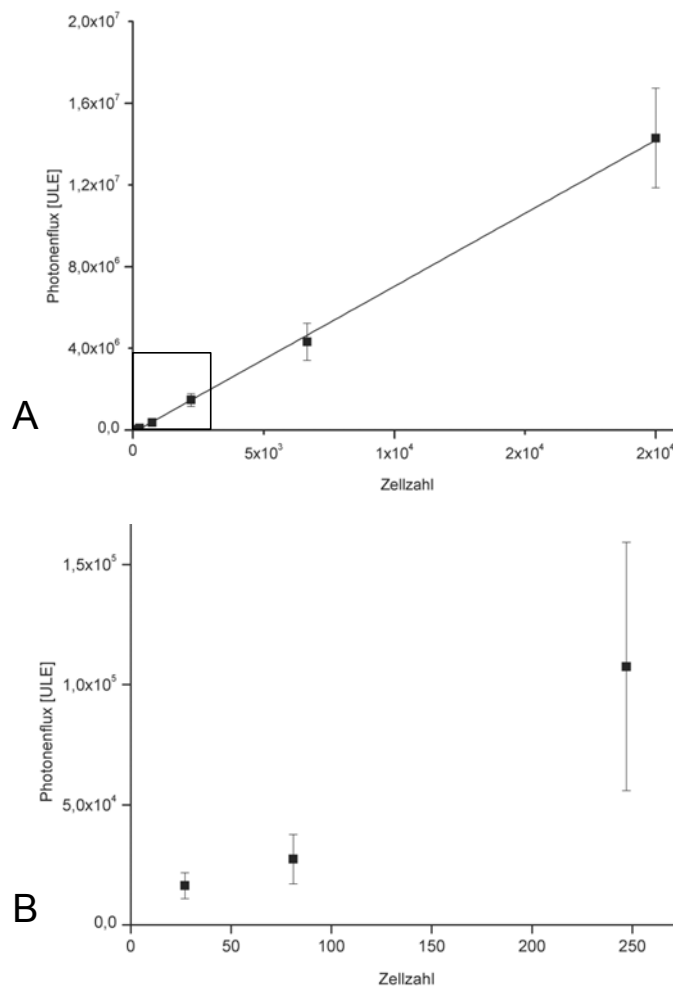


Abbildung 4–9: Quantitative Korrelation zwischen Photonenflux und Zellzahl im Suspensionsmodell:

Die unterschiedlichen Zellmengen aus Abbildung 4–8 wurden mit dem Photonenflux korreliert. Die ausgewertete Fläche des Tropfens wurde anhand der niedrigsten Zellzahl ausgewählt und bei allen Messpunkten verwendet. Die Regressionsberechnung ergab einen Wert für R^2 von 0,999. Zur exakten Fokussierung wurde der Bereich zwischen 27 und 247 Zellen gesondert dargestellt (Box in A und Graphik B). Für die Berechnung wurden fünf Einzelwerte aus drei unabhängigen Experimenten verwendet.

4.2.3 Visualisierung von Endorem-markierten Zellen mit dem MRT: Bestimmung der maximal detektierbaren Zellmenge

Zur Bestimmung des Detektionslimits im Suspensionsmodell mittels MRT wurden Zellmengen von 65 Zellen bis 2000 Zellen für einen Zeitraum von 24 h mit zwei Konzentrationen von Endorem inkubiert und auf eine Agaroseoberfläche in einem Volumen von 2 μL pipettiert. Die Analyse wurde bei 11,7 T mit einer Echozeit $TE = 18 \text{ ms}$ und Repetitionszeit $TR = 100 \text{ ms}$ durchgeführt. Die Zellkonzentrationen, die auf die Agaroseoberfläche aufgebracht wurden, wurden lichtmikroskopisch überprüft. Deutlich wird, dass Zellen, die mit der hohen Konzentration von $224 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem inkubiert wurden in Zellkonzentrationen von 250 bis 2000 Zellen im Phantom detektierbar waren (Abbildung 4–10 A). Nach Inkubation mit der geringeren Konzentration von $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem konnte ein Detektionslimit von 500 Zellen ermittelt werden. Die Quantifizierung verdeutlicht einen linearen Zusammenhang des Kontrast zu Gelrauschen-Verhältnisses zu den einzelnen Endoremkonzentrationen, während die Kontrollzellen kein zellzahlabhängiges Verhältnis aufweisen (Abbildung 4–10 B). Eine Regressionskorrelation wurde wegen des hohen Standardfehlers nicht durchgeführt.

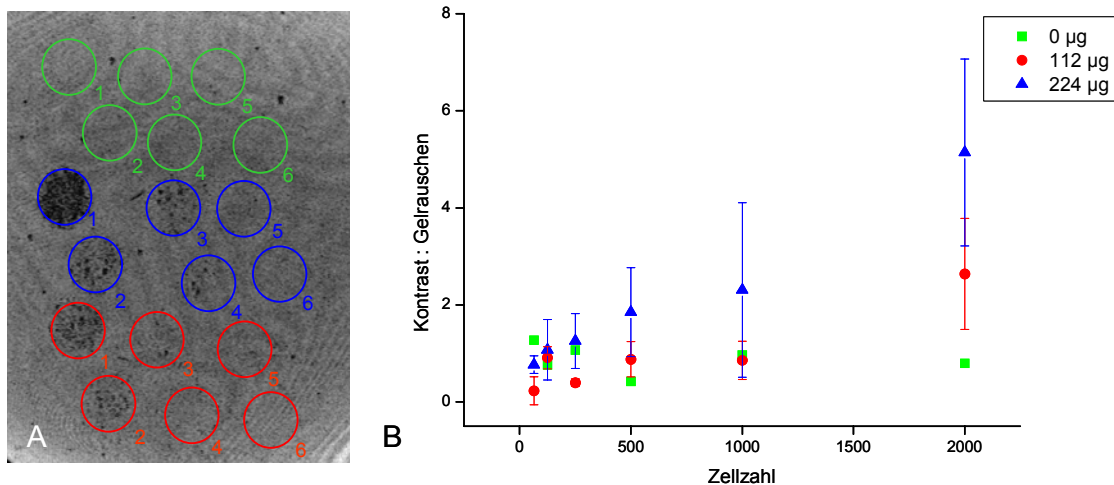


Abbildung 4–10: Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge im Suspensionsmodell mittels MRT:

Verschiedene Zellkonzentrationen zwischen 65 und 2000 Zellen wurden untersucht. Die Kreise um die Zellmengen, die in einem Volumen von 2 μL auf die Agaroseoberfläche aufgebracht wurden, symbolisieren die Lokalisation der Proben. Dabei repräsentiert grün: Präinkubation mit der Konzentration $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem, blau: Präinkubation mit $224 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem und rot: Präinkubation mit $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem. Die untersuchten Zellmengen sind: 1) 2000 Zellen, 2) 1000 Zellen, 3) 500 Zellen, 4) 250 Zellen, 5) 125 Zellen, 6) 65 Zellen (A). Die quantitative Auswertung des Kontrast : Gelrauschen-Verhältnisses der untersuchten Proben verdeutlicht Abbildung B. Die MRT- Messungen wurden mit einer Echozeit $TE = 18 \text{ ms}$, und einer Repetitionszeit $TR = 100 \text{ ms}$ durchgeführt. Die Anzahl der Stichproben beträgt $n = 3$.

Um eine Verbesserung des Kontrast zu Gelrauschen-Verhältnisses und damit eine eindeutigere Identifikation der Proben zu erzielen, wurde die Repetitionszeit von $TR = 100 \text{ ms}$ auf $TR = 200 \text{ ms}$ erhöht und die Echozeiten im Bereich von $TE = 5 \text{ ms}$ bis

TE = 25 ms variiert. Die Verdopplung der Repetitionszeit bei gleicher Matrixgröße führte zu einer Verdopplung der benötigten Messzeit von 27 min auf 54 min.

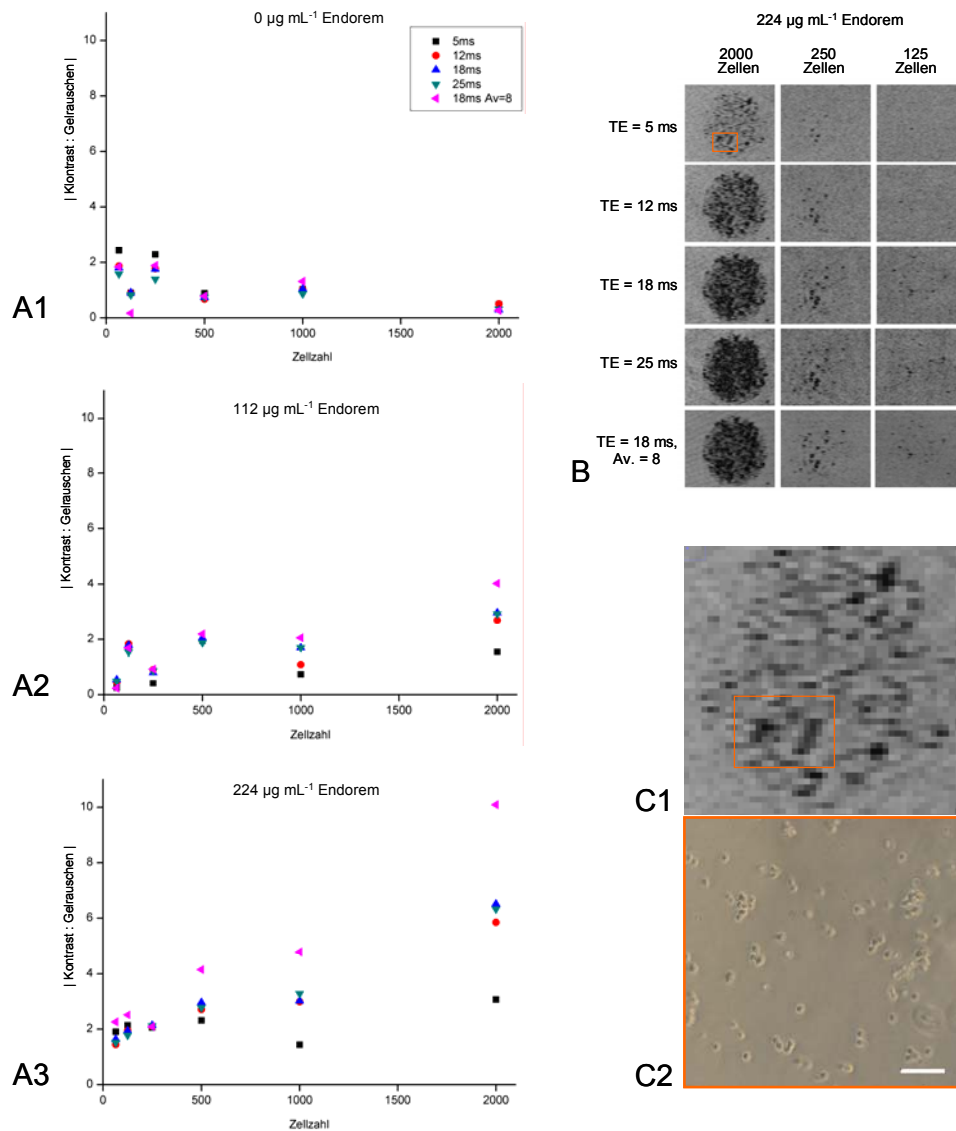


Abbildung 4–11: Quantitative Auswertung der Endorem- markierten Gli36 Δ EGFR-Zellen im Suspensionsmodell in Abhängigkeit von der Echozeit TE:

Zellen, die mit Endorem in den Konzentrationen 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A1), 112 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2) und 224 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A3) inkubiert wurden, wurden im MRT mit den Echozeiten TE = 5 ms, TE = 12 ms, TE = 18 ms und TE = 25 ms untersucht. Die Repetitionszeit wurde mit TR = 200 ms durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Messung mit TE = 18 ms, TR = 100 ms, Mittelungen = 8 durchgeführt. Das absolute Kontrast : Gelrauschenverhältnis wurde bestimmt (A1- A3). Visueller Vergleich der Detektionslimits der Zellkonzentrationen 2000 Zellen, 250 Zellen und 125 Zellen, welche mit 224 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem inkubiert wurden (B). Der Ausschnitt im Bild TE = 5 ms wurde ergänzend vergrößert und mit einer mikroskopischen Phasenkontrastaufnahme der in Agarose eingeschlossenen Zellen korreliert (C1 und C2). Maßstabsbalken in C2: 100 μm . Die Anzahl der Stichproben war n = 1.

Durch die Berechnung des Verhältnis Kontrast : Gelrauschen wurde deutlich, dass keine signifikante Korrelation bei den Kontrollzellen in Abhängigkeit zu den verschiedenen

Echozeiten existiert. (Abbildung 4–11 A1). Eine Vorinkubation mit Endorem in der Konzentration $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ führt zu einer signifikanten Signalauslöschung bei den Zellmengen oberhalb von 250 Zellen (Abbildung 4–11 A2). Bei den niedrigen Zellmengen ist eine Detektion nur noch bei Zellen, die mit einer Endoremkonzentration von $224 \mu\text{g mL}^{-1}$ inkubiert wurden möglich (Abbildung 4–11 A3). Zur zusätzlichen Verdeutlichung wurden die Proben mit der Zellmenge 125 Zellen, 250 Zellen und 2000 Zellen in Abhängigkeit von der Echozeit TE dargestellt (Abbildung 4–11 B). Dabei zeigt sich, dass eine Detektion von geringen Zellmengen nicht eindeutig durchgeführt werden konnte. Eine Korrelation mit einer mikroskopischen Phasenkontrastaufnahme (Abbildung 4–11 C1 und C2) der Zellen wurde erstellt, wobei Bereiche stärkerer Signalauslösungen mit zellulären Ansammlungen übereinstimmen.

Tabelle 4–1: Bestimmung des Regressionskoeffizienten R-Quadrat:

In Abhängigkeit von der Echozeit TE wurde eine Regressionsanalyse der in Abbildung 4–11 A dargestellten Daten durchgeführt. Av.= Mittelungen.

Echozeit	$0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$112 \mu\text{g mL}^{-1}$	$224 \mu\text{g mL}^{-1}$
TE = 5 ms	$R^2 = 0.4310$	$R^2 = 0.0891$	$R^2 = 0.3448$
TE = 12 ms	$R^2 = 0.4280$	$R^2 = 0.4726$	$R^2 = 0.9618$
TE = 18 ms	$R^2 = 0.5548$	$R^2 = 0.6672$	$R^2 = 0.9449$
TE = 25 ms	$R^2 = 0.6243$	$R^2 = 0.7726$	$R^2 = 0.9792$
TE = 18 ms,	$R^2 = 0.1986$	$R^2 = 0.8261$	$R^2 = 0.9621$
Av. 8			

Zur Qualitätssicherung der erhobenen Daten wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt (Tabelle 4–1). Dabei zeigt sich, dass der Regressionskoeffizient von den Kontrollen mit Werten zwischen 0,199 und 0,624 nicht für eine Regression ausreicht. Zellen, die mit der hohen Endoremkonzentration inkubiert wurden, lassen sich mit einer Echozeit von TE = 5 ms sehr gut darstellen, das Detektionslimit betrug in diesem Fall 500 Zellen. Es konnte eine von den gewählten Echozeiten abhängige Entwicklung des Verhältnisses Kontrast zu Gelrauschen bei beiden Endoremkonzentrationen nachgewiesen werden.

4.2.4 Quantifizierung des aufgenommenen Eisengehaltes mittels spektral-photometrischen Methoden

Nach einer Inkubationszeit von 20 h, wie für die hier beschriebenen Versuche verwendet, konnte kein Unterschied in der proliferativen Aktivität der Gli36 Δ EGFR-mCherry-Klon 17-Zellen in Gegenwart der beiden Kontrastmittelkonzentrationen und zwischen den beiden Kulturformen Suspensionskultur und adhärenente Einzelzellkultur nachgewiesen werden. Nach der Inkubationszeit konnten nach dem enzymatischen Ablösen der Zellen von der Oberfläche nur ca. 50 % der ausplattierten Zellen durch Zellzählungen ermittelt werden. Für die Ermittlung der Eisenkonzentration wurden 4×10^5 Zellen für beide Kulturformen initial kultiviert (Abbildung 4–12).

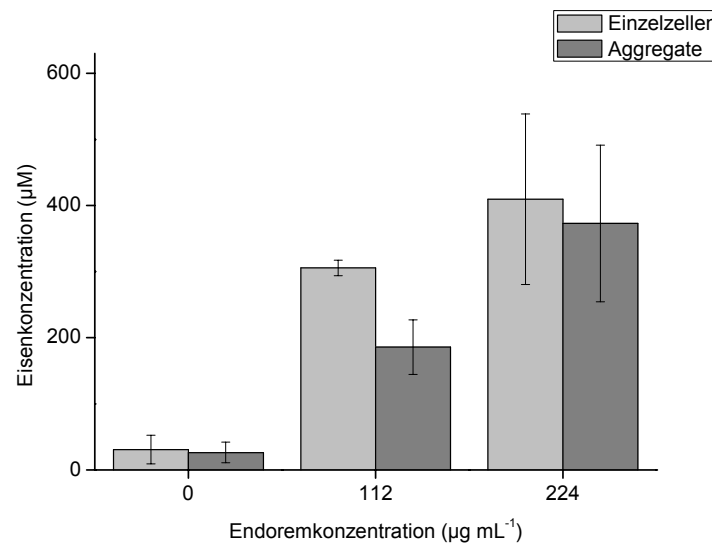


Abbildung 4–12: Spektralphotometrische Quantifizierung der intrazellulären Eisenkonzentration:

Bei den beiden Varianten Aggregationskultur und adhärenente Kulturform wurde nach einer Inkubationszeit von 20 h mit den beiden Endoremkonzentrationen ein spektralphotometrischer Eisentest durchgeführt. In die Berechnung wurden $n = 3$ Stichproben aufgenommen.

Die aufgenommene Eisenkonzentration bei beiden Gruppen unterschied sich signifikant von der Kontrollinkubation. Es konnte bei Einzelzellen, die mit Endorem in der Konzentration von $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ inkubiert wurden $305,7 (\pm 11,8) \mu\text{M}$ Eisen ermittelt werden, bei der Aggregatinkubation $185,7 (\pm 41,3) \mu\text{M}$ Eisen. Für die höhere Konzentration von Endorem konnte eine Eisenkonzentration von $406,6 (\pm 128,9) \mu\text{M}$ für Einzelzellen und eine Konzentration von $372,9 (\pm 118,5) \mu\text{M}$ für Aggregate ermittelt werden.

4.2.5 Kultivierung und Visualisierung der multizellulären Aggregate (Spheroide) im Aggregatmodell

4.2.5.1 Kultur der Zellen im Suspensionsmodell und Inkubation mit Endorem

Einzelzellen wurden für einen Zeitraum von etwa 20 h auf nicht-adhäsiven Kulturschalen kultiviert, was zu einer spontanen Anlagerung der Zellen zu multizellulären Aggregaten führte. Diese Aggregate weisen innerhalb der ersten 24 h Kulturzeit eine lockere Aneinanderlagerung auf, die sich mit zunehmender Kulturzeit verdichtet. Zur Untersuchung wurden Aggregate nach einer dreitägigen Kultivierungszeit in Paraffin eingebettet und Schnittpräparate mittels eines Mikrotoms angefertigt. Eine kombinierte Hämatoxylin- und Eosinfärbung zur Visualisierung des Zellkerns und Zytoplasmas zeigt deutlich, dass die Zellen nach diesem Kultivierungszeitraum nahezu homogen in den Aggregaten verteilt sind (Abbildung 4–13).

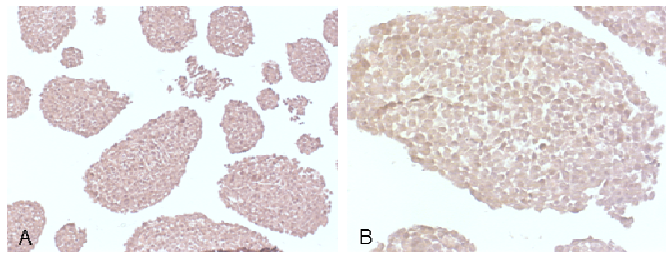


Abbildung 4–13: Lokalisation und Verteilung der Einzelzellen im multizellulären Aggregat:

Nach einer dreitägigen Kultivierungszeit als frei flottierende Aggregate wurde die Anordnung der Zellen im multizellulären Aggregat nach Hämatoxylin- und Eosin-Färbung untersucht. Es findet sich eine nahezu homogene Verteilung der Zellen in hoher Dichte.

Von Beginn der Aggregationsperiode an wurden die Zellen in Gegenwart von Endorem mit den Konzentrationen $112 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ und $224 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ kultiviert. Bei der Kontrollgruppe erfolgte keine Zugabe von Endorem. Es konnten während 20 h Kultivierung keine signifikanten Unterschiede in der Aggregatbildung zwischen den Gruppen beobachtet werden. Um die Effizienz der Endoremaufnahme und die zelluläre Verteilung zu untersuchen, wurden Einzelzellen nach der Inkubationsperiode und die Aggregate nach Plattierung auf einer adhärennten Oberfläche histochemisch untersucht. Dabei wurde die Berliner-Blau-Färbung verwendet, die sich durch die spätere Addition von Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid noch weiter verstärken lässt.

Nach Anfärbung mit Berliner-Blau bei der hohen Endoremkonzentration konnte eine Aufnahme der Partikel in den Zellen beobachtet werden (roter Pfeil in Abbildung 4–14). Nicht alle der untersuchten Zellen nahmen gleichmäßig viele Endorempartikel auf. Es konnten Zellen identifiziert werden, die keine zytoplasmatisch lokalisierten Partikel aufweisen (schwarzer Pfeil in Abbildung 4–14), oder Zellen, die viele Endorempartikel aufgenommen

haben (roter Pfeil in Abbildung 4–14). Diese inhomogene Aufnahme der superparamagnetischen Partikel wird bei Inkubation mit der geringeren Endoremkonzentration noch deutlicher (Abbildung 4–14 A2). Durch die Verstärkung der Berliner-Blau-Färbung mit DAB konnte ein sensitiverer Nachweis der Endorempartikel im Vergleich mit der nativen Berliner-Blau-Färbung erzielt werden (Abbildung 4–14 B1-B3). Eine distinkte Lokalisation innerhalb der Zellen ist allerdings nach der Addition des DAB nicht mehr eindeutig möglich. In den unbehandelten Kontrollgruppen konnte kein Nachweis von eisenhaltigen Partikeln mit beiden verwendeten Techniken erbracht werden (Abbildung 4–14 A3 und B3).

Nach der Adhäsion der multizellulären Aggregate konnte eine Migration der peripher im Aggregat lokalisierten Zellen auf der Oberfläche beobachtet werden. Bei der Begutachtung der DAB-verstärkten Berliner-Blau-Färbung fallen größere Akkumulationen von Endorempartikeln auf, die wahrscheinlich extrazellulär lokalisiert sind (Pfeil in Abbildung 4–14 C1). Die reduzierte Anzahl von superparamagnetischen Partikeln bei der niedrigen Endoremkonzentration ist im Vergleich zur Einzelzellkultivierung weniger ausgeprägt.

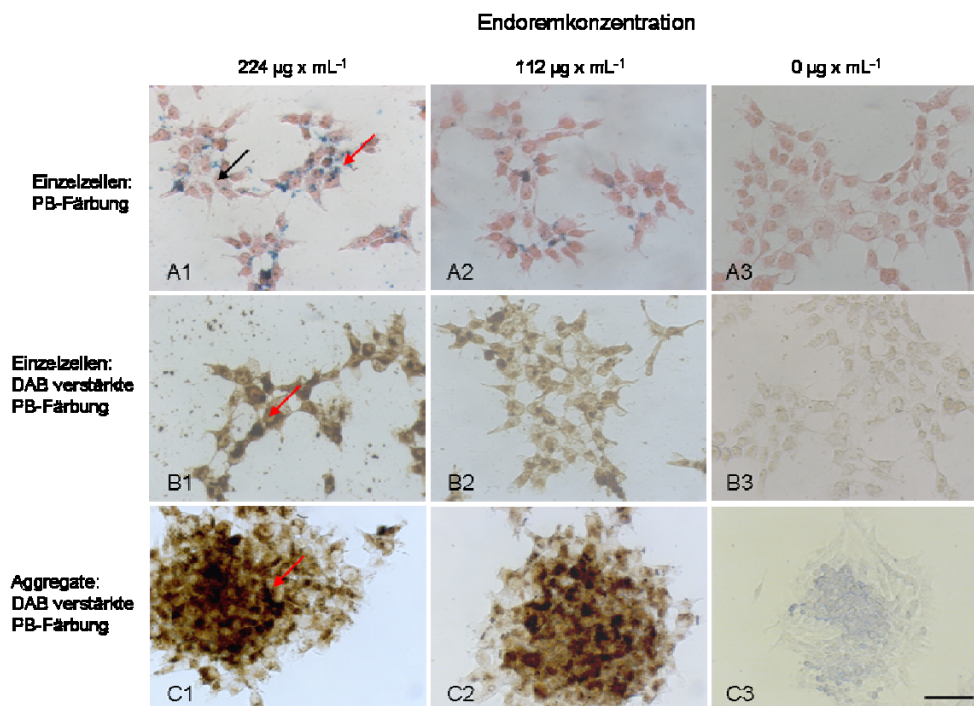


Abbildung 4–14: Histologische Färbung der mit Endorem inkubierten Gli36 Δ EGFR-mCherry Zellen:

Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurden die mit verschiedenen Konzentrationen des Kontrastmittels Endorem inkubierten Einzelzellen mittels Berliner-Blau-Färbung (A1-A3) untersucht. Intrazellulär lokalisierte Partikel sind in vielen Zellen vorhanden (roter Pfeil in A1). Allerdings findet keine Aufnahme der Partikel in allen Zellen statt (schwarzer Pfeil in A1). Durch die Verstärkung der Berliner-Blau-Färbung mit DAB findet sich eine stärkere Anfärbung der mit Endorem inkubierten Zellen (B1-B3). Die nicht mit Endorem inkubierten Kontrollzellen wiesen bei beiden Kulturformen keine Färbung auf (B3, C3). Multizelluläre Aggregate wurden nach der Inkubationszeit auf eine adhärenente Oberfläche plattiert. Die Berliner-Blau-Färbung und die mit DAB verstärkte Färbung weisen auf das Vorhandensein von Eisen hin (C1-C2). Unbehandelte Kontrollaggregate weisen ebenfalls keine DAB verstärkte Berliner-Blau-Färbung auf (C3). Eine Gegenfärbung mit Eosin wurde in A1-A3 durchgeführt. Maßstab: 50 μm .

4.2.5.2 Immunzytochemische Lokalisation und Verteilung von Endorempartikeln

Zur detaillierten Analyse der Endoremverteilung innerhalb der Zellen wurden die vorinkubierten Einzelzellen und Aggregate immunzytochemisch untersucht. Verwendet wurde ein anti-Dextran-Antikörper, welcher die Oberflächenstruktur der superparamagnetischen Partikel erkennt. Deutlich erkennbar ist eine Agglutination der Endorempartikel intrazellulär und partiell auch extrazellulär (Abbildung 4–15 A). Bei hoher Vergrößerung der in die Peripherie migrierten Zellen wurde die perinukleäre Verteilung der Partikel deutlich. Die Visualisierung der Partikel mittels anti-Dextran-Antikörper und konfokaler Laserscanning Mikroskopie verdeutlicht den bereits mit der Berliner-Blau-Färbung beobachteten Effekt der inhomogenen Aufnahme und intrazellulären Verteilung der Partikel (Abbildung 4–15 C).

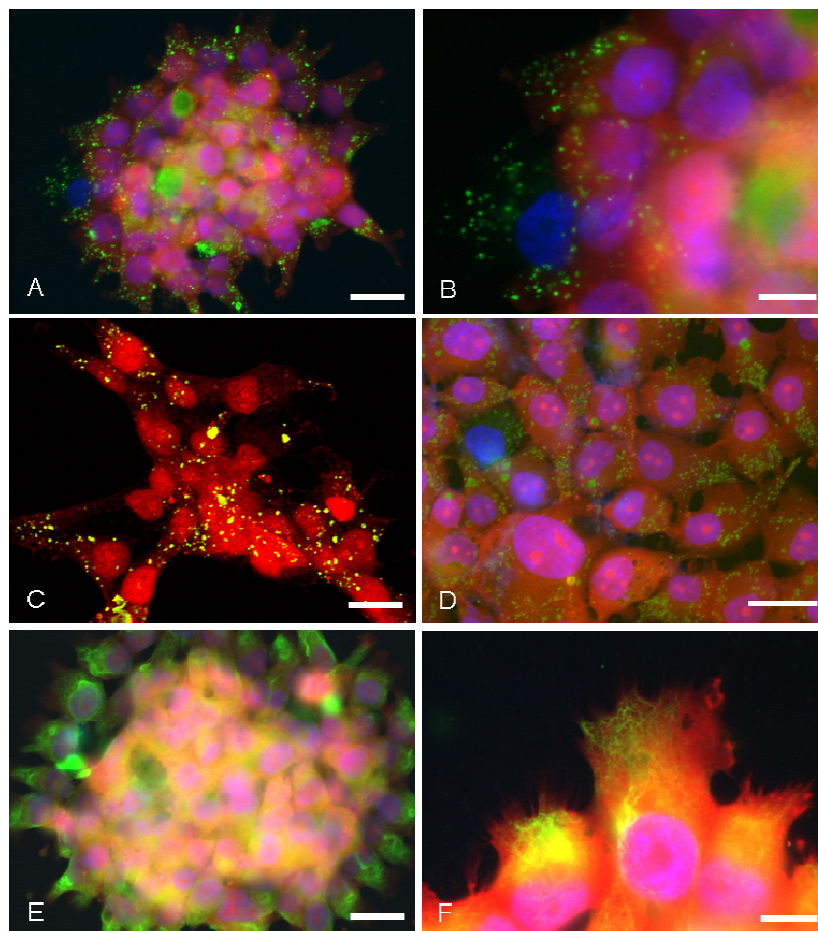


Abbildung 4–15: Immunzytochemische Analyse der Lokalisation und Verteilung der Endorempartikel nach 20 h Inkubation:

Für die Detektion der Endorempartikel wurde ein anti-Dextran-Antikörper (grün) verwendet (A). Bei höherer Vergrößerung ist die perinukleäre Verteilung der Partikel deutlich erkennbar sowie die nukleäre Lokalisation des mCherry-Proteins (B). Konfokale Laserscanning Mikroskopie (C) ermöglicht eine detaillierte Beurteilung der Endoremverteilung im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie. Die inhomogene Aufnahme der Partikel ist nicht auf die Aggregationskultur beschränkt, sondern konnte auch nach Endoreminkubation in der Monolayerkultivierung detektiert werden (D). Um die Integrität der Intermediärfilamente nach der spontanen Aufnahme der Partikel zu beurteilen, wurde eine anti-Vimentinfärbung (grün) durchgeführt (E und F). Rot: mCherry. Visualisierung der Zellkerne mit Hoechst Dye 33342 (blau). Maßstab: A, C, D, E: 25 µm; B, F: 10 µm.

Diese Beobachtung konnte auch nach der Inkubation von Zellen, die in der Monolayerkultur inkubiert wurden, gemacht werden (Abbildung 4–15 D).

Zur Visualisierung der Intermediärfilamente wurde eine immunzytochemische Färbung mit einem anti-Vimentin-Antikörper durchgeführt (Abbildung 4–15 E und F).

Der Photonenfluss von definierten Zellmengen mit Endorem inkubierter Zellen wurde in einem Plattenlesegerät bestimmt, um einen Einfluss des Kontrastmittels auf die Menge der emittierten Photonen nach Fluoreszenzanregung auszuschließen. Nach 24 h Inkubation der Einzelzellen mit den Konzentrationen von $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $224 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem konnte kein signifikanter Einfluss auf die emittierte Photonenmenge im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 4–16).

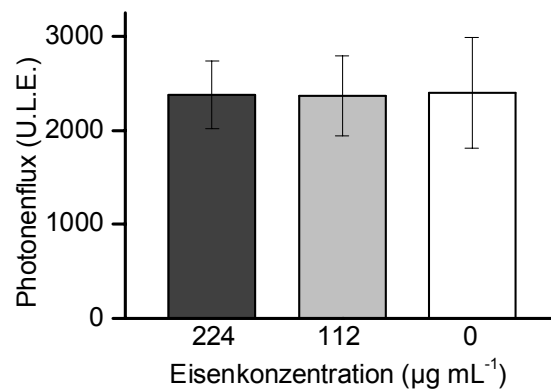


Abbildung 4–16: Ermittlung des Einflusses der intrazellulären Endorempartikel auf die Photonemission und Detektion:

Definierte Zellmengen wurden mit den $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $224 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem inkubiert und in einem Plattenlesegerät untersucht. Es konnte kein negativer Einfluss auf die Detektion der emittierten Photonen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden. Anzahl der unabhängigen Stichproben: $n = 3$.

4.2.5.3 Koregistrierung von Fluoreszenz- und MRT-Bildgebung

Nach 20 h Inkubation mit den beiden Kontrastmittelkonzentrationen wurden die Zellen in einer 0,5 % Agarosematrix innerhalb einer Zellkulturschale eingebettet. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung unter Sicherstellung optimaler optischer Eigenschaften zu gewährleisten, wurde die Agarose in 10 % FCS/DMEM gelöst und verwendet. Es wurde dabei auf die Verwendung von Phenolrot als pH-Indikator verzichtet.

Durch die kurzzeitige Kultivierung in dieser Agarosematrix verändert sich die Lokalisation der Aggregate nicht mehr und bietet die Möglichkeit kombinierte Photonenflux- und MRT-Akquisitionen durchzuführen.

Unter Verwendung der Illuminationsplattform wurde eine Expositionszeit von 30 s als optimale Anregungszeit festgelegt. Nach einer vergleichenden Analyse verschiedener Blendenöffnungen wurde eine Blendenöffnung von 2,8 gewählt. Die Bestimmung des Photonenfluxes nach Fixierung der Zellen im Agarosephantom führt zu mehr als 50 % Verringerung der detektierbaren Photonen bei gleicher Anregungszeit und Anregungsenergie im Vergleich zu vitalen Zellen. Es wurden daher alle Fluoreszenzaufnahmen vor Fixierung der Zellen durchgeführt, während die MRT-Messung von der Fixierung nicht beeinflusst wurde. Die MRT-Untersuchungen wurden vergleichend mit den Echozeiten $TE = 5$ ms und $TE = 18$ ms durchgeführt. Die Ergebnisse einer Untersuchung, in der die optische Bildgebung mit der MRT-Bildgebung kombiniert wurde, sind in Abbildung 4–17 dargestellt. Eine Minimum-Intensitäts-Projektion der MRT-Aufnahmen wurde von den akquirierten Schichten für die Analyse verwendet.

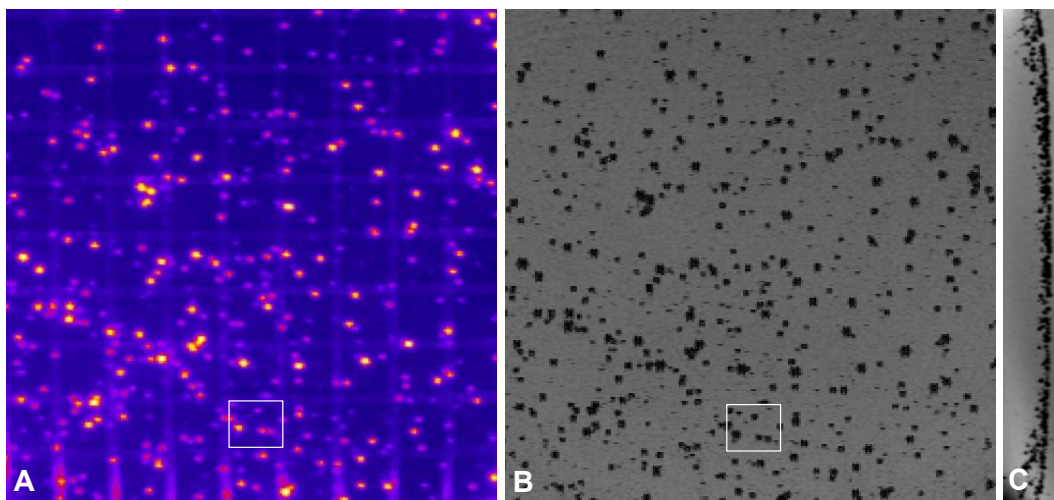


Abbildung 4–17: Koregistrierung des detektierten Photonenfluxes und der MRT-Aufnahmen: Multizelluläre mCherry⁺-Aggregate wurden in einer Agarosematrix in Gegenwart von Endorem kultiviert. Nach Anregung wurde der Photonenflux detektiert (A) und kann mit einer Minimum-Intensitäts-Projektion der MRT-Aufnahmen (B) koregistriert werden (Box in A und B). Für die MRT Akquisition wurde eine 3D-Sequenz mit der Echozeit $TE = 5$ ms erstellt. Eine transversale Projektion verdeutlicht die unterschiedliche Lage der multizellulären Aggregate (C). Die Rasterdimensionen in A betragen 2 mm x 2 mm.

Die Position einzelner multizellulärer Aggregate konnte mit beiden Techniken eindeutig bestimmt werden (Box in Abbildung 4–17 A und B). Bei den mikroskopischen Analysen konnte die Lokalisation und Dokumentation der Aggregate anhand des in der Zellkulturschale vorhandenen Rasters eindeutig bestimmt werden. Aufgrund der verwendeten 3D-Sequenz bei den MRT-Aufnahmen konnte die Position aller Aggregate in der Transversalebene lokalisiert werden (Abbildung 4–17 C).

Die MRT-Bilder weisen eine bessere Auflösung im Vergleich mit dem 2-dimensionalen optischen Bild auf, was mit höherer Vergrößerung unter Einbeziehung mikroskopisch angefertigter Phasenkontrastaufnahmen analysiert wurde (Abbildung 4–18).

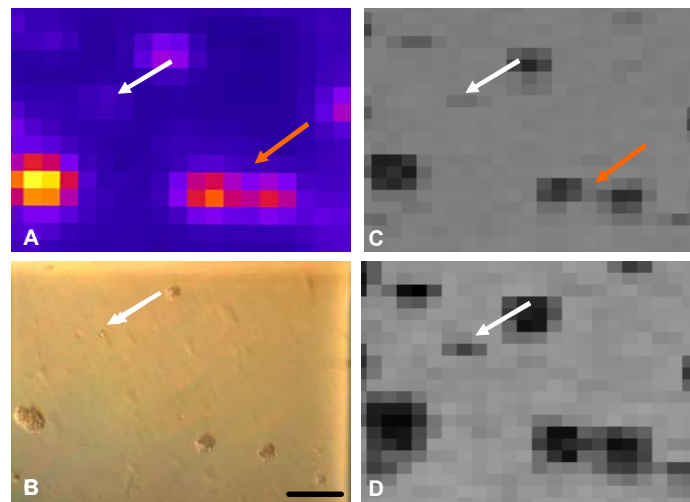


Abbildung 4–18: Detaillierter Vergleich von Fluoreszenzbildgebung, MRT-Signal und mikroskopischer Phasenkontrastaufnahme:

Multizelluläre Aggregate, die 3-dimensional in einer Fläche von 2 mm² angeordnet waren, wurden detailliert untersucht. Dabei wurde die mCherry Fluoreszenz (A) und mikroskopische Aufnahmen (B) mit MRT-Bildern, die mit TE = 5 ms (C) und TE = 18 ms (D) aufgenommen wurden, verglichen. Maßstab in B: 240 µm.

Es konnte eine präzise Übereinstimmung aller drei Bildgebungsmodalitäten nachgewiesen werden. Besonders deutlich ist die verringerte Auflösung bei der Fluoreszenzbildgebung im Vergleich mit den MRT-Aufnahmen in Abbildung 4–18 A und B. (orangene Pfeile). Die beiden Aggregate können klar bei der Echozeit TE = 5 ms voneinander abgegrenzt werden. Eine Erhöhung der Echozeit führt zu einer Abnahme der Signalintensität und deutlicheren Identifikation kleiner multizellulärer Aggregate (weiße Pfeile in Abbildung 4–18 A-D) mittels MRT. Die reduzierte Signalintensität bei höheren Echozeiten führt aber bedingt durch den erhöhten Suszeptibilitätseffekt auch zu einer undeutlichen Abgrenzung der einzelnen benachbarten Aggregate (orangener Pfeil in Abbildung 4–18 D).

Aufgrund des MRT-Datensatzes, der mit der Echozeit von TE = 5 ms erstellt wurde, konnte nach elektronischer Segmentierung eine 3 dimensionale Rekonstruktion der Region aus Abbildung 4–17 erstellt werden (Abbildung 4–19). Die Verteilung der Aggregate in der

Transversalebene beträgt weniger als 1 mm, es wird jedoch der Vorteil der 3-dimensionalen MRT-Bildgebung im Vergleich mit der 2-dimensionalen optischen Bildgebung deutlich.

Es wurde versucht, eine Korrelation zwischen detektiertem MRT-Signal und der mikroskopisch ermittelten Geometrie multizellulärer Aggregate nach Präinkubation mit Endorem zu erstellen. Eine Korrelation zwischen diesen beiden Messparametern war, mit der hier vorgestellten Methode nicht möglich.

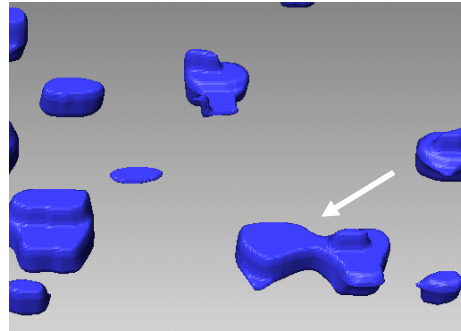


Abbildung 4–19: 3-dimensionale Rekonstruktion der MRT-Daten aus Abbildung 4–18:

Aufgrund der mit der Echozeit von TE = 5 ms erhobenen Daten wurden von der Region in Abbildung 4–18 eine 3-dimensionale Rekonstruktion nach vorhergehender elektronischer Segmentierung erstellt.

4.2.5.4 Korrelation des Fluoreszenzsignals mit dem Aggregatvolumen

Der Photonenfluss von einzelnen Aggregaten mit unterschiedlichen Durchmessern wurde von 200 randomisiert gewählten multizellulären Aggregaten aus 14 unabhängig durchgeführten Einzelexperimenten bestimmt. Die mittleren Aggregatdurchmesser wurde mittels Mikroskopie bestimmt und aus diesen Werten das Aggregatvolumen errechnet.

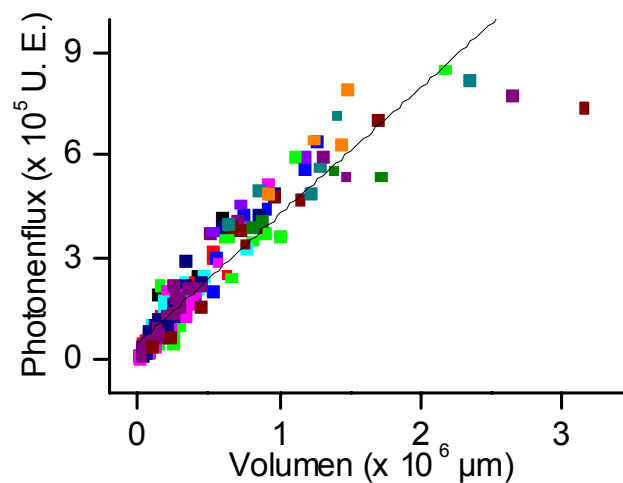


Abbildung 4–20: Korrelation zwischen sphärischem Aggregatvolumen und Photonenfluss:

Die verschiedenen Farben der Messpunkte reflektieren unabhängig voneinander erhobene Stichproben. Korreliert wurde das Volumen der multizellulären Aggregate mit dem individuell bestimmten Photonenfluss.

Eine anschließende Regressionsanalyse der Daten führte zu einer linearen Korrelation mit einem Regressionskoeffizienten $R^2 = 0,9$. Der lineare Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität (FI) und dem Aggregatvolumen (V) wird durch die Funktion

$$FI = (39601 \pm 5064) + (6,32 \pm 0,13)V$$

beschrieben (Abbildung 4–20).

Die Volumenbestimmung wurde unter der vereinfachten Annahme gemacht, dass ein multizelluläres Aggregat eine Kugelform aufweist.

4.2.5.5 Longitudinale Proliferationsanalyse mittels Photonenflux-Determinierung

Die stationäre Fixierung der multizellulären Aggregate erlaubte eine longitudinale Analyse der Proliferationsdynamik individueller Aggregate. Es konnte die Zunahme des Photonen-signals über einen Zeitraum von 5 Tagen untersucht und zu den jeweiligen Zeitpunkten mit dem mikroskopisch bestimmten mittleren Aggregatvolumen korreliert werden.

Im zweitägigen Abstand wurde das Kulturmedium auf der Oberfläche der Agarosematrix erneuert. Es wurde in diesem Zusammenhang beobachtet, dass eine schnelle Diffusion von auf der Oberfläche lokalisierten Flüssigkeiten in den unteren Bereich der Agarosematrix stattfand.

Eine repräsentative Analyse des ermittelten Photonenfluxes von vier isoliert voneinander lokalisierten Aggregaten über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigt Abbildung 4–21. Der mittlere Durchmesser des kleinsten Aggregates vergrößerte sich in den fünf Tagen von 49,5 μm auf 121,8 μm . Ein Aggregat mit einem initial größeren Durchmesser von 76,8 μm zeigte eine Zunahme auf 176,8 μm . Der Photonenflux der vier ausgewählten Aggregate wurde quantitativ ausgewertet und als Balkendiagramm in Abbildung 4–21 dargestellt.

Für eine detaillierte Analyse des proliferativen Effektes auf die Ausbreitung des Kontrastmittels in einer longitudinalen Studie wurde zusätzlich zu den Photonensignal-Messungen die Veränderung der Signalintensität nach MRT-Untersuchungen bestimmt. Die Untersuchungen wurden im Abstand von 48 h durchgeführt und mit den beiden anderen Bildgebungsmodalitäten korreliert.

Die Anregung mit der maximal möglichen Energie stellte sich bei Zeitwerten > 4 Tagen als problematisch für die Erfassung des Photonenfluxes heraus, da die eindeutige Abgrenzung benachbarter multizellulärer Aggregate nur noch bei etwa 80 % aller einzelnen Aggregate durchgeführt werden konnte.

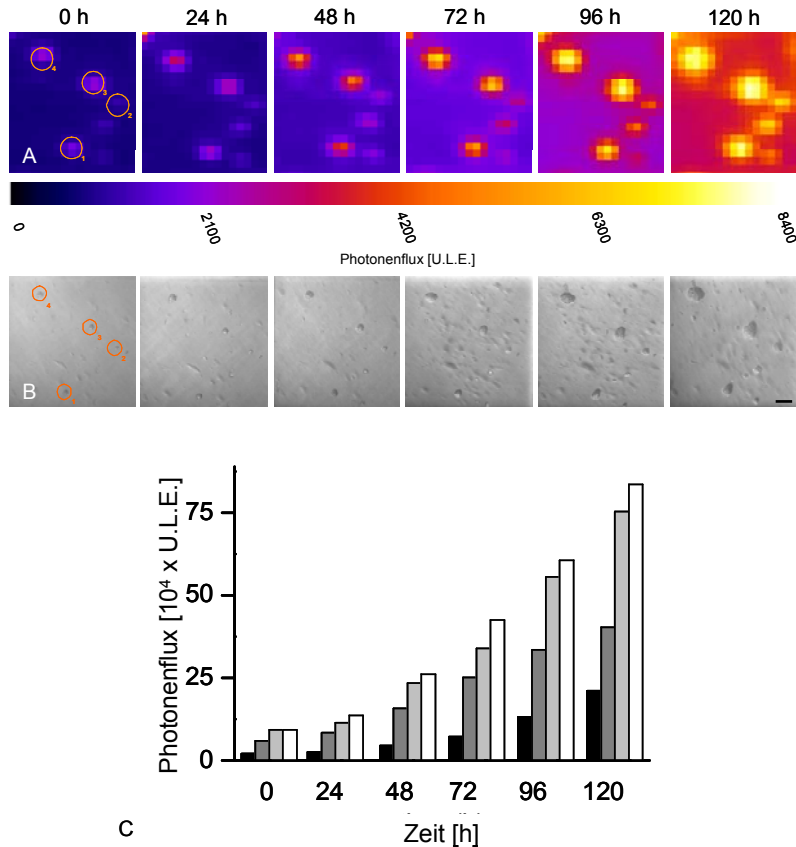


Abbildung 4–21: Longitudinale Proliferationsanalyse des Photonenflusses:

Multizelluläre Aggregate wurden in einer Agarosematrix immobilisiert und über einen Zeitraum von 5 d der Photonenflux (A) und der minimale Aggregatdurchmesser (B) mikroskopisch bestimmt. Der Skalierungsbalken wurde für die Beurteilung an die maximalen Helligkeitswerte/Pixel normiert. Die quantitative Auswertung der repräsentativ dargestellten Aggregate weist einen über den Zeitraum hinweg zunehmenden Photonenflux auf. Die zur Auswertung gemessenen Aggregate (1-4 in A) sind als einzelne Balken (C, schwarz, dunkelgrau, hellgrau, weiß) dargestellt. Maßstab in B: 120 µm.

Bei den MRT-Messungen wurde eine Kombination aus den Echozeiten $TE = 5 \text{ ms}$ und $TE = 18 \text{ ms}$ durchgeführt. Die Repetitionszeit wurde konstant bei $TR = 100 \text{ ms}$ belassen. Verwendet wurde eine Flash3D-Sequenz, um einen 3-dimensionalen Datensatz über den gesamten Untersuchungszeitraum analysieren zu können.

In diesen Experimenten wurden der Photonenflux und die korrelierenden mikroskopisch ermittelten Durchmesser von einer größeren Anzahl von Aggregaten individuell bestimmt, die sich im Gegensatz zu den in Abbildung 4–21 dargestellten Ergebnissen über einen größere Fläche verteilen. In der ersten Analyse wurde die Korrelation des Aggregatvolumens und des Photonenfluxes über den gesamten Kultivierungszeitraum von 96 h bestimmt, um die Linearität der Funktion auch bei Aggregaten mit großem Volumen überprüfen zu können. Dies konnte erfolgreich bei den beiden Messparametern gezeigt werden (Abbildung 4–22).

Der Photonenflux und die mittleren Aggregatdurchmesser nahmen bei allen untersuchten Proben im Untersuchungszeitraum kontinuierlich zu.

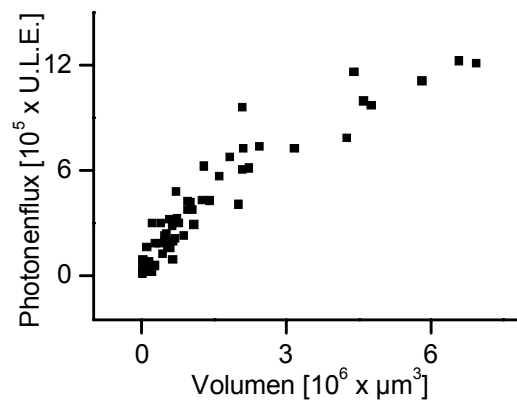


Abbildung 4–22: Korrelation von Photonenflux und Aggregatvolumen über vier Tage:

Von 19 unabhängigen multizellulären Aggregaten wurden der Photonenflux und das korrespondierende Volumen in einem Zeitraum von vier Tagen ermittelt. Alle Messungen wurden in einer vergleichenden Analyse zusammengefasst.

Die vergleichende Analyse der Aggregate untereinander zeigt die Variabilität der einzelnen Proliferationscharakteristika (Abbildung 4–23). Bei dem kleinsten der 19 Aggregate konnte nach vier Tagen Kultur in der Agarosematrix ein Volumen von $7340,5 \mu\text{m}^3$ und die korrelierende Photonenemission von $14\,451 \text{ U.L.E.}$ gemessen werden. Das Aggregat mit dem größten Volumen von $6,57 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ wies eine Photonenemission von $1,22 \times 10^6 \text{ U.L.E.}$ auf.

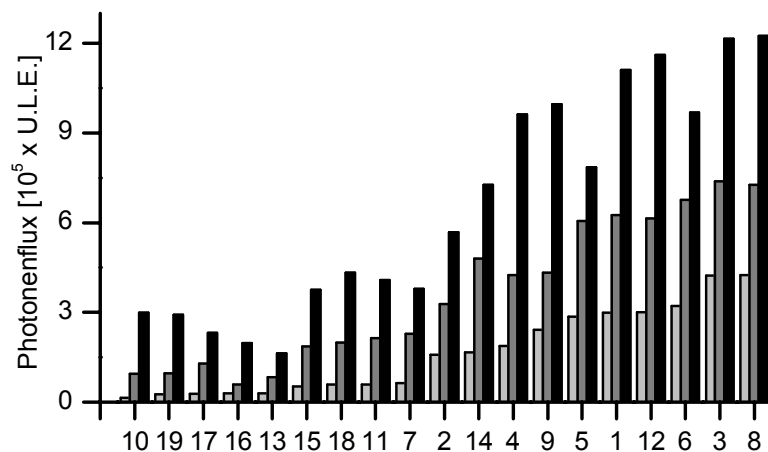


Abbildung 4–23: Vergleichende Analyse der Proliferationscharakteristika multizellulärer Aggregate in einem Zeitraum von vier Tagen:

Von 19 unabhängigen multizellulären Aggregaten wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen der Photonenflux ermittelt. Aggregat #13 weist am Ende der Messzeit den geringsten Photonenflux auf, wohingegen Aggregat #8 die maximale Photonenemission von $1,22 \times 10^6 \text{ U.L.E.}$ aufweist. Die hellgrauen Balken repräsentieren die Werte am ersten Tag der Untersuchung, die grauen Balken die nach 48 h und die schwarzen Balken die Werte nach 96 h.

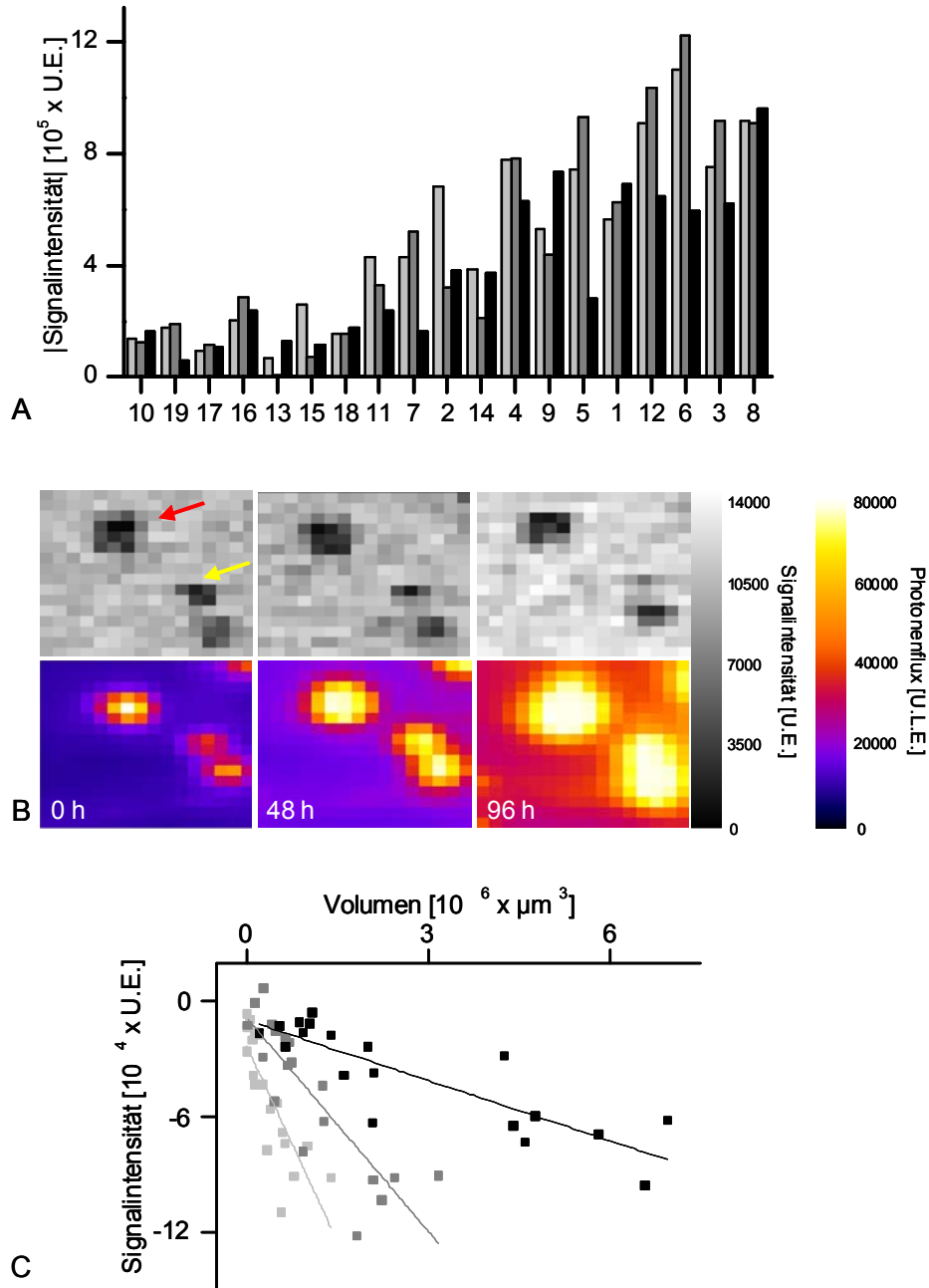


Abbildung 4–24: Analyse der MRT-Signalintensität über einen Zeitraum von vier Tagen:

Die Signalintensität der 19 analysierten Aggregate wurde im Abstand von 48 h mit einer Echozeit von $TE = 5 \text{ ms}$ bestimmt. Im Kontrast zu dem kontinuierlich ansteigenden Photonensignal konnte hier kein zeitlicher Abfall der Signalintensität bei der individuellen Analyse der Aggregate dokumentiert werden (A). Die vergleichende Darstellung von drei repräsentativ ausgewählten multizellulären Aggregaten zeigt deutlich die nahezu konstante Signalintensität bei der Minimum-Intensitäts-Projektion der MRT-Daten (B, roter Pfeil). Entspricht Aggregat Nr. 8 in A). Der gelbe Pfeil weist auf ein Aggregat hin, welches nach 144 h Kultivierung eine geringere Signalauslöschung als bei dem initialen Kulturzeitpunkt aufweist. Darstellung der quantitativen Auswertung aller 19 Aggregate zu den verschiedenen Zeitpunkten mit berechneter Regressionsgerade (C). Dargestellt sind die Absolutwerte der ermittelten Signalintensität. Die Analyse der MRT-Daten wurde bei $TE = 5 \text{ ms}$ durchgeführt. Hellgraue Symbole und Regressionsgerade zeigen die Signalintensitäten bei 0 h, dunkelgraue Symbole: Zeitpunkt 48 h, schwarze Symbole: Zeitpunkt 96 h.

Im Gegensatz zum kontinuierlichen Anstieg der emittierten Photonen im Messzeitraum konnte bei der vergleichenden Analyse der ermittelten Signalintensität bei den MRT-Messungen keine kontinuierliche Zunahme des Signals festgestellt werden (Abbildung 4–24 A). Die absolute Signalintensität veränderte sich bei einem großen Anteil der untersuchten multizellulären Aggregate kaum, oder nahm ab. Dies ist exemplarisch an Aggregat #8 gezeigt, das zu Beginn des Beobachtungszeitraums eine Signalintensität von | 89 269 U.E. | aufwies und nach 144 h Kultur einen Wert von | 86 031 U.E. | erreichte (roter Pfeil in Abbildung 4–24 B). Die Analyse eines weiteren Aggregates (gelber Pfeil in Abbildung 4–24 B) wies eine Reduktion der absoluten Signalintensität am Ende des Beobachtungszeitraumes von 64,9 % auf, obwohl die emittierten Photonen und das Volumen deutlich anstiegen.

Eine Regressionsanalyse der MRT-Ergebnisse in Abhängigkeit des Aggregatvolumens der aufeinander folgenden Tage zeigt eine Veränderung der Geradensteigung (Abbildung 4–24 C). Die bei den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ermittelten linearen Funktionen sind in Tabelle 4–2 dargestellt.

Tabelle 4–2: Funktionen und Regressionskoeffizienten R^2 für die longitudinale Messung der MRT-Signalintensitäten:

Korrespondierend zu Abbildung 4–24 C sind die Funktionen und Regressionskoeffizienten R^2 dargestellt. Signalintensität (S), Volumen (v)

Zeitpunkt	Funktion	R^2
0 h	$S(v) = -22961,94v(\pm 6356,91) - 0,07(\pm 0,01)$	0,63
48 h	$S(v) = -8454,37v(\pm 7520,01) - 0,04(\pm 0,01)$	0,71
96 h	$S(v) = -9775,22v(\pm 5297,84) - 0,01(\pm 0,002)$	0,72

4.2.5.6 Gamma-Bestrahlung multizellulärer Tumoraggregate zur Simulation einer Strahlenbehandlung

Zur Untersuchung der Proliferationsdynamik und -inhibierung von in Agarose eingebetteten und immobilisierten Tumoraggregaten wurde eine Gammabestrahlung durchgeführt (Abbildung 4–25). Die Proliferation wurde anhand der Photonenemission bestimmt und mit dem mikroskopisch ermittelten Volumen der Tumoraggregate korreliert. Die Untersuchung wurde über einen Zeitraum von 180 h durchgeführt. Um eine eindeutige Identifikation der Aggregate über den gesamten Zeitraum zu gewährleisten, wurde die Anregungsenergie um 50 % reduziert. Die Experimente mit den Gamma-Bestrahlungen wurden in zwei unabhängigen Stichproben durchgeführt.

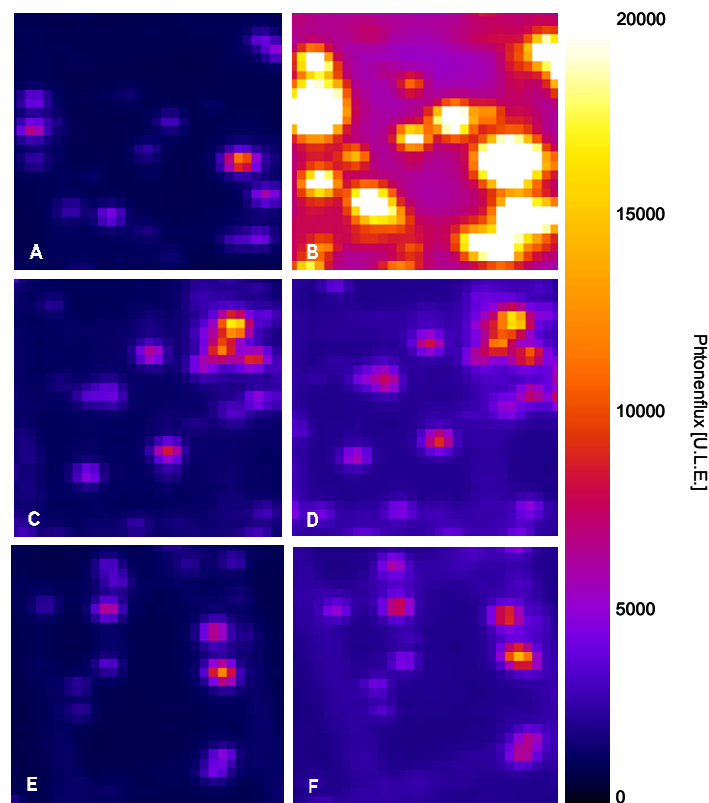


Abbildung 4–25: Bestrahlung der Tumorzellaggregate mit Gammastrahlen zur Simulation einer Strahlentherapie:

Die Bestrahlung wurde mit den Einzeldosen 20 Gy und 50 Gy durchgeführt. Das Aggregatwachstum wurde über einen zeitlichen Verlauf von insgesamt acht Tagen (A, C, E: Tag 1; B, D, F: Tag 8) mikroskopisch und mittels Photonen Bildgebung dokumentiert. Die Bestrahlung fand 26 h nach der initialen Kultivierung statt. Die Bilder A und B dokumentieren einen repräsentativen Ausschnitt eines Bereiches in einer Kontrollpräparation, wohingegen C und D den Verlauf des Zellwachstums innerhalb des Untersuchungszeitraumes in der mit 20 Gy bestrahlten Probe, die Abbildungen E und F die Proliferation der mit 50 Gy bestrahlten Probe darstellen. Der Farbcode wurde in allen Abbildungen auf die maximalen Werte, die im Skalierungsbalken abgebildet wurden, normiert.

24 h nach der Platzierung der Aggregate in der mit Kulturmedium angereicherten Agarosematrix, wurde die Bestrahlung mit den sublethalen Dosen 20 Gy und 50 Gy durchgeführt. Eine Kontrollpräparation wurde ohne die Durchführung der Strahlenbehandlung neben dem verwendeten Patientenbestrahlungsgerät platziert, um einen Einfluss der kurzzeitig stattfindenden Temperatur- und CO₂-Abnahme auf die Proliferation der Tumorzellen auszuschließen.

90 h nach der Bestrahlung konnte nur noch eine geringe proliferative Aktivität der bestrahlten Aggregate festgestellt werden (Abbildung 4–26). Nach diesem Zeitpunkt konnte allenfalls eine leichte Abnahme der Photonenemission beobachtet werden. Die Bestimmung der mittleren Aggregatdurchmesser nach acht Tagen Kulturzeit zeigte bei den Kontrollzellen im Vergleich zum initialen Durchmesser eine Volumenzunahme von 238 (± 48) %. Während der gleichen Beobachtungszeit konnte bei den mit 20 Gy bestrahlten Proben eine Volumenzunahme von 128 (± 10) % detektiert werden. Bei den den mit 50 Gy bestrahlten Zellen konnte kein signifikanter Unterschied bzgl. der Volumenzunahme im Vergleich zu den mit 25 Gy bestrahlten Proben festgestellt werden. Die Volumenzunahme betrug in dieser Gruppe 122,6 (± 48,8) % im Vergleich zum initialen Untersuchungszeitpunkt.

Die Wachstumscharakteristik der unbehandelten Kontrollzellen korrespondiert zu den Werten, die in Abbildung 4–20 ermittelt wurden.

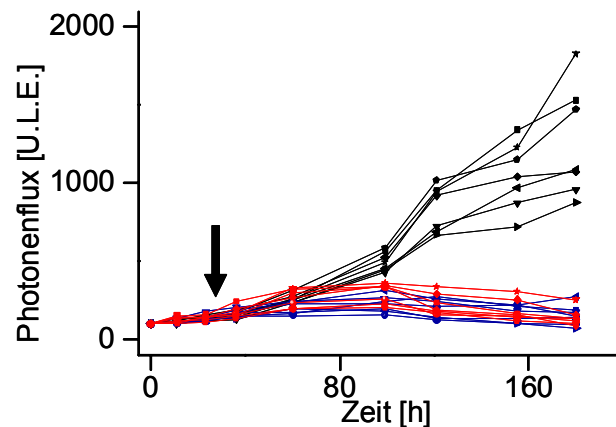


Abbildung 4–26: Quantitative Auswertung des Photonenflusses nach Gamma-Bestrahlung:

Die Bestrahlung mit 20 Gy (rote Symbole) und 50 Gy (blaue Symbole) wurde 24 h nach der initialen Kultur in der Agarosematrix durchgeführt (Pfeil). Die Photonenemission repräsentativer Zellaggregate wurde über den Untersuchungszeitraum dokumentiert. Es findet sich eine verringerte Photonenemission in den behandelten Präparaten, während die Proliferation der Kontrollzellen zunimmt. Die Anregungsenergie wurde um 50 % reduziert, um eine exakte Identifikation benachbarter Aggregate im gesamten Untersuchungszeitraum sicherzustellen. Daher sind die ermittelten Werte nicht direkt mit den anderen Versuchen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, vergleichbar.

4.2.6 Ermittlung der minimal detektierbaren Zellmenge multizellulärer mCherry⁺-Aggregate

4.2.6.1 Korrelation von Photonenflux und absoluter Zellzahl multizellulärer Aggregate

Für eine direkte Ermittlung der minimal detektierbaren Zellmenge und Diskriminierung von Aggregaten, bestehend aus weniger als 100 Zellen, wurden multizelluläre Aggregate auf einer Fibronectin beschichteten Oberfläche ausplattiert und nach einem Zeitraum von 4 h fixiert. Der Zeitpunkt von 4 h wurde in diesem Fall gewählt, um eine ausreichende Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche zu gewährleisten und eine extensive Migration von Einzelzellen in die Peripherie des Aggregates zu unterbinden. Vor der Fixierung wurde der Photonenflux mittels Photonen-Bildgebungssystem bestimmt und diese Werte mit der absoluten Zellmenge nach Inkubation mit den DNA-interkalierenden Farbstoffen Hoechst Dye 33342 und Sytox green verglichen (Abbildung 4–27).

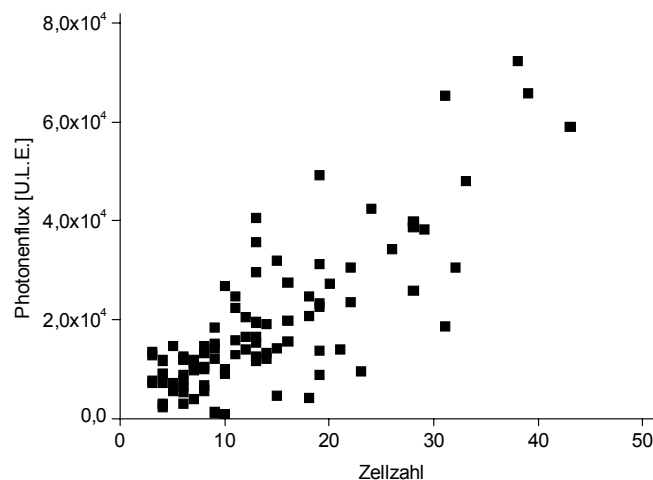


Abbildung 4–27: Korrelation absoluter Zellmenge mit dem emittierten Photonensignal:

Absolute Zellmengen der multizellulären Aggregate die aus 5 bis 50 Zellen bestanden, wurden einzeln ermittelt und mit dem vor der Fixierung ermittelten Photonensignal verglichen. Eine Regressionsanalyse der bestimmten Werte wurde anhand des Datenmaterials durchgeführt. $R^2 = 0,696$, Anzahl unabhängiger Stichproben: $n = 3$.

Für diese Korrelationsmessung wurden 4-Loch-Multikammer-Systeme verwendet, da die Analyse der Agarosegele mittels konfokaler Lasermikroskopie und hoher mikroskopischer Vergrößerung aufgrund der Präparatedicke nicht möglich war. In diesem Zusammenhang wurden auch aufwändige Präparationen untersucht, bei denen kleine Mengen von multizellulären Aggregaten in einem Volumen von 2 μ L Agarose auf die Agarosegrundschicht im 35 mm Schälchen aufgebracht wurden. Ein Vergleich der Hintergrundwerte mit dem 4-Loch-Multikammer-System und der Agarosematrix ergab ein um etwa 66 % verringertes Signal für

das 4-Loch-Multikammer-System, was auf eine erhöhte Streuung der Photonen im Agarosegel hindeutet.

4.2.6.2 Korrelation von Photonenflux, Signalintensität im MRT, Aggregatvolumen und absoluter Zellzahl im 35 mm-Agarosephantom

Die Korrelation von absoluter Zellzahl mit dem mittleren Aggregatvolumen, dem Photonenflux und der Abnahme der Signalintensität im MRT kann im 4-Loch-Multikammer-System nicht erhoben werden. Multizelluläre mCherry⁺-Aggregate wurden nach der Inkubation mit $224 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Endorem in einer Agarosematrix eingebettet. Die Ermittlung des Photonenfluxes erfolgte im lebenden Zustand. Nach der Fixierung wurden NMR-Untersuchungen mit einer Echozeit von $TE = 5 \text{ ms}$ und $TE = 18 \text{ ms}$ durchgeführt und der minimale Durchmesser der Aggregate mikroskopisch bestimmt.

Um eine Veränderung des Aggregatvolumens, bedingt durch die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd und die anschließende Lagerung der Präparate bei einer Temperatur von 4°C auszuschließen, wurde der Aggregatdurchmesser über einen Zeitraum von vier Monaten verglichen. Dabei zeigte sich, dass eine minimale Zunahme zwischen 4 bis $8 \mu\text{m}$ möglich ist. Bei der Auswertung der folgenden Präparate war das Aggregatvolumen mit einer Abweichung von $\pm 2 \mu\text{m}$ vergleichbar zum unfixierten Zustand.

Die absolute Zellzahl wurde nach einer nachträglichen Inkubation der Präparate mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Sytox green fluoreszenzmikroskopisch ermittelt und mit den anderen Bildgebungsmodalitäten verglichen (Abbildung 4–28 C und F2).

Der mittlere Durchmesser einer einzelnen Zelle nach der Einbettung in die Agarosematrix betrug etwa $20 \mu\text{m}$. Der zelluläre Durchmesser wird aufgrund des geringen Gesamtumfangs der Zelle hauptsächlich vom Zellkern dominiert (Abbildung 4–28 F2).

Die MRT-Untersuchungen wurden mit den Echozeiten $TE = 5 \text{ ms}$, 12 ms und 18 ms bei konstanter Repetitionszeit $TR = 200 \text{ ms}$ aufgenommen. Für die korrelierende Analyse wurden nur die Werte aus der Messung mit $TE = 5 \text{ ms}$ verwendet, da bedingt durch den höheren Suszeptibilitäts T_2 -Effekt bei höheren Echozeiten eine isolierte Lokalisation der einzelnen multizellulären Aggregate nicht mehr exakt möglich war. In einer vergleichenden Untersuchung zwischen den verschiedenen Echozeiten konnten alle Aggregate und Gruppen von Zellen < 10 Zellen jedoch deutlich mit $TE = 5 \text{ ms}$ identifiziert werden.

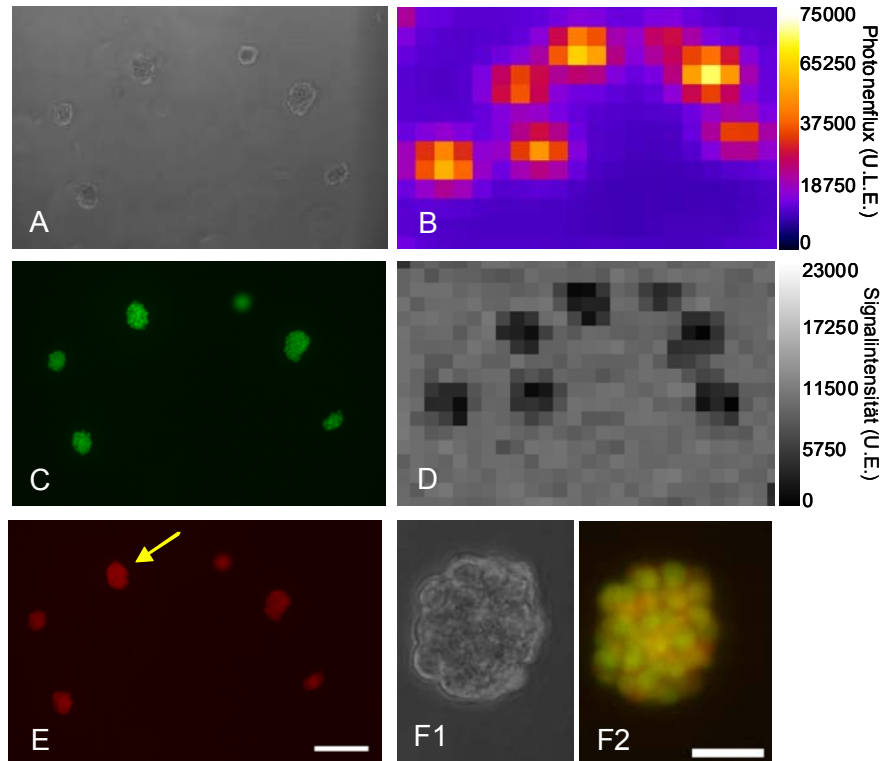


Abbildung 4–28: Korrelation aller Bildgebungsmodalitäten:

Für die detaillierte Analyse wurden die multizellulären Aggregate in einer Agarosematrix eingebettet. Ausgewertet wurden die mittleren Aggregatdurchmesser anhand von Phasenkontrastaufnahmen (A), durch quantitative Auswertung der Zellkerne nach Sytox green Inkubation (C) und der mCherry-Fluoreszenz (E). Der Photonenfluss nach Fluoreszenzanregung (B) wurde zusammen mit der Analyse der MRT-Aufnahmen, die mit einer Echozeit TE = 5 ms akquiriert wurden (D), quantitativ ausgewertet. Die höhere Vergrößerung eines Aggregates (Pfeil in E) zeigt die morphologische Struktur eines multizellulären Aggregates (F1). Eine deutliche Diskriminierung der einzelnen Zellkerne anhand der Sytox green Färbung ist möglich (F2, grün: Sytox green, rot: mCherry). Maßstab: A, C, E: 200 μm . F1 + F2: 50 μm .

Die Korrelation des Photonenflusses (P) zur absoluten Zellanzahl (z), die mikroskopisch bestimmt wurde, zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen den beiden Modalitäten (Abbildung 4–29 A). Die Regressionsfunktion wird durch

$$P(z) = 4629,7z(\pm 234,21) - 8572,42(\pm 2722,93)$$

beschrieben. Der Regressionskoeffizient betrug $R^2 = 0,90$. Die exakte Abgrenzung der einzelnen Nuklei konnte bei Zellansammlungen von bis zu 24 Zellen in nahezu allen untersuchten Fällen durchgeführt werden. Makroskopisch bestehen diese Zellgruppen aus einschichtigen- bis zweischichtigen lockeren Ansammlungen von Einzelzellen. Aus diesem Grund wurde in Abbildung 4–29 A für die Regressionsanalyse ein lineares Modell zu Grunde gelegt. Aggregate, die aus 15 bis 20 Einzelzellen bestehen, weisen mittlere Durchmesser zwischen etwa 45 μm und 65 μm auf (Abbildung 4–29 B). Bei Zellansammlungen, die einen Durchmesser von > 70 μm aufweisen, muss von einem kubischen Zusammenhang zwischen Aggregatvolumen und Photonenflux ausgegangen werden (Abbildung 4–29 C). Als

minimales Detektionslimit, bei dem kleine Zellgruppen noch deutlich von den Hintergrundsignalen diskriminiert werden konnten, wurden drei bis fünf Zellen identifiziert. Bei Zellmengen < 10 Zellen konnten Photonensignale nach der Subtraktion des Hintergrundsignals von $< 10\,000$ U.L.E. eindeutig detektiert werden.

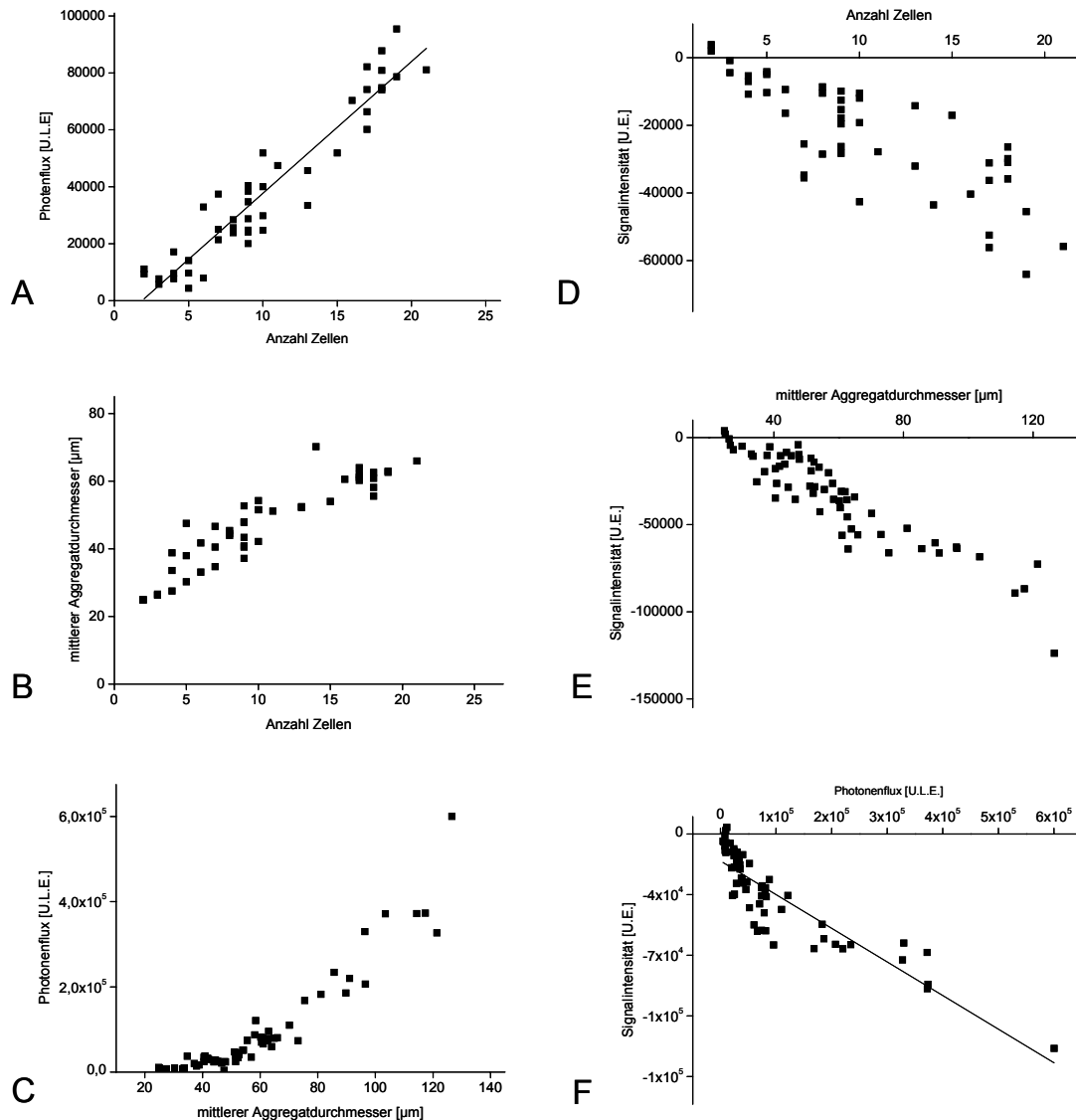


Abbildung 4–29: Quantitative Analyse zur Korrelation der unterschiedlichen Bildgebungsmodalitäten:

Die Korrelation zwischen den einzelnen Bildgebungsparametern bei der Untersuchung von Zellmengen zwischen 3 und 25 Zellen führt zu einem linearen Zusammenhang des Photon fluxes zur Zellzahl (A). Es wurde der mittlere Aggregatdurchmesser der kleinen Zellgruppen bestimmt und mit der mikroskopisch ermittelten Zellanzahl korreliert (B). Die weitergehende Analyse des Zusammenhangs zwischen mittleren Aggregatdurchmessern und dem Photon flux verdeutlicht eine kubische Funktion bei mittleren Aggregatdurchmessern von $> 70\ \mu\text{m}$ (C).

Bei der Analyse der Korrelation zwischen absoluter Zellzahl, mittlerem Aggregatdurchmessern und der Signalintensität, die mit einer Echozeit von $TE = 5\ \text{ms}$ mittels MRT-Untersuchung bestimmt wurde, konnte ein linearer Zusammenhang ermittelt werden (D, E). Dies gilt ebenfalls für die Korrelation von Photon flux aufgrund der mCherry Fluoreszenz und der mit dem MRT bestimmten Signalintensitäten (F).

Das Detektionsminimum der Endorem inkubierten Zellen mittels MRT lag bei drei Zellen. Für die zukünftigen Anwendungen mit mCherry überexprimierenden Zellen mit *in vivo* anwendbaren Verfahren wurde eine Korrelation des Photonenfluxes (P) mit den im MRT detektierten Signalauslöschungen (s) erstellt (Abbildung 4–29 F). Die Regressionsfunktion wird durch

$$P(s) = -0,194s(\pm 0,013) + 15611,084(\pm 2007,236)$$

beschrieben. Der Regressionskoeffizient betrug 0,77.

Die Signalintensitätsveränderung (S) bei den Echozeiten (x) TE = 5 ms, 12 ms und 18 ms wird in Abbildung 4–30 mit den mittleren Aggregatdurchmessern korreliert. Die Funktionen und Regressionskoeffizienten sind in (Tabelle 4–3) dargestellt.

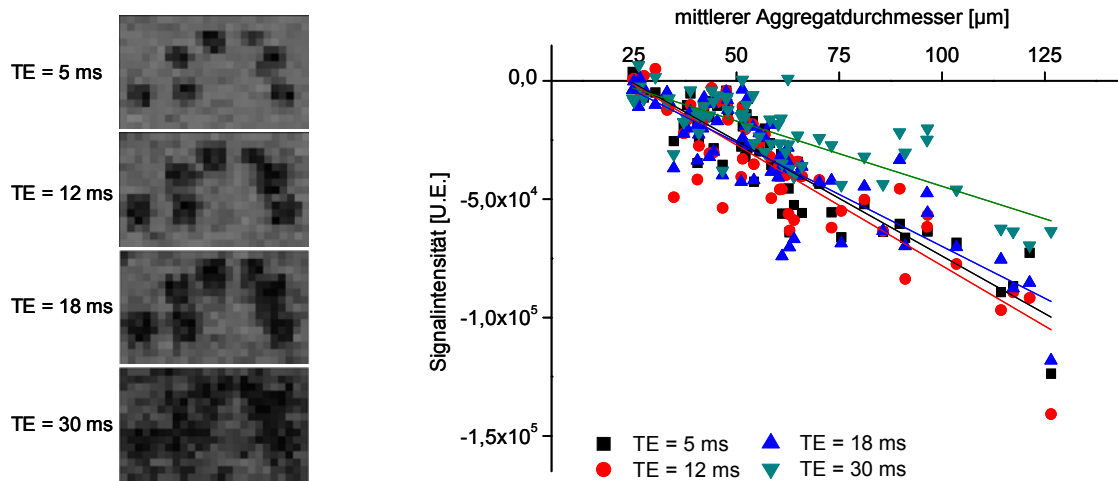


Abbildung 4–30: Vergleich unterschiedlicher Echozeiten zur Detektion multizellulärer Aggregate:

Um die Signalintensität bei unterschiedlichen Echozeiten zu ermitteln, wurde in einem vergleichenden Experiment mit den Echozeiten TE = 5 ms, TE = 12 ms, TE = 18 ms, TE = 30 ms jedes einzelne multizelluläre Aggregat separat analysiert.

Tabelle 4–3: Ermittlung der Funktionen und Regressionskoeffizienten R^2 für die vergleichende Analyse unterschiedlicher Echozeiten:

Echozeit	Funktion	R^2
5 ms	$S(x) = -971,79x(\pm 53,81) + 23212,29(\pm 3407,42)$	0,84
12 ms	$S(x) = -1020,45x(\pm 68,91) + 23929,59(\pm 4363,79)$	0,78
18 ms	$S(x) = -875,53x(\pm 69,83) + 17655,41(\pm 4422,06)$	0,72
30 ms	$S(x) = -551,69x(\pm 51,93) + 10616,72(\pm 3288,56)$	0,65

4.2.7 Kultivierung der multizellulären Aggregate im modifizierten Agarosephantom zur Simulation optischer Absorption

4.2.7.1 Fluoreszenz- und MRT-Bildgebungseigenschaften von in humanem Blut eingebetteten Zellaggregaten

Hämoglobin und oxygeniertes Hämoglobin gehören zu den Molekülen, die in biologischen Geweben hauptsächlich für die Absorption im sichtbaren und nahinfraroten Wellenlängenbereich verantwortlich sind. Die beiden Makromoleküle weisen maximale Extinktionskoeffizienten ϵ bei 400-420 nm und bei 530-550 nm auf. Um die optischen Eigenschaften der multizellulären Aggregate unter gewebeähnlichen Bedingungen zu simulieren, wurden die Tumoraggregate in einer Agarosematrix suspendiert, die ein Gemisch von humanem Vollblut mit den Konzentrationen 1 % und 10 % enthält. Anschließend wurden der Photonenflux, der Aggregatdurchmesser und die NMR-Eigenschaften bei 11,7 T bestimmt.

Für diesen Versuch wurden Zellen verwendet, die mit Endorem in der Konzentration $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ für 48 h in Suspensionskultur kultiviert wurden. Die Anordnung der verschiedenen Blutkonzentrationen im Agaroseschälchen ist in Abbildung 4–31 dargestellt. Durchgeführt wurde eine makroskopische Dokumentation (Abbildung 4–31A), Fluoreszenzaufnahmen zur Detektion des mCherry-Proteins (Abbildung 4–31B), NMR-Untersuchung bei 11,7 T mit der Flash-3D-Sequenz und einer Echozeit von $TE = 12 \text{ ms}$ (Abbildung 4–31C).

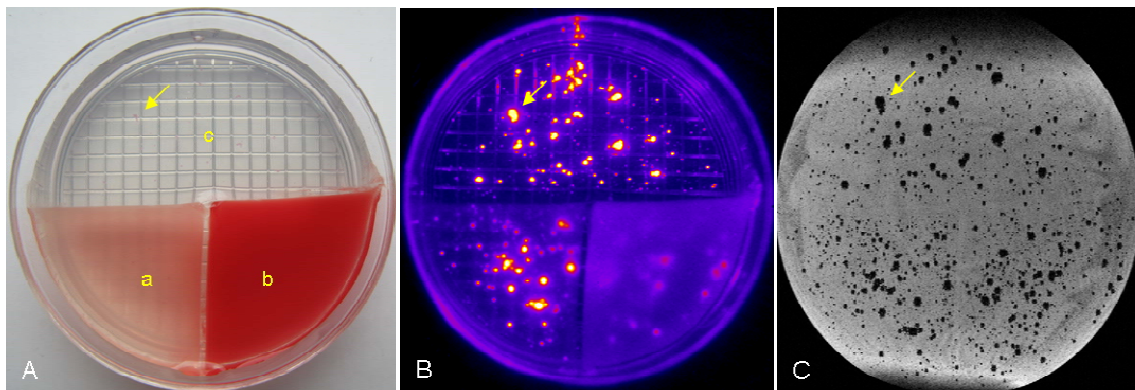


Abbildung 4–31: Visualisierung der multizellulären Tumoraggregate im modifizierten Agarosephantom:

Tumoraggregate wurden für 48 h in Suspensionskultur in Gegenwart von Endorem gebildet und anschließend in Agarose mit den unterschiedlichen Konzentrationen von 1 % (Aa) und 10 % (Ab) Vollblut kultiviert. Als Kontrolle wurde 0,5 % Agarose ohne Zusätze (Ac) verwendet. Die Detektion von mCherry wurde durch 30 s Exposition im Photonen-Bildgebungssystem erzielt (B), NMR-Aufnahmen wurden bei 11,7 T mit einer Flash-3D-Sequenz akquiriert. Die Echozeit betrug $TE = 12 \text{ ms}$, $TR = 200 \text{ ms}$ mit einer Auflösung von $70 \mu\text{m} \times 74 \mu\text{m} \times 78 \mu\text{m}$. (C). Die Pfeile weisen auf ein bereits makroskopisch sichtbares Aggregat hin und zeigen die Möglichkeit der Koregistrierung der einzelnen multizellulären Aggregate. Deutlich sichtbar ist die verringerte Detektierbarkeit der Aggregate anhand der Fluoreszenzaufnahme mit zunehmender Vollblutkonzentration. In der NMR-Aufnahme kann keine verringerte Signalintensität der Aggregate durch die Blutkonzentrationen detektiert werden.

Aufgrund der 28 h Kultivierung weisen die Aggregate größere Durchmesser als nach einer Kultivierungszeit von 20 h auf.

In der makroskopischen Aufnahme (Abbildung 4–31 A) lassen sich einzelne Zellkonglomerate bereits detektieren. Die einzelnen Messergebnisse können koregistriert werden (exemplarischer Pfeil in den drei Abbildungen). Die einzelnen Konzentrationen des Vollblutes sind in Abbildung 4–31 aufgrund der roten Färbung deutlich sichtbar. Dabei bezeichnet a) 1 % Vollblut, b) 10 % Vollblut und als Kontrollbedingung c) 0 % Vollblut. Bei der niedrigen Vollblutkonzentration lassen sich die Aggregate aufgrund des emittierten Lichtes im Vergleich mit der Kontrollbedingung eindeutig identifizieren. Dies ist bei 10 % Blutkonzentration nur bei der Minderheit der Zellen möglich.

4.2.7.2 Quantifizierung des Fluoreszenzsignals von standardisierten Mikropartikeln

Zur quantitativen Analyse des Photonenfluxes im Photonen-Bildgebungssystem wurden Fluoreszenzpartikel verwendet, die einen Durchmesser von 5 μm aufwiesen. Die Anregung lag bei der Wellenlänge 569 nm, die Emission bei 585 nm. Eine Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals wurde mit einer Verdünnungsreihe dieser Partikel in Reaktionsgefäßen bestimmt (Abbildung 4–32). Der Photonenflux nahm mit ansteigender Konzentration linear zu.

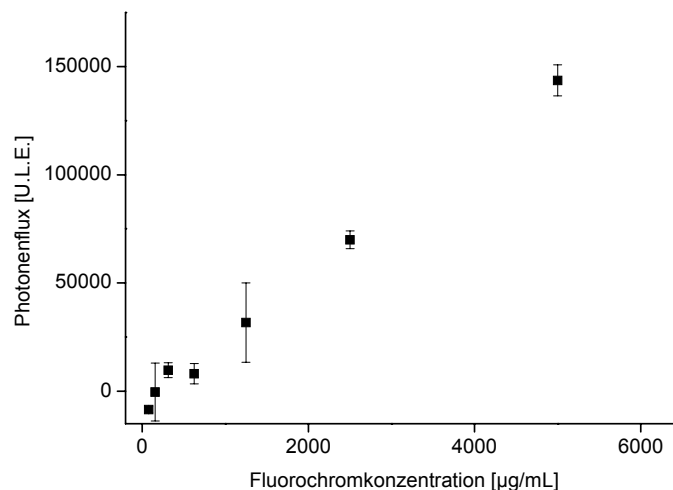


Abbildung 4–32: Bestimmung des Fluoreszenzsignals mit Fluoreszenzpartikeln:

Die Fluoreszenz wurde in unterschiedlichen Verdünnungen im Biospace Lab-Bildgebungssystem bestimmt. Die Anregung lag bei 100 %, die Belichtungszeit war 30 s. Der Regressionskoeffizient betrug $R^2 = 0,995$. Anzahl der unabhängigen Stichproben $n = 3$.

Des Weiteren wurde den Fluoreszenzpartikeln humanes Vollblut in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt, um die Inhibierung des Fluoreszenzsignals durch Blut zu bestimmen (Abbildung 4–33). Es konnte nachgewiesen werden, dass mit zunehmender

Konzentration von Vollblut eine Abnahme des Photonenflusses eintrat. Ab einer Konzentration von 5 % konnte das emittierte Licht nicht mehr eindeutig bestimmt werden.

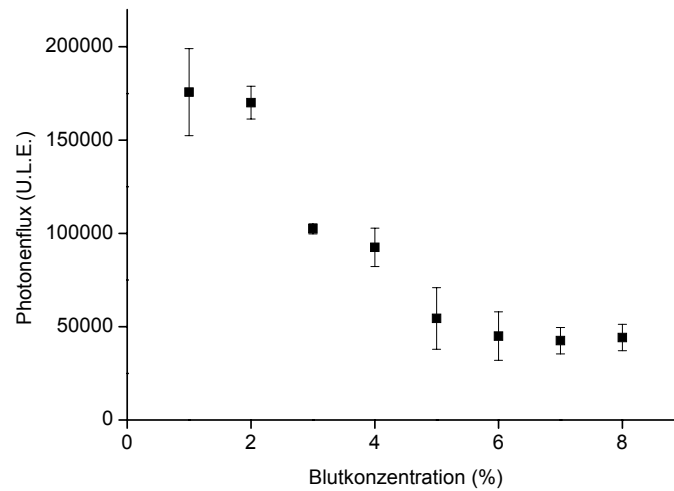


Abbildung 4–33: Inhibierung des Fluoreszenzsignals durch humanes Blut:

Eine Partikelkonzentration von 5000 µg/mL wurde gewählt, um das Fluoreszenzsignal dieser mit verschiedenen Vollblut-Konzentrationen im Photonen-Bildgebungssystem zu bestimmen. Blut wurde in den Konzentrationen 1-10 % zugegeben. Eine Plateauphase trat bereits bei einer Blutkonzentration von 6 % auf. Die Anregungsstärke lag bei 100 %, die Belichtungszeit bei 30 s. Anzahl der unabhängigen Stichproben n = 3.

4.2.8 Langzeitkultivierung der multizellulären Aggregate in Gegenwart von Endorem

Um den Einfluss einer längeren Kultivierungszeit der Aggregate in Gegenwart des Kontrastmittels Endorem auf die Signalauslöschung im MRT zu untersuchen, wurden Gli36ΔEGFR-mCherry exprimierende Zellen für 5 Tage mit $224 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Endorem inkubiert. Für die Quantifizierung der Signalintensität einzelner Aggregate wurden die Proben mit einer Echozeit von $TE = 5 \text{ ms}$ untersucht und anschließend mit dem mikroskopisch bestimmten mittleren Durchmesser korreliert. Multizelluläre Aggregate, die für 5 d in Suspension wuchsen und Aggregate, die nach einer viertägigen Kultivierungszeit ohne Endoremzugabe für 24 h mit Endorem inkubiert wurden, dienten als Vergleichsgruppen.

Die Aggregation in Gegenwart von Endorem über den Zeitraum von 5 d führt zu einer starken Signalauslöschung bei der MRT-Untersuchung im Vergleich mit der Probengruppe, die lediglich für einen Tag mit Endorem nach einer viertägigen Aggregationsperiode inkubiert wurde. Bei den Kontrollzellen konnte, unabhängig von der Größe, kein Signalverlust bei den Echozeiten $TE = 5 \text{ ms}$ und 18 ms detektiert werden. Bei einigen Aggregaten konnte ein positiver Kontrast mit Werten bis zu 62 U.E. festgestellt werden.

Die Aggregatdurchmesser aller Gruppen sind im Vergleich mit den 20 h bis 24 h Experimenten, die in dieser Arbeit hauptsächlich durchgeführt wurden mit Werten $> 500 \mu\text{m}$ überdurchschnittlich groß. Für die Beurteilung, welcher Einfluss auf das MRT-Signal unter den beiden Kultivierungsbedingungen ausgeübt wird, wurde der mittlere Durchmesser der Aggregate mikroskopisch bestimmt und mit dem MRT-Signal verglichen. Aggregate mit gleichem- oder ähnlichem Durchmesser (Abbildung 4–34 A, Pfeile) weisen einen unterschiedlichen Signalverlust in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit auf. Exemplarisch dargestellt wurde die ermittelte Signalintensität bei $TE = 5 \text{ ms}$ und $TE = 18 \text{ ms}$ von zwei Aggregaten, die beide einen mittleren Durchmesser von $212 \mu\text{m}$ aufweisen (Abbildung 4–34 B, C, Pfeile). Die Signalintensität bei der niedrigeren Echozeit des Aggregats aus der Gruppe, die nur für 24 h inkubiert wurden, betrug $-90\,138 \text{ U.E.}$ in einer Fläche von 12 Pixel. Bei der höheren Echozeit wurde die Signalauslöschung stärker. Wurden die Zellen kontinuierlich über die gesamte Kultivierungszeit in Gegenwart von Endorem kultiviert, zeigte sich bei der Echozeit von 5 ms eine Signalintensität von $-323\,234 \text{ U.E.}$, die ebenfalls bei höherer Echozeit stärker wurde. Die Fläche, in der die Signalauslöschung bestimmt wurde, betrug in diesem Fall 49 Pixel.

Bei der quantitativen Korrelation des Durchmessers und der Signalintensität konnte ein exponentieller Zusammenhang bei beiden Gruppen ermittelt werden. Die Aggregate, die kontinuierlich in Gegenwart von Endorem kultiviert wurden, zeigen dabei einen stärkeren Abfall in der Signalintensität (Abbildung 4–34 D).

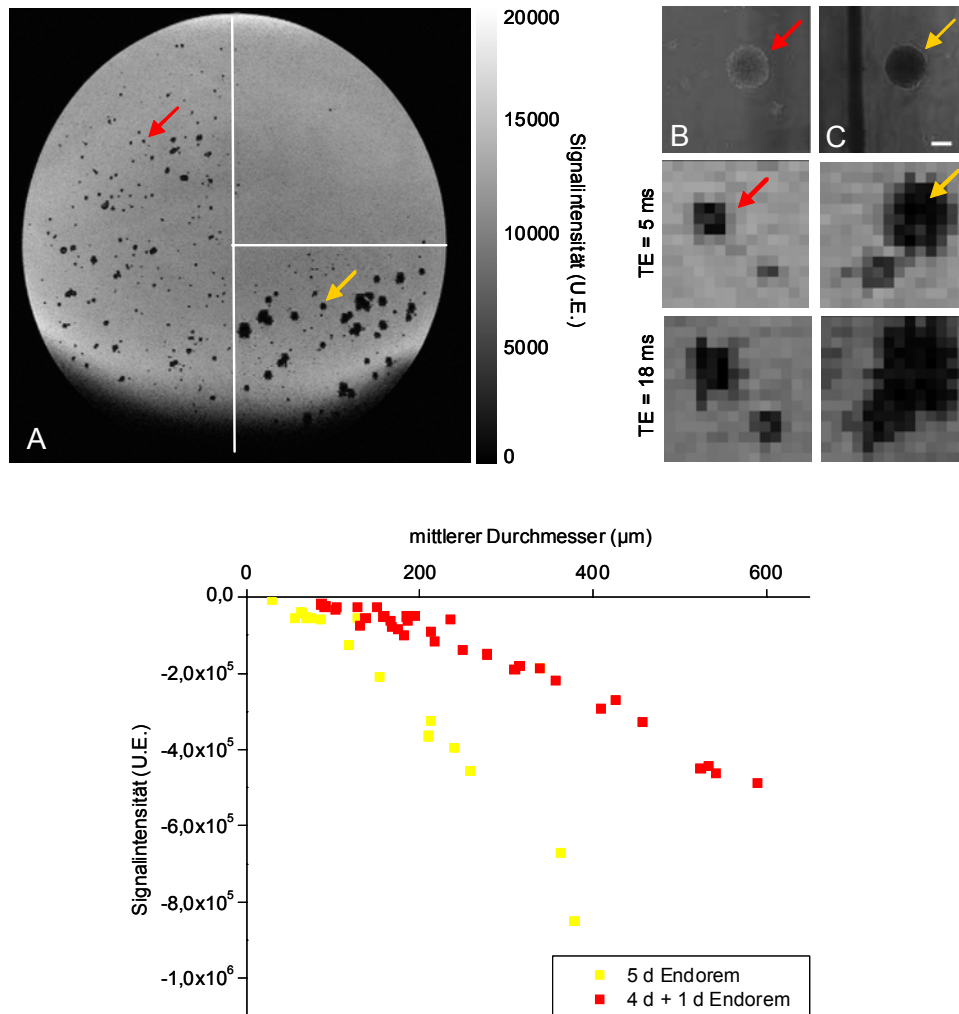


Abbildung 4–34: Langzeitkultivierung multizellulärer Aggregate in Gegenwart von Endorem: Gli36ΔEGFR Zellen wurden für 5 d in Gegenwart von $224 \mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem aggregiert (A, rechtes unteres Tertial) oder nach einer viertägigen Aggregationsperiode für zusätzliche 24 h mit der identischen Endoremkonzentration inkubiert (A, linkes Tertial). Bei unbehandelten Kontrollaggregaten konnte keine Abnahme der Signalintensität detektiert werden (A, rechtes oberes Tertial). Mikroskopische Aufnahmen wurden von den, in Agarose eingeschlossenen Aggregaten angefertigt und mit den korrespondierenden Bereichen kolokalisiert, die aufgrund der MRT-Untersuchung identifiziert werden konnten (B und C). Für die MRT-Untersuchungen wurde bei der konstanten Repetitionszeit $TR = 200 \text{ ms}$ die Echozeit $TE = 5 \text{ ms}$ und $TE = 18 \text{ ms}$ gewählt. Für die quantitative Auswertung wurde die Signalintensität der MRT-Daten, die mit einer Echozeit von $TE = 5 \text{ ms}$ akquiriert wurden, gewählt (D). Maßstab B, C: $100 \mu\text{m}$.

In der Gruppe, die lediglich einen Tag in Gegenwart von Endorem kultiviert wurde, befinden sich Aggregate, die neben der hypointensen Signalauslöschung durch das Kontrastmittel eine Signalintensitätszunahme im Zentrum des Aggregates aufweisen (Abbildung 4–35 A). Diese hyperintensiven Bereiche konnten Aggregaten mit einem Durchmesser $> 400 \mu\text{m}$ zugeordnet werden und treten in der Aggregatgruppe, die kontinuierlich mit Endorem inkubiert wurde, nicht auf (Abbildung 4–35 B). Dabei wurden multizelluläre Aggregate mit vergleichbaren oder größeren mittleren Durchmessern in die Analyse miteinbezogen, die

aufgrund von mikroskopischen Phasenkontrastaufnahmen ausgewählt wurden (Abbildung 4–35 A1 + B1). Die Bereiche mit erhöhter Signalintensität sind auf den entsprechenden Minimum-Intensität-Projektionen nicht zu identifizieren, aber deutlich in Einzelbildern der jeweiligen Schicht zu finden (Abbildung 4–35 A, Sch.1 bis Sch. 8). Diese Detailaufnahmen zeigen die Abgrenzung des hyperintensiven Bereiches von dem hypointensen Konturen des Aggregates. Die einzelnen Schichten wiesen dabei einen Abstand von 78 μm zueinander auf.

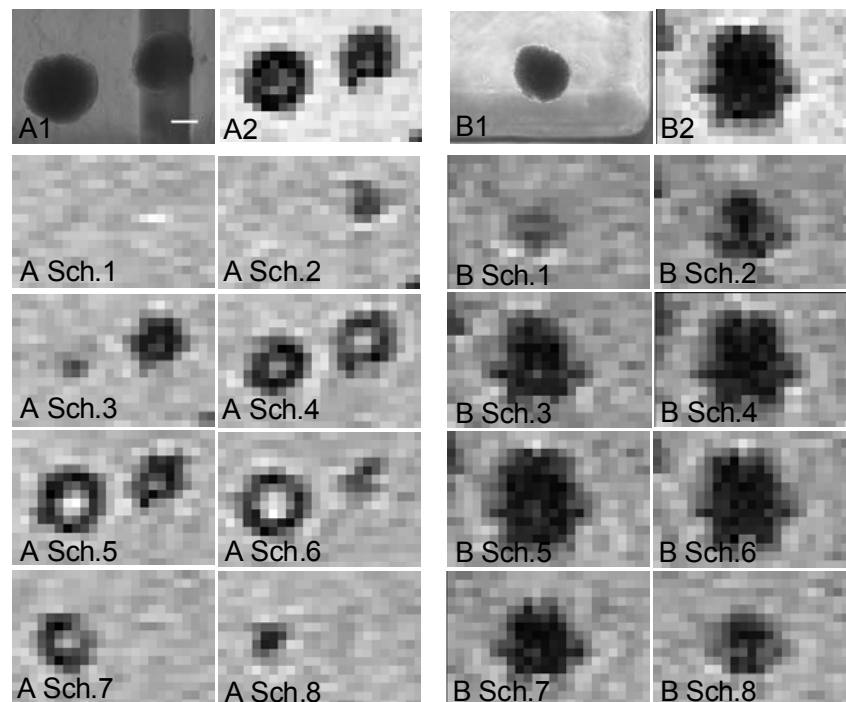


Abbildung 4–35: Vergleichende Analyse hyperintensiver Bereiche in multi-zellulären Aggregaten:

Zelluläre Aggregate mit einem mittleren Durchmesser $> 400 \mu\text{m}$, die für einen Zeitraum von 4 d aggregiert und anschließend mit Endorem inkubiert wurden, weisen einen zentral lokalisierten Bereich mit einer Signalintensitätszunahme auf. Bei Aggregaten vergleichbarer Größe tritt diese Signalzunahme nicht auf. A2 und B2 stellen Minimum-Intensitäts-Projektionen der einzeln akquirierten Schichten (A, Sch.1-Sch.8 und B, Sch.1-Sch.8) dar. Der vertikale Balken in A2 stellt einen Steg des in die Zellkulturschalen eingelassenen Rasters dar. Die Schichtdicke betrug $78 \mu\text{m}$. Maßstab: A1 und B1: $200 \mu\text{m}$.

Die hyperintensiven Bereiche sind nicht ausschließlich zirkulär angeordnet, sondern können der geometrischen Form eines multizellulären Aggregates zugeordnet werden. Exemplarisch in (Abbildung 4–36) ist eine Aggregat, welches vermutlich aus der Fusion von mindestens zwei Einzelaggregaten entstanden ist, dargestellt, das eine Länge von $977 \mu\text{m}$ und eine Breite von $422 \mu\text{m}$ aufweist. Deutlich erkennbar ist die Übereinstimmung der mikroskopisch bestimmten Morphologie mit den Bereichen erhöhter Signalauslöschung, die mit dem MRT bestimmt wurden.

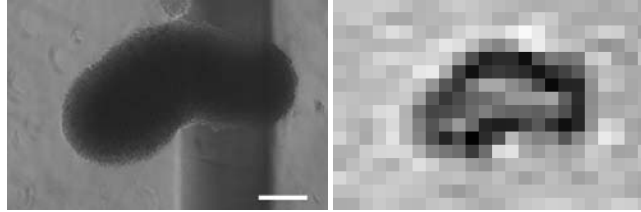


Abbildung 4–36: Korrelation zwischen mikroskopisch ermittelten Strukturen und den MRT-Daten:

Ein Vergleich zwischen der Phasenkontrastaufnahme eines multi-zellulären Aggregates lässt Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen zellulärer Struktur und der Signalauslöschung, die in der MRT-Aufnahme beobachtet wurde, zu. Die Schichtdicke betrug $78\ \mu\text{m}$. Der vertikale Balken im linken Bild stellt einen Steg innerhalb der Kulturschale dar. Maßstab: A1 und B1: $200\ \mu\text{m}$.

4.3 Erstellung lentiviraler Plasmide und Viren für die Überexpression optischer Reportergene

4.3.1 Erstellung des Vektors pLV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin

Das 718 bp lange mCherry Gen wurde aus dem Vektor pcDNA-3.1(+) durch eine Inkubation mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *XhoI* ausgeschnitten und in die, mit *SpeI* und *XhoI* eröffnete, Multiple Klonierungsstelle (MCS) der prälentiviralen DNA pLV-CMV-IRES-Puromycin-N-Acetyltransferase integriert.

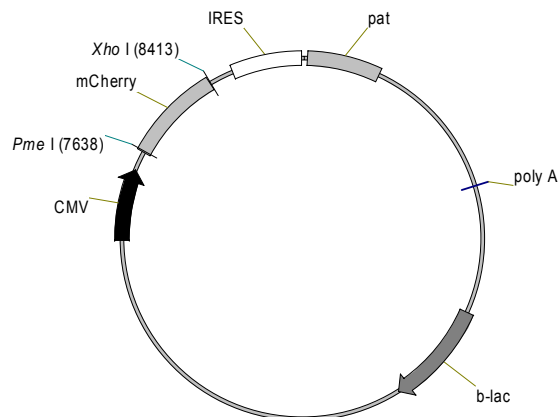


Abbildung 4–37: Vektorkarte von pLV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:

Nach dem Einfügen des 718 bp langen mCherry-Gens, stromabwärts des Zytomegalovirus-Promotors (CMV), weist das gesamte prälentivirale Plasmid eine Größe von 9197 bp auf. Die Puromycin-N-Acetyltransferase (*pat*) befindet sich stromabwärts der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES). Die lentiviralen Verpackungselemente wurden in der Abbildung nicht dargestellt. Die Ampicillinresistenz wird durch die β -Lactamase (*b-Lac*) kodiert.

Die Virusproduktion konnte, nach Transfektion des Drei-Plasmidsystems in 293T Zellen durchgeführt werden und ein Titer von 163 ng mL^{-1} produziert werden. Die Titerbestimmung erfolgte nach der Reinigung der infektiösen Partikel mittels eines HIV-p24-ELISAs

Die prinzipielle Transduktionseffizienz der infektiösen Partikel wurde an drei verschiedenen Zelllinien überprüft.

Nach der Transduktion der murinen Brustkrebszelllinie SMF mit einer MOI von 5 für 24 h, konnte die optimale Puromycinkonzentration für die Selektionierung ermittelt werden (Abbildung 4–38). Die Abbildung verdeutlicht den Prozess der Erstellung der stabilen mCherry⁺-Zelllinie. Zwei Tage nach der viralen Infektion wiesen etwa 80 % der Zellen eine mCherry-Expression auf (Abbildung 4–38 A1 und A2). Die Anzahl der mCherry⁺-Zellen reduzierte sich im Verlauf der folgenden vier Tage auf < 50 %. (Abbildung 4–38 B1 und B2). Durch die Zugabe von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Puromycin zum Kulturmedium konnten die mCherry⁺-Zellen innerhalb von 4 d eliminiert werden (Abbildung 4–38 C1 und C2).

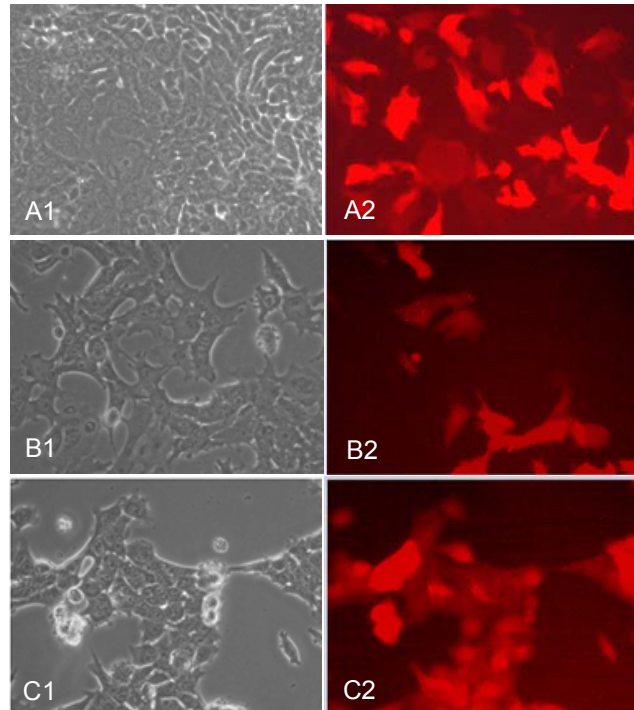


Abbildung 4–38: Lentivirale Transduktion der murinen Brustkrebszelllinie SMF mit LV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:

Die lentivirale Transduktion wurde mit einer MOI von 5 durchgeführt. Etwa 80 % der Zellen exprimieren zwei Tage nach der Infektion das mCherry-Protein (Phasenkontrast-aufnahme A1 und korrespondierende Fluoreszenzaufnahme A2). Im Verlauf der nächsten 4 d reduzierte sich die Anzahl mCherry⁺-Zellen auf < 50 % (B1 und B2). Durch die Zugabe von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Puromycin konnte innerhalb von 4 d eine Eliminierung der nicht-transduzierten Zellen erreicht werden (C1 und C2).

Es wurden mit dieser Zelllinie keine weiteren Versuche in dieser Arbeit durchgeführt. Die Zellen wurden an das Labor von Professor Peter Friedl, Universität Eindhoven, Niederlande abgegeben.

Bei der Transduktion der immortalisierten humanen neuralen Vorläuferzelllinie hc-NCS-F7b, die bereits eine Expression von GFP aufwies, konnte der Einfluss von zwei verschiedenen Viruspartikelkonzentrationen auf die Expressionsstärke des mCherry-Proteins dokumentiert werden. Deutlich erkennbar ist die niedrigere Transduktionseffizienz und schwächere Expression nach Infektion mit der MOI von 1 im Vergleich zur doppelten Viruspartikelkonzentration (Abbildung 4–39 A1-A3 und B1-B3). Die Transduktionseffizienz betrug etwa 95 %. Diese hohe Transduktionseffizienz konnte ebenfalls nach der lentiviralen Infektion der humanen Glioblastomzelllinie Gli36 Δ EGFR erreicht werden (Abbildung 4–39 C1 und C2).

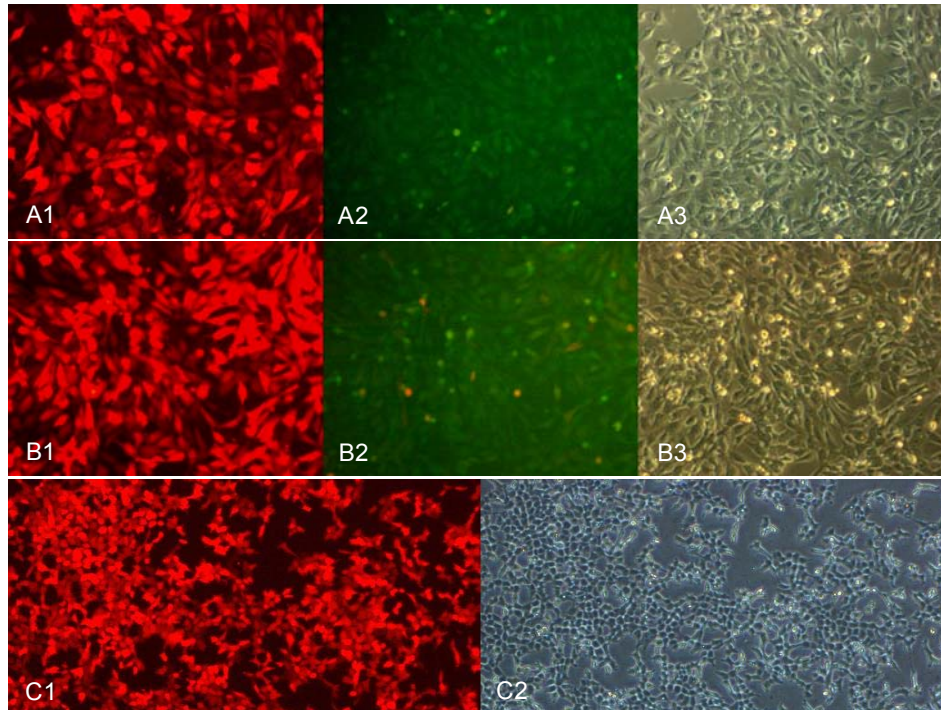


Abbildung 4–39: Transduktion einer humanen neuronalen Vorläuferzelllinie und einer humanen Glioblastomzelllinie mit LV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:

Eine immortalisierte neuronale GFP⁺-Vorläuferzelllinie wurde mit einer MOI von 1 (A1-A3) des Lentivirus LV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin transduziert. Die Zellen weisen nach der Transduktion eine starke Expression des mCherry Proteins auf (A1). Die Transduktionseffizienz ließ sich mit der doppelten Konzentration von Viruspartikeln steigern (B1). Zum Vergleich wurde die GFP-Expression dargestellt (A2 und B2). Die hohe Transduktionseffizienz des Virus von > 95 % konnte ergänzend auch nach der Infektion der Zelllinie Gli36ΔEGFR bestätigt werden (C1 und C2). A3, B3, C2 stellen phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen dar. A1, B1, C1: mCherry-Fluoreszenz; A2, B2: GFP-Fluoreszenz.

4.3.2 Erstellung des Vektors pLV-CMV-mCherry-IRES-GFP

Das 718 bp lange mCherry Protein wurde aus dem Vektor pCDNA-3.1(+) durch einen Restriktionsverdau mit *NheI* und *XhoI* ausgeschnitten und in die mit *SpeI* und *XhoI* eröffnete Multiple Klonierungsstelle der prälentiviralen DNA pLV-CMV-IRES-GFP integriert.

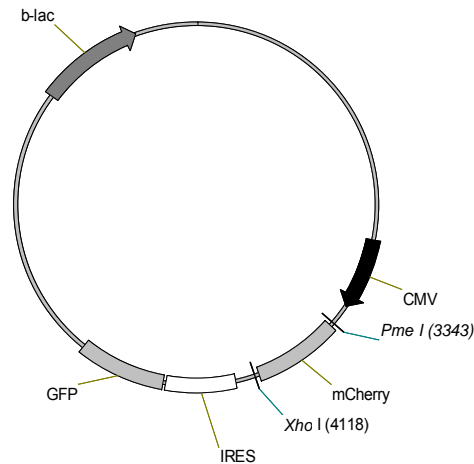


Abbildung 4–40: Vektorkarte von pLV-CMV-mCherry-IRES-GFP:

Das Gen für mCherry wurde stromabwärts des CMV-Promotors kloniert. Eine Koexpression von mCherry und GFP wurde durch das IRES-Element verwirklicht. Die Ampicillinresistenz wird durch β -Lactamase (b-lac) kodiert. Die Gesamtgröße des Plasmids beträgt 9224 bp.

Die Virusproduktion wurde nach Transfektion des 3-Plasmidsystems in 293T Zellen durchgeführt. Es konnte ein Titer von 221 ng mL^{-1} hergestellt und für weitere Transduktionsexperimente verwendet werden.

293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pLV-CMV-mCherry-IRES-GFP transfiziert. Die Expression der beiden Reporter konnte mit Fluoreszenzmikroskopie validiert werden (Abbildung 4–41 A). Die Transfektionseffizienz lag bei etwa 75 %. Alle untersuchten Zellen wiesen eine Expression des mCherry Proteins (Abbildung 4–41 A) und von GFP (Abbildung 4–41 A) auf. Abbildung 4–41 A zeigt die Koexpression der beiden Proteine in den untersuchten Zellen (Abbildung 4–41 A).

Die transfizierten Zellen wurden in einem Transplantationsexperiment verwendet. Bei einer Nacktmaus erfolgte eine intrazerebrale Injektion von $2,3 \times 10^5$ Zellen. Ergänzend wurden $5,8 \times 10^6$ Zellen subkutan in die rechte Flanke der Maus implantiert. Die intrazerebral lokalisierte Expression von mCherry wurde *in vivo* mit dem Photonen-Bildgebungssystem nachgewiesen (Abbildung 4–41 B). Die subkutan injizierten Zellen konnten deutlich lokalisiert werden (oranger Pfeil in Abbildung 4–41 B). Eine GFP-Expression konnte sowohl bei dem intrazerebral lokalisierten Tumor, als auch bei dem subkutanen Tumor nicht nachgewiesen werden.

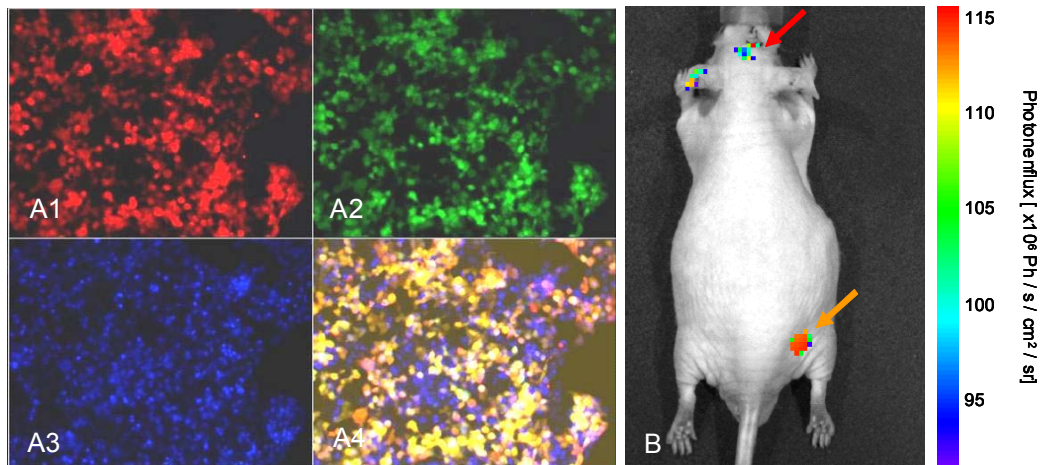


Abbildung 4–41: Intrazerebrale Transplantation und immunzytochemische Analyse von mCherry⁺ und GFP⁺-293T Zellen:

293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pLV-CMV-mCherry-IRES-GFP transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Expression von mCherry (A1) und GFP (A2) konnte in etwa 75 % der Zellen nachgewiesen werden. Nach Anfärbung der Nuklei (A3) und der Überlagerung der Bilder konnte die Koexpression in allen transfizierten Zellen nachgewiesen werden (A4). Nach intrazerebraler- und subkutaner Transplantation der Zellen konnte eine schwache mCherry Expression intrazerebral (roter Pfeil in B) und eine stärkere Photonemission subkutan (oranger Pfeil in B) nachgewiesen werden.

Die Transduktionskompetenz der Lentiviren wurde an 293T-Zellen analysiert. Die Infektion der Zellen mit einer MOI von 1 resultierte in einer Transduktionseffizienz von > 90 % nach 48 h (Abbildung 4–42). Es konnten keine zytotoxischen Effekte festgestellt werden.

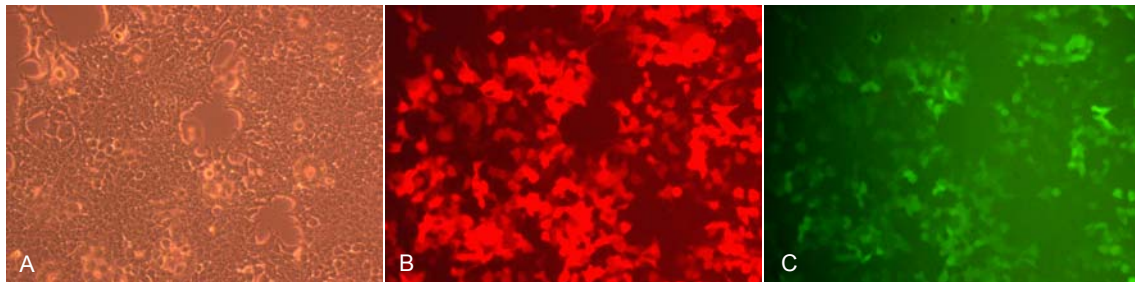


Abbildung 4–42: Transduktion von 293T-Zellen mit LV-CMV-mCherry-IRES-Puromycin:

293T-Zellen wurden mit einer MOI von 1 transduziert. Die Transduktionseffizienz lag bei > 90 %. A) Phasenkontrastaufnahme; B) mCherry-Expression; C) GFP-Expression.

4.3.3 Erstellung des Vektors pLV-CMV-Luziferase-IRES-Puromycin

Aus dem Vektor pGL3 wurde das Gen für die *firefly*-Luziferase durch eine Inkubation mit den Restriktionsenzymen *Xba*I- und *Xho*I geschnitten und nach Agarosegelreinigung in den Vektor pLV-IRES-Puromycin integriert (Abbildung 4–43).

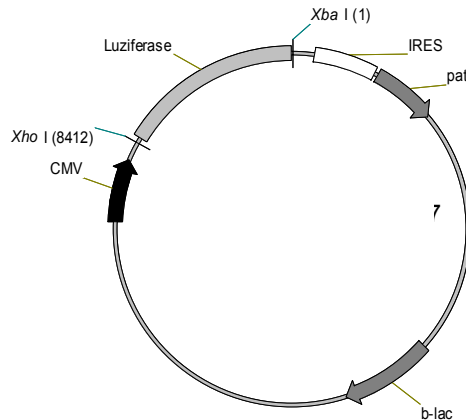


Abbildung 4–43: Vektorkarte des Plasmids pLV-CMV-Luziferase-IRES-Puromycin:

Das Gen für die *firefly*-Luziferase wurde aus dem Vektor pGL3 geschnitten und in pLV-IRES-Puromycin ligiert. Die Gesamtgröße beträgt 10121 bp. . Die Ampicillinresistenz wird durch β -Lactamase (b-lac) kodiert und die Puromycinresistenz durch die Expression der Puromycin-N-Acetyltransferase (pat).

Durch die Virusproduktion in 293T-Zellen konnte ein Titer von 350 ng mL^{-1} isoliert werden, der für die weiteren Transduktionen zur Verfügung stand.

Eine Transduktion der humanen Glioblastozelllinie Gli36 Δ EGFR wurde mit der MOI von 1 und 5 durchgeführt. Diese, mit der niedrigen MOI transduzierte Zelllinien wurden in weiteren Experimenten in dieser Arbeit nach Einzelzellselektionen verwendet.

Von 10 Klonen, die durch die Einzelzellselektionierung isoliert werden konnten, wurde innerhalb einer Verdünnungsserie die Zellzahl zu emittierten Photonen korreliert (Abbildung 4–44). Bei allen Zellen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellmenge und dem Photonenflux gefunden werden. Von den 10 Klonen wurde Klon #4 ausgewählt und anschliessend für Experimente verwendet. Von diesem Klon wurde eine weitere Einzelzellklonierung durchgeführt, aus der Klon #4/2N ausgewählt wurde.

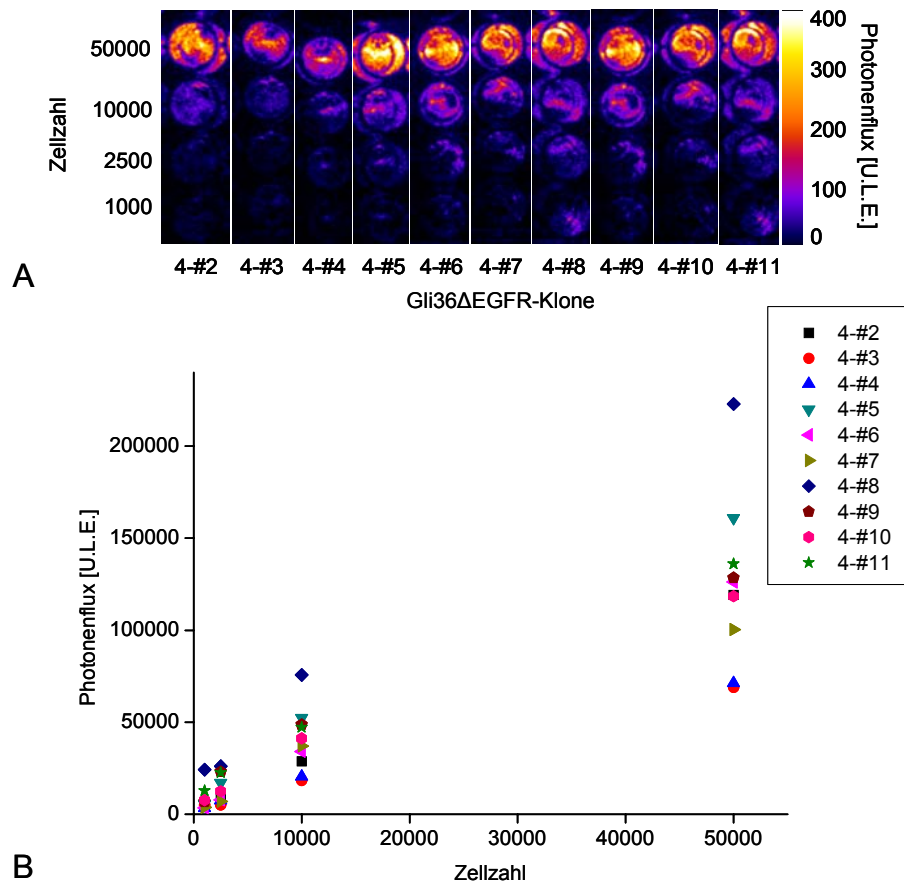


Abbildung 4–44: Einzelzellklonierung und Charakterisierung des Photonenfluxes von 10 Klonen der Zelllinie Gli36ΔEGFR-CMV-Luziferase:

Es wurden 10 Klone der Zelllinie isoliert und eine Korrelation der Zellmenge und des Photonenfluxes vorgenommen (A) Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellmenge und dem detektierten Photonenflux dokumentiert werden (B).

4.4 Herstellung und Funktionsüberprüfung eines liposomalen Systems für den effektiven Transport von superparamagnetischen Eisenpartikeln

4.4.1.1 Erstellung der Liposomenpräparationen

Um eine effektive Aufnahme von superparamagnetischen Partikeln in Zellen zu erzielen, werden kommerziell erhältliche Lipofektionsmittel verwendet. Es wurden in dieser Arbeit durch eine Ultraschallbehandlung kationische Liposomen erstellt, die aus den beiden Komponenten 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (DOPE) und einem Cholesterol-Derivat (DC-Chol) bestehen. Durch die Generierung eigener liposomaler Trägersysteme wurden proteinbiochemische Modifikationen möglich, die mit kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien nicht möglich waren. Im ersten Teil wurde ein Fluorochrom an die Kopfgruppen des Phospholipids kovalent gebunden. Im zweiten Teil wurde ein Fluoreszeinderivat durch Ausbildung einer Amidbindung an die aminoterminalen Gruppe auf der Oberfläche des superparamagnetischen Partikels konjugiert. Der Schwerpunkt lag auf der Untersuchung, ob ein effektiverer Transport von superparamagnetischen Partikeln erfolgen kann, wenn die SPIOs während der ultraschallvermittelten Bildung der Liposomen in das Innere des Liposoms integriert werden.

Das Syntheschema inklusive der Modifikation mit dem Fluorochrom 5- (und 6-)Karboxyfluoreszein-Succinimidylester ist schematisch dargestellt (Abbildung 4–45), wobei die aminoterminalen Gruppe entweder die superparamagnetischen Partikel oder die Kopfgruppe des Dioleoylphosphatidylethanolamins repräsentiert.

Liposomen mit einem mittleren Durchmesser zwischen 150 nm und 300 nm können durch ein Gemisch des Cholesterinderivates 3β [N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl] Cholesterol (DC-Chol) und 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphorylethanolamin (DOPE) durch eine Ultraschallbehandlung gebildet werden. Nach der durchgeführten Ultraschallbehandlung konnte eine optische Klärung der Fettsäurelösung beobachtet werden, die eine erfolgreiche Suspendierung und Bildung der Liposomen andeutete.

Die hergestellten Liposomen wurden für eine Lipofektion mit dem Plasmid pcDNA3.1-CMV-mCherry in PC12-Zellen und 293T-Nierenzellen verwendet. 48 h nach der Transfektion konnte eine zytoplasmatische Expression des mCherry-Proteins nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der Liposomenbildung wurden die Proben elektronenmikroskopisch mit Vergrößerungen zwischen 85 000x und 140 000x nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat untersucht. Bei den Proben, die nur Fettsäuren enthielten, konnten keine organisierten Strukturen identifiziert werden. Bei den Proben, die nach der Ultraschall-

behandlung untersucht wurden, konnten größere Ansammlungen von negativ kontrastierten Fettsäuren beobachtet werden, die eine organisierte Struktur mit Durchmessern von ca. 200 nm aufwiesen (Abbildung 4–46).

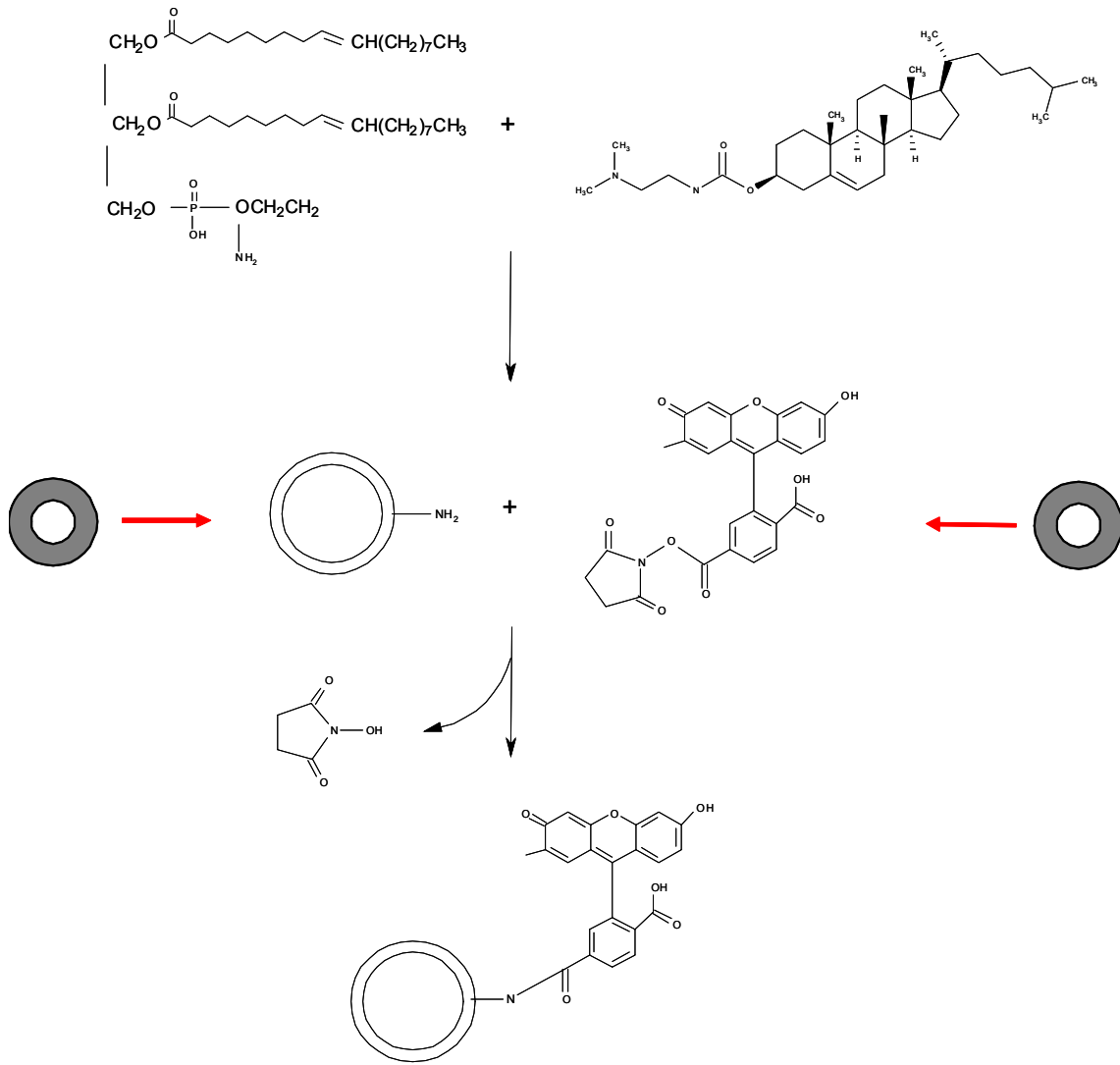


Abbildung 4–45: Präparation von Liposomen für den intrazellulären Transport von superparamagnetischen Partikeln und DNA:

3β-[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl] Cholesterol (DC-Chol) und 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphorylethanolamin (DOPE) wurden im Verhältnis 1,5 : 1 gemischt. Durch nachfolgende Ultraschallbehandlung bilden sich Liposomen, die für einen intrazellulären Transport von SPIOs verwendet werden können oder zusätzlich, mit der kovalenten Addition von dem Fluorochrom 5- (und 6-) Karboxyfluoreszein-Succinimidylester, modifiziert werden können. In dieser Arbeit wurde das Fluoreszein-Derivat zusätzlich an SPIOs, die eine aminoterminalen Gruppe auf der Oberfläche tragen, gekoppelt (graue Kreise repräsentieren schematisch die SPIOs).

Um einen intrazellulären Transport der Partikel lichtmikroskopisch nachzuweisen, wurden Liposomen mit SPIOs für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu 293T Zellen, die adhären wuchsen, zugefügt. Zur Kontrolle wurde eine Inkubation mit den negativ geladenen superparamagnetischen Partikeln durchgeführt. Die DAB-verstärkte Berlinerblau-Färbung

zeigt deutlich ein Vorhandensein von zytoplasmatisch lokalisierten Eisenpartikeln an (Abbildung 4–47 A2 und A3). Nach Inkubation mit der doppelten Konzentration von Liposomen konnte visuell keine intensivere Berlinerblau-Färbung dokumentiert werden (Abbildung 4–47 C).

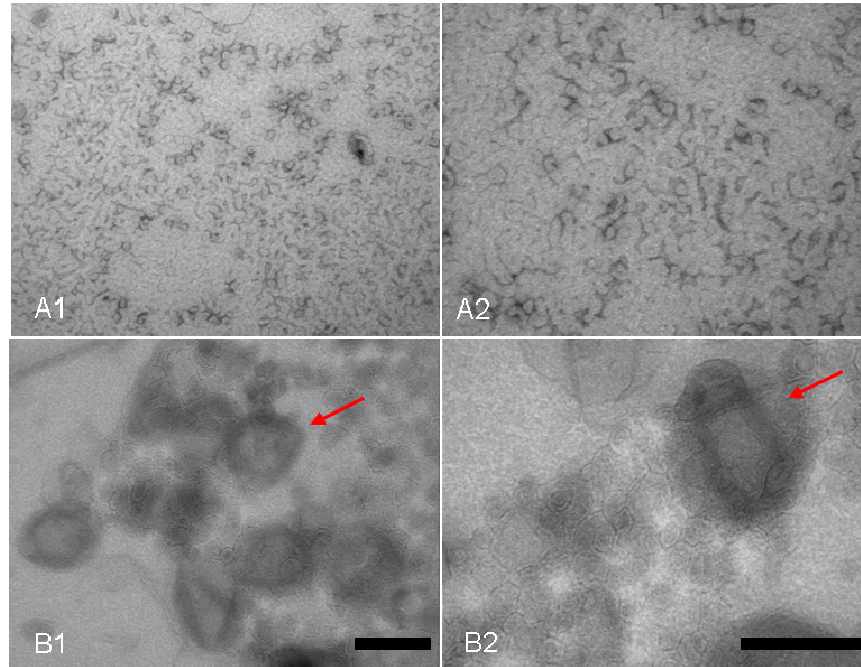


Abbildung 4–46: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Liposomenbildung:

Durch eine Negativkontrastierung mit Uranylacetat wurde die Liposomenpräparation vor der ultraschallvermittelten Liposomenbildung untersucht (A1 und höhere Vergrößerung A2). Nach der Ultraschallbehandlung bildeten sich kontrastreiche organisierte Strukturen aus, die auf eine erfolgreiche Bildung der Liposomen schließen lassen (B1 und höhere Vergrößerung B2). Maßstab: 200 nm

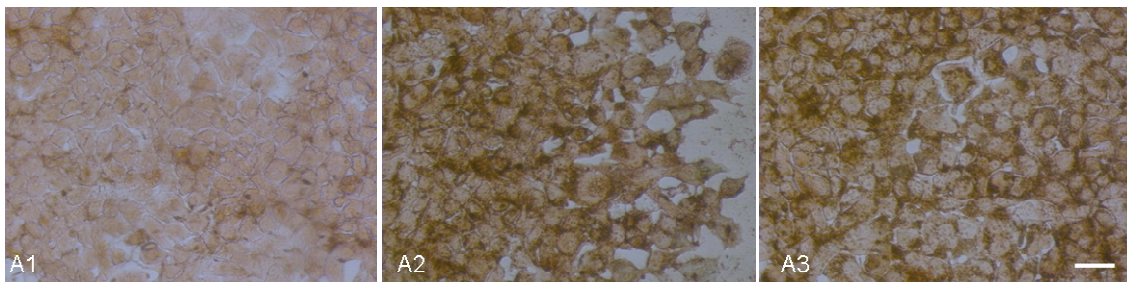


Abbildung 4–47: Histologische Untersuchung des Transportes superparamagnetischer Partikel:

293T-Zellen wurden mit SPIOs, die eine negative Oberflächenladung aufwiesen, für 3 h inkubiert (A1). Unter diesen Bedingungen konnten mittels DAB-verstärkter Berliner-Blau-Färbung keine eisenhaltigen Partikel nachgewiesen werden. Nach 20 min Vorinkubation der SPIOs mit den generierten Liposomen (A2) konnte in nahezu 100 % eine erfolgreiche Aufnahme der Partikel beobachtet werden. Der Berliner-Blau-Nachweis wird nach Inkubation mit der doppelten Konzentration von Liposomen nicht deutlicher (A3).

4.4.1.2 Liposomal vermittelter Transport von superparamagnetischen Partikeln in PC12-Zellen

Für die Inkubation der superparamagnetischen Partikel wurden zwei Strategien verwendet, bei der entweder die SPIOs nach der ultraschallvermittelten Liposomenausbildung zusammen mit diesen inkubiert wurden, oder bei der ultraschallvermittelten Liposomenausbildung präsent waren.

Die Inkubation der SPIOs mit bereits ausgebildeten Liposomen stellt das methodische Vorgehen bei Verwendung von kommerziell erhältlichen Transfektionsmitteln dar. Daher wurde zur Kontrolle und zum Vergleich der Transfektionseffizienz das Transfektionsreagenz Lipofectamin verwendet.

Die Inkubationsdauer der unterschiedlichen Ansätze betrug in allen durchgeführten Versuchen drei Stunden. Die Zellen wurden anschließend mittels hochaufgelöstem MRT, spektralphotometrischem Eisentest und Immunzytochemie untersucht. Die Präsenz und Verteilung der einzelnen Zellen in den Proben, die für die MRT-Messungen verwendet wurden, wurde lichtmikroskopisch überprüft, um Zellkonzentrationsschwankungen beim Vergleich der unterschiedlichen Gruppen untereinander auszuschließen.

Die Minimum-Intensitäts-Projektion der MRT-Aufnahmen, die mit einer Echozeit von $TE = 18$ ms durchgeführt wurden, zeigt bei den Inkubationsbedingungen, in denen SPIOs mit bereits ausgebildeten Liposomen inkubiert wurden, bei allen drei untersuchten Zellkonzentrationen von 12 500 Zellen, 5000 Zellen und 1000 Zellen eine deutliche Signalauslöschung im Vergleich zum Hintergrund (Abbildung 4–48, Gruppe 1).

Es wurden zwei verschiedene experimentelle Bedingungen gewählt, um den Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die intraliposomale Inkorporation der SPIOs zu untersuchen. Ein Teil der SPIO-Partikel wurde während der Ultraschallbehandlung zugegeben und nach Ausbildung der Liposomen neun weitere Teile (Abbildung 4–48, Gruppe 2), oder die gesamte Konzentration der SPIOs wurde während der Ultraschallbehandlung der Lösung von DOPE und DC-Chol zugefügt. (Abbildung 4–48, Gruppe 3). Im Vergleich dieser beiden Präparationen zeigt sich, dass unter den Bedingungen von Gruppe 3 eine signifikant höhere Menge an Eisenpartikeln von den Zellen aufgenommen wurde.

Zur Kontrolle wurde die Aufnahme von SPIOs, nach Inkubation mit DOPE und DC-Chol ohne eine Ultraschallbehandlung (Abbildung 4–48, Gruppe 4) und nach der Inkubation mit den SPIOs das Transfektionsmittel Lipofectamin (Abbildung 4–48, Gruppe 5) untersucht. Bei beiden Ansätzen konnte der Transport von Eisenpartikeln nachgewiesen werden, der aber deutlich geringer war als in Gruppe 3.

Nach der Inkubation mit negativ geladenen Partikeln ohne die Zugabe der Liposomen konnte bei keiner Zellkonzentration eine Veränderung der Signalintensität im Vergleich zum Hintergrundsignal detektiert werden (Abbildung 4–48, Gruppe 6).

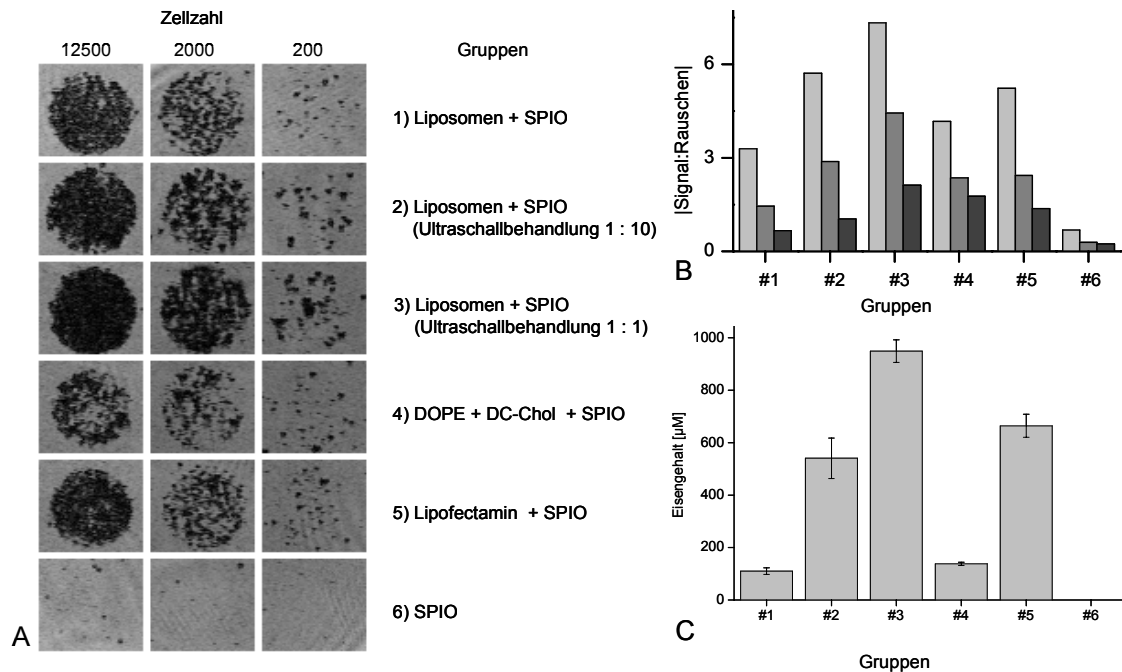


Abbildung 4–48: Analyse der intrazellulären Aufnahme von superparamagnetischen Partikeln bei Verwendung von DOPE und DC-Chol:

PC12 Zellen wurden mit negativ geladenen superparamagnetischen Partikeln unter den folgenden Konditionen inkubiert und mittels MRT (A) mit der Echozeit TE = 18 ms untersucht: Gruppe 1: Liposomen nach der Ultraschallbehandlung mit SPIOs inkubiert; Gruppe 2: Liposomen während der Ultraschallbehandlung inkubiert mit einem Teil und anschließend mit neun Teilen der SPIO-Konzentration; Gruppe 3: Zugabe der gesamten SPIO-Konzentration während der Ultraschallbehandlung; Gruppe 4: DOPE + DC-Chol + SPIOs ohne anschließende ultraschallinduzierte Liposomenbildung; Gruppe 5: Verwendung des kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzes Lipofectamin; Gruppe 6: Inkubation der Zellen mit negativ geladenen SPIOs. Untersucht wurden die Zellmengen 12500 Zellen, 5000 Zellen und 1000 Zellen, jeweils in einem Volumen von 2 µL.

Das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen wurde als Grundlage für die quantitative Auswertung der erhobenen MRT-Daten verwendet (B). Dabei repräsentieren die Balkenfarben hellgrau 12500 Zellen, dunkelgrau 5000 Zellen und schwarz 1000 Zellen.

Korrespondierend zu den MRT-Untersuchungen wurde der Eisengehalt der sechs Gruppen mittels spektralphotometrischer Eisentests untersucht (C). Es wurden 4×10^5 Zellen für die Eisenkonzentrationsbestimmung von jeder Gruppe eingesetzt. Die Experimente wurden in $n = 3$ unabhängigen Stichproben durchgeführt.

Bei der detaillierten Beurteilung der Minimum-Intensitäts-Projektion fällt die punktuelle Verteilung der Bereiche erhöhter Signalauslöschung auf. Die PC12-Zellen weisen ein charakteristisches Wachstum in Zellgruppen auf. Um die Zellen für die Phantome, die für MRT-Untersuchungen verwendet wurden, möglichst homogen verteilen zu können, wurden verschiedene Zelldissoziationsansätze verglichen. Verwendet wurden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies PBS, Ethylendiamintetraacetat, Accutase und Trypsin, jeweils gefolgt von einer mechanischen Behandlung mittels einer Pipette. In allen Ansätzen konnten die PC12-Zellen nicht effektiv voneinander getrennt werden, wodurch die Untersuchung von homogen verteilten Einzelzellsuspension nicht möglich war.

Die Auswertung des quantitativen spektralphotometrischen Eisentests bestätigt in allen Gruppen die mit dem MRT erhaltenen Daten (Abbildung 4–48 C). Es konnte unter Verwendung der Bedingung von Gruppe 3 ein Eisengehalt von 899,8 μM Eisen in den Zellen nachgewiesen werden. Die Eisenkonzentration in der Gruppe 1 betrug 109,8 μM . Bei Inkubation der negativ geladenen SPIOs ohne Verwendung eines Transfektionsmittels wurde eine Eisenkonzentration von 4,8 μM festgestellt.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung, unter Verwendung eines FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörpers zur Lokalisation der superparamagnetischen Partikel, konnten die Analysen bestätigt werden. Die roten Pfeile in Abbildung 4–49 weisen auf die eindeutig identifizierbaren SPIO-Partikel oder auf zusammen gelagerte Komplexe von Partikeln hin. Bei der Inkubation der SPIOs, ohne Verwendung von DOPE + DC-Chol (Gruppe 4) oder Liposomen (Gruppe 6), konnten mit dem anti-Dextran-Antikörper keine Partikel nachgewiesen werden.

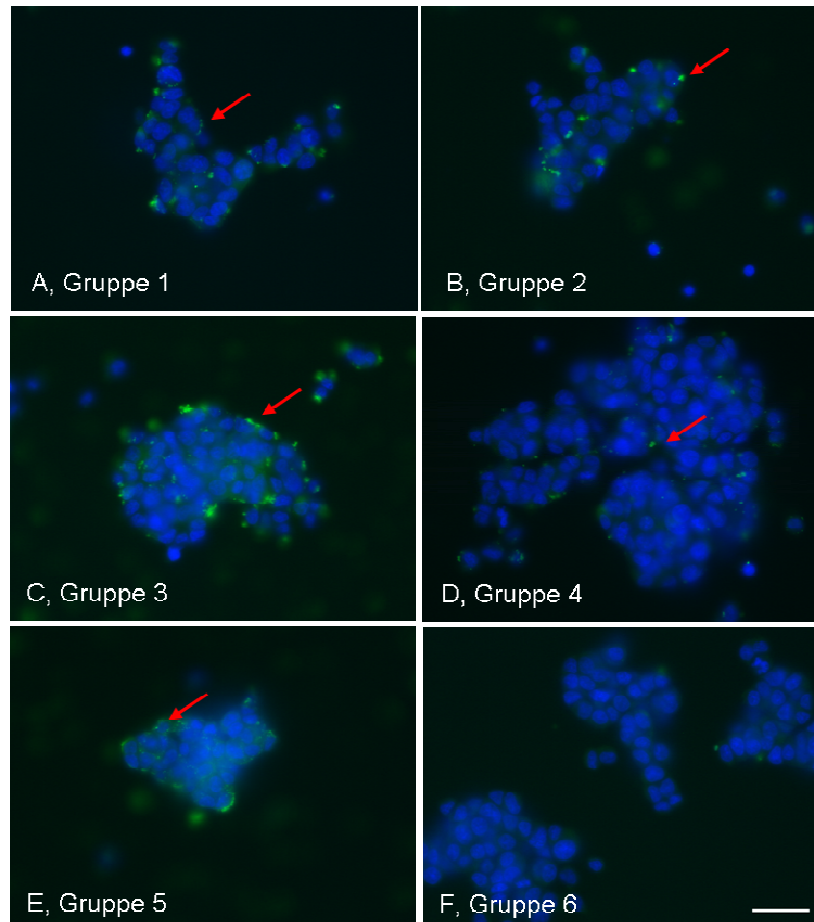


Abbildung 4–49: Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Detektion der superparamagnetischen Partikel in den Zellen:

Die immunzytochemische Analyse wurde an PC12 Zellen durchgeführt, die 3 h mit den superparamagnetischen Partikeln unter den Bedingungen, wie in der Abbildungslegende von Abbildung 4–48 angegeben, inkubiert wurden (Gruppen 1 bis 6). Der rote Pfeil weist auf einzelne oder kleinere Gruppen zusammengelagerter Dextran⁺ SPIOs hin. Farbnachweis: grün: FITC-konjugierter anti-Dextran-Antikörper; blau: Hoechst Dye 33342. Maßstab: 25 μm .

4.4.1.3 Aufnahme der superparamagnetischen Partikel in menschliche 293T-Zellen

Um die universelle Anwendbarkeit der hergestellten Liposomenpräparationen zu überprüfen, wurden die Inkubationsexperimente an 293T-Zellen durchgeführt. Die 293T-Zellen zeichnen sich, im Gegensatz zu den PC12-Zellen, darüber hinaus durch ein größeres Zytoplasma zu Zellkern Verhältnis aus, welches für die Untersuchung des intrazellulären SPIO-Transportes und deren Visualisierung von Vorteil ist.

Die Minimum-Intensitäts-Projektionen reflektieren eine zahlreiche Aufnahme der superparamagnetischen Partikel. Es wurden bei diesen Experimenten die Minimum-Intensitäts-Projektionen von Messungen ausgewertet, die mit einer Echozeit von $TE = 5$ ms und $TE = 18$ ms durchgeführt wurden (Abbildung 4–50 A und B). Insgesamt sind die Zellen in den einzelnen Proben homogen verteilt. Der Anteil von Zellen, die in Gruppen angeordnet sind, tritt im Vergleich zu den PC12-Zellen in deutlich reduzierter Anzahl auf.

In diesen Experimenten wurde die Echozeit von 5 ms in die Auswertungen einbezogen, da eine höhere Inkorporation von superparamagnetischen Partikeln, aufgrund des größeren Zytoplasma zu Zellkern Verhältnis, vorausgesetzt wurde. Die Verwendung einer kleineren Echozeit bietet die Möglichkeit einer Beurteilung der T_2^* Effekte aufgrund der SPIO-Inkorporation. Wegen der erhöht auftretenden Suszeptibilitätsartefakte bei der Echozeit von $TE = 18$ ms ist dies nicht möglich (Abbildung 4–50 B). Die Gruppeneinteilung entspricht der Aufteilung der Experimente mit den PC12-Zellen. Die Detektion der Zellen mit der Echozeit von $TE = 5$ ms zeigt bei den Zellmengen ≥ 5000 Zellen in allen Gruppen eine deutlich niedrigere Signalintensität im Vergleich zum Hintergrundsignal aller fünf Gruppen. Die Kontrollzellen konnten bei keiner der untersuchten Zellkonzentrationen detektiert werden. Für die quantitative Auswertung wurde das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen bestimmt. Die Verwendung der Liposomen, bei denen während des Ultraschallprozesses superparamagnetische Partikel inkubiert wurden, zeigt das größte Kontrast : Gelrauschen-Verhältnis (Abbildung 4–50 A und B, #3). Bei Zellmengen ≤ 1000 Zellen kann eine deutliche Identifikation der hypointensen Signale nur noch bei den Gruppen 3 und 5 bei der Echozeit von $TE = 5$ ms gemessen werden, während bei $TE = 18$ ms eine deutliche Abgrenzung vom Hintergrund möglich war (Abbildung 4–50 A und B). Bei den geringeren Zellzahlen von ≤ 200 Zellen konnte eine eindeutige Detektion nur noch in den Gruppen 2, 3 und 5 bei beiden verwendeten Echozeiten erzielt werden.

Die Untersuchung des Eisengehalts mit dem quantitativen Eisentest bestätigt die MRT-Ergebnisse. Für die Untersuchung wurden 4×10^5 Zellen verwendet. Die aufgenommene Eisenmenge bei Gruppe 3 betrug $851,5 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $476,8 \mu\text{M}$ in der Gruppe, in der die SPIOs nach der Ausbildung der Liposomen zugefügt wurden (Abbildung 4–50 C, #1). Bei Gruppe 5 konnte eine Eisenkonzentration von $736,5 \mu\text{M}$ detektiert werden.

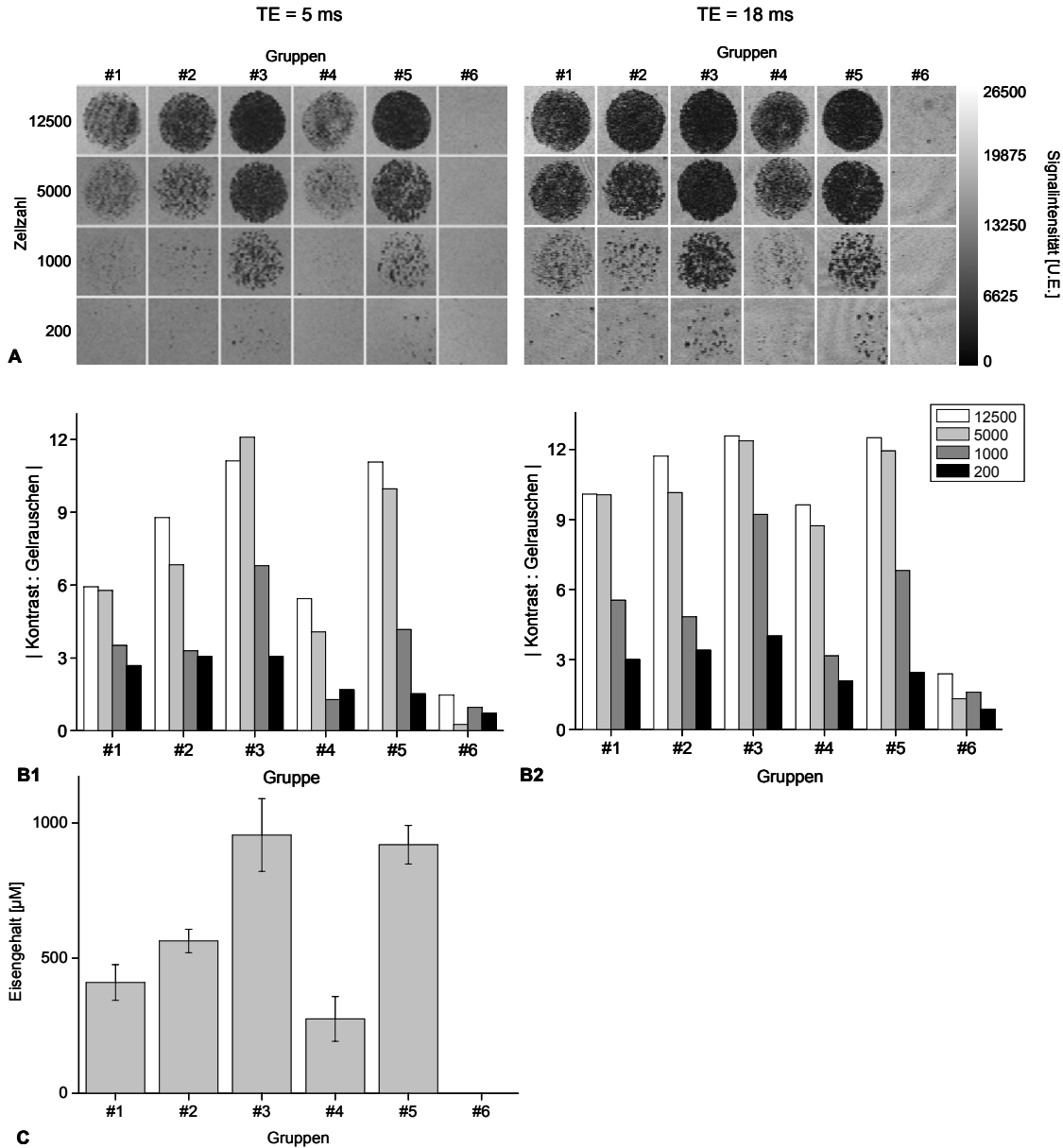


Abbildung 4–50: Analyse der intrazellulären Aufnahme von SPIOs bei 293T-Zellen:

293T-Zellen wurden mit SPIOs unter den folgenden Konditionen inkubiert und mittels MRT mit der Echozeit von TE = 5 ms und TE = 18 ms untersucht (A): Gruppe 1: Liposomen nach der Ultraschallbehandlung mit SPIOs inkubiert; Gruppe 2: Liposomen während der Ultraschallbehandlung mit einem Teil und anschließend mit neun Teilen der SPIO-Menge; Gruppe 3: Zugabe der gesamten SPIO-Menge während der Ultraschallbehandlung; Gruppe 4: DOPE + DC-Chol + SPIOs ohne anschließende ultraschallinduzierte Liposomenbildung; Gruppe 5: Verwendung von Lipofectamin mit Inkubation der SPIOs; Gruppe 6: Inkubation der Zellen mit negativ geladenen SPIOs ohne Liposomen, DOPE oder DC-Chol. Untersucht wurden die Zellmengen 12500 Zellen, 5000 Zellen, 2000 Zellen und 200 Zellen jeweils in einem Volumen von 2 µL. Für die quantitative Analyse wurde das Kontrast : Gelrauschen Verhältnis berechnet. Eine deutlich höhere Menge an SPIOs konnte unter den Bedingungen von Gruppe 3 im Vergleich zu Gruppe 1 intrazellulär nachgewiesen werden (B1 und B2). 4×10^5 Zellen der Gruppen 1-6 wurden mittels spektralphotometrischem Eisentest untersucht. Die Ergebnisse der MRT-Untersuchungen konnten in den Gruppen 1-5 bestätigt werden. In der Gruppe 6, in der nur negativ geladene SPIOs inkubiert wurden, konnte kein Eisen detektiert werden (C).

4.4.2 Konjugation des Fluorochroms 5- (und 6-)Karboxyfluoreszein-Succinimidylester an Liposomen und superparamagnetische Partikel

Unter Ausbildung einer kovalenten Bindung wurde NHS-Fluoreszein für die Konjugation der primären aminoterminalen Gruppe an der Kopfgruppe des Diolelylphosphatidylethanolamins verwendet. Durch die Verwendung eines Fluorochroms zur Markierung der Liposomen konnte die intrazelluläre Aufnahme der Liposomen untersucht werden (Abbildung 4–51).

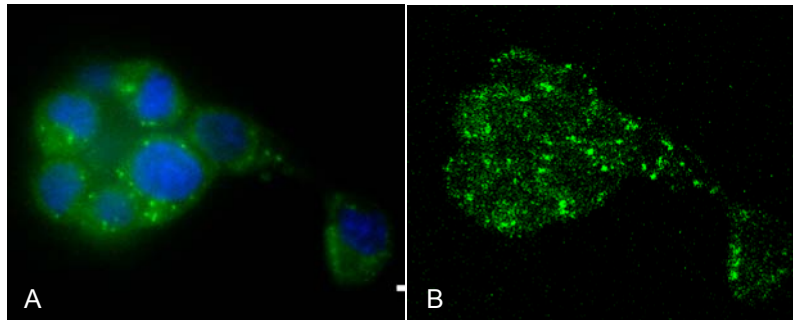


Abbildung 4–51: Konjugation der Kopfgruppen des Diolelylphosphatidylethanolamins mit einem Fluoreszein-Derivat:

Die primäre Aminogruppe der Kopfgruppe von Diolelylphosphatidylethanolamin wurde mit einem Fluoreszein-Derivat konjugiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Eine deutliche zytoplasmatische Verteilung der Fluoreszein⁺- Objekte lässt sich in der klassischen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (A) und nach Laserscanning Mikroskopie (B) darstellen. Blau: Hoechst Dye 33342.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde eine direkte kovalente Bindung des Fluoreszeins an superparamagnetische Partikel erreicht, die eine NH₂-Gruppe an der Oberfläche der aus Dextran bestehenden Hülle tragen.

Die fluoreszeinmarkierten superparamagnetischen Partikel wurden nach Präinkubation mit Liposomen für 3 h auf den PC12 Zellen inkubiert, was zu einer intrazellulären Aufnahme führte (Abbildung 4–52).

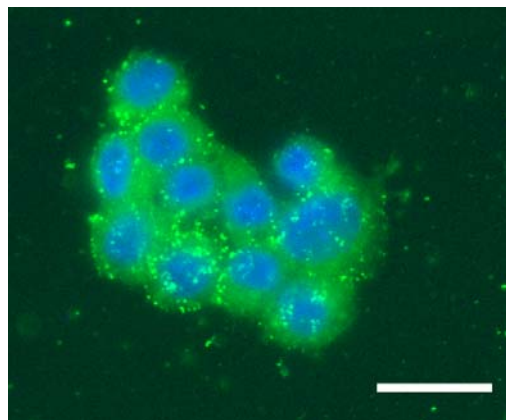


Abbildung 4–52: Konjugation des Fluoreszein-Derivats an superparamagnetische Partikel:

PC12 Zellen wurden mit Liposomen und dem Fluoreszein konjugierten SPIOs (grün) für 3 h inkubiert und die Fluoreszeinfärbung untersucht. Blau: Hoechst Dye 33342. Maßstab: 15 µm.

4.5 Überexpression der modifizierten schweren Kette des Ferritinmoleküls für die MRT-Bildgebung

4.5.1 Erstellung des Vektors pcDNA3.1-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase

Die cDNA für die Expression des Ferritins wurde bereits mit der cDNA für die neun Aminosäure lange YPYDVPDYA-Peptidsequenz eines Epitops des Hämagglutinins (HA) aus dem Influenzavirus am 5'-Ende des Gens für die modifizierte schwere Kette des Ferritinmoleküls fusioniert [14]. In den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) wurde das IRES-Luziferase-Fragment durch einen Restriktionsverdau mit *Bam*HI inseriert. Das mit HA fusionierte Gen für Ferritin wurde in den Expressionsvektor stromaufwärts von dem Fragment IRES-Luziferase ligiert. Durch eine Inkubation mit *Xho*I und *Xba*I und anschließender Ligation wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1(-)-HA-Ferritin-IRES-Luziferase erstellt, der für die Expressionsüberprüfung der beiden Reporter HA-Ferritin und *firefly*-Luziferase in transienten Transfektionen verwendet wurde (Abbildung 4–53). Die Plasmide wurden zur Überprüfung sequenziert.

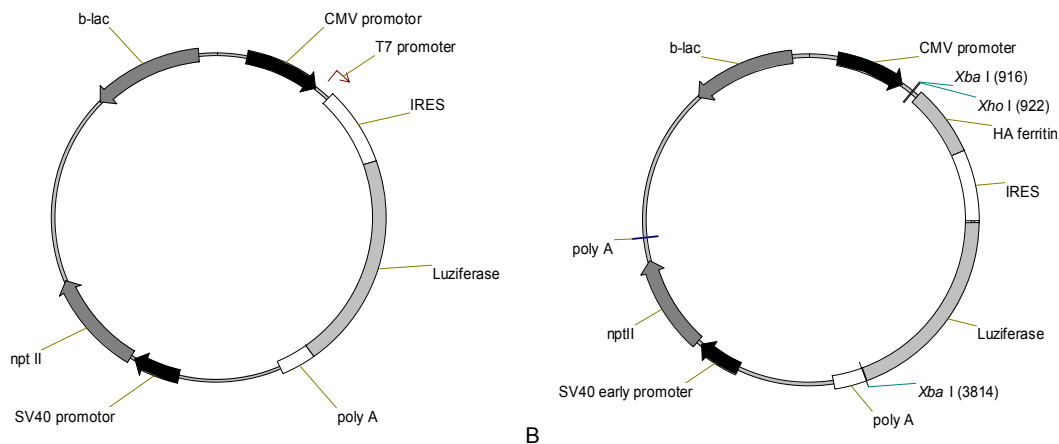


Abbildung 4–53: Vektorkarte der Plasmide pcDNA3.1(+)-IRES-Luziferase und pcDNA3.1(-)-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase:

Stromabwärts des CMV-Promotors befindet sich das Gen, welches für die modifizierte schwere Kette des Ferritinmoleküls kodiert. Am 5'-Ende ist die fusionierte cDNA kodierend für ein Epitop des Hämagglutinins des Influenzavirus lokalisiert. Stromabwärts des HA-Ferritins wurde in Abhängigkeit einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) das Gen für Luziferase ligiert. Die Selektion der prokaryotischen Zellen, in die das Plasmid transformiert wurde, wird durch die Expression der β -Lactamase (b-lac) initiiert. Durch die Expression der Neomycin-Phosphotransferase II (npt II) wird eine Selektionierung nach erfolgreicher Translation im eukaryotischen System erreicht. Die Gesamtgröße des Plasmids beträgt 8585 bp.

4.5.2 Erstellung der Vektoren pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-Puromycin und pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP

Das Fragment HA-Ferritin-IRES-Luziferase wurde aus dem Plasmid pcDNA3.1(+)-HA-Ferritin-IRES-Luziferase durch eine Inkubation mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Xba*I ausgeschnitten und in die Vektoren pRRL-CMV-IRES-Puromycin (A) und pRRL-CMV-IRES-GFP (B) integriert. Die MCS der beiden prälentiviralen-Vektoren wurden durch eine Inkubation mit den Enzymen *Sall* und *Xba*I geöffnet. Das kohäsive Ende, das durch *Sall* entsteht, ist kompatibel zu dem Ende, das durch *Xho*I entsteht (Abbildung 4–54).

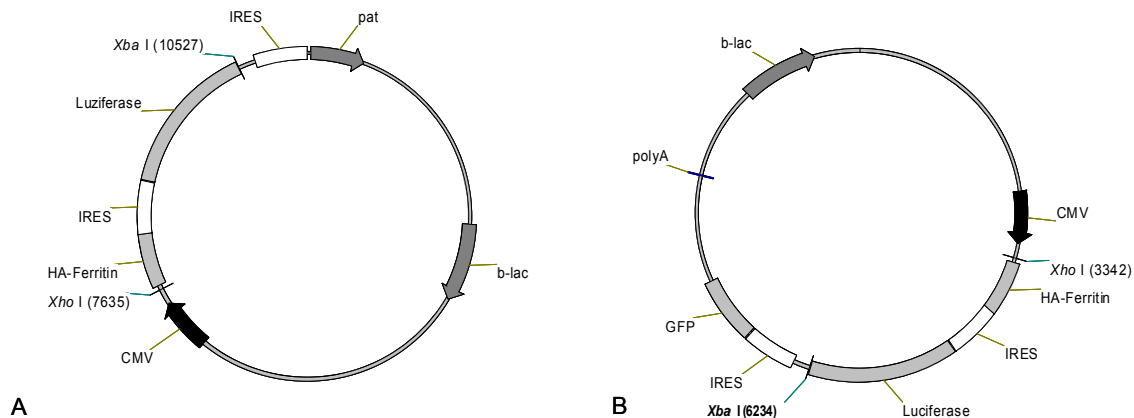


Abbildung 4–54: Vektorkarte der Plasmide pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-Puromycin und pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP:

Die MCS der Vektoren wurden durch eine Inkubation mit *Sall* und *Xba*I geöffnet. Das HA-Ferritin-IRES-Luziferase-Fragment wurde dort eingebracht, sodass das Plasmid pLV-CMV-IRES-Luziferase-IRES-Puromycin eine Größe von 11303 bp aufweist (A). Das Plasmid pLV-CMV-IRES-Luziferase-IRES-GFP hat eine Größe von 11 369 bp (B).

Beide Plasmide wurden in einer transienten Transfektion von 293T-Zellen überprüft.

Von beiden Vektoren wurden Viruspartikel nach Transfektion mit dem 3-Plasmidsystem hergestellt. Der generierte Virustiter von LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-Puromycin betrug 76 ng mL^{-1} und der Virustiter von LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP betrug $29,26 \text{ ng mL}^{-1}$.

Eine Transduktion mit einer MOI von 1 mit beiden Lentiviren wurde bei 293T-Zellen durchgeführt. Eine Expression von GFP konnte zwei Tage nach der Transduktion nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke stieg bis zum vierten Tag an. Zu diesem Zeitpunkt wiesen etwa 20 % der Zellen die Expression von GFP auf (Abbildung 4–55 A1 und A2).

Da bei der Transduktion mit den niedrigen Virustitern große Volumina verwendet werden müssen, kommen die zu transduzierenden Zellen mit einer hohen Konzentration von fötalem Kälberserum aus dem virushaltigen Kulturüberstand in Kontakt. Um dies zu umgehen, wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt und die Viruspartikel in Zentrifugationspuffer resuspendiert.

Unabhängig von der viralen Transduktion wurden 293T-Zellen mit dem Plasmid pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-GFP und pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-Puromycin transfiziert. Als Kontrolle wurde pLV-CMV-Luziferase-IRES-Puromycin verwendet. 48 h nach der Transfektion konnte die Expression der Luziferase nach Inkubation mit Luziferin dokumentiert werden (Abbildung 4–55 B). Bei der Transfektionskontrollgruppe erfolgte lediglich eine Inkubation mit dem Transfektionsreagenz Metafectene.

Die Expression des HA-Ferritins wurde durch eine immunzytochemische Analyse mit einem anti-HA-Antikörper validiert (Abbildung 4–55 C). Es konnte eine Koexpression von HA-Ferritin und GFP nachgewiesen werden (Abbildung 4–55 C4). Zur Kontrolle wurden die 293T Zellen mit dem Plasmid pLV-CMV-IRES-GFP transfiziert, wobei keine HA-Ferritin-Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4–55 D).

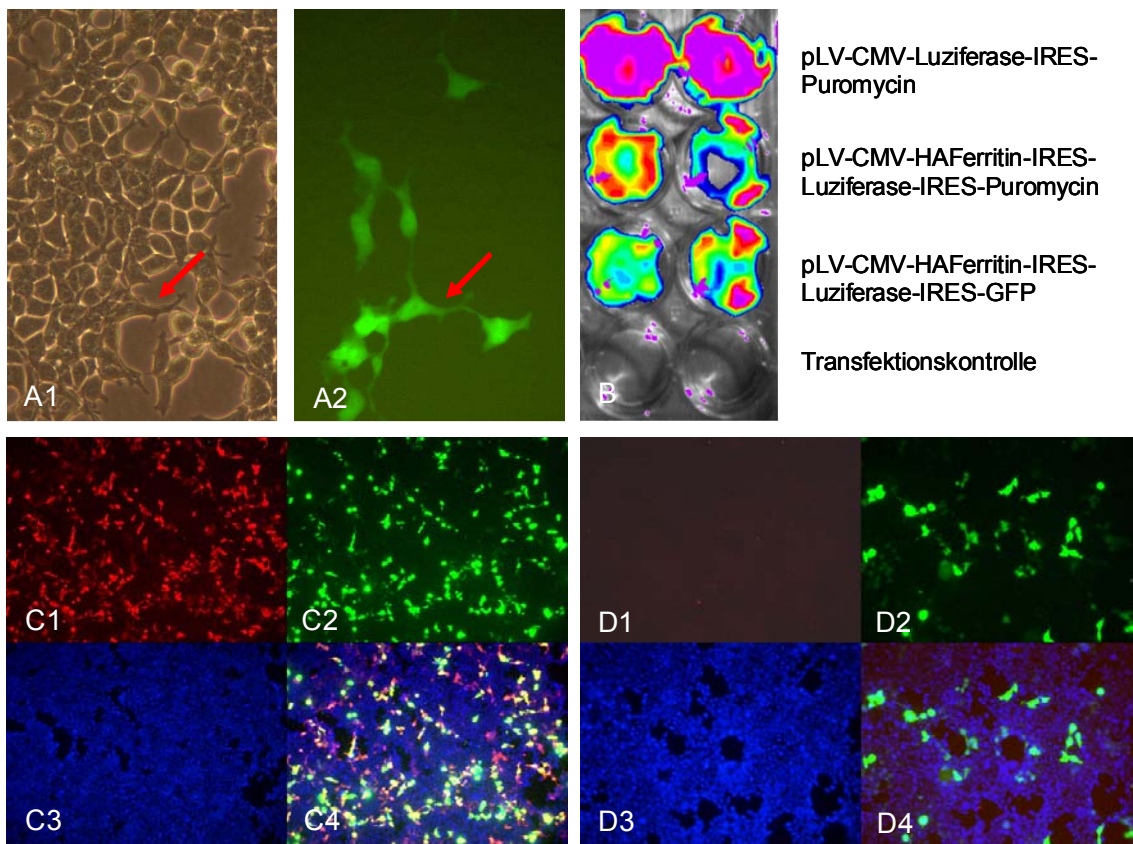


Abbildung 4–55: Funktionsüberprüfung des Virus LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP und der präentiviralen DNA in 293T-Zellen:

Vier Tage nach der Infektion mit LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP mit einer MOI von 1 konnte eine spezifische GFP-Expression in 20 % der 293T-Zellen identifiziert werden. Die Pfeile weisen auf die identische Zelle in der Phasenkontrastaufnahme (A1) und der Fluoreszenzaufnahme (A2) hin.

Eine Expression der Luziferase konnte nach Transfektion von pLV-CMV-Luziferase-IRES-Puromycin und den beiden Trippelreporterplasmiden dokumentiert werden. Die Aufnahmen wurden mit der BertholdNightOwl nach Zugabe von Luziferin angefertigt. (B).

Die Expression von HA-Ferritin (rot) wurde durch eine immunzytochemische Analyse nach Transfektion von pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP in 293T-Zellen erfolgreich untersucht (C1-C4). Bei einer Kontrolltransfektion mit pLV-CMV-IRES-GFP konnte das HA-Fusionspeptid nicht nachgewiesen werden (D1-D4). Grün: GFP-Fluoreszenz.

4.5.3 Erstellung des Vektors pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase

In das Plasmid pRRL-CMV wurde, nach Inkubation mit *Xba*I und *Xho*I, das HA-Ferritin-IRES-Luziferase-Fragment, welches ebenfalls mit beiden Enzymen inkubiert wurde, eingebracht (Abbildung 4–56).

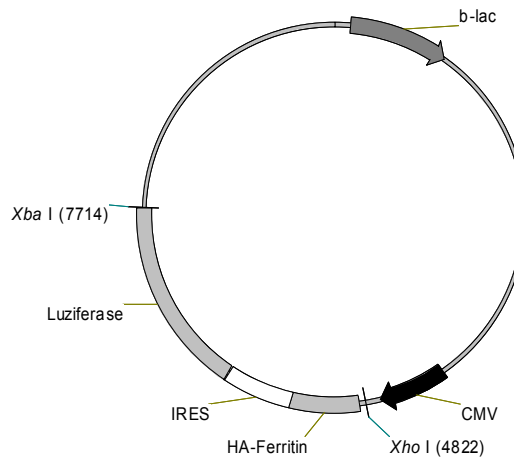


Abbildung 4–56: Vektorkarte des Vektors pLV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase:

Durch Ligation des HA-Ferritin-IRES-Luziferase Fragments in das Plasmid pLV-CMV wurde das Plasmid generiert. Die endgültige Größe beträgt 10203 bp. Die Selektionierungsmöglichkeit im prokaryotischen System wird durch die Expression von β -Lactamase (b-lac) erreicht.

Die Expression der Luziferase wurde nach transients Transfektion in 293T-Zellen zur Funktionsüberprüfung validiert.

Nach der Transfektion mit dem 3-Plasmidsystem in 293T-Zellen zur Generierung infektiöser Partikel, konnte ein Virustiter von 417 ng mL^{-1} isoliert werden, der für die weiteren Transduktionen zur Verfügung stand.

Gli36 Δ EGFR Tumorzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Viruspartikel infiziert. Es wurden die MOI 0,2, MOI 1, MOI 2 und MOI 5 verwendet. Zwei Tage nach der Transduktion wurde die erste Passage der Zellen vorgenommen. Dabei wurden 10 % der gewonnenen Zellmenge für eine Bestimmung der Luziferaseaktivität nach Proteinextraktion verwendet. Es konnte eine deutliche und MOI abhängige Luziferaseaktivität bei den Zellen, die mit LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase transduziert wurden, nachgewiesen werden (Abbildung 4–57). Bei den Kontrollpräparationen wurden untransduzierte Zellen und Zellen, die nur mit Polybren behandelt wurden, berücksichtigt. Die ermittelte Luziferaseaktivität bei diesen Kontrollproben betrug $160,5 (\pm 183,14)$ U.L.E. bzw. $94,5 (\pm 74,25)$ U.L.E. Bei den Zellen, die mit einer MOI von 1 transduziert wurden, konnte eine Luziferaseaktivität von $1,36 \times 10^7 (\pm 1 \times 10^6)$ U.L.E. ermittelt werden. Die detektierte Lichtemission nahm bei den beiden mit höherer MOI infizierten Zellen konzentrationsabhängig zu (Abbildung 4–57).

Es konnte in Abhängigkeit von der Viruspartikelkonzentration zwei Passagen nach der initialen Transduktion ein verändertes Adhäsionsverhalten bei den HA-Ferritin überexprimierenden Zellen beobachtet werden. Die Adhäsion an den Untergrund nahm mit ansteigender MOI im Vergleich zu den Kontrollzellen, die nur mit Polybren behandelt wurden, zu (Abbildung 4–58).

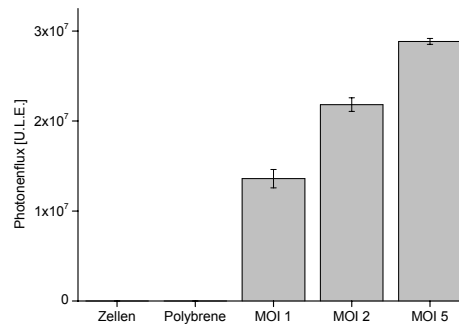


Abbildung 4–57: Nachweis und Quantifizierung der Luziferaseexpression bei LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase transduzierten Gli36ΔEGFR-Zellen:

Zwei Tage nach der initialen Infektion mit dem Lentivirus LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase konnte die Expression der Luziferase in Proteinpräparationen der Zellen nachgewiesen werden. Als Kontrollgruppen wurden nicht-transduzierte Zellen und Zellen, die lediglich mit Polybren behandelt wurden, berücksichtigt. Es konnte eine deutliche Abhängigkeit der Luziferaseaktivität von den MOIs beobachtet werden.

In den mit der MOI 2 und MOI 5 transduzierten Zellen konnten 4 h nach der Aussaat eine quantitativ höhere Anzahl von abgeflachten Zellen mit langgestreckten Zellfortsätzen beobachtet werden. Dieser Effekt konnte unabhängig von einer exogenen Supplementation von 2 mM Eisen(III)-Ammoniumzitat (FAC) beobachtet werden.

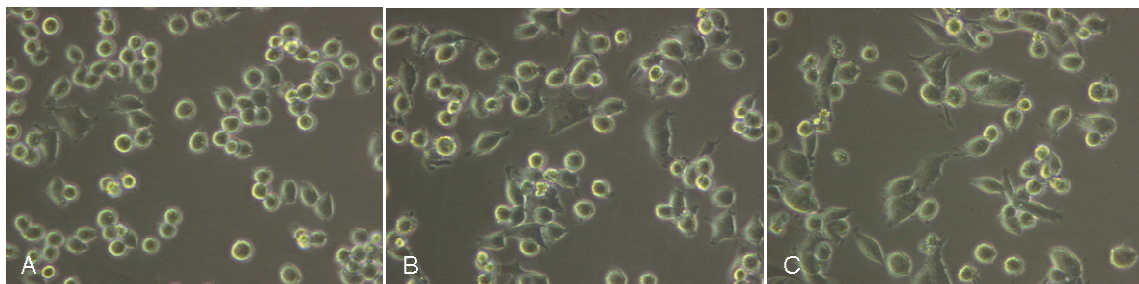


Abbildung 4–58: Verändertes Adhäsionsverhalten der mit LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase transduzierten Gli36ΔEGFR Tumorzellen:

Vier Stunden nach Plättung konnte ein stärkeres Adhäsionsverhalten bei den mit dem Virus LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase transduzierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (A) beobachtet werden. Die Adhäsion korrelierte dabei mit der bei der Transduktion verwendeten Viruskonzentrationen der MOI 2 (B) und der MOI 5 (C). Bei den transduzierten Zellen wurde eine exogene Eisensupplementation durchgeführt.

Eine immunzytochemische Analyse mit einem anti-HA-Antikörper nach Fixierung der Zellen verdeutlicht die Expression des HA-Ferritins in Abhängigkeit von der eingesetzten MOI. Mit

zunehmender MOI nimmt der Anteil HA-Ferritin⁺-Zellen zu. Eine deutlich homogenere Expression und Steigerung der Transduktionseffizienz konnte mit den MOI 2 und 5 erzielt werden. Es konnten keine HA-Ferritin⁺-Zellen in den unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 4–59 E) und den mit Polybren behandelten Zellen (Abbildung 4–59 F) identifiziert werden. Die Proliferationsgeschwindigkeit der transgenen Zellen ist deutlich verlangsamt, wie ein Vergleich der Abbildung 4–59 A-D zeigt. Bei der Zellzahlbestimmung betrug die ermittelte Zellmenge in den mit MOI 2 transduzierten Zellen 37,5 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach der Transduktion mit MOI 5 betrug die ermittelte Zellmenge 31,3 % der Kontrollzellen. Eine morphologische Veränderung konnte korrespondierend zu den Ergebnissen, die in Abbildung 4–58 dargestellt wurde bei den mit anti-HA-Ferritin⁺-Antikörper inkubierten Zellen bestätigt werden (Abbildung 4–59 G und H).

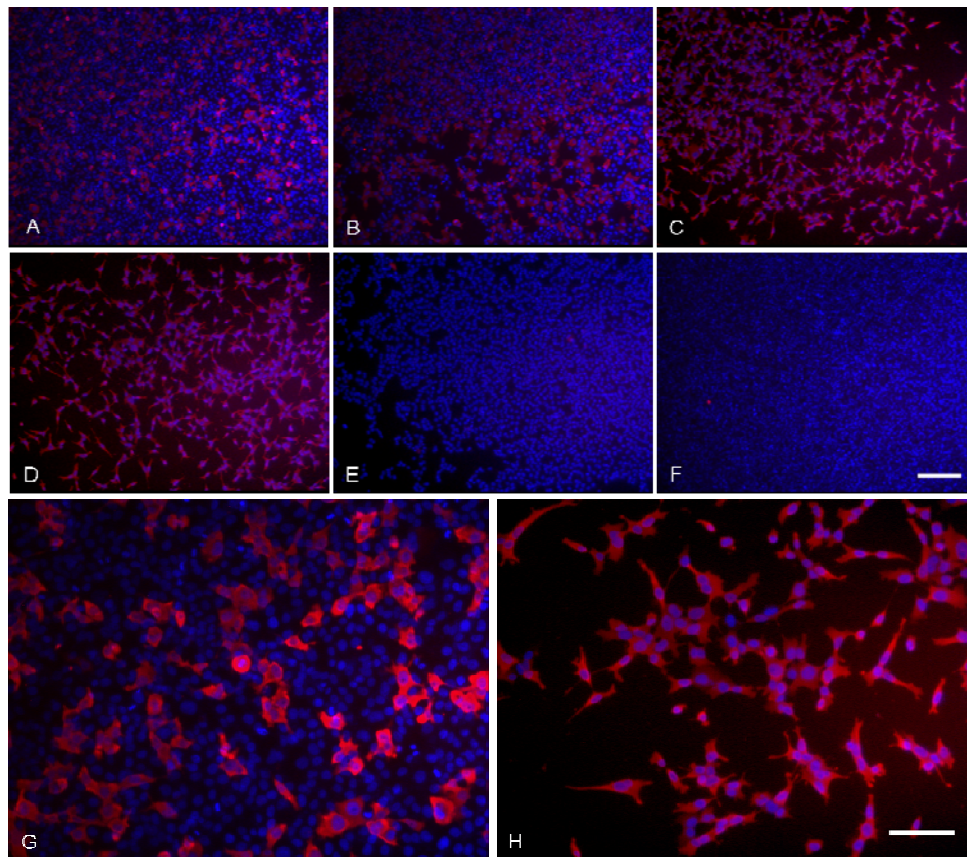


Abbildung 4–59: Immunzytochemische Analyse der HA-Ferritin-Expression in Abhängigkeit von der initialen Viruspartikelkonzentration:

Gli36ΔEGFR humane Glioblastomzellen wurden mit einer MOI von 0,2 (A), einer MOI von 1 (B), einer MOI von 2 (C) und einer MOI von 5 (D) infiziert. Es konnte eine Expression bei Verwendung eines anti-HA-Antikörpers nachgewiesen werden. Bei den Kontrollpräparationen, die nicht mit dem Virus transduziert wurden (E) oder nur mit Polybren behandelt wurden (F), konnte keine Immunreaktivität nachgewiesen werden. Es konnten Unterschiede in der Zellmorphologie in Abhängigkeit von der zur Transduktion verwendeten Viruspartikelkonzentration dokumentiert werden, die mit höherer Vergrößerung deutlich zu erkennen sind (G-H). Mit der MOI 0,2 transduzierte Zellen weisen eine runde, kontrahierte Morphologie auf (G). Die Zellen, die mit der MOI 2 transduziert wurden zeigen eine abgeflachte Morphologie mit lang gestrecktem Zellkörper und Ausbildung von Pseudopodien (H). Maßstab: A-F: 200 µm; G und H: 200 µm.

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Antibiotikaselektion wurden Zellen, die mit der MOI 1 transduziert wurden, durch Kolonienisolation selektioniert. Die initialen Experimente wurden mit der Zelllinie 2/C3 durchgeführt.

Durch die immunzytochemische Analyse mit einem anti-HA-Antikörper konnte die Expression von HA-Ferritin in der Zelllinie 2/C3 eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4–60 A). Bei untransduzierten Kontrollzellen konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden (Abbildung 4–60 B). Die Photonenemission der Zelllinie 2/C3 konnte nach Zugabe von D-Luziferin ermittelt werden (Abbildung 4–60 C). Der von 1×10^5 Zellen emittierte Photonenflux betrug $1,46 \times 10^5 (\pm 27703,8)$ U.L.E.

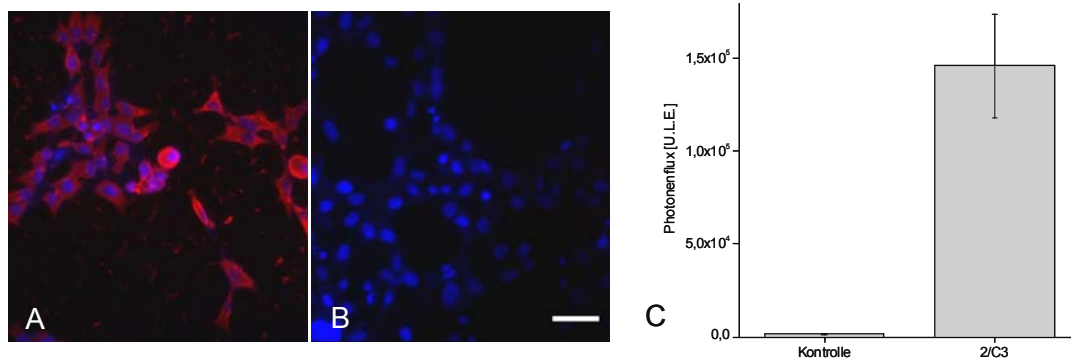


Abbildung 4–60: Detektion von HA-Ferritin und Quantifizierung der Luziferaseaktivität bei der 2/C3-Zelllinie:

Die HA-Expression konnte durch eine immunzytochemische Analyse in den 2/C3-Zellen detektiert werden (A.). In untransduzierten Kontrollzellen konnte keine Immunreaktion festgestellt werden (B). Die Luziferaseaktivität von 1×10^5 2/C3-Zellen wurde nach Zugabe von D-Luziferin im Luminometer bestimmt (C). Farbnachweis: rot: anti-HA; blau: Hoechst Dye 33342. Maßstab: 50 μ m. Anzahl unabhängiger Stichproben: n= 3.

Es wurden Verdünnungsreihen mit Zellkonzentrationen zwischen 1×10^3 und 1×10^5 Zellen der Zelllinie 2/C3 erstellt. Als Kontrollen wurden die gleichen Zellkonzentrationen der untransduzierten Gli36 Δ EGFR- und Luziferase⁺ 4/2 Zellen untersucht.

Nach Zugabe von D-Luziferin wurde die Photonenemission für 60 s mit dem Photonen-Bildgebungssystem der Firma Biospace Lab erfasst. Die maximale Photonenemission der Zelllinie 4/2N im Untersuchungszeitraum betrug bei der höchsten Zellkonzentration $5,49 \times 10^5$ U.L.E. während die maximale Photonenemission bei der HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺-Zelllinie 2/C3 den Wert von 1×10^5 U.L.E. aufwies. Bei den untransduzierten Kontrollzellen konnte keine konzentrationsabhängige Veränderung der detektierten Photonen ermittelt werden. Die ermittelten Werte lagen zwischen 258,8 U.L.E. und 658,9 U.L.E.

Die gleichen Verdünnungsreihen wurden mit dem Berthold-Luminometer für einen Zeitraum von 10 s untersucht. Die ermittelte Photonenemission der Zelllinie 4/2 betrug bei $1,0 \times 10^5$

Zellen $1,9 \times 10^6$ U.L.E. Die detektierten Photonen der anderen Zelllinien waren im Vergleich zu den mit dem Photonen-Bildgebungssystem dokumentierten Werten ebenfalls höher.

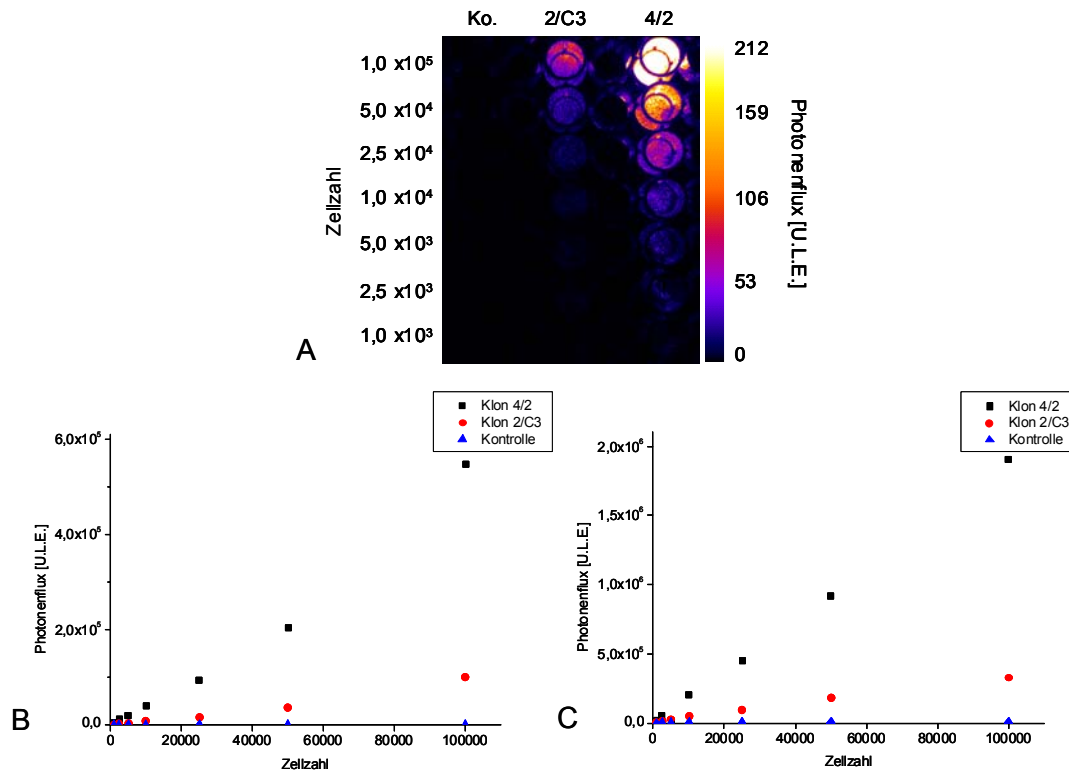


Abbildung 4–61: Quantifizierung der Luziferaseexpression bei der Zelllinie 2/C3 und dem Klon 4/2:

Die Expression der Luziferase wurde in Abhängigkeit von der Zellkonzentration bei den Luziferase⁺ Gli36ΔEGFR Klon 4/2- Zellen und den HA-Ferritin und Luziferase koexprimierenden Zellen der Zelllinie 2/C3 untersucht. Dabei wurde eine vergleichende Analyse der Photonenemission nach Inkubation mit D-Luziferin in dem Biospace Lab-Photonen-Bildgebungssystem (A, B) und dem Luminometer (C) vorgenommen. Die Luziferaseexpression des Klons 4/2 war bei der Untersuchung in beiden Systemen deutlich stärker als die Expression der Zelllinie 2/C3.

4.5.4 Supplementation von Eisen(III)-Ammoniumzitat zu MRT-Bildgebungszwecken

HA-Ferritin- und Luziferase⁺-Gli36ΔEGFR-Tumorzellen der Zelllinie 2C/3 wurden für 37 h in Vollmedium und zusätzlicher Supplementation von 2 mM Eisen(III)-Ammoniumzitat kultiviert. Es wurden hochaufgelöste MRT-Untersuchungen und korrespondierende Berliner-Blau-Färbungen angefertigt, um die Möglichkeit der MRT-Bildgebung durch eine verstärkte Eisenspeicherkapazität zu eruieren.

Die DAB-verstärkte Berlinerblau-Färbung konnte deutlich eine höhere Konzentration von Eisen in der Zelllinie 2/C3 belegen (Abbildung 4–62). Dabei ließen sich Bereiche einer sehr intensiven Färbung (schwarzer Pfeil in Abbildung 4–62 A) von schwächer angefärbten Zellen unterscheiden, die eine perinukleäre Anreicherung aufwiesen (weißer Pfeil in Abbildung 4–62 A). Die Intensität der Färbung unterschied sich deutlich von den untransduzierten Kontrollzellen (Abbildung 4–62 B).

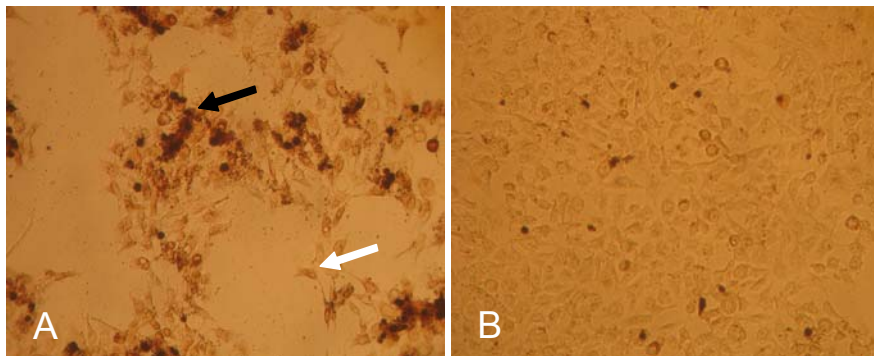


Abbildung 4–62: Histologischer Nachweis von zweiwertigem Eisen nach exogener Eisensupplementation:

Nach 37 h Inkubation mit Eisen(II)-Ammoniumzitat konnte mittels DAB-verstärkter Berlinerblau-Färbung eine Anreicherung von Eisenmolekülen in den 2/C3-Zellen nachgewiesen werden (A). Untransduzierte Kontrollzellen wiesen keine Anreicherung von Eisen auf (B).

Für den Nachweis der Zellen mittels hochaufgelöstem MRT, die durch die Überexpression des Ferritins Eisen erhöht akkumulieren, wurden Phantomexperimente angefertigt, in denen $4,5 \times 10^4$ und $1,5 \times 10^5$ mit 2 mM FAC präinkubierte 2/C3-Zellen und präinkubierte, untransduzierte Kontrollzellen verwendet wurden (Abbildung 4–63). In den Ergebnissen der T_2^* -gewichteten Messungen konnte kein Unterschied in der Signalintensität zwischen Probenlöchern des Phantoms festgestellt werden, in denen sich keine Zellen befanden und Probenlöchern, in denen Zellen platziert wurden, die nicht mit FAC inkubiert wurden (Abbildung 4–63). In transduzierten und untransduzierten Zellen konnte eine deutliche Anreicherung von Eisen nach der Inkubation beobachtet werden.

Ein deutlicher Unterschied zwischen $4,5 \times 10^4$ HA-Ferritin⁺-Zellen und untransduzierten Kontrollzellen konnte bei der Inkubation mit 2 mM FAC dokumentiert werden. Der

Unterschied in den Signalintensitäten wurde bei Untersuchung von $1,5 \times 10^6$ Zellen eindeutiger. Es konnten bei den 2/C3-Zellen nach Subtraktion der Hintergrund-Signalintensität eine absolute Signalintensität von |11534| U.E. dokumentiert werden. Bei den untransduzierten Kontrollzellen betrug die Signalintensität |7521| U.E. Die quantitative Analyse des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen zeigt klar die gute Identifikationsmöglichkeit der mit Eisen angereicherten Zellen im Vergleich zu den untransduzierten Kontrollzellen und zum Hintergrund (Abbildung 4–63). Zusätzlich zu den Untersuchungen, die mit der T_2^* -gewichteten Gradienten-Echo-Sequenz angefertigt wurden, wurde eine quantitative Analyse mit einer Multi-Slice-Multi-Echo-Sequenz durchgeführt (Abbildung 4–63). Durch die Berechnung der T_2 -Mappe einer einzelnen Schicht konnte keine klare Quantifizierung von T_2 durchgeführt werden (Abbildung 4–63). Es wurden für die T_2 -Mappe drei unterschiedliche Berechnungen verwendet um die erhaltenen Daten zu validieren.

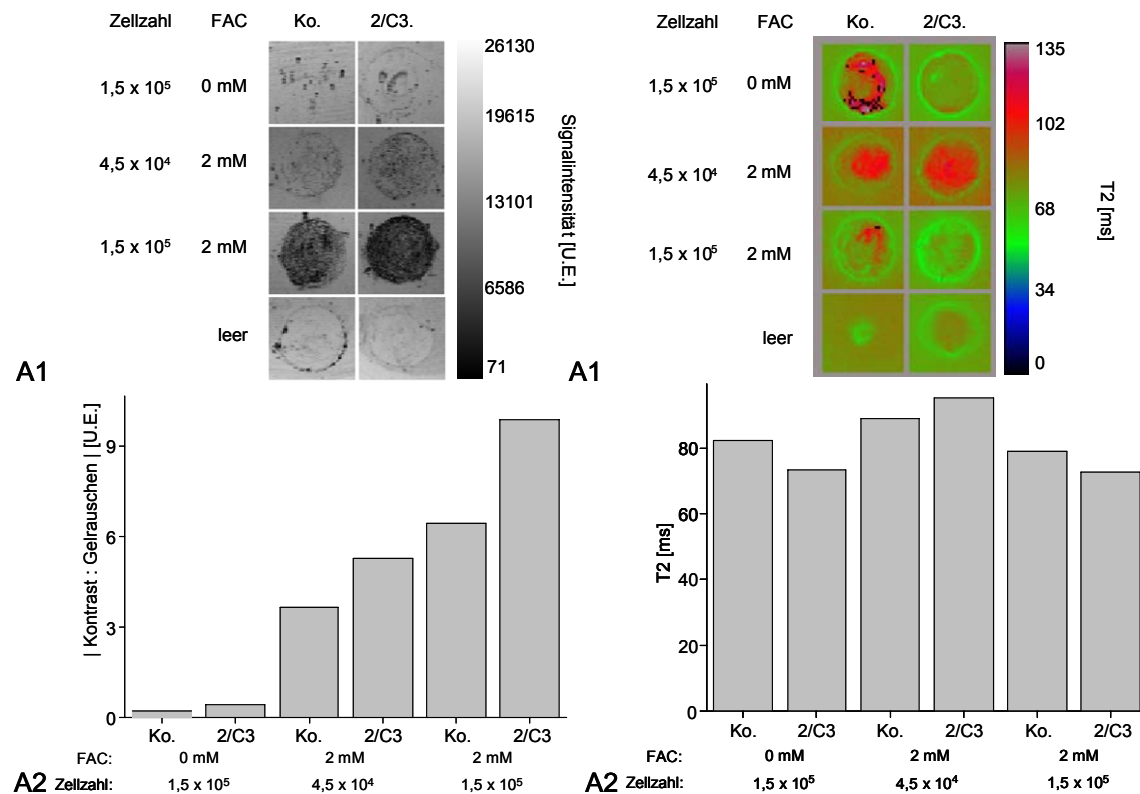


Abbildung 4–63: MRT-Untersuchung der HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-2/C3-Zellen nach Inkubation mit 2 mM Eisen(II)-Ammoniumzitat:

Eine deutliche Abgrenzung vom Hintergrund konnte bei den Zellkonzentrationen von $4,5 \times 10^4$ und $1,5 \times 10^5$ der mit 2 mM FAC vorinkubierten Zellen vorgenommen werden (A1). Bei beiden Zellkonzentrationen konnte eine Verringerung der Signalintensität bei den Zellen der Zelllinie 2/C3 nach der FAC-Inkubation im Vergleich zu den Kontrollzellen identifiziert werden. Die Quantifizierung durch die Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen zeigte die Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den 2/C3-Zellen (A2). Es wurde durch Verwendung einer MSME-Sequenz die T_2 -Zeit der Proben berechnet (B1 und B2). Es konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden.

4.5.4.1 Intrazerebrale Transplantation von Gli36 Δ EGFR-2/C3-Zellen

Um die Eisenaufnahme der HA-Ferritin⁺-Zellen *in vivo* zu überprüfen, wurden native Gli36 Δ EGFR-2/C3-Zellen und Kontrollzellen, die nicht in Gegenwart von FAC kultiviert wurden in einer Transplantationsstudie verwendet.

Die Gli36 Δ EGFR-2/C3-Zellen (2×10^5) wurden intrazerebral in den Kortex von zwei Nacktmäusen implantiert und für 10 Tage mittels Biolumineszenzdetektion untersucht. Drei Tage nach der Operation konnte bei Tier #1, das eine Injektion von 2/C3-Zellen in der rechten Hemisphäre und eine Injektion von untransduzierten Kontrollzellen auf der linken Hemisphäre erhielt, ein deutliches Biolumineszenzsignal von den HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺-Zellen detektiert werden (roter Pfeil in Abbildung 4–64 A). Es konnte keine Photonenemission von den Kontrollzellen akquiriert werden (grüner Pfeil in Abbildung 4–64 A). Über den gesamten Untersuchungszeitraum nahm die mittlere Strahlungsdichte des Luziferase⁺-Tumors von Tier #1 zu. Der initial ermittelte Wert betrug $2,33 \times 10^4$ Photonen $s^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ sr}^{-1}$. Nach 10 Tagen konnten auf der gleichen Fläche $2,98 \times 10^5$ Photonen $s^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ sr}^{-1}$ detektiert werden. Dieses entspricht einer Zunahme des detektierten Photonenfluxes von $2,83 \times 10^5$ Photonen s^{-1} am dritten Tag nach der Injektion und einer Zunahme von $2,48 \times 10^6$ Photonen s^{-1} am letzten Untersuchungstag.

In den rechten- und linken Kortex des zweiten Tieres wurden beidseitig Gli36 Δ EGFR-2/C3-Zellen implantiert (Abbildung 4–64 B). Die Photonenemission des Tumors in der linken Hemisphäre am 3. Tag betrug $3,85 \times 10^4$ Photonen $s^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ sr}^{-1}$ (roter Pfeil in Abbildung 4–64 B, 3. Tag). Auf der rechten Hemisphäre konnte eine Lichtemission von $1,92 \times 10^4$ Photonen $s^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ sr}^{-1}$ detektiert werden (gelber Pfeil in Abbildung 4–64 B, 3. Tag). Beide Tumoren zeigten keinen stetigen Zuwachs über den gesamten Zeitraum bis zum achten Untersuchungstag. Die Quantifizierung der mittleren Strahlungsdichte in Abbildung 4–64 C verdeutlicht graphisch das Tumorwachstum.

Es wurde an dem Kamerasystem untersucht, welchen Einfluss die Wahl eines kleineren Gesichtsfeldes auf die Photonendetektion *in vivo* besitzt. Am 10. Tag nach Injektion wurden mit dem kleineren Gesichtsfeld $3,3 \times 10^6$ Ereignisse im rechten Tumor von Tier #1 detektiert (Abbildung 4–64 D), wohingegen nur $2,1 \times 10^6$ Ereignisse mit dem größeren Gesichtsfeld detektiert wurden (Abbildung 4–64 A, 10. Tag). Neben der exakteren Quantifizierung des Photonenfluxes ist eine deutliche Auflösungssteigerung bei Tier #2 sichtbar (Abbildung 4–64 E).

Die MRT-Untersuchungen mit Tier #1 und Tier #2 wurden bei einer Feldstärke von 7 Tesla durchgeführt. Die ersten T_1 - und T_2 -gewichteten Messungen wurden 4 h nach der Transplantation durchgeführt. Bei der T_2 gewichteten Messung konnte ein deutlicher Signalverlust in beiden Hemisphären lokalisiert werden. Beide Zellinjektionen fanden sich in unterschiedlichen Schichten wieder (Abbildung 4–65 A). Eine Berechnung des Verhältnisses

Kontrast : Geweberauschen der erstellten Minimum-Intensitäts-Projektion zeigt einen Absolutwert von [9,67] für die Region, in der sich die Zellen in der linken Hemisphäre befinden. Die HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Zellen, die in der rechten Hemisphäre lokalisiert waren, weisen

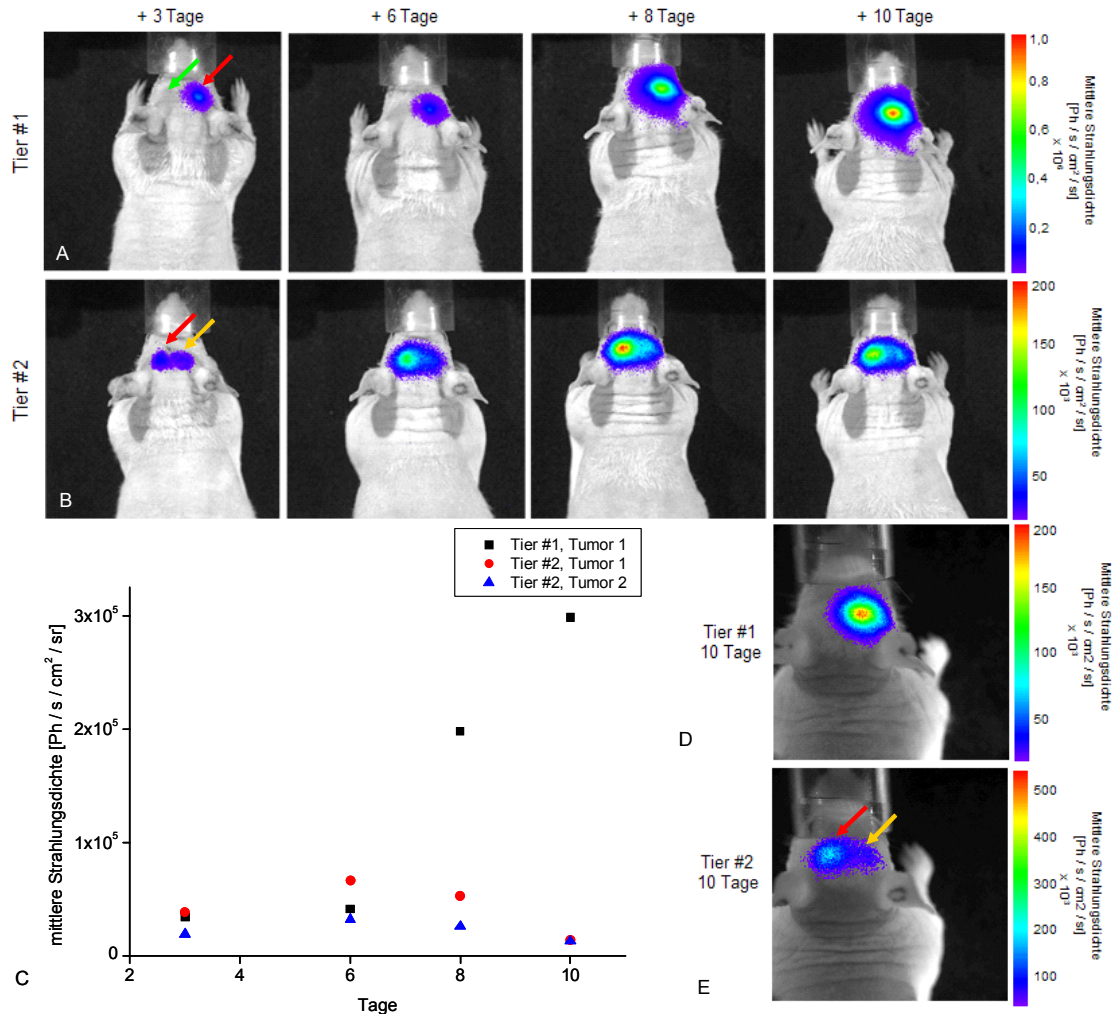


Abbildung 4–64: Intrazerebrale Transplantation der Gli36ΔEGFR-2/C3-Zelllinie:

2×10^5 Gli36ΔEGFR-2/C3-Zellen wurden stereotaktisch in das rechte Striatum einer Nacktmäuse implantiert. In die linke Hemisphäre wurde die gleiche Zellzahl von untransduzierten Kontrollzellen injiziert. Drei Tage nach der Operation erfolgte eine Biolumineszenzuntersuchung um die Aktivität der Luziferase zu bestimmen. Es konnte ein deutliches Biolumineszenzsignal in den HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺-Zellen im rechten Striatum identifiziert werden (roter Pfeil in A, 3 Tage). Keine Photonenemission konnte bei den Kontrollzellen detektiert werden (grüner Pfeil in A, 3 Tage). Bis zum 10. Tag der Untersuchung konnte eine kontinuierliche Zunahme der Photonenemission detektiert werden. In eine weitere Nacktmäuse wurden in beide Hemisphären 2×10^5 Gli36ΔEGFR-2/C3-Zellen implantiert (roter und gelber Pfeil in B, 3 Tage). Es wurde bis zum achten Untersuchungstag eine Zunahme der emittierten Photonen detektiert. Eine Quantifizierung der mittleren Strahlungsdichte wurde getrennt für die Luziferase⁺-Tumoren erstellt (C).

Durch die Verwendung eines kleineren Gesichtsfeldes für die Photonendetektion konnte eine Auflösungssteigerung erreicht werden (D und E). Die Expositionszeiten betragen in allen Experimenten 60 s. Eine subkutane Injektion von 2 mg D-Luziferin wurde 10 min vor Beginn der Narkose durchgeführt. Verwendetes Photonenbildgebungssystem: Xenogen IVIS-200. Die mittlere Strahlungsdichte wurde für die Skalierung an den im Untersuchungszeitraum maximal detektierten Werten normiert.

einen Wert von $|4,84|$ und eine Signalintensität von -8690 U.E. auf. Bei der Analyse der T_1 -gewichteten Messsequenz (Abbildung 4–65 C) konnten die auf der linken Hemisphäre injizierten Kontrollzellen nicht identifiziert werden. Bei der Berechnung des Kontrast : Geweberauschen-Verhältnisses wurde ein absoluter Wert von $|0,64|$ und eine Signalintensität von -7282 U.E. ermittelt. Ein deutlicher Signalverlust in der rechten Hemisphäre mit einem Kontrast : Geweberauschen-Verhältnisses von $|2,87|$ konnte vom umliegenden Gehirngewebe diskriminiert werden.

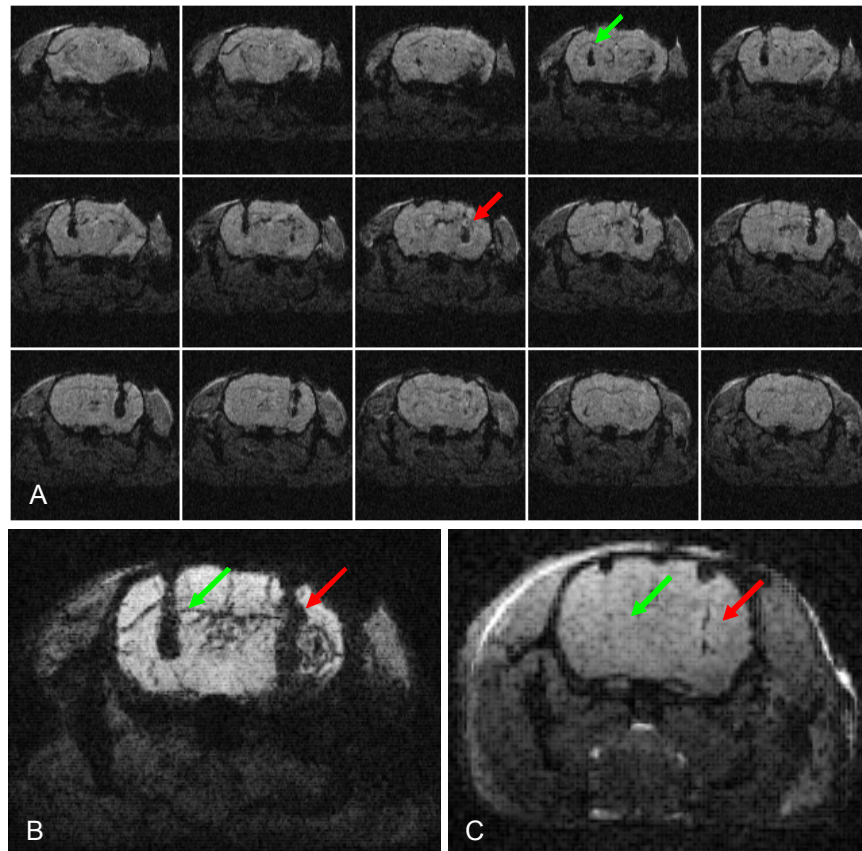


Abbildung 4–65: MRT-Analyse von Tier #1, 4 h nach Transplantation:

Die MRT-Untersuchungen wurden bei einer Feldstärke von 7 Tesla durchgeführt. Die T_2^* -gewichtete Untersuchung zeigt in beiden Hemisphären eine Signalauslöschung (grüner und roter Pfeil in A), die mit der Lokalisation der injizierten Zellen übereinstimmte. Dargestellt ist eine Auswahl der einzelnen Schichten aus des 3D-Datensatzes, von denen die nachfolgende Minimum-Intensitäts-Projektion angefertigt wurde. In dieser Minimum-Intensitäts-Projektion konnte das Volumen der Zellansammlungen dargestellt werden (grüner und roter Pfeil in B). Eine T_1 -gewichtete Messung zeigte nur die Position der HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierenden Zellen (grüner und roter Pfeil in C).

In der Folgemessung am 6. Tag nach Transplantation konnten mittels T_2 -gewichteter Untersuchung beide Tumoren identifiziert werden (Abbildung 4–66 grüner und roter Pfeil in A). In der Minimum-Intensitäts-Projektion, die von den 15 Schichten in Abbildung 4–66 A angefertigt wurde, findet sich im linken Tumor eine Aussparung (gelber Pfeil in Abbildung 4–67). Durch die Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Geweberauschen konnte ein Wert von $|14,4|$ und die Signalintensität von -5025 U.E. ermittelt werden.

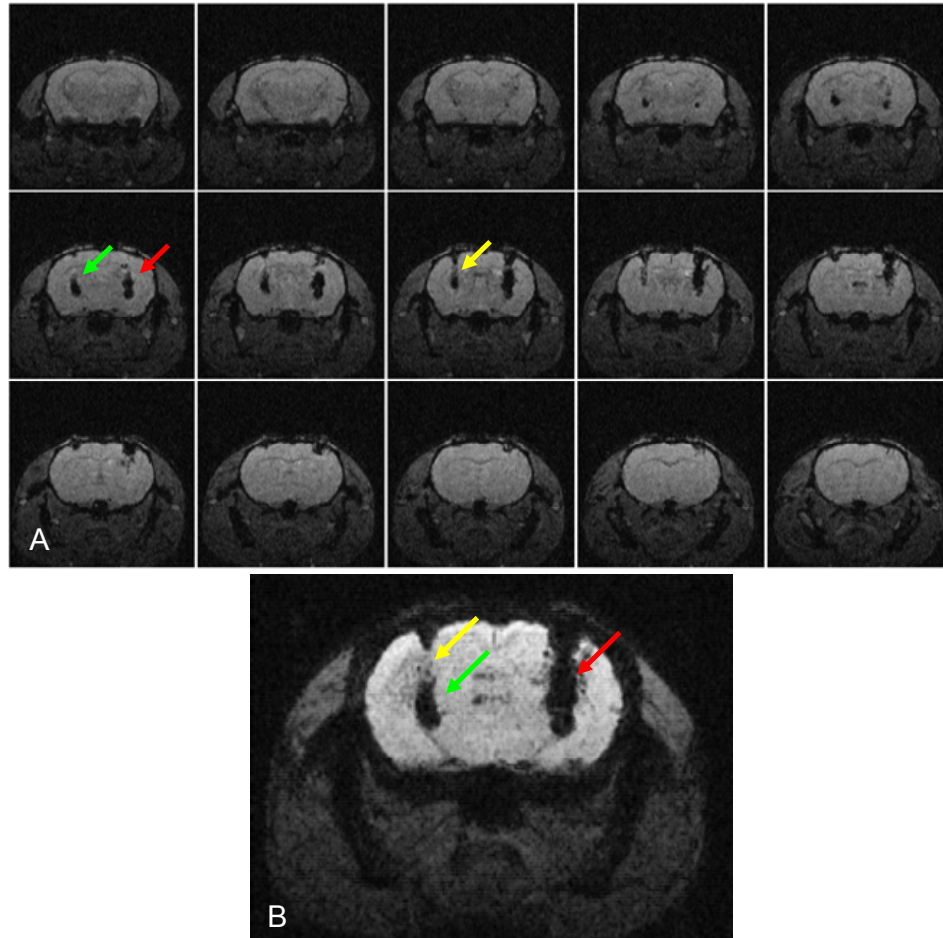


Abbildung 4–66: MRT-Analyse von Tier #1 sechs Tage nach Transplantation:

Sechs Tage nach der Injektion konnte die Lokalisation der Kontrollzellen (grüner Pfeil in A) und der HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierenden Zellen (roter Pfeil in A) in beiden Hemisphären anhand der T_2 -gewichteten Messungen bestätigt werden. Der Tumor in der linken Hemisphäre weist einen Verlust in der Homogenität der Signalauslöschung auf (gelber Pfeil in A). In der Minimum-Intensitäts-Projektion, die aus den 15 Schichten, die in A dargestellt wurden, konnte das Volumen der Zellansammlungen dargestellt werden (B).

Am 10. Tag der Untersuchungsreihe konnte eine massive Volumenvergrößerung beider Tumoren in der T_2^* -gewichteten MRT-Analyse beobachtet werden (Abbildung 4–67). Innerhalb des Kontrolltumors konnte eine distinkte Region mit erhöhter Signalintensität lokalisiert werden (gelber Pfeil in Abbildung 4–67 A). Bei der Bestimmung der Signalintensität konnte für den linksseitig lokalisierten Tumor ein Wert von -3357,3 U.E. ermittelt werden. Der Tumor auf der rechten Seite weist eine Signalintensität von -3468 U.E. auf. Zusätzlich zu der T_2^* -gewichteten Messung wurde eine T_1 -gewichtete Analyse nach der subkutanen Injektion von Gd-DTPA vorgenommen. Dargestellt ist eine Maximum-Intensitäts-Projektion. Durch die Anreicherung von Gd-DTPA sowohl im Kontrolltumor, als auch im HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺- Tumor, die sich in Abbildung 4–67 C als positive Signalintensität identifizieren lässt (Pfeile in Abbildung 4–67), kann eine Blut-Hirnschrankenstörung aufgrund geöffneter Tight Junctions angenommen werden. Das mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllte

Liquorsystem (blauer Pfeil in Abbildung 4–67) lässt sich eindeutig von dem umliegenden Gehirngewebe abgrenzen. Der flüssigkeitsgefüllte Hohlraum im linksseitig lokalisierten Tumor weist in der T_1 -gewichteten Messung ebenfalls eine positive Signalintensität auf (gelber Pfeil in Abbildung 4–67).

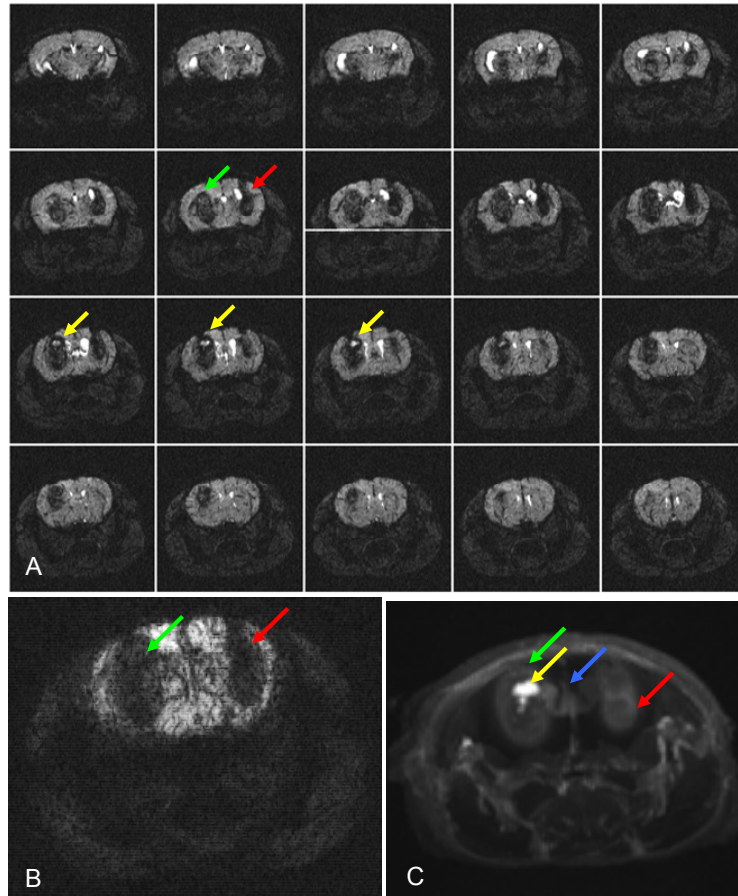


Abbildung 4–67: MRT-Analyse von Tier #1 zehnte Tage nach Transplantation und subkutaner Applikation von Gd-DTPA:

Am 10. Untersuchungstag konnte eine massive Zunahme des Tumolvolumens beidseitig identifiziert werden (A). Im linken Tumor, der aus den Kontrollzellen gebildet wurde, kann ein Hohlraum mit erhöhter Signalintensität erkannt werden (gelber Pfeil in A). Die Minimum-Intensitäts-Projektion der T_2 -gewichteten Messung verdeutlicht das gesamte Volumen der beiden Tumoren (B). Aufgrund einer subkutanen Applikation von Gd-DTPA kann eine Blut-Hirnschrankenstörung in beiden Hemisphären identifiziert werden (grüner und roter Pfeil in C). Dargestellt ist eine Maximum-Intensitäts-Projektion. Der gelbe Pfeil weist auf die Region erhöhter Signalintensität im linken Tumor hin, der blaue Pfeil auf die Liquorräume des ersten und zweiten Ventrikels.

Die Ergebnisse aus den T_2^* -gewichteten Analysen der beiden Tumore wurden in Abbildung 4–68 dargestellt.

Zusätzlich zu den T_1 - und T_2^* -gewichteten Messungen wurde eine Multi-Slice-Multi-Echo-Sequenz verwendet, um die T_2 -Relaxationszeiten zu berechnen (Abbildung 4–69). Die kürzesten T_2 -Relaxationszeiten konnten bei beiden Tumoren in Schicht #4 ermittelt werden (Pfeil in Abbildung 4–69). Der linkshemisphärisch lokalisierte Tumor ist zu geringen Anteilen

in drei weiteren Schichten lokalisiert, wohingegen das Volumen des rechten Tumors auf zwei Schichten begrenzt ist.

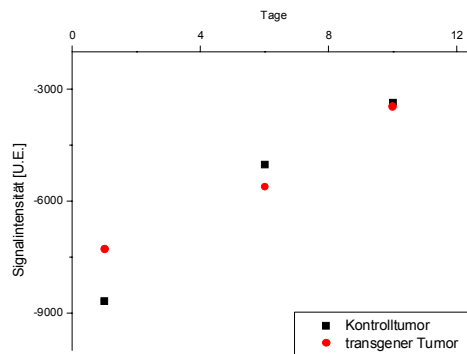


Abbildung 4–68: Quantifizierung der *in vivo* ermittelten Signalintensitätsveränderungen der Tumoren über den Untersuchungszeitraum:

Die Signalintensitäten für beide Tumoren wurden über den Zeitraum von 10 Tagen ermittelt und vergleichend graphisch dargestellt.

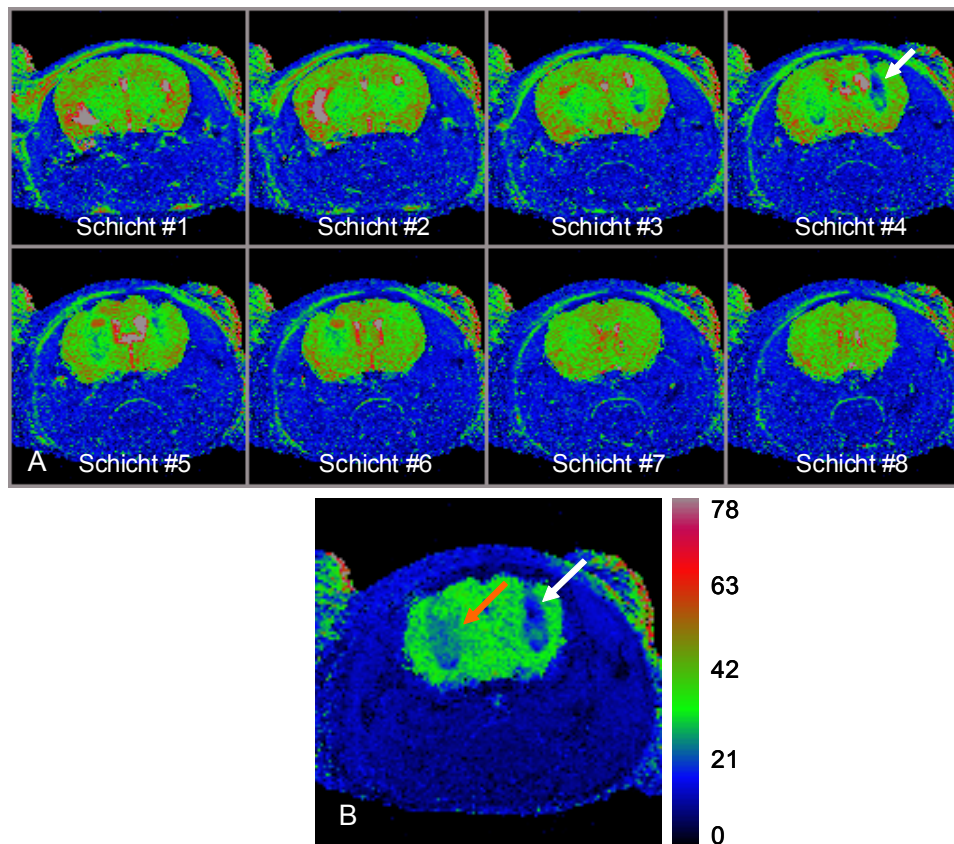


Abbildung 4–69: Ermittlung von T_2 Werten des Gehirns von Maus #1:

Durch die Analyse der T_2 -Mappe konnte die T_2 -Relaxationszeit von beiden Tumoren ermittelt werden. Dargestellt wurden die einzelnen Schichten (A) und eine Minimum-Intensitäts-Projektion der in A visualisierten Schichten (B). Der HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺ rechtsseitig lokalisierte Tumor (weißer Pfeil in B) weist einen signifikant niedrigeren T_2 -Wert auf als der rechtsseitig lokalisierte Kontrolltumor (roter Pfeil in B).

Anhand einer Minimum-Intensitäts-Projektion der in Abbildung 4–69 A dargestellten Schichten, wurde die T_2 -Relaxationszeit einzelner Bereiche im Gehirn berechnet. Für die liquorgefüllten Ventrikel konnte ein $T_2 = 132$ ms berechnet werden.

Es wurden T_2 -Relaxationszeiten zwischen $T_2 = 38$ ms bis $T_2 = 49$ ms in nativem Gehirngewebe detektiert. In dem Kontrolltumor auf der linken Seite (roter Pfeil in Abbildung 4–69 B) konnte ein Mittelwert von $T_2 = 21,4 (\pm 2)$ ms aus dem Mittelwert von acht ROIs im Tumorbereich ermittelt werden. In dem HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺-Tumor in der rechten Hemisphäre wurde $T_2 = 14,6 (\pm 4)$ ms berechnet (weißer Pfeil in Abbildung 4–69 B).

Bei der Analyse am 10. Untersuchungstag nach Transplantation von Tier #2 konnten mittels T_2^* -gewichteter Messungen in jeder Hemisphäre Bereiche mit einer stärkeren Signalauslöschung als im benachbarten Gehirngewebe identifiziert werden (Abbildung 4–70 A). Die Berechnung der T_2 -Relaxationszeit zeigt einen Bereich mit $T_2 = 11$ ms in der rechten Hemisphäre (roter Pfeil in Abbildung 4–70 B), dessen Lokalisation übereinstimmt mit den Ergebnissen der T_2 gewichteten Messung aus Abbildung 4–70 A. In der linken Hemisphäre konnte ein kleiner Bereich (gelber Pfeil in Abbildung 4–70 B) mit einem niedrigen T_2 -Wert identifiziert werden.

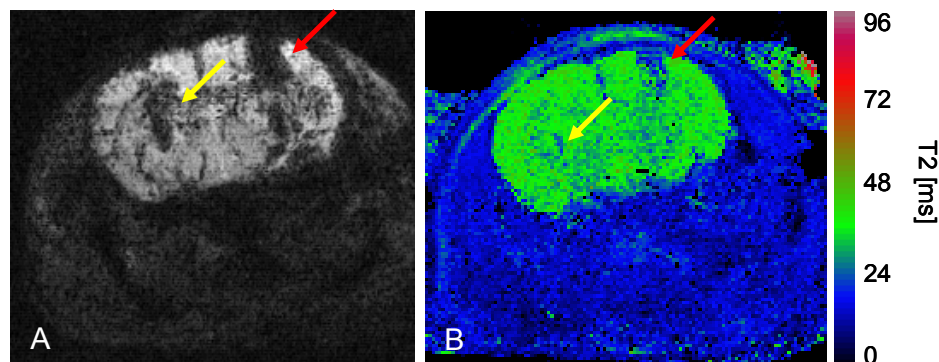


Abbildung 4–70: Signalauslöschung und Ermittlung von T_2 bei Tier #2, am 10. Untersuchungstag nach Transplantation der HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺-Gli36 Δ EGFR-Zellen:

Die abschließenden MRT-Untersuchungen am 10. Untersuchungstag mittels T_2 -gewichteter Mess-Sequenz zeigen, sowohl in der linken Hemisphäre (gelber Pfeil in A) als auch in der rechten Hemisphäre (roter Pfeil in A), distinkte Bereiche mit niedrigen Signalintensitäten. Die Berechnung der T_2 -Zeit führte ebenfalls zur distinkten Lokalisation von Bereichen mit einem $T_2 < 15$ ms (Pfeile in B).

4.5.5 Histologische Analyse der mit HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Gli36ΔEGFR-Zellen transplantierten Nacktmaus

Die histologische Analyse nach Perfusion des Tieres #1 mit 4 % Paraformaldehyd zeigt nach einer kombinierten Hämatoxylin und Eosin Färbung die beiden, in den Hemisphären lokalisierten Tumoren, die sich durch eine dichte und kondensierte Ansammlung von Zellen vom umliegenden Gehirngewebe abgrenzen. Im linken Tumor findet sich eine Zyste (roter Pfeil in Abbildung 4–71 A1). Durch eine DAB-verstärkte Berlinerblau-Färbung konnten auf den Gefrierschnitten, in denen beide Tumoren lokalisiert sind, eine deutliche Anreicherung von Berlinerblau⁺-Zellen in dem HA-Ferritin und Luziferase exprimierenden Tumor identifiziert werden (schwarzer Pfeil in Abbildung 4–71 A1-A3).

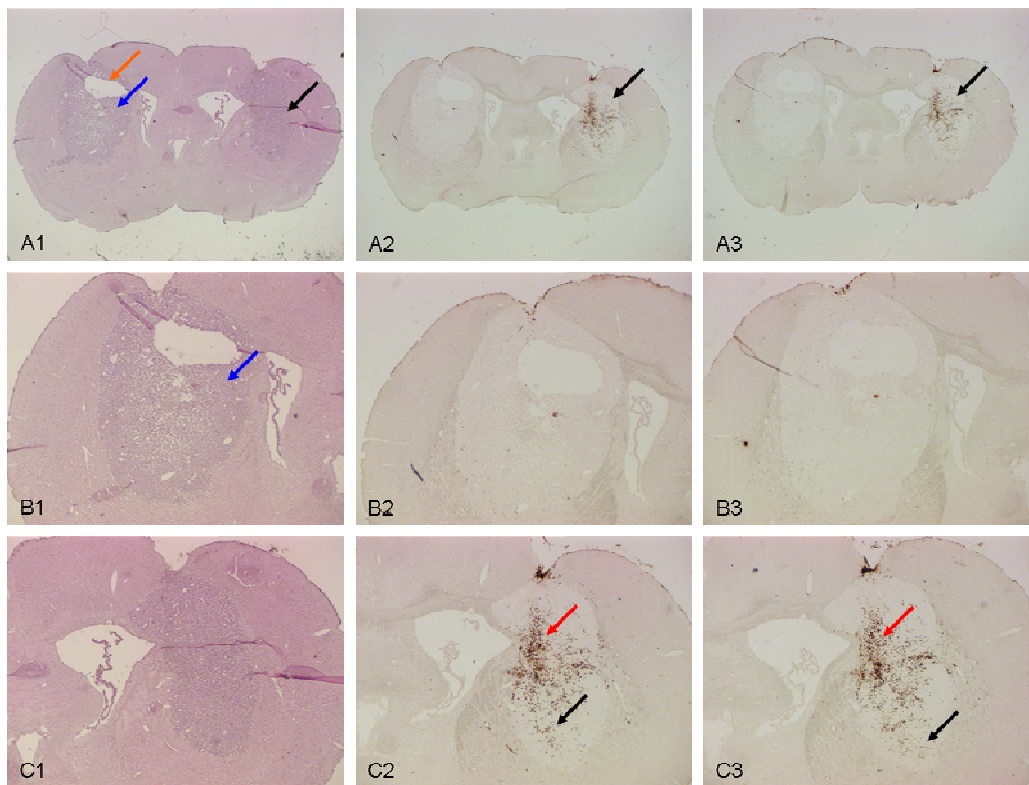


Abbildung 4–71: Übersicht über die Lokalisation von Berlinerblau⁺-Zellen in beiden Tumoren:

Nach Perfusion des Tieres am 10. Untersuchungstag konnte nach einer Hämatoxylin- und Eosin-Färbung die beiden Tumoren identifiziert werden (blauer und schwarzer Pfeil in A1). Der rote Pfeil in A1 weist auf eine Kavität innerhalb des linksseitig lokalisierten Tumors hin. Eine Berlinerblau-Färbung zeigte eine Anreicherung von Zellen mit erhöhtem Eisengehalt in dem HA-Ferritin und Luziferase-exprimierenden Tumor (A2-A3), die in dem Kontrolltumor nicht lokalisiert werden konnte. Aufnahmen mit höherer Vergrößerung bestätigen dies. In dem Kontrolltumor (B2-B3) kann keine Färbung mit Berliner-Blau erzielt werden, die Zellen im rechten Tumor weisen eine Verteilung der Berliner Blau⁺-Zellen (schwarze Pfeile in C2 und C3), außerhalb des Bereiches, in dem sich der Einstichkanal (roter Pfeil in C2 und C3) befindet, auf.

In dem linksseitig lokalisierten Kontrolltumor konnten histologisch, auch bei höherer Vergrößerung, keine Berlinerblau⁺-Zellen lokalisiert werden (Abbildung 4–71 B1-B3). Die detaillierte Übersicht über die Verteilung der Berliner-Blau⁺-Zellen im rechten Tumor zeigt

deutlich, dass einige der im Tumor vorkommenden Zellen Eisen enthielten (Abbildung 4–71 C2-C3). Auf zwei aufeinander folgenden Schnitten konnte eine Verteilung der Berlinerblau⁺-Zellen innerhalb des Tumors dokumentiert werden, die sich außerhalb der Einstichstelle befinden (Abbildung 4–71 C2-C3).

Anhand einer detaillierten Analyse einzelner Bereiche in dem Tumor, der HA-Ferritin- und Luziferase exprimierende Zellen enthält, konnte aufgrund der Morphologie der Zellen ausgeschlossen werden, dass es sich um Erythrozyten handelte (Abbildung 4–72 A-C). Die Zellen weisen einen Durchmesser von 6,1 µm bis 12 µm auf und besitzen teilweise Fortsätze (Pfeil in Abbildung 4–72 A). Es konnten Gefäße (blauer Pfeil in Abbildung 4–72 B-C) identifiziert werden, in deren Nähe ebenfalls Berliner-Blau⁺-Zellen lokalisiert sind (weiße Pfeile in Abbildung 4–72 B-C).

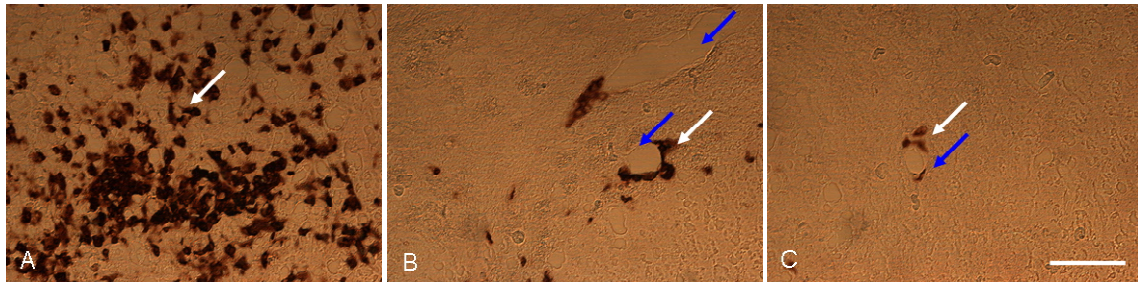


Abbildung 4–72: Detaillierte morphologische Analyse der Berlinerblau⁺-Zellen im HA-Ferritin- und Luziferase exprimierenden Tumor:

Innerhalb des Tumorgewebes der HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierenden Zellen konnte eine Ansammlung DAB-verstärkter Berlinerblau⁺-Zellen identifiziert werden (A). Diese Zellen weisen eine Morphologie mit Fortsätzen und einem Durchmesser des Zellkörpers von 6,1 µm bis 12 µm auf (weißer Pfeil in A), die zu einem Teil auch mit Gefäßen (blaue Pfeile in B und C) kolokalisiert sind. Maßstab: 50 µm.

Beide Tumoren konnten vom Hirngewebe durch einen Nachweis mit einem anti-Vimentin-Antikörper zur Visualisierung der Intermediärfilamente der Tumorzellen deutlich vom benachbarten Gehirngewebe abgegrenzt werden (Gehirngewebe: weiße Sterne, Tumorgewebe: rote Sterne in Abbildung 4–73 A-C). Oftmals sind die Vimentin⁺-Zellen in direkter Nachbarschaft von Blutgefäßen lokalisiert (Pfeil in Abbildung 4–73 A). Die gleiche distinkte Abgrenzung zwischen Gehirngewebe und Tumorgewebe konnte im HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierenden Tumor in der rechten Hemisphäre beobachtet werden. Zur Gegenfärbung wurde eine immunhistochemische Analyse mit einem anti-GFAP-Antikörper durchgeführt, der spezifisch Astrozyten markiert. Es konnten keine GFAP⁺-Zellen innerhalb des Tumorgewebes identifiziert werden (Abbildung 4–73 C). Dagegen finden sich im ventrikelumkleidenden Gehirngewebe und dem Tumor GFAP⁺-Astrozyten mit ausgeprägter radialer Morphologie (Pfeil in Abbildung 4–73 C). Zum Vergleich wurde eine Aufnahme der kortikalen Region gezeigt (Abbildung 4–73 D).

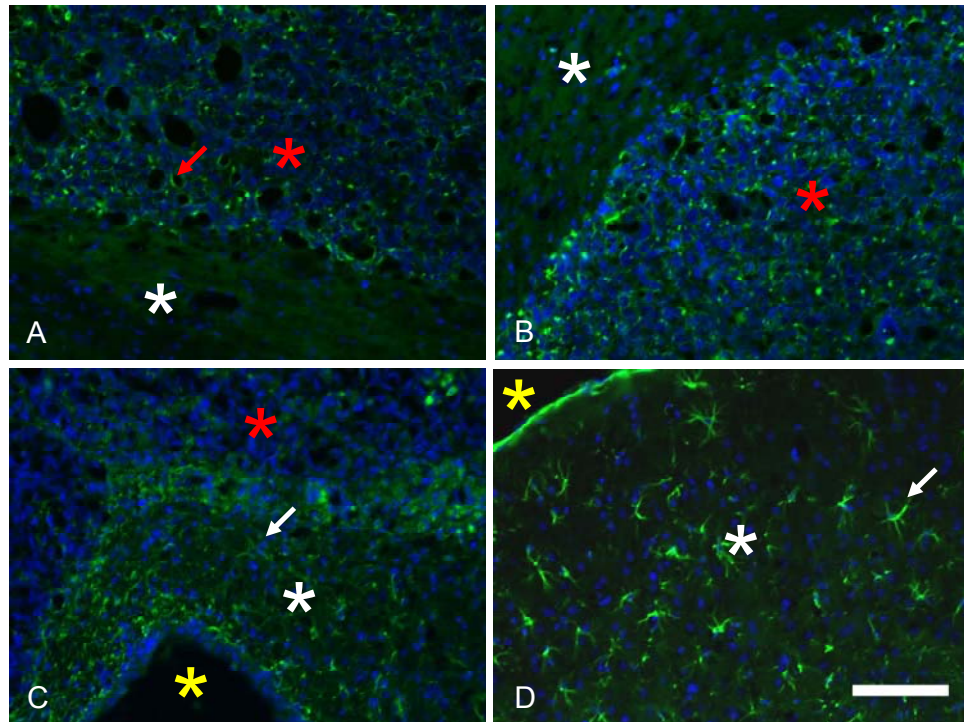


Abbildung 4–73 Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin und GFAP:

Durch eine immunhistochemische Analyse mittels anti-Vimentin-Antikörper (grün in A, B) konnte der linksseitig lokalisierte Kontrolltumor (A, roter Stern) vom Gehirngewebe (A, weißer Stern) abgegrenzt werden. Vimentin⁺-Zellen konnten nur innerhalb des Tumorgewebes lokalisiert werden und weisen teilweise eine Assoziation mit Blutgefäßen auf (roter Pfeil in A). Die gleiche Abgrenzung zwischen Gehirngewebe und Tumorgewebe konnte bei dem HA-Ferritin und Luziferase exprimierenden Tumor beobachtet werden (B). Eine Abgrenzung des Gehirngewebes von den Tumoren konnte mittels eines Astrozyten-spezifischen Nachweises unter Verwendung eines anti-GFAP-Antikörpers (grün in C,D) vorgenommen werden. GFAP⁺-Zellen konnten in der Region zwischen Ventrikel (gelber Stern) und Tumorgewebe (C) und auch innerhalb des Kortex (D) detektiert werden. Die Nuklei wurden mit Hoechst Dye 33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 25 µm.

Für die Lokalisation und Identifizierung der HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierenden Zellen innerhalb des rechtsseitig lokalisierten Tumors, wurde eine immunhistochemische Analyse mit einem anti-HA-Antikörper durchgeführt. Innerhalb des Kontrolltumors und des nativen Gehirngewebes konnten keine HA⁺-Zellen identifiziert werden (Abbildung 4–74 A). Es finden sich zahlreiche HA⁺-Zellen innerhalb des rechtsseitig lokalisierten Tumors, die teilweise mit Blutgefäßen assoziiert waren. Die Zellen weisen eine ausgeprägte Morphologie auf, die verglichen werden kann mit der in Abbildung 4–72 beobachteten Morphologie nach DAB-verstärkter Berliner-Blau-Färbung.

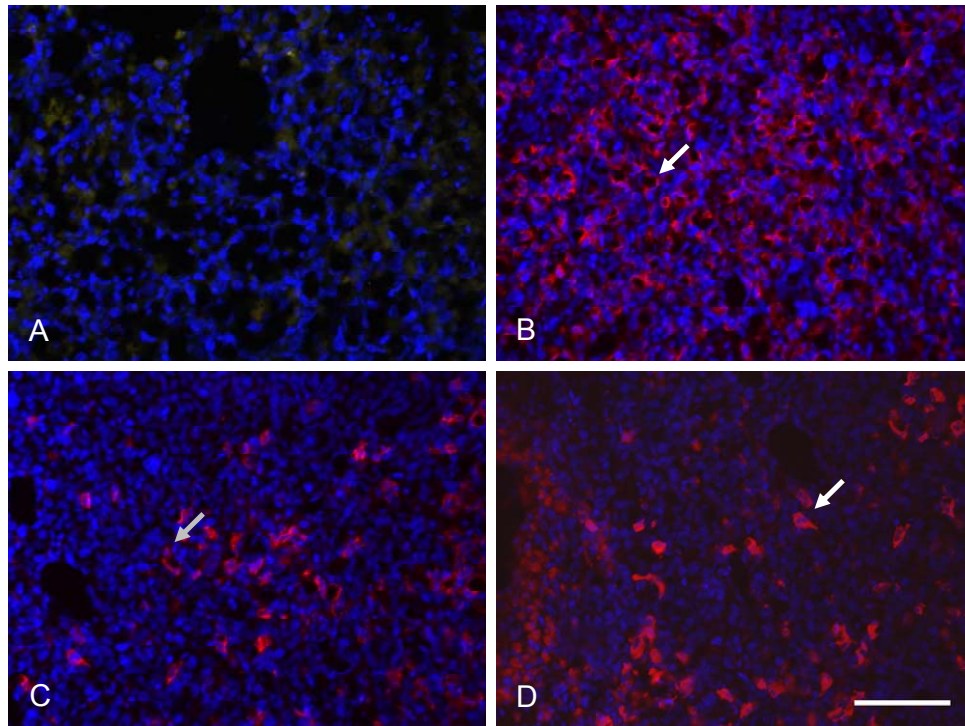


Abbildung 4-74: Immunhistochemischer Nachweis der Expression des HA-Fusionsproteins:

Bei einem immunhistochemischen Nachweis der HA-Expression konnten keine HA⁺-Zellen innerhalb des Kontrolltumors identifiziert werden (A). Zahlreiche HA⁺-Zellen befinden sich innerhalb des auf der rechten Hemisphäre lokalisierten Tumors, die teilweise mit Blutgefäßen assoziiert waren (Pfeil in B), und entlang des Ventrikels (D). Die HA⁺-Zellen weisen einen Nukleus und eine lang gestreckte Morphologie auf (Pfeil in D). Farbnachweis: rot: anti-HA; blau: Hoechst Dye 33342. Maßstab: 50 µm.

4.5.6 Einzelzellklonierung der Gli36ΔEGFR-2/C3-Zelllinie

Durch immunzytochemische Inkubation mit dem anti-HA-Antikörper wurde beobachtet, dass sich innerhalb der Zellpopulation HA⁺-Zellen befanden. Bei repetitiven Bestimmungen der Luziferaseaktivität konnte eine Abnahme des registrierten Photonenflusses festgestellt werden. Es wurde von den 2/C3-Zellen eine anschließende Einzelzellklonierung vorgenommen und die Zellen expandiert. Die Auswahl der Klone für anschließende Experimente wurde aufgrund mehrfacher Bestimmung der Luziferaseaktivität über einen Zeitraum von 14 Tagen vorgenommen (Abbildung 4–75). Klon #5 und Klon #15 wiesen bei den Experimenten den kontinuierlich stabilsten und höchsten Photonenflux auf und wurden für alle weiteren Versuche in dieser Arbeit verwendet.

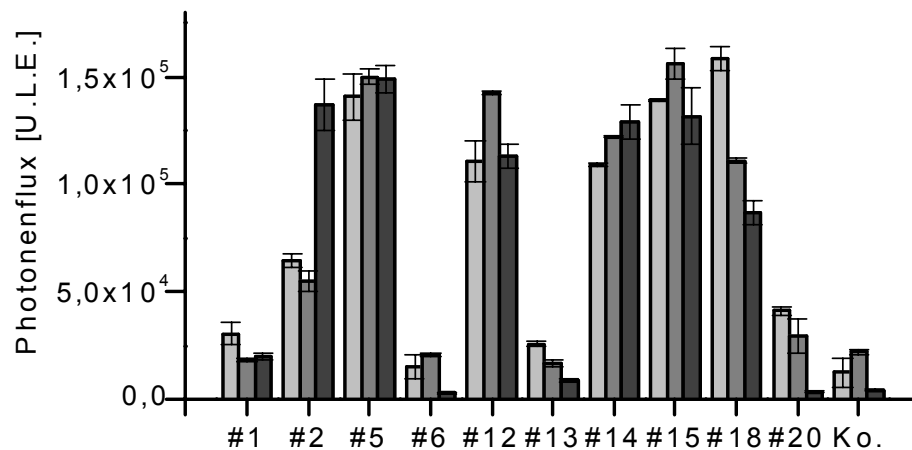


Abbildung 4–75: Determination der Luziferaseaktivität von 10 HA-Ferritin-IRES-Luziferase⁺-Gli36ΔEGFR-Klonen:

Die Luziferaseaktivität von 10 Klonen der mit der MOI 1 viral transduzierten Gli36ΔEGFR-Zellen wurde über 14 d analysiert. Für jede Einzelmessung wurden 5×10^4 Zellen eingesetzt und die nach Zugabe von Luziferin emittierten Photonen im Luminometer für 10 s integriert. Für die weiteren Experimente wurden die Klone #10 und #15 ausgewählt. In jeder einzelnen Messung wurde eine Doppelbestimmung der Luziferaseaktivität vorgenommen. Anzahl unabhängiger Stichproben: $n = 3$.

Es wurde die Kinetik der Luziferasereaktion bei den Gli36ΔEGFR-HA-Ferritin-IRES-Luziferase⁺-Klonen #5 und #15 im Vergleich zu der nicht-transduzierten Gli36ΔEGFR-Zelllinie ermittelt (Abbildung 4–76). Bei dem Zeitpunkt 19 min nach der Zugabe von D-Luziferin konnte bei Klon #5 die maximale Photonenemission von $1,8 \times 10^5$ (± 9670) U.L.E. detektiert werden. Die maximale Photonenemission von $2,8 \times 10^5$ (± 4847) U.L.E. konnte bei Klon #15 erst 70 min nach der Substrataddition dokumentiert werden. Bei den Kontrollzellen konnte im Untersuchungszeitraum keine Photonenemission (> 3882 (± 365) U.L.E.) festgestellt werden.

Der Einfluss von Phenolrot als Medienkomponente auf die Entwicklung des Hintergrundsignals konnte in einer konzentrationsabhängigen Untersuchung ausgeschlossen werden.

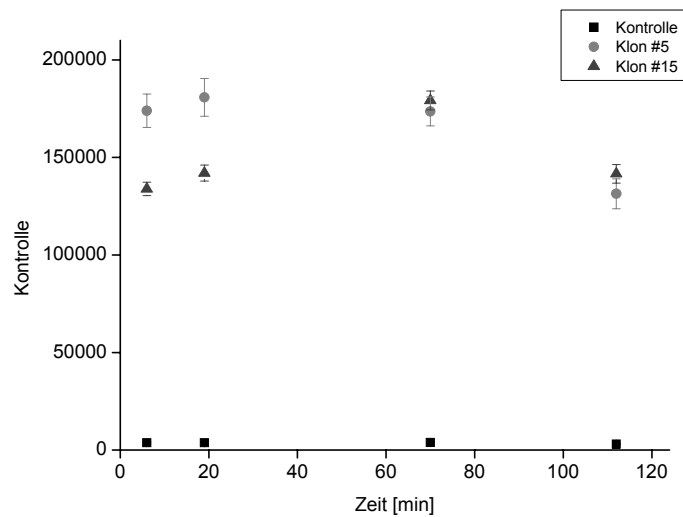


Abbildung 4–76: Kinetische Untersuchung der Luziferasereaktion:
 Die Luziferaseaktivität der HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺ Klone #5 und #15 wurden im Vergleich zu untransduzierten Kontrollzellen in einer Messung über 120 min bestimmt. Jeweils vier Einzelmessungen wurden berücksichtigt. Anzahl unabhängiger Stichproben: n = 1.

4.5.7 Immunzytochemische Charakterisierung der Expression von HA-Ferritin, Luziferase und der Intermediärfilamente in den Gli36ΔEGFR-HA-Ferritin-IRES-Luziferase Zellen

Die HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierenden Klone #5 und #15 der transduzierten Gli36ΔEGFR Zelllinie wurden immunzytochemisch auf die Expression des N-terminal fusionierten Hämagglutinins (HA) und die Expression von Luziferase mit entsprechenden spezifischen Antikörpern untersucht. Zusätzlich wurden die untransduzierten Zellen und die lentiviral mit dem Virus LV-CMV-Luziferase transduzierten Gli36Δ-EGFR-Zellen untersucht. Zur Visualisierung der Intermediärfilamente wurde ein anti-Vimentin-Antikörper benutzt.

Die Klone #5 und #15 zeigten eine starke Expression des HA-Ferritins, die keine zytoplasmatische Verteilungspräferenz erkennen ließ (Abbildung 4–77). Es konnte beim direkten Vergleich zwischen den beiden Klonen visuell kein Unterschied in der Expressionsstärke nachgewiesen werden. Allerdings wiesen einzelne Zellen innerhalb der Population eine starke Expression auf. Diese Zellen waren häufig oberhalb der Zellen auf der Kulturoberfläche angeordnet. Anhand der Hoechst Dye 33342 Färbung wird erkennbar, dass diese Zellen kondensierte DNA und einen verkleinerten Zellkern aufweisen. Die untransduzierten Kontrollzellen und die Luziferase⁺-Zellen weisen keine HA-Expression auf.

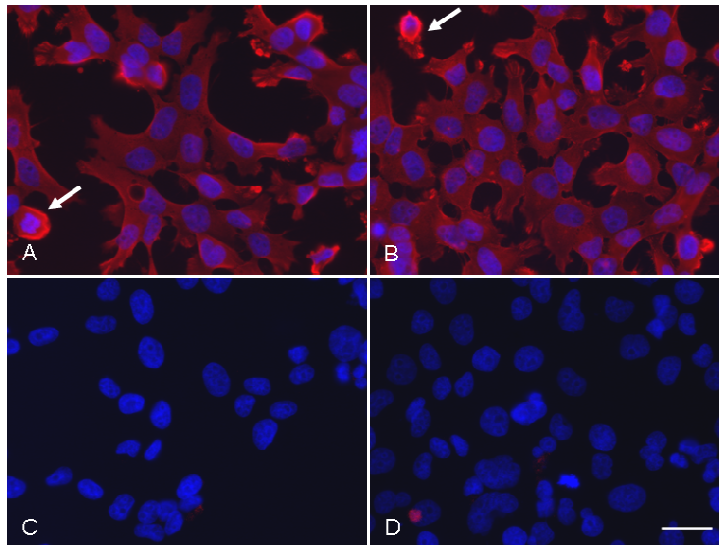


Abbildung 4-77: Immunzytochemischer Nachweis der Hämagglutininexpression:

Es wurde mit einem spezifischen Antikörper die Expression von HA in den Zellen Gli36 Δ EGFR-Ferritin-IRES-Luziferase-Klon #5 (A), Klon #15 (B) und als Kontrollzelllinien die untransduzierten Zellen (C) und der Luziferase⁺ Klon 4/2N (D) verwendet. Es konnte eine hohe Expression von HA bei den Klonen #5 und #15 nachgewiesen werden. In den Kontrollzelllinien wurde keine Expression von HA-Ferritin beobachtet. Die Pfeile in den Abbildungen A und B zeigen Zellen, die eine hohe Expression von HA-Ferritin aufweisen. Farbzuzuordnung: rot: anti-HA, blau: Hoechst Dye 33342. Maßstabsbalken: 25 μ m.

Bei der Luziferaseexpression zeigen die Klone #5 und #15 eine schwächere Expression im Vergleich mit der Zelllinie 4/2N und ebenfalls eine homogene zytoplasmatische Verteilung (Abbildung 4-78), wobei das Enzym nicht im Zellkern lokalisiert war.

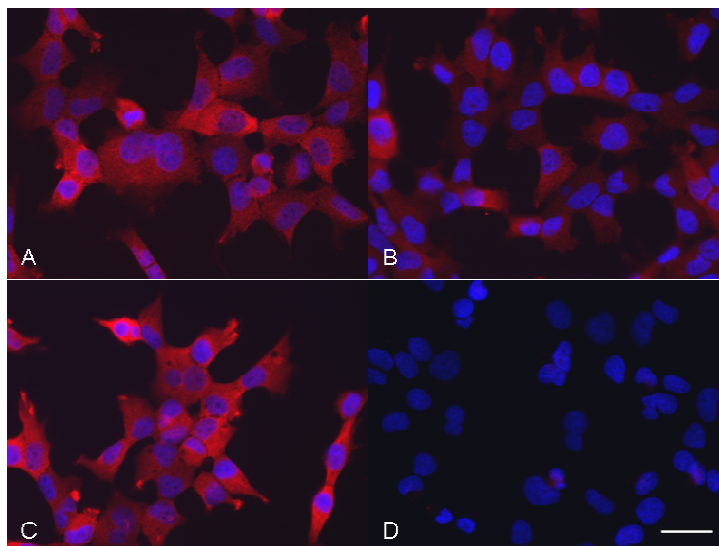


Abbildung 4-78: Immunzytochemischer Nachweis der Luziferaseexpression:

Es befindet sich eine Expression der Luziferase in dem Klon #5 (A), dem Klon #15 (B) und der Luziferase⁺-Zelllinie 4/2N (C). Im semiquantitativen Vergleich der Expressionsstärken fällt die stärkere Expression der Luziferase in den 4/2N-Zellen im Vergleich zu den beiden Klonen #5 und #15 deutlich auf. Es konnte bei der nicht-transduzierten Kontrollzelllinie keine Luziferaseexpression nachgewiesen werden (D). Farbzuzuordnung: rot: anti-Luziferase, blau: Hoechst Dye 33342. Maßstabsbalken: 25 μ m.

Es konnte keine Luziferaseexpression bei den untransduzierten Kontrollzellen nachgewiesen werden.

Die anti-Vimentinfärbung zeigt bei den Klonen #5, #15, sowie bei der Zelllinie 4/2N eine homogene zytoplasmatische Verteilung. Allerdings fällt bei allen drei Zelllinien, die entweder Luziferase oder die Reporterkombination HA-Ferritin und Luziferase überexprimieren, eine kleinere Morphologie der einzelnen Zellen im Vergleich mit den untransduzierten Kontrollzellen auf. Dies ist besonders deutlich anhand der Proportionen Zellkern zu Vimentinzytoskelett. Mitotisch aktive Zellen scheinen ein kleineres Zytoplasma aufzuweisen, wohingegen sich bei dem Nachweis von Vimentin im Vergleich zu der anti-HA Färbung kein entscheidender Unterschied in der Stärke der zellulären Anfärbung manifestiert (Pfeile in Abbildung 4–79).

Um einen Nachweis der Überexpression der schweren Kette des Ferritinmoleküls zu erhalten, der unabhängig von der Expression des N-terminal fusionierten Hämagglutins ist, wurde ein gegen die schwere Kette des Ferritinmoleküls gerichteter, polyklonaler Antikörper verwendet. Dieser Antikörper erkennt einen Teil in der Aminosäuresequenz des Proteins, der weder C-terminal noch N-terminal lokalisiert ist. Nach der Analyse konnte kein Unterschied in der Expression und der subzellulären Lokalisation von HA-Ferritin bei der Verwendung dieses Antikörpers zwischen den Zelllinien festgestellt werden (Abbildung 4–80).

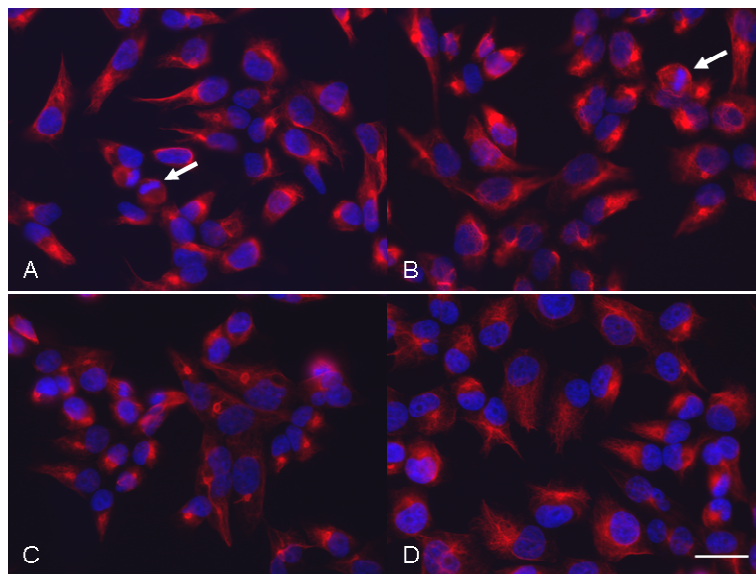


Abbildung 4–79: Immunzytochemischer Nachweis der Intermediärfilamente anhand einer Vimentinfärbung:

Es wurden mit einem spezifischen Antikörper, gerichtet gegen Vimentin, die Intermediärfilamente in den Klonen #5 (A), Klon #15 (B) und den Kontrollzelllinien 4/2N und Δ WT nachgewiesen. Die Pfeile deuten auf mitotisch aktive Zellen, die ein kondensiertes Zytoplasma aufweisen. Farbenzuordnung: rot: anti-HA, blau: Hoechst Dye 33342. Maßstabsbalken: 25 μ m.

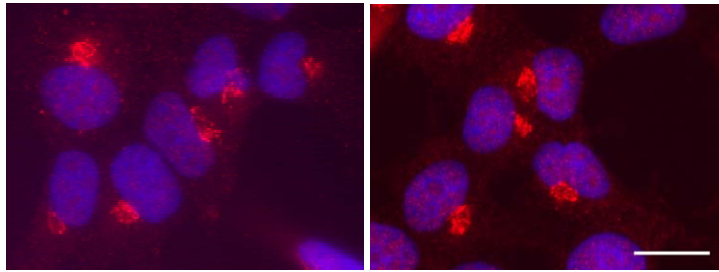


Abbildung 4–80: Immunzytochemischer Nachweis der schweren Kette des Ferritinmoleküls:

Die vier Zelllinien wurden auf die Expression der schweren Kette des Ferritinmoleküls untersucht. Exemplarisch dargestellt sind die Klon #5-Zellen (A) und Wildtypzellen (B). Deutlich identifizierbar ist eine perinukleäre Expression von HA-Ferritin, die sich bei den zwei Zelllinien allerdings in der Expressionsstärke nicht unterscheidet. Farbenzuordnung: rot: anti-HA, blau: Hoechst Dye 33342. Maßstabsbalken: 15 μm .

Mittels eines polyklonalen Antikörpers, der die Autophosphorylierungsstelle der fokalen Adhäsionskinase (FAK) an Tyrosin 397 detektiert, konnte die Lokalisation der FAK bei den Zellen des Klon #5 und Kontrollzellen untersucht werden (Abbildung 4–80). Beide Zelllinien wurden mit und ohne Supplementation von FAC kultiviert um eine Beteiligung der FAK bei dem beobachteten Adhäsionseffekten, die bei dem Klon #5 von der exogenen Eisensupplementation abhing, zu untersuchen. Bei beiden Zelllinien konnte unabhängig von der Kultivierungsart kein Unterschied in der Lokalisation der FAK festgestellt werden.

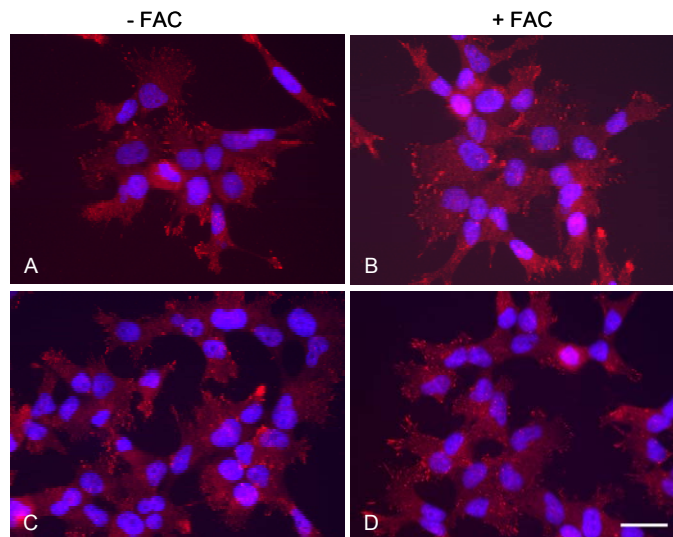


Abbildung 4–81: Immunzytochemische Untersuchung der an Tyrosin 397 phosphorylierten fokalen Adhäsionskinase:

Die Expression der FAK an Gli36 Δ EGFR-(A und B) und Klon #5-Zellen (C und D) wurde mit (B und C) und ohne (A und C) Supplementation von 2 mM FAC untersucht. Es konnten keine Unterschiede in allen vier Proben detektiert werden. Farbenzuordnung: rot: anti-FAK, blau: Hoechst Dye 33342. Maßstabsbalken: 25 μm .

4.5.8 Überexpression des HA-Ferritin-Proteins

Zur Überprüfung der erfolgten Expression des HA-Ferritin-Proteins in den HA-Ferritin-IRES-Luziferase⁺-Gli36ΔEGFR-Klonen wurde Gesamtprotein der Zelllinien Gli36ΔEGFR, Klon 4/2N, 2/C3 und Klon #5 elektrophoretisch aufgetrennt und mit anti-HA-Antikörper und anti-Ferritin-Antikörper in einem Western Blot detektiert. Um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Antikörper anschließend vom Blot entfernt und das konstitutiv exprimierte Protein α-Tubulin auf dem gleichen Blot nachgewiesen (Abbildung 4–82).

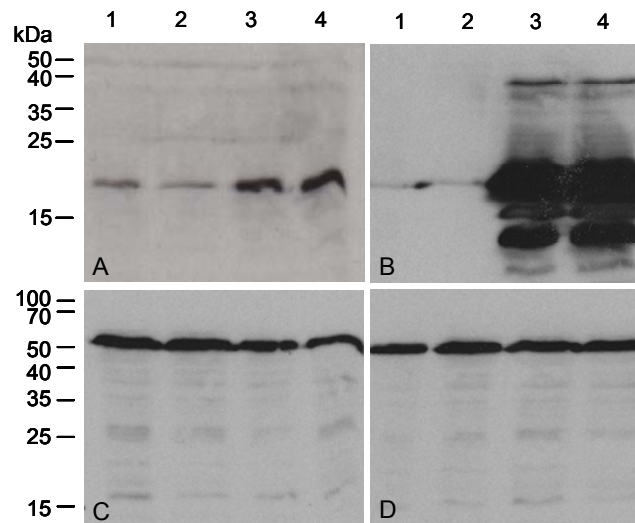


Abbildung 4–82: Nachweis der Expression von Ferritin in Gli36ΔEGFR, Klon 4/2N, der Zelllinie 2/C3 und dem Klon #5:

Die Detektion von Ferritin (A), HA (B) und α-Tubulin (C und D) mit spezifischen Antikörpern wurde im Western Blot durchgeführt. Aufgetragen wurden Zellysate von Gli36ΔEGFR (Spur 1), Klon 4/2N (Spur 2), der Zelllinie 2/C3 (Spur 3) und dem Klon #5 (Spur 4). Pro Spur sind 30 µg Gesamtprotein aufgetragen. Während die Beladung der einzelnen Spuren gleich war (α-Tubulin-Nachweis), war die Expression von Ferritin in der Zelllinie 2/C3 und dem Klon #5 stärker. HA wurde nur in den beiden HA-Ferritin exprimierenden Zelllinien nachgewiesen.

In der Zelllinie 2/C3 und dem Klon #5 war die Menge an Ferritin höher als in den beiden, nicht-überexprimierenden Zelllinien. Die Detektion mit dem anti-HA-Antikörper war bei den beiden HA-Ferritin exprimierenden Zelllinien stark. Die Ladekontrolle mit dem Nachweis von α-Tubulin ist bei allen Spuren gleich stark.

4.5.9 Proliferation der HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Gli36ΔEGFR-Zellen in Abhängigkeit exogener Supplementation mit Eisen(III)-Ammoniumzitat

Bei der Kultur der Zellen konnten seit der initialen Transduktion mit dem Virus LV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase eine stärkere Adhäsion an die Kulturschalenoberfläche und eine verringerte Proliferationsrate beobachtet werden. Um diese Beobachtungen zu untersuchen, wurden die lentiviral transduzierten Zellen in Gegenwart von 500 µM Eisen(III)-Ammoniumzitat (FAC) kultiviert, um eine exogene Eisenversorgung zu gewährleisten.

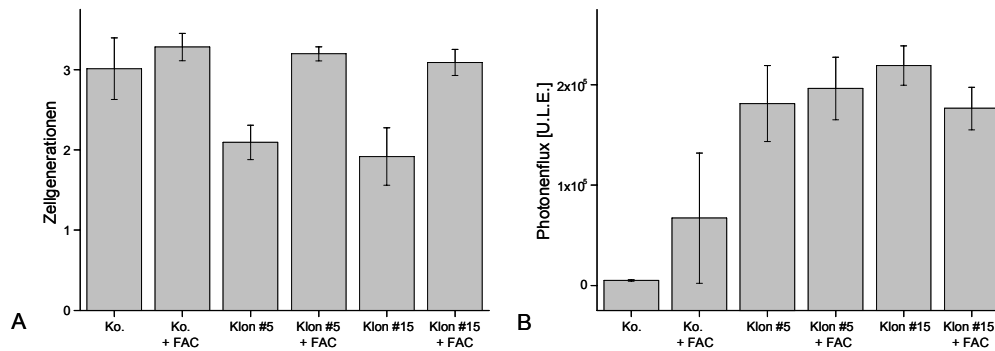


Abbildung 4–83: Effekte der exogenen Eisen(III)-Ammoniumzitratsupplementation auf die Proliferation der HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Gli36ΔEGFR-Klone:

HA-Ferritin und Luziferase überexprimierende Gli36ΔEGFR-Zellen wurden in Gegenwart von 500 μM Eisen(III)-Ammoniumzitrats für 96 h kultiviert. Die Ermittlung der in dieser Zeit gebildeten Zellgenerationen konnte durch die Zugabe von FAC im Vergleich zu unbehandelten Bedingungen signifikant gesteigert werden. Es konnte kein signifikanter Einfluss der Supplementation auf die Proliferationsrate der untransduzierten Kontrollen detektiert werden (A). Um auszuschließen, dass die Zugabe von Eisen(III)-Ammoniumzitrats einen Einfluss auf die Detektion der emittierten Photonen ausübt, wurde nach Zugabe von D-Luziferin der Photonfluss registriert. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass die Supplementation einen negativen Einfluss auf die Photonendetektion hat (B). Anzahl unabhängiger Stichproben: n = 3.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsaktivität der Kontrollzellen beobachtet werden, wenn diese mit Eisen(III)-Ammoniumzitratsupplementation kultiviert wurden (Abbildung 4–83). In dem Untersuchungszeitraum von 96 h konnten bei Applikation von FAC 3,28 (± 0,28) Zellgenerationen dokumentiert werden. Ohne die exogene Supplementation konnten 3,0 (± 0,3) Zellgenerationen festgestellt werden. Bei den beiden HA-Ferritin exprimierenden Klonen #5 und #15 konnten signifikante Unterschiede erkannt werden. Bei exogener Zugabe von FAC stiegen bei Klon #5 die gebildeten Generationen um 1,17 an. Bei Klon #15 konnte eine Zunahme um 1,1 Generationen beobachtet werden.

Es konnte kein signifikanter Einfluss auf die Detektion emittierter Photonen, die bei der Luziferasereaktion gebildet wurden, mit der exogenen Zugabe von 500 μM Eisen(III)-Ammoniumzitrats gemessen werden (Abbildung 4–83).

Es ist anzumerken, dass sich die HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Zellen unter dem Einfluss von Enzymen mit proteolytischen und kollagenolytischen Aktivitäten leichter von der Zellkulturschalenoberfläche ablösen, wenn eine Kultivierung in Gegenwart von 500 μM Eisen(III)-Ammoniumzitrats erfolgte.

4.5.10 Supplementation von exogenem Eisen(III)-Ammoniumzitat zu Bildungszwecken bei den Klonen #5 und #15 der Zelllinie Gli36ΔEGFR

4.5.10.1 *In vitro* Validierung der Eisenaufnahme

Die Klone #5 und Klone #15 wurden für 24 h in Gegenwart von 2 mM FAC kultiviert und mittels Berliner-Blau und DAB-verstärkter Berliner-Blau-Färbung untersucht. Als Kontrollgruppe wurde die lentiviral mit dem Virus LV-CMV-Luziferase transduzierte Zelllinie Gli36ΔEGFR-Klon 4/2N untersucht. Mittels der nicht verstärkten Berlinerblau-Färbung können deutlich zwei Typen der zytoplasmatischen Verteilung unterschieden werden. Es finden sich sehr stark markierte Zellen mit einer runden Morphologie (Abbildung 4–84 B2) und Zellen, die eine schwächere Anreicherung von Eisen und eine flachere Morphologie aufweisen.

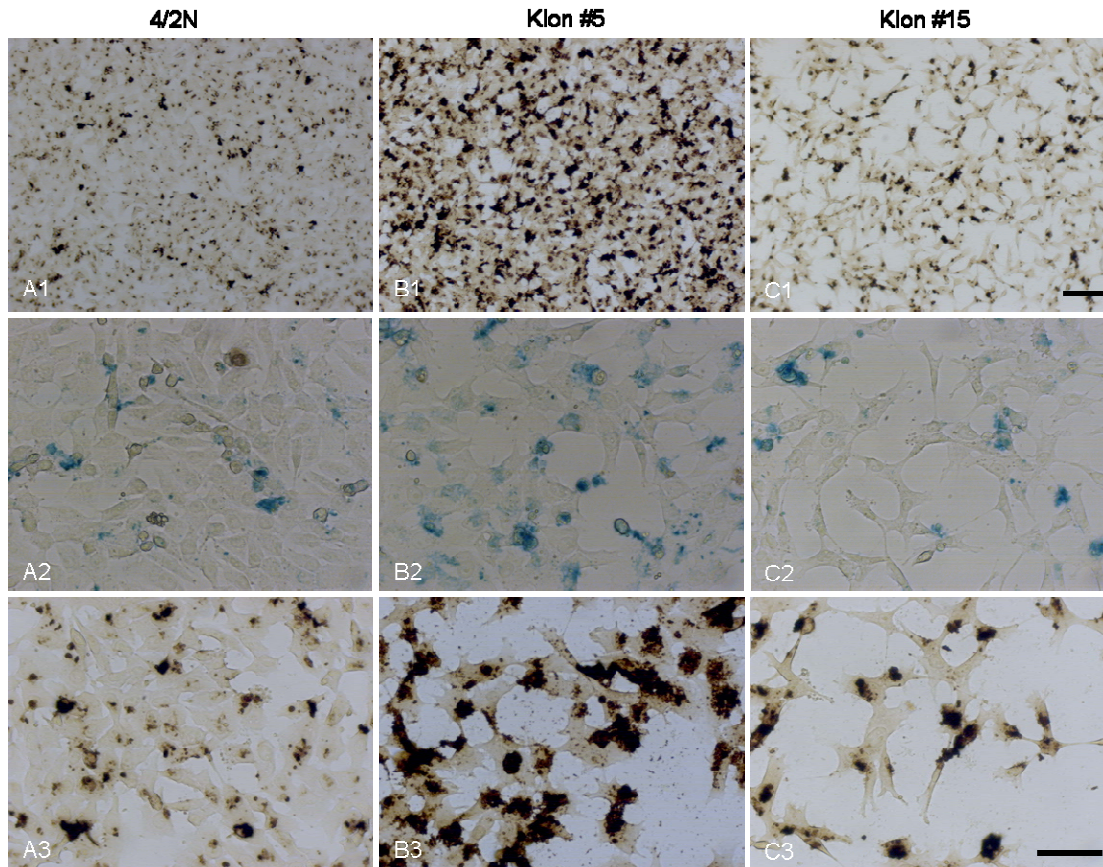


Abbildung 4–84: Untersuchung der Eisenspeicherung nach Inkubation mit Eisen(III)-Ammoniumzitat:

Luziferase⁺ Kontrollzellen der Zelllinie 4/2N zeigten nach 24 h Inkubation mit 2 mM FAC eine deutlich geringere Anfärbung in der DAB-verstärkten Berlinerblau-Färbung (A1) im Vergleich mit der HA-Ferritin- und Luziferase überexprimierenden Zelllinie Klon #5 (B1) und der Zelllinie Klon #15 (C1). Vergrößerungen dieser Bilder sind in A1, B1, C1. Die nicht DAB-verstärkte Berliner Blau-Färbung verdeutlicht die zytoplasmatische Verteilung (A2, B2, C2). Es können prinzipiell zwei unterschiedliche Zell-Morphologien unterschieden werden. Durch die Verwendung der DAB-Verstärkung werden auch kleinere zytoplasmatische Eisenvorkommen deutlicher sichtbar. Maßstab: A1, B1, C1: 100 µm; A2, A3, B2, B3, C2, C3: 50 µm.

Die Berlinerblau-Anfärbung der Klon #15 Zellen ist um ein vielfaches geringer, als bei Klon #5 (Abbildung 4–84 C1-C3). Die Berliner Blau⁺-Zellen weisen aber verglichen mit der Kontrollzelllinie eine stärkere Eisenspeicherung auf.

Die mit 2 mM FAC inkubierten Kontrollzellen und HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Zellen wurden mittels T₂*-gewichteter MRT-Messung bei einer Echozeit von TE = 18 ms untersucht (Abbildung 4–85).

Die Kontrollzellen wiesen eine leichte Signalintensitätsveränderung auf, durch die sie deutlich vom Hintergrund unterschieden werden können (Abbildung 4–85 A). Klon #5 und Klon #15 wiesen eine starke Anreicherung von Eisen auf. Die Quantifizierung nach Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen bestätigt die visuellen Eindrücke. Der Wert bei der Zelllinie Klon #5 betrug [9,7] (± 2,0) und bei Klon #15 [7,7] (± 0,3) Es konnte gegenüber der Kontrollzelllinie 4/2N, die ein Kontrast : Gelrauschen-Verhältnis von [1,0] (± 0,8) aufwies, eine deutliche Steigerung der Detektion erreicht werden.

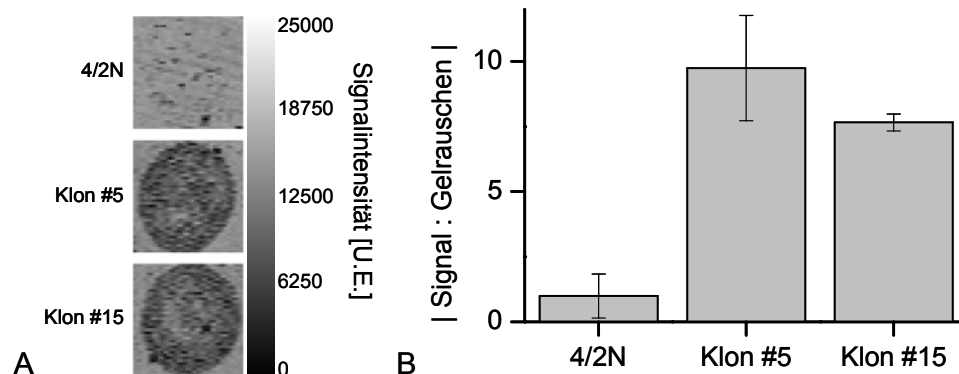


Abbildung 4–85: Detektion der mit FAC inkubierten Kontrollzellen 4/2N und HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Gli26ΔEGFR-Zellen:

Die MRT-Untersuchung mit einer Echozeit von TE = 18 ms führte zu einer klaren Identifikation von Klon #5 und Klon #15 durch die Verringerung der ermittelten Signalintensität im Vergleich zum Hintergrund und der Kontrollzelllinie 4/2N (A). Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen ermittelt (B). Die Anzahl der Stichproben war n = 3.

Um die minimal detektierbare Zellmenge zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe der mit 2 mM FAC inkubierten Zellen erstellt und mittels MRT untersucht (Abbildung 4–86). Eine Zellmenge von 30 000 Zellen konnte eindeutig von der Hintergrund-Signalintensität und von der Kontrollzelllinie 4/2N diskriminiert werden (Abbildung 4–86 A). Die minimal detektierbare Zellmenge betrug bei dieser Untersuchung für Klon #5 1500 Zellen. Die Signalintensitäten der mit FAC inkubierten Kontrollzelllinie unterschieden sich zwar signifikant vom Hintergrund, korrelierten aber nicht mit der in der Probe vorhandenen Zellzahl (Abbildung 4–86 B). Als Grundlage für die quantitative Auswertung wurde das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen ermittelt. Bei Zellmengen > 3000 konnte bei den HA-Ferritin- und Luziferase exprimierenden Tumorzellen ein linearer Anstieg der Funktion beobachtet werden (Abbildung 4–86 B).

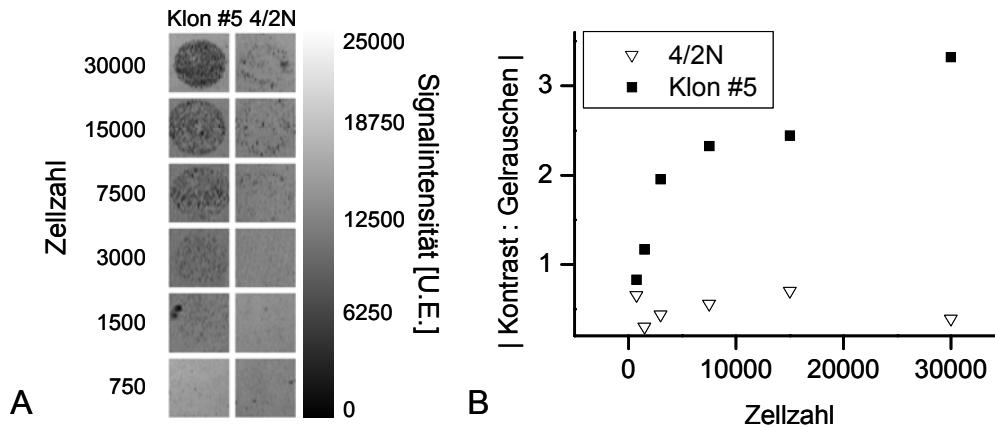


Abbildung 4–86: MRT-Untersuchung der beiden Zelllinien Gli36ΔEGFR- Klon 4/2N und Klon #5 nach exogener Eisensupplementation:

Zellmengen zwischen 750 Zellen und 3×10^4 Zellen wurden in einem identischen Volumen mittels MRT untersucht (A). Die gewählte Echozeit betrug $TE = 18$ ms und die Repetitionszeit betrug $TR = 200$ ms. Es konnte eine eindeutige Identifikation der mit FAC inkubierten Zellen vorgenommen werden. Die Signalintensität der HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierenden Tumorzellen war in diesem Experiment bei allen untersuchten Zellmengen signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen erniedrigt. Die Ermittlung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen zeigt für die Kontrollzellen keine Korrelation zwischen untersuchten Zellmenge und Signalintensität (B).

Zur unabhängigen Validierung der Eisenaufnahme nach Präinkubation mit FAC wurde die intrazelluläre Eisenkonzentration durch einen quantitativen Eisentest ermittelt. Innerhalb der Experimente konnte bei den 4/2N Kontrollzellen eine Eisenkonzentration von $74,7 (\pm 36,3) \mu\text{M}$ nach 20 h Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ FAC nachgewiesen werden (Abbildung 4–87 A). Bei Klon #5 konnte ohne die Inkubation mit FAC eine Eisenkonzentration von $39,8 (\pm 35,7) \mu\text{M}$ ermittelt werden und unterschied sich damit von den unbehandelten Kontrollzellen, die eine Konzentration von $15,9 (\pm 7,3) \mu\text{M}$ aufwiesen. Die Eisenkonzentration der mit $500 \mu\text{M}$ FAC inkubierten Klon #5 Zellen betrug $128,5 (\pm 70,1) \mu\text{M}$. Die Eisenkonzentration der Kontrollzellen wurde durch die Inkubation mit FAC ebenfalls erhöht. Es konnte in dieser Gruppe ein Wert von $74,7 (\pm 36,3) \mu\text{M}$ ermittelt werden. Durch die Inkubation mit FAC konnte auch eine Zunahme der Eisenkonzentration des Klon #15 von $19,7 (\pm 12,6) \mu\text{M}$ auf $91,5 (\pm 23,6) \mu\text{M}$ beobachtet werden.

Durch die Untersuchung der zeitlich abhängigen Aufnahme von FAC konnte ein Profil der intrazellulären Eisenaufnahme erstellt werden (Abbildung 4–87 B). Innerhalb von 4 h konnte eine deutlich höhere Akkumulation von Eisen in den Zellen von Klon #5 beobachtet werden. Die Konzentration stieg von $36,25 \mu\text{M}$ auf $106,25 \mu\text{M}$, während die Konzentration der Kontrollzellen sich nur von $18,25 \mu\text{M}$ auf $36,25 \mu\text{M}$ erhöhte. Die Aufnahme von Eisen stieg bis zum untersuchten Zeitpunkt von 55 h an. Die Eisenkonzentration bei Klon #5 betrug $161,25 \mu\text{M}$, während bei Klon #15 eine niedrigere Konzentration von $101,26 \mu\text{M}$ ermittelt wurde. Die Kontrollzellen unterschieden sich von beiden HA-Ferritin⁺-Zelllinien durch eine geringere Eisenspeicherung von maximal $86,25 \mu\text{M}$ nach 55 h Kultivierungszeit.

In einem weiteren vergleichenden Experiment mit den Konzentrationen 500 μM und 2 mM FAC konnte eine signifikant höhere Eisenspeicherung bei den Klonen #5 und #15 im Vergleich zum Klon 4/2N dokumentiert werden (Abbildung 4–87 C). Die Eisenkonzentrationen von 8,61 μM nach 48 h Inkubation mit 500 μM FAC und 12,34 μM mit 2 mM FAC bei Klon #5 unterscheiden sich allerdings stark von den Konzentrationen, die sonst innerhalb dieser Arbeit beobachtet wurden. Bei Klon #15 wurden die Konzentrationen 11,59 μM bei der Inkubation mit 500 μM und 16,07 μM bei der Inkubation mit 2 mM FAC gemessen.

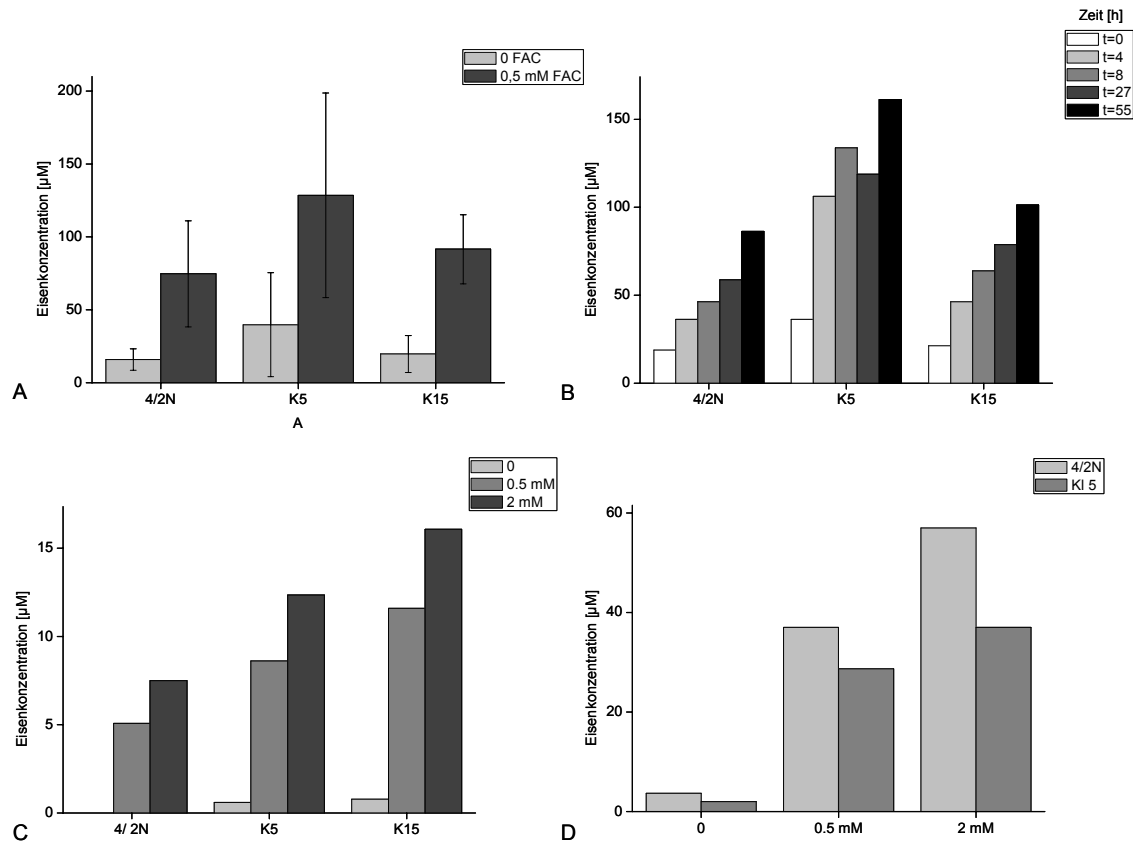


Abbildung 4–87: Ermittlung der Eisenkonzentration mittels quantitativem Eisentest in vergleichenden Experimenten:

Die intrazellulären Eisenkonzentrationen von dem HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺ Klon #5 und Klon #15 wurden nach 20 h Inkubation mit 0,5 mM FAC mittels quantitativem Eisentest ermittelt (A). Es konnte eine signifikante Erhöhung der Eisenkonzentration der Klon #5 und Klon #15 Zellen im Vergleich mit der Kontrollzelllinie 4/2N bestimmt werden.

In einer kinetischen Untersuchung über den Zeitraum von 55 h wurde ermittelt, dass bereits nach 4 h Inkubation die Eisenkonzentration der Klon #5 Zellen um den Faktor 2,9 gegenüber der Ausgangskonzentration anstieg (B).

In Abbildung C und D wurden zwei Einzelexperimente mit den Konzentrationen 500 μM und 2 mM FAC für je 20 h Inkubation visualisiert, die die Variabilität der Experimente verdeutlicht. Anzahl unabhängiger Experimente: A: n = 3; B, C, D: n = 1.

Ein negatives Beispiel bzgl. der Spezifität der inkorporierten Eisenkonzentration zeigt Abbildung 4–87 D. Es konnte keine erhöhte Eisenspeicherung bei den HA-Ferritin⁺ Tumorzellen im Vergleich mit der Kontrollzelllinie beobachtet werden. Nach 20 h Inkubation

mit den zwei Konzentrationen 500 μM und 2 mM FAC konnte bei den transgenen Zellen unabhängig von der FAC Konzentration eine geringere Eisenkonzentration von maximal 37 μM bei einer Inkubation mit 2 mM FAC im Vergleich zu 57 μM bei den Kontrollzellen nachgewiesen werden.

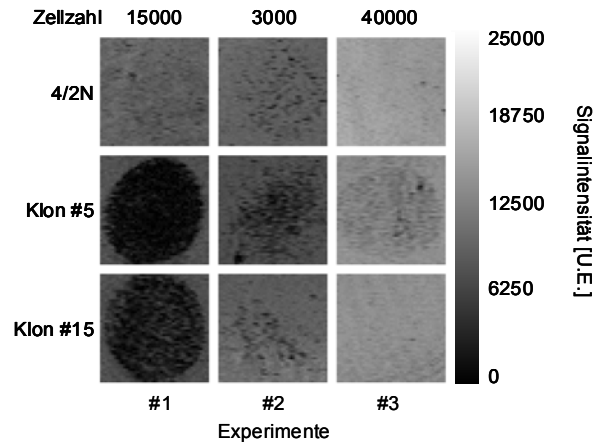


Abbildung 4–88: Vergleichende Untersuchung von FAC inkubierten Zellen mittels MRT:

Es wurden drei unabhängige Experimente, in denen Zellkonzentrationen der Kontrollzelllinie und der Klone #5 und #15 zwischen 3000 Zellen und 40 000 Zellen mittels MRT untersucht wurden, verglichen. Eine deutliche Variabilität in der Detektionsfähigkeit der unterschiedlichen Präparationen mit jeweils gleicher FAC-Konzentration von 500 μM und gleicher Inkubationszeit (20 h) konnte ermittelt werden. Echozeit TE = 18 ms, TR = 200 ms; Anzahl unabhängiger Experimente: n = 3.

Der Vergleich von drei unabhängig voneinander erstellten Experimenten, in denen mittels MRT die Zellmengen von 3000 Zellen, 15 000 Zellen und 40 000 Zellen verglichen wurden, zeigt eine Variabilität in der intrazellulären Anreicherung von Eisen innerhalb der Experimente und damit der Detektionsfähigkeit der HA-Ferritin⁺ und Luziferase⁺-Tumorzellen. In Experiment #1 konnten 15 000 Zellen der Zelllinien Klon #5 und Klon #15, die mit 2 mM FAC für 24 h inkubiert wurden, aufgrund der niedrigen Signalintensität eindeutig vom Hintergrund und von der Kontrollzelllinie 4/2N unterschieden werden, (Abbildung 4–88, Exp.1). Die Signalintensität in einem weiteren Experiment wurde aufgrund der intrazellulär inkorporierten Eisenmenge bei den beiden HA-Ferritin-exprimierenden Zelllinien verändert. Es konnte eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Klonen und der Zelllinie 4/2N detektiert werden (Abbildung 4–88, Exp.2). In Experiment #3 wurden 4×10^4 Zellen untersucht. Es konnte lediglich eine Veränderung der Signalintensität bei Klon #5 identifiziert werden. Keine Akkumulation von Eisenatomen konnte bei Klon #15 und der Zelllinie 4/2N beobachtet werden (Abbildung 4–88, Exp.3).

4.5.10.2 Intrazerebrale Transplantation der HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Zelllinie Gli36ΔEGFR Klon #5

In das rechte Striatum von zwei Nacktmäusen wurden 2×10^5 HA-Ferritin- und Luziferase-exprimierende Gli36ΔEGFR-Klon #5 Zellen transplantiert. In die kontralaterale Hemisphäre wurde die identische Zellmenge der untransduzierten Gli36ΔEGFR-Klon4/2N-Zellen implantiert. Es wurde bei beiden Tieren im Anschluss an die Transplantation ein T₂*gewichtetes MRT bei der Feldstärke von 7 Tesla durchgeführt. Beide Tiere wiesen 1 h nach der Implantation eine deutliche Signalauslöschung in beiden Gehirnhemisphären auf, die mit der Implantationsstelle übereinstimmte (Abbildung 4–89 A und C). Bei dem abschließenden MRT nach einem Zeitraum von 12 Tagen (Abbildung 4–89 B und D) konnte eine Veränderung der Signalintensität beobachtet werden. Bei den Kontrollzellen, die im linken Striatum implantiert wurden, war eine deutliche Reduktion der initial beobachteten Signalintensitätserniedrigung bei beiden Tieren beobachtbar (Abbildung 4–89 C und D), während in der rechten Hemisphäre hypointense Bereiche identifizierbar waren. Innerhalb des Beobachtungszeitraums konnte allerdings keine Zunahme der Signalauslöschung detektiert werden.

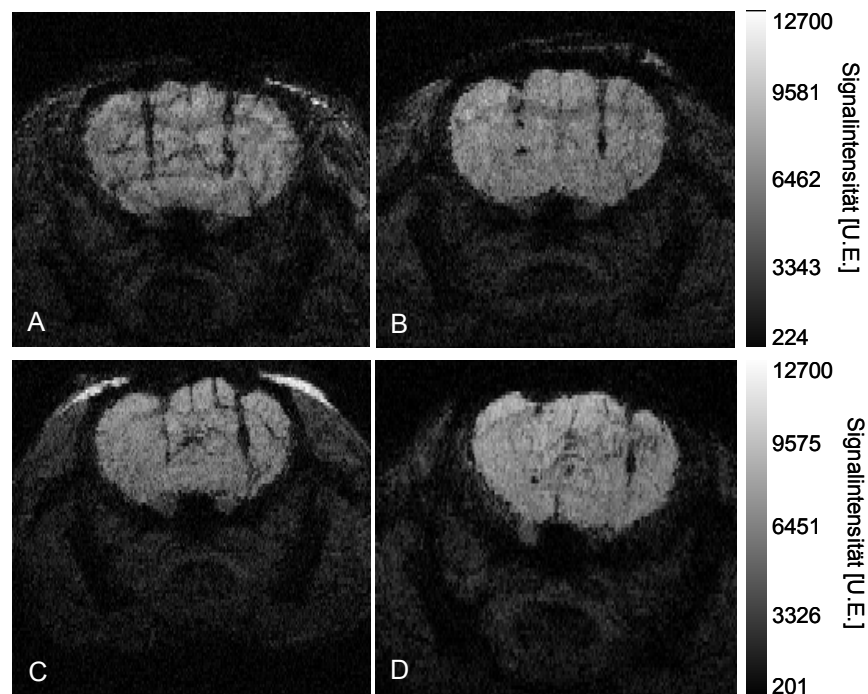


Abbildung 4–89: Intrazerebrale Transplantation der Zelllinie GLI36ΔEGFR Klon #5 in eine Nacktmaus:

HA-Ferritin- und Luziferase-überexprimierende Gli36ΔEGFR Zellen wurden bei zwei Nacktmäusen in die rechte Hemisphäre implantiert. In der linken Hemisphäre erfolgte eine Injektion von Kontrollzellen. 1 h nach der Injektion wurde eine Untersuchung mittels MRT durchgeführt (A und C), die mit identischen Parametern nach einem Zeitraum von 12 Tagen wiederholt wurde (B und D).

4.6 Überexpression des humanen Δ CD4-Rezeptors in 293T-Zellen zur extrazellulären MRT-Bildgebung

In einem experimentellen Ansatz soll die Verwendung eines trunkierten humanen Δ CD4-Rezeptors, der in einem eukaryotischen System unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors exprimiert wird, zu MRT-Bildgebungszwecken untersucht werden. Durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, an den superparamagnetische Partikel kovalent konjugiert wurden, soll eine spezifische Erkennung des extrazellulären Rezeptors erreicht werden und damit für die MRT-Bildgebung zur Verfügung stehen. In einem multimodalen Ansatz soll die Expression des manipulierten Rezeptors kombiniert werden mit der Expression der *firefly*-Luziferase und dem Fluoreszenzprotein mCherry.

4.6.1 Klonierung der Expressionsplasmide und transiente Transfektion in menschlichen 293T-Tumorzellen

Das Gen für den humanen Δ CD4 Rezeptor wurde aus dem Plasmid pMACS4.1 durch eine Inkubation mit *HindIII* geschnitten und die Überhänge mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Das resultierende 1,4 kbp lange Fragment wurde in den Vektor pcDNA3.1(+)-IRES-Luziferase stromabwärts des CMV-Promotors eingebracht (Abbildung 4–90 A). Die Plasmide wurden zur Überprüfung sequenziert.

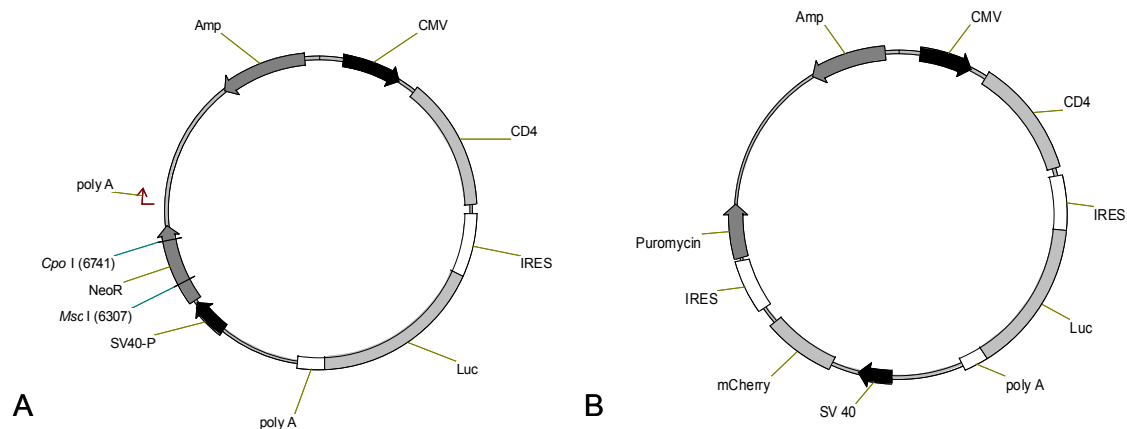


Abbildung 4–90: Klonierung der Expressionsplasmide pK79- Δ CD4 und pK79- Δ CD4-K201:

Durch Ligation des 1,4 kbp langen cDNA, kodierend für den Δ CD4-Rezeptor, stromabwärts des CMV-Promotors, wurde das Plasmid pK79- Δ CD4 generiert (A). Durch die Kombination der Δ CD4-Rezeptorsequenz mit dem Gen für die *firefly*-Luziferase stromabwärts einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES), wird eine Untersuchung mittels Biolumineszenzdetektion nach Expression ermöglicht. Zur Selektionierung im eukaryotischen System wird die Expression der Neomycin-Phosphotransferase II unter Kontrolle des SV 40-Promotors verwendet. Das Plasmid weist eine Größe von 9388 bp auf. In einem weiteren Schritt wurde stromabwärts des SV40 Promotors die cDNA für eine interne ribosomale Eintrittsstelle kombiniert mit der cDNA des mCherry Proteins und des Puromycinresistenzgens kloniert (B). Das resultierende Expressionsplasmid pK79- Δ CD4-K201 weist eine Größe von 11260 bp auf.

Das komplette Plasmid pcDNA3.1-CMV- Δ CD4-IRES-Luziferase (pK79-CD4) weist eine Neomycin-Resistenz unter Kontrolle des SV40-Promotors zur Selektionierung der Δ CD4-exprimierenden Zellen in einem eukaryotischen System auf.

Durch Entfernung des Gens für die Neomycin-Phosphotransferase II und Integration der Reporter-kassette mCherry-IRES-Puromycin-N-Acetyltransferase wurde mCherry als zusätzliches Fluoreszenzprotein eingebracht und die Möglichkeit der Selektionierung mittels des Antibiotikums Puromycin ermöglicht (Plasmid pK79- Δ CD4-K201).

Für die initiale Überprüfung der Funktion des Δ CD4-Rezeptors, der C-terminal trunkiert und damit signaltransduktionsinkompetent exprimiert wird, wurden 293T-Zellen transient mit den Plasmiden pMACS 4.1 und pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry kotransfiziert. Die Transfektionseffizienz betrug für das Plasmid pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry 60 % und für die Kotransfektion beider Expressionsplasmide 45 %. Die Quantifizierung wurde anhand der mCherry-Fluoreszenz durchgeführt. Es konnte keine zytotoxische Wirkung anhand eines Trypanblau-Ausschlusstestes bei der ersten Passage der Zellen beobachtet werden. Die mit pMACS4.1 transfizierten Zellen wurden fixiert und immunzytochemisch untersucht. Dazu wurden die Zellen mit einem anti-CD4-Antikörper inkubiert, der kovalent mit superparamagnetischen Eisenpartikeln konjugiert war. Die Lokalisation des superparamagnetischen Partikels wurde mit einem Phycoerythrin konjugierten anti-Dextran-Antikörper visualisiert. Ein weiterer anti-CD4-Antikörper, der an FITC gekoppelt war, zeigte, dass eine extrazelluläre, membran-assoziierte Lokalisation des CD4-Rezeptors in den Zellen vorlag (Abbildung 4–91). Die Effizienz der Antikörperbindung des anti-CD4-SPIO-Antikörpers konnte als suboptimal eingestuft werden, da nur ein Bruchteil der CD4-Rezeptoren eine Kolokalisation mit dem SPIO-gekoppelten anti-CD4-Antikörper aufwies.

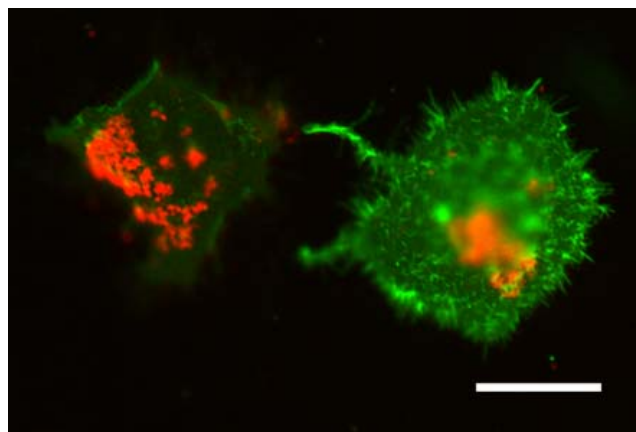


Abbildung 4–91: Immunzytochemische Analyse der Δ CD4-Expression in 293T-Zellen: 293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pMACS4.1 transfiziert und nach Fixierung mit einem SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper inkubiert. Zum Nachweis der Δ CD4-Expression wurde ein FITC konjugierter anti-CD4-Antikörper verwendet (grün). Es konnte eine extrazelluläre Expression des Δ CD4-Rezeptors und eine partielle Kolokalisation mit superparamagnetischen Partikeln nachgewiesen werden. Die Detektion der SPIOs wurde durch einen Phycoerythrin konjugierten anti-Dextran-Antikörper ermöglicht (rot) Maßstab: 25 μ m.

Um die Visualisierung der Antikörper-SPIO inkubierten Zellen mittels Magnetresonanztomographie zu überprüfen, wurden 2500 und 5000 Zellen in einem Agarosephantom untersucht. Die Sequenz war eine Flash-3D mit der Echozeit TE = 18 ms, und der Repetitionszeit TR = 200 ms. Es konnte ein deutlicher Unterschied der Signalintensität bei den Δ CD4-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden (Abbildung 4–92). In einer weiteren Verdünnungsreihe, bei der die Anzahl der Mittelungen erhöht wurde und die Echo- und Repetitionszeit beibehalten wurden, konnte eine eindeutige Visualisierung von < 100 Zellen im Suspensionsmodell erreicht werden.

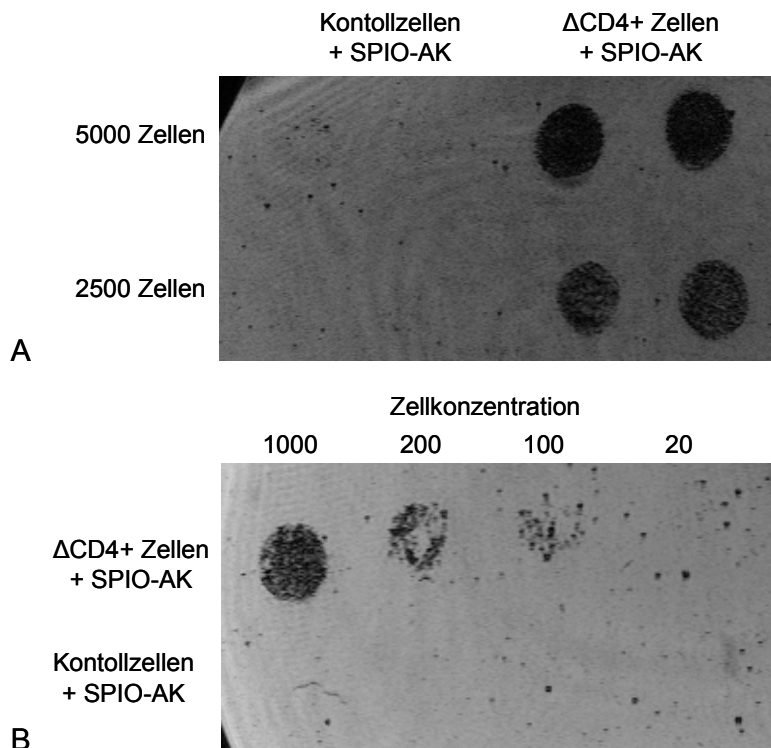


Abbildung 4–92: MRT-Visualisierung der Δ CD4⁺-293T Zellen nach Inkubation mit dem SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper:

2500 und 5000 Δ CD4⁺-293T-Zellen und Δ CD-Kontrollzellen wurden nach 1 h Inkubation mit dem SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper (SPIO-AK) mittels MRT untersucht. Es konnte eine eindeutige Erniedrigung der Signalintensität bei Δ CD4⁺-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden (A). In einem weiteren Ansatz wurde mit beiden Zellpopulationen eine Verdünnungsreihe erstellt (B). Die minimal detektierbare Zellmenge wurde auf < 100 Zellen bestimmt. In beiden Versuchen wurde keine klare Identifizierung der Kontrollzellen erreicht. Details der MRT-Untersuchung: A und B: Echozeit TE = 18 ms, Repetitionszeit TR = 200 ms. Mittelungen in A: n = 1; Mittelungen in B: n = 4.

Zu beachten ist, dass für die Nachweise eine unsortierte Population von Δ CD4-Rezeptor überexprimierenden Zellen verwendet wurde.

Im weiteren Schritt wurden Transfektionen mit dem Plasmid pK79- Δ CD4-201 in 293T Zellen vorgenommen. Die Zellen wurden aufgrund der Puromycin- Antibiotikaresistenz mit 2,5 mg mL⁻¹ Puromycin Kulturmedium selektioniert. Die Transfektionseffizienz lag nach der Optimierung des DNA-Lipofektionsmittel-Ansatzes und Optimierung des Reinheitsgehaltes

der DNA, bei 70 %. Es konnte kein zytotoxischer Effekt bei den transfizierten Zellen anhand des Trypanblau-Ausschlusstests beobachtet werden.

Die Expression von mCherry und Luziferase wurde nach Inkubation mit D-Luziferin von 1×10^4 Zellen im Luminometer untersucht (Abbildung 4–93). Es konnte eine Emission von 2957,5 (\pm 758) U.L.E. der mCherry Fluoreszenz bei Zellen, die mit den Plasmiden pMACS4.1 und pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry kotransfiziert wurden, detektiert werden (Abbildung 4–93 A). Bei 293T-Zellen, die mit dem Plasmid pK79- Δ CD4-K201 transfiziert wurden, konnte eine Emission von 2197,5 (\pm 239) U.L.E. dokumentiert werden. Ein Wert von 73 042,5 (\pm 20 218) U.L.E. konnte bei der Untersuchung der Luziferasereaktion ermittelt werden. Das Signal der Kontrolltransfektion betrug 897,5 (\pm 475) U.L.E. (Abbildung 4–93 B).

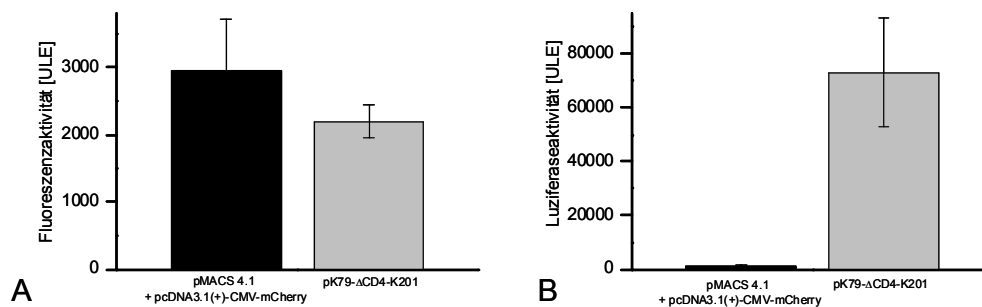


Abbildung 4–93: Vergleichende Quantifizierung der Expression von mCherry und der firefly-Luziferase nach Transfektion von 293T-Tumorzellen:

Es konnte eine vergleichbare mCherry-Expression bei Zellen, die mit den Plasmiden pMACS4.1 und pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry kotransfiziert wurden und den mit pK79- Δ CD4-K201 transfizierten Zellen, detektiert werden (A). Die Luziferaseaktivität der mit pK79- Δ CD4-K201 transfizierten Zellen war 120x höher als das detektierte Signal der Kontrolltransfektion (B). Verwendetes Untersuchungssystem: Berthold Mithras. Fluoreszenzdetektion: 1 s Expositionszeit; Biolumineszenz: 10 s Expositionszeit nach Inkubation mit 50 μ g D-Luziferin.

Nach der Selektionierung mittels Puromycin wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt, um die mCherry-, Luziferase- und Δ CD4-Expression zu validieren und deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu überprüfen (Abbildung 4–94).

Es wurde eine Koexpression von mCherry und dem Δ CD4-Rezeptor in allen Zellen beobachtet. Dabei zeigt die mCherry-Verteilung innerhalb der Zelle eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation, wohingegen der Δ CD4-Rezeptor an der Zellmembran lokalisiert war (Abbildung 4–94 A). Die Expression der Luziferase, die mit einem polyklonalen anti-Luziferase-Antikörper untersucht wurde, befindet sich homogen im Zytoplasma der Zelle verteilt und weist keine Zellkernlokalisation auf (Abbildung 4–94 B). Es konnte ohne die Präinkubation mit dem SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper keine spezifische extrazelluläre membranassoziierte Anfärbung mittels anti-Dextran-Antikörperinkubation beobachtet werden (Abbildung 4–94 C). Eine Präinkubation mit dem SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper führte zu einem deutlichen Nachweis der Rezeptor- und Ligandenbindung (Abbildung 4–94 D).

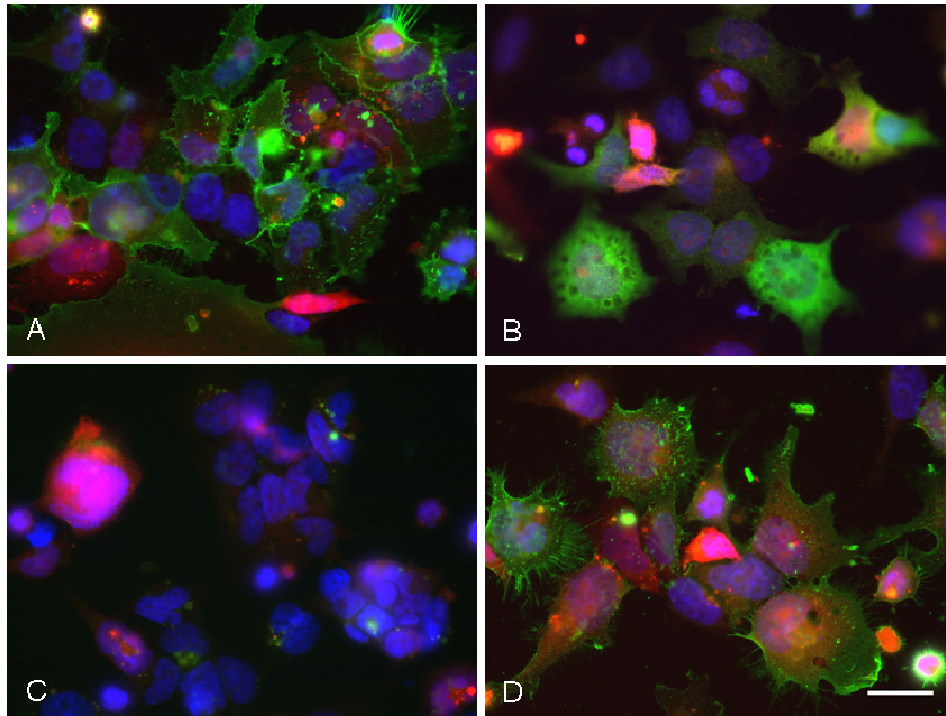


Abbildung 4–94: Immunzytochemische Analyse der mCherry-, *firefly*-Luziferase- und der Δ CD4-Expression in 293T-Tumorzellen, die mit dem Plasmid pK79- Δ CD4-K201 transfiziert wurden:

Der CD4-Rezeptor wurde mit dem FITC konjugierten anti-CD4-Rezeptor-Antikörper extrazellulär detektiert (A). Die mCherry Fluoreszenz (rot) ist zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert (A-D). Die Expression der Luziferase (B) befindet sich im Zytoplasma der transfizierten Zellen. Zellen, die nicht mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper präinkubiert wurden, zeigen nach Inkubation mit dem FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörper keine Rezeptor-Antikörper Interaktion (C). Die Präinkubation mit dem SPIO-gekoppelten anti-CD4-Antikörper zeigt eine deutliche Membranlokalisation der Partikel mit dem anti-Dextran-Antikörper (D). Farbnachweis: A: grün: anti-CD4; B: grün: anti-Luziferase; C: grün: anti-Dextran; D: grün: anti-CD4. Die Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 visualisiert (blau). Maßstab: 25 μ m.

4.6.2 Einzelzellklonierung und Charakterisierung der Reporterexpression des Klons 293T-K79- Δ CD4-K201 #5

Durch eine Einzelzellklonierung konnten sechs Klone isoliert werden, die sich in der Expressionsstärke des mCherry Proteins und der Luziferase unterschieden. Abbildung 4–95 zeigt die Luziferaseaktivität gemessen in einem Abstand von 9 Tagen. Die weiteren Experimente in dieser Arbeit wurden mit dem Klon #5 durchgeführt, da die Zellen über einen Zeitraum von vier Monaten eine stabile Expression der Reporterproteine aufwiesen.

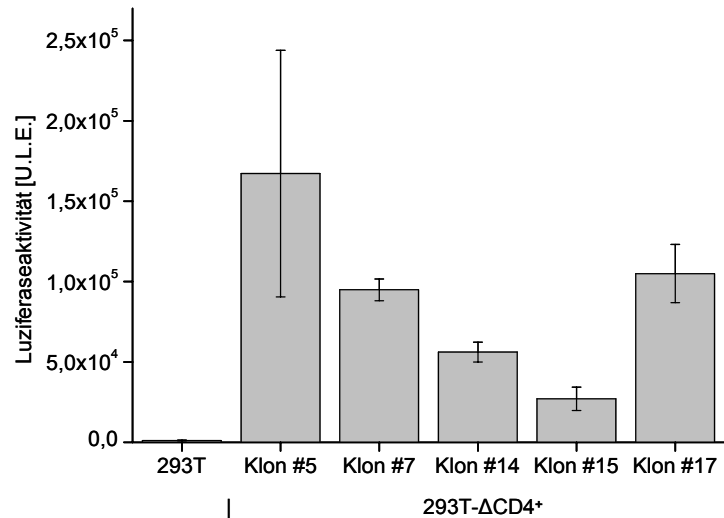


Abbildung 4–95: Luziferaseaktivität der Δ CD4⁻ und Luziferase⁺-293T-Einzelzellklone:

Die Luziferaseaktivität von 5 Δ CD4⁻ und Luziferase exprimierenden Klonen wurde im Luminometer in einem Zeitraum von 9 d untersucht. Klon # 5 wies bei den Messungen die höchste Luziferaseaktivität auf und wurde für die weiteren Experimente verwendet. Messungen wurden von jeweils 5×10^4 Zellen durchgeführt. Expositionszeit im Berthold Mithras Luminometer: 10 s / Probe. Anzahl unabhängiger Stichproben: n = 2.

Nach 1 h Inkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper wurden spektralphotometrische Eisentests durchgeführt, um die Menge der Δ CD4-Rezeptor assoziierten Antikörper-SPIO-Komplexe zu bestimmen (Abbildung 4–96). Zur Kontrolle wurden 293T Δ CD4⁻-Zellen mit dem SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper inkubiert, um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu ermitteln. Es konnte eine Eisenkonzentration von $15,1 (\pm 11,5) \mu\text{M}$ Eisen bei den Kontrollzellen und $102,1 (\pm 23,7) \mu\text{M}$ Eisen bei den Δ CD4⁺-293T-Zellen detektiert werden (Abbildung 4–96 A). In einem zusätzlichen Nachweis wurden die Δ CD4⁺-293T-Zellen mit den unkonjugierten superparamagnetischen Partikeln inkubiert. Es konnte eine Eisenkonzentration von $54,2 \mu\text{M}$ bei diesen Zellen ermittelt werden (Abbildung 4–96 B). Um die unspezifische Bindungskapazität eines SPIO-konjugierten-Antikörpers zu überprüfen, wurde der für Mikroglia spezifische Antikörper anti-CD11b verwendet. Dieser Antikörper weist eine Speziespezifität, gerichtet gegen humane und murine CD11b Proteine, auf. Es konnte nach Inkubation dieses Antikörpers eine Eisenkonzentration von $22,5 \mu\text{M}$ detektiert werden (Abbildung 4–96 B).

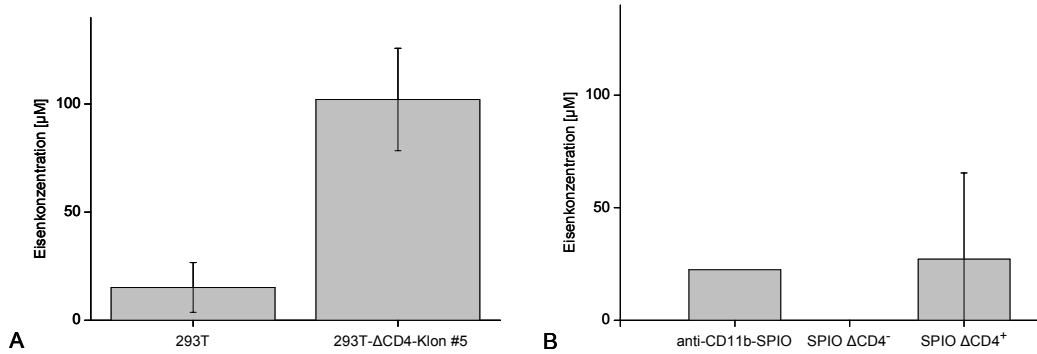


Abbildung 4–96: Ermittlung der Eisenkonzentration nach spezifischer- und unspezifischer Antikörper-Rezeptor-Interaktionen mittels spektralphotometrischem Eisentest:

293T- Δ CD4⁺-Zellen und Kontrollzellen wurden mit dem SPIO-konjugierten Antikörper anti-CD4 inkubiert und die Eisenkonzentration mittels spektralphotometrischem Eisentest bestimmt. Es wurde bei den Δ CD4⁺-Zellen eine 6,8x höhere Eisenkonzentration als bei den Kontrollzellen ermittelt (A). Nach Inkubation der Δ CD4⁺-Zellen mit unkonjugierten superparamagnetischen Partikeln konnte eine Eisenkonzentration von 27,1 (\pm 38,4) μ M ermittelt werden, wohingegen bei den Kontrollzellen kein Eisen nachgewiesen werden konnte (B). Bei Verwendung des Mikroglia spezifischen Antikörpers anti-CD11b-SPIO konnte eine Eisenkonzentration von 22,5 μ M Eisen detektiert werden. Anzahl unabhängiger Stichproben: A: n = 4; B: anti-CD11b-SPIO n = 1 und SPIO Δ CD4^{+/-} n = 2.

4.6.2.1 Immunzytochemische Analyse der 293T-K79- Δ CD4-K201-Klon #5-Zellen:

Δ CD4⁺-Klon #5-Zellen und 293T-Kontrollzellen wurden als Einzelzellen auf einer adhärennten Oberfläche kultiviert und nach 1 h Inkubation mit SPIO-konjugierten-anti-CD4-Antikörper immunzytochemisch untersucht (Abbildung 4–97).

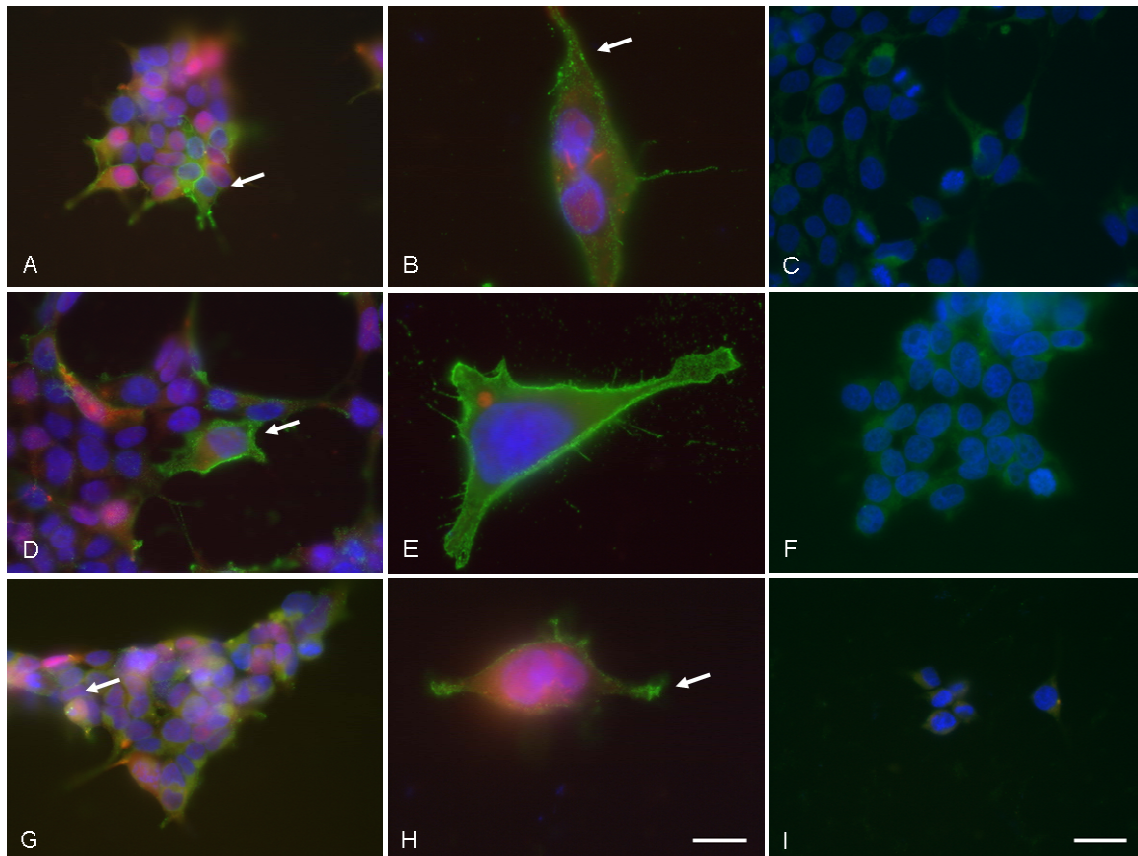


Abbildung 4–97: Immunzytochemische Analyse der 293T- Δ CD4⁺-Klon #5-Tumorzellen nach Inkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper:

Δ CD4⁺-293T-Zellen (linke und mittlere Spalte) und 293T-Kontrollzellen (rechte Spalte) wurden für 1 h mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper inkubiert und immunzytochemisch untersucht. Es konnte eine membranassoziierte Expression des Δ CD4-Rezeptors bei den transgenen Zellen mit einer Variabilität in der Expressionsstärke einzelner Zellen festgestellt werden (Pfeil in A und stärkere Vergrößerung in B). Keine CD4-Expression konnte bei den Kontrollzellen detektiert werden (C). Nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörper wurde eine Rezeptor-Antikörper-Interaktion verifiziert. Es konnte eine membranassoziierte Lokalisation des anti-Maus-Antikörpers bei den Δ CD4⁺-Zellen festgestellt werden (D und stärkere Vergrößerung in E), wohingegen der Antikörper bei Kontrollzellen nicht nachgewiesen werden konnte (F). Nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörper konnte die Lokalisation der superparamagnetschen Partikel bei den Δ CD4⁺-Zellen dokumentiert werden (G und stärkere Vergrößerung in H). Keine Dextran⁺-Färbung wurde bei den Kontrollzellen erfasst (I). Farbnachweis: A, B, C: anti-CD4 (grün); D, E, F: anti-Maus (grün); G, H, I: anti-Dextran (grün). In allen Bildern wurde mCherry in rot visualisiert. Detektion der Zellkerne mit Hoechst Dye 33342 (blau). Maßstab: A, C, D, F, G, I: 25 μ m; B, E, H: 10 μ m.

Es konnte eine deutliche CD4-Expression nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-CD4-Antikörper bei den Zellen des Klons #5 nachgewiesen werden, wohingegen keine Detektion bei den Kontrollzellen möglich war (Abbildung 4–97 A und C). Alle transgenen Zellen exprimieren den Δ CD4-Rezeptor, doch die Expressionsstärke innerhalb der Zellen variierte. Es finden sich vereinzelt Zellen, die eine wesentlich stärkere Expression aufweisen (Pfeil in Abbildung 4–97 A). In höherer Vergrößerung konnte bei einzelnen Zellen eine punktuelle, lokale Markierung mit dem FITC-konjugierten Antikörper beobachtet werden (Pfeil in Abbildung 4–97 B). Die mCherry-Expression ist bei Klon #5 Zellen zytoplasmatisch und auch innerhalb des Zellkerns detektierbar. Durch die Inkubation mit einem Alexa 488

konjugierten anti-Maus-Antikörper konnte bei den mit dem SPIO-anti-CD4-Antikörper inkubierten Δ CD4⁺-Zellen der anti-CD4-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 4–97 D). Dabei wurde festgestellt, dass die in Abbildung 4–97 A identifizierten Zellen mit hoher Δ CD4-Expressionsstärke auch mit einer höheren Konzentration von SPIO-Antikörperkomplexen kolokalisiert waren (Pfeil in Abbildung 4–97 D). Die Anlagerung des SPIO-konjugierten Antikörpers trat bei einzelnen Zellen vermehrt homogen an der Zellmembran auf (Abbildung 4–97 E). Es konnten mit dem FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörper keine membranassoziierten Antikörper-SPIO-Komplexe bei den Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abbildung 4–97 F). Durch die Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörper wurde die Lokalisation der superparamagnetischen Partikel verifiziert. Dabei wurde ebenfalls eine Zellmembran assoziierte Lokalisation der Partikel nachgewiesen, wohingegen keine Markierung bei den Kontrollzellen beobachtet wurde (Abbildung 4–97 G und I). Bei höherer mikroskopischer Vergrößerung konnten lokale, punktuelle anti-Dextran⁺-Strukturen erkannt werden (Abbildung 4–97 H).

4.6.2.2 Minimal detektierbare Zellmengenbestimmung nach SPIO gekoppelter Antikörperinkubation mittels MRT

293T- Δ CD4⁺-Klon #5-Zellen wurden mit SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörpern inkubiert und eine Verdünnungsreihe für die MRT-Untersuchungen auf eine Agaroseoberfläche aufgebracht. Die Ergebnisse einer Untersuchung mit den Parametern TE = 5 ms im Vergleich mit TE = 18 ms werden in Abbildung 4–98 dargestellt.

Die Kontrollzellen, welche mit der gleichen Antikörperkonzentration inkubiert wurden wie die Δ CD4 exprimierenden Zellen, weisen keinen Signalverlust bei beiden untersuchten Echozeiten auf. Bei TE = 5 ms konnten Zellmengen von mehr als 6250 Zellen eindeutig detektiert werden, die Abgrenzung vom Hintergrund wurde allerdings mit abnehmender Zellkonzentration schwächer. Zellkonzentrationen von ≥ 6250 Zellen konnten mit der Echozeit von TE = 5 ms nicht mehr detektiert werden. Bei der höheren Echozeit von TE = 18 ms war eine eindeutige Identifizierung aller untersuchter Zellmengen möglich. Wie zu erwarten, wurde die Signalauslöschung mit abnehmender Zellzahl geringer.

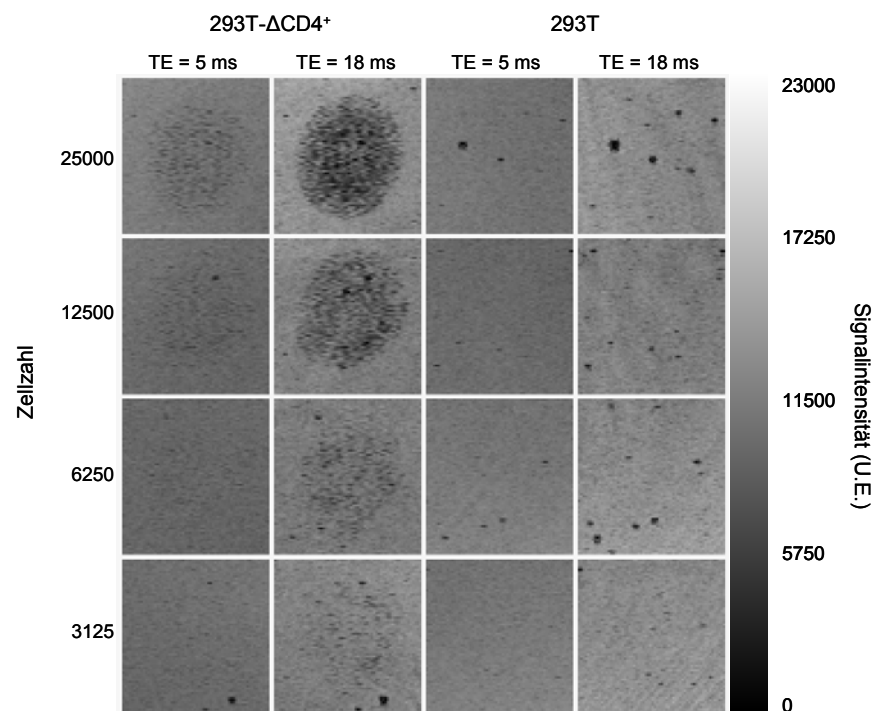


Abbildung 4–98: Quantifizierung der minimal detektierbaren Zellmenge mittels MRT: 293T- Δ CD4- und 293T-Zellen wurden nach einer Antikörperinkubationszeit von einer Stunde mit dem MRT untersucht. Für die Analyse wurden zwei Echozeiten TE = 5 ms und TE = 18 ms gewählt. Die Repetitionszeit betrug bei beiden Untersuchungen TR = 200 ms. Die Kontrollzellen weisen bei beiden Echozeiten keine Signalauslöschung auf, wohingegen die Δ CD4-exprimierenden Zellen eine deutliche Signalauslöschung bei beiden Echozeiten aufweisen. Die Grauwerte beider Messungen wurden vor der Analyse angeglichen und normiert.

4.6.3 Kultivierung der 293T-K79- Δ CD4-K201 Zellen im Aggregatmodell

4.6.3.1 Expression des Δ CD4 Rezeptors und Inkubation mit SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörpern

Nach einer Aggregation der Δ CD4⁺-Tumorzellen für 24 h bildeten sich multizelluläre Aggregate aus, die mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper für 1 h oder 5 h inkubiert und anschließend immunzytochemisch untersucht wurden. Vor der Fixierung wurden die Aggregate für 24 h auf einer mit Fibronektin beschichteten Oberfläche ausplattiert, was zu einer Abflachung der Aggregate und Migration einzelner Zellen führte.

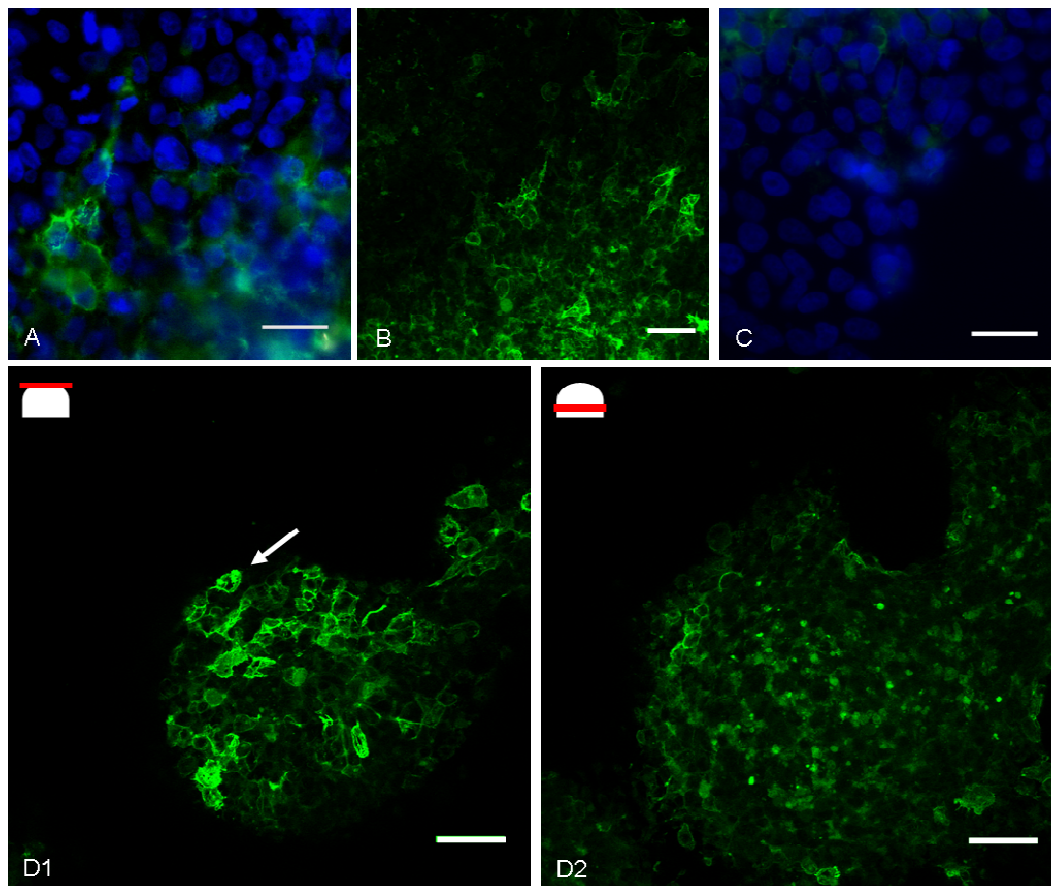


Abbildung 4–99: Expression des trunkierten Δ CD4-Rezeptors in 293T-K79- Δ CD4-K201-Klon#5 Aggregaten:

Die immunzytochemische Analyse zeigt eine starke Expression des Rezeptors in den Zellen. Zur Visualisierung der Kerne wurde eine Hoechst Dye 33342 Färbung vorgenommen (A). Die konfokale Laserscanningmikroskopie verdeutlicht, dass 100 % der Zellen den CD4-Rezeptor exprimieren, dass jedoch erhebliche Unterschiede in der Expressionsstärke vorliegen (B). Es konnte keine Δ CD4 Expression in den 293T Kontrollzellen detektiert werden (C). Die konfokale Mikroskopie durch ein Aggregat mit einer Einzelschichtdicke von 2,3 μ m verdeutlicht die Unterschiede in der Morphologie und Expressionsstärke der Δ CD4⁺-Zellen (Abb. D1 und D2). Für die beiden Abbildungen wurde eine Maximum-Intensitäts-Projektion über jeweils drei Schichten angefertigt. Die Symbole in den Abb. D1 und D2 verdeutlichen die untersuchten und abgebildeten Ebenen. Maßstab: A, C: 25 μ m; B, D1, D2: 50 μ m.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach Inkubation mit dem FITC-konjugierten anti-CD4-Antikörper zeigt eine deutliche, membranassoziierte Expression des Δ CD4-Rezeptors in den Δ CD4⁺-Zellen (Abbildung 4–99 A). Die konfokale Analyse verdeutlicht, dass alle untersuchten Zellen den Δ CD4-Rezeptor exprimieren, die Expressionsstärke allerdings variierte (Abbildung 4–99 B). Bei 293T Kontrollzellen konnte keine Expression des Rezeptors nach Inkubation mit dem anti-CD4-Antikörper detektiert werden (Abbildung 4–99 C), Die Analyse eines multizellulären Aggregates und Darstellung einzelner Schichten aus dem Datensatz verdeutlicht zusätzlich die heterogene Expression des Δ CD4-Rezeptors. CD4⁺-Zellen finden sich gehäuft auf der Oberfläche des Aggregates (Pfeil in Abbildung 4–99 D1). Die Zellen in tieferen Schichten zeigen ebenfalls eine Expression des Δ CD4-Rezeptors (Abbildung 4–99 D2). Durch eine Untersuchung mit dem FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörper konnte die spezifische Reaktion des Antikörper-SPIO-Konjugates mit dem überexprimierten Δ CD4-Rezeptor nachgewiesen werden (Abbildung 4–100).

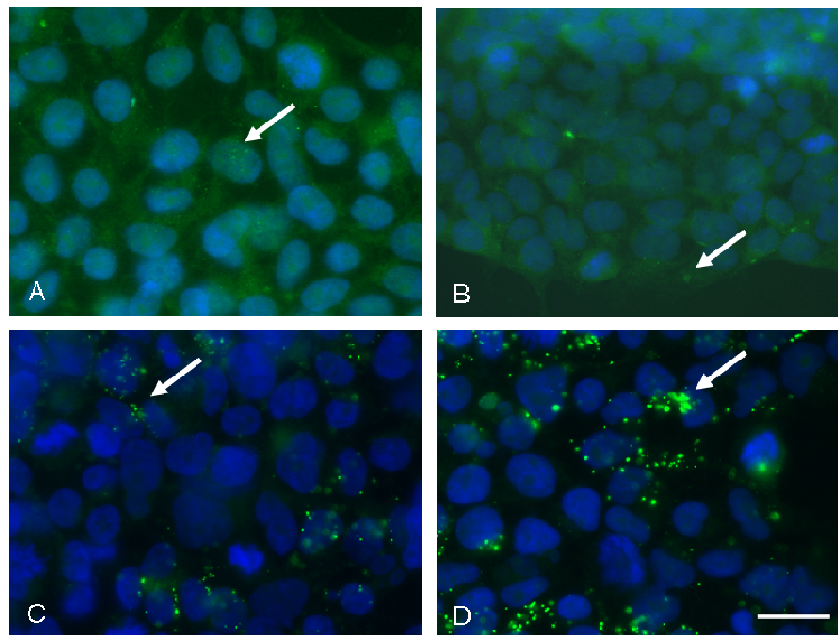


Abbildung 4–100: Immunzytochemische Lokalisation der Antikörper-SPIO-Komplexe:

Mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörper, wurde die Lokalisation der SPIO-konjugierten Antikörper untersucht. Bei den 293T-Kontrollzellen konnte eine schwach positive Immunreaktion nach 1 h Inkubationszeit beobachtet werden (A). Eine längere Inkubation von 5 h führte zu keiner signifikanten Erhöhung von Dextran⁺-Strukturen (B). Bereits nach 1 h Inkubation fanden sich Dextran⁺-Strukturen bei den Δ CD4-überexprimierenden 293T-K79- Δ CD4-K201-Klon #5-Zellen (C), deren Menge sich mit zunehmender Inkubationszeit erhöhte (D). Farbnachweis: FITC-konjugierter anti-Dextran-Antikörper: grün; Hoechst Dye 33342: blau. Maßstab: 20 μ m.

Untersucht wurde zusätzlich der Einfluss einer Erhöhung der Inkubationszeit von 1 h auf 5 h bei 37°C auf die Interaktion der Rezeptoren mit den SPIO-konjugierten Antikörpern.

Bei beiden untersuchten Zeitpunkten konnte bei den Kontrollzellen eine geringe Menge an anti-Dextran⁺-Strukturen identifiziert werden, deren Menge bei längerer Inkubationszeit von

5 h quantitativ nicht zunahm (Pfeil in Abbildung 4–100 A und B). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine deutliche Präsenz von Dextran⁺-Partikeln bei 1 h Inkubation der Δ CD4-überexprimierenden 293T Zellen (Abbildung 4–100 C). Mit zunehmender Inkubationszeit erhöhte sich die Menge von Dextran⁺-Strukturen und es konnte eine zellassoziierte Agglomeration der Antikörper-SPIO-Komplexe beobachtet werden (Pfeil in Abbildung 4–100 D). Eine zusätzliche Untersuchung mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie zur Untersuchung der Verteilung der Partikel im dreidimensionalen Raum wurde angefertigt (Abbildung 4–101). Wie bei den fluoreszenzmikroskopischen Analysen, konnte eine minimale Anlagerung der Antikörper-SPIO-Komplexe bei den Kontrollzellen dokumentiert werden (Pfeile in Abbildung 4–101 A und B).

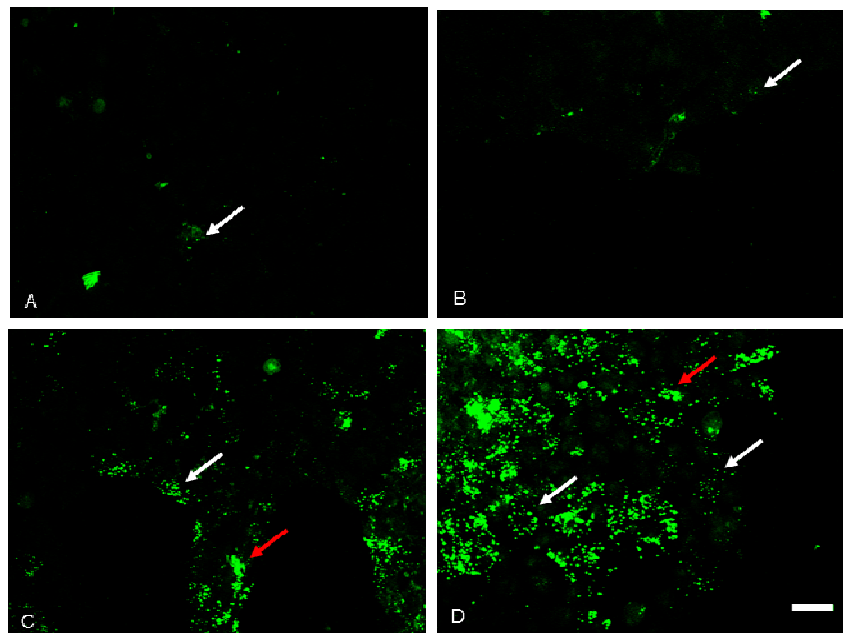


Abbildung 4–101: Untersuchung der Antikörper-SPIO-Komplexe nach 1 h und 5 h Inkubation mittels LSM:

Die Lokalisation der SPIO-konjugierten Antikörper nach 1 h und 5 h Inkubationszeit führte bei der detaillierten Analyse mittels LSM zu keiner signifikanten Zunahme der Menge von Dextran⁺-Strukturen bei den 293T-Kontrollzellen (A und B). Eine deutliche homogene Verteilung der Dextran⁺-Partikel konnte bei den Δ CD4-überexprimierenden Zellen identifiziert werden. (weißer Pfeil in C), es wurde aber auch eine Zusammenlagerung der Partikel dokumentiert (roter Pfeil in C), die sich mit zunehmender Inkubationszeit verstärkte (Pfeile in D). Maßstab: 75 μ m.

Eine deutliche Präsenz von Dextran⁺-Strukturen wurde bei den Δ CD4⁺-Zellen nach 1 h Inkubation gefunden. Dabei wurde eine homogene Verteilung der Partikel in der Zelle dokumentiert (weißer Pfeil in Abbildung 4–100 C), die geringfügig vorkommende Agglomeration der Partikel konnte aber bereits zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden (roter Pfeil in Abbildung 4–101 C). Eine deutliche Zunahme der Menge von Dextran⁺-Partikeln wurde nach 5 h Inkubationszeit beobachtet, wobei sich eine Zunahme der homogenen Verteilung der Partikel (weiße Pfeile in Abbildung 4–101 D), als auch eine Zunahme der

Zusammenlagerung erkennen ließ (roter Pfeil in Abbildung 4–101 D). Eine höhere Vergrößerung und ein direkter Vergleich von Fluoreszenz- und konfokaler Laserscanningmikroskopie zeigt eine membranassoziierte Lokalisation der SPIO-konjugierten Antikörper (Abbildung 4–102 A und B).

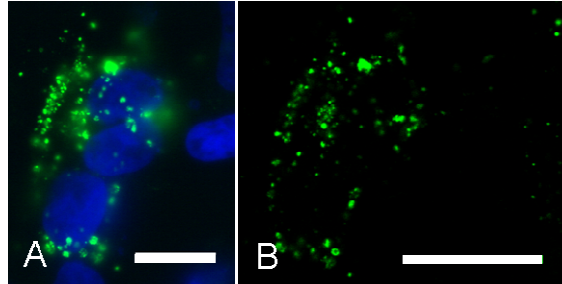


Abbildung 4–102 Membranassoziierte Lokalisation der superparamagnetischen Partikel nach 5 h Inkubation mit dem Antikörper:

In einzelnen Zellen befindet sich, korrespondierend zu der Δ CD4-Rezeptorlokalisierung, eine extrazelluläre anti-Dextran Färbung. Der Vergleich zwischen Fluoreszenzmikroskopie (A) und LSM (B) zeigt die nahezu homogene Verteilung der superparamagnetischen Partikel an der Außenseite des Aggregates. Balken: A: 15 μ m; B: 50 μ m.

4.6.3.2 FACS-Analyse der Δ CD4⁺-Zellen zur quantitativen Analyse der Rezeptorexpression

Es wurde eine FACS-Analyse mit den 293T-K79- Δ CD4-K201-Klon #5 Zellen nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-CD4-Antikörper durchgeführt, um die Δ CD4-Rezeptorexpression zu quantifizieren. Bei den 293T-Kontrollzellen und den Δ CD4⁺-Zellen konnten zwei distinkte Populationen von den toten Zellen abgegrenzt werden, erstere waren in einem Anteil der gesamten Population von 85 % bei den 293T Kontrollzellen und 87 % bei den Δ CD4⁺-Zellen vertreten (Abbildung 4–103 A und B). Es wurde zusätzlich eine Analyse nach Inkubation mit Propidium Iodid durchgeführt, bei der die Kontrollzellen 5 % und die Δ CD4⁺-Zellen 7 % Propidium Iodid⁺ waren (nicht gezeigt). Für die weiteren Analysen wurden nur vitale Populationen nach Ausgrenzung der toten Zellen verwendet. Bei Analyse der Δ CD4-Rezeptorexpression mittels FITC-konjugierter anti-CD4-Antikörperinkubation konnte bei den Δ CD4⁺-Zellen eine distinkte Population, die 80 % der Gesamtpopulation betrug, FITC⁺ bezeichnet werden. 9 % der gesamten Population wurde als stark FITC⁺ identifiziert (Abbildung 4–103 C). Nach der Inkubation des SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörpers wurde das superparamagnetische Partikel mittels FITC-konjugiertem anti-Dextran-Antikörper identifiziert.

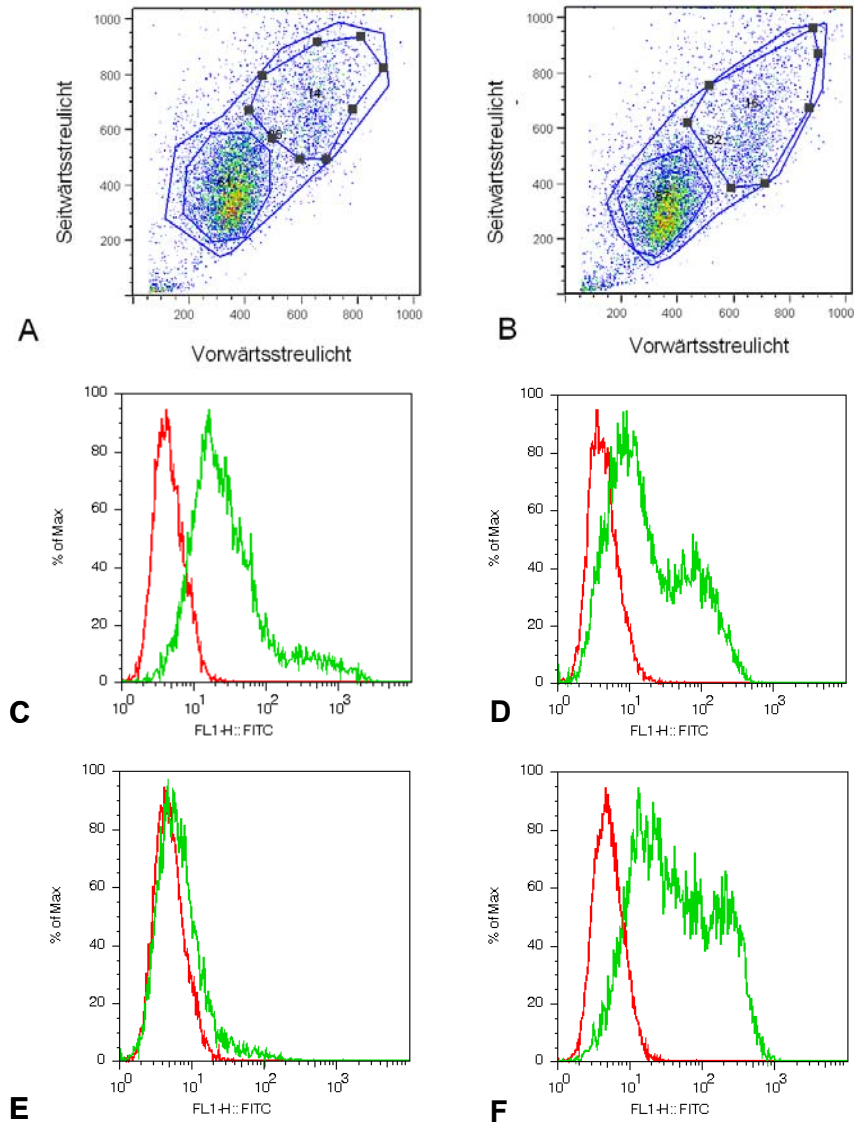


Abbildung 4–103: FACS-Analyse der Δ CD4⁺-Zellen zur quantitativen Analyse der Rezeptor-expression und der Bindung der SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper:

Die vitalen Zellpopulationen der 293T-Kontrollzellen (A, in allen Abbildungen als rote Kurve visualisiert) und der Δ CD4⁺-Zellen (B, in allen Abbildungen als grüne Kurve visualisiert) wurden nach Bestimmung der Granularität (SSC) und der Zellgröße (FSC) von den toten Zellen diskriminiert.

Eine Analyse der Δ CD4 Rezeptorexpression wurde mittels FITC-konjugierter Antikörperinkubation durchgeführt (C). Nach der Präinkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper konnte eine stark FITC⁺-Population nach Inkubation mit einem anti-Dextran-Antikörper detektiert werden (D). Durch die Inkubation mit einem Alexa 488 konjugierten anti-Maus Antikörper konnte keine Immunreaktivität ohne Präinkubation mit dem SPIO gekoppelten anti-CD4-Antikörper nachgewiesen werden. Bei 90 % der Zellen konnte nach der Präinkubation eine starke Alexa 488 Fluoreszenz detektiert werden.

Es konnte eine distinkte Abgrenzung der 293T-Kontrollzellen von den Δ CD4⁺-Zellen anhand der Quantifizierung des FITC-Signals durchgeführt werden (Abbildung 4–103 D). Bei 54 % der Δ CD4⁺-Zellen konnte ein schwaches FITC-Signal identifiziert werden, während bei 29 % ein starkes FITC-Signal detektiert werden konnte. Durch Inkubation mit einem Alexa 488 konjugierten anti-Maus Antikörper konnten die SPIO-konjugierten Antikörper unabhängig von

dem superparamagnetischen Partikel identifiziert werden. Zur Kontrolle wurden sowohl 293T-Kontrollzellen, als auch ΔCD4^+ -Zellen, die nicht mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper präinkubiert wurden, mit dem Alexa 488 gekoppelten anti-Maus-Antikörper behandelt (Abbildung 4–103 E). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche FITC⁺-Population ΔCD4 -überexprimierender Zellen nach der Präinkubation mit SPIO-konjugiertem anti-CD4-Antikörper identifiziert werden (Abbildung 4–103 F). 90 % der Zellen wiesen über 50 % der maximalen Fluoreszenzstärke aller untersuchten Zellen auf. 64 % dieser Zellpopulation ließen sich weiterhin noch in eine stark Alexa 488⁺-Population und 26 % in eine schwächere Alexa 488⁺-Zellpopulation unterteilen.

4.6.3.3 Multimodale Bildgebung von multizellulären Aggregaten im 35 mm-Agarosephantom

Um die multimodalen Visualisierungseigenschaften der 293T- Δ CD4⁺ Zellen zu untersuchen, wurden multizelluläre Aggregate im Suspensionsmodell gebildet und anschließend für eine Stunde mit dem SPIO-konjugierten anti-CD-4 Antikörper inkubiert.

Bei der Untersuchung konnte keine relevante Photonenemission nach der Applikation von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Luziferin bei den Kontrollzellen beobachtet werden. Deutliche Signale wurden bei den Luziferase-exprimierenden Zellen detektiert (Abbildung 4–104 A). Bei 30 s Anregung des gleichen Präparates mit Fluoreszenzlicht konnte eine schwache, aber deutliche Emission bei den mCherry⁺-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4–104 B). MRT-Untersuchungen wurden nach der Fixierung der Zellen mit den identischen Aufnahmesequenzen wie bei den Einzelzelluntersuchungen durchgeführt. Es konnte eine deutliche Lokalisation vieler vereinzelter hypointenser Bereiche bei den Δ CD4⁺-Zellen bereits mit einer Echozeit von TE = 5 ms identifiziert werden (Abbildung 4–104 C).

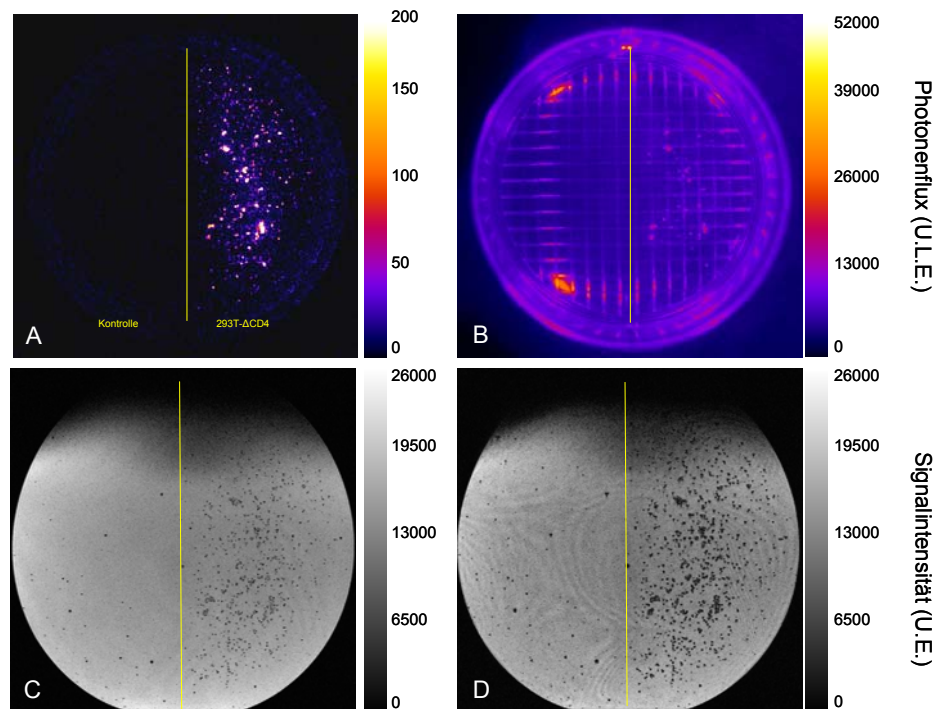


Abbildung 4–104: Multimodale Bildgebung im Agarosephantom von 293T- Δ CD4 über-exprimierenden Zellen:

Multizelluläre Aggregate von 293T- Δ CD4-Zellen, wurden für einen Zeitraum von 1 h mit dem anti-CD4-SPIO-Antikörper inkubiert. Anschließend fand eine Immobilisierung im 35 mm-Agarosephantom statt. Die Analyse der Reporterexpression und der Detektion wurde mit Biolumineszenz (A), Fluoreszenz (B) und MRT (nach Fixierung) mit den Echozeiten TE = 5 ms (C) und TE = 18 ms (D) durchgeführt. Für die Detektion der Luziferase wurde $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ D-Luziferin auf die Agaroseoberfläche gegeben. Die Fluoreszenzdetektion wurde in einem Zeitraum von 30 s mit der Blendeneinstellung 2,8 durchgeführt. Bei der MRT-Untersuchung wurde die Echozeit bei der konstanten Repetitionszeit TR = 200 ms variiert.

Die dargestellten Bilder stellen minimale Intensitäts-Projektionen aus der Aufnahme­sequenz dar, in der 12 Schichten kombiniert wurden. Jede einzelne Schicht weist eine Dicke von 78 μm auf. Mit der Echozeit $TE = 18\text{ ms}$ wurde eine stärkere Signalauslöschung im Vergleich zur niedrigeren Echozeit $TE = 5\text{ ms}$ bei den ΔCD4^+ -Zellen erzielt (Abbildung 4–104).

Bei einer detaillierten Betrachtung der einzelnen, mit den zwei Echozeiten akquirierten Schichten, konnte eine selektive Signalauslöschung an den Rändern verschiedener Aggregate festgestellt werden, die sich signifikant von benachbarten Hintergrundbereichen unterschieden (Abbildung 4–105).

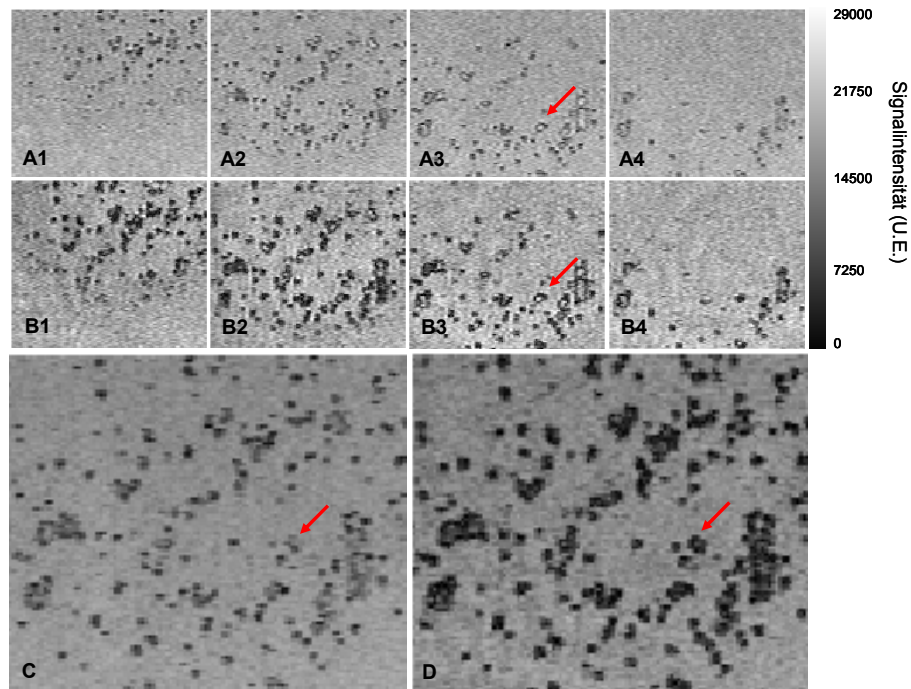


Abbildung 4–105: Detaillierte Analyse der MRT-Untersuchungen nach SPIO-konjugierter Anti-körperinkubation von ΔCD4^+ -multizellulären Aggregaten:

Nach der Inkubation mit dem SPIO-konjugierten-anti-CD4-Antikörper konnte bei den multizellulären Aggregaten, bestehend aus 293T-K79- ΔCD4 -K201-Klon #5 Zellen, eine niedrigere, zirkulär angeordnete Signalintensität an den Aggregatgrenzen festgestellt werden. Abbildung A1-A4 zeigt die einzelnen Schichten mit einer Schichtdicke von 78 μm , die mit der Echozeit $TE = 5\text{ ms}$ akquiriert wurden. Bei der höheren Echozeit von $TE = 18\text{ ms}$ (B1-B4) wurde eine niedrigere Signalintensität ermittelt. Der an den Rändern auftretende Signalintensitätsverlust konnte nicht bei allen Aggregaten eindeutig in den Minimum-Intensitäts-Projektionen der Sequenz mit $TE = 5\text{ ms}$ und $TE = 18\text{ ms}$ (D) identifiziert werden. Bedeutung der Pfeile: s.Fließtext.

Bei einer Echozeit von $TE = 5\text{ ms}$ konnte der randständige Signalverlust bei einzelnen Aggregaten über teilweise drei akquirierte Schichten verfolgt werden (Pfeil in Abbildung 4–105 A3). Bei der höheren Echozeit von $TE = 18\text{ ms}$ konnte ein stärkerer Signalverlust beobachtet werden, der teilweise über vier Schichten lokalisierbar war (Pfeil in Abbildung 4–105 B3). In den Minimum-Intensitäts-Projektionen konnte die zirkulär auftretende Signalauslöschung bei der niedrigen Echozeit kaum identifiziert werden (Abbildung 4–105 C), während durch den T_2^* -Effekt bei der höheren Echozeit die exakte Abgrenzung von den benachbarten Regionen nicht eindeutig möglich war (Abbildung 4–105 D).

4.6.3.4 Quantifizierung der Aggregate anhand der unterschiedlichen Bildgebungsmethoden

Die in Abbildung 4–104 mittels mCherry-Fluoreszenz, Biolumineszenz- und MRT-Techniken visualisierten $\Delta CD4^+$ -Tumoraggregate und 293T-Kontrollzellen wurden quantitativ ausgewertet (Abbildung 4–106). Es wurde eine Korrelation mit dem mikroskopisch bestimmten Aggregatdurchmesser vorgenommen, was bei der Quantifizierung der Luziferasereaktion zu einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,72$ führte (Abbildung 4–106 A). Es konnte bei der Korrelation zwischen dem berechneten Aggregatvolumen und dem auf der mCherry Expression basierenen Photonenflux ebenfalls ein linearer Zusammenhang gezeigt werden. Allerdings konnte für R-Quadrat lediglich ein Wert von 0,58 ermittelt werden (Abbildung 4–106 B). bei den MRT-Aufnahmen, die mit der Echozeit von $TE = 18$ ms durchgeführt wurden, konnte eine exaktere Korrelation zwischen der ermittelten Signalintensität und dem Aggregatvolumen erstellt werden, als mit $TE = 5$ ms (Abbildung 4–106 C und D).

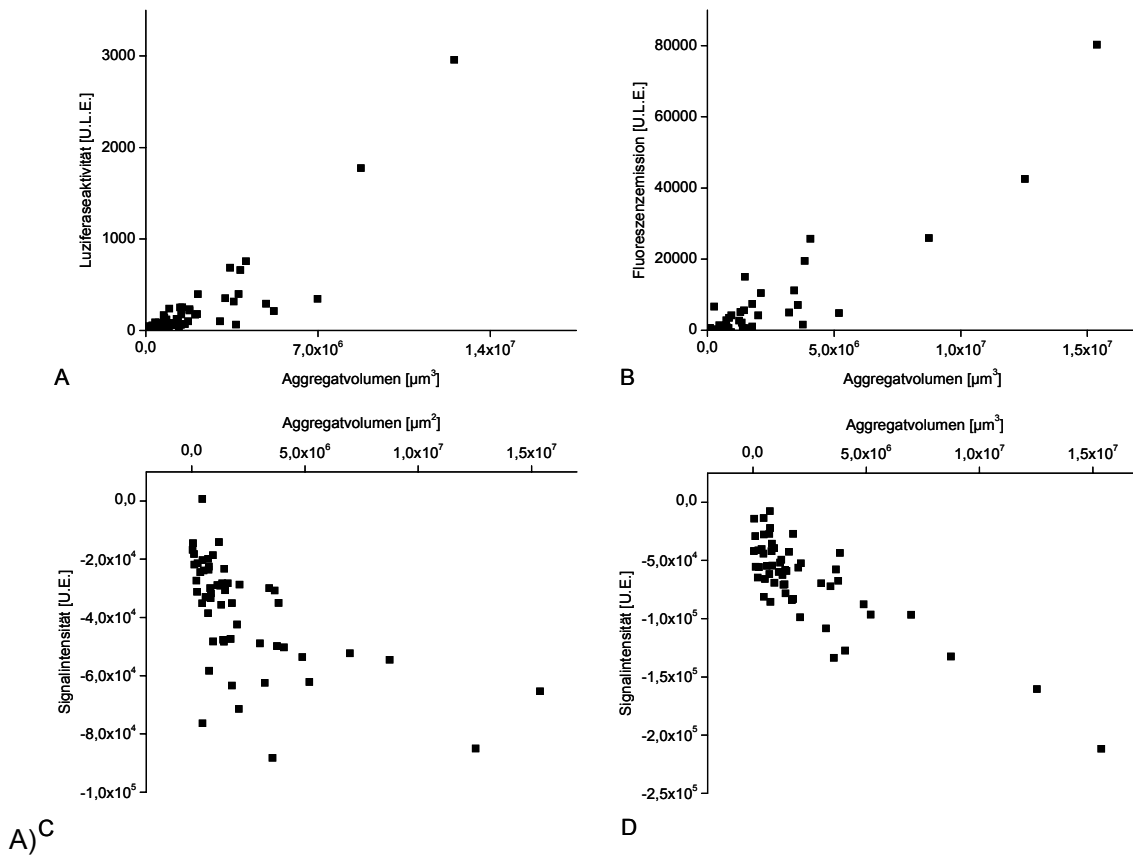


Abbildung 4–106: Quantitative Analyse der unterschiedlichen Bildgebungsreporter im Tumoraggregatmodell:

Die Photonenemission der Tumoraggregate wurde nach Zugabe von D-Luziferin (A), und nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 585 nm (B) untersucht und mit dem Aggregatvolumen korreliert. Die Signalintensitätsveränderungen aufgrund der Rezeptor-Antikörperbindung wurde mittels MRT-Untersuchungen bei einer Echozeit von $TE = 5$ ms (C) und 18 ms (D) quantifiziert.

4.6.4 Subkutane Implantation der $\Delta CD4^+$ -Luziferase⁺ und mCherry⁺-Zelllinie 293T-K79- $\Delta CD4$ -K201-Klon #5

4.6.4.1 Untersuchung der minimal detektierbaren Zellmenge nach Ausbildung von Tumoren *in vivo*

Zellmengen zwischen $0,5 \times 10^6$ und 5×10^6 Zellen der Zelllinie 293T-K79- $\Delta CD4$ -K201-Klon #5 wurden subkutan implantiert und mittels optischer Bildgebung untersucht (Abbildung 4–107 A).

Vier Tage nach der Transplantation konnte ein Photonenflux von $3,2 \times 10^6$ Photonen s^{-1} bei dem Tumor mit der initialen Zellzahl von 1×10^6 Zellen ermittelt werden (Abbildung 4–107 B). Mit zunehmender Zellzahl stieg auch die Menge der detektierten Photonen an. Bei dem Tumor mit der initial implantierten Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen konnten $5,4 \times 10^6$ Ph s^{-1} gemessen werden, bei dem Tumor mit der höchsten Zellzahl von 5×10^6 Zellen konnte ein Photonenflux von $7,6 \times 10^7$ Ph s^{-1} detektiert werden.

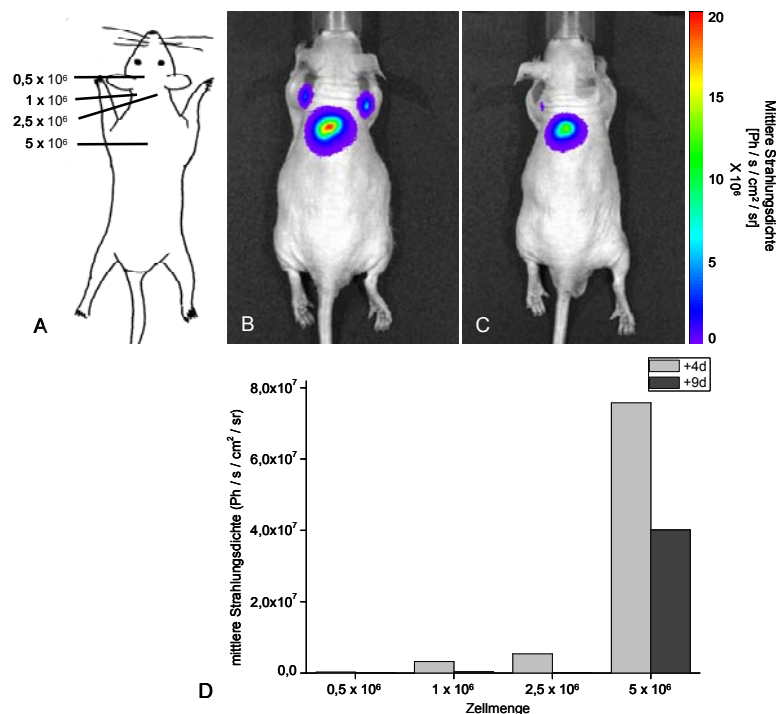


Abbildung 4–107: Subkutane Implantation von 293T-K79- $\Delta CD4$ -K201 Zellen in eine Nacktmaus: Zellmengen zwischen $0,5 \times 10^6$ und 5×10^6 Zellen wurden subkutan in eine Nacktmaus transplantiert (A). Der Photonenflux der Biolumineszenz der einzelnen Tumoren wurde am 4. (B) und am 9. Tag (C) nach Injektion mittels Photonendetektionssystem untersucht. Eine graphische Darstellung der im Untersuchungszeitraum ermittelten Photonenflux-Werte zeigt Abbildung D. Details der Untersuchung: Verwendetes Bildgebungssystem: Xenogen IVIS 200; FOV: 12,8; f1, Expositionszeit 30 s. Kalibrationsbalken: Die dargestellten Werte wurden in allen Abbildungen auf die maximal und minimal detektierten Werte des Bildes B normiert.

Der ermittelte Photonenflux des kleinsten Tumors betrug zum Untersuchungszeitraum $2,13 \times 10^5$ Ph s^{-1} und konnte klar von dem Hintergrundwert von $3,8 \times 10^4$ Ph s^{-1} , der in

direkter räumlicher Nachbarschaft des Tumors detektiert wurde, unterschieden werden. In der Nähe der Ohren traten allerdings starke Reflektionen auf, die eine eindeutige Abgrenzung erschwerten.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte eine Abnahme des Photonensignals der einzelnen Tumoren ermittelt werden. Eine photographische Übersicht gibt Abbildung 4–107 C. Die quantitative Auswertung beider Untersuchungszeitpunkte wurde graphisch in Abbildung 4–107 D dargestellt. Es konnte *in vivo* mit der Filterkombination DsRed/DsRed keine eindeutige Identifizierung der Tumoren erzielt werden.

4.6.4.2 Erweiterte Biolumineszenzbildgebung bei subkutanen Tumoren mit einer initialen Zellmenge von 5×10^6 Zellen

In einem weiteren Experiment wurden subkutane Implantationen von 5×10^6 Zellen der 293T-K79- Δ CD4-201-Klon #5 Zellen vorgenommen und zusammen mit transplantierten Zellen der Kontrollzelllinie 293T mittels optischen Bildgebungsmethoden untersucht (Abbildung 4–108).

In Versuchstier #1 wurden im Kopfbereich 293T-K79- Δ CD4-201-Klon #5 Zellen implantiert und weitere zwei Kontrolltumoren im Körperbereich (Abbildung 4–108 A). Neun Tage nach der Transplantation wurde nach intraperitonealer D-Luziferinjektion der Photonенfluss der einzelnen Tumoren erfasst (Abbildung 4–108 B und C). Die detektierten Photonенfluss-Werte der beiden Kontrolltumoren betragen $3,79 \times 10^5 \text{ Ph s}^{-1}$ bei Tumor #2 und $1,15 \times 10^4 \text{ Ph s}^{-1}$ bei Tumor #3. Damit unterschieden sich beide Werte nicht von einer Kontrollmessung, die in der Mitte zwischen beiden Kontrolltumoren platziert wurde. Der ermittelte Wert lag bei $2,8 \times 10^4 \text{ Ph s}^{-1}$. Der Tumor, bestehend aus 293T-K79- Δ CD4-201-Klon #5 Zellen, konnte eindeutig anhand des Photonенflusses identifiziert werden. Der ermittelte Photonенfluss betrug $4,98 \times 10^7 \text{ Ph s}^{-1}$.

In Versuchstier #2 wurden im Hals- und im unteren Rückenbereich zwei Tumoren, bestehend aus 293T-K79- Δ CD4-201-Klon #5 Zellen, implantiert und im Kopfbereich 293T-Kontrollzellen (Abbildung 4–108 D und E). Der ermittelte Photonенfluss im Tumor #1 betrug $3,4 \times 10^4 \text{ Ph s}^{-1}$ und unterschied sich wie bei Versuchstier #1 nur geringfügig von einer Kontrollmessung, bei der $4,2 \times 10^4 \text{ Ph s}^{-1}$ ermittelt wurden. Bei dem Luziferase⁺-Tumor #2 konnte ein Photonенfluss von $1,06 \times 10^7 \text{ Ph s}^{-1}$ detektiert werden. Tumor #3 wies mit einem Photonенfluss von $1,82 \times 10^7 \text{ Ph s}^{-1}$ einen ähnlich hohen Wert auf (Abbildung 4–108 F). Es konnte mittels Fluoreszenzbildgebung keine klare *in vivo* Lokalisation der Tumoren aufgrund der Überexpression des mCherry-Proteins ermittelt werden. Nach Terminierung des Experimentes wurden alle Tumoren aus den Versuchstieren explantiert und nach erneuter Inkubation von D-Luziferin untersucht. Der Zeitpunkt der Untersuchungen nach Tod der Tiere betrug $< 30 \text{ min}$.

Es konnte eine eindeutige Verifizierung der Emission von Photonen bei dem Tumor #1 des Versuchstieres #1 von 1554,77 U.L.E. im Vergleich zu den Kontrolltumoren, bei denen 16,19 U.L.E und 0 U.L.E. detektiert wurden, vorgenommen werden.

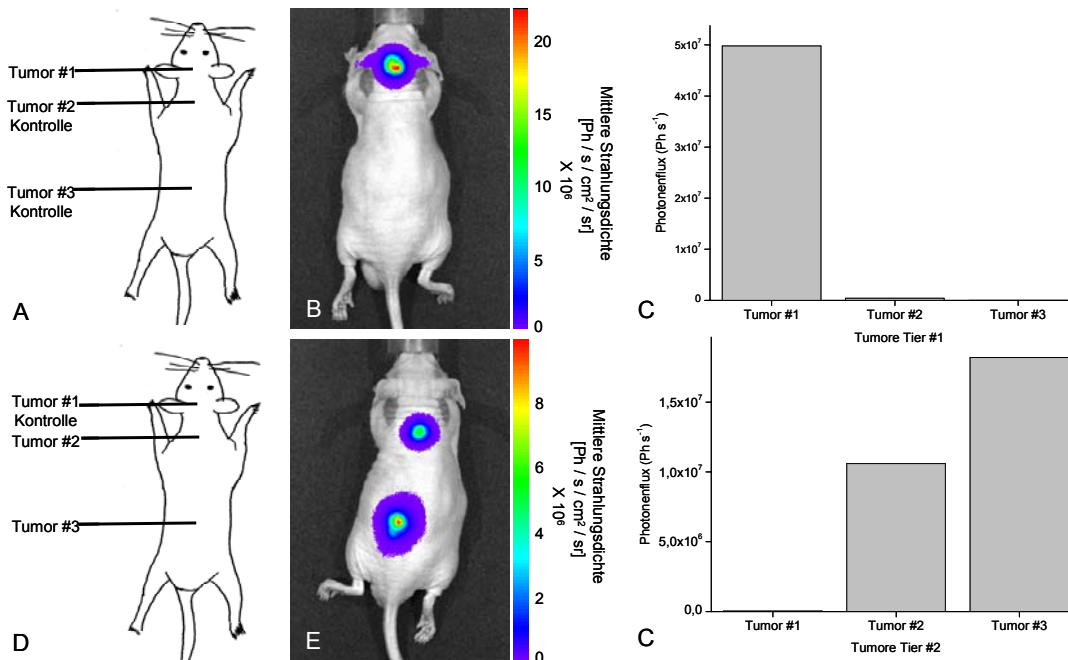


Abbildung 4–108: Subkutane Implantation der 293T-K79- Δ CD4-K201-Klon #5 Zellen in Nacktmäuse:

5×10^6 293T-K79- Δ CD4-201-Klon #5 Zellen und die identische Menge an 293T-Kontrollzellen wurden subkutan in zwei Nacktmäuse injiziert (A und D) und 9 Tage nach der Transplantation mittels Photonendetektor untersucht. Nach der Injektion des Substrates D-Luziferin konnten die Luziferase⁺-Tumoren (Tumor #1 in Versuchstier #1 und Tumor #2 + Tumor #3 in Versuchstier #2) eindeutig anhand der emittierten Photonen detektiert und quantifiziert werden (B, C und E, F). Bei den 293T-Kontrolltumoren wurden ähnliche Werte wie beim Hintergrund gemessen. Details der Untersuchung: Verwendetes Bildgebungssystem: Xenogen IVIS 200; FOV: 12,8; f1, Expositionszeit 60 s.

Die emittierten Photonen der beiden Luziferase-überexprimierenden Tumoren von Versuchstier #2 wiesen eine höhere Photonenemission im Vergleich zu Tier #1 auf (Abbildung 4–109). Bei dem Luziferase⁺-Tumor #2 wurden 28 965,80 U.L.E. nachgewiesen, während bei Tumor #3 426 613,61 U.L.E. detektiert wurden. Die Expression des Cherry-Proteins konnte erfolgreich nachgewiesen und von den Kontrolltumoren unterschieden werden. Zur Spezifitätsuntersuchung der mCherry-Detektion wurden Aufnahmen mit der Fluoreszenzfilterkombination 488 nm/530 nm, die spezifisch zur Detektion von GFP verwendet wird, eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen mCherry⁺-Tumoren und Kontrolltumoren festgestellt werden.

Die Tumore #3 von Versuchstier #1 und #2 (Abbildung 4–109 C und D) wurden nach Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte mit einer kombinierten Hämatoxylin und Eosin Färbung behandelt. Die mittleren Durchmesser der Tumoren wurden bestimmt und mit der *in vivo* und *in vitro* ermittelten Luziferaseaktivität korreliert. Es konnten

Durchmesser zwischen 3,44 mm und 4,37 mm ermittelt werden. Eine Korrelation mit den ermittelten Photonenflux-Werten war nicht möglich. Eine Übersicht über die ermittelten Daten zeigt Tabelle 4–4.

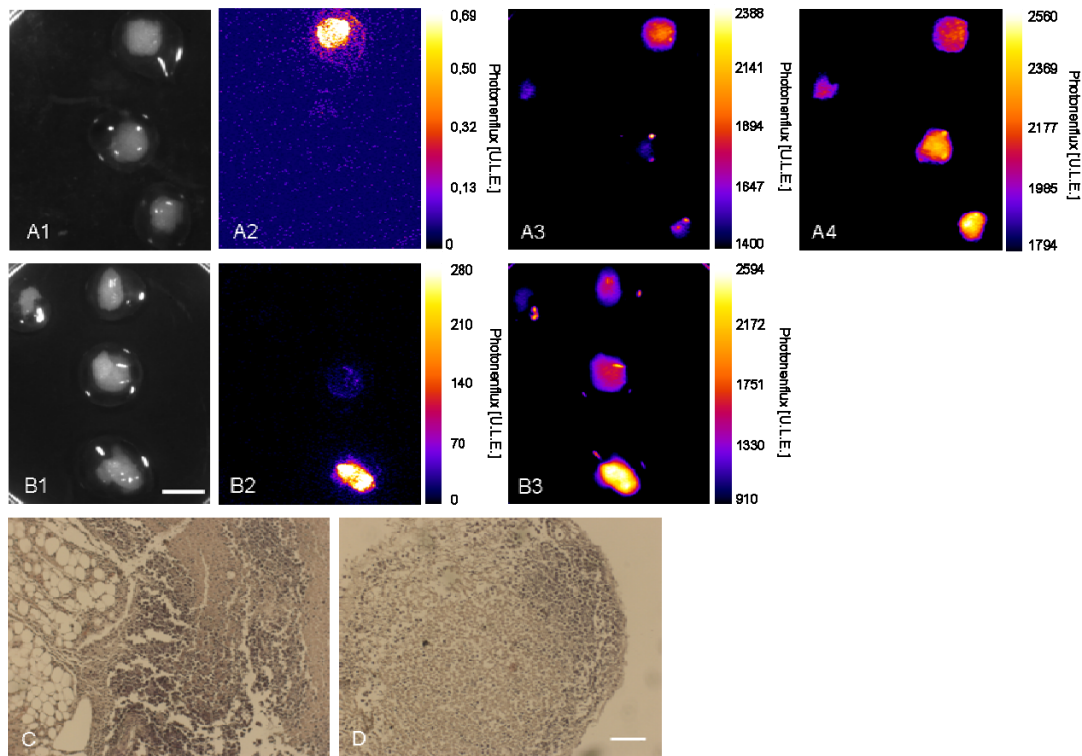


Abbildung 4–109: Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Untersuchung an explantierten Tumoren: Die Position der Tumoren in den Bildern entspricht der Position in den Mäusen (Abbildung 4–108). Die Tumoren aus den Versuchstieren #1 (A1-A4) und dem Tier #2 (B1-B3) wurden nach Terminierung des Experimentes explantiert. Anhand der photographischen Aufnahmen (A1 und B1) wurden die minimalen Durchmesser der einzelnen Tumoren bestimmt. Nach zusätzlicher Inkubation mit D-Luziferin wurde das Biolumineszenzsignal detektiert (A2 und B2). Die Luziferase⁺-Tumoren konnten eindeutig von den Kontrolltumoren abgegrenzt werden, wobei Tumor #3 von Versuchstier #2 die höchste Photonenemission aufwies (B2, unten). Die mCherry-Expression konnte in allen mCherry⁺-Tumoren eindeutig von den Kontrolltumoren unterschieden werden (A3 und B3). Zur Kontrolle wurde ein kleines Stück Muskelgewebe (links) untersucht. Zur Abschätzung von auftretender Autofluoreszenz in den Gewebestücken wurde die Filterkombination 488 nm/530 nm eingesetzt, die bei der Visualisierung des GFP verwendet wird (A4). Histologische Präparate mit einer Hämatoxylin- und Eosin-Färbung wurden von den Tumoren #3 des Versuchstiers #1 (C) und Versuchstiers #2 (D) angefertigt. Verwendetes Bildgebungssystem: Biospace Lab, Messung der Luziferasereaktion: 2 min, kein Filter; mCherry und GFP: 4 s Exposition. Maßstab in B1: 5 mm.

Tabelle 4–4: Übersicht über die ermittelten Messwerte:

Versuchstier / Tumor	mittlerer Durchmesser [µm]	Luziferase-aktivität <i>in vivo</i> [Ph s ⁻¹]	Luziferase-aktivität <i>in vitro</i> [U.L.E.]	Emission mCherry <i>in vitro</i> [U.L.E.]
#1 / T1	3904,96	4,98 10 ⁷	1554,77	1,90 10 ⁶
#1 / T2	3845,83	3,79 10 ⁵	16,19	6,26 10 ⁵
#1 / T3	3436,14	1,15 10 ⁴	0,00	5,59 10 ⁵
#2 / T1	3960,12	3,40 10 ⁴	438,93	1,19 10 ⁶
#2 / T2	4373,00	1,06 10 ⁷	28965,80	2,12 10 ⁶
#3 / T3	4181,47	1,82 10 ⁷	426613,61	3,43 10 ⁶

4.7 Ultrahochaufgelöste Visualisierung von Endorem oder anti-CD4-SPIO markierten Einzelzellen mittels MRT

4.7.1 Untersuchung der Aufnahme von Endorem Partikeln in 293T Zellen im zeitlichen Verlauf

Für eine longitudinale Erfassung der intrazellulären Endoremaufnahme wurden 293T-Zellen für 2 h, 4 h, 6 h und 24 h mit Endorem in der Konzentration $224 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ inkubiert. NMR Untersuchungen und korrespondierende Eisentests wurden durchgeführt, um die Aufnahme der Partikel zu untersuchen.

Bereits bei dem ersten untersuchten Zeitpunkt von 2 h konnte ein signifikanter Anstieg der detektierten Eisenmenge bei den Endorem inkubierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mittels quantitativer Eisenbestimmung und MRT-Messung beobachtet werden (Abbildung 4–110 A und B). Im weiteren zeitlichen Verlauf konnte keine kontinuierliche Zunahme der Eisenkonzentration beobachtet werden, auch eine direkte Korrelation zwischen den MRT-Messungen und der Bestimmung der Eisenkonzentration durch einen spektralphotometrischen Test war nicht eindeutig, ein signifikanter Anstieg der Eisenmenge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen konnte allerdings bei jedem untersuchten Zeitpunkt detektiert werden.

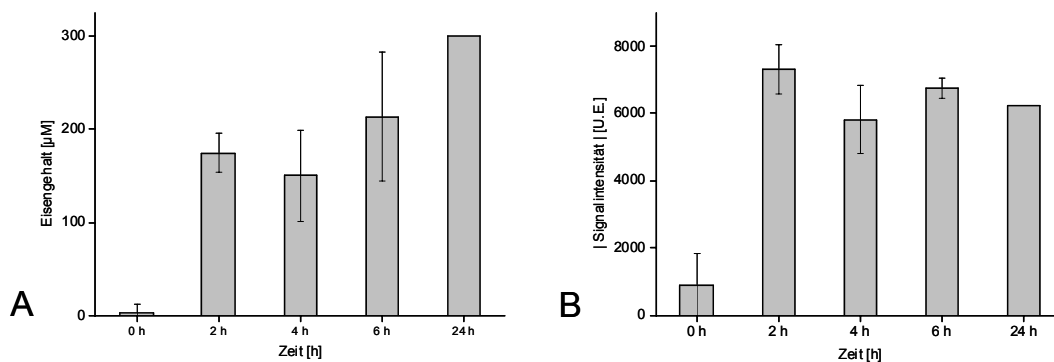


Abbildung 4–110: Bestimmung des Eisengehaltes von 293T-Zellen nach Inkubation mit Endorem mittels quantitativem Eisentest und MRT:

Der Eisengehalt der mit Endorem inkubierten Zellen wurde mittels spektralphotometrischem Eisentest (A) und MRT-Messung (B) bestimmt. Die für beide Verfahren verwendete Zellkonzentration war identisch. Die MRT-Messung wurde bei $\text{TE} = 18 \text{ ms}$ und $\text{TR} = 200 \text{ ms}$ durchgeführt. Das Probenvolumen betrug $2 \mu\text{L}$. Bei den Messungen wurden für die Zeitpunkte 0 h bis 6 h zwei unabhängige Stichproben verwendet. Die absoluten Beträge der ermittelten Signalintensität wurden verwendet. Für die Bestimmung der Eisenkonzentration nach 24 h Inkubation mit Endorem wurde eine Stichprobe verwendet.

4.7.1.1 Hochaufgelöste MRT-Bildgebung von 293T-Zellen nach Inkubation mit Endorem mittels 5 mm Spule

Für eine hochaufgelöste Visualisierung mittels MRT wurden die mit Endorem inkubierten Einzelzellen in einer Spule mit einem Durchmesser von 5 mm visualisiert. Die nominale Auflösung betrug in diesen Experimenten $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m} \times 39 \mu\text{m}$. Bei der mikroskopischen Kontrolle konnte verifiziert werden, dass sich in der Probe mehrzellige Gruppen und Einzelzellen befanden. Eine direkte Korrelation von MRT und mikroskopischen Aufnahmen konnte aufgrund des verwendeten Probengefäßes nicht durchgeführt werden.

Die Spule weist bei einer Messung, die ohne die Zugabe eines Kontrastmittel durchgeführt wurde, eine inhomogene Signalintensität auf, die in vertikaler Richtung zwischen 2000 U.E. und 12 500 U.E. schwankt. Die Signalintensitätsschwankung in horizontaler Richtung variiert zwischen 6000 U.E. und 12 000 U.E. und weist im Vergleich zu dem horizontalen Spulenprofil ein gleichmäßigeres Profil auf.

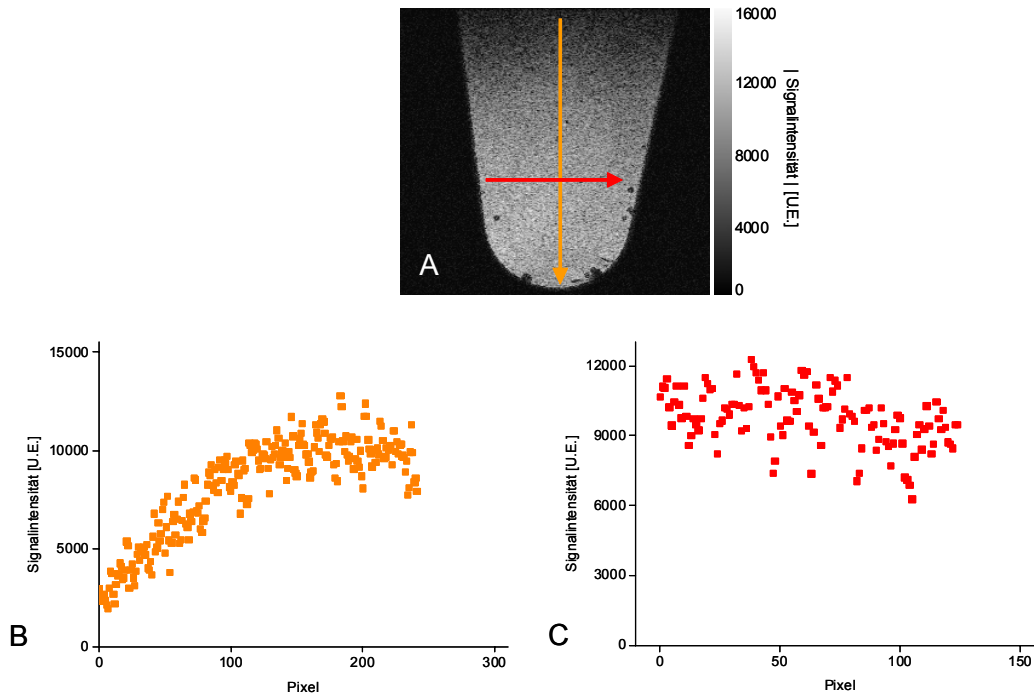


Abbildung 4-111: Analyse der Signalintensität der 5 mm Spule und Erstellung eines Spulenprofils:

Die verwendete Spule weist ein inhomogenes Profil auf. Die Signalintensitäten bei einer Messung, die ohne Kontrastmittel durchgeführt wurde, zeigt eine Schwankung der Signalintensität sowohl in horizontaler, als auch in vertikaler Richtung (Pfeile in A und quantitative Analyse in B und C). Die verwendeten Parameter der Flash-3D-Sequenz waren $TE = 3,6 \text{ ms}$, $TR = 100 \text{ ms}$.

Für die Analysen zellulären Materials mit der 5 mm Spule wurde ein Analysebereich von $107 \text{ Pixel} \times 63 \text{ Pixel}$ (=6741 Pixel) in dem Bereich ausgewählt, den der rote Pfeil in Abbildung 4-111 A markiert. Da sich innerhalb der Probe homogen verteilt Zellkonglomerate befanden, wurde zur quantitativen Analyse ein ROI mit 12 Pixeln verwendet. Dieses beruht auf der

Annahme, dass die T_2^* Effekte von mehreren Zellen eine Fläche von > 12 Pixeln einnehmen würden. Die Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen ergab für die Kontrollgruppe (0 h Inkubation) einen Wert von $0,61 (\pm 0,51)$ U.E. Die ermittelten Werte bei den Endorem inkubierten Zellen zeigen zwischen $2,27 (\pm 1,76)$ U.E. und $3,79 (\pm 1,36)$ U.E. Die Standardabweichung war bei den Zellen, die für 24 h mit Endorem inkubiert wurden am geringsten (Abbildung 4–112 B).

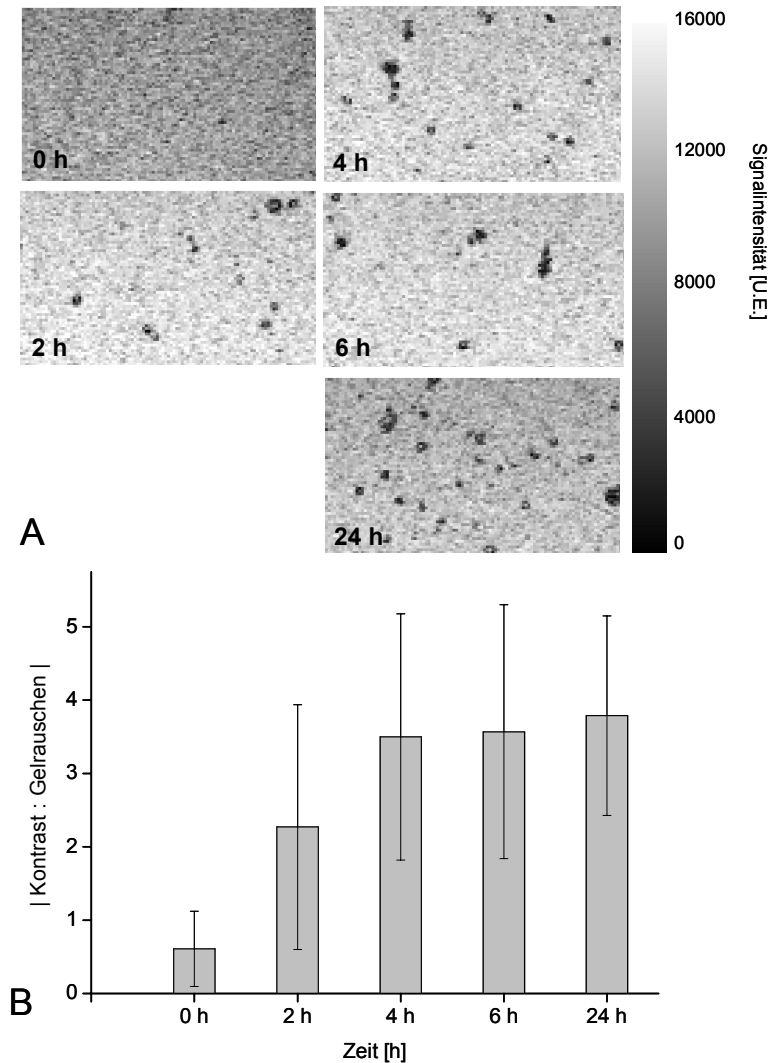


Abbildung 4–112: Lokalisation Endorem markierter Zellen mittels 5 mm Spule:

Um eine hochaufgelöste Visualisierung der Endorem markierten Zellen zu erzielen, wurde eine Auflösung von $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m} \times 39 \mu\text{m}$ verwendet. Ein Bereich von 12 Pixeln wurde in den ausgewählten Analysebereichen für die Bestimmung der Signalintensität (A) und die Berechnung des Verhältnisses von Kontrast : Gelrauschen (B) benutzt. Anhand der Messergebnisse konnte eine eindeutige Zuordnung von hypointensen Bereichen durchgeführt werden. In der quantitativen Analyse wurden 10 Einzelbereiche pro Zeitpunkt berücksichtigt. Die verwendeten Parameter der Flash-3D-Sequenz waren $TE = 3,6 \text{ ms}$, $TR = 100 \text{ ms}$. Ausgewertet wurden Minimum-Intensitäts-Projektionen von 30 Schichten.

4.7.2 Visualisierung von Δ CD4 überexprimierenden 293T Zellen mit der 5 mm Spule und Applikation von Gd-DTPA

Für die Visualisierung von Δ CD4 überexprimierenden Zellen wurden die 293T- Δ CD4⁺-Zellen für eine Stunde mit dem anti-CD4-SPIO-Antikörper als Einzelzellen inkubiert und nach Fixierung mit der 5 mm Spule untersucht. Bei der mikroskopischen Beurteilung der Proben konnte verifiziert werden, dass sich zu 93,4 % Einzelzellen und zu 6,6 % kleinere Zellgruppen mit < 10 Zellen in den Proben befanden (Abbildung 4–113 A, B, Pfeile). Die MRT-Untersuchungen wurden mit einer Echozeit von TE = 3,6 ms und TR = 100 ms durchgeführt.

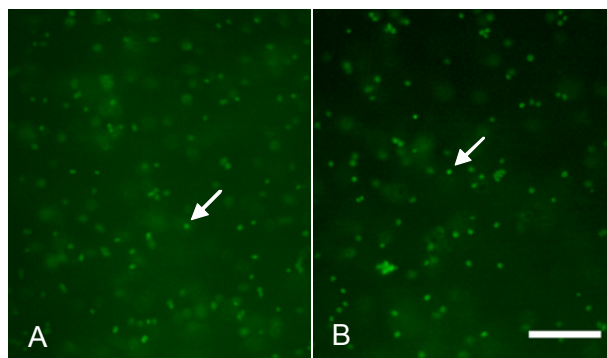


Abbildung 4–113: Lokalisation der untersuchten Zellen innerhalb des Probengefäßes für die 5 mm Spule:

Die mit dem anti-CD4-SPIO-Antikörper inkubierten 293T-Zellen (A) und Δ CD4⁺-Zellen wurden nach der Fixierung durch die Agarosematrix im Probengefäß mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Sytox green (grün) inkubiert. Zu 93,4 % befanden sich Einzelzellen (Pfeile in A und B) in den Probengefäßen. Maßstab: 100 μ m.

In einer weiteren Untersuchung wurden die in Agarose eingebetteten Zellen nach den Messungen mit Gd-DTPA für 4 h inkubiert und erneut untersucht. Dabei wurden die Messungen nach einer Inkubation von 4 h begonnen, die sicherstellte, dass sich das Gd-DTPA homogen in der Agarose verteilt hatte. Für die Messungen wurde eine Flash3D-Sequenz verwendet, bei der die Repetitionszeit von TR = 100 ms konstant belassen wurde, die Echozeit aber zwischen TE = 3,6 ms und TE = 18 ms variiert wurde. Zusätzlich wurden Messungen mit der Einstellung „zero filling“ durchgeführt um eine Reduktion der Zeit zu erlangen, die für die Messung benötigt wurde. Tabelle 4–5 gibt darüber einen Überblick.

Tabelle 4–5: Übersicht über die verwendeten Akquisitionsparameter:

Für die Untersuchungen mit der 5 mm Spule wurden verschiedene Parameter benutzt, die in (Abbildung 4–114) quantitativ ausgewertet wurden.

Messung #	Echozeit [ms]	Kontrastmittel	zero-filling	Mittelungen	benötigte Zeit [min]
1	3,6	- Gd-DTPA	ja	1	27
2	3,6	+ Gd-DTPA	ja	1	27
3	18	+ Gd-DTPA	ja	1	27
4	3,6	+ Gd-DTPA	nein	2	109

Bei den 293T-Kontrollzellen, die mit dem anti-CD4-SPIO konjugierten Antikörper inkubiert wurden, konnte in den Untersuchungen mit TE = 3,6 ms keine signifikante zellassoziierte Signalauslöschung beobachtet werden. Die Zugabe von Gd-DTPA führte zu einer signifikanten Erhöhung der Signalintensität bei allen verwendeten Messesequenzen (Abbildung 4–114). Besonders hervorzuheben ist die hohe Signalintensität bei TE = 18 ms (Abbildung 4–114, #3), da eine Erhöhung der Echozeit ohne Zugabe des Kontrastmittels mit einer starken Reduktion der Signalintensität einhergeht.

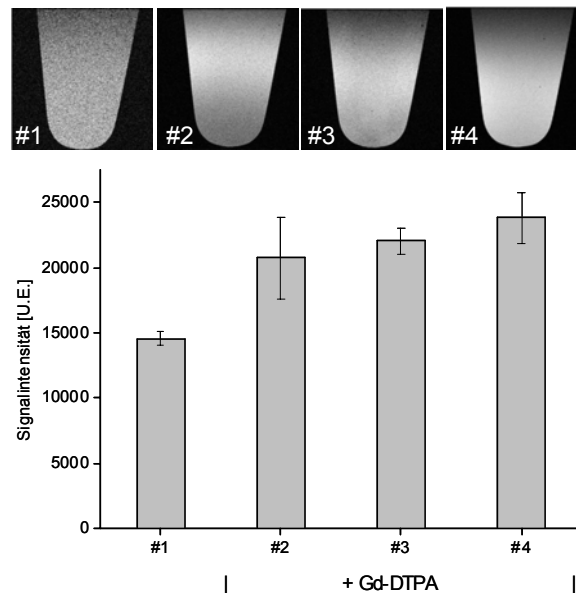


Abbildung 4–114: Quantitative Auswertung der Signalintensität nach Zugabe von Gd-DTPA:

Die Zugabe von Gd-DTPA führt zu einer signifikanten Erhöhung der Signalintensität in den Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte von 20 Signalintensitätsmessungen bei den durchgeführten Akquisitionsparametern aus Tabelle 4–5. Es wurde eine Minimum-Intensitäts-Projektion von 4 Schichten durchgeführt.

Eine 1 h Inkubation von Δ CD4 überexprimierenden 293T-Zellen mit dem anti-CD4-SPIO-Antikörper und eine anschließende Untersuchung mit der 5 mm Spule, führte zu einer eindeutigen und qualitativ hochwertigen Visualisierung der Zellen, wenn Gd-DTPA als Kontrastmittel eingesetzt wird (Abbildung 4–115). Die Minimum-Intensitäts-Projektionen von vier einzelnen Schichten vor der Zugabe des Kontrastmittels erlauben eine Lokalisation der Einzelzellen und kleineren Zellgruppen in der Agarosematrix (Abbildung 4–115 A). Eine detaillierte zelluläre Auflösung wird allerdings erst nach der Zugabe von Gd-DTPA möglich (Abbildung 4–115 B).

Bei der vergleichenden Analyse des Gd-DTPA inkubierten Präparates fällt auf, dass die Zellen, die durch den Signalintensitätsabfall im MRT sichtbar werden, in drei Kategorien eingestuft werden können:

- 1.) Bereiche, die eine starke Signalauslöschung im Vergleich zum zellfreien Hintergrund aufweisen und im Gd-DTPA freien Präparat ebenfalls einen deutlichen hypointensen Bereich einnehmen (grüne Pfeile in Abbildung 4–115 A und B)
- 2.) Zellen mit starker Signalauslöschung vor allem an den Rändern. Es findet sich ein hyperintenser Bereich im Zentrum der Zelle. Diese Zellen sind ebenfalls im Präparat ohne Gd-DTPA Zugabe identifizierbar, wobei allerdings Details nicht deutlich erkennbar sind (rote Pfeile in Abbildung 4–115 A und B).
- 3.) Zellen mit schwachem Signalintensitätsverlust sind deutlich identifizierbar nach Inkubation mit Gd-DTPA und weisen ebenfalls einen deutlichen hyperintensen Bereich im Zentrum auf. Diese Zellen sind ohne die Zugabe von Gd-DTPA nicht identifizierbar (gelbe Pfeile in Abbildung 4–115 A und B).

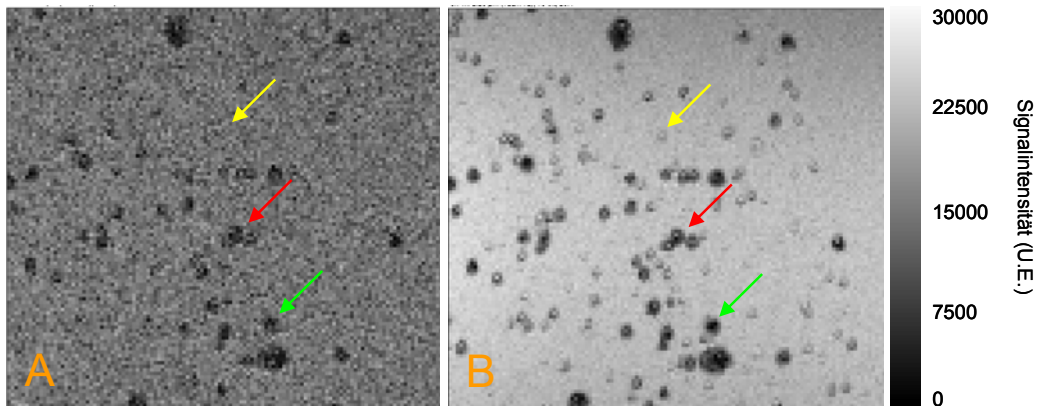


Abbildung 4–115: Vergleichende Visualisierung Δ CD4 überexprimierender 293T-Zellen nach Inkubation mit dem anti-CD4-SPIO-Antikörper:

Nach 1 h Inkubation mit dem anti-CD4-SPIO-Antikörper wurden Δ CD4 überexprimierende 293T-Zellen im Agarosephantom mit der 5 mm Spule untersucht (A). Zusätzlich wurde die Agarosematrix mit Gd-DTPA inkubiert und die Messungen wiederholt (B). Ein deutlicher Unterschied in der Identifikation von Einzelzellen ist nach der Gd-DTPA Inkubation erkennbar (Pfeile). Die gezeigten Messungen wurden mit einer identischen Messsequenz aufgenommen (TE = 3,6 ms, TR = 100 ms, Mittelungen: 2, kein „zero filling“).

Die Einzelzellen aus Kategorie 2 sind durchschnittlich in drei bis vier Schichten lokalisiert. Die schwach hypointensen Zellen aus der Kategorie 3 sind durchschnittlich in einer bis zwei Schichten lokalisiert. Bei einer Schichtdicke von 39 μ m bedeutet dieses, dass eine einzelne, extrazellulär schwach mit den superparamagnetischen Partikeln markierte Zelle in einer Fläche von 39 μ m bis 72 μ m eindeutig identifiziert werden kann (Abbildung 4–116 A). Bei der Detailanalyse der Schichten ist noch ein weiterer Effekt erkennbar, der in den Nachbarschichten auftritt, die auf Schichten folgen, in denen Zellen lokalisiert sind, die eine starke Signalauslöschung produzieren. In diesen benachbarten Bereichen treten hypertrophe Flecken mit einem zellulären Durchmesser auf, die ebenfalls nur auf eine singuläre Schicht begrenzt sind (rot-weißer Pfeil in Abbildung 4–116 A1).

Für die exakte Quantifizierung wurde das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen von den Zellen aus Kategorie 2 und 3 bestimmt, nachdem aus verschiedenen Bereichen des gesamten Datensatzes jeweils aus vier Schichten Minimum-Intensitäts-Projektionen erstellt wurden.

Das Kontrast : Gelrauschen-Verhältnis, ohne die Verwendung von Gd-DTPA, für die deutlich vom Hintergrund abgrenzbaren Einzelzellen der Kategorie 2 betrug $|1,80| \pm 0,87$ U.E. Das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen für Zellen der Kategorie 2 nach der Applikation von GdDTPA betrug $|11,63| \pm 4,19$ U.E.. Die schwach hypointensen Zellen, die ohne Gd-DTPA Zugabe nicht identifizierbar waren, wiesen ein Kontrast : Gelrauschen-Verhältnis von $|4,25| \pm 2,12$ U.E auf (Abbildung4–116 B).

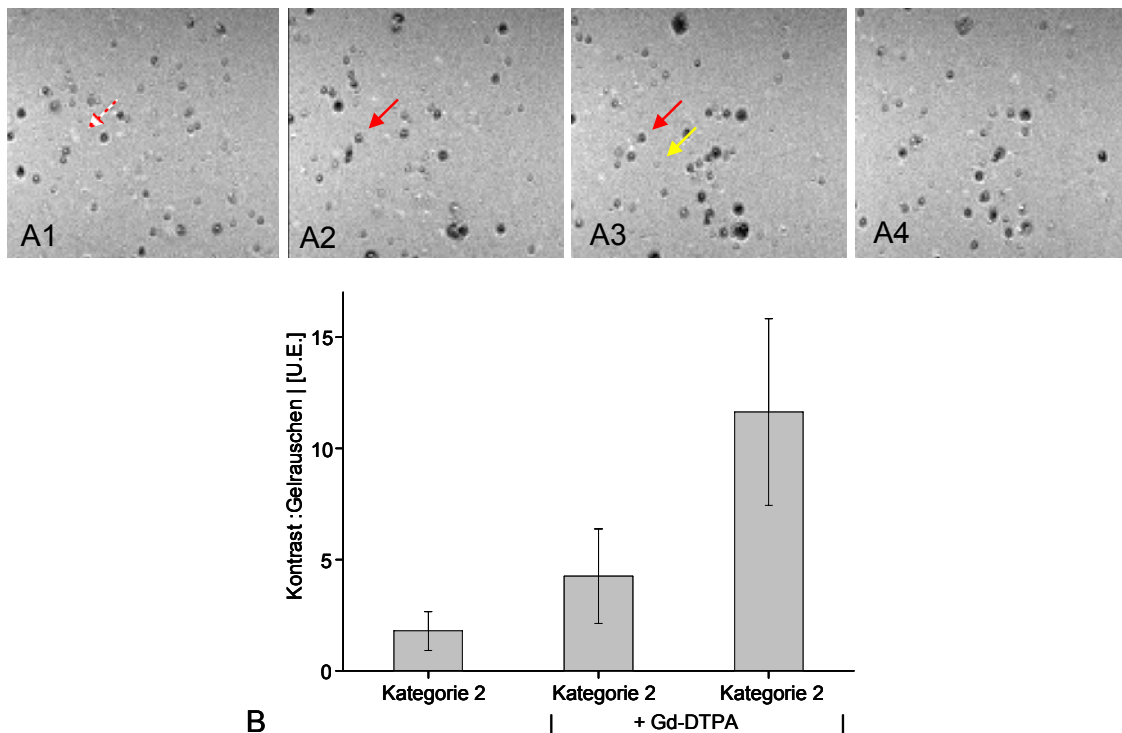


Abbildung 4–116: Lokalisation und Identifikation der einzelnen Zellen in aufeinander folgenden Schichten:

Vier aufeinander folgende Schichten mit einem Abstand von $39 \mu\text{m}$ zeigen die Lokalisation der Einzelzellen (A1-A4). Der gelbe Pfeil in A3 weist auf eine Zelle, die eine schwache Signalauslöschung bei $TE = 3,6$ ms hervorruft und nur in einer einzigen Schicht identifizierbar ist. Der rot-weiße Pfeil identifiziert einen Bereich mit einer Signalverstärkung, welche in den weiteren beiden Schichten als Signalverlust erkennbar wird (rote Pfeile). Der gelbe Pfeil weist auf eine einzelne, schwach markierte Zelle hin.

Eine Quantifizierung der Zellen in den Kategorien 2 und 3 (B) zeigt das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen mit/ohne Zugabe von Gd-DTPA.

4.8 EGF-Rezeptorexpression und Erstellung eines gekoppelten Antikörpers

4.8.1 Antikörperproduktion, Reinigung und Kopplungsreaktion

Hybridomzellen wurden initial in einem serumhaltigen Medium kultiviert und über einen Zeitraum von 4 Wochen an ein serumfreies Medium adaptiert. Dadurch wurde der Gehalt an unspezifischen Proteinen im Kulturmedium verringert und die spätere Reinigung der Antikörper erleichtert. Durch die Entfernung der serumeigenen Proteine wird zudem eine Erhöhung der Kopplung von superparamagnetischen Partikeln an die Antikörper erreicht. Abbildung 4–117 verdeutlicht den Gehalt an serumeigenen Proteinen im Vergleich zu den gereinigten Antikörpern nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Coomassiefärbung.

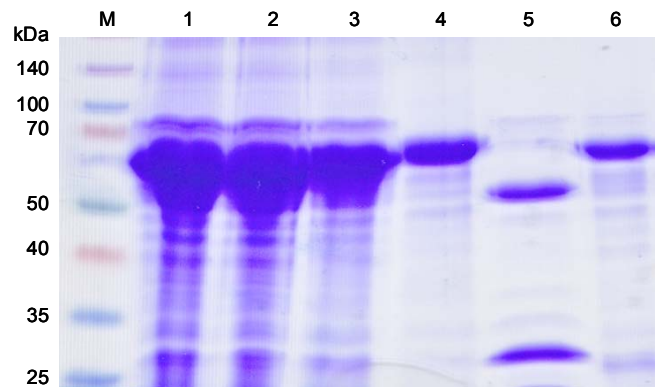


Abbildung 4–117: Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese des EGFR-Antikörpers:

Um den Gehalt an Antikörpern zu Serumproteinen zu beurteilen, wurde das gleiche Volumen in Spur 1-4 aufgetragen. Auf Spur 1 des 15 % SDS-Gels wurde der Kulturüberstand des um 25 % serumreduzierten Mediums, auf Spur 2, der um 50 % reduzierte Kulturüberstand, auf Spur 3 der um 75 % reduzierte Überstand und auf Spur 4 serumfreier Kulturüberstand aufgetragen. Die Fraktion nach der MelonGel-Säule befindet sich in Spur 5 und der kommerziell erhältliche Überstand in Spur 6. Deutlich erkennbar ist die Reduktion der unspezifischen Serumproteine und die Anreicherung der beiden Antikörperbanden nach der Reinigung.

Die ursprüngliche Konzentration von Rinderserum betrug 20 %, zusammengesetzt aus 15 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum und 5 % hitzeinaktiviertem Kälberserum. Deutlich wird, dass bei identisch aufgetragener Proteinmenge der Anteil der unspezifischen Serumproteine subsequent reduziert wird und sich nunmehr eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 65 kDa befindet (Spur 4). Nach der Reinigung durch die MelonGel-Säule werden zwei Banden angereichert, die sich bei etwa 55 kDa und 30 kDa befinden (Spur 5). Deutlich erkennbar ist der hohe Proteingehalt, der nach der Reinigung mit der MelonGel-Säule eluiert werden konnte. Der kommerziell erhaltene Hybridomüberstand hat einen hohen Gehalt an Serumproteinen (Spur 6).

4.8.2 *In vitro* Validierung der Antikörperspezifität und SPIO-Antikörper Konjugierung in PC12-Zellen

Die EGF-Rezeptorexpression wurde an unterschiedlichen Zellen mit dem ungereinigten Antikörper getestet, der aus der Hybridomzellproduktion erhalten wurde, um eine Funktionsüberprüfung durchzuführen. Als Positivkontrolle wurde ein kommerziell erworbener Überstand verwendet, mit dem auch durch semiquantitative Immunfluoreszenzanalysen eine Speziesreaktivität untersucht wurde (Tabelle 4–6).

Tabelle 4–6: Speziesvergleich der Antikörperbindung und Auswahl eines geeigneten Testsystems anhand semiquantitativer immunzytochemischer Untersuchungen:

An verschiedenen Zelllinien und aus Mäusen und Ratten isolierten primären Zellen wurden immunzytochemische Untersuchungen mit dem aus den Hybridomzellen gewonnenen anti-EGFR-Antikörper angefertigt. Die Immunglobulinkonzentration des Antikörpers, der für die Inkubationen verwendet wurde, betrug $68 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Zelllinie	Spezies	Ergebnis	Stärke der Immunreaktion
Primäre neurale Vorläuferzellen aus dem Kortex	Maus	Keine Immunreaktion	-
Primäre neurale Vorläuferzellen aus dem Kleinhirn	Ratte	Schwache, spezifische Reaktion	+
Gli36 Δ EGFR-Glioma	Mensch	Keine Immunreaktion	-
C6-Glioma	Ratte	Spezifische Reaktion	++
PC12 Phäochromozytom	Ratte	Spezifische Reaktion	++++

Es konnte keine spezifische Immunreaktion bei den primären neuronalen Vorläuferzellen, die aus dem Kortex von embryonalen Mäusen zum Zeitpunkt E14,5 isoliert wurden, beobachtet werden. Des Weiteren konnte bei der humanen Glioblastomzelllinie Gli36 Δ EGFR nach Antikörperinkubation ebenfalls keine Immunreaktion dokumentiert werden. Bei neuronalen Vorläuferzellen, die aus dem postnatalen Kleinhirn von Ratten isoliert wurden und C6-Gliomzellen, konnte eine spezifische Markierung mit dem Antikörper erreicht werden. Nach Inkubation der PC12-Phäochromozytomzellen mit dem Antikörper wurde eine starke Anfärbung beobachtet.

Die PC12-Zellen wurden als geeignetes Untersuchungssystem für die weiteren Versuche ausgewählt. Die Immunfluoreszenzfärbung in Abbildung 4–118 verdeutlicht die extrazelluläre, zellmembranassoziierte Lokalisation des Rezeptors.

Die Zellen weisen auf den Kollagen beschichteten Zellkulturschalen eine spontane Zusammenlagerung auf, die eine Vereinzelung der Zellen sowohl mechanisch, als auch enzymatisch erschwerte.

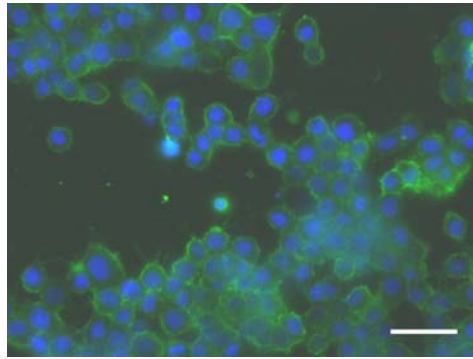


Abbildung 4–118: Visualisierung der EGF-Rezeptorexpression in PC12 Zellen:

Die PC12 Zellen weisen ein kleines Zytoplasma auf, in dem der Nukleus dominiert. Eine deutliche, membranassoziierte Immunfärbung konnte mit einer Verdünnung von 1:25 erreicht werden. Grün: anti-EGFR, Blau Hoechst Dye 33342. Maßstab: 25 μm .

Um die Visualisierung mittels MRT zu überprüfen, wurden Inkubationsexperimente mit dem aus serumfreier Kultur isolierten nativen Antikörper und Antikörper, der mittels Karbodiimid an superparamagnetische Partikel konjugiert wurde, vorgenommen.

Innerhalb des Reinigungsprozesses wurden zwei unterschiedliche Zentrifugationsgeschwindigkeiten gewählt, die für die Pellettierung des SPIO-konjugierten Antikörpers eingesetzt wurden. Abbildung 4–119 verdeutlicht diesen Prozess anhand einer MRT-Untersuchung nach 1 h Inkubation der PC12-Zellen mit dem Überstand, der nach der Zentrifugation mit 15 000 $\times g$ (Abbildung 4–119 A1) und 20 000 $\times g$ (Abbildung 4–119 B1) inkubiert wurde.

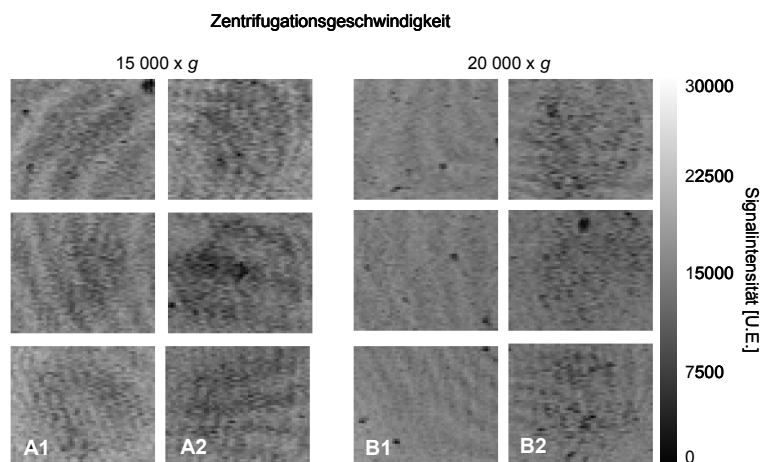


Abbildung 4–119: MRT-Untersuchung nach Inkubation der PC12-Zellen mit dem SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper:

Nach der Reinigung der Antikörper wurde eine Inkubation von PC12-Zellen mit den resultierenden Proben vorgenommen. Die 2 h Inkubation mit dem Überstand, der nach einer Zentrifugation mit 15 000 $\times g$ gewonnen wurde, erzeugt ein hypointenses Signal A1 im Vergleich mit dem stärker zentrifugierten Überstand (B1). Die spezifische Markierung der Zellen mit dem isolierten Antikörper-SPIO-Komplex (A2 und B2) führt zu einer deutlichen Verringerung der Signalintensität im Vergleich mit dem Hintergrund und den Inkubationen mit dem Überstand. Die MRT-Untersuchung wurde mit einer FLASH-3D-Sequenz, TE=30 ms, TR=200 ms, Matrix 512 \times 512 \times 64 Pixel, Mittelungen = 3 durchgeführt.

Deutlich erkennbar ist eine stärkere Immunmarkierung bei der niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeit in den drei untersuchten Proben nach der Überstandsinkubation. Die Zentrifugation mit $20\,000 \times g$ resultiert in einer Reduktion dieser Markierung mit dem Überstand und führte zu einer stärkeren Signalauslöschung nach Inkubation mit dem pelletierten SPIO-konjugierten Antikörpern (Abbildung 4–119 B2) im Vergleich zu der niedrigeren Zentrifugationsgeschwindigkeit (Abbildung 4–119 A2).

Für die weiteren Inkubationen mit dem anti-EGFR-Antikörper wurde die hohe Zentrifugationsgeschwindigkeit gewählt und nur der pelletierte SPIO-Antikörperkomplex verwendet. Abbildung 4–120 A zeigt photographisch eine braune Färbung von PC12-Zellen nach 1 h Inkubation, die mit dem konjugierten Antikörper durchgeführt wurde. Bei den Kontrollzellen konnte keine Färbung der Zellen beobachtet werden (Abbildung 4–120 B).

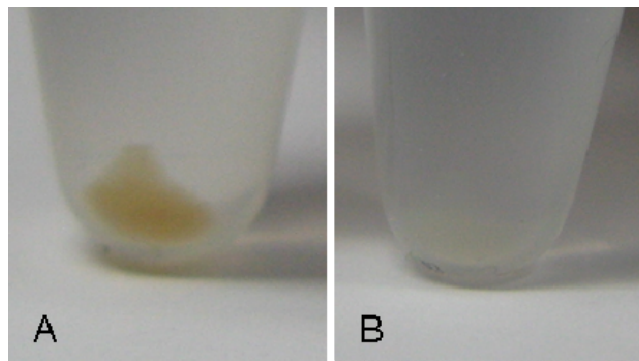


Abbildung 4–120: Inkubation von PC12-Zellen mit dem SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper:

Nach einer Inkubation von PC12 Zellen mit dem SPIO-konjugierten Antikörper wurde nach den Waschschritten eine photographische Aufnahme der Zellen angefertigt, die mit dem Antikörper-SPIO-Komplex inkubiert wurden (A). Bei Kontrollzellen, die mit dem negativ geladenen superparamagnetischen Partikel inkubiert wurden, konnte keine Färbung festgestellt werden (B).

Es wurden weiterführende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Antikörperspezifität und Lokalisation nach Inkubation von PC12-Zellen durchgeführt (Abbildung 4–121). Dabei konnte ohne eine Präinkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper eine deutliche Expression des Rezeptors nachgewiesen werden. Die Reaktion mit dem anti-Dextran-Antikörper zeigt keine Immunreaktion (Abbildung 4–121 A). Nach einer Präinkubation mit dem Überstand, der bei einer Geschwindigkeit von $15\,000 \times g$ zentrifugiert wurde, konnten Dextran⁺-Partikel nachgewiesen werden, die mit dem EGFR kolokalisiert auftraten (Abbildung 4–121 B). Eine leichte punktuelle Verteilung rotfluoreszierender Strukturen, die homogen über die Kulturoberfläche verteilt auftraten, zeigt die Präsenz von unkonjugiertem Antikörper (nicht gezeigt). Die Inkubation mit dem pelletierten SPIO-anti-EGFR-Antikörper-Komplex führte zu einer deutlichen Dextran⁺-Markierung der Zellen, die stärker als in Abbildung 4–121 B war (Abbildung 4–121 C). Es konnten auf der Kulturoberfläche homogen verteilt rot- und grünfluoreszierende Strukturen gefunden werden, die auf das Vorhandensein von freien SPIO-Antikörper-Komplexen hinwies.

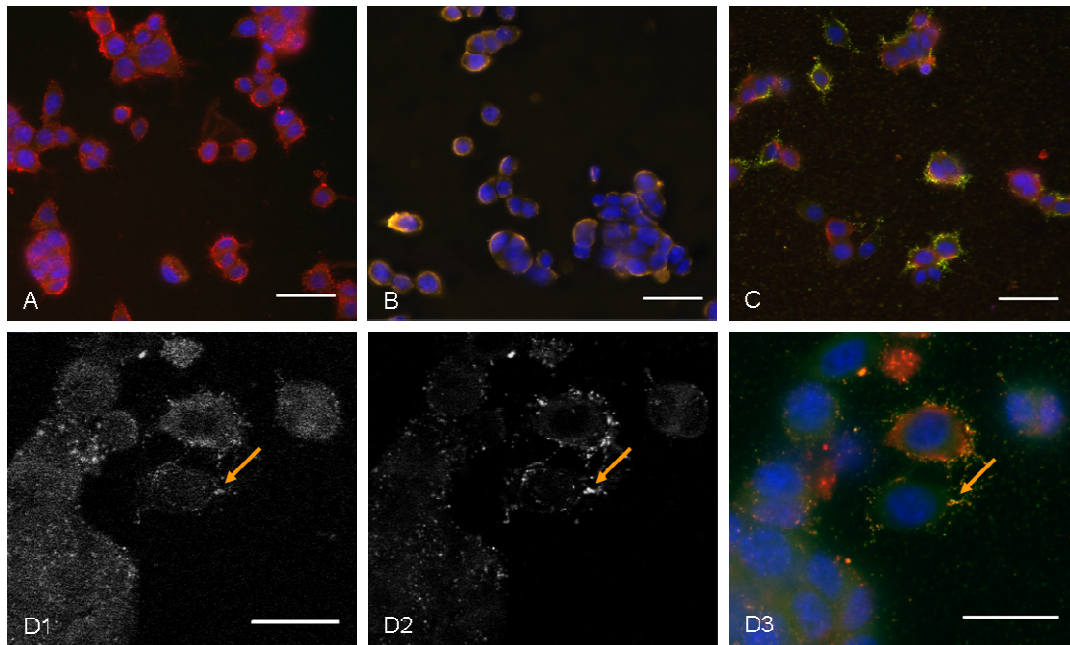


Abbildung 4–121: Immunzytochemische Analyse der EGFR-Expression und Spezifität der SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper:

PC12-Zellen wurden ohne Präinkubation mit SPIO-konjugierten Antikörpern mit einem kommerziell erworbenem anti-EGFR- und anti-Dextran-Antikörper inkubiert (A). Unter diesen Bedingungen konnte eine hohe Expression des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Nach Präinkubation mit dem nach der Zentrifugation erhaltenen Überstand konnte eine Kolokalisation von EGF-Rezeptor und Dextran⁺-Zellen nachgewiesen werden (B). Nach Verwendung des pelletierten Antikörpers wurde die Kolokalisation deutlicher und punktueller identifiziert (C). Die Analyse mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie zeigt deutlich eine homogene Expression des EGF-Rezeptors (D1) und eine Kolokalisation der SPIO-Antikörper mit den Rezeptoren (D2 und D3). Farbnachweis: rot: anti-EGF-Rezeptor; grün: anti-Dextran, blau: Hoechst Dye 33342. Maßstab: A, B, C: 25 µm; D1-D3: 15 µm.

Es konnten auf der Kulturoberfläche homogen verteilt rot- und grünfluoreszierende Strukturen gefunden werden, die auf das Vorhandensein von freien SPIO-Antikörper-Komplexen hinwies. Die erfolgreiche Antikörper-Rezeptorinteraktion konnte auch bei einer fünffachen Erniedrigung der Antikörpermenge erfolgreich nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Für eine detaillierte Analyse wurden konfokale Laserscanningaufnahmen der in Abbildung 4–121 C gezeigten Präparate angefertigt (Abbildung 4–121 D1-D3). Eine homogene Expression des EGF-Rezeptors konnte somit nachgewiesen werden (Abbildung 4–121 D1). Bei Beurteilung der anti-Dextran-Färbung fällt auf, dass nur ein Teil der EGF-Rezeptoren mit dem Antikörper-SPIO-Komplex interagierten (Pfeile in Abbildung 4–121 D2).

4.8.3 Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge mittels MRT

Die minimal mit dem MRT detektierbare Zellmenge, nach Präinkubation mit dem EGFR-Antikörper, wurde durch die Anfertigung von Verdünnungsreihen bestimmt (Abbildung 4–122).

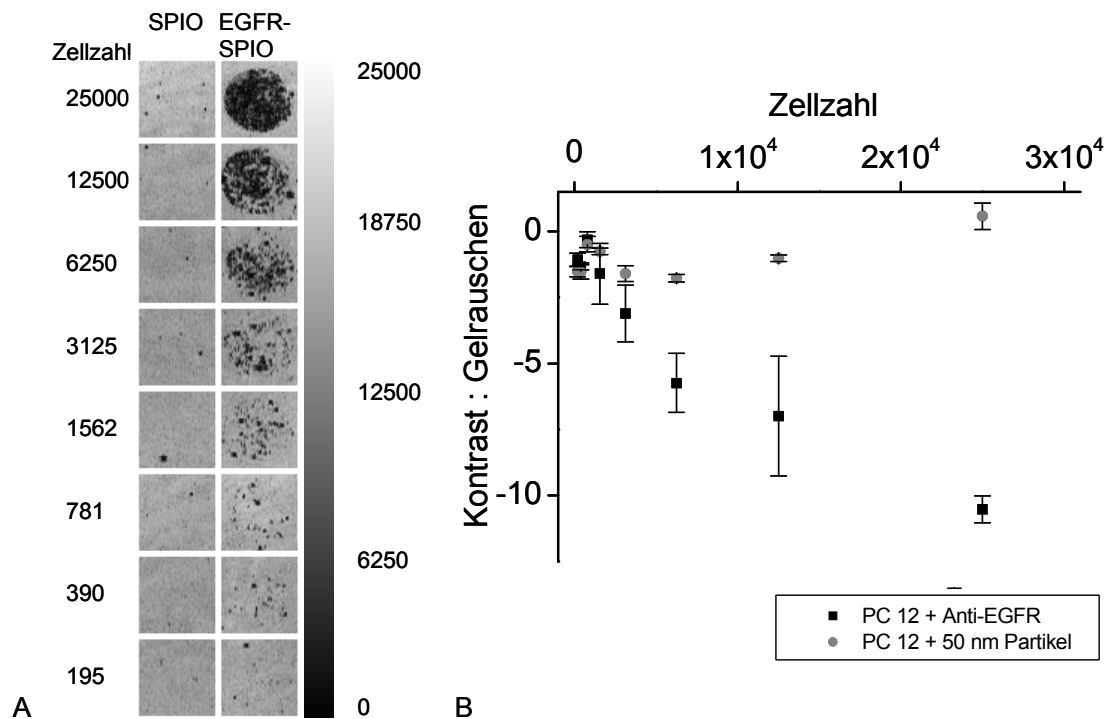


Abbildung 4–122: Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge nach Markierung des EGF-Rezeptors:

Nach 1 h Präinkubation der PC12-Zellen mit dem SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper wurden Verdünnungsreihen der Zellen erstellt (A). Als Kontrolle wurden die PC12-Zellen mit dem negativ geladenen COOH-superparamagnetischen Partikeln inkubiert. Die akquirierten Bilder wurden durch Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen quantifiziert (B). Anzahl unabhängiger Stichproben: $n = 2$.

Zellzahlen zwischen 195 und 25 000 Zellen wurden für die Analysen verwendet und mit einer T_2^* -gewichteten Messsequenz untersucht (Abbildung 4–122 A). Zur Kontrolle wurden die PC12-Zellen mit den negativ geladenen superparamagnetischen Partikeln ohne den konjugierten Antikörper verwendet. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis Kontrast : Gelrauschen bestimmt (Abbildung 4–122 B). Die Kontrollproben wiesen Werte für das Kontrast : Gelrauschen zwischen $|0,482 (\pm 0,30)|$ und $|1,77 (\pm 0,15)|$ auf. Es konnte dabei keine Korrelation zu der untersuchten Zellmenge beobachtet werden. Bei der Zellinkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-EGFR-Antikörper konnten Werte für das Kontrast : Gelrauschen zwischen $|0,31 (\pm 0,29)|$ und $|10,53 (\pm 0,52)|$ identifiziert werden. Bis zu einer Zellmenge von 781 Zellen konnte ein linearer Zusammenhang bei der Korrelation zugrunde gelegt werden.

4.8.4 Bestimmung der EGF-Rezeptorexpression im Mausgewebe mittels semi-quantitativer PCR:

Aus PC12-Zellen wurde Gesamt-RNA präpariert und nach cDNA-Synthese mittels EGFR-spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Diese wurden exonübergreifend gewählt, um eventuelle Verunreinigungen von DNA in der Präparation identifizieren zu können. Als Kontrolle wurde Gesamt DNA isoliert und amplifiziert (Abbildung 4–123).

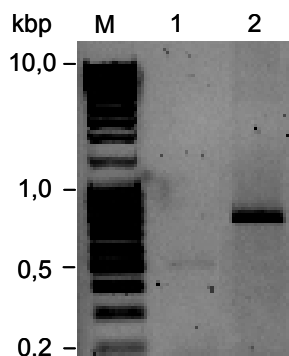


Abbildung 4–123: Semiquantitative PCR von PC12 Zellen zur Quantifizierung der EGF-Rezeptorexpression:

Aus PC12-Zellen wurde Gesamt-RNA nach der Synthese der cDNA (B, Spur 1) und nach Isolation genomischer DNA (B, Spur 2) isoliert und mit EGFR-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert.

In PC12-Zellen wird der EGF-Rezeptor relativ stark exprimiert. Die Amplifikation von DNA zeigt, dass die Oligonukleotide Intronübergreifend gewählt wurden, da das Amplifikat länger ist als in der cDNA. Die cDNA weist ein Amplifikat mit einer Länge von etwa 500 bp auf, während die Länge für die DNA-Amplifikation bei etwa 750 bp liegt.

4.9 PEGylierung von Makromolekülen als Modifikation für effiziente *in vivo*-Applikation

Die kovalente Modifikation von Makromolekülen durch das langkettige Polymer Polyethylenglykol (PEG) führt zu einer Erhöhung des hydrodynamischen Radius, reduzierter Immunogenität und Schutz vor proteolytischer Spaltung.

Die kovalente Kopplung von PEG soll zum ersten Test an nativen Zellen und Rinderserumalbumin durchgeführt werden. Mit einem spezifischen Antikörper und einer modifizierten Proteinfärbung nach elektrophoretischer Trennung soll die erfolgreiche Kopplung verifiziert und anschließend auf die Modifikation eines monoklonalen Antikörpers zur Erkennung des extrazellulär exprimierten EGF-Rezeptors übertragen werden. Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 4–124 schematisch dargestellt.

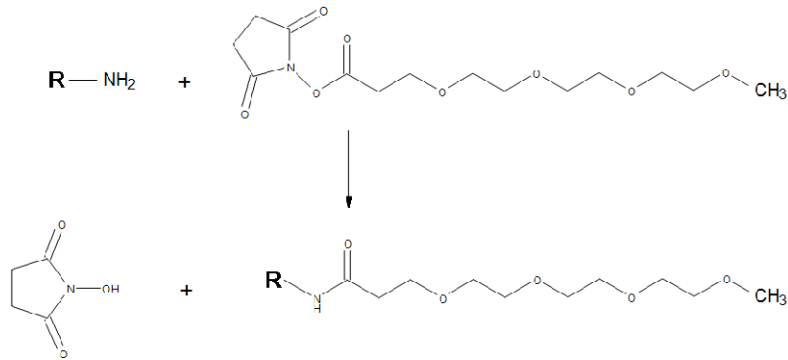


Abbildung 4–124: Schematische Darstellung der PEGylierung eines Moleküls mittels N-Hydroxysuccimid (NHS) Ester-Aktivierung:

Die PEGylierung des Moleküls R, welches eine aminoterminaler Gruppe trägt, führt zu einem acylierten Produkt und der NHS-Abgangsgruppe.

4.9.1 PEGylierung von PC12-Zellen zur Funktionsüberprüfung der Reaktion und Überprüfung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers zur Detektion.

Mit Paraformaldehyd fixierte Zellen wurden für einen Zeitraum von einer Stunde mit NHS-PEG inkubiert und anschließend immunzytochemisch unter Verwendung des Antikörpers anti-PEG-47, welcher die Methoxygruppe des Polymers detektiert, untersucht. Es konnte bei Verwendung der Konzentrationen 1:25, 1:50 und 1:100 kein semiquantitativer Unterschied in der Stärke bemerkt werden. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in Abbildung 4–125 zeigt die membranständige Lokalisation des Antikörpers.

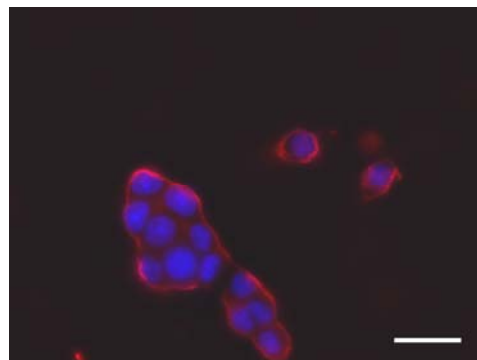


Abbildung 4–125: Nachweis der PEGylierung von PC12 Zellen mittels immunzytochemischer Markierung:

Der spezifische polyklonale Antikörper anti-PEG-47 wurde für die Detektion der PEGylierung von PC12-Zellen verwendet. Erkennbar ist die membranständige Lokalisation des Epitops. Die sekundäre Antikörperkontrolle war bei gleicher Expositionszeit negativ. Farbnachweis: Rot: anti-PEG-47, Blau: Hoechst Dye 33342. Maßstab: 25 μm .

4.9.2 Konzentrationsabhängige PEGylierung von Rinderserumalbumin

Zur Quantifizierung der Reaktion wurde Rinderserumalbumin (Fraktion V) PEGyliert und nach elektrophoretischer Trennung in einem 15 % SDS-Gel mittels einer Zink-Imidazol-Proteinfärbung visualisiert (Abbildung 4–126).

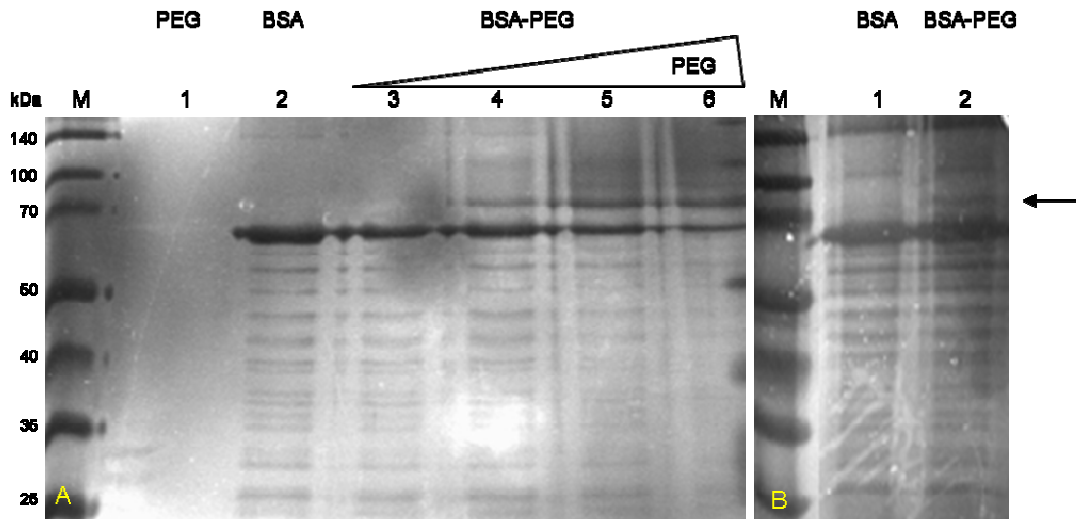


Abbildung 4–126: Proteinbiochemischer Nachweis der PEGylierung mittels Zink-Imidazol-Färbung:

In einer einstündigen Kopplungsreaktion wurden unterschiedliche Mengen des Polymers mit 1 mg Rinderserumalbumin inkubiert und das Protein auf einem 15 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (A). Als Kontrolle für die nachfolgende Detektion dient unkonjugiertes PEG (Spur 1) und ebenfalls unkonjugiertes BSA (Spur 2). Die ansteigenden PEG-Konzentrationen sind: 0,1 mg (Spur 3), 1 mg (Spur 4), 5 mg (Spur 5) und 10 mg (Spur 6). Die aufgetragenen Proteinmengen betragen 1 µg/Spur.

Zur besseren Visualisierung der kleinsten PEG-Konzentration von 0,1 mg wurden in einer weiteren Gelelektrophorese je 2,5 µg des unkonjugierten und konjugierten Rinderserumalbumins aufgetragen (B, Spur 1 und Spur 2).

Ungebundenes PEG konnte durch die Zink-Imidazol-Färbung nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4–126 A, Spur 1). Natives BSA weist nach der Elektrophorese eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 68 kDa auf (Abbildung 4–126 A, Spur 2). Durch die kovalente Modifikation mit dem Polymer wird bei etwa 70 kDa eine Bande sichtbar, deren Färbung sich konzentrationsabhängig verstärkt (Abbildung 4–126 A, Spur 3-5 und Pfeil). Die maximale Stärke wird bei der Konzentration von 5 mg PEG erreicht und wird bei der Kopplung von 10 mg PEG nicht intensiver (Abbildung 4–126 A, Spur 6). Um eine erfolgreiche Bindung bei der kleinsten verwendeten PEG-Konzentration von 0,1 mg nachzuweisen, wurde die aufgetragene Gesamtproteinmenge auf 2,5 µg erhöht (Abbildung 4–126 B, Spur 1 und 2). Unter diesen Bedingungen wird die Bande des PEGylierten Albumins bei 68 kDa sichtbar.

4.9.3 PEGylierung des monoklonalen Antikörpers 151-IgG (anti-EGF-Rezeptor)

Die PEGylierung des anti-EGFR-Antikörpers, der aus der serumfreien Hybridomzellkultur isoliert und gereinigt wurde, wurde im Konzentrationsverhältnis PEG : 151-IgG 1:1 durchgeführt (Abbildung 4–127).

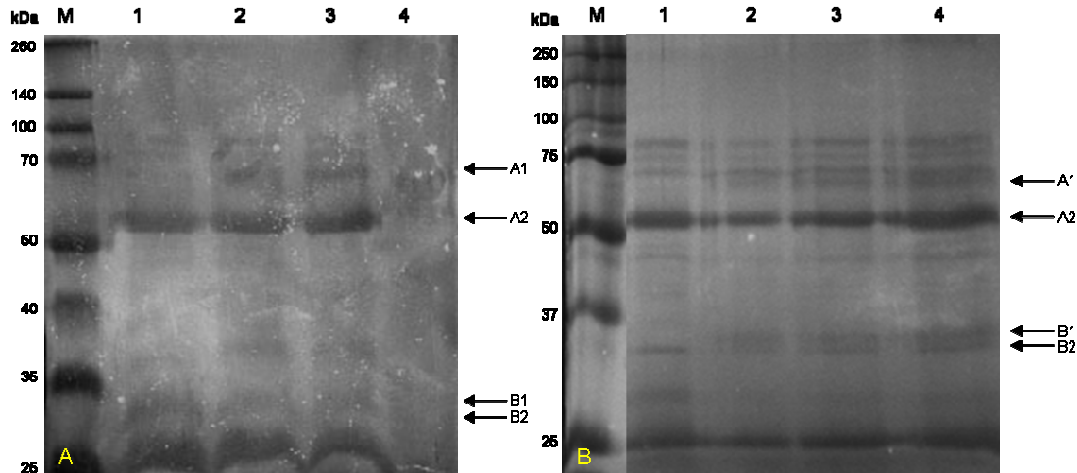


Abbildung 4–127: PEGylierung des monoklonalen Antikörpers 151-IgG und Verifizierung nach SDS-PAGE mit der Zink-Imidazol-Färbung:

Zwei Banden bei 26 kDa und 56 kDa repräsentieren die leichte- und schwere Kette des nativen Antikörpers (A, Pfeile A2 und B2, Spur 1) Bei dem 151-IgG-PEG-Konjugat wird eine zusätzliche Bande bei 35 kDa und 68 kDa deutlich (A, Pfeile A1 und B1, Spur 2), die nach einer zusätzlichen Reinigung stärker erkennbar wurden (A, Pfeile A1 und B1, Spur 3). Unkonjugiertes PEG konnte nicht detektiert werden (A, Spur 4). Aufgetragen wurden 5 µg Gesamtprotein/Spur. Zur Verdeutlichung wurden verschiedene Konzentrationen des PEG konjugierten Antikörpers eingesetzt (B, Spur 1-4). Dabei wurden aufgetragen: Spur 1: 2,5 µg unkonjugiertes 151-IgG, Spur 2: 1 µg 151-IgG-PEG, Spur 3: 2,5 µg 151-IgG-PEG, Spur 4: 5 µg 151-IgG-PEG.

Durch die PEGylierung wird bei der schweren Kette des Antikörpers eine zusätzliche Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 68 kDa sichtbar (Abbildung 4–127 A, Spur 2, Pfeil A1), die in der Kontrolle (Abbildung 4–127 A, Spur 1) nicht erkennbar war. Nach einer zusätzlichen Reinigung mit einer Entsalzungssäule konnte diese Bande deutlicher identifiziert werden (Abbildung 4–127 A, Spur 3). Eine Veränderung an der leichten Kette des Antikörpers, die ein Molekulargewicht von etwa 26 kDa aufweist, konnte in diesem Versuch nicht beobachtet werden (Abbildung 4–127 A, Spuren 2 und 3). In einem Wiederholungsversuch konnte bei dem PEGylierten Antikörper neben der Bande bei 68 kDa (Abbildung 4–127 B, Spuren 2-4, Pfeil A1 und A2) auch eine zusätzliche Bande bei der leichten Kette des Antikörpers identifiziert werden (Abbildung 4–127 B, Spuren 2-4, Pfeil B1 und B2). Beide Banden treten nicht bei dem unkonjugierten Antikörper auf (Abbildung 4–127 B, Spur 1). Die Intensität nimmt mit der aufgetragenen Gesamtproteinmenge des konjugierten Antikörpers zu. Unkonjugiertes PEG konnte nicht detektiert werden (Abbildung 4–127 A, Spur 4).

4.9.4 Immunzytochemische Detektion der konjugierten Makromoleküle nach einer Lebendzellinkubation

Um zu überprüfen ob eine effektive Bindung des konjugierten Antikörpers an lebende Zellen erfolgen kann, wurden PC12-Zellen für eine Stunde mit dem PEGylierten Antikörper 151-IgG inkubiert und anschließend immunzytochemisch untersucht. Zur Kontrolle der Reaktion wurde PEGyliertes BSA, sowie freies PEG verwendet. Es konnte unter den lebenden Bedingungen eine spezifische Detektion des PEG durchgeführt werden (Abbildung 4–128).

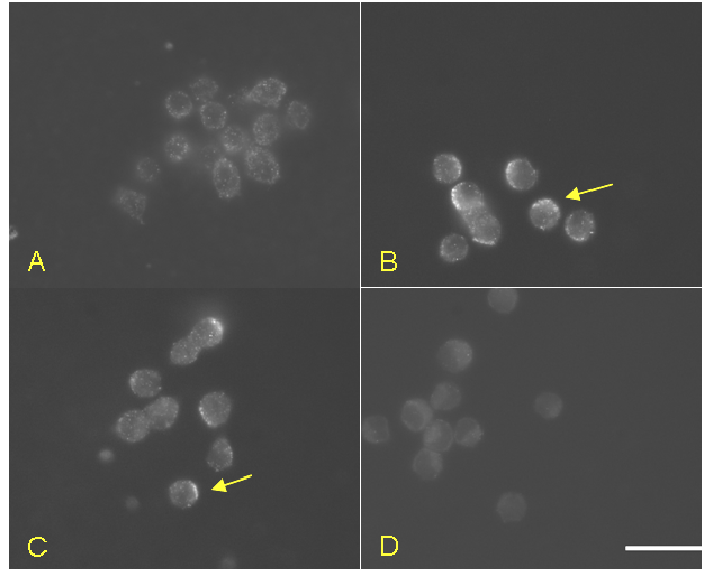


Abbildung 4–128: Immunzytochemische Detektion des PEGylierten Antikörpers 151-IgG und BSA-PEG nach Lebendzellinkubation:

PC12-Zellen wurden für den Zeitraum von 1 h mit freiem PEG (A), PEGyliertem BSA (B), dem PEGylierten Antikörper 151-IgG (C) und als Kontrolle mit unkonjugiertem BSA (D) inkubiert und immunzytochemisch mit dem polyklonalen Antikörper anti-PEG-47 untersucht. Es konnte eine spezifische Immunreaktion bei beiden PEGylierten Proteinen und bei der Inkubation mit freiem PEG beobachtet werden (A, B, C). Die Expositionszeiten bei der Aufnahme betragen: A, B: 1 s, C, D: 2 s. Maßstab: 20 μm .

Bei der Inkubation mit freiem PEG findet sich eher eine gleichmäßige Verteilung entlang der Zelloberfläche, (Abbildung 4–128 A) wohingegen bei der Inkubation mit PEGyliertem BSA und IgG-151 eine lokale Anhäufung zu beobachten ist (Abbildung 4–128 B und C).

4.10 Neurale Differenzierung der embryonalen Stammzelllinie CGR8

4.10.1 Proliferations- und Differenzierungsbedingungen

Die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der murinen pluripotenten Stammzelllinie sollte untersucht werden. Durch die Anwendung und Modifikation publizierter Protokolle soll die neurale Differenzierung eingeleitet werden und die Expression von Kohlenhydrat-epitopen der Laktoserie II untersucht werden. Durch die Produktion und Kopplung von Antikörpern kann somit die Verwendung dieser Epitope zu MRT-Bildgebungszwecken genutzt werden.

4.10.2 Kultivierung der Zelllinie CGR8 im undifferenzierten Zustand

4.10.2.1 Immunzytochemische Analyse der Expression von Differenzierungs-markern

Die CGR8-Zellen wurden initial in einem DMEM-Medium mit Zusatz von 10 % FCS und Leukämie Inhibitionsfaktor (LIF), welches vor Beginn der Kultivierung auf die Unterstützung des Wachstums von ES-Zellen getestet wurde, auf einer gelatinebeschichteten Kulturschale kultiviert. Eine Umstellung auf *knockout* DMEM, supplementiert mit 10 % KSR und LIF fand vor Beginn der Differenzierungsexperimente statt. Bezugnehmend auf die Etablierung von Protokollen für die Differenzierung in neurale Vorläuferstadien und spätere neuronale und astrogliale Subtypen wurde als Referenzmodell die murine Stammzelllinie D3 kultiviert. Der in dieser Arbeit verwendete Klon weist eine Expression von GFP unter Kontrolle des β -Aktin Promotors auf. Es konnte durch die Verwendung des vollen synthetischen Mediums eine gute Proliferation beider Zelllinien dokumentiert werden. Mit der D3-Zelllinie konnte erfolgreich die Differenzierungsfähigkeit in spontan aktive Kardiomyozyten überprüft werden (nicht gezeigt).

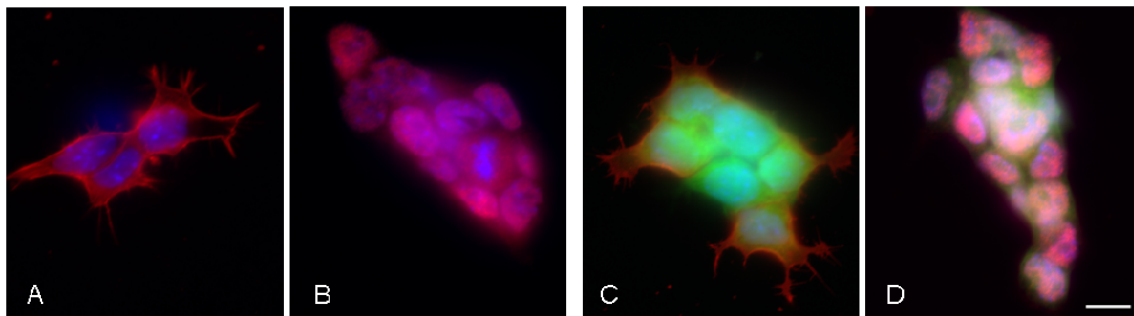


Abbildung 4-129: Expression von CD15 und Oct 3/4 bei CGR8- und D3-ES-Zellen:

Unter proliferativen Bedingungen konnte bei der embryonalen Stammzelllinie CGR8 eine Expression des Kohlenhydrat-epitops CD15 (A) und des Transkriptionsfaktors Oct 3/4 (B) nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie D3^{GFP} konnte ebenfalls CD15 (C) und Oct 3/4 (D) zusammen mit GFP identifiziert werden. Farbnachweis: A, C: rot: CD15; B, D: rot: Oct 3/4; C, D: grün: GFP; Kernfärbung mit Hoechst Dye 33342. Maßstab: 10 μ m.

Die Expression des Transkriptionsfaktors Oct 3/4 und des Karbohydratepitops SSEA-1 (Synonym CD15) wurde im undifferenzierten Stadium unter dem Einfluss von LIF mit immunzytochemischen Methoden untersucht (Abbildung 4–129).

Die CGR8 ES-Zellen bildeten kleine mehrzellige Inseln aus, die deutlich CD15⁺ waren. Die CD15 Expression konnte exklusiv zellmembranassoziiert gefunden werden (Abbildung 4–129 A). Der Transkriptionsfaktor Oct 3/4 war innerhalb des Zellkerns lokalisiert (Abbildung 4–129 B). Bei den D3^{GFP}-Zellen wurde ein identisches Expressionsmuster gefunden (Abbildung 4–129 C und D). Die Expression des Intermediärfilaments Nestin, der neuronal exprimierten Proteine Doublecortin, alpha-Internexin und β 3-Tubulin, des astrozytär exprimierten Proteins GFAP wurden innerhalb der Experimente untersucht. Keines der Proteine konnte detektiert werden.

4.10.2.2 RT-PCR-Analyse der ES-Zellen im undifferenzierten Zustand

Die Expression verschiedener mRNAs, die Schlüsselrollen bei der Klassifizierung der Differenzierungszustände der embryonalen Stammzellen spielen, wurden nach Isolation und cDNA-Synthese untersucht (Abbildung 4–130). Es konnten die Transkripte für den Transkriptionsfaktor Oct 4 (Spur 2) und das saure Zinkfinger-Protein Rex-1 (Spur 3) nachgewiesen werden. Keine Transkripte ergaben die Amplifikate für das N-glykosylierte Transmembranprotein 5T4 (Spur 4), den Wachstumsfaktor FGF-5 (Spur 5), Zeta-Globin (Spur 6), den Wachstumsfaktor BMP-1 (Spur 7), das Intermediärfilament Nestin (Spur 8), Prominin-1 (Spur 9), Musashi-1 (Spur 10) und den astroglialen Marker GFAP (Spur 11). Zusätzlich wurde Aktin als interne Kontrolle amplifiziert (Spur 1). Die erwarteten Fragmentlängen sind dem Anhang II zu entnehmen.

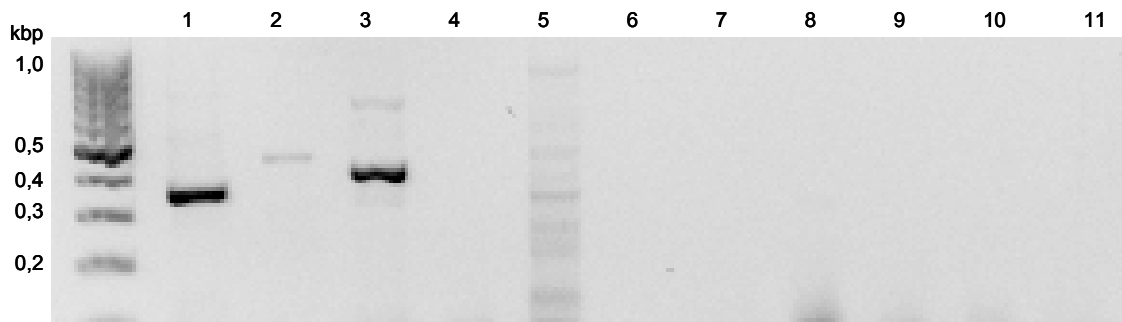


Abbildung 4–130: RT-PCR-Analyse von Markertranskripten der ES-Zellen im undifferenzierten Zustand:

Aus embryonalen Stammzellen, die kontinuierlich in Gegenwart von LIF kultiviert wurden, wurde die Gesamt-RNA isoliert und nach cDNA-Synthese mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Aufgetragen sind: Spur 1: Aktin, Spur 2: Oct 4, Spur 3: Rex-1; Spur 4: 5T4; Spur 5: FGF-5; Spur 6: Zeta-Globin; Spur 7: Bmp-1; Spur 8: Nestin; Spur 9: Prominin-1; Spur 10: Musashi-1; Spur 11: GFAP.

4.10.3 Induktion der neuralen Differenzierung

4.10.3.1 Entwicklung eines neuralen Differenzierungsprotokolls und Charakterisierung der Zellen

Zur Induktion der neuralen Differenzierung wurden die Zellen in dem Medium N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal für einen Zeitraum von 5 oder 7 Tagen kultiviert, was zu einer Abnahme der Proliferation und morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den proliferativen Kulturbedingungen führte. Die epitheliale Morphologie der undifferenzierten ES-Zellen (Abbildung 4–131 A) nahm ab und es konnte phasenkontrastmikroskopisch hellleuchtende, bipolare Zellen mit einer runden Morphologie beobachtet werden (Abbildung 4–131 B).

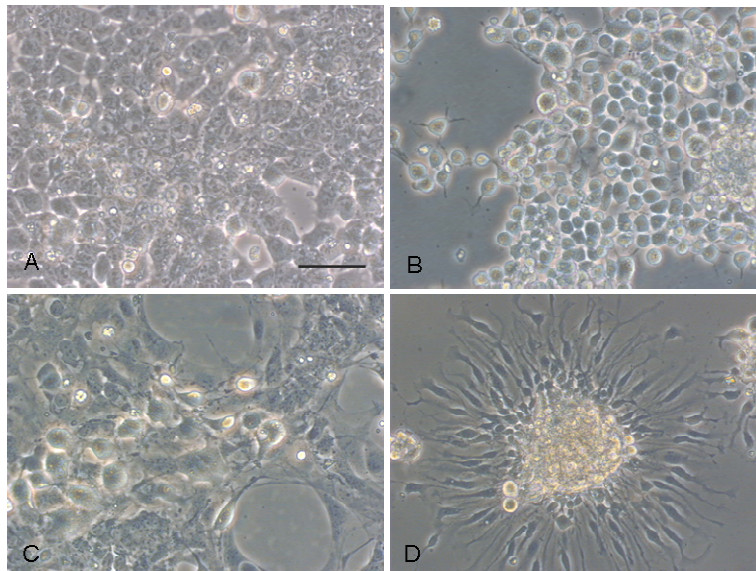


Abbildung 4–131: Phasenkontrastmikroskopische Dokumentation nach Einleitung der neuralen Differenzierung:

Embryonale Stammzellen der Linie CGR8 wurden nach Kultivierung in undifferenzierten Zustand (A) für 7 d in dem Medium N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal kultiviert, was zu einer deutlichen morphologischen Veränderung führte (B). Eine anschließende Kultivierung in 10 % KSR-Medium ohne Zusatz weitere Wachstumsfaktoren führte zu einer heterogenen Zellpopulation (C), die nach weiterer Kultivierung auf Laminin beschichteter Oberfläche zur Ausbildung von Zellen mit neuronalen Strukturen führte (D).

Eine anschließende Kultivierung in 10 % KSR Medium führte zu einer erneuten Abflachung der Zellen und teilweise auch zu einem Verlust der Adhäsionseigenschaften (Abbildung 4–131 C). Eine anschließende Kultivierung der Zellen auf einer Laminin beschichteten Oberfläche führte zur Migration von Zellen, die eine neuronale Morphologie aufwiesen (Abbildung 4–131 D). Zur Kontrolle des Differenzierungsprotokolls wurden Kulturen für den gesamten Zeitraum in 10 % KSR Medium, ohne den Differenzierungsschritt durch Verwendung des Mediums N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal, kultiviert. Zusätzlich wurden die Differenzierungs-experimente mit der ES-Zelllinie D3^{GFP} durchgeführt. Die

immunzytochemische Analyse nach Plattierung auf Laminin zeigte nach Inkubation mit dem anti-Nestin Antikörper unter beiden Differenzierungsbedingungen bei den beiden ES-Zelllinien die Ausbildung von Nestin⁺-Zellen (Abbildung 4–132 A1, B1, C1).

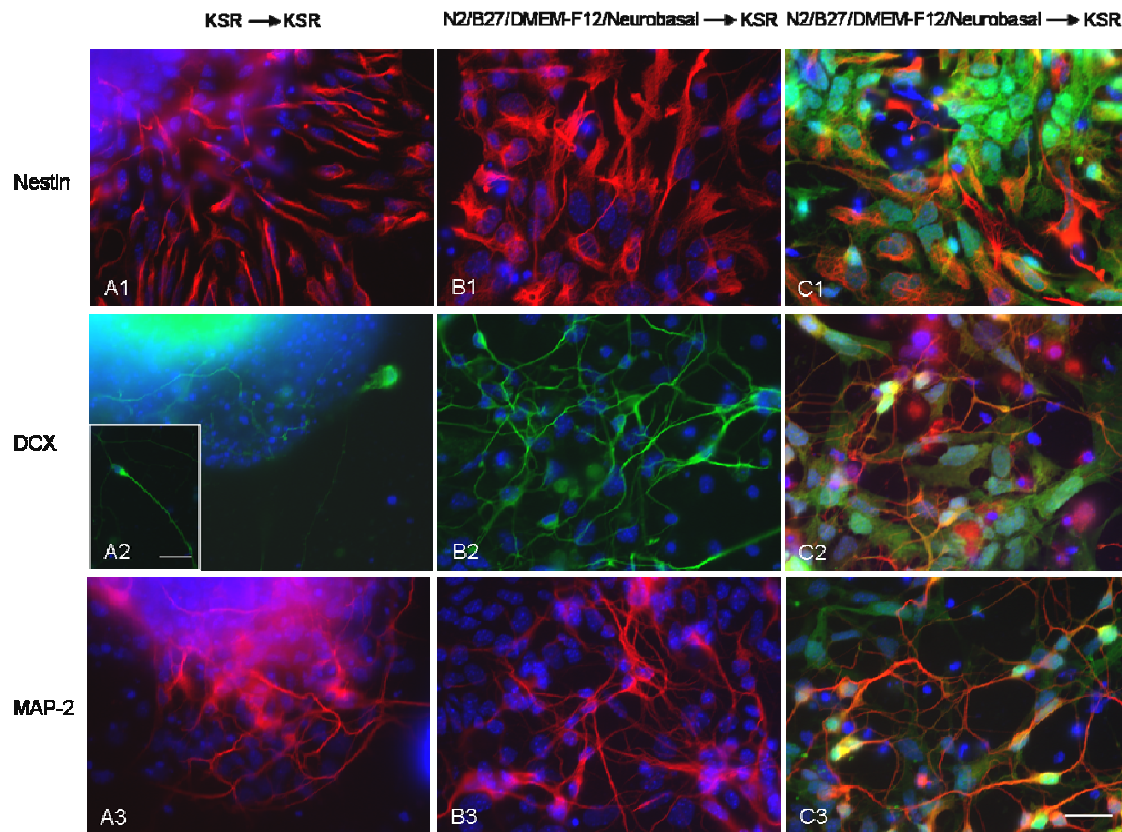


Abbildung 4–132: Immunzytochemische Analyse der ES-Zelllinien nach neuraler Induktion: Zellen der ES-Zelllinie CGR8 wurden nach der Initiierung der neuralen Differenzierung entweder durch die Medienkombination KSR→KSR (A1-A3) oder N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal→KSR (B1-B3) immunzytochemisch untersucht. Zur Kontrolle der Verwendbarkeit dieses Differenzierungsprotokolls wurde zusätzlich die Zelllinie D3^{GFP} mittels N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal→KSR differenziert (C1-C3). Die Inkubation mit dem anti-Nestin-Antikörper zeigt bei allen drei Proben die zelluläre Expression des Proteins (A1, B1, C1). Wenige DCX⁺-Zellen konnten nach Verwendung der Medienkombination KSR→KSR identifiziert werden (A2 und Kasten in A2). Deutlich mehr DCX⁺-Zellen, die Neuritennetzwerke ausbildeten konnten durch Verwendung des zweiten Differenzierungsmediums lokalisiert werden (B2, C2). Ein ähnliches Expressionsmuster konnte bei Beurteilung der MAP-2⁺-Zellen gefunden werden (A3, B3, C3). Die Zellkerne wurden durch Inkubation mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Maßstab: 25 µm.

Unter den Kulturbedingungen KSR→KSR konnte eine schwache Expression des Doublecortinproteins nachgewiesen werden (Abbildung 4–132 A2). Die DCX⁺-Zellen zeigen eine isolierte Lokalisation in der Nachbarschaft zu größeren Aggregaten und wiesen eine bipolare Morphologie mit langen Neuriten auf (Kasten in Abbildung 4–132 A2). Zudem fiel eine prozentual häufige Anzahl von fragmentierten Zellkernen auf. Bei der Verwendung des N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal Mediums und der zusätzlichen Kultivierung in 10 % KSR-Medium konnte bei den CGR8-Zellen eine deutliche DCX-Expression in vielen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4–132 B2). Diese Zellen zeigten eine Interkonnektivität

und waren gleichmäßig in den Präparaten verteilt. Die gleiche Beobachtung konnte bei den D3^{GFP}-Zellen gemacht werden (Abbildung 4–132 C2). Zudem konnte eine Koexpression von DCX und GFP nachgewiesen werden. Der Anteil von MAP2⁺-Zellen in dem KSR→KSR-Ansatz war höher, als bei der Anzahl von Doublecortin-exprimierenden Zellen und nicht nur auf bipolare Zellen beschränkt (Abbildung 4–132 A3). Bei dem kombinierten Differenzierungsprotokoll N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal→KSR konnte ebenfalls ein hoher Anteil von MAP2⁺-Zellen nachgewiesen werden, die bei Verwendung der D3^{GFP}-Zellen auch eine Kolokalisation beider Proteine zeigten (Abbildung 4–132 B2 und C3). Eine detaillierte Untersuchung der Expression von GFP unter Kontrolle des β -Aktin-Promotors zeigte in vielen differenzierten D3-Zellen eine Koexpression von GFP und Nestin (Abbildung 4–133 A).

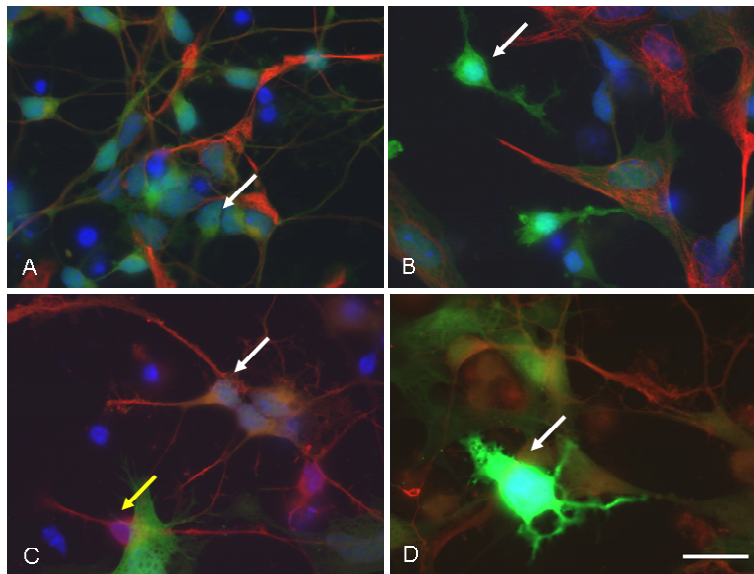


Abbildung 4–133: Detaillierte Untersuchung der Aktivität des β -Aktin Promotors unter Differenzierungsbedingungen der D3^{GFP}-ES-Zellen:

Unter den Differenzierungsbedingungen N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal→KSR differenzierte D3^{GFP} Zellen zeigen eine deutliche Koexpression von GFP und Nestin in dem größten Teil der Zellen mit neuronaler Morphologie (Pfeil in A). Die stark GFP⁺-Zellen weisen keine Koexpression auf (Pfeil in B). Bei der Untersuchung der DCX-Expression wurde eine Koexpression in dem größten Teil der Zellen mit neuronaler Morphologie gefunden (weißer Pfeil in C). Eine sehr schwache somatische GFP-Expression konnte in einer Subpopulation von DCX⁺-Zellen nachgewiesen werden, die in den Neuriten kaum mehr beobachtbar war (gelber Pfeil in C). Die stark GFP⁺-Zellen weisen keine DCX-Expression auf (Pfeil in D). Farbnachweis: A, B: rot: Nestin; C, D: rot: Doublecortin; A, B, C, D: grün: GFP, blau: Hoechst Dye33342. Maßstab: 20 μ m.

Bei den GFP und Nestin koexprimierenden Zellen mit neuronaler Morphologie (Pfeil in Abbildung 4–133 A) war die Intensität der Färbung im Vergleich mit GFP⁺- und Nestin⁻-Zellen (Pfeil in Abbildung 4–133 B) schwach ausgeprägt.

Bei der Analyse der Doublecortinexpression wurden Zellen mit deutlicher DCX- und GFP-Expression gefunden, die interneuronale Verbindungen ausgebildet haben (weißer Pfeil in Abbildung 4–133 C). Es wurden allerdings auch DCX⁺-Zellen identifiziert, die keine Expression von GFP aufwiesen (gelber Pfeil in Abbildung 4–133 C). Bei stark GFP⁺-Zellen konnte die Expression von Doublecortin nicht beobachtet werden (Abbildung 4–133 D).

4.10.3.2 Charakterisierung der Expression von Karbohydraten der Laktoserie II

Die Expression der Karbohydrate der Laktoserie II im embryonalen Stammzellstadium und nach der Differenzierung mit dem kombinierten Differenzierungsprotokoll N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal→KSR.

Die Untersuchungen wurden immunzytochemisch mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern, die gegen die terminalen Oligosaccharide gerichtet waren, angefertigt. Im Detail wurden die nicht derivatisierte Form A2B5, die fukosylierte Form CD15 und sulfatierte und glukoronylierte Form HNK-1 untersucht.

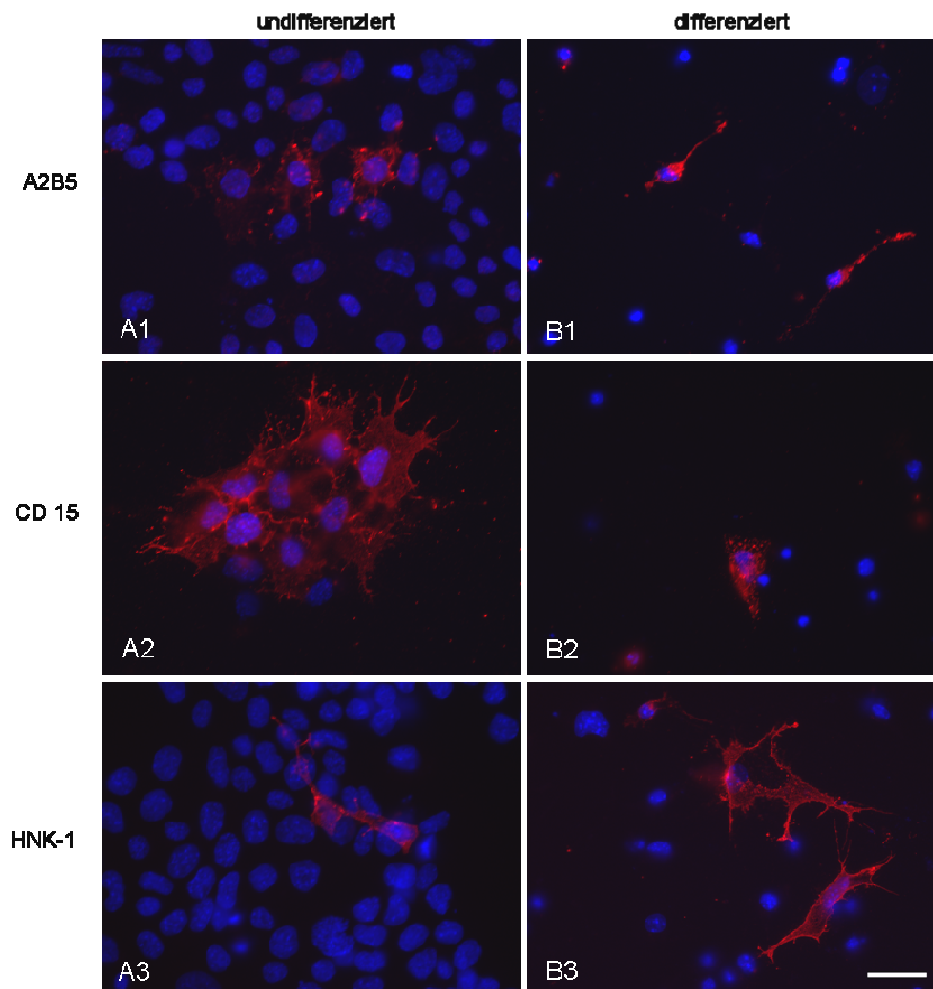


Abbildung 4–134: Expression von A2B5, CD15 und HNK-1 im undifferenzierten Zustand und nach neuraler Differenzierung:

Unter proliferativen Bedingungen im undifferenzierten Zustand konnte eine Minderheit der gesamten ES-Zellpopulation als A2B5⁺ identifiziert werden (A1). Nach der neuralen Induktion fand eine morphologische Veränderung statt und der Anteil von A2B5⁺-Zellen erhöhte sich (B1). Bei etwa 80 % der undifferenzierten Stammzellen konnte die Expression von CD15 nachgewiesen werden (A2). Eine Abnahme der CD15⁺ Zellen konnte unter Differenzierungsbedingungen dokumentiert werden (B2). Im undifferenzierten Stadium konnten < 1 % HNK-1⁺-Zellen identifiziert werden (A3). Nach Verwendung des kombinierten Differenzierungsprotokolls stieg der Anteil der HNK-1 exprimierenden Zellen an und es konnten morphologische Veränderungen beobachtet werden (B3). Anzahl unabhängiger Stichproben: undifferenzierte Bedingungen: n = 2. Differenzierte Bedingungen: n = 1. Maßstab: 25 µm.

Unter proliferativen Bedingungen konnte eine Expression von A2B5 nachgewiesen werden (Abbildung 4–134 A1). Die Zellen zeichneten sich durch eine verzweigte und vielgestaltige Morphologie und eine zellmembranassoziierte Lokalisation des Kohlenhydratepitops aus. Die CD15 Expression beschränkte sich ebenfalls auf eine membranassoziierte Lokalisation (Abbildung 4–134 A2). etwa 80 % der embryonalen Stammzellen waren CD15⁺.

Der Anteil an HNK-1⁺ Zellen konnte auf < 1 % der gesamten Population bestimmt werden (Abbildung 4–134 A3). Nach Einleitung der neuralen Induktion mit dem kombinierten Differenzierungsprotokoll wurde ein Anstieg der A2B5⁺ Zellen und eine morphologische Veränderung beobachtet (Abbildung 4–134 B1). Während unter den undifferenzierten Kulturbedingungen A2B5⁺-Zellen mit einem großen Zellkerndurchmesser vorkamen, konnte unter den Differenzierungsbedingungen unter anderem kleine, bipolare Zellen mit kleinem Soma und Nukleus identifiziert werden. Der Anteil der CD15⁺-Zellen nahm deutlich unter den Differenzierungsbedingungen ab. Die stark CD15 exprimierenden Zellen konnten auf < 10 % bestimmt werden, wobei die Zellen ebenfalls stark von der Morphologie unter undifferenzierten Bedingungen abwichen (Abbildung 4–134 B2).

Der Anteil der HNK-1⁺-Zellen nahm unter den Differenzierungsbedingungen stark zu und wurde auf etwa 40 % bestimmt (Abbildung 4–134 B3). Die Zellen weisen keine einheitlichen morphologischen Charakteristika auf.

Es wurde ein weit verzweigtes Fortsatzsystem und interzytoplasmatisches Netzwerk beobachtet, das sich um einen zentral lokalisierten Zellkern organisierte. Drei dominant vorkommende morphologische HNK-1⁺-Zelltypen wurden in hoher mikroskopischer Vergrößerung in Abbildung 4–135 dargestellt. Es wurden weit verzweigte Zelltypen gefunden, die ein kleines Soma und lange, neuritenartige Fortsätze aufweisen (Abbildung 4–135 A). Ein anderer prominenter Zelltyp wurde in Abbildung 4–135 B dargestellt, der einen kleinen Zellkern mit weit ausgebreiteten Zytoplasmafortsätzen und ausgesparten Bereichen zeigt. Zellen mit großem Durchmesser des Zellkerns und des Somas, wurden in der Minderheit der HNK-1⁺-Population identifiziert (Abbildung 4–135 C).

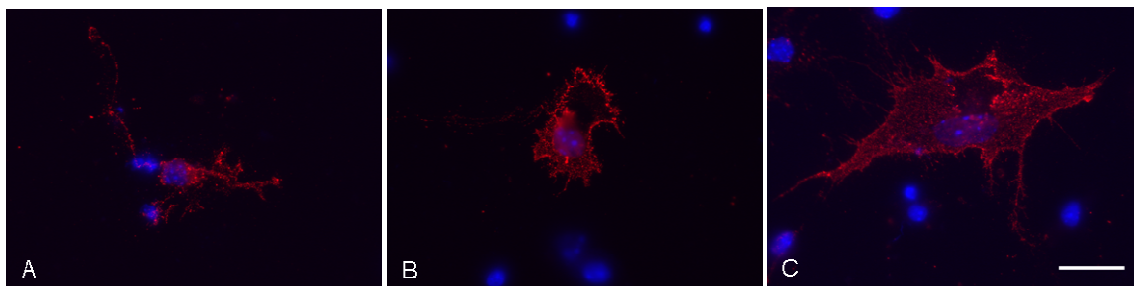


Abbildung 4–135: Detaillierte Analyse der HNK-1-Expression nach neuraler Differenzierung: Drei verschiedene, in den differenzierten Zellkulturen beobachtete HNK-1⁺-Zelltypen (rot) wurden identifiziert. Hoechst Dye 33342 (blau). Maßstab: 20 µm.

4.10.4 Differenzierung der ES-Zelllinie CGR8 im Suspensionsmodell

Um eine direkte Differenzierung ohne den Umweg über die Etablierung einer proliferativen neuronalen Vorläuferzelllinie zu erreichen, wurden die undifferenzierten ES-Zellen in einem spontanen Aggregationsansatz differenziert (Abbildung 4–136). Nach einer siebentägigen Differenzierung in 10 % KSR in Suspension wurde eine Differenzierung mit der Mediumkomposition ITSFn parallel zur Differenzierung in KSR untersucht (Abbildung 4–137).

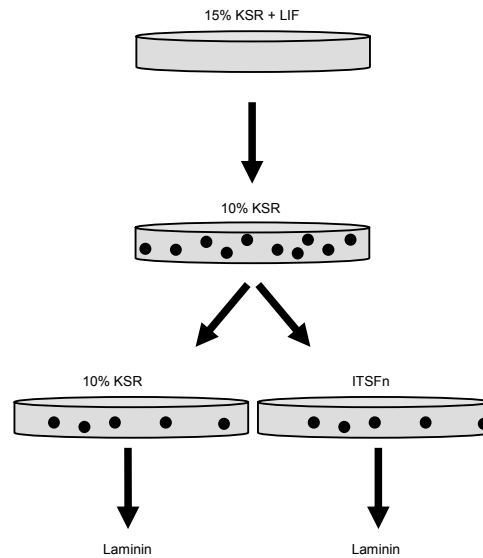


Abbildung 4–136: Schematische Übersicht über die Differenzierungsbedingungen in Suspension:

Nach der initialen Kultivierung unter proliferativen Bedingungen wurden die Zellen für 7 Tage im Suspensionsmodell ohne die Zugabe von LIF kultiviert und anschließend auf bakteriologischen Schalen in den Medien KSR 10 % oder ITSFn kultiviert.

In den Wachstumsbedingungen 10 % KSR bildeten sich multizelluläre Aggregate, die im Kultivierungszeitraum Durchmesser von über 500 µm erreichen (Abbildung 4–137 A und B). Die Umstellung der Kultur auf das selektive Medium ITSFn wurde durchgeführt, um eine effizientere Einleitung der Neurogenese zu erreichen.

Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen bereits in den bakteriologischen Schalen in dem ITSFn-Medium auf der Oberfläche adhären und die Migration von einzelnen Zellen aus dem zentralen Aggregat (Abbildung 4–137 C), sowie komplexe Neuritogenese beobachtbar ist (Abbildung 4–137 D).

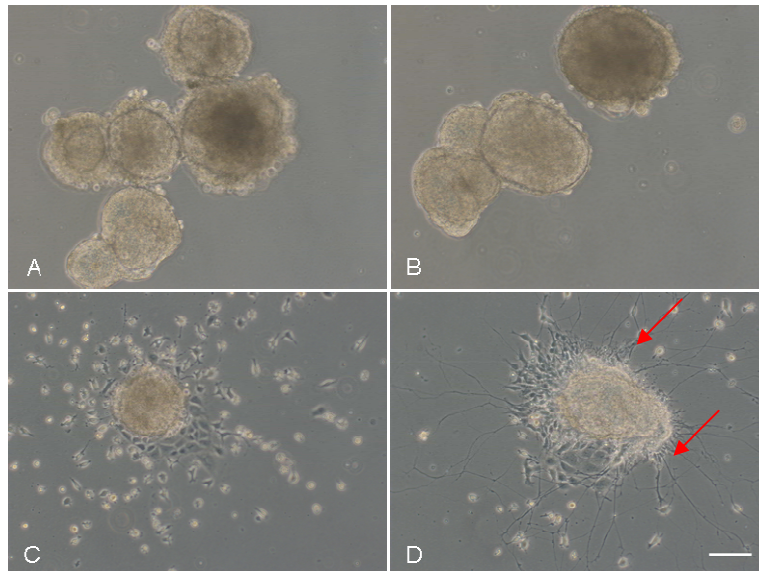


Abbildung 4–137: Differenzierung der ES-Zellen CGR8 im Suspensionsmodell:

Die Beobachtung mit dem Phasenkontrastmikroskop verdeutlicht den Unterschied der beiden Kultivierungsbedingungen KSR und ITSFn. Ohne Adhäsionseffekte proliferieren die multizellulären Aggregate in dem KSR Medium (A,B), während sich zwei Tage nach der Umstellung der Kultur auf das ITSFn Medium etwa 60 % der Aggregate auf der bakteriologischen Schale adhären und einzelne Zellen in die Umgebung migrieren (C), oder komplexes Neuritenwachstum erkennbar ist (Pfeile in D). Maßstab: 100 μm .

Die Aggregate wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf Fibronectin beschichteten Oberflächen ausplattiert.

Es konnte eine verzögerte Adhäsion bei den KSR- Aggregaten im Vergleich zu ITSFn auf der Laminin beschichteten Oberfläche beobachtet werden. Unter beiden Kultivierungsbedingungen fand eine Migration von Zellen und Neuriten in die Peripherie der Aggregate statt. Die Neuritogenese unter den Kulturbedingungen ITSFn konnte in einer Fotomontage (Abbildung 4–138) dokumentiert werden. Neuriten aus unterschiedlichen Aggregaten bilden intensive Verknüpfungen untereinander aus. Das Neuritengeflecht ist teilweise von äußerst komplexer Erscheinungsform.

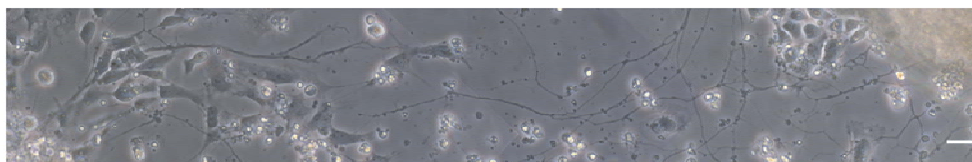


Abbildung 4–138: Visualisierung der Neuritogenese der differenzierten Aggregate:

Um die Neuritogenese zu verdeutlichen, wurde unter Differenzierungsbedingungen eine Rekonstruktion der Neuriten vorgenommen. Dargestellt sind zwei Aggregate mit in die Peripherie migrierten Zellen mit teilweise neuronaler Morphologie und langen Neuriten. Maßstab: 30 μm .

Unter beiden Kulturbedingungen konnte ein extensives Neuritenwachstum in die Peripherie der Aggregate zwei Tage nach der Plattierung dokumentiert werden (Abbildung 4–139 A und B). Durch eine immunzytochemische Analyse, die durchgeführt wurde, um die Expression des Doubleortinproteins nachzuweisen, konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen mit neuronaler Morphologie und die Neuriten DCX⁺ waren (Abbildung 4–139 C und D).

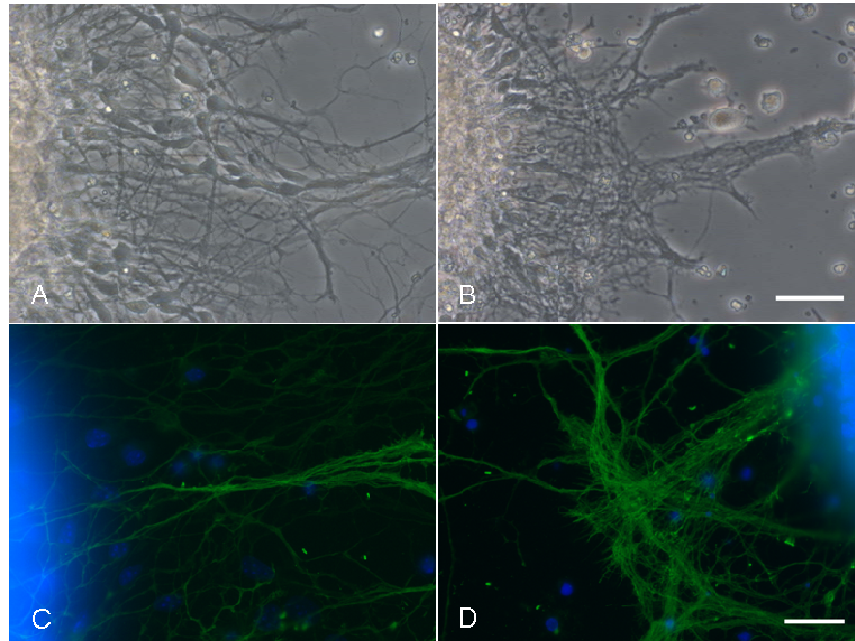


Abbildung 4–139: Differenzierung der multizellulären Aggregate:

Die Zellen wurden für 3 Tage in Suspension differenziert und beide Gruppen anschließend auf einer Laminin-Beschichtung für weitere zwei Tage in der Medienkomposition ITSFn kultiviert. Zwei Tage nach der Plattierung konnte bei den Kulturen, die in dem KSR-Medium (A) und in ITSFn-Medium (B) kultiviert wurden, ein Neuritenwachstum in die Aggregatperipherie beobachtet werden. Die immunzytochemische Analyse zum Nachweis des Doublecortin-Proteins bei den in KSR kultivierten Zellen (C) und bei den in ITSFn kultivierten Zellen (D) konnte die DCX-Expression nachweisen. Maßstab: A,B: 100 µm; C,D: 25 µm.

Eine detaillierte Analyse der Expression zur neuronalen und astroglialen Differenzierung wurde bei Aggregaten vorgenommen, die für sieben Tage in der Suspensionskultur mit KSR-Medium oder ITSFn kultiviert wurden. Die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen zeigten ein verstärktes Migrationsverhalten in die Aggregatperipherie sowohl bei den KSR-Bedingungen (Abbildung 4–140 A), als auch bei dem Medium ITSFn (Abbildung 4–140 B). Vier Tage nach der Plattierung konnte bei den Zellen aus dem KSR-Medium eine Ko-Expression von Doublecortin in den Zellen mit neuronaler Morphologie beobachtet werden (Abbildung 4–140 C). Daneben konnten größere Zellen identifiziert werden, die DCX⁻ waren und Nuklei mit großem Durchmesser aufwiesen (Pfeil in Abbildung 4–140 C). Es wurde ein stark ausgebildetes Netzwerk β 3-Tubulin⁺-Zellen identifiziert (Abbildung 4–140 D). Durch die Inkubation mit einem anti-GFAP-Antikörper konnten radiale und protoplasmatische Astrozyten identifiziert werden. Bei Kultivierung der Zellen in dem ITSFn-Medium wurden DCX⁺-Zellen identifiziert, die eine bipolare Morphologie aufwiesen (Pfeile in Abbildung 4–140

E). Die intrazelluläre Expression beider Proteine war nicht in allen Zellen identisch lokalisiert. Unter den ITSFn-Kultivierungsbedingungen konnten β 3-Tubulin⁺-Neurone und GFAP-positive Astrozyten identifiziert werden (Abbildung 4–140 F). Der Anteil der Astrozyten in der gesamten Population war geringer im Vergleich zu der Differenzierung mit 10 % KSR.

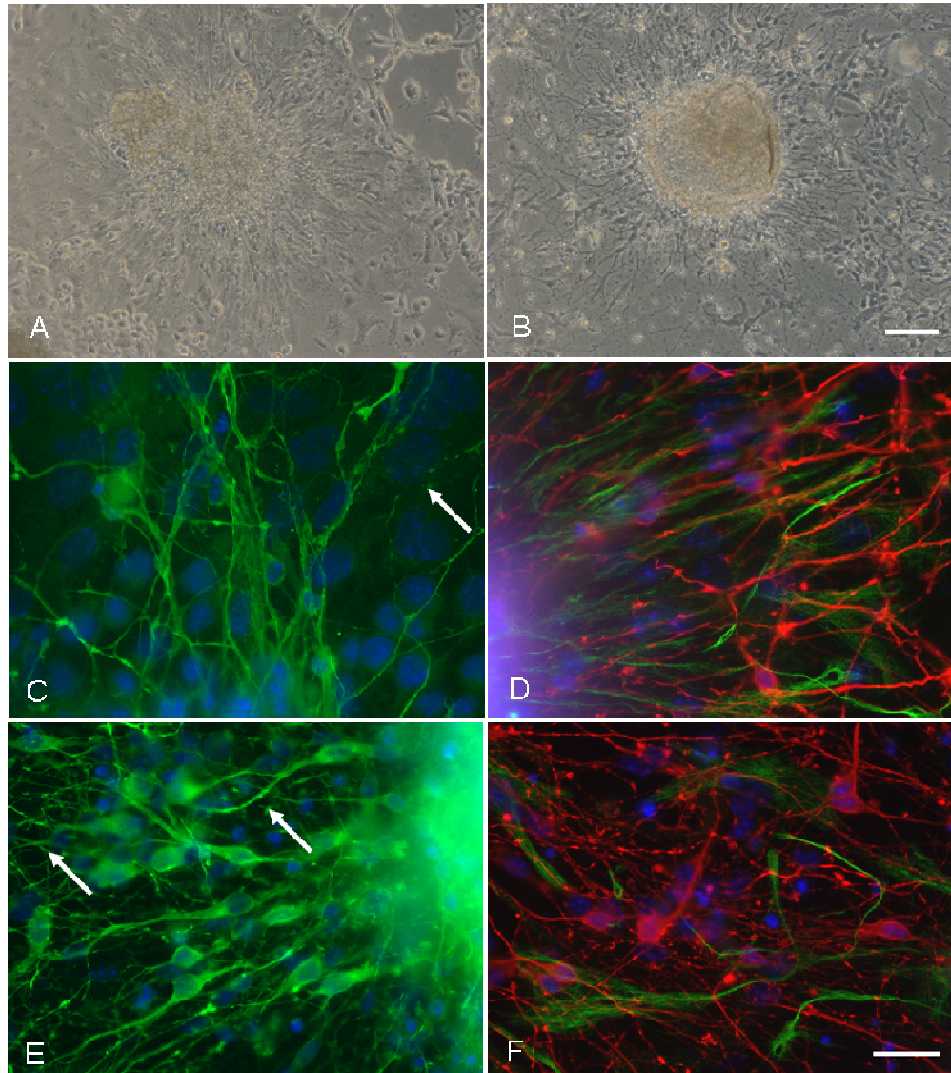


Abbildung 4–140: Immunzytochemische Analyse der differenzierten Aggregate:

Aggregate aus der KSR-Differenzierungskultur (A) und der ITSFn-Kultur (B) wurden auf mit Laminin beschichteten Oberflächen für 4 Tage in den entsprechenden Medien kultiviert. Die immunzytochemische Analyse zeigt unter den KSR-Kulturbedingungen das Vorhandensein von DCX⁺ Zellen, aber auch große Zellkerne, die auf nicht neuronalen Ursprung hinweisen (weißer Pfeil) (C). Es konnten weiterhin β 3-Tubulin⁺-Neurone und GFAP⁺-Astrozyten nachgewiesen werden (D). Bei den Differenzierungsbedingungen im ITSFn-Medium wurden DCX⁺-Zellen identifiziert (E). Dabei sind deutlich sehr feine- und dickere Neuriten identifizierbar (weiße Pfeile in E). β 3-Tubulin⁺-Neurone und GFAP⁺-Astrozyten konnten nachgewiesen werden (F). Farbnachweis: C, E: grün: DCX; D, F: grün: GFAP, rot: β 3-Tubulin. Zellkerne wurden durch Inkubation mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Maßstab: A, B: 100 μ m; E, F: 25 μ m.

4.10.5 Generierung einer stabilen neuronalen Vorläuferzelllinie aus den prädifferentiierten CGR8-Zellen

4.10.5.1 Entwicklung und Charakterisierung der Kulturbedingungen

Nach der initialen neuronalen Differenzierung mittels des kombinierten N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal→KSR Differenzierungsprotokolls wurden die Kulturen umgestellt auf die Mediumkomposition N2/Euro, woraus eine stabil proliferierende Kultur resultierte, die für einen Zeitraum von > 6 Monaten kultiviert werden konnte. Die Zellen weisen eine rasche Proliferation mit einer mittleren Generationsverdopplung im Abstand von 14 h auf und zeichnen sich durch eine schwach epitheliale Morphologie aus (Abbildung 4–141 A und B). Die Kulturen konnten adhären auf behandelten Kunststoffoberflächen in dem Medium N2/Euro unter Zusatz der Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF kultiviert werden.

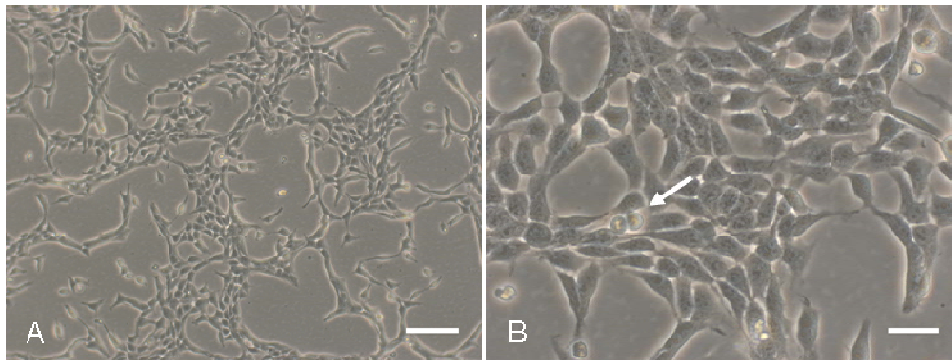


Abbildung 4–141: Kultur der neuronalen Vorläuferzellen N2/Euro #1:

Durch Kultivierung der neural prädifferentiierten embryonalen Stammzelllinie CGR8 in dem Medium N2/Euro und der Supplementierung der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 konnte eine stabile neurale Vorläuferzelllinie generiert werden. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf (A und höhere Vergrößerung in B).

4.10.5.2 Semiquantitative Analyse der Expression von Markerproteinen der neuronalen Vorläuferzelllinie

Ein mRNA-Expressionsprofil der Zelllinie N2/Euro #1 wurde nach Isolierung von RNA und anschließender cDNA-Synthese erstellt (Abbildung 4–142). Es konnten keine Transkripte des Transkriptionsfaktor Oct 3/4 (Spur 1), des sauren Zinkfinger-Protein Rex-1 (Spur 2), des Wachstumsfaktors FGF-5 (Spur 4), von Zeta-Globin (Spur 5), Musashi-1 (Spur 9) und vom astroglialen Marker GFAP (Spur 10) nachgewiesen werden. Transkripte für das N-glykosylierte Transmembranprotein 5T4 (Spur 3), den Wachstumsfaktor BMP-1 (Spur 6), das Intermediärfilament Nestin (Spur 7) und Prominin-1 (Spur 8) konnten mittels der RT-PCR detektiert werden. Zusätzlich wurde Aktin als interner Standard amplifiziert (Spur 11).

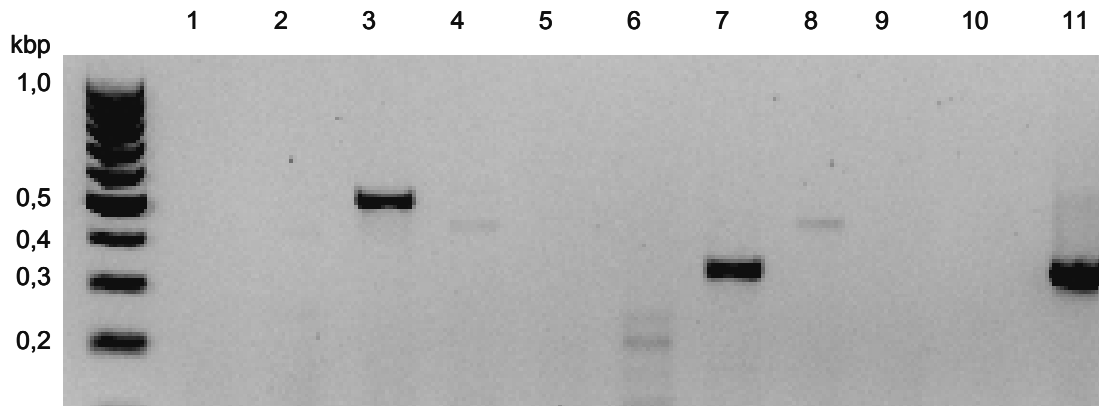


Abbildung 4–142: mRNA-Expressionsprofil der Zelllinie N2/Euro #1 unter proliferativen Bedingungen:

Aus der neuralen Vorläuferzelllinie N2/Euro #1, die unter proliferativen Bedingungen kultiviert wurde, wurde die Gesamt-RNA isoliert und nach cDNA-Synthese mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Aufgetragen wurden: Spur 1: Oct 3/4, Spur 2: Rex-1, Spur 3: 5T4; Spur 4: FGF-5; Spur 5: Zeta-Globin; Spur 6: Bmp-1; Spur 7: Nestin; Spur 8: Prominin-1; Spur 9: Musashi-1 Spur 10: GFAP; Spur 11: Aktin.

4.10.5.3 Charakterisierung der Zelllinie N2/Euro #1 in der adhärennten Kulturform aufgrund der Expression neuraler Markerproteine

Für die Charakterisierung der Expression von ausgewählten Markerproteinen wurden die Zellen auf mit Fibronectin beschichteten Deckgläschen für einen Zeitraum von 24 h plattiert und immunzytochemisch analysiert. Schwerpunkt der Untersuchungen waren die Markerproteine MAP-2 (erkannte Isoformen: a, b und c), Doublecortin, Nestin, β 3-Tubulin und GFAP. Um die Expression der Karbohydrate der Laktoserie im undifferenzierten Zustand zu untersuchen, wurden die beiden Epitope HNK-1 und CD15 ausgewählt.

Alle Zellen exprimieren das Intermediärfilament Nestin, perinukleär findet sich eine starke Akkumulation von Nestin⁺-Filamenten (Abbildung 4–143 A). Unter den Proliferationsbedingungen konnten keine β 3-Tubulin⁺, Doublecortin⁺ und GFAP⁺-Zellen identifiziert werden (Abbildung 4–143 B-C). Es konnten einzelne intensiv MAP-2_{a,b,c} exprimierende Zellen identifiziert werden, die im Vergleich mit dem Hauptanteil der Zellen eine auffällige Morphologie besitzen (Pfeil in Abbildung 4–143 D).

Insgesamt zeigt sich eine ungewöhnlich starke Anfärbung aller Zellen in den untersuchten Präparaten. Die Antikörperkontrollen zeigten keine Bindung des Sekundärantikörpers. In einer detaillierten Betrachtung dieser Zellen zeigt sich eine heterogene und partielle Expression von MAP-2_{a,b,c}.

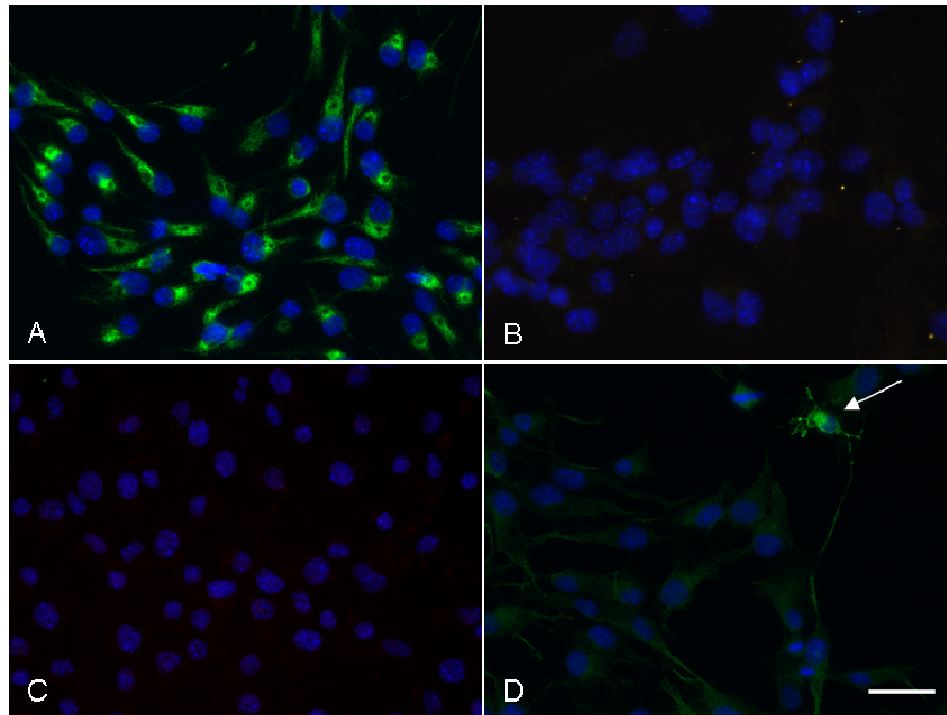


Abbildung 4-143: Expression von Markerproteinen während der Proliferation der N2/Euro #1-Zellen in adhärenter Kultur:

Einzelzellen wurden für einen Zeitraum von 24 h auf Fibronektin-beschichteter Oberfläche in N2-Euro-Vollmedium kultiviert und immunzytochemisch analysiert. Alle Zellen weisen eine Expression des Intermediärfilaments Nestin auf (A, grün). Es konnte keine Expression von Doublecortin (grün) identifiziert werden (B). Das gleiche gilt für β 3-Tubulin (rot) und GFAP (C, grün). Eine intensive MAP-2 Expression (grün) konnte bei einzelnen Zellen nachgewiesen werden (Pfeil in D). Aufnahmen stellen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Expositionszeiten in B und C wurden mindestens doppelt so lange gewählt wie in A und D. Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Maßstab: 25 μ m.

In einer Zelle mit deutlich differenzierter Morphologie zeigt sich die Expression perinukleär, sowie deutlich in fein verästelten Neuriten (Abbildung 4-144 A). Die stark MAP-2_{a,b,c}⁺-Zelle in Abbildung 4-144 B exprimiert das Protein homogen im Zytoplasma und weicht stark von den sonst beobachteten Zellmorphologien ab. Interessant ist eine lokal begrenzte MAP-2_{a,b,c}-Expression des Neuriten der Zelle in Abbildung 4-144 C (Pfeil).

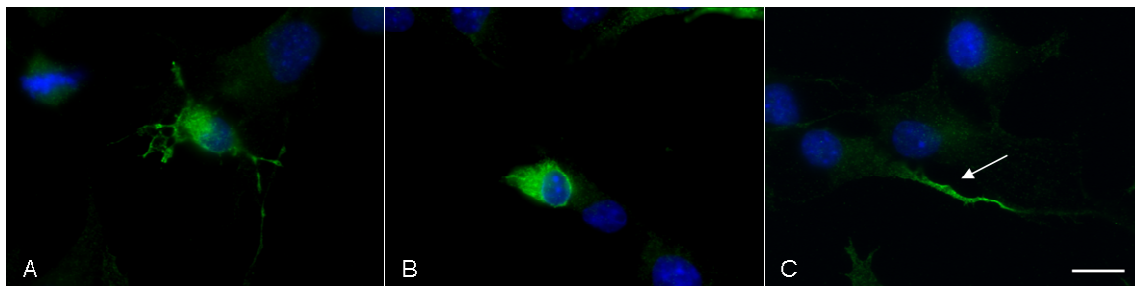


Abbildung 4-144: Hochoaufgelöste Mikroskopie zur Lokalisation von MAP-2_{a,b,c} im Zytoplasma der neuralen Vorläuferzellen:

Die Aufnahmen in hoher Vergrößerung zeigen repräsentative Beispiele zur Lokalisation von MAP-2_{a,b,c} (grün) in den Zellen. Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Maßstab: 10 μ m.

4.10.5.4 Proliferation und Differenzierung der Zelllinie N2/Euro #1 im Sphäroidmodell

In den Experimenten wurden die neuronalen Vorläuferzellen N2/Euro #1 auf Poly-HEMA-beschichteten Zellkulturschalen für 4 Tage aggregiert. Dieses Modell soll die Differenzierung im multizellulären Aggregat im Vergleich zur Proliferationskultur vergleichend untersuchen und soll eine Grundlage für eine effizientere Elektroporation oder virale Transduktion im Vergleich mit 2-dimensionalen Kulturformen darstellen, um vor allem neuronal vor-differenzierte oder differenzierte Neuronen zu transfizieren.

Nach der viertägigen Aggregation unter den Bedingungen:

- 1.) N2/ Euro Medium supplementiert mit 10 ng mL^{-1} FGF-2 und 5 ng mL^{-1} EGF
- 2.) N2/ Euro Medium supplementiert mit 10 ng mL^{-1} FGF-2
- 3.) 10 % KSR

wurden die Zellaggregate auf den Oberflächenbeschichtungen Fibronectin und Laminin plattiert. Zu diesem Zeitpunkt konnten in den unterschiedlichen Gruppen deutliche Unterschiede in Bezug auf die mittleren Aggregatdurchmesser beobachtet werden. Während eine deutliche Größenabnahme durch den Entzug des Wachstumsfaktors FGF-2 im Vergleich zu dem kompletten Medium erkennbar ist (Abbildung 4–145 A, B), finden sich in dem 10 % KSR-Medium hauptsächlich kleine Zellgruppen, deren minimaler Durchmesser deutlich unterhalb von $50 \mu\text{m}$ liegt (Abbildung 4–145 C). Die Aggregate aus dem KSR-Medium wurden für weitere Versuche nicht mehr verwendet.

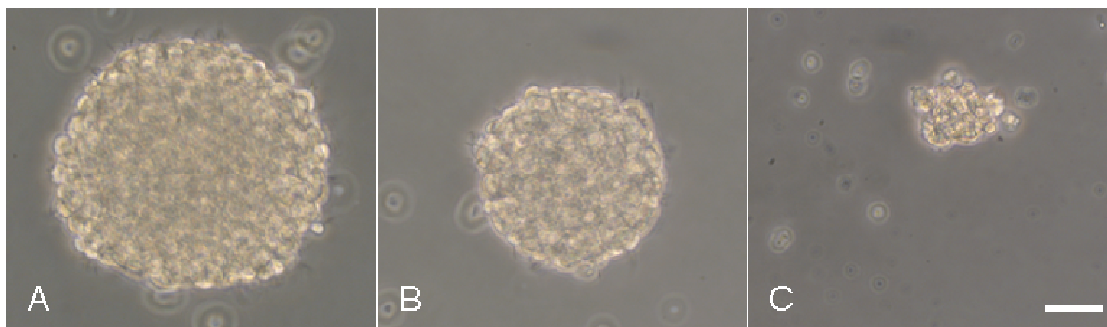


Abbildung 4–145: Morphologische Größenunterschiede nach 4 d Aggregationskultur:

Nach der Kultivierungszeit in den drei unterschiedlichen Medien sind deutliche Größenunterschiede erkennbar. Während die Aggregate unter den proliferativen Bedingungen im N2/Euro Medium die größten Durchmesser aufweisen (A), führt die Deprivation von 10 ng mL^{-1} FGF-2 zu einer deutlichen Abnahme der minimalen Aggregatdurchmesser (B). Die Kultur in dem 10 % KSR-Medium führt zu Aggregaten, deren Durchmesser größtenteils unterhalb von $50 \mu\text{m}$ liegen (C). Maßstab Balken: $30 \mu\text{m}$.

Um eine detaillierte Charakterisierung der Durchmesser vorzunehmen, wurde von jeder Kultivierungsbedingung eine Analyse von 160 randomisiert ausgewählten Aggregaten aus zwei unabhängigen Experimenten vorgenommen. Dabei wurden die minimalen Durchmesser bestimmt und in sieben Klassen von jeweils $50 \mu\text{m}$ gruppiert (Abbildung 4–146). Diese Auswertung zeigt eine statistisch signifikante Verteilung der unterschiedlichen Kulturformen,

welche die mikroskopischen Beobachtungen unterstützt. Die Durchmesser­verteilung der Aggregate unter proliferativen Bedingungen liegt hauptsächlich in dem Bereich 80 µm bis 250 µm während der Entzug von FGF-2 eher zu multizellulären Aggregaten in dem Bereich 50 µm bis 150 µm Durchmesser führt. Alle Aggregate im KSR-Medium weisen einen minimalen Durchmesser von < 100 µm auf.

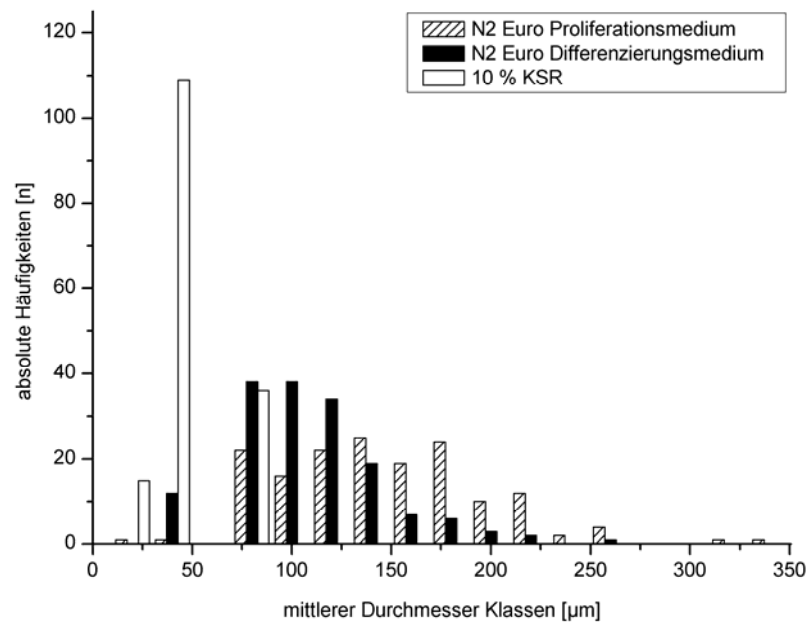


Abbildung 4–146: Bestimmung der minimalen Durchmesser der Aggregate nach einer 4 tägigen Kultivierungszeit:

Es wurden die Durchmesser von 160 Aggregaten aus den jeweiligen Medien untersucht. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten von Aggregaten aus zwei unabhängigen Experimenten. Deutlich erkennbar ist die Akkumulation der Aggregate nach Entzug des Wachstumsfaktors FGF-2 unterhalb von 150 µm, während die unter proliferativen Bedingungen kultivierten Zellen minimale Durchmesser zwischen 50 µm und 250 µm aufweisen. Die Aggregatgrößen der Zellen aus dem 10 % KSR Medium liegen alle in Klassen unterhalb von 100 µm.

Die Zellen wurden für 24 h unter unterschiedlichen Kulturbedingungen auf den Oberflächenbeschichtungen Fibronectin und Laminin ausplattiert, um morphologische Unterschiede nach der Aggregationskultur zu dokumentieren und immunzytochemisch die Differenzierung in DCX⁺- neuronale Zellen zu untersuchen. Es konnte bei dieser initialen Differenzierungsphase ein massives Ablösen von Zellen beobachtet werden, die sich anschließend frei flottierend im Medium befanden.

4.10.6 Charakterisierung der Proliferation und Differenzierung der Aggregate

Es wurde die Expression der beiden neuronalen Differenzierungsmarker Doublecortin und β 3-Tubulin 24 h nach Plattierung in den beiden Medien, in denen die viertägige Suspensionskultur durchgeführt wurde, auf einer Fibronektin beschichteten Oberfläche ausplattiert (Abbildung 4–147). Die kleineren Aggregate aus der EGF deprived Kulturform wiesen auf dieser Oberflächenmatrix eine verringerte migratorische Aktivität zu den Aggregaten auf, die in dem EGF- und FGF-2 haltigen Medium kultiviert wurden. Es konnten unter den proliferativen Bedingungen DCX⁺-Neurone mit einer simplen, bipolaren Morphologie identifiziert werden (Abbildung 4–147 A). Der Anteil von β 3-Tubulin⁺-Neuronen war < 1 % der gesamten Zellen (Abbildung 4–147 C). Nach insgesamt 5 d Entzug des Wachstumsfaktors EGF konnte eine höhere Anzahl and DCX⁺- und β 3-Tubulin⁺-Neuronen detektiert werden (Abbildung 4–147 B und D).

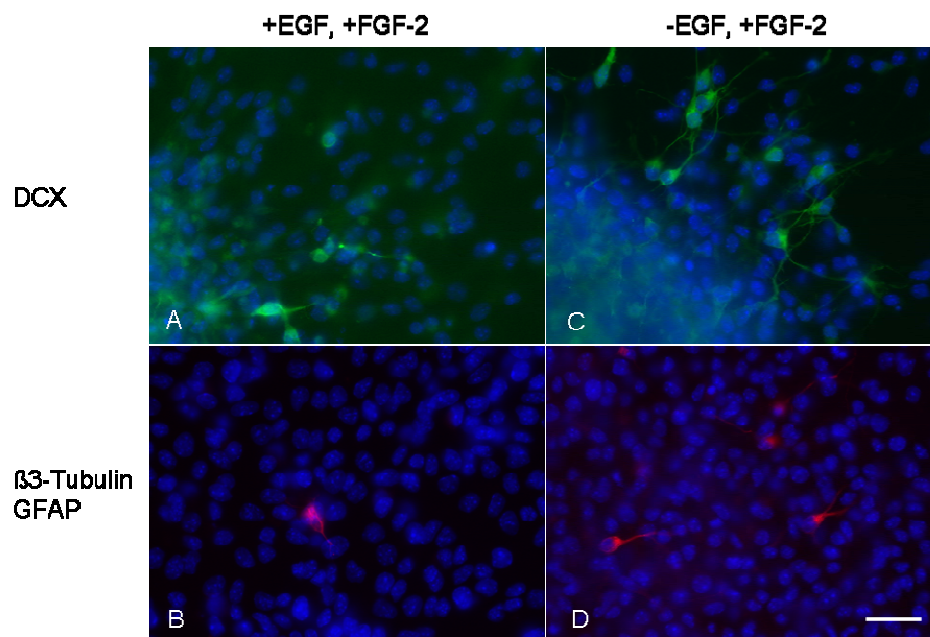


Abbildung 4–147: Charakterisierung der Doublecortin- und β 3-Tubulinexpression der Aggregate:

Die Aggregate wurden nach 4 d in der Suspensionskultur auf einer mit Fibronektin beschichteten Oberfläche in den Medien, die auch in der Suspensionskultur verwendet wurden, ausplattiert und immunzytochemisch untersucht. Unter proliferativen Bedingungen konnte die Expression von DCX (A, grün) in einzelnen Neuronen nachgewiesen werden. Ein noch geringerer Anteil von Neuronen exprimierte β 3-Tubulin (C, rot). Nach insgesamt 5 d Entzug des Wachstumsfaktors EGF wurde ein höherer Anteil von DCX⁺-Neuronen (B, grün) und β 3-Tubulin⁺-Zellen (D, rot) detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 in blau visualisiert. Maßstab: 25 μ m.

Zur weiteren Differenzierung wurden beide Gruppen von Suspensionsaggregaten auf einer mit Laminin beschichteten Oberfläche für 4 d in dem Kulturmedium B27/Euro kultiviert (Abbildung 4–148). Bei Aggregaten, die in dem Proliferationsmedium kultiviert wurden (Abbildung 4–148 A), konnten wenige DCX⁺-Zellen mit hauptsächlich einfach neuronaler Morphologie identifiziert werden. Der Anteil von β 3-Tubulin⁺-Neuronen und GFAP⁺-

Astrozyten (Abbildung 4–148 B) war geringer im Vergleich zu den Aggregaten, die ohne EGF in der Suspension kultiviert wurden (Abbildung 4–148 C und D).

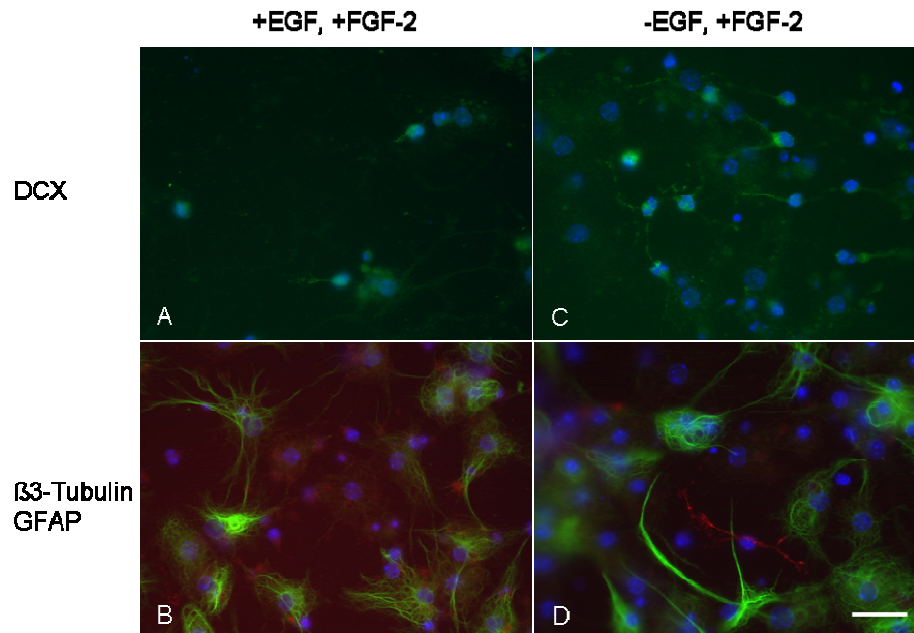


Abbildung 4–148: Markerexpression nach 4 d Differenzierung in dem Medium B27/Euro:

Multizelluläre Aggregate wurden nach 4 d Kultur in der Suspensionskultur auf mit Laminin beschichteten Oberflächen für weitere 4 d in dem Medium B27/Euro kultiviert. Aggregate, die sich unter proliferativen Bedingungen gebildet haben, differenzierten zu einem geringen Anteil in DCX⁺-Neurone (A). Wenige β3-Tubulin⁺-Zellen und GFAP⁺-Astrozyten konnten nachgewiesen werden (B). Aggregate, die sich unter Deprivierung von EGF gebildet haben, differenzierten zu einem höheren Prozentsatz in DCX⁺-Zellen (C). Es konnten ebenfalls β3-Tubulin⁺-Zellen und GFAP⁺-Astrozyten nachgewiesen werden (D). Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Maßstab: 25 μm.

Eine Kultivierung nach der Ausplattierung in 10 % KSR führte zur Differenzierung von mehr DCX⁺-Neuronen bei Aggregaten, die unter proliferativen Bedingungen kultiviert wurden im Vergleich zu dem Medium B27/Euro (Abbildung 4–149 A). Es konnten mehr β3-Tubulin⁺-Neurone und komplex entwickelte GFAP-Astrozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4–149 B). Die Präkultivierung in dem EGF deprivierten Medium führte zu einer Erhöhung der Anzahl DCX-exprimierender Neurone (Abbildung 4–149 C) und β3-Tubulin⁺-Zellen (Abbildung 4–149 D). Die Zellen wiesen eine komplexere Morphologie auf im Vergleich zu den nicht EGF deprivierten Kulturbedingungen.

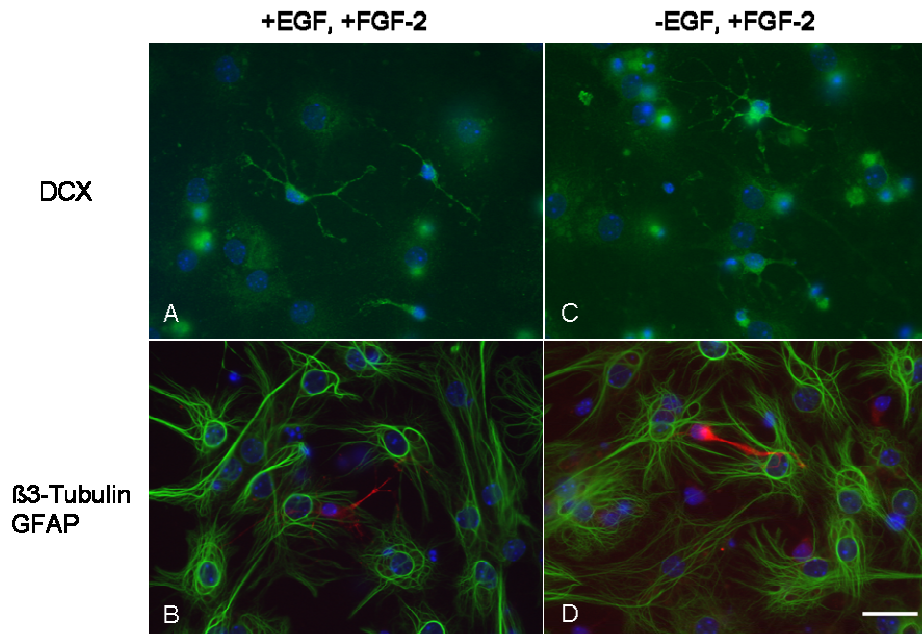


Abbildung 4–149: Markerexpression nach 4 d Differenzierung in dem Medium 10 % KSR:

Multizelluläre Aggregate wurden nach 4 d Kultur in der Suspensionskultur auf mit Laminin beschichteten Oberflächen für weitere 4 d in dem Medium 10 % KSR kultiviert. Aggregate, die sich unter proliferativen Bedingungen gebildet haben, differenzierten zu DCX⁺-Neurone, die eine komplexere Morphologie aufweisen, als bei den Kulturen, die in dem Medium B27/Euro kultiviert wurden (A). β3-Tubulin-exprimierende Neurone und GFAP⁺-Astrozyten konnten nachgewiesen werden (B). Aggregate, die sich unter Deprivierung von EGF in der Suspensionskultur bildeten, differenzierten stärker in DCX⁺-Zellen (C). Es konnten β3-Tubulin⁺-Zellen und GFAP⁺-Astrozyten mit komplexer Morphologie nachgewiesen werden (D). Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Maßstab: 25 µm.

4.10.7 Nukleofektion der multizellulären Aggregate

Aggregate wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1-CMV-mCherry und dem Plasmid pcDNA3.1-CMV-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase (siehe Kapitel 4.11.3) nukleofektiert und auf einer mit Fibronectin beschichteten Oberfläche plattiert. Nach der Nukleofektion konnte die Expression des mCherry-Proteins bereits nach 24 h detektiert werden. Die Transfektionseffizienz von Einzelzellen betrug etwa 90 %, wobei die Effizienz bei der Nukleofektion von Aggregaten nur etwa 40 % bis 50 % betrug. Die Expression von mCherry nahm innerhalb von 72 h nach der Nukleofektion stark ab. Besonders Zellen mit bipolarer neuronaler Morphologie zeigten nach diesem Zeitraum noch eine starke Expression des Fluoreszenzreporters. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Stichproben konnten nach Nukleofektion und anschließender Supplementation von Neomycin zur Selektionierung keine stabil exprimierenden Zelllinien gewonnen werden.

Die immunzytochemische Analyse mittels anti-DCX-Antikörper zeigte in vereinzelt Neuronen eine Koexpression von DCX und mCherry (weißer Pfeil in Abbildung 4–150 A), während prozentual mehr Neurone gefunden wurden, die mCherry⁺ waren, aber kein DCX exprimierten (gelber Pfeil in Abbildung 4–150 A). Die immunzytochemische Analyse der

Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA3.1-CMV-K79- Δ robo3-IRES-Luziferase nukleofektiert wurden, zeigte nach Inkubation mit dem anti-robo3 spezifischen Antikörper vereinzelt Zellen, die den Oberflächenrezeptor stark exprimierten. Die Expression konnte membranassoziiert nachgewiesen werden (weißer Pfeil in Abbildung 4–150 B). Zur Visualisierung der Aktinfilamente in Abbildung 4–150 B wurde FITC konjugiertes Phalloidin verwendet.

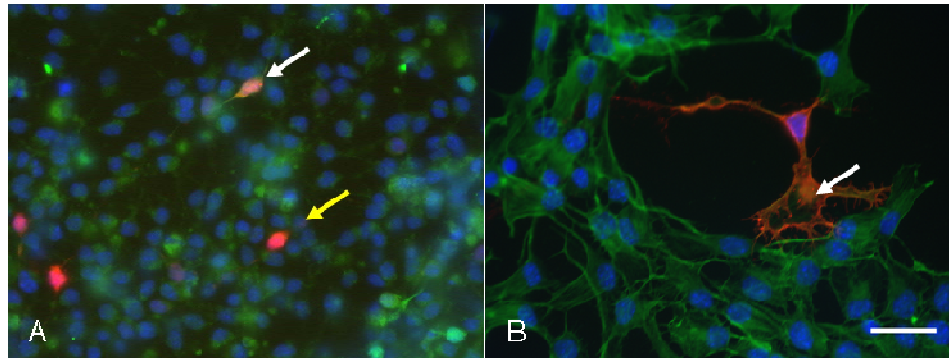


Abbildung 4–150: Nukleofektion von Aggregaten der Zelllinie N2/Euro #1:

In der Suspensionskultur gebildete Aggregate wurden mit den Plasmiden pcDNA3.1-CMV-mCherry und dem Plasmid pcDNA3.1-CMV-K79- Δ robo3 nukleofektiert und auf einer Fibronektin beschichteten Oberfläche ausplattiert. Es konnten einzelne Neurone detektiert werden, die eine Koexpression von mCherry und DCX aufwiesen (A, weißer Pfeil). Der gelbe Pfeil weist auf eine Cherry⁺- und DCX⁻-Zelle hin.

Nach Nukleofektion mit dem Plasmid pcDNA3.1-K79- Δ robo3 wurden nach einer immunzytochemischen Analyse mit einem anti-robo3-Antikörper vereinzelt Zellen mit einer Expression des Oberflächenrezeptors identifiziert (B, Pfeil). Die Aktinfilamente wurden mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) visualisiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Maßstab: 25 μ m.

Für den Nachweis der Luziferaseexpression wurden die nukleofektierte Aggregate mittels Photonenbildungssystem nach der Zugabe des Substrates untersucht (Abbildung 4–151). Es konnte dabei keine Zellzahl ermittelt werden.

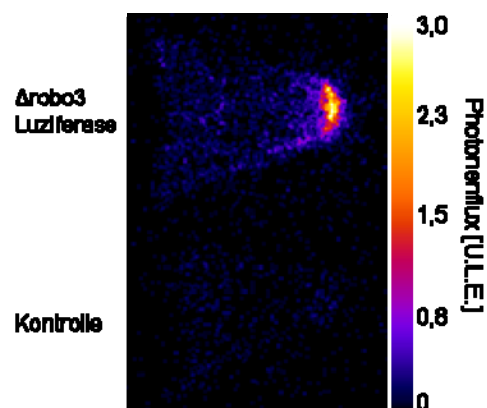


Abbildung 4–151: Überprüfung der Luziferaseexpression mittels optischem Bildgebungssystem:

Die Expression der *firefly*-Luziferase in multizellulären Aggregaten wurde nach Zugabe von D-Luziferin bestimmt. Für die Untersuchung wurde die 3-fach größere Menge an Kontrollaggregaten verwendet.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte eine schwache aber eindeutige Expression der Luziferase nachgewiesen werden. Die detektierten unabhängigen Lichteinheiten bei den $\Delta robo3^+$ - und Luziferase⁺-Zellen betragen in einem Bereich von 7200 Pixeln $1,4 \times 10^5$ U.L.E. Bei den Kontrollzellen wurden $3,0 \times 10^4$ U.L.E. in einem identisch großen Bereich detektiert.

4.10.7.1 Charakterisierung der N2/Euro #1-Zellen in der adhärennten Kulturform aufgrund der Expression neuraler Markerproteine: Differenzierung

Um die Differenzierung in neuronale und astrogliale Phänotypen in der Einzelzellkultur zu induzieren wurden die N2/Euro #1-Zellen auf einer mit Laminin beschichteten Oberfläche unter proliferativen Bedingungen ausgesät. Ein Mediumwechsel auf die zwei Differenzierungsbedingungen B27/Euro und 10 % KSR fand nach weiteren 24 h Kultur statt. Durch eine immunzytochemische Analyse wurde die Expression von DCX, $\beta 3$ -Tubulin und GFAP 4 Tage nach Einleitung der Differenzierung untersucht. Es konnten erhebliche Expressionsunterschiede der Markerproteine dokumentiert werden. Nur ein minimaler Teil der Zellen im B27/Euro Medium differenziert in schwach DCX⁺-Zellen (Abbildung 4–152 A). Bei den beobachteten Zellen handelt es sich morphologisch um simple, bipolare Zellen, die keine feinen Verzweigungen- oder Neuritenansammlungen aufweisen.

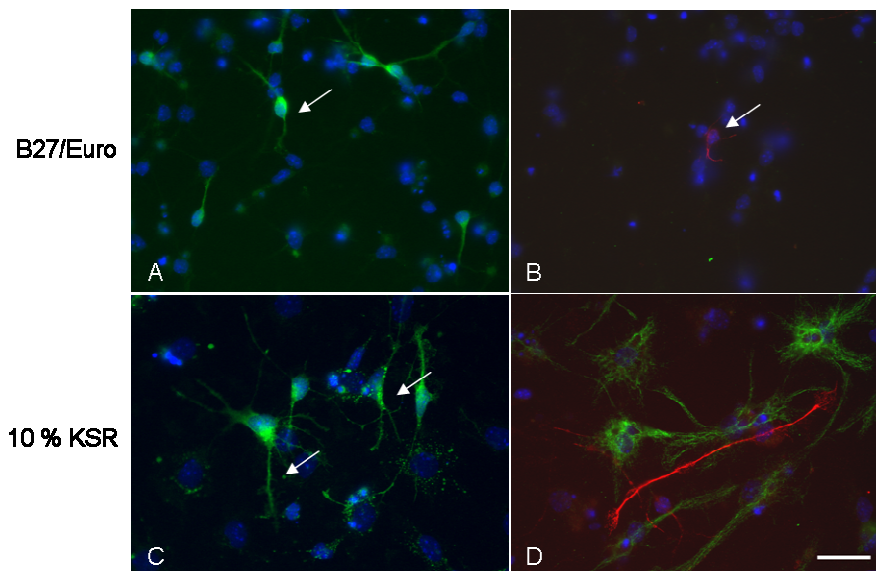


Abbildung 4–152: Immunzytochemischen Analyse nach der viertägigen Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen:

Die Differenzierung wurde vergleichend in den zwei Medien B27/Euro (A, B) und 10 % KSR (C, D) durchgeführt. In dem B27/Euro Medium differenzieren nur wenige Zellen in DCX (A, grün)-exprimierende Zellen. Es konnten wenige $\beta 3$ -Tubulin⁺ (B, rot)- und keine GFAP⁺ (B, grün)-Zellen unter diesen Differenzierungsbedingungen gefunden werden. Im 10 % KSR- Medium befinden sich DCX (C, grün)-exprimierende Zellen. Die $\beta 3$ -Tubulin⁺ (D, rot)-exprimierenden Zellen sind morphologisch komplexer ausgebildet. Unter dem Einfluss des KSR-Mediums differenzieren die neuralen Vorläuferzellen zu GFAP-exprimierenden Astrozyten (D, grün). Kernfärbungen wurden mit dem Hoechst Dye 33342 (blau) durchgeführt. Maßstab: 25 μ m.

Ebenfalls konnten wenige β 3-Tubulin exprimierende Zellen und keine GFAP⁺-Astrozyten identifiziert werden (Abbildung 4–152 B). Auffällig ist der hohe Anteil an toten Zellen, der deutlich mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff identifiziert werden kann. Ein hoher Anteil an fragmentierten Zellkernen konnte auch unter den Differenzierungsbedingungen 10 % KSR gefunden werden. Allerdings differenziert im KSR- Medium ein höherer prozentualer Anteil von Zellen in DCX-exprimierenden Neuronen (Abbildung 4–152 C).

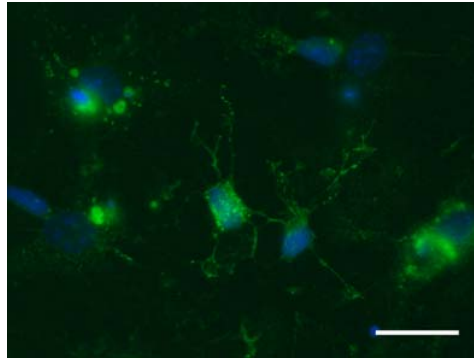


Abbildung 4–153: Detaillierte Untersuchung DCX-exprimierenden Zellen in der Differenzierungsphase mit 10 % KSR-Medium:

Die DCX-exprimierenden Zellen weisen eine komplexe Morphologie auf. Maßstab: 20 μ m.

Nur unter diesen Bedingungen konnten quantitativ mehr- und morphologisch komplexer gestaltete β 3-Tubulin⁺-Zellen und GFAP exprimierende Astrozyten identifiziert werden (Abbildung 4–152 D).

In Abbildung 4–153 wurden exemplarisch zwei DCX⁺-Zellen dargestellt. Die Expression von DCX war in der linken Zelle stärker ausgeprägt, als in der rechten.

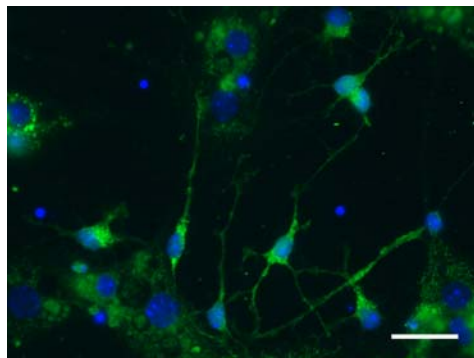


Abbildung 4–154: Immunzytochemische Charakterisierung der Doublecortin-Expression nach Differenzierung in B27 / Euro und 10 % KSR:

Eine kombinierte Kultivierung der neuronalen Vorläuferzellen in B27/ Euro und 10 % KSR resultierte in einer starken Expression neuronaler Marker DCX (grün). Maßstab: 25 μ m.

In einem weiteren Ansatz wurden die Kultivierungsbedingungen B27/Euro und 10 % KSR kombiniert, wobei die Zellen nach der proliferativen Kultur erst in dem Medium B27/Euro kultiviert wurden, gefolgt von einer Kultivierung in KSR (Abbildung 4–154). Es konnte unter diesen Bedingungen eine starke Expression von DCX beobachtet werden.

4.10.8 Expression von CD15 und HNK-1 unter proliferativen und differenzierenden Kulturbedingungen

Die Kohlenhydratpitope HNK-1 und CD-15 befinden sich unter den proliferativen Bedingungen in Subgruppen der Zellen. Beide Epitope sind extrazellulär membranassoziiert lokalisiert (Abbildung 4–155 A und B).

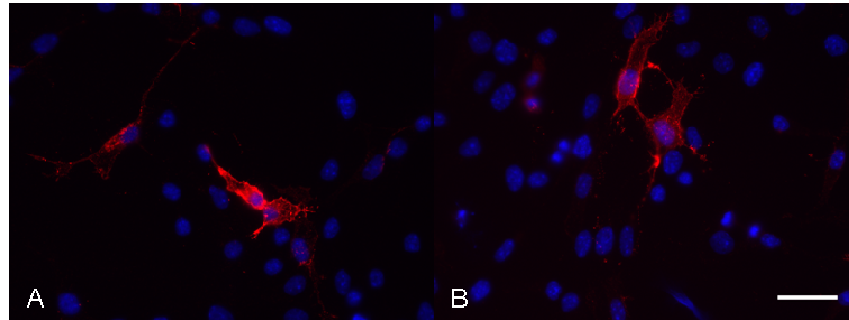


Abbildung 4–155: Lokalisation der beiden Kohlenhydratpitope HNK-1 und CD-15: HNK-1 (rot, A) und CD-15 (rot, B) weisen eine membranassoziierte Lokalisation in einzelnen Zellen auf. Zellkerne wurden mit Hoechst Dye 33342 visualisiert. Repräsentatives Beispiel aus $n = 4$ unabhängigen Stichproben. Maßstab: 25 μm .

Eine Quantifizierung der HNK-1⁺-Zellen konnte in vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten erstellt werden. Unter proliferativen Bedingungen exprimierten 5,9 ($\pm 3,3$) % der neuronalen Vorläuferzellen HNK-1.

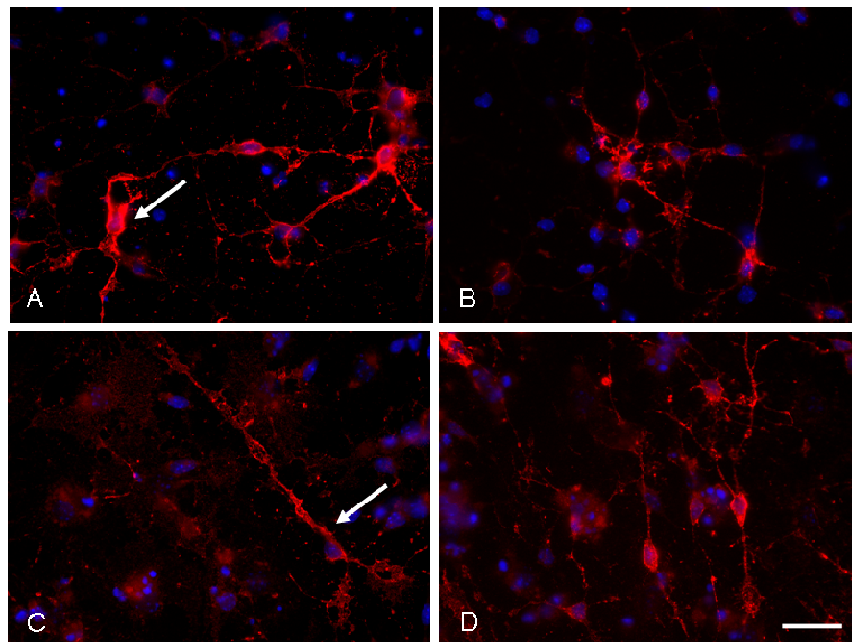


Abbildung 4–156: Expression der Kohlenhydratpitope CD15 und HNK-1 unter Differenzierungsbedingungen:

Nach Einleitung der Differenzierung in dem Medium B27/Euro konnte nach vier Tagen eine starke Expression von CD15 in vielen Zellen nachgewiesen werden (A, rot: anti-CD15). Die Expression von HNK-1 war im Vergleich zu CD15 in diesem Kulturmedium geringer ausgeprägt (B, rot: anti-HNK-1). Unter den Kulturbedingungen 10 % KSR konnte eine geringe Anzahl CD15⁺-Zellen (C, rot: anti-CD15) und eine hohe Anzahl HNK-1⁺-Zellen nachgewiesen werden (D, rot: anti-HNK-1). Maßstab: 20 μm .

Die Expression von CD15 konnte in $2,6 (\pm 1,2) \%$ der Zellen unter proliferativen Bedingungen nachgewiesen werden. Die Expression beider Kohlenhydratepitope wurde während der Differenzierung mittel B27/Euro und der Differenzierung in 10 % KSR-Medium untersucht (Abbildung 4–156).

Die Expression von CD15 konnte bei der Differenzierung mittels B27/Euro in vielen Zellen lokalisiert werden, wobei die Expressionsstärke variierte. Stark CD15⁺ Zellen wiesen ein weit verzweigtes Fortsatzsystem auf und bildeten Verbindungen untereinander aus (Pfeil in Abbildung 4–156 A). Die Expression von HNK-1 konnte in stark verzweigten, morphologisch komplexen Zellen identifiziert werden (Abbildung 4–156 B). Unter den Differenzierungsbedingungen im KSR-Medium wurden weniger stark CD15⁺ Zellen als bei dem B27/Euro Ansatz gefunden (Pfeil in Abbildung 4–156 C). Eine intensive Expression von HNK-1 wurde in vielen Zellen, die eine neuronale Morphologie aufwiesen lokalisiert (Abbildung 4–156 D). Ein großer Anteil der HNK-1⁺ Zellen wies eine komplexe Morphologie auf.

Durch eine Untersuchung zur Koexpression von HNK-1 und GFAP konnte gezeigt werden, dass HNK-1⁺ Zellen mit neuronaler Morphologie keine Koexpression mit GFAP aufwiesen (Abbildung 4–157 A und B). Es wurden zusätzlich HNK-1⁺ Zellen mit flächiger Morphologie beobachtet, die keine GFAP-Expression aufwiesen (Abbildung 4–157 C).

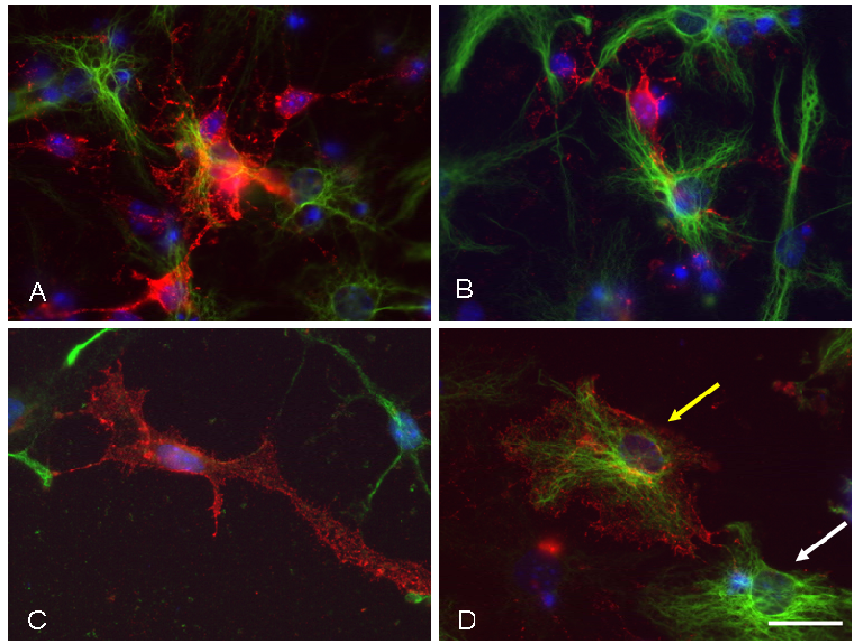


Abbildung 4–157: Immunzytochemische Analyse der Expression von HNK-1 und GFAP:

Es konnte unter den Kulturbedingungen 10 % KSR komplexe (A) und weniger komplex (B) entwickelte HNK-1⁺-Zellen (rot) mit neuronaler Morphologie nachgewiesen werden, die keine Expression von GFAP (grün) aufwiesen. HNK-1⁺ und GFAP⁺-Zellen mit breitem Soma und epithelialer Morphologie konnten in selteneren Fällen identifiziert werden. In noch kleinerer Anzahl wurden HNK-1⁺ und GFAP⁺-Zellen identifiziert (gelber Pfeil in D). Der weiße Pfeil weist auf eine HNK-1⁻ und GFAP⁺-Zellen hin. Maßstab: 20 μm .

In gering vorkommender Anzahl konnten HNK-1⁺-Zellen identifiziert werden, die eine starke, fibrilläre GFAP Expression aufwiesen (gelber Pfeil in Abbildung 4–157 D). Zum Vergleich wurde eine GFAP⁺-Zelle gezeigt, bei der keine HNK-1 Expression lokalisiert wurden konnte (weißer Pfeil Abbildung 4–157)

4.10.8.1 Aufnahme von Endorem und MRT-Visualisierung der Zelllinie N2/Euro #1

Um die Aufnahme von Endorempartikeln mit anschließender MRT-Visualisierung der neuralen Vorläuferzelllinie N2/Euro #1 zu untersuchen, wurden die Zellen in Gegenwart von 300 µg mL⁻¹ Endorem für 17 h als Monolayer kultiviert. Im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen konnte eine verringerte Proliferationsrate festgestellt werden, sowie ein quantitativ höherer Anteil von Trypanblau⁺-Zellen (Abbildung 4–158). Morphologisch wurde eine Konzentrierung der Zellen in lang gestreckten Gruppen (Schläuchen) bei Inkubation mit Endorem beobachtet. Dieser Effekt konnte bei den Kontrollzellen nicht beobachtet werden

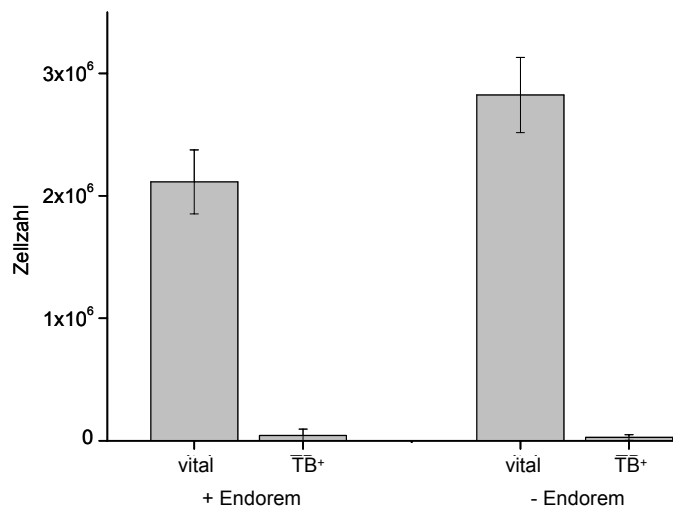


Abbildung 4–158: Quantifizierung der vitalen Zellzahl nach Endoreminkubation:

2 × 10⁶ Zellen wurden für 17 h in Gegenwart von 112 µg mL⁻¹ Endorem inkubiert und anschließend wurde die Zellzahl unter Berücksichtigung der lebenden- und toten Zellen anhand einer Trypanblau Ausschlußfärbung (TB) quantifiziert. In der Endorem inkubierten Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied an TB⁺-Zellen im Vergleich mit den Kontrollen festgestellt werden. Die Proliferationsrate war bei den mit Endorem inkubierten im Vergleich zur Kontrollpopulation erniedrigt. Anzahl der unabhängigen Stichproben: n = 3

Um die Aufnahme und zytoplasmatische Verteilung des Kontrastmittels zu ermitteln wurden immunzytochemische Untersuchungen mittels anti-Dextran-Antikörper durchgeführt. Zur Visualisierung der Aktinfilamente wurde eine Färbung mit Alexa 660 konjugiertem Phalloidin verwendet. Die Ergebnisse in Abbildung 4–159 bestätigen die Beobachtung aus der Zellkultur, dass sich die morphologische Anordnung der Zellen in der mit Kontrastmittel inkubierten Gruppe von den unbehandelten Kontrollen unterscheidet. Endorem wurde von dem größten Teil der Zellen aufgenommen und die Verteilung im Zytoplasma ist in kleinen

Gruppen sichtbar (Pfeile in Abbildung 4–159). Der anti-Dextran-Antikörper zeigt in den unbehandelten Kontrollen nur eine schwache unspezifische Fluoreszenz, bei sehr guter Visualisierung der Aktinfilamente. Nicht alle Zellen haben vergleichbare Mengen des Endorems aufgenommen, wie in der höheren Vergrößerung sichtbar wird. (roter Pfeil: starke Ansammlung; gelber Pfeil: geringe Ansammlung). Die starke körnige Hintergrundfärbung in Abbildung 4–159 A und D lässt sich auf die experimentellen Konditionen zurückführen, da die Zellen als Monolayer auf einer mit Fibronectin beschichteten Oberfläche inkubiert wurden und nicht durch enzymatischen Verdau vor der Fixierung abgelöst wurden.

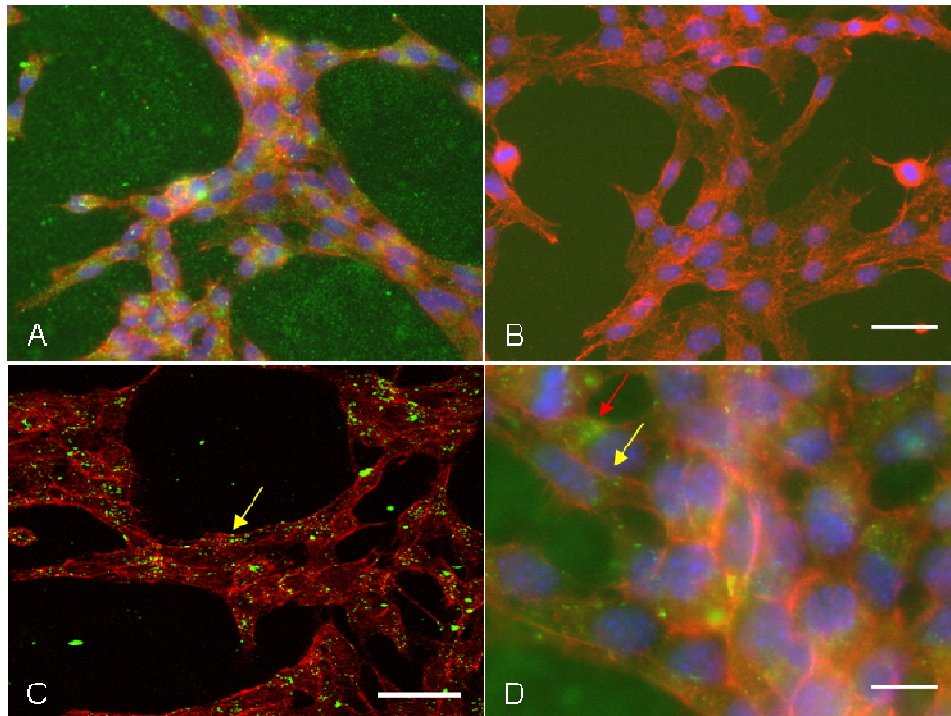


Abbildung 4–159: Immunzytochemische Analyse der Endoremaufnahme und Verteilung nach 14 h Inkubation:

In der immunzytochemischen Analyse zeigen die Endorempartikel (grün) eine Konzentration im Zytoplasma (A). Die stark körnige Hintergrundfärbung wird durch die experimentellen Bedingungen hervorgerufen, da die Zellen als Monolayer mit dem Kontrastmittel inkubiert wurden. Durch die Markierung der Aktinfilamente können die Zellmembranen deutlich vom extrazellulären Raum abgegrenzt werden (rot). Die Kontrollzellen zeigen keine Markierung mit dem anti-Dextran-FITC-Antikörper bei gleicher Expositionszeit für die mikroskopische Aufnahme (B). Laser-Scanning Mikroskopie wurde zur detaillierten Untersuchung der Endorempartikel-Verteilung verwendet (C). Der gelbe Pfeil in C weist auf die zytoplasmatische Verteilung der Endorempartikel hin. Bei stärkerer Vergrößerung lässt sich mittels Fluoreszenzmikroskopie deutlich eine ungleichmäßige Aufnahme der Partikel in einzelnen Zellen nachweisen (roter und gelber Pfeil in Abbildung D). Maßstab: A,B,C: 25 µm; D: 10 µm.

Um die MRT-Visualisierungseigenschaften zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe von 98 Zellen bis 12500 Zellen nach Fixierung im Agarosephantom erstellt. Visuell ließen sich einzelne hypointense Bereiche erkennen. Parallel dazu wurde eine quantitative Eisenbestimmung mit dem spektralphotometrischen Eisentest durchgeführt. Bei der MRT Analyse wurden die Meßparameter Echozeit TE = 18 ms, Matrizengröße und Mittelungen

konstant gehalten und nur die Relaxationszeit TR variiert. Bei der Beurteilung der beiden Relaxationszeiten kann eine minimal zu detektierende Zellmenge von 390 Zellen eindeutig bei den Repetitionszeiten TR = 200 ms und TR = 100 ms identifiziert werden (Abbildung 4–160 A). Die Visualisierung von 196 Zellen gelingt mit der höheren Repetitionszeit, eine eindeutige Identifizierung kann allerdings nicht durchgeführt werden. Die Berechnung des Kontrast zu Gelrauschen Verhältnisses ist in (Abbildung 4–160 B) dargestellt und bestätigt den optischen Eindruck bezüglich der minimal eindeutig identifizierbaren Zellmenge. Durch die spektralphotometrische Analyse konnte der Eisengehalt in den Zellen quantifiziert werden (Abbildung 4–160 C). In den mit Endorem inkubierten Zellen konnten $418,0 (\pm 32,9)$ μM Eisen detektiert werden. In der Kontrollgruppe wurde eine Eisenkonzentration von $4,8 (\pm 7,1)$ μM Eisen ermittelt.

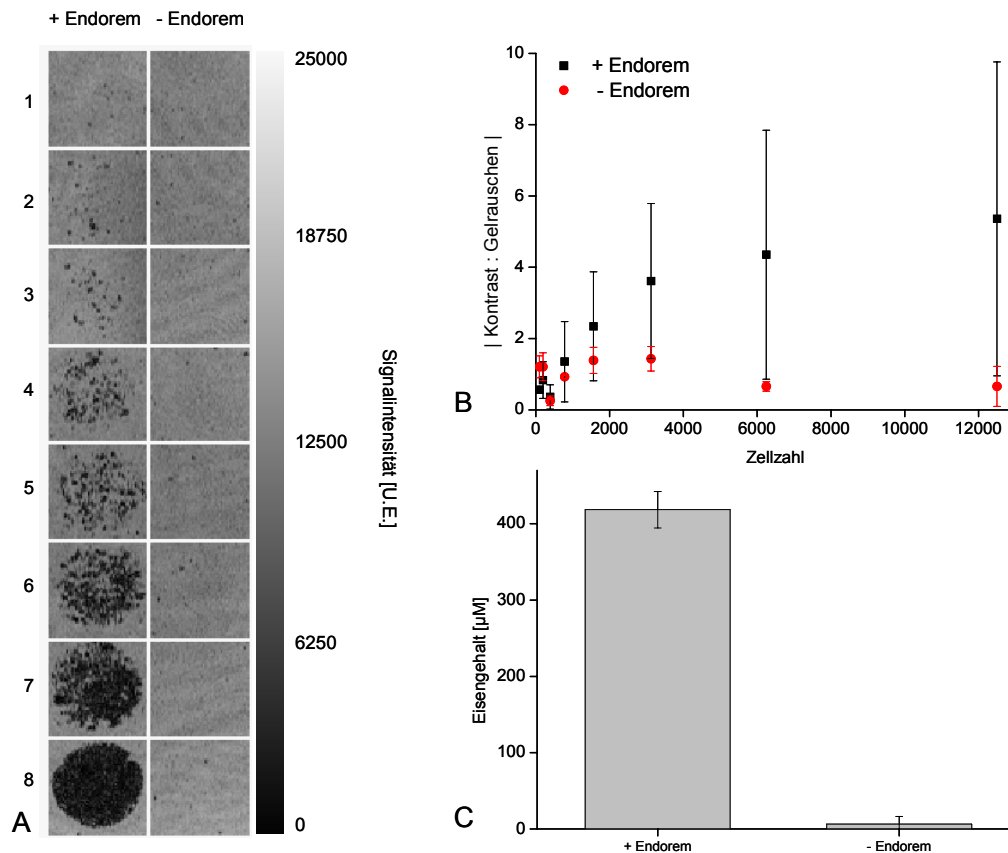


Abbildung 4–160: Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge der mit Endorem markierten Zellen mittels MRT:

Für die Analyse wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und mittels MRT untersucht: 1) 98 Zellen, 2) 196 Zellen, 3) 331 Zellen, 4) 781 Zellen, 5) 1563 Zellen, 6) 3125 Zellen, 7) 6250 Zellen, 8) 12 500 Zellen. Die Inkubation mit Endorem wurde für einen Zeitraum von 18 h mit dem Kontrastmittel durchgeführt. In der Kontrollpräparation konnte keine Veränderung der Signalintensität im Vergleich zum Hintergrund identifiziert werden (A). Es wurden bei identischem TE = 18 ms die Repetitionszeiten von TR = 100 ms und TR = 200 ms (B) verglichen. Eine eindeutige Identifizierung gelingt bei beiden Repetitionszeiten bis zu einer Zellmenge von 391 Zellen. Der Eisengehalt der Zellen wurde mittels spektralphotometrischem Eisentest ermittelt (C).

4.10.8.2 Detektion von HNK-1 in neuronalen Vorläuferzellen mit SPIO-konjugierten Antikörpern

In diesem Versuchsteil wird die endogene Expression des HNK-1-Karbohydratepitops mit SPIO-konjugierten Antikörpern untersucht. Für die Detektion werden 4 Ansätze verwendet:

- 1.) anti-HNK-1-Antikörper der Firma Miltenyi Biotech, konjugiert mit SPIO (Durchmesser 50 nm)
- 2.) anti-HNK-1-Antikörper aus eigener Hybridomkultur, der für die immunzytochemischen Analysen in dieser Arbeit verwendet wurde, nachträglich konjugiert an SPIO (Durchmesser 50 nm)
- 3.) anti-HNK-1-Antikörper aus eigener Hybridomproduktion und Konjugierung an SPIO (Durchmesser 50 nm)

Aus dem Überstand der serumfrei adaptierten Hybridomzelllinie TIB 200, die den monoklonalen Antikörper gegen das Epitop Sulfo-Glucuronyl-N-Acetyllactosamin (HNK-1) exprimiert, wurde der Antikörper isoliert. Nach erfolgter Isolierung mittels Protein A-Affinitätschromatographie, wurde die Effizienz anhand eines SDS-Polyacrylamidgels überprüft (Abbildung 4–161).

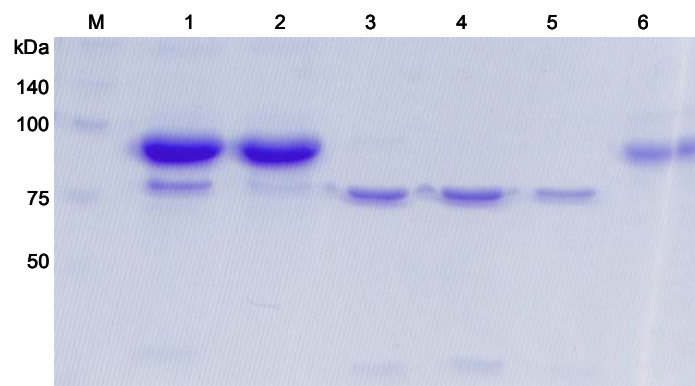


Abbildung 4–161: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Reinigung des HNK-1 Antikörpers:

Spur 1: Kulturüberstand nach Ultrafiltration; Spur 2: nicht Protein A-affine Proteine; Spur 3: Fraktion 1 nach Protein A-Bindung; Spur 4: Fraktion 2; Spur 5: Fraktion 3; Spur 6: kommerzieller Kulturüberstand.

Aufgetragen ist in Spur 1-5 das gleiche Volumen. In Spur 6 befinden sich 3 µg Gesamtprotein.

M: Molekulargewichtsmarker.

Um die Reinigungseffizienz im SDS-Gel vergleichen zu können, wurde das gleiche Volumen aufgetragen. Die Isolierung führt zur Anreicherung zweier Proteine, die ein apparentes Molekulargewicht von 80 kDa und etwa 20 kDa haben und von restlichen Proteinen isoliert wurden.

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde spektralphotometrisch bestimmt und der Ertrag ermittelt (Tabelle 4–7).

Tabelle 4–7: Reinigung von HNK-1-Antikörpern.

	Volumen (mL)	Protein (mg)	Ertrag (%)
Überstand	4.00	5.30	100.0
Konzentrat	0.40	5.30	100.0
ungebunden	0.39	3.60	67.9
Fraktion 1	0.32	0.51	9.6
Fraktion 2	0.32	0.52	9.8
Fraktion 3	0.32	0.47	8.9

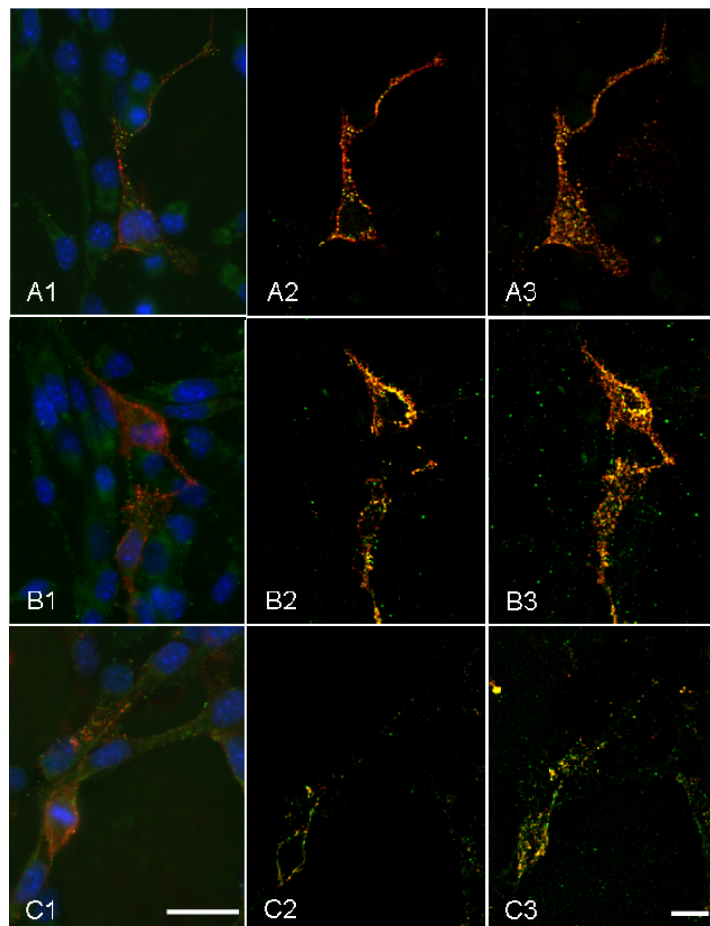


Abbildung 4–162: Immunzytochemische Analyse von drei unterschiedlichen anti-HNK1-Antikörpern, die mit einem superparamagnetischen Partikel konjugiert wurden:

N2/Euro #1 Zellen wurden nach der Fixierung mit den unterschiedlichen Antikörper-SPIO-Komplexen inkubiert um die spezifische Erkennung des Antikörperkomplexes zu überprüfen und die Unterschiede in den biochemischen Präparationen aufzuzeigen. Als Kontrolle zu den selbst hergestellten Antikörpern wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper verwendet (A1-A3). Bei der Präparation in B1- B3 wurde ein bestehender Hybridomüberstand, der in allen in dieser Arbeit angefertigten Immunzytochemischen Nachweisen verwendet wurde konjugiert. Ein biochemisch von Serumproteinen gereinigter Antikörper und neuer Konjugation wurde in C1-C3 verwendet. Zur besseren Visualisierung wurde eine Fluoreszenzaufnahme dargestellt (A1, B1, C1). Die Präparate wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Dabei wurden acht Einzelbilder akquiriert, aus denen eine repräsentative Schicht in A2, B2, C2 dargestellt wurde. Eine Projektion aller Schichten zeigt A3, B3, C3. Die Expositionszeiten wurden bei der Akquisition an die Stärke der Immunreaktion angepasst. Farbzunordung: grün: anti-Dextran, rot: anti-Maus, blau: Hoechst Dye 33342.

Die immunzytochemische Analyse bei 1 h Inkubation neuraler Vorläuferzellen zeigt Unterschiede zwischen den verwendeten Antikörperkonjugaten auf (Abbildung 4–162). Bei der Analyse wurde für die Detektion des konjugierten Antikörpers ein anti-Maus-Antikörper mit konjugiertem Fluorochrom verwendet. Bei Kontrollzellen, die nicht mit dem primären Antikörper inkubiert wurden, konnte selbst bei langer Belichtungszeit kein Signal detektiert werden. Ebenfalls konnte nach Inkubation mit dem anti-Dextran-FITC-Antikörper keine Immunreaktion festgestellt werden.

Für eine Eisenmarkierung des gereinigten HNK-1 Antikörpers wurde 0,1 mg der Fraktion 2 an Eisenpartikel mit einem Durchmesser von 50 nm (SPIO) gekoppelt. Die Bindung an HNK-1 positive Zellmembranen war dadurch nicht beeinträchtigt.

Für eine Markierung der CD 15 positiven Zellen wurde ein kommerzieller erhältlicher SPIO konjugierter Antikörper verwendet.

4.10.8.2.1 Markierung der Zelllinie N2/Euro #1 mit SPIO-konjugierten anti-CD15 und anti-HNK-1 Antikörpern für die MRT-Visualisierung

Je 50 000 N2/Euro #1-Zellen wurden für die Bildung zu Aggregaten über Nacht in N2/Euro oder 10 % KSR kultiviert und anschließend mit entweder HNK-1-SPIO, CD 15-SPIO oder nur SPIO für 1 h inkubiert. Der Eisengehalt wurde im MRT sichtbar gemacht (Abbildung 4–163).

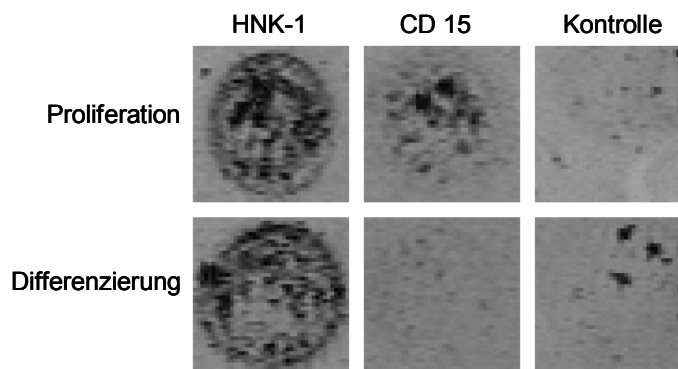


Abbildung 4–163: Minimum-Intensitäts-Projektion des MRT der mit HNK-1 oder CD 15 inkubierten N2/Euro #1 und den in 10 % KSR differenzierten Zellen:

Aufgetragen sind etwa 10 000 Zellen als Aggregate, die mit dem jeweiligen Antikörper bzw. nur mit SPIO für 1 h inkubiert wurden. Die Messparameter der FLASH 3D Sequenz waren TE = 18 ms, TR = 200 ms, 4 Mittelungen.

Die unter proliferativen Bedingungen kultivierten N2/Euro #1-Zellen lassen sich mit HNK-1-SPIO und CD15-SPIO im MR detektieren, wohingegen die unter Differenzierungsbedingungen kultivierten Zellen hauptsächlich nur mit HNK-1-SPIO markiert wurden. Die hypointensen Bereiche der Kontrollinkubation sind mikroskopisch nicht mit Zellen assoziiert. Einzelzellen der N2/Euro #1 Zelllinie wurden mit HNK-1-SPIO, CD 15-SPIO und nur mit dem karboxylierten SPIO inkubiert und mit einer Magnet-Chromatographie sortiert. In den

N2/Euro #1-Zellen konnten etwa 5 % HNK-1⁺ Zellen und etwa 15 % CD15⁺ Zellen separiert werden. Die erfolgte Sortierung wurde im MRT überprüft (Abbildung 4–164).

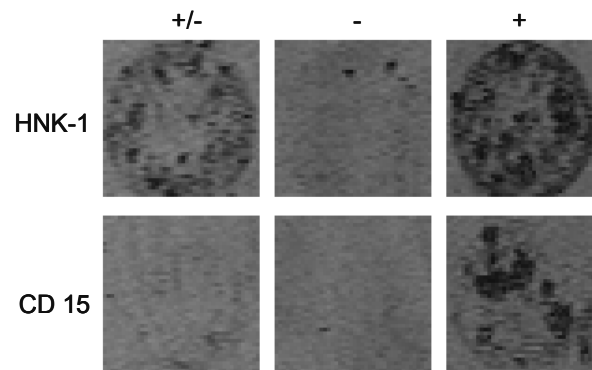


Abbildung 4–164: Minimum-Intensitäts-Projektion des MRT der Magnet-Chromatographie von N2/Euro #1 Zellen mit HNK-1 und CD 15:

Dargestellt sind die mit SPIO-Antikörpern inkubierten Zellen vor (+/-) und nach der Sortierung. Aufgrund der Sortierung wurde eine Fraktion erhalten, die keine Zellen mit assoziierten SPIOs enthält (-) und eine Fraktion mit SPIO-assoziierten Zellen (+) Unsortierte Zellen zeigen ein hypointenses Signal, wenn sie mit HNK-1 inkubiert wurden, die mit CD15 inkubierten Zellen sind schwach sichtbar. Nach der Sortierung wird eine Anreicherung der CD15⁺- und HNK-1⁺-Zellen deutlich. Aufgetragen wurden jeweils 50 000 Zellen. Die Messparameter der FLASH 3D Sequenzen waren TE = 18 ms, TR = 200 ms, 4 Mittelungen.

In den N2/Euro #1-Zellen zeigen die HNK-1⁺ Zellen einen stärkeren Signalverlust als die CD15⁺ Zellen. Dennoch lassen sich Zellen nach Inkubation mit dem CD15-SPIO Antikörper, der weniger Eisen enthält als der HNK-1-SPIO Antikörper (Material und Methoden; Tabelle 3-1), Zellen anreichern und das hypointense Signal verstärken. Die beiden Negativfraktionen unterschieden sich nicht vom Hintergrund.

4.11 Applikation des Oberflächenrezeptors robo3 aus *Drosophila melanogaster* für die MRT-Bildgebung

Zur Erweiterung der Experimente, die mit der Überexpression des Δ CD4-Rezeptors durchgeführt wurden, wurde das robo3 Protein aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nach der Deletion der am 3'-Ende der cDNA lokalisierten zytoplasmatischen Domänen in CGR8 Zellen überexprimiert. Monoklonale Antikörper, gerichtet gegen einen Bereich innerhalb der extrazellulären Domäne wurden produziert und kovalent an karboxylierte superparamagnetische Partikel konjugiert.

4.11.1 Sequenzanalyse und speziesübergreifende Homologieanalyse der robo3 Rezeptoren

Da das robo3-Protein in verschiedenen Spezies exprimiert wird, wurde vor Beginn der experimentellen Arbeiten eine Homologieanalyse durchgeführt. Das 1342 Aminosäuren umfassende robo3-Protein von *Drosophila melanogaster* (Drme) wurde mit weiteren robo3-Homologae aus verschiedenen Spezies verglichen (Tabelle 4–8). Dazu gehörten *Anopheles gambiae* (Anga), *Danio rerio* (Dare), *Taeniopygia guttata* (Tagu), *Mus musculus* (Mumu), *Rattus norvegicus* (Rano) und *Homo sapiens* (Hosa).

Tabelle 4–8: Speziesübergreifende und vergleichende Homologieanalyse der robo3 Rezeptoren:

Eine Homologieanalyse mittels ClustalW wurde auf Aminosäureebene bei sechs verschiedenen Spezies durchgeführt. Angegeben sind die prozentualen score-Werte für die einzelnen Sequenzen der Insectae *Drosophila melanogaster* (Drme), *Anopheles gambiae* (Anga), den Actinopterygii *Danio rerio* (Dare), den Aves *Taeniopygia guttata* (Tagu) und die Mammaliae *Mus musculus* (Mumu), *Rattus norvegicus* (Rano) und *Homo sapiens* (Hosa)

	Drme	Anga	Dare	Hosa	Mumu	Rano	Tagu
Sequenzlänge	1342	919	956	1386	1344	1305	798
Drme	-	60	31	24	23	24	15
Anga		-	34	31	31	30	14
Dare			-	57	53	53	26
Hosa				-	79	83	40
Mumu					-	92	37
Rano						-	36

Für die Analysen wurde das Programm ClustalW verwendet, das ein multiples Alignment der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen erstellt und die Homologie der Proteine untereinander anhand von prozentualen Score-Werten ermittelt. Es konnte herausgefunden werden, dass eine relativ hohe Homologie der Insekten untereinander existiert, die einen Score-Wert von 60 % aufweisen. Die Vertreter der Spezies Actinopterygii und Mammalia

weisen zu robo3 aus *Drosophila melanogaster* die Score-Werte zwischen 23 % und 31 % auf. Der geringste Score-Wert von 15 % konnte für *Taeniopygiae guttata* ermittelt werden. Bei einem Vergleich der Vertreter der Mammaliae untereinander konnten Homologie zwischen 79 % und 92 % ermittelt werden.

Eine detaillierte Analyse der Antigenbindedomäne wurde in Abbildung 4–165 erstellt. Die Antigenbindedomäne befindet sich bei *Drosophila melanogaster* in dem Bereich AS 317 bis AS 732. Deutlich erkennbar ist an Position 14 bis 30 eine ausgeprägte Identität innerhalb der Vertebratae. Die beiden Vertreter der Arthropoden weisen untereinander eine geringere Homologie zueinander auf, als bei den Chordata, und unterscheiden sich wesentlich stärker von diesem Phylum. Zusammengefasst unter Ermittlung der Score-Werte wurden die Homologieanalysen in Tabelle 4–9. Es konnte eine Abnahme der Homologien bei den Vertretern der Insectae beim Vergleich der Score-Werte der Antigenbindestelle zu dem gesamten Protein identifiziert werden (Tabelle 4–8). Dieser Bereich zeigt im direkten Vergleich der Klassen untereinander höhere Score-Werte, als bei Betrachtung des gesamten Proteins (Tabelle 4–8).

Tabelle 4–9: Vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen der Antigenbindestelle:

Eine Homologieanalyse der Antigenbindestelle wurde auf Aminosäureebene bei sechs verschiedenen Spezies mittels ClustalW durchgeführt. Diese Domäne liegt innerhalb des Aminosäurebereiches As 317 bis AS 732. Angegeben sind die prozentualen Score-Werte für die einzelnen Sequenzen der Familien, wie in Tabelle 4–8 aufgeführt.

	Drme	Anga	Dare	Hosa	Mumu	Rano	Tagu
Sequenzlänge	416	607	290	568	568	568	568
Drme	-	49	31	23	23	25	16
Anga		-	35	26	25	25	24
Dare			-	60	58	58	37
Hosa				-	84	86	46
Mumu					-	93	44
Rano						-	43

```

Mm VAPGANVSFQCETEKGNPPPAIFWQKEGSQVLLFSPSQSLQPMGRLLVSPRGQLNITEVKIGDGG---YYVVCQAVSVAGSILAKALLEIKGASIDGLPPIILQGPANQTLVLG--SSVWLPCR 116
Rn AAPGENVSFQCETEKGNPPPAIFWQKEGSQVLLFSPSQSLQPMGRLLVSPRGQLNITEVKIGDGG---YYVVCQAVSVAGSILAKALLEIKGASIDGLPPIILQGPANQTLVLG--SSVWLPCR 116
Hs AAPGESVAFQCETEKGNPPPAIFWQKEGSQVLLFSPSQSLQPTGRFSVSPRGQLNITAVQRGDAG---YYVVCQAVSVAGSILAKALLEIKGASIDGLPPVILQGPANQTLVLG--SSVWLPCR 116
Dr SAQGRTVTFLCGTKGNPPPAIFWQKEGSQVLLFSPSQSPQRSRFSVLSSGELTITDVHSEDSG---YYICQAVSVAGSILTKALLEVESTPSDRIPPIIIRQGPANQTLAPG--TTAQLQCH 116
Tg ITPGQSVTFQCQSKGNPPPAIFWQKEGSQVLLFSPSQSPQRSRFSVLSSGELTITDVHSEDSG---YYICQAVSVAGSILTKALLEVESTPSDRIPPIIIRQGPANQTLAPG--TTAQLQCH 117
Dm VELGADTSFECRAIGNPKPTIFWTIKNNSTLIFFPAPPDRFHSLNTEEHGSILTLTRFQRTDKDLVILCNAMNEVASITSRVQLSLD--SQEDRPPPIIIISGPVNQTLPIK--SLATLQCK 118
Ag VEAPHDVSEFECKSEGRPKPTTFWSIEGNRTLLIFPGTS--IDRFETTYTQESLTVLTLTQTKSDNGLVIVCSAVNSVGSVSRARLMVA--SQDDRPPPIIIILGPTNQTLPSK--STVSMACN 117
: * * : * * * : * * : : : : : : * * * : * * * : : : *
Mm VIGNPQNIQWKKDERWLQGDDSQFNLMDNGTLHIASIQEM--DMGFYSCVAKSSIGEATWNSWLRKRQEDW--GASPGPATGPSNPPGPSPPIVTEVTANSITLTWKPNPQSG--ATATSY 232
Rn VIGNPQPNVQWKDETWLQDNSQFNLMDNGTLYIASVQEM--DMGFYSCVAKSSIGEATWNSWLRKRREBHW--GASPGPATEPGNPPGPSPPIVTEVTTNSITLTWKPNPQSG--AARATSY 232
Hs VTGNPQPSVRWKKDGQWLQGDDLQFKTMANGTLYIANVQEM--DMGFYSCVAKSSIGEATWNSGWLKMREDW--GVSPDPTEPSPPGAPSQPVVTEITKNSITLTWKPNPQTG--AAVTSY 232
Dr VMGNPLPSIQWERDQRILGIDERISLMENGTLQITALQET--DSGAYTCVASSLSGETSWSGVLTVKESG--GLSASPVSEPYQLPGPPQKPVVTDVTRNSVTLTWQPNAHEGGAAVTSY 233
Tg AHE--PPGSVEWLKDGSALVGQPRASLENGTLQISGLRVR--DSGLYKCVAPTPAGETHWGISLEVQD-----VVWLISSVVNLFLH---VEG--TVLAT 206
Dm AIGLPSPTISWYRDGIPVQ--PSSKLNITTSGDLIISDDLRQQDGLYTCVASSRAGKSTWSGFLRIELPTNPNIKFYRAPEQTKCPSAPGQPKILNATASALTIVWPTSDKAGASSFLGY 237
Ag AVGNPNPFISWLDGNPVV--PSERINITENGTLLLELEKGTDQGLYTCVASSRSGKSTWSAFLRVESPTNPNVNFYRAPEPSEFPSAPGKPQIVNISNSITISWLPSIKSGASDINGY 236
* : * * : * * * : * * : : : : : : * * * : * * * : : : *
Mm VIEAFSQAAGNTRWTVADGVQLETYTIISGLQPNTIYLFLVRAVGAWGLSEPSPVSEEPVQTQ-----DSSLSRPAEDPWKQRGLAEVAVRMQEPTVLGPRTLQVSWTVDGPVQLVQ 343
Rn VIEAFSQAAGNTRWTVADGVQLETHTVSGLQPNTIYLFLVRAVGAWGLSEPSPVSEEPVQTQ-----DSSLSRPVEDPWKQQGLAEVAVRMQEPIVLGPRTLQVSWTVEGGQLVQ 343
Hs VIEAFSPAAGNTRWTVADGVQLETHTVSGLQPNTIYLFLVRAVGAWGLSEPSPVSEEPVRTQ-----DSSPSRPVEDPWRQQGLAEVAVRLQEPIVLGPRTLQVSWTVDGPVQLVQ 343
Dr IIEAFSQASGSTWTVADFVKLEKHTATGLSPNTIYLFIRAVNAYGLSDPSPISEP----- 290
Tg VLQGLVPGVS--YRAEVAAATSAGVGARSAPVIHIAPLVQDVGAGGSS----- 255
Dm SVEMYCTNSRTWIPIASRLSEPIFTVESLTQGAAMFIVRAENSLGFSPPSPISEPITAGKLVGVRDGESTGTSQLLLSDVETLLQANDVVELLEANASDSTARLSWDIDSGOYIEG 357
Ag LIEVFSSDMAKWTTVPFKVSSTSYSPISPNVSYIFIVRAENDQGLIPSLMSDPVSIG-----REFNHGEDINLSEAQATLSSGQVVNLEANATDATSVRLAWEIVNGQYVEG 348
: : : : : : : : : : :
Mm GFRVSWRIAGLDQGSWTMLDLQSPHKQSTVLRGLPPGAQTQIKVQVQGQEGLGAESPFVTRSIPEEAPSGPPQGVVALGGDRNSSVTVSWEPPLPSQRNGVITEYQIWCLGNESRFHLN 463
Rn GFRVSWRIAGLDQGSWTALDVQSPHKQSTVLRGLPPGSQTQIKVQVQGQEGLGAESPSVTRSIPEEAPSGPPQGVVALGGDRNSSVTVSWEPPLPSQQNGVITEYQIWCLGNESRFHLN 463
Hs GFRVSWRVAGPEGGSWTMLDLQSPSQSTVLRGLPPGTQTQIKVQQAQQGEGLGAESLSVTRSIPEEAPSGPPQGVVALGGDNSITVSWEPPLPSQQNGVITEYQIWCLGNESRFHLN 463
Dr ----- 463
Tg ----- 463
Dm FYLYARELHSS--EYKMVTLLNKGQGLSSCTVPGLAKASTYEFFLVPFYKSIVGKPNSRR-----416
Ag FYIYSRKVNSNGTYRLTVLHGG--GASACTINGLEKFTEYFFLVPFYKTIQGRPNSRSTCTLEDVPTASPVNLEAVLLNTSAVYLKWEPPSNSTINGKLKHYHIIRGYDVHNISKVL 467
Mm RSAAGWARSVTFSGLLPGQIYRALVAAATSAGVGVASAPVLVLQLPFPPAEPGPVESEGLAERLAK---VLRKPAFLAGSSAACGALLLGLCAALYRRQKRELSHY----- 568
Rn RSAAGWARSVMFRGLLPGLLYRAVAAATSAGVGVASAPVLVLQLPFPPAEPGPVESEGL AERLSR---VLRKPAFLAGSSAACGALLLGLCAALYRRQKRELSHY----- 568
Hs RSAAGWARSAMLRGLVPGLLYRTLVAAATSAGVGVPSAPVLVLQLPSPPDLEPGLEVGAGL AVRLAR---VLREPAFLAGSSAACGALLLGLCAALYWRRKRELSHY----- 568
Dr ----- 568
Tg -----LTEHLAE---VARQPAFIAGVGGACWVILAFAAWLYSRRRRKKELSHF----- 301
Dm ----- 301
Ag TNMTVDGEAPKLLLANLSAGVTYSVSIAASTKVGIGPYSIPSILRLDPHTRRLDHGYTRY PINHDYSHDILTQTFIILLGSIAIAIVFLFGAIIIFFRIQFMKHSSLNNMHGNHAIGTV 587

```

Abbildung 4-165: Sequenzvergleich der Aminosäuren der Antigenbindestelle des Rezeptors robo3:

Identische Aminosäuren wurden durch Sterne (*) symbolisiert, Doppelpunkte (:) repräsentieren konservierte Aminosäuren an gleicher Position. Semi-konservierte Aminosäure werden mit einem Unterpunkt (.) gekennzeichnet, während keine Identitäten mit einem Punkt (·) versehen wurden. Die Farbuordnung und Abkürzung der einzelnen Aminosäuren ist dem Anhang III zu entnehmen. Die Nummerierung der Aminosäuresequenzen bezieht sich auf die erste Aminosäure der Antigenbindestelle des *D. melanogaster* robo3-Proteins (AS 317)

4.11.2 Produktion, biochemische Reinigung und Konjugation von superparamagnetischen Partikeln an den anti-robo3-Antikörper

Der monoklonale Antikörper, gerichtet gegen einen Abschnitt der oben aufgeführten Antigenbindestelle, wurde von den Hybridomzellen 14C9 in das Kulturmedium sezerniert. Zu Beginn der Experimente wurden die Zellen an ein serumfreies Medium adaptiert. Der Antikörper, bestehend aus einer leichten Kette mit einem Molekulargewicht von 26 kDa und der schweren Kette mit einem Molekulargewicht von 52 kDa wurde mittels Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt. Die verschiedenen Reinigungsschritte wurden in Abbildung 4–166 nach elektrophoretischer Trennung mittels SDS-PAGE dargestellt.

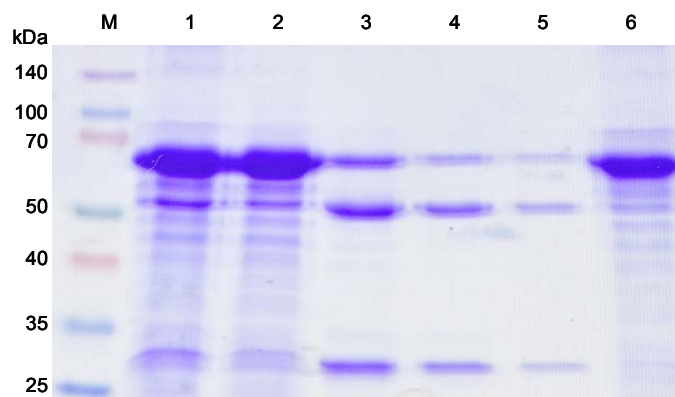


Abbildung 4–166: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der biochemischen Antikörperreinigung:

Der in serumfreiem Medium produzierte robo3-Antikörper wurde nach Ultrafiltration durch Reinigung über eine Protein A-Säule von nicht-IgG-Proteinen isoliert. Aufgetragen wurden: Kulturüberstand nach Ultrafiltration (Spur 1), ungebundene Fraktion nach Protein A-Bindung (Spur 2); Elution der an Protein A gebundenen Antikörper (Spur 3-5). Kommerziell erworbener antikörperhaltiger Überstand (Spur 6).

Der ungereinigte Überstand weist einen hohen Massenanteil von unbestimmten Proteinen auf (Abbildung 4–166, Spur 1). Der prozentual größte Anteil wies eine Größe von etwa 60 kDa auf. Dieser 10 fach konzentrierte Überstand wurde nach der Durchführung einer Ultrafiltration erhalten. Die anschließende Affinitätschromatographie und Elution in drei Schritten führte zu einer Reduktion des Anteils von beiden Antikörperketten in der ungebundenen Fraktion (Abbildung 4–166, Spur 2). Es konnte in den drei Fraktionen nach der Affinitätschromatographie eine deutliche Anreicherung der IgG-Moleküle erreicht werden (Abbildung 4–166, Spur 3-5). Zum Vergleich wurde ein kommerziell erworbener Antikörperenthaltener Überstand aufgetragen (Abbildung 4–166, Spur 6). Der Anteil der schweren- und leichten Antikörperketten war im Vergleich zu den anderen aufgetragenen Proben deutlich geringer.

Der durch Protein A-Chromatographie gereinigte Antikörper wurde mittels Karbodiimid an karboxylierte superparamagnetische Partikel konjugiert.

4.11.3 Deletion der am 3'-Ende der cDNA lokalisierten zytoplasmatischen Domänen des robo3-Proteins aus *D. melanogaster*

Nach Überprüfung der Homologieverhältnisse wurden ein 281 Aminosäuren langer zytoplasmatischer Abschnitt deletiert, in dem sich die Autophosphorylierungsstellen zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade befinden (Abbildung 4–167). Es wurde bei dieser Deletion darauf geachtet, einen möglichst großen Abstand zur Transmembrandomäne zu erhalten, um die Integration des Proteins in die Zellmembran zu gewährleisten.

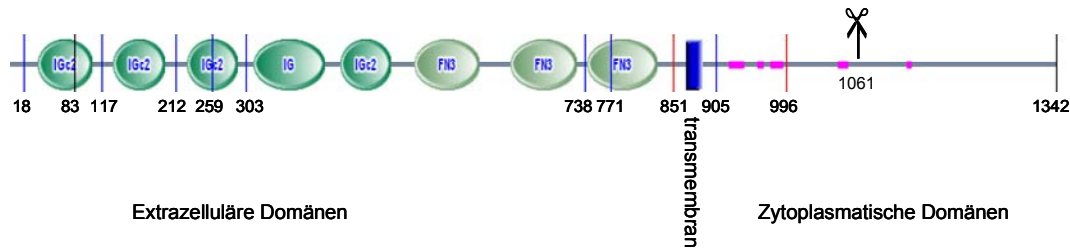


Abbildung 4–167: Deletion der am 3'-Ende der cDNA lokalisierten zytoplasmatischen Domänen des robo3-Proteins:

Zur Inaktivierung der zytoplasmatischen Signaltransduktion wurde an der Position AS 1061 eine Deletion C-terminalen Proteinbereiches vorgenommen. Abbildung modifiziert nach PFAM-Datenbank

Um die Deletion durchzuführen wurde cDNA-Sequenz des Teilabschnittes mittels PCR amplifiziert. Das artifizielle Stopcodon TAG wurde an Basenpaar 3183 angefügt. Eine anschließende Integration der amplifizierten cDNA in das Expressionsplasmid pcDNA3.1(+)-CMV-K79-IRES-Luziferase wurde durchgeführt (Abbildung 4–168 A). Um die Expression des Δ robo3-Proteins und der *firefly*-Luziferase unter einem gewebsspezifisch aktiven Promotor zu erzielen, wurde eine Substitution des CMV-Promotors gegen den humanen Doublecortin-Promotor vorgenommen (Abbildung 4–168 B). Der Promotor weist eine Gesamtgröße von 3500 bp auf, wodurch sich die Größe des pcDNA3.1(+)-CMV-K79- Δ robo3-IRES-Luziferase Plasmids von 11155 bp auf 13845 bp des pcDNA3.1(+)-DCX-K79- Δ robo3-IRES-Luziferase Plasmids erhöhte. Die Plasmide wurden zur Überprüfung sequenziert.

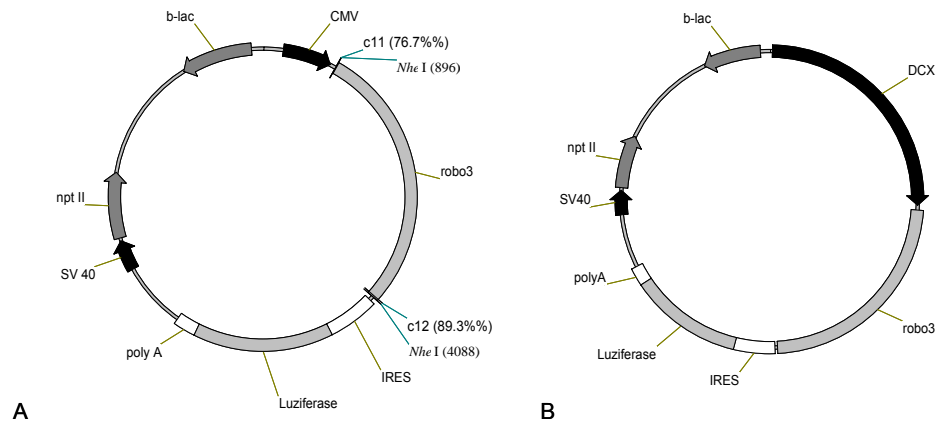


Abbildung 4–168: Genkarten der Plasmide pcDNA3.1(+)-CMV-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase und pcDNA3.1(+)-DCX-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase:

Die verkürzte cDNA für das robo3-Protein wurde nach PCR-Amplifikation in das Expressionsplasmid pcDNA3.1(+)-CMV-K79-IRES-Luziferase integriert (A). Eine Substitution des CMV-Promotors gegen den humanen Doublecortin-Promotors wurde durchgeführt (B).

4.11.3.1 Generierung von Δrobo3- und Luziferase überexprimierenden CGR8 Zellen unter Kontrolle der CMV- und Doublecortin-Promotoren

Zur Transfektion der Plasmide wurde eine optimierte Transfektionsstrategie unter Verwendung des synthetischen Polymers Polyethylenimin (PEI) verwendet. PEI erleichtert den nukleomembranären Transport der gebundenen Nucleinsäuren und erhöht damit die Menge an genomisch integrierten DNA-Fragmenten. Zur Transfektionskontrolle und Quantifizierung des PEI-Einflusses auf die Expressionsrate wurde das Plasmid pcDNA3.1(-)-CMV-mCherry verwendet. 48 h nach Transfektion mittels Metafectene und PEI betrug die Menge an mCherry⁺-Zellen 65 (± 6) %. Ohne die Supplementation von PEI konnten nur 24 (± 4) % mCherry-exprimierende Zellen identifiziert werden.

Aufgrund der Expression der Neomycin-Phosphotransferase II konnten nach einer Selektionsperiode mit G418 antibiotikaresistente Zelllinien isoliert werden. Der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen lag auf der Expressionsuntersuchung der Luziferase und der genomischen Integration. Es wurden innerhalb der hier vorgelegten Dissertation keine weiteren Experimente zur Differenzierung der CGR8 Zellen in neuronale Zelltypen durchgeführt.

Die Expression der Luziferase wurde von 1×10^6 Zellen vor der Selektionierung und $3,4 \times 10^5$ Zellen nach Selektionierung im Luminometer überprüft (Abbildung 4–169). Es konnten zum initialen Zeitpunkt 433 U.L.E. bei der Zelllinie CGR8-CMV-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase detektiert werden. Nach der Selektionierung konnten bei einer geringeren Zellmenge 551 U.L.E. gemessen werden. Bei der identischen Anzahl von Zellen der Zelllinie CGR8-DCX-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase konnten 18 U.L.E. ermittelt werden. Nach der Selektionierung wurde lediglich 1 U.L.E. festgestellt.

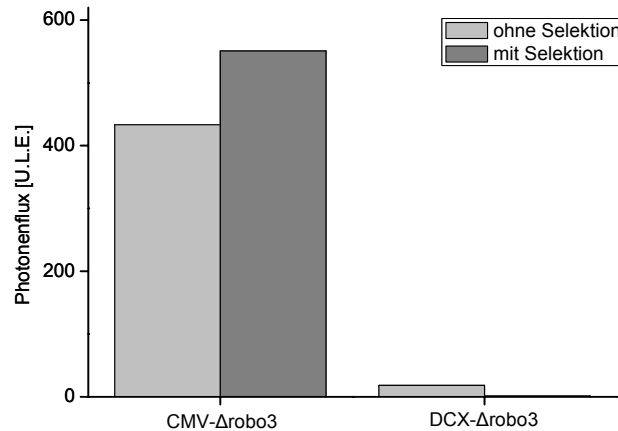


Abbildung 4–169: Luziferaseexpression der transfizierten CGR8-Zellen:

Es wurden 7 Tage nach der Transfektion $1,0 \times 10^6$ Zellen der Zelllinien CGR8-CMV-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase und CGR8-DCX-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase nach Addition von D-Luziferin die Expression der Luziferase ermittelt (hellgrau). Nach Selektionierung mittels G418 wurden $3,4 \times 10^5$ Zellen beider Zelllinien erneut untersucht (dunkelgrau).

Zur Bestätigung der stabilen genomischen Integration des Δrobo3-Gens konnte nach Isolation der Gesamt-DNA ein 600 bp langes Amplifikat in beiden Zelllinien detektiert werden (Abbildung 4–170).

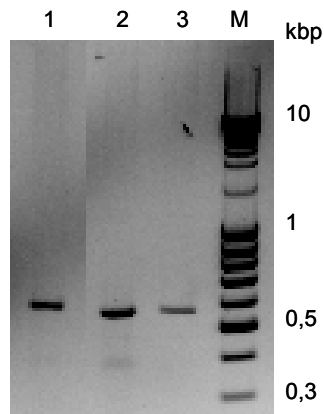


Abbildung 4–170: Nachweis des Δrobo3-Gens in der nukleären DNA der CGR8-Zellen:

Mittels PCR wurde ein Fragment des Δrobo3-Gens in CGR8-CMV-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase (Spur 2) und CGR8-DCX-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase (Spur 3)-Zelllinien amplifiziert. Als Kontrolle wurde das zirkuläre pcDNA3.1-CMV-K79-Δrobo3-IRES-Luziferase-Plasmid verwendet (Spur 1).

Weitere Arbeiten wurden mit den Δrobo3 und Luziferase überexprimierenden ES-Zellen innerhalb der hier vorgelegten Dissertation nicht durchgeführt und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5 Diskussion

5.1 Zelluläre Visualisierung mit optischen und MRT Bildgebungsverfahren

Die Detektion von Biolumineszenz und Fluoreszenz mittels *in vivo* optischen Bildgebungsverfahren stellt eine Möglichkeit für die nicht-invasive Messung von optischen Reportern dar. In dieser Arbeit wurden drei Photonen-Bildgebungssysteme verwendet und für das System der Firma BioSpace Labs zusätzlich eine Illuminationsplattform für *in vitro* Versuche entwickelt. Die Illuminationsplattform verringert den Abstand zwischen zu untersuchender Probe und Kamerasystem um 10 cm, was zu einer deutlich höheren räumlichen Auflösung führte. Durch die Konzentration des Anregungslichts von 12 Kaltlichtfasern auf 4 Kaltlichtfasern wurde zudem eine stärkere Anregung der Proben mit Fluoreszenzlicht und somit auch Emission des Lichtes von dem entsprechend angeregten Fluorochrom erreicht. Es wurde herausgefunden, dass die Abstrahlung des Lichtes in der vom Hersteller vorgegebenen Anordnung von Kaltlichtleitern zu einer inhomogenen Ausleuchtung des Blickfeldes führte. Durch die Verwendung der Illuminationsplattform wurde eine homogenere Ausleuchtung und Erhöhung des detektierten Photonenfluxes nach Anregung um den Faktor 3,7 erreicht (Abbildung 4-3). Durch Verwendung einer standardisierten Mikropartikel-suspension konnte eine lineare Korrelation zwischen Mikropartikelkonzentration und detektiertem Photonenflux nachgewiesen werden (Abbildung 4-4). Bei den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit den vom Hersteller vorgegebenen Einstellungen der höhenveränderlichen Plattform eine Detektion von Mikropartikeln $< 2,1 \times 10^6$ nicht möglich war. Bei Verwendung der optimierten Bedingungen konnte eine Mikropartikelkonzentration von bis zu $5,3 \times 10^5$ Partikeln eindeutig von unspezifischen Hintergrundsignalen abgegrenzt und identifiziert werden.

Die verbesserte Auflösung konnte bei der Verwendung eines zellulären Reportersystems verifiziert werden (Abbildung 4-5). Multizelluläre Tumorzellaggregate, bestehend aus Zellen, die eine Überexpression eines Fluoreszenzproteins aufweisen, wurden in einer Agarosematrix eingebettet und damit räumlich immobilisiert. Die höhere Auflösung und verbesserten Anregungsbedingungen führten zu einer präzisen Abgrenzung und Identifikation einzelner multizellulärer Aggregate und damit zu einer Erhöhung des detektierten Photonenfluxes. Einzelne, kleinere Aggregate konnten ohne die Verwendung der Illuminationsplattform nicht visualisiert werden.

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Detektion von Zellen gelegt, die den Fluoreszenzreporter mCherry überexprimieren. MCherry ist ein monomeres Protein aus der mFruit Serie von Roger Tsien, das eine höhere Photostabilität und eine höhere Anregungs-

wellenlänge und Emission im Vergleich zu der ersten Serie der mFruit Proteine und dem Protein DsRed aufweist [140]. Die maximale Anregungswellenlänge beträgt bei dem mCherry-Protein 587 nm und die maximale Emission wurde bei 610 nm bestimmt. Die Helligkeit des Proteins beträgt 27 % der Helligkeit des DsRed-Proteins. Im Vergleich dazu beträgt die Helligkeit des Proteins dsTomato, ebenfalls aus der mFruits Serie 160 % von DsRed [141]. Die Verwendung von GFP und EGFP als Fluoreszenzreporter für *in vivo* Versuche weist Limitierungen auf, da in dem entsprechenden Emissionswellenlängenbereich der Proteine verstärkt Autofluoreszenz zu detektieren ist [142]. Die Verwendung von Fluoreszenzproteinen, die Emissionswellenlängen > 600 nm aufweisen hat sich für *in vivo* Bildgebungs-Versuche aufgrund des verminderten Anteils von Autofluoreszenz bei der Detektion und aufgrund niedrigerer Absorption im Gewebe, was zu einer erhöhten Lichtpenetration führt, bewährt [143].

In dieser Arbeit wurde die humane Glioblastomzelllinie Gli36 Δ EGFR für die Überexpression des mCherry-Proteins verwendet. Diese Zelllinie weist eine Mutation im p53 Gen auf, die zu einer Inaktivierung des p53-Proteins führt [144]. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Art der Manipulation zu einer Erhöhung der Tumorigenität bei vielen Zelllinien nach der Injektion in das Gehirn von Nacktmäusen führt [145].

Die mCherry überexprimierende Tumor-Zelllinie wurde nach einer Lipofektion mit dem zirkulären Expressionsplasmid pcDNA3.1(+)-CMV-mCherry und anschließender Einzelzellklonierung gewonnen. Die unterschiedlichen Klone wiesen verschiedene Expressionsstärken des mCherry Proteins auf, was anhand des detektierten Photonenfluxes in dem Photonen-Bildgebungssystem NightOwl der Firma Berthold Technologies bestimmt wurde (Abbildung 4-7). Es wurde der Klon #17 für alle weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet, da dieser den höchsten Photonenflux aller untersuchten Zelllinien aufwies.

Es wurden Verdünnungsreihen der Zellen in einem Suspensionsmodell erstellt, wobei Zellmengen zwischen 27 Zellen und 2000 Zellen untersucht wurden (Abbildung 4-8). Eine eindeutige Identifizierung der kleinsten untersuchten Zellmenge von 27 Zellen konnte bei Verwendung der Illuminationsplattform im Photonen-Bildgebungssystem der Firma Biospace Lab deutlich vom Hintergrund diskriminiert werden.

Die Verwendung des Verdünnungsmodells in Vertiefungen von Zellkulturplatten für eine Ermittlung der Korrelation zwischen Zellmenge und detektierbarem Photonenflux wurde in der Literatur beschrieben und vielfach angewendet [146-147]. Für die in dieser Arbeit erstellten Untersuchungen erwies es sich als vorteilhaft eine schwarze Klebefolie anstatt einer Zellkulturplatte zu verwenden, auf der einzelne Tropfen einer Zellsuspension aufgebracht wurden. Die Anwendung dieser Methode führte zu einer Reduktion von Reflexionen des ein- und abgestrahlten Lichtes in Vergleich zu getesteten Zellkulturschalen. Zusätzlich ist eine Konservierung der Proben möglich, wobei allerdings nach Flüssigkeits-

entzug eine höhere Fluoreszenzemission im Vergleich zum ursprünglichen Zustand berücksichtigt werden muss.

Für weitergehende Untersuchungen der multimodalen Koregistrierung, der Signalintensität mittels MRT und des Photonenflusses mittels Photonen-Bildgebungssystem, wurden die Zellen in einer Agarosematrix eingeschlossen und untersucht. Agarose wird für die Erstellung von Phantomen für MRT-Untersuchungen seit langer Zeit verwendet und es konnte von Mitchell et al. nachgewiesen werden, dass eine Beeinflussung des T_2 -Effekts durch die Agarose hervorgerufen wird, während der T_1 -Effekt unter anderem durch supplementierte Substanzen wie Kupfersulfat verändert wird [148]. In dieser Arbeit wurden alle Zellen in MRT-Phantomen mit Agarose eingeschlossen. Erweiterungen oder Veränderungen des verwendeten, auf reiner Agarose basierenden Modells sind möglich, um die T_1 - und T_2 -Werte an, im menschlichen Gewebe detektierte Messgrößen anzunähern [149]. In dieser Arbeit wurden allerdings auch Versuche mit in Agarose eingeschlossenen lebenden Zellen durchgeführt, wobei der Schwerpunkt auf eine nicht-toxische Matrix gelegt wurde und die verwendeten Parameter zwischen fixierten und lebenden Zellen vergleichbar sein sollten. Bei der Kultivierung lebender Zellen wurde 10 % FCS in DMEM supplementiert. Unterschiedliche Zellmengen von fixierten Zellen wurden in der Agarosematrix eingeschlossen und mittels MRT bei einer Feldstärke von 11,7 Tesla untersucht. Für die Visualisierung der Zellen wurde eine Markierung mit dem klinisch zugelassenen Kontrastmittel Endorem vorgenommen. Endorem (Feridex) besteht aus superparamagnetischen Partikeln mit einem Durchmesser von 120 nm bis 180 nm, die eine dextranhaltige Oberfläche aufweisen [150]. Die Eisenkonzentration der Partikelsuspension beträgt $11,2 \text{ mg mL}^{-1}$ [151-152]. Die mCherry⁺-Gli36ΔEGFR Zellen wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen des Kontrastmittels inkubiert, was zu einer intrazellulären Aufnahme der Partikel führte. Die minimal detektierbare Zellmenge der Zellen im MRT konnte nach Erstellung einer Verdünnungsreihe bei der niedrigen Endoremkonzentration bei 500 Zellen bestimmt werden. Bei Inkubation mit der höheren Endoremkonzentration konnten Zellmengen noch unterhalb dieser Grenze detektiert werden (Abbildung 4-10). Die Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten lässt den Schluss zu, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellzahl und dem Verhältnis Kontrast : Gelrauschen vorliegt. Eine gesicherte Aussage ist aufgrund der hohen Standardabweichung allerdings nicht möglich. Ein Vergleich von verschiedenen Echozeiten zeigte eine deutliche Zunahme des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen bei höheren Echozeiten bei mit Endorem inkubierten Zellen (Abbildung 4-11 A1-A3). Die Aufnahmen wurden mit einer Gradientenechosequenz durchgeführt. Die Echozeit wurde verändert, während die Relaxationszeit von $TR = 100 \text{ ms}$ beibehalten wurde. Jede Akquisition eines 3D-Datensatzes nahm einen Zeitraum von 27 min ein. Eine Erhöhung der Mittelungen führte zu einem

generell höheren Verhältnis Kontrast : Gelrauschen, was sich bei einer Zellmenge von 2000 Zellen in einem 1,6-fachen Unterschied im Vergleich zu einer Mittelung darstellte, aber auch zu einer Erhöhung der benötigten Messzeit auf 3,5 h. Bei der Beurteilung der Minimum-Intensitäts-Projektionen der beiden Messungen mit TE = 18 ms und den Mittelungen n = 1 und n = 8 konnte bei n = 1 Mittelungen nur ein minimaler Unterschied in der Identifikation und Abgrenzung der Zellen voneinander beobachtet werden, der die Erhöhung der Messzeit um das 8fache nicht rechtfertigt. Bei dem Vergleich der MRT-Aufnahmen mit einer phasenkontrastmikroskopischen Aufnahme konnte festgestellt werden, dass Bereiche, in denen Zellen in enger Nachbarschaft lagen oder sogar adhärten, die stärkste Veränderung der Signalintensität hervorriefen, während einzeln verteilte Zellen nicht vom Hintergrund abgrenzbar waren (Abbildung 4-11 C1 und C2). Die MRT-Visualisierung von Zellen im Suspensionsmodell, die mit einem Kontrastmittel präinkubiert wurden, wurde vielfach beschrieben [153-156].

In dieser Arbeit sollte der T₂*-Effekt, der bei räumlich eng aneinander liegenden Zellen auftrat, systematisch untersucht werden. Eines der Hauptziele bei dieser Untersuchung war ein Zusammenhang zwischen Zellzahl- und MRT-Signalintensität bei Zellmengen unterhalb von 1000 Zellen zu bestimmen und der Frage nachzugehen, ob sich diese Zuordnung für eine Quantifizierung verwenden lässt und mit optischen Bildgebungsmethoden korreliert werden kann.

Die paramagnetischen Substanzen reduzieren, in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, sowohl T₁ als auch T₂. Aus der Theorie folgt, dass der Einfluss der Relaxativität R eines Kontrastmittels mit der Konzentration C auf T₁ und T₂ im Gewebe wie folgt beschrieben mit R₁ und R₂ als Kontrastmittelspezifische Konstanten wirkt [157]:

$$T_1^{-1}(\text{gemessen}) = T_1^{-1} + R_1 * C$$

$$T_2^{-1}(\text{gemessen}) = T_2^{-1} + R_2 * C$$

Bei diesem Modell wird von einer homogenen Verteilung des Kontrastmittels ausgegangen. Die T₂-Relaxation, die durch superparamagnetische Eisenoxidpartikel verursacht wird, wird allerdings von mehreren Größen beeinflusst, wozu der Partikeldurchmesser, die Materialeigenschaften, die verwendete Echozeit und auch die räumliche Verteilung zählt [158]. Die magnetische Feldinhomogenität, die durch die superparamagnetischen Partikel verursacht wird, dominiert den transversalen Relaxationseffekt, wie durch die Solomon-Bloembergen Theorie verdeutlicht wird [159]. In der Arbeit von Tanimoto et al konnte nachgewiesen werden, dass mit einer Erhöhung der räumlichen SPIO Konzentration ein höherer T₂-Relaxationseffekt nachgewiesen werden konnte. Ähnliche Beobachtungen konnten ebenfalls bei einem Vergleich von isoliertem Leber- und Milzgewebe beobachtet werden [160]

Um den quantitativen Eisengehalt nach Inkubation mit den zwei Eisenkonzentrationen bei Einzelzellen und im Aggregatmodell zu bestimmen, wurde ein spektralphotometrischer

Eisentest verwendet (Abbildung 4-12). Riemer et al konnte in einem Vergleich der Sensitivität des spektralphotometrischen Test und Atomabsorptionsspektroskopie keinen signifikanten Unterschied feststellen [104]. Es konnte nach der Inkubation der Zellen mit der niedrigen Endoremkonzentration eine geringfügig höhere Eisenkonzentration bei den Einzelzellen als bei den multizellulären Aggregaten nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit der höheren Konzentration von Endorempartikeln war kein signifikanter Unterschied in der Eisenkonzentration zwischen Aggregationskultur und Einzelzellkultur detektierbar.

Die Bildung von Aggregaten (Sphäroiden) in Suspensionskulturen stellt eine Kulturform dar, in der die einzelnen Zellen in einer 3-dimensionalen Anordnung organisiert sind und Zell-Zellkontakte und Zell-Matrix-Kontakte ausbilden [161-162]. Innerhalb der Sphäroide findet eine heterogene Organisation von proliferierenden, quieszenten und nekrotischen Zellen statt. Das 3-dimensionale Sphäroidmodell bildet ein Untersuchungssystem für normale und maligne Zellen und repräsentiert die *in vivo* Situation exakter, als es in einer 2-dimensionalen Kulturform möglich ist [163-164].

Es konnten innerhalb dieser Arbeit multizelluläre Aggregate der mCherry⁺-Gli36ΔEGFR-Zelllinie in Gegenwart von Endorem hergestellt werden. Mittels histologischem Verfahren wurde nachgewiesen, dass die Zellen auch innerhalb dieser komplexen Organisationsform bei beiden verwendeten Endoremkonzentrationen die Partikel intrazellulär aufnehmen. Mittels der Berliner-Blau-Färbung und durch immunzytochemische Detektion der Endorempartikel mit einem FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörper konnte die intrazelluläre Lokalisation und Verteilung der Partikel nachgewiesen werden (Abbildung 4-14 und 4-15). Deutlich ist mit beiden Visualisierungstechniken eine inhomogene Aufnahme der Partikel in den Zellen beobachtbar. Einzelne Zellen weisen eine hohe Konzentration der Partikel auf, während andere Zellen eine niedrige Konzentration, oder keine Partikel aufgenommen haben. Dieser Effekt konnte sowohl bei der 2-dimensionalen, als auch bei der 3-dimensionalen Kulturform festgestellt werden (Abbildung 4-14 und 4-15). Die inhomogene Aufnahme der superparamagnetischen Partikel konnte auch in anderen, publizierten Arbeiten beobachtet werden [154, 165]. Die Integrität des Zytoskeletts wurde anhand einer immunzytochemischen Visualisierung nach Inkubation mit einem anti-Vimentin-Antikörper, der Intermediärfilamente markiert, vorgenommen.

Da die multizellulären Tumoraggregate für die optische Detektion der mCherry-Expression verwendet wurden, wurde der detektierbare Photonenflux in Abhängigkeit von der inkubierten Endoremkonzentration ermittelt (Abbildung 4-16). Es konnte kein negativer Einfluss auf die Detektion festgestellt werden. Für die Koregistrierung der Fluoreszenz- und MRT-Signale wurden die mit Endorem inkubierten multizellulären Aggregate in einer mit fötalen Kälberserum angereicherten Agarosematrix immobilisiert. Es konnte eine exakte Zuordnung der Position einzelner Aggregate mit beiden Bildgebungsmodalitäten

vorgenommen werden (Abbildung 4-17). Ein Vergleich der lokalisierten hypointensen Bereiche bei den beiden verwendeten Echozeiten $TE = 5 \text{ ms}$ und $TE = 18 \text{ ms}$ mit den phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen zeigt deutlich, dass eine Identifikation kleiner Aggregate mittels optischen- und MRT-Bildgebungsmethoden möglich ist. Die räumliche Auflösung des MRT mit niedriger Echozeit ist bei der Analyse benachbarter Zellaggregate höher, als die Fluoreszenzbildgebung mittels des Photonen-Bildgebungssystems (weiße Pfeile in Abbildung 4-18). Aufgrund des 3-dimensionalen Datensatzes konnte nach elektronischer Segmentierung eine Rekonstruktion der Aggregate vorgenommen werden, welche die räumliche Distribution der Aggregate in allen drei Dimensionen berücksichtigt (Abbildung 4-19). Diese Analysen sind alleine aufgrund von Daten, die durch Fluoreszenzbildgebung gewonnen wurden, nicht möglich. Durch Berechnung des Volumens der Aggregate aufgrund des mittleren Aggregatdurchmessers konnte eine lineare Korrelation zwischen dem Volumen und detektiertem Photonenflux erstellt werden (Abbildung 4-20). Die Volumenbestimmung wurde unter der Annahme durchgeführt, dass die einzelnen multizellulären Aggregate eine Kugelform aufweisen, was für Aggregate, deren Zellzahl unterhalb von 50 Zellen liegt nicht bestätigt werden konnte. Es wurden ebenfalls multizelluläre Aggregate mit größerem Durchmesser beobachtet, die von einer Kugelform abweichen.

Im Vergleich mit der Anfertigung von Verdünnungsreihen zur Bestimmung der minimal detektierbaren Zellmenge berücksichtigt das hier vorgestellte Modell die räumliche Verteilung der Zellen und deren physiologische Interaktion. Durch die Möglichkeit der mikroskopischen Validierung der sowohl mittels MRT, als auch mit dem Photonen-Bildgebungssystem ermittelten Daten, kann eine exakte Zuordnung der Signalintensitäten zur Zellmenge vorgenommen werden.

Durch die stationäre Fixierung der Aggregate konnte eine longitudinale Analyse der Proliferationsdynamik individueller Aggregate über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt werden (Abbildung 4-21 und 4-22). Bei der vergleichenden Untersuchung von 19 individuellen Aggregaten über vier Tage konnten die individuellen Proliferationscharakteristika der einzelnen Aggregate anhand des Photonenfluxes dokumentiert werden (Abbildung 4-23). Alle untersuchten Zellkonglomerate wiesen bei Versuchsabschluss einen höheren Photonenflux im Vergleich zu den initialen Bedingungen auf. Dieses steht im Gegensatz zu den mit der Echozeit von $TE = 5 \text{ ms}$ erhobenen MRT Daten. Es konnte dabei im Messzeitraum kein linearer Zusammenhang zwischen der Signalintensität und dem ermittelten Aggregatvolumen beobachtet werden (Abbildung 4-24). Interessanterweise konnte bei einigen Aggregaten eine fast vollständige Abnahme der Signalintensität mit dem MRT beobachtet werden, während ein kontinuierlicher Anstieg des Photonenfluxes detektiert wurde (Abbildung 3-24 B). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass mit jeder Zellteilung eine

Verteilung der initial von den Zellen aufgenommenen superparamagnetischen Partikel auf die Tochterzellen stattfindet [166]. Durch die Zellteilungen vergrößert sich das Volumen des beobachteten Aggregates und die nahe räumliche Anordnung der Partikel ist nicht mehr gegeben. Durch die Verwendung des vorgestellten Modells besteht die Möglichkeit, die Veränderung der mittels MRT erhobenen Signalintensitäten aufgrund der Distribution der Endorempartikel unter proliferativen Bedingungen mit dem optisch ermittelten Photonenflux zu korrelieren.

Die Kultur von multizellulären Aggregaten und Analyse mittels multipler MRT-Messungen stellt eine Grundlage zur nicht-invasiven Beobachtung von zellulärer Aktivität dar. Das Wachstums- und Invasionsverhalten von multizellulären Tumorsphäroiden mit Durchmessern zwischen 400 μm und 1 mm wurde bereits 1995 von Brandl et al beschrieben [167]. Es handelt sich bei dieser Studie allerdings nicht um eine Untersuchung, bei der einzelne, individuelle Aggregate über einen Zeitraum hinweg beobachtet wurden. Die Tumorzellen wurden mit fötalen Rattenhirnaggregaten in Suspensionskultur konfrontiert und zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h mittels MRT untersucht. Es konnte eine klare Abgrenzung der beiden Gewebearten anhand der Bestimmung der T_2 -Relaxationszeit durchgeführt werden. In einer kürzlich erschienenen Publikation von Huang et al wurde das Wachstum von Gliomzellen in einem Zeitraum von 12 h, die in einer mit Gadolinium-DTPA angereicherten Kollagen I-Matrix eingebettet wurden, beschrieben [168]. Die Zellen wurden nicht vor den Untersuchungen mit einem MRT-Kontrastmittel inkubiert, wie es für *in vivo* Versuche nötig ist. In einer Studie von Bernas et al wurde die Invasionscharakteristik in einem Kollagen I Gel von einzelnen Gliomzellen, die mit fluoreszierenden, superparamagnetischen Partikeln mit einem Durchmesser von 0,9 μm inkubiert wurden, untersucht [169].

Durch die Bestrahlung mit den sublethalen Dosen 20 Gy und 50 Gy der in der Agarosematrix eingebetteten Tumorzellaggregate konnte eine Abnahme der proliferativen Aktivität mittels Analyse des Photonenfluxes festgestellt werden (Abbildung 4-25). 90 h nach der Bestrahlung konnte nur noch eine geringe Proliferation festgestellt werden, während die Wachstumscharakteristika der unbehandelten Kontrollzellen mit den Werten aus Abbildung 4-20 korrespondierten. Fehlauer et al konnte nach einer Bestrahlung von Tumorzellaggregaten in Suspension mit 10 Gy innerhalb der ersten 10 Tage nach Behandlung eine deutlich verminderte Proliferation der Aggregate beobachten [170], was die in dieser Arbeit erstellten Ergebnisse unterstützt. In weiterführenden Untersuchungen zwischen 10 bis zu 20 Tagen nach der Bestrahlung konnte in der Publikation von Fehlauer et al eine erneute Zunahme der proliferativen Aktivität beobachtet werden. Ein weiterer Vorteil der in dieser hier vorgelegten Dissertation vorgestellten Methodik der Bestrahlung immobilisierter, mCherry⁺-Tumorzellaggregate besteht darin, dass innerhalb einer geringen Messzeit eine sehr große Anzahl heterogener Tumorzellaggregate quantifiziert und individuell untersucht werden kann. Durch

eine zusätzliche Transfektion der Zellen mit der cDNA für die *firefly*-Luziferase könnte aufgrund der ATP-Abhängigkeit der Enzymreaktion der Anteil vitaler Zellen und deren physiologische Eigenschaften untersucht werden [171-173]. Glioblastomzellen weisen eine erhöhte Radioresistenz gegenüber Strahlenbehandlungen auf, die mit einer Erhöhung der CD133⁺ exprimierenden Zellpopulation einhergeht [38, 174]. Eine interessante Studie zeigte bereits 5 h nach Bestrahlung mit einer Isodosis von 10 Gy apoptotische Prozesse in einer distinkten Population von neuronalen Vorläuferzellen im hippocampalen Gyrus dentatus [175]. In einer Studie von Thorsen et al wurde eine selbst hergestellte Schale für die Bestrahlung von Glioblastomzellen, die aus Primärtumoren von Patienten isoliert wurden und als multizelluläre Aggregate kultiviert wurden, vorgestellt. Die Bestrahlung wurde mit den Isodosen 12 Gy und 24 Gy mit einem *Gamma knife*, das für neurochirurgische Präzisionsoperationen verwendet wird, durchgeführt. In dieser Studie konnte nach Transplantation der Aggregate in das Gehirn von Nacktmäusen eine von der Bestrahlungsdosis abhängige Inhibierung des Tumorwachstums beobachtet werden [160]. Innerhalb der hier vorgestellten Arbeit wurden keine weiteren histologischen Untersuchungen mit den Tumoraggregaten erstellt. Durch die Möglichkeit der optischen, nicht-invasiven Bildgebung wäre es möglich, Schlüsselmoleküle innerhalb des apoptotischen Signalweges mittels optischer Bildgebung zu analysieren. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurden die Beteiligungen der Proteine γ H2AX und aktiviertes PARP-1, die aufgrund von niedrigen Bestrahlungsdosen von 5 Gy aktiviert werden, immunzytochemisch nach Paraffineinbettung in Tumorsphäroiden einer Brustkrebszelllinie als verlässliche Markerproteine für Apoptose vorgestellt [176]. Eine weitere Applikation des vorgestellten Modells ist, dass einzelne Sphäroide, die über einen langen Zeitraum hinweg charakterisiert wurden, aus der Matrix isoliert werden können und entweder für eine weitere Kulturapplikation oder eine Charakterisierung des mRNA-Expressionsprofils zur Verfügung stehen.

Für die Ermittlung der exakten minimal detektierbaren Zellmenge mittels optischen- und MRT-Methoden wurden multizelluläre Aggregate mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Sytox green inkubiert und die Zellzahl anhand der Auszählung der Nuklei von multizellulären Aggregaten mit einer Gesamtzellzahl < 25 Zellen bestimmt (Abbildung 4-28). Die mittleren Aggregatdurchmesser wiesen in der Agarosematrix Werte zwischen 14 μ m und 20 μ m auf. Kleinere Aggregate, die aus 15 bis 20 einzelnen Zellen bestehen, weisen mittlere maximale Durchmesser zwischen 45 μ m und 65 μ m auf, wobei die Packungsdichte hoch ist (Abbildung 4-29 B). Die einzelnen Zellen bei Aggregaten mit Zellzahlen bis zu 25 μ m konnten sehr gut manuell ausgezählt werden, da sie sich auf ein bis zwei Zelllagen beschränken. Bei größeren Zellmengen konnte diese Methoden aufgrund der mehrdimensionalen Anordnung nicht mehr durchgeführt werden. Als alternatives Modell für die Korrelation zwischen Zellmenge und Photonenflux wurden Aggregate in 4-Loch-Multikammersystemen ausplattiert

und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert (Abbildung 4-27). Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen die in Abbildung 4-29 erhobenen Daten. Für die Bestimmung von Zellmengen < 20 Zellen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen ermitteltem Photonenflux und absoluter Zellzahl ermittelt werden, wohingegen bei größeren Zellmengen von einer kubischen Funktion zwischen ermitteltem Photonenflux und absoluter Zellzahl ausgegangen werden musste (Abbildung 4-29 C). Die minimale Zellzahl, die anhand von Photonenflussmessungen eindeutig von unspezifischen Hintergrundsignalen diskriminiert werden konnte, lag bei drei Zellen.

Es konnte darüber hinaus eine Korrelation zwischen der mittels MRT bestimmten Signalintensität, dem mittleren Aggregatdurchmesser und der absoluten Zellzahl ermittelt werden (Abbildung 4-29 D bis F). Bei einem Vergleich der Echozeiten $TE = 5$ ms bis $TE = 30$ ms konnte anhand der Abnahme der Regressionskoeffizienten mit zunehmendem TE gezeigt werden, dass sich die kleinste verwendete Echozeit für die Korrelation zwischen Aggregatdurchmesser und ermittelten Signalintensitäten am besten eignete (Abbildung 4-30 und Tabelle 4-3).

In Untersuchungen mit peritonealen Makrophagen und humanen pro-monozytischen Zellen wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Aufnahme von eisenhaltigen Partikeln und der Inkubationszeit und Konzentration in diesen Zelltypen gefunden [177-178]. Es konnte in der Arbeit von Bowen et al gezeigt werden, dass eine Veränderung in R_2 von der Verteilung der Eisenoxid-Partikel und der Konzentration abhängt, während die Veränderung von R_2' nur von der Partikelkonzentration beeinflusst wird. Für die Berechnungen wurden Zellmengen zwischen 1×10^6 und 16×10^6 Zellen, die mit superparamagnetischen Partikeln mit einem Durchmesser von 20 nm inkubiert wurden, verwendet [178]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der Abnahme der Signalintensität bei einer Echozeit von $TE = 5$ ms bei Zellmengen zwischen 3 und 25 Zellen erreicht werden. Der Schwerpunkt lag auf der Kodetektion und Korrelation zwischen dem optischen Signal, das linear mit einer Erhöhung der Zellzahl ansteigt und dem mittels MRT ermittelten Signalintensitäten. Für zukünftige *in vivo* Anwendungen könnte der Zusammenhang zwischen ermitteltem Photonenflux und MRT-Signalintensität, wie in Abbildung 4-29 F gezeigt, sehr interessant sein. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Publikationen veröffentlicht, in denen eine Einzelzellvisualisierung *in vitro* mittels MRT erreicht wurde [166, 179-181]. In einigen dieser Studien wurde eine Vorinkubation mit einem fluoreszierenden Farbstoff vorgenommen oder, wie in der Arbeit von Peldschus et al eine GFP⁺-Zelllinie verwendet [181]. In diesen Publikationen wurde die Fluoreszenz allerdings nicht für eine Korrelation zwischen Zellzahl und MRT-Signalveränderung verwendet, sondern diente nur der Lokalisation von Einzelzellen in der MRT-Probe. Eine interessante Publikation von Lewin et al zeigte die Verwendung von HIV-Tat-Peptid derivatisierten superparamagnetischen

Partikeln mit einem Durchmesser von 45 μm für die Visualisierung von C17.2-Zellen und CD4^+ -Lymphozyten. Einzelne Zellen konnten deutlich identifiziert werden und nach der Injektion von CD34^+ -Zellen in NOD/SCID-Mäuse effektiv aus dem Knochenmark der Versuchstiere mit magnetochromatographischen Methoden reisoliert werden [182].

Die Bestimmung eines Detektionslimits für Zellen, die mit superparamagnetischen Eisenpartikeln vorinkubiert wurden, wird unter anderem durch die Parameter Feldstärke, Kontrast : Gelrauschen, die verwendete Pulssequenz und die Akquisitionsparameter beeinflusst [183]. In Studien von Foster et al und Heyn et al konnte durch die Verwendung der 3D-FIESTA-Sequenz einzelne, mit SPIOs präinkubierte Zellen *in vitro* und *in vivo* identifiziert werden [183-185].

Zur Simulation von Absorption und Streuung von emittiertem Licht, wie es in Geweben vorkommt, wurden mCherry⁺ multizelluläre Aggregate mit verschiedenen Konzentrationen von heparinisierendem Vollblut gemischt und in einem Agarosephantom sowohl mit optischen- als auch mit MRT-Methoden untersucht (Abbildung 4-31). Die Verwendung von Vollblut wurde als etabliertes Modell bereits vielfach verwendet, da realistische Gewebespektren erhalten werden können. Allerdings ist die Stabilität und damit die Haltbarkeit des optischen Gewebephantoms begrenzt [186-187]. Es konnte eine deutliche Abnahme des detektierten Photonenflusses von den multizellulären Aggregaten bei den Konzentrationen 1 % und 10 % humanem Vollblut detektiert werden (Abbildung 4-31). Die Konzentration von 10 % Vollblut liegt deutlich über dem Gesamt-Blutvolumen von 4 %, das im Gehirn bestimmt worden ist [188]. Bei der MRT-Messung konnte kein Unterschied bei den verschiedenen Konditionen ermittelt werden. Hämoglobin und oxygeniertes Hämoglobin gehören zu den Molekülen, die in biologischen Geweben hauptsächlich für die Absorption im sichtbaren und nahinfraroten Wellenlängenbereich verantwortlich sind. Zur detaillierten Untersuchung wurde eine Suspension von Mikropartikeln, die mit einem rot fluoreszierenden Fluorochrom konjugiert wurden, verwendet. Ohne die Applikation von Vollblut konnte bei Mikropartikelkonzentrationen zwischen 0 und 6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ eine lineare Korrelation mit dem detektierten Photonenfluss ermittelt werden (Abbildung 4-32). Bei der Suspension der Mikropartikel in Vollblut wurde innerhalb der Konzentrationen von 2 %- 5 % Vollblut eine deutliche Abnahme des detektierten Photonenflusses detektiert (Abbildung 4-33). Bei Konzentrationen zwischen 5 % und 8 % konnte ein Photonenfluss von etwa 4900 U.L.E. bei jeder untersuchten Blutkonzentration detektiert werden. Bei den in Abbildung 4-33 dargestellten Werten für den Photonenfluss wurden die unspezifisch detektierten Hintergrundwerte bereits subtrahiert, so dass von einer unspezifischen Streuung des emittierten Fluoreszenzlichtes ausgegangen werden muss. Bei einer Konzentration von 100 % Vollblut konnten die detektierten Photonenwerte nicht mehr vom Hintergrund diskriminiert werden. Eine genauere Analyse

innerhalb des Bereiches 10 % und 99 % Vollblut wurde nicht durchgeführt und muss in zukünftigen Experimenten berücksichtigt werden.

Um den Einfluss einer länger als 20 h anhaltenden Inkubationszeit mit Endorem auf die Signalauslöschung der multizellulären Aggregate zu untersuchen, wurden die Gli36 Δ EGFR-mCherry⁺ Zellen für 5 Tage in Gegenwart von 224 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Endorem kultiviert, was zu mittleren Durchmessern von bis zu 1 mm führte. Ein weiterer Schwerpunkt der Experimente lag auf der Fragestellung, ob eine Diffusion von superparamagnetischen Partikeln in das Zentrum von großen Aggregaten stattfinden kann, wie für die Substanzen Vinblastin und 5-Fluoruracil beschrieben wurde [189]. Es konnte in den durchgeführten Experimenten nachgewiesen werden, dass ein deutlich stärkerer Einfluss auf den detektierten Signalverlust bei Aggregaten, die kontinuierlich in Gegenwart des Kontrastmittels kultiviert wurden, ausgeübt wurde als wenn das Kontrastmittel nach einer Kultivierungszeit von 4 d für 24 h appliziert wurde (Abb. 34). Bei dem Vergleich der beiden Echozeiten konnte bei TE = 5 ms wie in bereits beschriebenen Experimenten ein ausreichend starker Kontrast erzielt und eine Abgrenzung benachbarter Aggregate sichergestellt werden (Abbildung 4-34 B und C). Durch den ausgeprägten Blooming-Effekt konnte bei den Aggregaten, die kontinuierlich in Gegenwart von Endorem kultiviert wurden bei der höheren Echozeit keine distinkte Lokalisation einzelner Aggregate durchgeführt werden. Aufgrund der Analyse der einzelnen Schichten mit einer Schichtdicke von 78 μm konnte festgestellt werden, dass bei der zusätzlichen 24 h Inkubation mit Endorem nur in dem äußeren Rand der Aggregate eine MRT-Signalauslöschung festgestellt werden konnte, während ein hyperintenser Bereich im Zentrum des Aggregates beobachtet wurde (Abbildung 4-35 A). Bei den Aggregaten, die kontinuierlich in Gegenwart des Kontrastmittels kultiviert wurden, konnten diese Effekte nicht beobachtet werden (Abbildung 4-35 B). Durch diese selektive Signalauslöschung am Aggregatrand konnten geometrische Übereinstimmungen zwischen MRT-Aufnahmen und mikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden (Abbildung 4-36).

Die Untersuchung von Aggregaten mit einem Durchmesser zwischen 400 μm und 1 mm bietet die Möglichkeit, das Diffusionsverhalten von Kontrastmitteln zu untersuchen, wie in dieser hier vorgelegten Arbeit gezeigt werden konnte. Kotitschke et al konnte ¹H NMR-spektroskopische Untersuchungen an multizellulären Aggregatsuspensionen durchführen und dabei Unterschiede bei einzelnen Metaboliten zwischen 3-dimensionaler und 2-dimensionaler Kultur vergleichen [190]. Eine zukünftige Applikation des, in dieser Arbeit vorgestellten Modells, in der einzelne, in der Agarosematrix immobilisierte Aggregate kontinuierlich untersucht werden können, wäre individuelle Aggregate mit spektroskopischen Untersuchungen im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Es lassen sich nekrotische Areale innerhalb des multizellulären Tumoraggregates nachweisen, die eine ausschließliche Beschreibung des Proliferationsverhaltens der Aggregate aufgrund von mittleren Durch-

messern und berechnetem Volumen erschweren [191]. Nach einer längeren Kultivierungszeit und dem Auftreten eines nekrotischen Zentrums wurde eine Repopulation des nekrotischen Areals beschrieben, die mit der Expression von VEGF innerhalb dieser Zone korrelieren könnte [191-192]. Das multizelluläre Aggregationsmodell weist ein erstklassiges Modell für die Untersuchung heterologer Zell-Zellinteraktionen in der Tumorbilogie auf [193]. Darüber hinaus können neurale Vorläuferzellen im 3-dimensionalen Aggregatmodell kultiviert werden, wobei auch eine heterogene Zusammensetzung und die Präsenz von apoptotischen Zellen beschrieben wurde [194-195]. Experimentelle neurobiologische Fragestellungen, wie das Verhalten von neuronalen Vorläuferzellen in räumlicher Nachbarschaft zu nekrotischen Arealen, wie beim Schlaganfall *in vivo* beschrieben, könnten mittels des in dieser Dissertation vorgestellten Modells in zukünftigen Arbeiten experimentell untersucht werden. Damit bietet sich eine ähnliche Untersuchungsplattform, wie bei den Tumoraggregaten, die mit den in vorliegender Arbeit vorgestellten Methoden zur Kombination verschiedener Bildgebungsmodalitäten im zeitlichen Verlauf und unter Verwendung von molekularbiologischen Visualisierungstechniken untersucht werden können.

5.2 HIV-1 basierende lentivirale Systeme zur effektiven Transduktion unterschiedlicher Zelltypen

Im Rahmen der vorgestellten Arbeit wurde prälentivirale DNA und aktive Lentiviren mit verschiedenen Reportergenen für die optische Bildgebung generiert. Lentivirale Systeme basieren auf dem humanen Immundefizienz Virus-1 (HIV-1). In der vorliegenden Arbeit wurde ein lentivirales System der 3. Generation verwendet. Für die Herstellung der infektiösen Partikel wurden 293T-Zellen mittels der Kalziumphosphat-Methode mit dem Transfervektor, dem HIV gag/pol Verpackungskonstrukt, einem rev-Expressionsplasmid und dem VSV-G Expressionsplasmid transfiziert [97-98].

Die Expression des Fluoreszenzproteins mCherry wurde mit der Expression Puromycin-N-Acetyltransferase durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle verknüpft. Die prinzipielle Transduktionseffizienz des generierten Virus wurde an der murinen Brustkrebszelllinie SMF, an einer immortalisierten humanen neuronalen Vorläuferzelllinie und an der humanen Glioblastomzelllinie Gli36 Δ EGFR überprüft. Alle drei Zelllinien wurden mit einer „multiplicity of infection rate“ (MOIs) zwischen 1 und 5 transduziert, was in einer Transduktions-Effizienz zwischen 80 % und 95 % resultierte. Bei der Verwendung einer MOI von 1 wird rechnerisch davon ausgegangen, dass ein Virus eine Zelle transduziert. Daraus folgt, dass bei der Verwendung einer höheren MOI mehrere infektiöse Partikel eine einzelne Zelle transduzieren können. Mit der Supplementierung von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Puromycin konnte bei der SMF-Brustkrebszelllinie eine effektive Selektionierung aufgrund der Expression der Puromycin-N-Acetyltransferase, die stromabwärts der internen ribosomalen Eintrittsstelle

lokalisiert ist, nachgewiesen werden (Abbildung 4-38). Sechs Tage nach Beginn der Selektionierung konnte eine stabil mCherry exprimierende Zelllinie gewonnen werden. Die effiziente Selektionierung mittels Puromycin konnte in anderen Arbeiten bereits dokumentiert werden [196]. In der hier vorgelegten Dissertation wurde in allen lentiviralen Plasmiden, in denen eine Antibiotikaresistenz verwendet wurde, die Puromycin-N-Acetyltransferase gewählt, um die spätere Möglichkeit einer effektiven Selektionierung bei einer Transduktion von neuronalen Vorläuferzellen auszunutzen, die unterschiedliche Generationsverdopplungsraten, auch < 20 h aufweisen [197]. Um die Ko-Expression zweier optischer Bildgebungsreporter zu untersuchen, wurde unter Kontrolle des CMV Promotors mCherry kloniert und zusätzlich stromabwärts eines IRES-Elementes das grün fluoreszierende Protein GFP verwendet (Abbildung 4-40). Die Expression beider Fluoreszenzproteine konnte nach der Transfektion von 293T-Zellen in jeder Zelle deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 4-41 A). Nach der intrazerebralen und subkutanen Transplantation der Zellen in eine Nacktmaus konnte die Lokalisation der Tumoren anhand der mCherry-Fluoreszenz *in vivo* bestimmt werden. Es konnte allerdings keine spezifische Emission des grün fluoreszierenden Proteins im lebenden Versuchstier detektiert werden (Abbildung 4-41 B). Dieses Tierexperiment wurde nur einmalig durchgeführt und die resultierenden Ergebnisse können daher nicht zur Formulierung einer allgemeingültigen Aussage verwendet werden. Die GFP-Expression ist im Vergleich zur Expression des mCherry Proteins schwächer, was ebenfalls nach Transduktion von 293T-Zellen mit einer MOI von 1 mit dem aktiven Virus dokumentiert werden konnte (Abbildung 4-42). Es wurden bei Verwendung des IRES Elementes in bicistronischen Reportervektoren unterschiedliche Aktivitäten, die zwischen 6 % und 100 % liegen, für den Reporter stromabwärts des IRES-Elements relativ zum Reporter, der stromaufwärts lokalisiert ist liegen, berichtet [198-201]. Es wurden Differenzen in den Sequenzen der unterschiedlich verwendeten pIRES-Plasmiden festgestellt, die zu schwach aktiven IRES-Elementen, im Vergleich zur originalen Sequenz des IRES Elements aus dem Enzephalomyelitivirus, führten [202]. Es konnte gezeigt werden, dass das IRES-Element aus dem Enzephalomyelitivirus zu einer höheren Initiierung der ribosomalen Translation führt, als jedes andere bekannte IRES-Element oder eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe beinhaltende mRNA [198]. Die in vorliegender Arbeit verwendete IRES-Sequenz entsprach der originalen Sequenz des IRES-Elementes, wie durch durchgeführte Sequenzanalysen bestätigt werden konnte.

Da in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung eines IRES Elementes eine Koexpression von HA-Ferritin und Luziferase durchgeführt wurde (Siehe Kapitel 4.5), wurde als Kontrollvektor und Kontrollvirus ein Luziferase und Puromycin koexprimierender Vektor generiert (Abbildung 4-43). Nach Selektionierung mittels Puromycin wurde eine Einzelzellklonierung durchgeführt, um Zelllinien zu isolieren, die konstant hohe Expressionsstärken des Reporters

aufweisen. Eine Übersicht von 10 unterschiedlichen Zellklonen wurde in Abbildung 4-44 vorgestellt. Die Durchführung von Einzelzellklonierungen stellt eine zeitaufwändige Prozedur dar und kann nicht bei Zellen, die eine definierte Zelldichte für die Mitose benötigen, angewendet werden [203]. Eine interessante Ergänzung zur Isolation von transfizierten oder transduzierten Zelllinien wurde von Wirth et al 1988 vorgestellt, in der zwei unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene für die Selektionierung von Zellen, die eine große Anzahl von Kopien in das Genom integriert haben, verwendet werden [204].

Für die Pseudotypisierung der lentiviralen, infektiösen Partikel wurde das Oberflächen-glykoprotein des *Rhabdovirus* vesikulären Stomatitisvirus (VSV-G) verwendet, da dieses Protein eine hohe Stabilität aufweist und die Infektion unterschiedlicher Zell- und Gewebetypen durch die Interaktion mit einem Zellmembranlipid gewährleistet [205-206].

5.3 Herstellung und Funktionsüberprüfung eines liposomalen Systems für den effektiven Transport von superparamagnetischen Partikeln

In der hier vorgelegten Arbeit wurden grundsätzliche Arbeiten zur effektiven Aufnahme von karboxylierten superparamagnetischen Partikeln mit einem selbst hergestellten liposomalen Transfersystem vorgestellt. Durch die Verwendung des Cholesterinderivates 3 β [N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-Cholesterol (DC-Chol) und des Phospholipids 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphorylethanolamin (DOPE) konnten Liposomen mit einem Durchmesser von 150 nm bis 200 nm hergestellt werden. Die durch Ultraschallbehandlung gebildeten Liposomen wurden mittels Negativ-Kontrastierung elektronenmikroskopisch validiert (Abbildung 4-46). Es konnte nach Inkubation von 293T-Zellen gezeigt werden, dass für eine intrazelluläre Aufnahme der superparamagnetischen Partikel die Vorinkubation der Partikel mit den generierten Liposomen nötig ist (Abbildung 4-47). In verschiedenen Arbeiten wurde eine effektive Aufnahme von eisenhaltigen Partikeln unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Lipofektionsmitteln beschrieben, wobei jedoch in diesen Fällen die Liposomen mit den eisenhaltigen Partikeln suspendiert und anschließend appliziert wurden [154, 207-208]. Neue Entwicklungen führen zu der Generierung von superparamagnetischen Partikeln, bei denen Oberflächenmodifikationen durchgeführt wurden oder zur Verwendung von viralen Oberflächenproteinen, durch die eine Lipofektion nicht mehr notwendig ist [209-210]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt darauf gelegt, die liposomal vermittelte intrazelluläre Aufnahme von Eisenoxidpartikeln in einer etablierten neuronalen Zelllinie und den 293T-Zellen zu steigern und mittels Hochfeld-MRT zu quantifizieren. Die Addition der SPIOs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Präparation der Liposomen wurde analysiert (Abbildung 4-48). Anhand von Minimal-Intensitäts-Projektionen mit anschließender Analyse

des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen der T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen von erstellten Verdünnungsreihen konnte herausgefunden werden, dass die Zugabe zum Zeitpunkt der ultraschallvermittelten Liposomenausbildung zur effektivsten intrazellulären Aufnahme der Partikel führte. Die Quantifizierung des intrazellulären Eisengehaltes mittels spektralphotometrischer Methoden und die immunzytochemische Analyse unter Verwendung eines anti-Dextran-Antikörpers bestätigen die MRT-Analysen (Abbildung 4-48 C und Abbildung 4-49). Zum Vergleich des selbst hergestellten Lipofektionsmittels wurde das kommerziell erhältliche Lipofectamin verwendet. In dem direkten Vergleich konnte eine höhere Effizienz der Aufnahme von SPIOs mit dem selbst hergestellten Lipofektionsmittel erreicht werden. Lipofectamin ist ein vielfach verwendetes und hocheffektives Lipofektionsmittel, das aus dem zwei Komponenten DOPE und (2'-(1'',2''-Dioleoyloxypropyldimethyl)-Ammoniumbromid)-N-Ethyl-6-Amidospermin Tetratrifluorsäure im Mischungsverhältnis 1 : 3 besteht [211-212]. Rudelius et al konnte mittels eines Gemisches von Lipofectamin und Lipofektin zur Lipofektion von Gd-DTPA Markierungseffizienzen von bis zu 83 % in einer murinen embryonalen Stammzelllinie erreichen [211]. Mit dem selbst generierten Lipofektionsmittel, das in der hier vorgelegten Dissertation verwendet wurde konnten bei PC12-Zellen und 293T-Zellen eine Transfektionseffizienz bei Verwendung von superparamagnetischen Partikeln von etwa 90 % erreicht werden. Die Applikation des Systems bei embryonalen Stammzellen und neuralen Vorläuferzellen wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die 293T-Zellen zeichnen sich durch ein vielfach höheres Zytoplasma zu Zellkern-Verhältnis im Vergleich zu den PC12-Zellen aus, die wesentlich kleinere Durchmesser aufweisen. Der liposomal vermittelte Transport wurde mit dem selbst hergestellten Lipofektionsmittel bei diesen Zellen untersucht und es konnte überraschenderweise herausgefunden werden, dass im Vergleich der 293T-Zellen mit den PC12 Zellen ein doppelt so hohes Verhältnis des Kontrast : Gelrauschens bei den 293T-Zellen beobachtet wurde, der Eisengehalt aber nahezu identisch war. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich durch den größeren Durchmesser der 293T-Zellen zu den PC12-Zellen erklärbar. Liposomen können auf einfache Weise mit Fluorochromen dotiert werden, so dass die intrazelluläre Verteilung und Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden kann [213]. Das Fluorochrom 5-(und 6-)Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester wurde sowohl für die Konjugation der primären aminoterminalen Gruppe an der Kopfgruppe des Dioleoylphosphatidylethanolamins verwendet, als auch für eine direkte Konjugation an superparamagnetische Partikel (Abbildung 4-51 und Abbildung 4-52). Nach Inkubation von PC12-Zellen konnte eine intensive Fluoreszenz visualisiert werden, welche die intrazelluläre Aufnahme der Partikel beweist und sich damit die intrazelluläre Lokalisation unabhängig von immunzytochemischen Nachweisen auch unter vitalen Bedingungen durchführen lässt.

5.4 Überexpression polycistronischer mRNA mittels lentiviraler Transduktion

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die N-terminal mit Hämagglutinin fusionierte schwere Kette des humanen Ferritinmoleküls für die MRT-Bildgebung verwendet. Es konnten sowohl Expressionsplasmide, als auch aktive Lentiviren generiert werden, die durch Verwendung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle die Expression des HA-Ferritins mit der Expression der *firefly*-Luziferase verbinden (Abbildung 4-53 und Abbildung 4-54). Zusätzlich zu diesen bimodalen Vektoren und Lentiviren wurden zwei multicistronische Lentiviren konstruiert, in denen die zusätzliche Einführung eines weiteren IRES-Elements die Expression der Puromycin-N-Acetyltransferase (Abbildung 4-54 A) oder des grün fluoreszierenden Proteins (Abbildung 4-54 B) kontrolliert. Es konnte bei der Produktion der Viren in 293T-Zellen eine deutliche Abnahme des Virustiters auf 76 ng mL^{-1} bei dem Virus mit der Puromycin-N-Acetyltransferase und eine Abnahme des Virustiters auf 29 ng mL^{-1} bei dem GFP enthaltenden Virus ermittelt werden. Die Viruskonzentrationen wurden in allen Fällen mittels einer p24-HIV-ELISA bestimmt und es wurde die identische Ausgangsmenge der Komponenten des 3-Plasmidsystems verwendet. Bei der Produktion von Viren, die ein translationales *cis*-acting Element enthielten, wurden üblicherweise Virustiter von $> 200 \text{ ng mL}^{-1}$ erzielt. Zhu et al konnte bei der Expression einer polycistronischen mRNA durch ein IRES-Element keine Reduktion des Virustiters feststellen [214]. Somit können die niedrigen Virustiter, die bei Expression der polycistronischen mRNA auftraten, ein Hinweis darauf sein, dass die zusätzliche IRES-Element abhängige Expression von drei Cistronen bei der Virusproduktion problematisch wirken kann. 293T-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit dem LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-Puromycin-N-Acetyltransferase und dem LV-CMV-HA-Ferritin-IRES-Luziferase-IRES-GFP transduziert. Zwei Tage nach Transduktion konnte eine deutliche Expression des GFP fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Abbildung 4-55 A). In bisher publizierten Arbeiten wurden hauptsächlich bicistronische Lentiviren für die Expression der polycistronischen mRNA generiert, in denen ein IRES-Element als *cis*-acting Element verwendet wurde [214-218]. Es wurden bisher wenige Arbeiten publiziert, in denen multicistronische HIV-1 basierende Lentiviren mit der Expression von mehr als zwei mRNAs generiert- und verwendet wurden. Chinnasamy et al konnte die erfolgreiche Generierung von aktiven tricistronischen Lentiviren, unter Verwendung des humanen Phosphoglyzerat-Promotors, eines IRES-Elementes und des Spaltungsfaktor 2A zeigen [219]. Der Spaltungsfaktor 2A wurde aus dem Maul- und Klauenseuche-Virus, einem *Picornavirus* isoliert und kann zur unabhängigen Expression zweier funktionsfähiger Proteine von einer multicistronischen mRNA verwendet werden [220]. Es wurden weiter Arbeiten zur Generierung trimodaler Viren in den letzten Jahren publiziert, bei denen allerdings keine zwei IRES-Elemente verwendet wurden, sondern eine Kombination zweier *cis*-acting-Elemente [221-

223]. Die in vorliegender Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Generierung multicistronischer Lentiviren sind damit die ersten Ergebnisse zur Verwendung von zwei IRES-Elementen und dem CMV-Promotor zur Expression einer polycistronischen mRNA. Unabhängig von der viralen Transduktion konnte die Expression aller drei Reporterproteine nach Transfektion in 293T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-55 B und C).

5.5 Überexpression der schweren Kette des Ferritinmoleküls in humanen Gli36 Δ EGFR Glioblastomzellen

Durch die Klonierung der HA-Ferritin-IRES-Luziferase-Reporterkassette in einen prälentiviralen Vektor ohne ein weiteres IRES Element und ohne das Puromycin-N-Acetyltransferasegen, konnte bei der Lentivirusproduktion in 293T-Zellen ein Virustiter von 417 ng mL^{-1} erzielt werden. Die humane Glioblastomzelllinie Gli36 Δ EGFR wurde mit unterschiedlichen MOI transduziert. Nach der Extraktion der zellulären Proteine konnte über eine Bestimmung der Luziferaseaktivität die erfolgreiche Transduktion verifiziert und eine von der viralen Partikelkonzentration abhängige Expression der Luziferase beobachtet werden (Abbildung 4-58). Bei den HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Tumorzellen wurde ein verändertes Adhäsionsverhalten und eine reduzierte proliferative Aktivität der transduzierten Zellen dokumentiert. Vier Stunden nach der Aussaat konnten in den transduzierten Zellen ein erhöhter Anteil von Zellen mit flacher, epithelialer Morphologie detektiert werden (Abbildung 4-59). Die beobachteten Effekte sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Expression des HA-Ferritins zurückzuführen, da die immunzytochemische Analyse mittels eines Hämagglutinin spezifischen Antikörpers die Expression des Hämagglutinins in Zellen mit einer Morphologie, die den Zellen aus Abbildung 4-58 entsprechen, zeigt (Abbildung 4-59). Dabei ist ein deutlicher Unterschied zwischen der MOI von 0,2- und 5 erkennbar (Abbildung 4-59 G und 4-59 H). Cozzi et al konnte bei der Überexpression der schweren Kette des humanen Ferritins in Hela-Zellen ebenfalls eine Reduktion der Proliferation feststellen, die durch eine exogene Eisensupplementation über einen Zeitraum von 4 d wieder aufgehoben werden konnte [224]. Eine exogene Supplementation mit 2 mM FAC, die in diesem initialen Experiment kurz nach der Transduktion, durchgeführt wurde, führte zu einer Steigerung der Proliferation (exakte Analyse zur Supplementation von FAC: Kapitel 4.5.4) Es ist bekannt, dass Tumorzellen, die eine hohe Generationsverdopplungszahl aufweisen, eine erhöhte Ribonukleotid Reduktase Aktivität und damit einen erhöhten Eisenmetabolismus aufweisen [225]. Durch die Applikation des Eisenchelators Desferrioxamin konnte eine Arretierung des Zell-Zyklus in der G1-Phase bei Gliomzellen nachgewiesen werden [226]. Desferrioxamin wurde zur klinischen Behandlung von Neuroblastomen und akuter Leukämie verwendet, es bestehen allerdings Hinweise darauf, dass eine Verwendung dieses Eisenchelators bei Gliomen nicht angezeigt ist [227-229]. Innerhalb der hier vorgelegten Arbeit wurden *in vitro*

Experimente mit Desferrioxamin durchgeführt, um die zytoplasmatisch lokalisierten und nicht Ferritin-gebundenen Eisenatome zu entfernen. Es konnte allerdings bei Bildgebungsexperimenten nach exogener Supplementation von FAC kein Unterschied beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist damit begründbar, dass 1 Molekül Desferrioxamin 1 Eisenatom cheliert, der Komplex aber nicht mehr die Zellmembran passieren kann und damit zytosolisch arretiert wurde.

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit der Antibiotikaselektion wurden die Zellen, die mit der MOI 1 transduziert wurden, durch Kolonienisolation selektioniert und eine Zelllinie Gli36 Δ EGFR-2/C3 gewonnen, die eine starke Expression der Luziferase und des HA-Ferritins aufwies (Abbildung 4-60). Bei der Kolonienisolation wurden mittels eines Filterpapiers Zellkolonien selektiv von den anderen Kolonien getrennt und expandiert. Die Methode stellt eine Alternative zur Verwendung von Klonierungszyklindern dar, wobei die Handhabungsschritte ähnlich sind [230]. Zur Bestimmung der mittels Biolumineszenz-Bildgebung minimal detektierbaren Zellmenge wurden Verdünnungsreihen zwischen 1×10^5 Zellen und 1000 Zellen erstellt. Als Referenzzelllinie wurde die, ebenfalls lentiviral transduzierte Zelllinie 4/2 verwendet, die eine wesentlich stärkere Luziferaseexpression im Vergleich zu der Zelllinie 2/C3 aufwies (Abbildung 4-61). 5000 Zellen der HA-Ferritin⁻- und Luziferase⁺-Zelllinie konnten unter Verwendung eines Luminometers und des Photonen-Bildgebungssystems vom Hintergrund unterschieden werden.

Die HA-Ferritin und Luziferase überexprimierenden Gli36 Δ EGFR-Zellen wurden in einem serumhaltigen Medium mit zusätzlicher Supplementation von 2 mM FAC kultiviert und mittels DAB verstärkter Berliner-Blau-Färbung (Abbildung 4-62) und MRT mit einer Echozeit von TE = 18 ms untersucht (Abbildung 4-63). Nach 37 h Inkubation der Zellen konnte bei den HA-Ferritin überexprimierenden Zellen eine starke zelluläre Akkumulation von Eisen im Vergleich zu den HA-Ferritin⁻-Tumorzellen beobachtet werden. Die MRT-Analyse zeigte deutlich, dass HA-Ferritin⁺-Zellen eine stärkere Abnahme der Signalintensität aufwiesen als Kontrollzellen, wenn diese in Gegenwart von FAC kultiviert wurden. Auffällig dabei ist allerdings, dass die Kontrollzellen ebenfalls im Vergleich zu Zellen, die nicht mit FAC inkubiert wurden, verstärkt Eisen aufgenommen haben. Die Berechnung der T₂-Relaxationszeit von allen untersuchten Proben konnte die Unterschiede, die bei Analyse der Signalintensitäten eindeutig dargestellt wurden, nicht belegen. Ein Grund für die Diskrepanz der Daten, die mit der T₂-Mappe und der FLASH-3D Sequenz erhoben wurden, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an einer verringerten Sensitivität der Multi-Slice-Multi-Echo-Sequenz, die eine Spin-Echo-Sequenz darstellt und damit T₂-gewichtet ist [231]. Durch die starke T₂*-Gewichtung der Gradienten-Echo-Sequenz können die auf dem inkorporierten Eisen beruhenden, erniedrigten Signalintensitäten deutlich dargestellt werden. Die starke Eisenaufnahme bei den Kontrollzellen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen,

dass die Kontrollzellen nach einer exogen hohen Eisenkonzentration ebenfalls verstärkt Eisen aufnehmen und intrazellulär akkumulieren. Es konnte von Hoepken et al gezeigt werden, dass bei Astrozyten, die mit einer Konzentration von 100 μM FAC inkubiert wurden, innerhalb von 8 h ein 5facher Anstieg des Eisengehaltes auftritt. Bei exogener Supplementation von 1 mM FAC wurde sogar ein 17facher Anstieg dokumentiert [232]. Zusätzlich wurde in dieser Publikation nachgewiesen, dass induziert durch die Applikation des FAC eine starke Expression des endogenen Ferritin Moleküls hervorgerufen wird, die eine globale zytoplasmatische Verteilung erkennen lässt und ohne die Eisensupplementation nicht auftrat. Der Aufnahmemechanismus von FAC in die Zelle wurde bisher nicht aufgeklärt, die Aufnahme scheint allerdings unabhängig von der Expression des Transferrinrezeptors zu sein [233]. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine exogene Supplementation von FAC zu einer Herabregulierung der Transferrinrezeptorexpression führt [232]. Die Transferrinrezeptor unabhängige Aufnahme des Eisens könnte über den Eisentransporter DMT1 vermittelt werden [234].

Im Verlauf der Untersuchungen konnte aufgrund repetitiver Bestimmungen der Luziferaseaktivität und immunzytochemischer Untersuchungen herausgefunden werden, dass die 2/C3-Zellen eine Kontamination von nicht-viral-transduzierten Zellen aufwiesen, die aufgrund der höheren Proliferationsrate die HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Zellen verdrängten (nachfolgende Einzelzellklonierung: Kapitel 4.5.6).

Die Zelllinie Gli36 Δ EGFR-2/C3 wurde in einer intrazerebralen Transplantationsstudie verwendet. Nacktmäusen wurden in den Kortex 2×10^5 Zellen der HA-Ferritin- und Luziferase überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen implantiert und mittels Biolumineszenzuntersuchungen analysiert (Abbildung 4-64). In der Zellkultur wurde vor der Operation keine Supplementation von FAC vorgenommen. Bei dem Versuchstier #2 wurden in beide Hemisphären HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Tumorzellen implantiert, wohingegen bei Versuchstier #1 in die linke Hemisphäre Kontrollzellen transplantiert wurden (Abbildung 4-64 B). In beiden Versuchstieren konnte 3 Tage nach der Transplantation in den Luziferase-exprimierenden Tumoren ein klares Lichtsignal nach subkutaner Injektion von D-Luziferin detektiert werden. Bei Versuchstier #2 konnte am 6. Untersuchungstag eine maximale Lichtemission festgestellt werden, die im weiteren Verlauf des Experimentes abnahm. Bei Versuchstier #1 konnte eine kontinuierliche Zunahme der Lichtemission innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes detektiert werden, weshalb der Untersuchungsschwerpunkt auf dieses Tier gelegt wurde. Innerhalb des Untersuchungszeitraumes wurde bei dem Luziferase⁺-Tumor eine Zunahme der detektierten Photonen um das 8,8fache berechnet, was auf eine Proliferation der Tumorzellen hindeutet. Die Verwendung der Lichtemission der *firefly*-Luziferase für das Tumorwachstum und die Korrelation zwischen Lichtemission und Tumorwachstum konnte vielfach in der Literatur beschrieben werden und wird aufgrund der

ATP-Abhängigkeit der Reaktion zur tierexperimentellen Validierung von anti-Tumorthapien verwendet [24, 235-236]. Vier Stunden nach der beidseitigen Zellinjektion wurde eine MRT-Untersuchung durchgeführt und es konnte sowohl bei den Kontrollzellen, als auch bei den HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Tumorzellen deutliche hypointense Regionen im Bereich des Einstichkanals mittels einer T₂^{*}-gewichteten Gradienten-Echo-Sequenz mit einer Echozeit von TE = 20 ms detektiert werden (Abbildung 4-65 A und B). Zusätzlich wurde zu diesem Zeitpunkt eine Spin-Echo-Sequenz, die eine T₁-Gewichtung aufweist, durchgeführt (Abbildung 4-65 C). In der Minimum-Intensitäts-Projektion, die von den Schichten, in denen eine Signalauslöschung detektiert wurde, angefertigt wurden, konnte eine deutliche Abnahme der Signalintensität in der rechten Hemisphäre lokalisiert werden. Im Verlauf des gesamten Untersuchungszeitraumes konnte eine Reduktion der Signalintensität bei beiden Tumoren beobachtet werden. Eine quantitative Übersicht wurde in Abbildung 4-68 dargestellt. Am letzten Untersuchungstag wurde eine umfassende MRT-Untersuchungsreihe nach intraperitonealer Applikation von Gd-DTPA vorgenommen. Aufgrund einer Blut-Hirn-Schrankenstörung gelangt Gd-DTPA in den interstitiellen Raum und kann daher zur Darstellung des Tumorgewebes in T₁-gewichteten MRT-Aufnahmen verwendet werden [237]. In den T₂^{*}-gewichteten Aufnahmen konnten beide Tumore aufgrund eines starken Signalverlusts identifiziert werden (Abbildung 4-67 A und B). Aufgrund der Injektion des Kontrastmittels konnte innerhalb des ventrikulären Systems eine hohe Signalintensität dokumentiert werden. Im linkshemisphärisch lokalisierten Kontrolltumor konnte ein ebenfalls hyperintenses Areal detektiert werden, dass mit größter Wahrscheinlichkeit eine flüssigkeitsgefüllte Zyste darstellt, die eine Verbindung zum Liquorsystem aufweist. In den T₁-gewichteten Aufnahmen können die Struktur und die geometrische Organisation beider Tumore aufgrund einer vorliegenden Blut-Hirn-Schrankenstörung eindeutig bestimmt werden. Der Kontrolltumor stellt sich als nahezu ovale Struktur dar, während der rechtshemisphärisch, aus HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Tumorzellen bestehende Tumor eher eine stäbchenförmige Struktur aufweist (Abbildung 4-67 C). Mittels einer Spin-Echo-Sequenz wurde die T₂-Relaxationszeit in beiden Tumoren bestimmt, wobei bei der Auswahl von 8 statistisch verteilten, einzelnen ROIs eine signifikant niedrigere T₂-Relaxationszeit von 6,7 ms im HA-Ferritin exprimierenden Tumor im Vergleich zum Kontrolltumor bestimmt werden konnte (Abbildung 4-69). Die T₂-Relaxationszeiten der flüssigkeitsgefüllten Hohlräume und des umliegenden Gehirngewebes entsprechen den in der Literatur publizierten Werten. Bei der abschließenden Untersuchung im Versuchstier #2 konnten sowohl bei den T₂^{*}-gewichteten Aufnahmen, als auch bei der Berechnung der T₂-Relaxationszeit zwei distinkte Bereiche lokalisiert werden, die T₂-Relaxationswerte aufweisen, die dem HA-Ferritin⁺-Tumor in Versuchstier #1 entsprachen. Die räumlichen Dimensionen beider Tumore waren wesentlich kleiner und korrelierten somit mit den in Abb. 65 B und E dargestellten Biolumineszenz-Daten.

Nach der Terminierung des Versuches wurde eine histologische Färbung des Gehirns von Versuchstier #1 durchgeführt, bei der mittels DAB-verstärkter Berlinerblau-Färbung die Präsenz von stark eisenhaltigen Zellen im rechtshemisphärisch lokalisierten Tumor nachgewiesen wurde (Abbildung 4-71). Die Abgrenzung der Tumore vom umliegenden Gehirngewebe konnte durch eine Hämatoxylin- und Eosin-Färbung erreicht werden. Die detaillierte Analyse der Berliner-Blau⁺-Zellen konnte nachweisen, dass es sich nicht um Erythrozyten handelte (Abbildung 4-72). Teilweise findet sich eine Lokalisation dieser Zellen in direkter räumlicher Nachbarschaft zu Gefäßen (Abbildung 4-72 C). Genova et al verwendete einen Adenovirus zur intrazerebralen *in vivo* Infektion und späteren Überexpression der leichten und schweren Kette des humanen Ferritinmoleküls [238]. Die Zellen wurden mittels MRT-Aufnahmen und anschließender Berliner-Blau-Färbung identifiziert. Die inhomogene Eisenverteilung und die morphologische Struktur ähneln den bereits vorgestellten Ergebnissen. Im Kontrolltumor konnten keine Berliner-Blau⁺-Zellen detektiert werden. Anhand des kreisrunden, ausgesparten Bereiches in dem Kontrolltumor, der mit hoher Wahrscheinlichkeit die bei den MRT-Aufnahmen beobachtete Zyste darstellt, konnte verifiziert werden, dass die histologischen Schnitte mit den Schichten der MRT-Aufnahmen übereinstimmten. Die räumliche Struktur der beiden Tumore entspricht exakt der räumlichen Verteilung, die nach der Gd-DTPA-Injektion in den T₁-gewichteten MRT-Aufnahmen nachgewiesen wurde (Abbildung 4-67). Mittels einer immunhistochemischen Analyse konnten die Tumorzellen durch die Expression von Vimentin vom umliegenden Gehirngewebe abgegrenzt werden, welches GFAP⁺-Astrozyten enthält (Abbildung 4-73). Reifenberger et al konnte nachweisen, dass Gliome eine starke Expression des Intermediärfilaments Vimentin aufweisen und nur in Einzelfällen GFAP exprimieren [106]. Mittels des N-terminal fusionierten Hämagglutinins konnte ein Nachweis der HA-Ferritin⁺-Tumorzellen erbracht werden (Abbildung 4-74). Auffällig bei den Berliner-Blau-Färbungen und dem Nachweis von Hämagglutinin ist, dass nicht alle Zellen des rechtshemisphärischen Tumors positiv für die beiden Nachweise waren. Eine partielle Erklärung dafür könnte die *in vitro* schon festgestellte Tatsache sein, dass die Zelllinie 2/C3 eine Kontamination mit nicht-transduzierten Zellen aufwies. Es konnte innerhalb der hier vorgelegten Dissertation nicht geklärt werden, worauf die starke hypointense Darstellung des Kontrolltumors beruhte. Eine mögliche Erklärung dafür beruht auf der Wahl der langen Echozeit TE = 20 ms, durch welche die MRT-Aufnahmen sehr stark T₂^{*}-gewichtet wurden. Dafür würden auch die Ergebnisse sprechen, die durch die Wahl der T₁-gewichteten Spin-Echo-Sequenz am ersten Untersuchungszeitpunkt ermittelt wurden.

Durch eine Einzelzellklonierung der Zelllinie 2/C3 konnten 20 einzelne Klone isoliert werden, von denen die Luziferaseaktivität von 10 Klonen über einen Zeitraum von 14 d analysiert wurde (Abbildung 4-75). Dabei wurden die Klone #5 und #15 aufgrund der hohen Luziferase-

aktivität und Stabilität für die weiteren Versuche ausgewählt. Bei der zellulären immunzytochemischen Charakterisierung der Zellen konnte gezeigt werden, dass HA-Ferritin ubiquitär im Zytoplasma der Klone #5 und #15 lokalisiert werden konnte. Die ursprüngliche Zelllinie Gli36 Δ EGFR und die Luziferase⁺-Zelllinie 4/2N zeigten keine anti-HA-Immunreaktivität (Abbildung 4-77). In der Literatur konnte keine Publikation gefunden werden, welche die Lokalisation der schweren Kette des Ferritinmoleküls nach Überexpression immunzytochemisch *in vitro* charakterisiert hat. Daher sind die in dieser Dissertation vorgestellten Daten die ersten. Endogen gebildetes Ferritin konnte in Lysosomen, Mitochondrien und ubiquitär im Zytosol nachgewiesen werden [239-240]. Nach Inkubation der zwei Leberzelllinien HepG2 und Hep3B mit FAC, konnte eine Verteilung von Ferritinmolekülen im Zytoplasma gefunden werden. Als zusätzlicher Effekt der starken exogenen Eisensupplementation wurde die Präsenz von Hämosiderin-enhaltenden Körperchen beobachtet [240]. Die Expression der *firefly*-Luziferase wurde durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers validiert (Abbildung 4-78). Es konnte eine semiquantitativ starke Expression in der Zelllinie 4/2N nachgewiesen werden, wohingegen keine Expression des Enzyms in den untransduzierten Kontrollzellen gefunden wurde. Die Expression der Luziferase in Klon #5 konnte wie bei dem anti-Hämagglutinin Nachweis ubiquitär im Zytoplasma gefunden werden. Die Expressionstärke von Klon #15 war geringer, als bei Klon #5, was mit den Daten, die mittels Luminometer-Untersuchung nach Applikation von D-Luziferin erhoben wurden, übereinstimmt (Abbildung 4-76). Das Intermediärfilament Vimentin konnte in allen untersuchten Zelllinien detektiert werden (Abbildung 4-79).

Es konnte bei den beiden Klonen #5 und #15 eine verringerte Proliferationsrate im Vergleich zu der untransduzierten Gli36 Δ EGFR-Zelllinie beobachtet werden. Durch die Supplementation des Kulturmediums mit 500 μ M FAC konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden (Abbildung 4-83 A). Cozzi et al konnte diesen Effekt bei der Überexpression der schweren Kette des Ferritinmoleküls ebenfalls beobachten und durch die Supplementation von 100 μ M wieder eine Proliferationsrate, wie bei den Kontrollzellen dokumentiert, herstellen [224]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass dieser proliferationsenkende Effekt auf dem vermehrten Einbau von Eisenatomen in das Ferritinmolekül beruhte, indem eine mutierte schwere Kette überexprimiert wurde, die zwei Mutationen aufwies. Die Ferroxidaseaktivität wurde durch eine Substitution der AS 62 von Glutaminsäure zu Lysin und an AS 65 von Histidin zu Glyzin inhibiert [241]. Die schwere Kette des Ferritinmoleküls weist ein Ferroxidase-Zentrum auf, das den Einbau von Eisenatomen in das Molekül fördert [242-243]. Die Proliferationsaktivität dieser Zellen wies keinen Unterschied zu den Kontrollzellen auf und konnte durch die Applikation von FAC auch nicht weiter gesteigert werden [224]. Kontrovers zu diesen Ergebnissen konnte in der Arbeit von Cohen et al, in der die schwere Kette des Ferritinmoleküls in C6-Gliomazellen überexprimiert

wurde, keine Veränderung der proliferativen Aktivität festgestellt werden [14]. Picard et al konnte in MEL-Zellen ebenfalls keine Veränderung der Proliferationseigenschaften beobachten [244].

In den in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnissen konnte bei den Kontrollzellen wie auch in der Literatur beschrieben keine signifikante Steigerung der Proliferation durch exogene Eisensupplementation erreicht werden (Abbildung 4-83 A). Durch die Addition des FAC konnte keine Änderung in der Detektierbarkeit der Zellen nach der Inkubation von D-Luziferin beobachtet werden (Abbildung 4-83 B).

Die kurz nach der initialen Transduktion mit dem Lentivirus dokumentierten Effekte auf die Substratadhäsion konnten bei den regulären Passagen der Zellen beobachtet werden. Nach der Behandlung mit proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen wurde bei Klon #5 und Klon #15 eine sehr viel stärkere Substratanheftung beobachtet als bei den Gli36ΔEGFR-Kontrollzellen oder wenn bei den beiden HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Zelllinien eine Supplementation mit 500 μM Eisenzitrat durchgeführt wurde. Es wurden präliminäre Analysen durchgeführt, in denen die Zellen mit und ohne Supplementation mit FAC auf beschichteten Oberflächen ausplattiert wurden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Adhäsion spektralphotometrisch nach Behandlung mit Kristallviolett bestimmt [245]. Als erste Ergebnisse konnte beobachtet werden, dass die HA-Ferritin⁺-Zellen in Abwesenheit von FAC in kürzerer Zeit auf einer mit Fibronectin oder Laminin beschichteten Oberfläche adhären wurden, als die Kontrollzellen. Weitere Analysen werden dazu durchgeführt werden. In der Literatur wurden bisher keine Ergebnisse publiziert, die einen Zusammenhang zwischen Substratadhäsion und Eisenhaushalt von Gliomzellen beschreiben. Die in dieser Dissertation erhobenen Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen Substratadhäsion und Eisenhaushalt bei Gliomzellen hin. Von Elstner et al konnte nachweisen, dass eine Eisen-deprivation, hervorgerufen durch die *in vitro* Behandlung von Glioblastomzellen mit Desferrioxamin, zu einem erhöhten Invasionsverhalten der Zellen führte [229]. Eine Addition von FAC führte in den publizierten Experimenten zu einer Inhibition des invasiven Verhaltens. Interessanterweise konnte Benoliel et al an Adhäsionsstudien von humanen Zellen, die von primären Darmtumorresektionen von Patienten isoliert wurden, zeigen, dass die mit zunehmender Malignität oder schlechterer Prognose für den Patienten die Adhäsionsfähigkeit der Zellen anstieg [246].

Um die Adhäsionseffekte auf molekularer Ebene und ihre Bedeutung in der intrazellulären Signalkaskade detaillierter zu untersuchen, wurde die Beteiligung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) bei dem Substrat-Adhäsions-Prozess analysiert (Abbildung 4-81). Die fokale Adhäsionskinase gehört zur Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, die durch die Integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und den EGF-Rezeptor aktiviert werden kann [247]. Es konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte FAK mit β_1 -Integrin Heterodimeren assoziiert ist und

an der Zellmembran akkumuliert [248]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation der an Tyrosin 397 phosphorylierten (pY397) FAK immunzytochemisch in den HA-Ferritin überexprimierenden Gli36 Δ EGFR-Zellen und Kontrollzellen untersucht. Dabei wurde der Einfluss einer Supplementation mit Eisen(III)-Ammoniumzitat analysiert. Bezüglich der Lokalisation- und der Expressionsstärke konnte bei allen vier untersuchten Konditionen kein Unterschied beobachtet werden (Abbildung 4-81).

Für die Bildgebungsexperimente wurden die Zellen, wie bei der Zelllinie 2/C3 schon durchgeführt (siehe Kapittel 4.5.4) mit 2 mM FAC inkubiert. Die Berlinerblau und DAB-verstärkte Färbung konnte bei den Klonen #5 und #15 eine deutliche Akkumulation von intrazellulärem Eisen im Vergleich zu der Kontrollzelllinie 4/2N nachweisen (Abbildung 4-84). Es wurde eine kontinuierliche Verteilung von intrazellulärem Eisen mittels der DAB-verstärkten Berliner-Blau-Färbung beobachtet sowie runde Zellen, die eine sehr starke Anfärbung aufwiesen. Diese *in vitro* erhobenen Ergebnisse stimmen mit den *in vivo* beobachteten Ergebnisse nach Transplantation der Zelllinie 2/C3 überein (Abbildung 4-71 und 4-72). Zellen mit identischer Morphologie wurden in der Publikation von Bishop und Robinson nach der intrakortikalen Mikroinjektion von FAC in Ratten beschrieben [249]. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde nicht untersucht, ob diese stark eisenhaltigen Zellen einen apoptotischen oder nekrotischen Zustand aufweisen. Die Untersuchung auf die Expression der aktivierten Caspase 3 oder Annexin V könnte hierfür durchgeführt werden. Bei der Analyse der mit FAC inkubierten Zellen mittels Hoechst Dye 33342 konnte allerdings keine erhöhte Anzahl von fragmentierten Zellkernen beobachtet werden, wie es für apoptotische Zellen beschrieben wurde und ein anerkanntes Nachweisverfahren darstellt [250-251]. Bei den nachfolgenden MRT-Aufnahmen konnte eine deutlich niedrigere Signalintensität bei den beiden Klonen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden. Bei Klon #5 konnte eine 5fach niedrigere Signalintensität im Vergleich zu den Kontrollen berechnet werden (Abbildung 4-85 A). Durch die Berechnung des Verhältnisses Kontrast : Gelrauschen wurden diese Ergebnisse bestätigt (Abb 4-85 B). Durch die Anfertigung einer Verdünnungsreihe der mit FAC inkubierten Zellen konnte die minimal detektierbare Zellmenge bestimmt werden, die bei den Klon #5 bei 1500 Zellen lag (Abbildung 4-86). Unabhängig von den MRT-Analysen wurden spektralphotometrische Eisentests durchgeführt, um die intrazelluläre Eisenmenge zu bestimmen (Abbildung 4-86 A). Die Eisenkonzentration der beiden HA-Ferritin-überexprimierenden Klone war unabhängig von einer FAC-Supplementation in den untersuchten Proben im Vergleich zu den Kontrollzellen höher. Durch die FAC-Supplementation konnte ein höherer intrazellulärer Eisengehalt als bei den Kontrollzellen detektiert werden. Allerdings erhöhte sich der Eisengehalt bei Kontrollzellen ebenfalls stark in dem Untersuchungszeitpunkt. Bei den drei unabhängigen Experimenten, die der Abbildung 4-87 A zugrunde gelegt wurden, war die Eisenkonzentration der HA-Ferritin über-

exprimierenden Zellen in jedem Fall höher, als die bei den Kontrollzellen ermittelten Eisenmengen. Die hohe Standardabweichung reflektiert die unterschiedliche Eisenakkumulation, die in nahezu allen durchgeführten Experimenten beobachtet wurde. Es konnte in den drei einzelnen Experimenten jeweils eine 1,8fache, eine 2fache und eine 4fache Erhöhung des Eisengehaltes in den HA-Ferritin⁺-Zellen gegenüber den Kontrollzellen festgestellt werden. Um dies zu verdeutlichen, wurde in Abbildung 4-87 C ein Experiment dargestellt, in dem die Eisenkonzentration der HA-Ferritin⁺-Tumorzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich höher war, aber die Eisenkonzentrationen im Vergleich zu den in dieser Arbeit sonst festgestellten Konzentrationen sehr gering waren. In etwa 10 % aller durchgeführten Experimente konnte bei den Kontrollzellen eine höhere Eisenkonzentration nach der Inkubation mit FAC festgestellt werden (Abbildung 4-87 D). Die intrazelluläre Eisenakkumulation war bei den Zellen des Klons #15 schwächer ausgeprägt als bei den Zellen des Klons #5. Durch eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der FAC-Inkubation konnte herausgefunden werden, dass bereits nach einem Zeitraum von 4 h bei den Klon #5-Zellen die Eisenkonzentration um den Faktor 3 gegenüber der Ausgangskonzentration anstieg. Die höchste Eisenkonzentration wurde nach einem Zeitraum von 55 h gemessen. Alle ermittelten Eisenkonzentrationen bei den beiden HA-Ferritin⁺-Zelllinien waren zu jedem Zeitpunkt größer, als bei den Kontrollzellen (Abbildung 4-87 B). Die Variabilität der Eiseninkubationsexperimente konnte ebenfalls anhand von MRT-Aufnahmen bestätigt werden (Abbildung 4-88). Partiiell lassen sich die in Abbildung 4-87 und Abbildung 4-88 beschriebenen Effekte bzgl. der Eisenaufnahme der Kontrollzellen über die Tatsache erklären, dass eine exogen zugefügte Eisenkonzentration in Form von FAC von kultivierten Astrozyten in einer konzentrations- und zeitabhängigen Weise aufgenommen wird [232]. Die in dieser Arbeit supplementierte Eisenkonzentration von 2 mM ist höher, als unter normalen, physiologischen Umständen *in vivo* beobachtet wurde. Unter physiologischen Umständen findet sich eine Konzentration 9 µM bis 30 µM von Transferrin-gebundenem Eisen [249], wohingegen die hämoglobinunabhängige Eisenfraktion im Zerebralkortex 650 µM beträgt, was nahezu identisch mit der Eisenkonzentration ist, die im Parietalkortex von Ratten ermittelt wurde [252-253]. Aus diesen Konzentrationen ist ersichtlich, dass die für die Experimente verwendete Konzentration von 500 µM innerhalb des physiologischen Bereichs liegt. Interessanterweise steigen unter pathophysiologischen Bedingungen die Eisenkonzentrationen stark an und somit die verfügbare Eisenmenge, die von Zellen aufgenommen werden kann. So wurde in den neuritischen Plaques bei Patienten mit Morbus Alzheimer eine Konzentration von 1 mM Eisen gefunden. Bei Patienten mit Morbus Parkinson wurden erhöhte Eisenkonzentrationen und erhöhte Ferritinkonzentrationen in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra nachgewiesen [254]. Nach der Injektion von FeCl₃ in die Substantia nigra konnten parkinsonähnliche Symptome ausgelöst werden und

es wurde eine Degeneration von nigrostriatalen Neuronen beobachtet [255-256]. Im humanen Vollblut wurde eine Konzentration von 8,5 mM Eisen ermittelt, die im Falle eines Schlaganfalls in exogenen Kontakt mit Astrozyten und Neuronen kommt und damit 4fach höher liegt, als die höchste in dieser Arbeit eingesetzte Eisenkonzentration [232]. Die verstärkte Möglichkeit der Aufnahme von Eisen bei hoher exogener Konzentration könnte eine Erklärung sein, warum die Kontrollzellen ebenfalls eine hohe Eisenkonzentration nach FAC-Inkubation aufweisen. Zusätzlich wurde ermittelt, dass invasiv wachsende Glioblastomzellen eine hohe Ferritinkonzentration im Vergleich zu anderen Gliomzellen besitzen [257]. Eine Hochregulation von Ferritin nach Inkubation mit FAC wurde in Leberzellen *in vitro* und für Gehirnzellen *in vivo* bereits beschrieben [240, 249]. Ein erhöhter Ferritingehalt konnte ebenfalls bei Astrozyten nach der Inkubation mit Hämin oder Hämoglobin dokumentiert werden [258-259]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach der exogenen Applikation von Eisen bei Leberzellen die maximale Rate der Ferritinsynthese bereits nach 5 h erreicht wurde [260]. Erschwerend für die zelluläre Regulation ist weiterhin, dass in der kontinuierlichen Präsenz von endogen vorhandenem FAC kein Ferritinsatz mehr stattfindet. Die Studie von Truty et al konnte zeigen, dass bei kultivierten Leberzellen ohne eine exogene FAC Konzentration von 180 μM die Halbwertszeit von ^{35}S -Ferritin 19-20 h beträgt und mit Eisensupplementation kein Umsatz mehr stattfindet [261]. Dieser fehlende Umsatz hatte einen direkten Einfluss auf den Haushalt von ^{55}Fe , das in der FAC-Abwesenheit ebenfalls eine Halbwertszeit von 20 h aufwies. Bei FAC-Supplementation verblieb das ^{55}Fe in den Zellen.

Aufgrund des Literaturvergleiches kann zu dem Schluss gekommen werden, dass sowohl von den HA-Ferritin⁺-Zellen, als auch von den Kontrollzellen wegen der endogenen Regulation des Eisenhaushaltes stark erhöhte Eisenmengen innerhalb der Zellen erklärbar sind.

Es konnte in der hier vorgelegten Dissertation eindeutig mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass in den HA-Ferritin⁺- und Luziferase⁺-Zellen eine höhere Ferritinkonzentration aufgrund der Überexpression der schweren Kette vorliegt (Abb 4-82). Cozzi et al hat die schwere Kette des humanen Ferritinmoleküls in Hela Zellen überexprimiert und die Zellen für 18 h mit 1 μM ^{55}Fe -Transferrin inkubiert. Es konnte in dieser Publikation eine 14-16fach höhere Konzentration der schweren Ferritinkette aber nur eine etwa 1,8fach höhere Eisenkonzentration festgestellt werden [224].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in dieser Dissertation vorgelegten Ergebnisse zur Überexpression der schweren Kette des Ferritinmoleküls viel versprechende Ergebnisse für MRT-Bildgebungszwecke im Vergleich zu Kontrollzellen erzielten und die MRT-Nachweisgrenze der HA-Ferritin⁺-Gli36 Δ EGFR Zellen im Vergleich zu publizierten Ergebnissen wesentlich geringer lag [14, 238, 262]. Deutlich wurde jedoch auch, dass die

Ergebnisse nicht in allen Fällen reproduzierbar waren und innerhalb der Experimente nicht geklärt werden konnte, aufgrund welcher biologischen Regulation diese Diversität beruhte. Ein wesentlicher Erfolg konnte bei *in vivo*-Bildgebungsexperimenten erzielt werden, der weiterverfolgt werden kann, wenn die Bildgebungsmethodik optimiert wird. Dazu gehört die Wahl einer kleineren Echozeit bei Verwendung der Gradienten-Echo-Sequenz. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Luziferase mit optischen Bildgebungsmethoden analysiert werden konnte und das intrazerebrale Tumorwachstum reflektiert. Als interessanter biochemischer Aspekt konnte ein Einfluss des Eisenhaushaltes der Glioblastomzellen auf deren Adhäsionsverhalten beobachtet werden, der durch eine gezielte Untersuchung der Signaltransduktionsmechanismen weiterhin untersucht werden wird. Dieser postulierte Zusammenhang ist ein gänzlich neuer Aspekt in der Tumorbilogie und wird in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Für diese Experimente können Tumorzellen verwendet werden, die aus primären humanen Glioblastomen isoliert und expandiert werden.

5.6 Überexpression des humanen Δ CD4-Rezeptors in 293T-Zellen zur extrazellulären MRT-Bildgebung

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung des überexprimierten humanen Δ CD4-Rezeptors für MRT-Bildgebungszwecke vorgestellt.

Der Rezeptor wurde unter Kontrolle des CMV-Promotors und unter der Verwendung eines IRES-Elements mit der Expression der *firefly*-Luziferase kombiniert (Abbildung 4-90 A). In einer Weiterentwicklung des Expressionsplasmids wurde unter Kontrolle des SV40-Promotors die cDNA für das mCherry-Protein und die Puromycin-N-Acetyltransferase eingefügt (Abbildung 4-90 B). Die Wahl zweier unabhängiger Promotoren für die Expression der beiden Reporter bzw Reporter und Selektionierungskassette eröffnet die Möglichkeit des Austausches entweder des CMV-Promotors oder des SV40-Promotors gegen einen gewebsspezifisch exprimierten Promotor. Die initiale Transfektion des Plasmids pcDNA3.1-CMV- Δ CD4-IRES-Luziferase (pK79- Δ CD4) wurde in 293T-Zellen durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen mit einem SPIO konjugierten spezifischen anti-CD4-Antikörper und einem anti-CD4-FITC konjugierten Antikörper konnte die erfolgreiche Expression des Rezeptors immunzytochemisch überprüft werden (Abbildung 4-91). Die Inkubation mit dem SPIO-konjugierten Antikörper konnte ebenfalls an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Allerdings war die Markierungseffizienz in diesen initial transfizierten Zellen nicht effektiv genug. Die Inkubationsbedingungen wurden in späteren Experimenten auf eine Inkubationszeit von 1 h unter Bewegung der Proben festgelegt. Zur Detektion der Zellen mittels hochaufgelöstem MRT unter Verwendung einer T_2^* -gewichteten Gradienten-Echo-Sequenz wurden oberflächenmarkierte Zellen nach Fixierung verwendet. Die minimal detektierbare

Zellmenge betrug in diesen Experimenten 100 Zellen (Abbildung 4-92). In einem weiteren Schritt wurden Transfektionen mit dem komplexeren Plasmid pK79- Δ CD4-K201 in 293T-Zellen vorgenommen. Die zusätzliche Expression des mCherry-Proteins wurde mittels Plattenlesegerät und Immunzytochemie analysiert (Abbildung 4-93 und Abbildung 4-94). Dabei konnte eine membranassoziierte Expression des Δ CD4-Rezeptors bestätigt werden (Abbildung 4-94 A). Die Expression der Luziferase konnte mittels eines spezifischen Antikörpers im Zytosol nachgewiesen werden. Die Expression des Fluoreszenzproteins mCherry variierte beträchtlich in den Zellen und konnte sowohl zytoplasmatisch, als auch nukleär nachgewiesen werden (Abbildung 4-94 D). Mittels einer Einzelzellklonierung konnten Klone isoliert werden, die bei der Bestimmung der Luziferaseaktivität signifikante Unterschiede in der Luziferaseaktivität aufwiesen (Abbildung 4-95). Für die weiteren in der Dissertation vorgestellten Versuche wurde der Klon #5 ausgewählt, da dieser die höchste Luziferaseaktivität aufwies. Durch spektralphotometrische Analysen konnte gezeigt werden, dass die erfolgreiche Bindung des SPIO-konjugierten Antikörpers an den Δ CD4-Rezeptor in einer detektierten Eisenmenge von 102 μ M Eisen resultierte, während bei den Kontrollzellen nur 15 μ M Eisen detektiert werden konnte. Die Inkubation mit unkonjugierten, karboxylierten superparamagnetischen Partikeln und einem gegen humane und murine CD11b gerichteten Antikörper führte bei den Δ CD4⁺-Zellen zu einer Bindung an der Zelloberfläche. Die ermittelte Eisenkonzentration war allerdings 4fach gegenüber der spezifischen Reaktion erniedrigt (Abbildung 4-96 B). Interessanterweise konnte keine unspezifische Interaktion der carboxylierten superparamagnetischen Partikel mit den Δ CD4⁺-293T-Zellen beobachtet werden, was dafür spricht, dass die starke Überexpression des Δ CD4-Rezeptors dafür verantwortlich ist.

Bei der immunzytochemischen Analyse der Zellen des Klons #5 konnte im Gegensatz zu der initialen Transfektion (Abbildung 4-91) in allen Zellen die Koexpression des Fluoreszenzreporters mCherry und des Δ CD4-Rezeptors nachgewiesen werden (Abbildung 4-97). Auffällig ist hier, dass einzelne Zellen eine wesentlich stärkere Expression des Rezeptors aufweisen.

Die MRT-Auswertung wurde mit einer Gradienten-Echo-Sequenz mit den beiden Echozeiten TE = 5 ms und TE = 18 ms mit Δ CD4⁺-Zellen und Δ CD4-Kontrollzellen nach Inkubation mit dem SPIO-konjugierten Antikörper durchgeführt (Abbildung 4-98). Selbst bei der höchsten untersuchten Zellmenge von $2,5 \times 10^4$ Zellen konnte bei den Kontrollzellen keine Signalintensitätsveränderung bei beiden verwendeten Echozeiten ermittelt werden, während mit der Echozeit von TE = 5 ms minimal 6250 Δ CD4⁺-Zellen klar vom Hintergrund unterschieden werden konnten. Durch Verwendung der stärker T₂^{*}-gewichteten Echozeit von TE = 18 ms konnte die kleinste untersuchte Zellmenge von 3125 Zellen klar vom Hintergrund abgegrenzt werden. Dieses Ergebnis ist als äußerst erfolgreich einzustufen, da bereits bei vorherigen

Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von kurzen Echozeiten bezüglich der Auflösung und der Lokalisation deutliche Vorteile bei *in vitro*- und *in vivo*-Anwendungen besitzt.

Die Δ CD4-überexprimierenden Zellen wurden mittels FACS-Analyse untersucht, um die semiquantitativen immunzytochemischen Beobachtungen quantitativ abzusichern (Abbildung 4-103). Bei etwa 80 % der gesamten vitalen Zellpopulation konnte die Expression des Δ CD4-Rezeptors nachgewiesen werden, wobei die Expression eher schwach war. Allerdings konnte bei 9 % der Zellen eine sehr starke Expression nachgewiesen werden, was mit den immunzytochemischen Beobachtungen, die in der Fluoreszenzmikroskopie erhoben wurden, übereinstimmt. Die Δ CD4⁻-Zellen zeigten bei allen untersuchten Proben immer eine identische Verteilung, sodass daraus gefolgert werden kann, dass keine Immunreaktion mit den für die FACS-Analyse verwendeten Antikörpern stattfand. Nach der Präinkubation mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper konnten ebenfalls zwei Populationen dargestellt werden, wobei eine Population eine wesentlich stärkere Fluoreszenz aufwies als die andere (Abbildung 4-103 D). Dieses Ergebnis stimmt mit den in Abbildung 4-103 C dargestellten Untersuchungen überein, da davon ausgegangen werden kann, dass die vermehrt Δ CD4-Rezeptor überexprimierenden Zellen auch eine große Anzahl von SPIO-konjugierten Antikörpern nach der Inkubation an der Zelloberfläche aufweisen. Zur unabhängigen Überprüfung der Bindung des SPIO-konjugierten Antikörpers an den Δ CD4-Rezeptor wurde ein Alexa 488 konjugierter anti-Maus-Antikörper verwendet (Abbildung 4-103 F). Es konnten wie in der vorherigen FACS Analyse wieder zwei Populationen voneinander unterschieden werden, die allerdings keine so deutliche Trennung im Vergleich zur Analyse mittels anti-Dextran- und anti-CD4-Antikörper aufwiesen. Des Weiteren wies ein höherer Anteil von Zellen eine starke Fluoreszenz auf, was dafür spricht, dass der anti-CD4-Antikörper an den Rezeptor gebunden hat, aber eine geringe Anzahl von konjugierten SPIOs aufwies. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Eisenkonzentration der SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper im Vergleich zu den in dieser Dissertation selbst hergestellten Konjugationen um etwa den Faktor 30 geringer war (siehe Tabelle 3-1 in Abschnitt: Material und Methoden).

Zur kombinierten Analyse der Expression aller drei Reporterproteine wurden die Zellen als multizelluläre Aggregate im Suspensionsmodell kultiviert und immunzytochemisch untersucht (Abbildung 4-99). Es konnte mittels konfokaler Laserscanning-Untersuchungen eine deutliche Zunahme der spezifisch gebundenen SPIO konjugierten anti-CD4-Antikörper innerhalb von 5 h Inkubationszeit nur bei den Δ CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden. Die Antikörperinkubation wurde bei den Δ CD4⁺- und Δ CD⁻-Zellen bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt, um zu ermitteln, ob eine unspezifische Antikörperbindung unter Bedingungen, die der Körpertemperatur entsprechen, ansteigt. Bei den Kontrollzellen konnte keine Zunahme der Immunreaktivität beobachtet werden, was als Beweis dafür gelten soll, dass

keine starken unspezifischen Bindungen unter der gewählten Temperatur ausgebildet werden.

Die Visualisierung der Fluoreszenz und Biolumineszenz mittels des Photonen-Bildgebungssystems zeigte eine lineare Korrelation zwischen dem Fluoreszenz oder Biolumineszenz ermittelten Photonenflux und dem Aggregatvolumen (Abbildung 4-106 A und B). Es konnte mit den beiden Echozeiten $TE = 5$ ms und $TE = 18$ ms ebenfalls eine negative Korrelation der Signalintensität mit dem Aggregatvolumen beobachtet werden, wobei mit der längeren Echozeit eine exaktere Korrelation erzielt wurde (Abb. 106 C und D). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Gli36 Δ EGFR-CMV-mCherry⁺ Aggregatversuchen, die in Kapitel 4.2.5 beschrieben wurden. In diesen Experimenten konnte eine wesentlich bessere Lokalisation und Abgrenzung von benachbarten Strukturen mittels einer Echozeit von $TE = 5$ ms im Vergleich mit $TE = 18$ ms erzielt werden. Eine Erklärung bei den hier beschriebenen Beobachtungen findet sich bei der Struktur der Signalintensitätsveränderung, die exemplarisch in Abbildung 4-105 dargestellt ist. Wie bereits bei den immunzytochemischen Analysen beschrieben, findet sich eine selektive Anlagerung des SPIO-konjugierten Antikörpers an der Oberfläche der Aggregate, was bei den MRT-Untersuchungen zu einer selektiven Auslöschung im Randbereich führte und als Ring um den Mittelpunkt des multizellulären Aggregates dargestellt wurde. Bei einer Erhöhung der Echozeit findet eine stärkere Signalauslöschung aufgrund des Blooming-Effektes statt (Abbildung 4-106 B und D). Aufgrund der in Abbildung 4-106 C und D dargestellten Daten muss gefolgert werden, dass für eine Korrelation zwischen Aggregatdurchmesser und Signalintensität in diesem speziellen Fall eine höhere Echozeit gewählt werden muss.

Die Entwicklungen zur Verwendung von überexprimierten, signalinkompetenten Oberflächenproteinen, die für MRT-Bildgebung verwendet werden können, wurden bisher in wenigen Publikationen in der Literatur vorgestellt. So et al beschrieb 2005 die Überexpression des trunkierten murinen Histokompatibilitätsklasse 1 H2K^k-Antigens in Hela Zellen [263]. Das H2K^k-Antigen wurde wie der signalinkompetente humane anti-CD4-Rezeptor, der in dieser Dissertation verwendet wurde, von der Firma Miltenyi Biotec bezogen. Die Transfektionseffizienz in den Hela-Zellen betrug etwa 35 % und die Zellen wurden nicht weiter isoliert. Innerhalb der Arbeit konnte mittels *in vitro* MRT-Messungen nach Inkubation mit einem SPIO-konjugierten Antikörper 3×10^6 - 4×10^6 transfizierte Zellen deutlich von Kontrollzellen unterschieden werden.

Eine interessante Publikation von Winnard et al konnte die Verwendung des trunkierten humanen Typ II Transmembranproteins, das zudem mit dem Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert wurde, für die MRT- und Fluoreszenzbildgebung zeigen [264]. Nach der Injektion von stabilen Zellklonen in thorakales Fettgewebe konnte die Emission des mCherry-Proteins detektiert werden. Die T_2^* -gewichteten MRT-Untersuchungen wurden nach Inkubation mit

SPIO-konjugierten Antikörpern durchgeführt und konnten einen deutlichen Signalverlust bei den transgenen Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nachweisen. Leider wurde in der Publikation nicht die Zellmenge angegeben, die bei den MRT-Untersuchungen verwendet wurde. Eine weitere Publikation, die 2006 von Mäntylä et al veröffentlicht wurde, konnte erfolgreich die Überexpression eines mit Avidin modifizierten Scavidin-Rezeptors in Nabelschnurblutzellen zeigen [15]. Es wurden *in vitro* MRT-Ergebnisse nach der Inkubation mit biotinylierten SPIOs durchgeführt, bei der die Rezeptor-überexprimierenden Zellen detektierbar waren. Eine fehlende Angabe über die verwendeten Zellmengen erschwert einen Vergleich mit den in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnissen erheblich.

Um die Anordnung und Lokalisation der extrazellulär gebundenen superparamagnetischen Partikel, die in der Abbildung 4-105 an der Oberfläche der multizellulären Aggregate visualisiert wurden, detaillierter zu untersuchen, wurden hochaufgelöste MRT-Experimente durchgeführt. Für diese Experimente wurde eine Oberflächenspule mit einem Durchmesser von 5 mm verwendet. Die Auflösung betrug $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 39\ \mu\text{m}$ bei einer Messzeit von 27 min für die Akquisition eines 3-dimensionalen Datensatzes. Für Kontrolluntersuchungen wurden Endorem markierte 293T-Zellen verwendet, von denen detaillierte Untersuchungen über die intrazelluläre Aufnahme der superparamagnetischen Partikel durchgeführt wurden (Abbildung 4-110). Es konnte mittels spektralphotometrischem Eisentest und MRT-Aufnahmen nachgewiesen werden, dass bereits nach einer Inkubationszeit von 2 h eine deutliche, zelluläre Aufnahme von Endorem-Partikeln stattfand und sich im weiteren Verlauf nicht mehr signifikant veränderte. Bei den MRT-Analysen von Einzelzellen, die mittels der 5 mm Spule angefertigt wurden, konnte vereinzelt nach der Inkubationszeit von 2 h und nach 24 h zirkulär um die Zellen angeordnete Signalauslöschungen mit einer Echozeit von 3,6 ms beobachtet (Abbildung 4-112). ΔCD4^+ -Einzelzellen, die mit dem SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper markiert wurden, weisen im Vergleich mit den Endorem inkubierten Zellen einen geringeren Signalintensitätsverlust auf, was auf die geringere mit den Zellen assoziierte Eisenmenge zurückzuführen ist (Abbildung 4-115 A). In den durchgeführten Experimenten wurde die Agarose mit Gd-DTPA substituiert, was zu einer deutlichen Verbesserung des Verhältnisses Kontrast zu Gelrauschen führte (Abbildung 4-115 B).

In Abbildung 4-115 konnte eindrucksvoll dokumentiert werden, dass etwa 90 % der in der Probe vorhandenen Zellen ohne die Verwendung des Gd-DTPA nicht visualisierbar waren. Aufgrund des Durchmessers, der deutlich zirkulär angeordneten hypointensen Auslöschung und einer Beurteilung der Zellen anhand einer Sytox green Kernfärbung (Abbildung 4-113) kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um Einzelzellen handelte. Für in der Literatur beschriebene MRT-Phantomexperimente wurde bereits die Verwendung von Gd-DTPA zur Reduzierung der T_1 -Relaxationszeit der Matrix gezeigt [168, 265-266]. Es konnte allerdings keine publizierte Arbeit gefunden werden, die

den zirkulären Signalauslöschungseffekt, der durch die Verwendung von SPIO-konjugierten Antikörpern sowohl bei kleinen multizellulären Aggregaten, als auch bei Einzelzellen hervorgerufen wird, beschrieben hat. Aufgrund des technischen Aufbaus der Oberflächenspule konnte keine Korrelation zwischen mikroskopischen und MRT-Aufnahmen erstellt werden, was zur Interpretation der in Abbildung 4-115 dargestellten Ergebnisse von deutlichem Vorteil wäre.

Zellmengen zwischen $0,5 \times 10^5$ und 5×10^6 Δ CD4⁺-293T-Zellen wurden zur *in vivo*-Detektion der exprimierten Luziferase subkutan in Nacktmäuse injiziert (Abbildung 4-107). Vier Tage nach der Transplantation konnte bei allen Tumoren ein deutlicher Photonenflux detektiert werden. In weitergehenden *in vivo* Versuchen konnte die spezifische Detektion der subkutanen Tumore mittels Biolumineszenzbildgebung bestätigt werden. Eine Visualisierung der mCherry-Emission war zwar *in vivo* nicht möglich, jedoch konnte eine eindeutige Fluoreszenzemission des mCherry Proteins nach Explantation der Tumore dargestellt werden (Abbildung 4-109). Diese präliminären Experimente dienen der Vorbereitung einer *in vivo* Applikation der SPIO-konjugierten anti-CD4-Antikörper nach subkutaner Injektion von K79- Δ CD4-K201-293T-Zellen.

Die Spezifität ist ein wichtiger Faktor, der bei einer *in vivo* Verwendung sichergestellt werden muss, um eine spezifische Interaktion mit den Δ CD4⁺-Zellen zu gewährleisten und die Interaktion mit endogen CD4 exprimierenden Zellen zu unterbinden. Der humane anti-CD4 Antikörper des Klonen M-T466, der innerhalb der hier vorgelegten Dissertation verwendet wurde, weist laut Informationen der Firma Miltenyi Biotec keine immunologische Kreuzreaktivität mit Mäusen und Ratten auf. Es konnte eine geringe Kreuzreaktivität mit Rhesus Affen festgestellt werden. Für zukünftige *in vivo* Anwendungen wird ein humaner anti-CD4-Antikörper des Klonen MAX16H5 verwendet werden, der sich durch eine hohe Spezifität und Bindungskonstante auszeichnet [267-268].

Weissleder et al konnte mittels MRT nach der Transplantation von 9L-Gliosarcomen, die den Transferrinrezeptor überexprimierten, durch die intravenöse Injektion von superparamagnetischen Transferrinkonjugaten die Tumoren nachweisen [13]. Dabei wiesen die superparamagnetischen Partikel einen mittleren Durchmesser von 3 nm auf, was deutliche Vorteile bei der Verteilung der Konjugate hat. Durch eine Optimierung der Konjugation konnte Hogemann et al mit den Transferrin-SPIO-Konjugaten eine verbesserte Rezeptor-Konjugat-Interaktion und Reduktion der zu applizierenden konjugierten eisenhaltigen Partikel nachweisen [269]. Es wurden zahlreiche Arbeiten in den letzten Jahren zur *in vivo* Visualisierung von endogen exprimierten Rezeptoren mittels MRT publiziert. Die untersuchten Oberflächenproteine umfassen unter anderem den Her-2/neu-Rezeptor [270-271], den Folatrezeptor [272-273] und $\alpha_v\beta_3$ -Integrine [274]. Eine Übersicht über weitere

Arbeiten zur spezifischen Markierung von Oberflächenproteinen findet sich in der Publikation von Peng et al [275].

5.7 EGF-Rezeptorexpression und Generierung SPIO-konjugierter Antikörper

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur spezifischen Detektion des EGF-Rezeptors an PC12-Zellen durchgeführt. Die PC12-Zelllinie ist eine etablierte Phäochromozytomzelllinie, die aus dem Nebennierenmark von Ratten isoliert wurde und eine starke Expression des EGF-Rezeptors aufweist [276-278]. Durch die Adaptierung von Hybridomzellen, die den anti-EGFR in das Kulturmedium sezernieren, an serumfreie Bedingungen wurde eine Grundlage für anschließende biochemische Reinigungs- und Konzentrationsschritte gelegt. Mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese konnte die erfolgreiche Reinigung des Antikörpers überprüft werden (Abbildung 4-117). Nach der Inkubation verschiedener Zelllinien und primär isolierter Zellen konnte semiquantitativ gezeigt werden, dass bei den PC12-Zellen die stärkste Immunreaktion von allen untersuchten Zellen stattfand (Tabelle 4-6 und Abbildung 4-118). Dieses ist ein erster Hinweis auf die Spezifität, da einzig bei Rattenzellen eine Bindung des Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Zur unabhängigen Validierung der EGFR-Expression wurde die cDNA amplifiziert und damit die mRNA Expression nachgewiesen. Die Oligonukleotide wurden intron-übergreifend gewählt, so dass eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 4-123). Die gereinigten Antikörper wurden mittels Carbodiimid Reaktion mit carboxylierten superparamagnetischen Antikörpern mit einem mittleren Durchmesser von 50 nm konjugiert. Durch die Verwendung eines FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörpers, der die Oberfläche der eisenhaltigen Partikel erkennt und eines Alexa 549 konjugierten anti-Maus Antikörpers konnte die Kolo-kalisation der mit SPIOs konjugierten anti-EGFR-Antikörpern nach Inkubation der PC12-Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 4-121). Bei der MRT-Analyse von PC12-Zellen, die mit SPIO-konjugierten-Antikörpern inkubiert wurden, konnte bis zu einer Zellmenge von 781 Zellen ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellmenge und dem Verhältnis Kontrast zu Gelrauschen beobachtet werden (Abbildung 4-122). Es konnten bis zu 390 Zellen deutlich vom Hintergrund detektiert werden.

In bereits publizierten Arbeiten zur Visualisierung des EGF-Rezeptors wurde von Tseng et al eine Konjugation des Liganden an gelatinehaltige Partikel mit einem Durchmesser von 220 nm für eine Detektion von Adenokarzinomen der Lunge vorgenommen [279]. Iznaga-Escobar et al konjugierte einen humanen EGF-Rezeptor-Antikörper mit ^{99m}Tc-Technetium und wies die Biodistribution nach intravenöser Applikation in vier Patienten nach [280-281]. Rosenthal et al und Ke et al konjugierten Fluorochrome an einen EGF-Rezeptor Antikörper

und untersuchten Versuchstiere mittels optischen Bildgebungsmethoden [282-283]. In einer Studie, die 2009 von Yang et al publiziert wurde, konnte die Konjugation einer Einzelkette eines EGF-Rezeptor-Antikörpers an Quantum dots gezeigt werden. Die MRT-Visualisierung von 1×10^7 markierten Tumorzellen *in vitro* und die MRT-Visualisierung eine Woche nach Implantation von 1×10^7 Tumorzellen in den Pankreas von Mäusen konnte erfolgreich nachgewiesen werden [284]. Die Verwendung von Quantum dots für die Fluoreszenz-Bildgebung besitzt gegenüber der Verwendung von Fluorochromen deutliche Vorteile unter anderem bezüglich der Photostabilität und Helligkeit der Partikel [285].

5.8 PEGylierung von Makromolekülen als Modifikation für effiziente *in vivo* Anwendungen

Für die weitere *in vivo* Anwendung scheint es erforderlich, die Antikörper-SPIO-Komplexe zu stabilisieren. SPIOs tendieren zur Aggregation und zur Anlagerung an Plasmaproteine, was von Makrophagen schnell erkannt wird [286]. Biokompatible „Schutzhüllen“ sind daher von großem Interesse und die Modifikation mit PEG hat sich als sehr erfolgreich herausgestellt [287]. Die reduzierte immunogene Antwort auf PEGylierte Proteine ist schon früh an BSA oder Katalase analysiert worden [288-289]. Auch wurde in diesen Arbeiten das veränderte Laufverhalten bei der Elektrophorese beschrieben, welches bei den SDS-Gelen in Abbildungen 4-126 und 4-127 deutlich wird. Der immunogene Schutz und die Erhöhung der Halbwertszeit von Pharmazeutika, Proteinen oder auch DNA-Komplexen ist allerdings von dem gewählten Molekulargewicht des Polyethylenglykols abhängig [290]. So scheint PEG mit einem Molekulargewicht unter 5000 Da schnell immunogen degradiert zu werden, während PEG mit einem Molekulargewicht über 5000 Da für mehrere Tage stabil im Blut bleibt und das konjugierte Protein vor dem Abbau schützt. Dadurch wird zudem die Wahrscheinlichkeit der Durchquerung der Blut-Hirn-Schranke erhöht [291]. Das Polymer hat weiterhin den Vorteil, dass es mit verschiedenen Seitengruppen erhältlich ist, so dass neben kovalenten Bindungen an Proteinen auch weitere Modifikationen, wie die Konjugation an Fluorochromen, Lokalisationssequenzen [292], etc., möglich sind.

Durch die PEGylierung der Antikörper scheint die Bindungsaffinität nicht beeinflusst (Abbildung 4-128). So konnte eine erfolgte Bindung des anti-EGFR-Antikörpers an PC12-Zellen mit einem PEG-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Eine weitere interessante Anwendung der PEGylierung stellt die direkte PEGylierung von Zellen, wie bei den PC12-Zellen durch kovalente Konjugation des PEG an die Zellmembran in Abbildung 4-125, vor einer *in vivo* Transplantation dar. Eine PEGylierung wurde an Lymphozyten und pankreatischen Inselzellen *in vitro* vorgenommen und es konnte nach der Transplantation PEGylierter Inselzellen in Ratten eine Reduktion der immunogenen Wirkung des Transplantates festgestellt werden, ohne dass eine immunsuppressive pharmakologische

Therapie benötigt wurde [293-296]. Dieses Konzept der zellulären PEGylierung könnte in weiterführenden Experimenten auf die Transplantation von neuronalen Zellen in das zentrale Nervensystem übertragen werden. Auch wenn das Gehirn als immunprivilegierte Zone gilt, konnte doch nach der Xenotransplantation von neuronalen Zellen in das adulte Ratten- oder Mäusegehirnen ohne die Durchführung einer Immunsuppression eine Abstoßungsreaktion innerhalb der ersten zwei bis vier Wochen beobachtet werden [297-298]. Erste Konzepte zur Transplantation von neuronalen Vorläuferzellen, die in einer photopolymerisierten PEG und Poly-L-Lysin-Matrix transplantiert wurden, wurden in der Literatur im Jahr 2007 veröffentlicht [299]. Eine direkte PEGylierung der neuronalen Vorläuferzellen wurde allerdings noch nicht durchgeführt.

5.9 Neurale Differenzierung der embryonalen Stammzelllinie CGR8

Die Kultivierung der embryonalen Stammzelllinie CGR8 wurde von einem serumhaltigen Medium auf das Medium 10 % KSR und die Supplementation von LIF umgestellt. Die Vorteile bei Verwendung des synthetisch hergestellten KSR-Mediums anstelle des FCS-haltigen Mediums für die serumfreie Kultivierung verschiedener embryonaler Stammzelllinien konnten in mehreren Publikationen bereits nachgewiesen werden [300-302]. Zur Etablierung des neuronalen Differenzierungsprotokolls wurde ein GFP⁺-Klon der murinen Stammzelllinie D3 verwendet. Die Expression von GFP wird in dieser Zelllinie von dem β -Aktin-Promotor kontrolliert und die Fähigkeit der neuronalen Differenzierung dieser Zelllinie wurde bereits beschrieben [303]. Hoehn et al konnte nach Markierung mit dem MRT-Kontrastmittel Sinerem und Transplantation von Zellen dieser GFP-exprimierenden Zelllinie die migratorische Aktivität im Rattengehirn nach einem experimentell induzierten Schlaganfall nachweisen [304].

Innerhalb der hier vorgelegten Dissertation konnte eine Expression des Kohlenhydratpitops CD15 und des Transkriptionsfaktors Oct 3/4 in beiden ES-Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 4-129). Es wurde eine umfangreiche mRNA-Expressionsanalyse von den CGR8-Zellen im undifferenzierten Zustand erstellt (Abbildung 4-130), bei der die Transkripte für den Transkriptionsfaktor Oct 3/4 und das saure Zinkfingerprotein Rex-1 nachgewiesen wurden. Die Expression dieser Transkripte und des Kohlenhydratpitopes CD15 (SSEA-1) weisen den pluripotenten Zustand der embryonalen Stammzelllinie nach [305-307]. Keine Transkripte wurden für den Wachstumsfaktor FGF-5, Zeta-Globin, den Wachstumsfaktor BMP-2, das Intermediärfilament Nestin, das cholesterinbindende Glykoprotein Prominin-1, das RNA-Bindeprotein Musashi-1 und den astroglialen Marker GFAP identifiziert. Des Weiteren wurde keine Expression des 5T4 Onkotrophoblasten Antigens identifiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass das glykosylierte Transmembranprotein 5T4 nach der Initiierung der

Differenzierung in Zelltypen der drei Keimblätter Mesoderm, Ektoderm und Entoderm stark exprimiert wird, während die anderen untersuchten Transkripte spezifischer exprimiert werden [308]. Die fehlende Expression dieser Markertranskripte stellt einen weiteren Beweis für den pluripotenten Zustand der kultivierten embryonalen Stammzellen dar [108, 309-313]. Zur Induktion der neuralen Differenzierung wurden die Zellen der Zelllinien D3^{GFP} und CGR8 in der Medienkombination N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal für einen Zeitraum von fünf bis sieben Tagen kultiviert, was zur neuralen Induktion führte (Abbildung 4-131). Das beschriebene Differenzierungs-Protokoll wurde von Ying et al im Jahre 2003 entwickelt [314]. In dieser Publikation konnte bei 46C-ES-Zellen nachgewiesen werden, dass eine Expression des frühen neuroektodermalen Markers Sox-1 nach einer Kultivierungszeit von 4 Tagen bei über 60 % der Zellen festgestellt wurde und nach fünf Tagen Zellen mit neuronaler Morphologie beobachtet werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung der Kombination der beiden Supplemente N2 und B27 keine Selektionierung von Zellen der neuroektodermalen Zelllinie innerhalb der ersten vier Tage stattfindet, sondern dass bei einer Plattierung auf Laminin- oder Fibronektinoberflächen große Mengen von Sox-1-Zellen gebildet werden. Das N2-Medium wurde von Bottenstein und Sato entwickelt und besteht nur aus den vier Komponenten Insulin, Holotransferrin, Putreszin und Natriumselenit, während das B27-Supplement etwas komplexere Inhaltsstoffe aufweist [315-316]. Das B27-Supplement wurde 1993 von Brewer et al vorgestellt und ursprünglich in Kombination mit dem Neurobasal-Medium für die Kultur von hippokampalen Neuronen entwickelt [317-318]. Die Kombination des N2-Supplements und DMEM-F12 wurde bereits 1992 von Rynolds und Weiss für die Isolation von neuralen Vorläuferzellen aus dem Striatum von Ratten verwendet [195].

Die Zellen wurden nach der Differenzierung in dem N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium für weitere sieben Tage in dem Medium 10 % KSR kultiviert, was zu einer effektiven Differenzierung in Nestin⁺-, Doublecortin⁺- und MAP2⁺-Zellen führte (Abbildung 4-132 B und C). Zur Kontrolle des verwendeten Differenzierungsprotokolls wurden die Zellen anstatt der Kultivierung in dem N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium kontinuierlich in 10 % KSR kultiviert, was zu einer geringeren Differenzierung in Doublecortin⁺- und MAP2⁺-Zellen führte (Abbildung 4-132 A). Ein erster Schluss aus diesen Experimenten ist, dass das KSR-Medium nicht ausschließlich die frühe neuronale Differenzierung unterstützt, aber die Proliferation von neuroepithelialen Zellen fördert. Diese Ergebnisse werden durch die Publikation von Dhara et al unterstützt, bei der in vergleichenden Differenzierungen von humanen embryonalen Stammzellen gezeigt werden konnte, dass eine Kultivierung der menschlichen ES-Zellen in einem Medium mit dem N2-Supplement zu einer starken Expression von Musashi-1⁺-Zellen und einem hohen prozentualen Anteil Nestin⁺-Zellen führte [319]. Diese Nestin⁺-Zellen wiesen allerdings keine proliferative Aktivität mehr auf.

Durch eine Kultivierung in einem Medium mit 20 % KSR konnten proliferativ aktive Nestin⁺-Zellen gewonnen werden. Die KSR-Supplementation wurde ebenfalls von Lenka und Ramasamy 2007 bei der neuralen Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen nach einer Präkultivierung in 10 % FCS ohne den Zusatz von LIF gezeigt [320].

Die detailliertere Untersuchung der GFP-Expression unter Kontrolle des β -Aktin-Promotors führte zu dem Schluss, dass zwar ein großer Anteil der Nestin⁺-Zellen GFP⁺ war, dass die GFP-Expression aber teilweise sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung 4-133). Diese Ergebnisse zur GFP-Expression sind mit denen in der Publikation von Arnholt et al vergleichbar. Die Autoren beschrieben im Jahr 2000 ebenfalls die unterschiedliche Expressionsstärke der GFP-Fluoreszenz unter Kontrolle des β -Aktin-Promotors, konnten aber keine GFP⁻-Zellen identifizieren [303].

Die Expression der Glykokonjugate CD15, HNK-1 und des A2B5-Antigens wurde während der Entwicklung der CGR8-ES-Zellen untersucht. Eine A2B5-Expression konnte bei wenigen Zellen im undifferenzierten embryonalen Stammzellstadium identifiziert werden. Nach der Differenzierung mittels N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium und anschließender Kultivierung in 10 % KSR konnte eine Erhöhung des Anteils der A2B5⁺-Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-134 A1 und B1). Die Antigene, die von dem anti-A2B5-Antikörper erkannt werden, wurden als die c-Serien Ganglioside beschrieben und werden während der Entwicklung unter anderem auf glialen Vorläuferzellen exprimiert [126, 321]. In Mäusen konnte die Expression von A2B5 allerdings auch auf neuronalen Vorläufern beschrieben werden [50, 124]. Das in dieser Dissertation beobachtete Expressionsmuster kann durch die wahrscheinliche Präsenz des A2B5-Antigens auf Gliavorläuferzellen und die Abwesenheit im undifferenzierten Zustand erklärt werden. Mujtaba et al konnte nach der Differenzierung von ES-Zellen der D3-Zelllinie gliale Vorläuferzellen beschreiben und mittels Immunopanning isolieren, die A2B5⁺ waren und keine Expression von E-NCAM aufwiesen [50].

Es konnte eine starke Abnahme der CD15⁺-Zellen nach der Differenzierung beobachtet werden, während etwa 80 % der undifferenzierten ES-Zellen eine zellmembranassoziierte Expression aufwiesen (Abbildung 4-134 A2 und B2). Die Expression von HNK-1 in undifferenzierten ES-Zellen betrug unter 1 % und stieg deutlich nach der Differenzierung mittels des N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium und anschließender Kultivierung in 10 % KSR auf etwa 40 % an (Abbildung 4-134. A3 und B3). Die abnehmende Expression von CD15 und Zunahme von HNK-1 wurde von Chou et al 2003 nach der retinsäurevermittelten Differenzierung in P19 Zellen gefunden, was die in dieser vorgelegten Dissertation erhobenen Ergebnisse unterstützt [322]. Die Glykosylierung von Zelloberflächenproteinen mit HNK-1 besitzt eine wesentliche Bedeutung bei neuronalen Zell-Zell-Erkennungsvorgängen, Adhäsionsprozessen und der neuronalen Migration und konnte als wesentliches Merkmal bei der Synaptogenese identifiziert werden [323-325]. Aufgrund der

neuronalen Spezifikation der HNK-1 Expression innerhalb des zentralen Nervensystems wurde innerhalb dieser Dissertation ein Schwerpunkt auf die Expression der Kohlenhydrat-epitope CD15 und vor allem HNK-1 gelegt, die zu einem späteren Zeitpunkt auch für die MRT-Bildgebung und magnetchromatographische Methoden genutzt wurden (siehe Kapitel 4.10.8.2).

5.9.1 Differenzierung der ES-Zelllinie CGR8 im Suspensionsmodell

Um eine direkte Differenzierung in einem Suspensionsmodell zu erreichen, wurden die undifferenzierten ES-Zellen der Zelllinie CGR8 für sieben Tage auf bakteriologischen Kulturschalen in 10 % KSR differenziert und anschließend entweder in 10 % KSR oder in dem Medium ITSFn kultiviert. Die Verwendung der Suspensions-Kulturform führt zur spontanen Ausbildung von "embryoid bodies" ohne Verwendung der "hangig-drop"-Methode, in der die ES-Zellen in einem kleinen Mediumvolumen für 2 Tage aggregieren, bevor diese in ein größeres Volumen zusammen überführt werden [326]. Das chemisch definierte ITSFn-Medium wurde in diesem kombinierten Ansatz zur Selektionierung von Nestin⁺-Zellen verwendet [327-329]. Es fand eine Ausbildung von frei im Medium flottierenden aggregierten Zellen statt, die nach der Umstellung der Kulturbedingungen auf das ITSFn-Medium, wahrscheinlich aufgrund der Supplementation mit Fibronectin, auf der anti-adhäsiven Oberfläche der Kulturschalen adhärten. Es konnte die Migration von einzelnen Zellen mit neuronaler Morphologie in der Peripherie der Aggregate und die Ausbildung von Neuriten beobachtet werden, die nach Ausplattierung auf einer Laminin-beschichteten Oberfläche verstärkt auftraten (Abbildung 4-137 und Abbildung 4-138). Aufgrund der immunzytochemischen Charakterisierung der Zellen konnte festgestellt werden, dass der Anteil von Doublecortin⁺-Zellen und die Komplexität der neuronalen Netzwerke in den Zellen aus der ITSFn-Kultur im Vergleich mit der Suspensionskultivierung in 10 % KSR erhöht war (Abbildung 4-140). In detaillierteren Analysen konnte eindeutig festgestellt werden, dass nach der Kultivierung in dem ITSFn-Medium der Anteil von Zellen, die keine Expression von neuronalen oder astroglialen Markern aufweisen, gegenüber der Kultivierung in 10 % KSR erniedrigt war (Abbildung 4-140). Die Erniedrigung des Anteils von Zellen, die keine neurale Spezifizierung aufweisen, hat bei der Verwendung von Zellen, die aus ES-Zellen generiert wurden, für Transplantationen in das Nervensystem entscheidende Konsequenzen, da die Ausbildung von Teratokarzinomen verringert wird [330-331]. Mit dem vorgestellten Differenzierungsansatz konnte eine effiziente Differenzierung in Doublecortin⁺-, β 3-Tubulin⁺- und GFAP⁺- Zellen erreicht werden.

5.9.2 Generierung einer stabilen neuralen Vorläuferzelllinie aus den prä-differenzierten CGR8-Zellen

Für die Etablierung von neuralen Vorläuferzellen aus den ES-Zellen wurde ein weiterer experimenteller Ansatz durchgeführt, der zur Generierung einer proliferativ aktiven neuralen Vorläuferzelllinie führte. Nach Kultivierung der undifferenzierten ES-Zellen in dem N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium und anschließender Kultivierung in dem Medium 10 % KSR wurden die Zellen in dem Medium N2-Euromed mit der Supplementation der Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF kultiviert (Abbildung 4-141). Die Verwendung dieses Medium wurde von Conti et al vorgestellt [332]. Im Gegensatz zu den in dieser Publikation vorgestellten Daten konnte bei der Umstellung des Mediums auf das N2-Euromed-Medium direkt nach der Kultivierung in dem N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium keine neurale Vorläuferzelllinie generiert werden, sondern erst nach der kurzzeitigen Kultivierung in 10 % KSR. Innerhalb der Publikation von Conti et al konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung des N2-Euromed-Kulturmediums das Wachstum von residierenden, undifferenzierten ES-Zellen nicht unterstützt wird. Bei der immunzytochemischen Analyse der Zellen konnte die Expression des Intermediärfilaments Nestin in allen Zellen festgestellt werden, was ein Beleg für den neuralen Vorläuferzellcharakter dieser Zellen ist (Abbildung 4-143). Bei der Erstellung eines mRNA-Expressionsprofils der Zelllinie N2/Euro #1 konnte eine semiquantitativ starke Expression des Transkriptes für Nestin und eine schwache Expression von Prominin-1 und FGF-5 beobachtet werden (Abbildung 4-142). Eine FGF-5 Expression konnte in pluripotenten Zellen nach der primitiven Ektodermausbildung in Koexpression mit Oct 4 beschrieben werden [333]. Die höchste Expression wurde in dieser Publikation in "embryoid bodies" zwischen dem zweiten und dritten Tag der Differenzierung beobachtet. Anschließend folgte eine Abnahme der Expression von FGF-5 und Oct 4, was ein deutlicher Hinweis für die weitergehende Entwicklung der Zellen ist und mit hoher Wahrscheinlichkeit für die schwache Expression, die in der hier vorgelegten Doktorarbeit beobachtet wurde, verantwortlich ist. Interessant wäre die Überprüfung der mRNA-Expression von FGF-5 nach der siebentägigen Differenzierung in dem N2/B27/DMEM-F12/Neurobasal-Medium. In diesem Differenzierungsstadium ist eine starke Expression von FGF-5 sehr wahrscheinlich. Besonders hervorzuheben ist die starke Bande beim Nachweis des Transkripts für das onkofötale Antigen 5T4 bei 500 bp (Abbildung 4-142, Spur 3). Bei der Charakterisierung der 5T4 mRNA-Expression im undifferenzierten ES-Zell-Stadium konnte das Transkript nicht nachgewiesen werden, während eine semiquantitativ starke Expression bei der N2/Euro #1 Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis unterstützt zusammen mit der Abwesenheit von Markertranskripten, die charakteristisch für das undifferenzierte ES-Zell-Stadium sind, die erfolgreiche Generierung einer neuralen Vorläuferzelllinie. Mittels der immunzytochemischen Analyse konnte keine Expression von β 3-Tubulin, GFAP und

Doublecortin in den Zellen festgestellt werden (Abbildung 4-143 B und C). Insgesamt fand sich eine leichte, homogene Anfärbung der Zellen nach Inkubation mit dem MAP-2 Antikörper (Abbildung 4-143 D). Es konnten einzelne, stark MAP-2 exprimierende Zellen identifiziert werden, die sich in der Expressionsstärke deutlich von den anderen beobachteten Zellen unterschieden (Abbildung 4-143 D und Abbildung 4-144). Bei der Beurteilung der MAP-2 Expression muss allerdings die Spezifität des zur Untersuchung verwendeten Antikörpers berücksichtigt werden. MAP-2 Proteine sind bei der Genese der neuronalen Zellpolarität beteiligt und spielen eine kritische Rolle bei der Mikrotubulorganisation und Stabilität [334-335]. Es konnte gezeigt werden, dass die drei Hauptformen MAP-2a, -b und -c in einer chronologischen Reihenfolge bei der neuronalen Entwicklung in einer embryonalen Karzinoma-Zelllinie exprimiert werden [336]. Die Expression von MAP-2c beginnt schon früh nach der neuronalen Induktion, während die beiden anderen Proteine zu späteren Entwicklungsstadien exprimiert werden [336]. Die Expression von MAP-2c kann ebenfalls mit dem Prädispositionsgrad der Zellen korreliert werden, da die MAP-2c-Isoform von vielen primitiven Zelltypen und immaturren Neuronen exprimiert wird [337-338]. Der in dieser Dissertation verwendete Antikörper erkennt alle drei Hauptformen, so dass eine Unterscheidung des Differenzierungsgrades der neuralen Vorläuferzellen aufgrund der beobachteten MAP-2-Expression nicht diskriminiert werden kann.

5.9.3 Proliferation und Differenzierung der Zelllinie N2-Euro #1 im Sphäroidmodell

Die spontane Ausbildung von multizellulären Aggregaten der Zelllinie N2-Euro #1 wurde durch Kultivierung auf einer anti-adhäsiven Beschichtung in drei verschiedenen Mediumkompositionen untersucht. Es konnten signifikante Unterschiede in den mittleren Durchmessern der Aggregate nach einer viertägigen Kultivierungszeit festgestellt werden (Abbildung 4-145 und Abbildung 4-146). Die Proliferation der neuralen Vorläuferzellen wurde durch die Supplementation mit den Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF unterstützt, was anhand von mittleren Durchmessern bis zu 250 µm unterstützt wird. Durch die Deprivation von EGF verkleinerte sich der mittlere Durchmesser der Aggregate, was auf eine geringere proliferative Aktivität hindeutete. Die Kultur in 10 % KSR wies mittlere Durchmesser deutlich unterhalb 100 µm auf und die Zellen wiesen keine intakte Morphologie mehr auf (Abbildung 4-145 und Abbildung 4-146 C). Aus diesen Beobachtungen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass in dem neuralen Vorläuferzellstadium keine Unterstützung der Proliferation durch das 10 % KSR-Medium mehr stattfindet. Bei der immunzytochemischen Charakterisierung der Aggregate konnte sowohl nach Kultivierung in Gegenwart beider Wachstumsfaktoren, als auch nach Deprivation von EGF das Vorhandensein Doublecortin und β 3-Tubulin exprimierender Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-147). Der Anteil der

neuronalen Zellen war in der EGF-deprivierten Gruppe geringfügig erhöht. Es konnten in keiner Gruppe GFAP⁺-Zellen identifiziert werden.

Eine viertägige Differenzierung auf Laminin-beschichteten Oberflächen in dem Medium B27/Euromed führte zu einem hohen Zellsterben innerhalb der ersten 12 h nach Veränderung der Kulturbedingungen. Nach der Differenzierung der Aggregate, die in dem Komplettmedium kultiviert wurden, konnten wenige schwach Doublecortin⁺-Neurone identifiziert werden (Abbildung 4-148 A und B). Nach der Suspensionskultivierung in dem EGF deprivierten Medium wurde ein größerer Anteil von Doublecortin⁺- β 3-Tubulin⁺- und GFAP⁺-Zellen gefunden (Abbildung 4-148 C und D). Eine Kultivierung der Aggregate in 10 % KSR-Medium, das aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung und den anti-proliferativen Eigenschaften ausgewählt wurde, führte zur Ausbildung von komplex entwickelten Doublecortin⁺-Neuronen (Abbildung 4-149 A und C). Es wurden im Vergleich zu der Differenzierung im B27-Euromed-Medium mehr β 3-Tubulin⁺-Neurone und komplexer entwickelte GFAP⁺-Astrozyten identifiziert (Abbildung 4-149 B und D). Vergleichend zu den Ergebnissen in dem B27/Euromed-Medium war der Differenzierungsgrad der Neurone nach der Suspensionskultivierung in EGF-deprivierten Medium höher als nach Kultivierung in dem EGF und FGF-2 supplementierten Medium. Der hohe Anteil von sterbenden Zellen während der frühen Phase der Differenzierung wurde innerhalb der hier vorgelegten Dissertation nicht genauer untersucht. Es ist zwar bekannt, dass neurale Vorläuferzellen, die aus dem Gehirn von Ratten isoliert und in Kultur expandiert wurden, nach Entzug des Wachstumsfaktors und damit der Einleitung der Differenzierung absterben, aber die in der Literatur gefundenen prozentualen Anteile an der Gesamtpopulation wurden geringer beschrieben, als es bei den hier vorgelegten Experimenten beobachtet wurde [87]. Es konnte die Beobachtung gemacht werden, dass der Anteil von absterbenden Zellen bei der Kultivierung in 10 % KSR geringer war, als bei Differenzierung in dem B27/Euro-Medium. Zusätzlich wurde eine Applikation von 10 % FCS durchgeführt, wobei in diesem Fall keine apoptotischen Zellen identifiziert werden konnten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Differenzierungsbedingungen nicht optimal gewählt wurden. Ein weiterer Grund für die hohen Apoptoseraten kann auch in der Wahl einer ungünstigen Zelldichte liegen, die unter anderem bei kortikalen Stammzellen auch einen Einfluss auf die Differenzierungsrichtung ausübt [339].

Mit der Etablierung des Suspensionsmodells sollten drei Grundlagen für weitere Versuche geschaffen werden:

- 1.) Basierend auf den in Kapitel 4.2 beschriebenen Bildgebungsexperimenten, die mit multizellulären Tumorzellaggregaten durchgeführt wurden und deutliche Vorteile bei den Bildgebungseigenschaften gegenüber Suspensionskulturen aufwiesen, sollten für MRT und optische Untersuchungen, die mit der N2/Euro #1 Zelllinie durchgeführt

werden, ebenfalls die Möglichkeit einer multizellulären Aggregat- oder Neurosphären-Kultur evaluiert werden.

- 2.) Bei der Transplantation von neuronalen Vorläuferzellen, die aus dem Gehirn isoliert wurden und nach einer Expansion in Kultur für Transplantationen verwendet wurden, kommen die Möglichkeiten in Betracht, die Zellen als Einzelzellsuspension oder als Neurosphären zu transplantieren [340-345]. Johann et al konnte in einer vergleichenden Untersuchung mit neuronalen Vorläuferzellen in das Striatum von Mäusen zeigen, dass nach Injektion von Neurosphären bessere Überlebensraten der Zellen dokumentiert werden konnten, als wenn eine Einzelzellsuspension verwendet wurde [346]. Durch die Etablierung der Suspensionskultivierung und der Differenzierung in der Suspension können die Zellen der Zelllinie N2/Euro #1 für Transplantationsversuche verwendet werden.
- 3.) Durch die Kultivierung der N2/Euro #1-Zellen in multizellulären Aggregaten mit kleinen Durchmessern kann ein Transfer der Zellen in Elektroporationsküvetten stattfinden, ohne dass eine vorherige Ablösung der Zellen vom Untergrund nötig ist. Durch die Möglichkeit der neuronalen Prädifferenzierung können mittels des Aggregationsmodells auch Neurone elektroporiert werden. Eine spezielle Elektroporationsmethode, die Nukleofektion, wurde daher experimentell detaillierter untersucht.

5.9.4 Nukleofektion der multizellulären Aggregate

Die Lipofektion von neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen zur Einschleusung von Plasmiden konnte zwar erfolgreich in verschiedenen publizierten Ansätzen gezeigt werden, weist allerdings eine geringe Transfektionseffizienz auf [347]. Chesnulevicius et al verglich die Anwendung von Lipofektion, Elektroporation und Nukleofektion bei neuronalen Stammzellen und konnte den Schluss ziehen, dass die Nukleofektion die effizienteste nicht-virale Transfektionsmethode darstellt [347]. Die effiziente Verwendung der Nukleofektion bei ES-Zellen konnte ebenfalls beschrieben werden [348-350]. Die Nukleofektion stellt eine erweiterte Methode der Elektroporation dar, bei der ein Zelltyp-spezifischer Puffer und hohe elektrische Spannungen mit kleiner Pulsdauer zur Elektroporation verwendet werden [351]. Wahrscheinlich aufgrund der hohen Feldstärke wird ein Transfer der eingesetzten DNA, entweder durch eine transiente Permeabilisierung oder Veränderung der Kernporenstruktur, in den Nukleus gewährleistet [351-352].

In der hier vorgelegten Dissertation wurden die Plasmide pcDNA3.1-CMV-mCherry und pcDNA3.1-CMV-K79- Δ robo3-IRES-Luziferase (siehe Kapitel 4-11) in N2/Euro #1 Aggregate nukleofektiert. Einen Tag nach der Nukleofektion konnte die Expression des mCherry-Proteins in den Zellen detektiert werden, was ein Hinweis auf einen effizienten Zellkerntransfer darstellt. Die Transfektionseffizienz bei der Nukleofektion von Aggregaten betrug etwa 40 % bis 50 % und lag damit deutlich niedriger als bei der Nukleofektion von Einzel-

zellen, die als Referenz eingesetzt wurden. Bei den durchgeführten Experimenten konnte zwar kurz nach der Nukleofektion eine starke Expression des Fluoreszenzreporters detektiert werden, allerdings nahm diese auch innerhalb von zwei bis drei Tagen wieder stark ab. Aufgrund dieser Tatsache war es nicht möglich, eine stabile Zelllinie durch Antibiotika-Selektionierung zu generieren. Die immunzytochemische Analyse nach Plattierung der Aggregate auf Laminin-beschichteten Oberflächen konnte eine Koexpression vom mCherry und Doublecortin nachweisen (Abbildung 4-150 A). Deutlich erkennbar ist die geringe Anzahl der mCherry⁺-Zellen, die auf die schnelle Abnahme der Expression zurückzuführen ist. Die mCherry-Expression in Doublecortin⁺-Zellen stellt einen wichtigen Hinweis dafür dar, dass der CMV-Promotor auch nach der Differenzierung in Neurone noch aktiv ist. Wang et al konnte in einer vergleichenden Analyse der EGFP-Expression während der undifferenzierten ES-Zellkultur und nach der Differenzierung in neuronale Zellen unterschiedliche Expressionsstärken bei Verwendung von drei Promotoren beschreiben. Dabei zeigte der CMV-Promotor im Vergleich zu EF1 α und PGK die schwächste Expression nach der neuronalen Differenzierung [353].

In Abbildung 4-150 B konnte die erfolgreiche, membranassoziierte Expression des Δ robo3-Rezeptors dokumentiert werden. Im Vergleich zu der Expression des mCherry-Proteins lag die Expressionseffizienz des Δ robo3-Rezeptors deutlich niedriger. Dies kann auf die Verwendung eines IRES-Elementes und die Expression eines Oberflächenproteins zurückgeführt werden, da diese Elemente die Nukleofektionseffizienz verringern [354]. Eindeutig konnte die Expression der Luziferase nach Inkubation der nukleofektierten Aggregate mittels optischer Bildgebung dokumentiert werden (Abbildung 4-151).

Durch die vorgestellten Experimente konnte eine eindeutige Verwendung des Aggregationsmodells für *in vitro*-Applikationen beschrieben und eine Grundlage für zukünftige *in vivo*-Applikationen gelegt werden. Zur Charakterisierung der CD15- und HNK-1-Expression unter Proliferations- und Differenzierungsbedingungen wurden die adhärennten N2/Euro #1 Kulturen in ihrer Differenzierungsfähigkeit charakterisiert. Dabei konnte nach der Differenzierung auf Laminin beschichteten Oberflächen in dem Medium B27-Euromed eine geringe Differenzierung in Doublecortin-exprimierende Neurone und wenige β 3-Tubulin⁺-Neurone beobachtet werden (Abbildung 4-152). Keine GFAP⁺-Astrozyten konnten identifiziert werden. Bei Verwendung des 10 % KSR-Mediums konnten komplex differenzierte Doublecortin⁺-Zellen, β 3-Tubulin⁺-Neurone und protoplasmatische Astrozyten in den Kulturen identifiziert werden. Damit stimmen diese Beobachtungen mit den Ergebnissen, die in der Suspensionskultur beschrieben wurden, überein. Durch Verwendung eines kombinierten Differenzierungsprotokolls, in dem das B27-Euromed-Medium und 10 % KSR verwendet wurden, konnte eine Steigerung der Doublecortin-Expression erreicht werden (Abbildung 4-154).

Eine Expression von CD15 konnte unter proliferativen Bedingungen in etwa 3 % der N2/Euro #1-Zellen nachgewiesen werden, während 6 % der Zellen HNK-1 Expression aufwiesen (Abbildung 4-155). Morphologisch zeichneten sich die die CD15⁺- und HNK-1⁺-Zellen durch eine wenig komplex gestaltete Zellarchitektur, mit der Ausbildung von kleinen Fortsätzen, aus. Nach der Differenzierung nahm der Anteil von CD15⁺-Zellen stark zu, wobei ebenfalls eine morphologische Veränderung beobachtet werden konnte (Abbildung 4-156). Der größte Anteil der Zellen wies komplexe Verzweigungen auf. Interessanterweise konnten nach der Differenzierung im 10 % KSR-Medium weniger CD15⁺-Zellen identifiziert werden, als bei der Differenzierung im B27/Euro-Medium, in dem der Anteil von GFAP⁺-Astrozyten deutlich geringer bei der Differenzierung in 10 % KSR war. Im Vergleich zu der Verteilung von CD15⁺-Zellen unter proliferativen Bedingungen, wurde ein größerer Anteil von HNK-1⁺-Zellen mit ausgeprägter neuronaler Morphologie gefunden (Abbildung 4-156). Unter Differenzierungsbedingungen konnten eine deutliche Zunahme der HNK-1-Expression beobachtet werden, die mit einer Zunahme des morphologischen Komplexitätsgrades einherging (Abbildung 4-156 und Abbildung 4-157). Bis auf seltene Ausnahmen konnte die HNK-1-Expression GFAP⁻-Zellen mit neuronaler Morphologie zugeordnet werden (Abbildung 4-157 A und B). Es konnten wenige Zellen gefunden werden, die eine flache epitheliale Struktur aufwiesen und in noch weniger Zellen eine GFAP- und HNK-1-Koexpression zeigten (Abbildung 4-157 D). Dabei war die HNK-1 Expression geringer als die GFAP-Expression und konnte verstärkt im peripheren Teil der Astrozyten identifiziert werden. Die Koexpression von GFAP und HNK-1 in Astrozyten konnte von Kobayasi et al bei einer Subpopulation von Typ 1b-Astrozyten, die aus dem humanen optischen Nerv isoliert wurden, gefunden werden [355]. In dieser Publikation wurde ein Antikörper verwendet, der ein Antigen erkennt, das mit HNK-1 und NCAM assoziiert ist. Verschiedene Adhäsionsmoleküle wie NCAM, L1 und P0, extrazelluläre Matrixproteine wie Phosphacan weisen eine Glykosylierung auf, die von dem anti-HNK-1-Antikörper erkannt wird [325]. Des Weiteren konnte eine Assoziation mit der Migration von Neuralleistenzellen und der Neuronen-Gliazellen Adhäsion für HNK-1 beschrieben werden [123, 325].

Die CD15-Expression wurde aufgrund von Untersuchungen an neuralen Stamm- und Vorläuferzellen als spezifischer Marker für diese Zelltypen vorgestellt [356]. Diese publizierten Ergebnisse werfen die Frage auf, warum in den proliferierenden neuralen Vorläuferzellen der Zelllinie N2/Euro #1 der prozentuale Anteil von CD15⁺-Zellen in drei unabhängig untersuchten Stichproben nur 3 % an der gesamten Population betrug.

Bei den vorgestellten Ergebnissen zur CD15- und HNK-1-Expression unter Differenzierungsbedingungen muss die Anmerkung gemacht werden, dass die Anzahl der unabhängig untersuchten Stichproben im Vergleich zu den Proliferationsbedingungen geringer war und eine Quantifizierung der vorgestellten Ergebnisse in weiteren Experimenten folgen muss.

Eine weiterführende Untersuchung, die mit der N2/Euro #1 Zelllinie durchgeführt werden kann, ergibt sich aus Beobachtungen, die von Ward et al publiziert wurden [308]. Es konnte festgestellt werden, dass nach einer FACS-Sortierung von undifferenzierten ES Zellen der Zelllinie 129 mittels SSEA-1 die SSEA-1⁺- Zellen keine 5T4-Expression aufwiesen. Nach der sechstägigen Differenzierung durch LIF-Entzug konnte eine SSEA-1⁺- und 5T4⁺-Population von Zellen identifiziert werden, die einen geringen Grad von pluripotenten Eigenschaften aufwiesen. In der Publikation von Ward wurden die Eigenschaften dieser Population nicht weiter untersucht. Interessant wäre es, die SSEA-1⁺-Zellen, die sich in der N2/Euro #1-Zelllinie befinden, auf die Expression von 5T4 zu untersuchen, da es sich hier um einen Marker handelt, der in Zellen aller drei Keimblätter vorkommt.

Die beiden Kohlenhydratepitope CD15 und HNK-1 wurden aufgrund ihrer für neurobiologische Fragestellungen interessanten Expressionscharakteristika für weitere, unter anderem auch MRT-Bildgebungsapplikationen ausgewählt. Da in den bisherigen Ergebnissen, die in dieser Dissertation vorgestellt wurden, noch keine MRT-Experimente mit der N2/Euro #1 Zelllinie durchgeführt wurden, wurde die Markierungsfähigkeit mit dem Kontrastmittel Endorem untersucht. Die Inkubation mit 300 µg mL⁻¹ Endorem führte zu einer geringen, aber signifikanten Abnahme der Proliferation im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 4-158). Der Anteil von Trypanblau⁺-Zellen stieg ebenfalls an, kann aber als vernachlässigbar gelten. Mittels immunzytochemischer Analyse nach Inkubation mit dem FITC-konjugierten anti-Dextran-Antikörper und der Visualisierung der Aktinfilamente mittels Rhodamin-konjugiertem Phalloidin, konnte die Aufnahme der eisenhaltigen Partikel nachgewiesen werden (Abbildung 4-159). Die effektive Aufnahme konnte ebenfalls mit dem spektralphotometrischen Eisentest verifiziert werden, bei dem eine 87fach höhere Eisenkonzentration bei den mit Endorem inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet wurde. Bei der MRT-Untersuchung, die mit einer Gradienten-Echo-Sequenz durchgeführt wurde, konnten 196 Zellen deutlich vom Hintergrund differenziert werden (Abbildung 4-160).

Für die MRT-Experimente, die mittels des HNK-1-Antikörpers durchgeführt werden sollten, wurde die Hybridomzellkultur von TIB 200 Zellen etabliert. Durch die Adaptierung der Hybridomzellen an serumfreie Bedingungen und die anschließende biochemische Reinigung und Konzentration, konnte der Antikörper isoliert werden. Mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der Erfolg der Antikörperreinigung überprüft (Abbildung 4-161). Die Konjugation mit karboxylierten superparamagnetischen Partikeln wurde mit der Carbodiimid-Reaktion vorgenommen und immunzytochemisch mit zwei weiteren Antikörper-SPIO-Präparationen verglichen (Abbildung 4-162). Bei der Untersuchung konnte herausgefunden werden, dass der Anteil von eisenhaltigen Partikeln in der selbst hergestellten Antikörper-SPIO-Präparation am höchsten war. Die Vergleichsantikörper waren ein SPIO-

Antikörperkomplex der von der Firma Miltenyi Biotech bezogen wurde und ein Hybridom-überstand, der uns freundlicherweise von Prof. K. Addicks, Institut für Anatomie I, Uniklinik Köln überlassen wurde und nachträglich mit den SPIOs konjugiert wurde. Bei dieser Antikörper-SPIO-Konzentration konnte bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eine niedrigere Antikörperkonzentration im Vergleich zu dem gereinigten und konzentrierten Antikörper detektiert werden. Eine zukünftige weitere Untersuchung sollte die Affinität der Antikörper betreffen, da sich die Intensität der Färbung in Abbildung 4-162 stark bei den drei eingesetzten Antikörpern unterscheidet.

Multizelluläre Aggregate wurden mit den SPIO-konjugierten anti-HNK-1- und CD15-Antikörpern inkubiert, die unter Differenzierungs- und Proliferationsbedingungen kultiviert wurden (Abbildung 4-163). Es konnte bei den MRT-Untersuchungen ein starker Signalverlust bei den HNK-1 inkubierten Zellen unter proliferativen Bedingungen identifiziert werden. CD15⁺-Aggregate waren im Vergleich zu den HNK-1⁺-Aggregaten quantitativ schwächer. Diese Ergebnisse stützen die Daten, die bei den immunzytochemischen Untersuchungen erhoben wurden. Unter differenzierten Bedingungen konnten keine CD15⁺-Zellen identifiziert werden. Der Anteil von HNK1-markierten Zellen entsprach etwa der Menge, die unter proliferativen Bedingungen identifiziert wurden. Zur Kombination der MRT-Analyse und der Anwendung der Magnetchromatographie wurden proliferierende N2/Euro #1 Zellen mit den SPIO-konjugierten anti-HNK-1- und CD15-Antikörpern inkubiert und damit die beiden Zellpopulationen voneinander isoliert. Deutlich konnte bei der MRT-Untersuchung eine Anreicherung der Zellpopulationen beobachtet werden (Abbildung 4-164). Die Anwendung der Zellsortierung mittels SPIO-konjugierten Antikörpern, die gegen Zelloberflächenproteine gerichtet sind, bietet die Grundlage zur Untersuchung von isolierten, spezifischen Zellpopulationen.

sLe^x kommt auf der Oberfläche von Neutrophilen und Monozyten, einer Subgruppe der Leukozyten, vor und kann mit E- oder P-Selektin, die von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden, interagieren. Durch diese Expression während der frühen inflammatorischen Antwort nach einer Entzündungsreaktion oder Gewebeschädigung wird eine Interaktion mit im Blut zirkulierenden Leukozyten mediiert [357-358]. Kogan et al konnte substituierte Biphenyle herstellen, die durch eine Palladium mediierte Biarylkopplungsreaktion entstanden sind, welche die Bindung von E- oder P-Selektin an das sLe^x-Tetra-saccharid verhindern [359]. Eine der wirkungsvoll identifizierten Substanzen war das 3-(2- α -D-Mannopyranosyloxyphenyl)-Phenyllessigsäure-Motiv, das von Fu et al neusynthetisiert und mit einer Aminogruppe zur Derivatisierung von DTPA versehen wurde [357]. Durch die Komplexbildung mit Gadolinium konnte dieses E- und P-Selektin spezifische Kontrastmittel, das allerdings im Vergleich mit Gd-DTPA eine deutlich niedrigere Protonenrelaxation aufweist, für MRT-Visualisierungsexperimente verwendet werden [360]. In den letzten

Jahren wurde das vorgestellte Kontrastmittel in einigen sehr interessanten Experimenten *in vivo* zur Detektion der E- und P-Selektin-Expression nach experimentellem Schlaganfall und nach Entzündungsreaktionen eingesetzt [361-363]. Im Hinblick auf die Verwendung von CD15- und HNK-1-Antikörpern in vorliegender Arbeit stellen diese vorgestellten Veröffentlichungen eine interessante Grundlage zur potentiellen *in vivo* Applikation dar. Die Verwendung der spezifischen Antikörper eröffnet darüber hinaus eine weitergehende Anwendung, als es mit dem derivatisierten 3-(2- α -D-Mannopyranosyloxyphenyl)-Phenyl-essigsäure-Motiv möglich ist, welches auf eine spezifische Interaktion mit E- und P-Selektin hin entworfen wurde.

5.9.5 Applikation des Oberflächenrezeptors robo3 aus *Drosophila melanogaster* für die MRT-Bildgebung

Zur Weiterentwicklung der extrazellulären Markierung von Zellen, die im Kapitel 5.6 ausführlich behandelt wurde, konnte im Folgenden die Expression eines weiteren Rezeptors ermöglicht werden. Die Wahl eines geeigneten Rezeptors hing zum einen von der Verfügbarkeit einer Hybridomzelllinie ab, zum anderen davon, dass der zu exprimierende Rezeptor möglichst keinen Einfluss auf die Zellen haben sollte. Der *Roundabout*-Rezeptor (Robo3) aus *Drosophila melanogaster* erfüllte beide Kriterien. Die Regulierung der Expressionen von Robo1-3 in *Drosophila* ist verantwortlich für das Wachstum der Wachstumskegel von Neuronen über die Mittellinie oder das Verbleiben auf ipsilateraler Seite. So exprimieren ipsilaterale Neurone in der Entwicklung stärker Robo1 als kommissurale Neurone beim Überqueren der Mittellinie. Nach erfolgter Kreuzung letzterer wird die Expression von Robo1 erhöht, damit eine Rückkreuzung verhindert wird. Die Expression ist durch das Protein *Commisureless* (Comm) reguliert und das lokale Wachstum durch Inhibitoren (wie Slit) oder Aktivatoren (Netrine) gelenkt [364]. Bei der ausbleibenden Expression von Comm wird nach erfolgter Überkreuzung die exakte longitudinale Lage durch das Zusammenspiel der Robo1-3 Rezeptoren bestimmt [365].

Während Robo1 und Robo2 zu den Rezeptoren in Vertebraten sehr ähnlich sind, gibt es für Robo3 ein Homolog in Vertebraten (Rig-1), welches sich stärker von dem in *Drosophila* unterscheidet [366].

Rig-1 scheint die Rolle von Comm in Vertebraten zu übernehmen. Es wird ausschließlich in kommissuralen Axonen vor der Mittellinienkreuzung exprimiert, um die Neuralplatte zu erreichen. Anschließend wird der Kontakt zur Neuralplatte gelöst, um ein erneutes Kreuzen zu verhindern [367]. Dieser Mechanismus kann durch Rig-1 über die veränderte Perzeption von Slit als Liganden vollzogen werden, so wie es auch von Comm in *Drosophila* reguliert wird.

Durch die unterschiedlichen Mechanismen und die geringe Homologie von Robo3 und Rig-1, wie es auch in Abbildung 163 und den Tabellen 4-8 und 4-9 beschrieben wurde, hat die

Überexpression von Robo3 aus *Drosophila melanogaster* mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Auswirkungen auf Vertebratenzellen. Die in Abbildung 163 dargestellte Antigenbindestelle des Antikörpers, der von den Hybridomzellen sezerniert wird, zeigt zudem kaum identische Aminosäuren zwischen *Drosophila*- und Vertebraten-Robo3-Proteinen. Die fehlende Interaktion des Antikörpers mit Robo3-Homologen aus Mammalienzellen muß in zukünftigen Experimenten mittels proteinbiochemischen Methoden bestätigt werden.

Durch die Deletion eines langen Bereiches der zytoplasmatischen Domäne des Robo3-Proteins wird zusätzlich eine mögliche Signalweiterleitung nach Bindung eines Liganden unterbrochen. Die Autophosphorylierungsstellen von Robo3 werden in diesem Fall nicht mehr exprimiert. Diese trunkierte Sequenz wurde in zwei Plasmide kloniert, die eine konstitutive und eine entwicklungs- und zellspezifische Expression von Robo3 ermöglichen (Abbildung 4-168). Durch die Verknüpfung der Expression von Robo3 mit *firefly*-Luziferase, kann die Aktivierung beider Promotoren detektiert werden. Für die konstitutive Expression wurde der CMV-Promotor gewählt und für die zellspezifische Expression in neuronalen Zellen der Promotor für das humane Doublecortin. Dieses mikrotubuliassoziierte Protein wurde in migratorisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen und spielt eine Rolle bei der humanen Lissencephalie, die auf einer neuronalen Migrationsstörung während der Gehirnentwicklung beruht [368-370]. Die Expression von Doublecortin konnte nicht in einer Koexpression mit Nestin oder dem Protein NeuN, das in reifen Neuronen exprimiert wird, nachgewiesen werden [114]. Eine Koexpression mit β 3-Tubulin wurde in Zellen, die aus dem embryonalen Mausgehirn isoliert wurden, aber beobachtet [114].

Zur Transfektion der Plasmide in CGR8-Zellen musste eine optimierte Transfektionsstrategie gesucht werden, da sich diese Zellen nicht mit üblichen Transfektionsmitteln oder mit Nukleofektion transfizieren ließen. Polyethylenimin ist ein Polymer aus Ethylenimin, welches in wässriger Lösung als Polykation mit einer sehr hohen Ladungsdichte vorliegt [371]. Die Eigenschaft, die negative Ladung der DNA zu neutralisieren, ermöglicht den Eintritt des Polyplexes in die Zellmembran. Nach der Endozytose gelangt der PEI/DNA-Komplex direkt an den Zellkern [372], indem wahrscheinlich die Affinität zu den negativ geladenen Phospholipiden der Zellkernmembran des Polyplexes für eine Zellkernmembranbindung ausreicht. Unterschiedliche Verhältnisse zwischen DNA und verschieden großen, linearen oder verzweigten PEI-Molekülen wurden für viele Zelltypen bestimmt, was einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat [373]. Sogar Sphäroide können mit relativ gutem Erfolg schonend genetisch verändert werden [374]. Zudem besteht die Möglichkeit, PEI mit gewöhnlichen Transfektionsmitteln zu mischen [375].

Nach Optimierung der Transfektion beider *robo3*-Plasmide unabhängig in CGR8-Zellen konnte die Integration der *robo3*-Sequenz in die Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-170). Die Aktivität der *firefly*-Luziferase in den mit CMV-*robo3*-Luziferase transfizierten Zellen

konnte eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 4-169). Weitere Experimente, vor allem eine proteinbiochemische Validierung der von dem Doublecortinpromotor vermittelten Reporterexpression konnten in dieser hier vorgelegten Dissertation nicht durchgeführt werden und ist Gegenstand der weiteren Arbeiten.

Ladewig konnte vor kurzem die Sortierung von DCX-GFP exprimierenden neuronalen Vorläuferzellen, die aus humanen Stammzellen generiert wurden, mittels FACS zeigen [376]. Durch die Klonierung des Δ robo3-Proteins unter Kontrolle des Doublecortin Promotors stehen vielfältige Applikationsmöglichkeiten für die multimodale Bildgebung mittels hochaufgelöstem MRT in Kombination mit der Überexpression der *firefly*-Luziferase und zur magnetchromatographischen Isolation von Doublecortin⁺-Zellen zur Verfügung [33].

6 Literaturverzeichnis

1. Rome, C., Couillaud, F., Moonen, C.T. (2007). Gene expression and gene therapy imaging. *Eur Radiol*, 17(2): S. 305-19.
2. Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M. (1946). Nuclear Induction. *Physical Review*, 69(3-4): S. 127.
3. Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V. (1946). Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review*, 69(1-2): S. 37-38.
4. Roth, K. (1984). *NMR-tomography and -spectroscopy in medicine: an introduction*. Springer-Verlag, Berlin.
5. Schaeffter, T., Dahnke, H (2008). *Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy*, in *Molecular Imaging I*, Herausgeber: Semmler, W., Schwaiger, M. Springer-Verlag, Berlin. S. 75-90.
6. Burtea, C., Laurent, S., Elst L.V., Muller, R.N (2008). *Contrast Agents: Magnetic Resonance*, in *Molecular Imaging I*, Herausgeber: Semmler, W., Schwaiger, M., Springer-Verlag, Berlin. S. 135-165.
7. Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C.A., Bengel, H.H., Josephson, L. (1990). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology*, 175(2): S. 489-93.
8. Wang, Y.X., Hussain, S.M., Krestin, G.P. (2001). Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol*, 11(11): S. 2319-31.
9. Barkhausen, J., Ebert, W., Debatin, J.F., Weinmann, H.J. (2002). Imaging of myocardial infarction: comparison of magnevist and gadophrin-3 in rabbits. *J Am Coll Cardiol*, 39(8): S. 1392-8.
10. Hofmann, B., Bogdanov, A. Jr., Marecos E., Ebert, E., Semmler, W., Weissleder, R. (1999). Mechanism of gadophrin-2 accumulation in tumor necrosis. *J Magn Reson Imaging*, 9(2): S. 336-41.
11. Taupitz, M., Wagner, S., Hamm, B., Dienemann, D., Lawaczek, R., Wolf, K.J. (1993). MR lymphography using iron oxide particles. Detection of lymph node metastases in the VX2 rabbit tumor model. *Acta Radiol*, 34(1): S. 10-5.
12. Louie, A.Y., Huber, M.M., Ahrens, E.T., Rothbacher, U., Moats, R., Jacobs, R.E., Fraser, S.E., Meade, T.J. (2000). In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat Biotechnol*, 18(3): S. 321-5.
13. Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E.A., Basilion, J.P. (2000). In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med*, 6(3): S. 351-5.
14. Cohen, B., Dafni, H., Meir, G., Harmelin, A., Neeman, M. (2005). Ferritin as an endogenous MRI reporter for noninvasive imaging of gene expression in C6 glioma tumors. *Neoplasia*, 7(2): S. 109-17.
15. Mantyla, T., Hakumaki, J.M., Huhtala, T., Narvanen, A., Yla-Herttuala, S. (2006). Targeted magnetic resonance imaging of Scavidin-receptor in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Magn Reson Med*, 55(4): S. 800-4.
16. Josephson, L., Perez, J.M., Weissleder, R. (2001). Magnetic Nanosensors for the Detection of Oligonucleotide Sequences. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(17): S. 3204-6.
17. Contag, P.R. (2002). Whole-animal cellular and molecular imaging to accelerate drug development. *Drug Discov Today*, 7(10): S. 555-62.
18. Gibson, A.P., Hebden, J.C., Arridge, S.R. (2005). Recent advances in diffuse optical imaging. *Phys Med Biol*, 50(4): S. 1-43.
19. Stell, A., Belcredito, S., Ramachandran, B., Biserni, A., Rando, G., Ciana, P., Maggi, A. (2007). Multimodality imaging: novel pharmacological applications of reporter systems. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 51(2): S. 127-38.
20. Ntziachristos, V., Yodh, A.G., Schnall, M., Chance, B. (2000). Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6): S. 2767-72.
21. Rice, B.W., Cable, M.D., Nelson, M.B. (2001). In vivo imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt*, 6(4): S. 432-40.
22. Tuchin, V.V. (2000). *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis*. Tutorial texts in optical engineering TT 38. SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, USA.

23. Winkeler, A., Sena-Esteves, M., Paulis, L.E.M., Li, H., Waerzeggers, Y., Rückriem, B., Himmelreich, U., Klein, M., Monfared, P., Rueger, M.A., Heneka, M., Vollmar, S., Hoehn, M., Fraefel, C., Graf, R., Wienhard, K., Heiss, W.D., Jacobs, A.H. (2007). Switching on the lights for gene therapy. *PLoS One*, 2(6): S. 528.
24. Waerzeggers, Y., Monfared, P., Viel, T., Winkeler, A., Voges, J., Jacobs, A.H. (2009). Methods to monitor gene therapy with molecular imaging. *Methods*, 48(2): S. 146-60.
25. Goertzen, A.L., Meadors, A.K., Silverman, R.W., Cherry, S.R. (2002). Simultaneous molecular and anatomical imaging of the mouse in vivo. *Phys Med Biol*, 47(24): S. 4315-28.
26. Ray, P., De, A., Min, J.J., Tsieng, R.Y., Gambhir, S.S. (2004). Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res*, 64(4): S. 1323-30.
27. Hastings, J.W. (1996). Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 173(1): S. 5-11.
28. Wilson, T., Hastings, J.W. (1998). Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14: S. 197-230.
29. Bioluminescence Reporters, in *Protocols & Applications Guide*. 2009, Promega.
30. Wong, M.L., Kaye, A.H., Hovens, C.M. (2007). Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes. *J Clin Neurosci*, 14(4): S. 301-8.
31. Legler, J.M., Ries, L.A., Smith, M.A., Warren, J.L., Heineman, E.F., Kaplan, R.S., Linet, M.S. (1999). Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst*, 91(16): S. 1382-90.
32. Kowalczyk, A., Macdonald, R.L., Amidei, C., Dohrmann, G. 3rd, Erickson, R.K., Hekmatpanah, J., Krauss, S., Krishnasamy, S., Masters, G., Mullan, S.F., Mundt, A.J., Sweeney, P., Vokes, E.E., Weir, B.K., Wollman, R.L. (1997). Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas. *Neurosurgery*, 41(5): S. 1028-36; discussion 1036-8.
33. Bigner, D.D., McLendon, R.E., Bruner, J.M., Russell, D.S. (1998). Russell and Rubinstein's pathology of tumors of the nervous system. 6th ed. Oxford University Press, London.
34. Thorsen, F., Jirak, D., Wang, J., Sykova, E., Bjerkvig, R., Enger, P.O., van der Kogel, A., Hajek, M. (2008). Two distinct tumor phenotypes isolated from glioblastomas show different MRS characteristics. *NMR Biomed*, 21(8): S. 830-8.
35. Bengzon, J.E., Salford, E., Leif, G., Fan, X. (2009). Glioma Stem Cells in the Context of Oncogenesis, in *Stem Cells and Cancer*, Herausgeber: Bagley, R.T., Springer-Verlag, Berlin. S. 115-26.
36. Hide, T., Takezaki, T., Nakamura, H., Kuratsu, J., Kondo, T. (2008). Brain tumor stem cells as research and treatment targets. *Brain Tumor Pathol*, 25(2): S. 67-72.
37. Johannessen, T.C., Bjerkvig, R., Tysnes, B.B. (2008). DNA repair and cancer stem-like cells-potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev*, 34(6): S. 558-67.
38. Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120): S. 756-60.
39. Wang, J., Sakariassen, P.O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R., Enger, P.O. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, 122(4): S. 761-8.
40. Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5: S. 67.
41. Weller, M., Tonn, J.C., Ernemann, U., Wiestler O.D., Bamberg, M., (2006). Diagnostik und Therapie des Glioblastoms. *Der Onkologe*, 6: S. 500-7.
42. Stummer, W., Reulen, H.J., Novotny, A., Stepp, H., Tonn, J.C. (2003). Fluorescence-guided resections of malignant gliomas-an overview. *Acta Neurochir Suppl*, 88: S. 9-12.
43. Swanson, K.R., Chakraborty, G., Wang, C.H., Rockne, R., Harpold, H.L., Muzi, M., Adamsen, T.C., Krohn, K.A., Spence, A.M. (2009). Complementary but distinct roles for MRI and 18F-fluoromisonidazole PET in the assessment of human glioblastomas. *J Nucl Med*, 50(1): S. 36-44.
44. Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859): S. 112-7.
45. Morrison, S.J., Uchida, N., Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11: S. 35-71.
46. Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M., McKay, R.D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev*, 59(1): S. 89-102.

47. Dinsmore, J., Ratliff, J., Deacon, T., Pakzaban, P., Jacoby, D., Galpern, W., Isacson, O. (1996). Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant*, 5(2): S. 131-43.
48. Renoncourt, Y., Carroll, P., Filippi, P., Arce, V., Alonso, S. (1998). Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mech Dev*, 79(1-2): S. 185-97.
49. Brustle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., McKay, R.D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 285(5428): S. 754-6.
50. Mujtaba, T., Piper, D.R., Kalyani, A., Groves, A.K., Lucero, M.T., Rao, M.S. (1999). Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Dev Biol*, 214(1): S. 113-27.
51. Trentin, A., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M., Dupin, E. (2004). Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13): S. 4495-500.
52. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 17(13): S. 5046-61.
53. Katsura, Y., Kawamoto, H. (2001). Stepwise lineage restriction of progenitors in lymphomyelopoiesis. *Int Rev Immunol*, 20(1): S. 1-20.
54. Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88(3): S. 287-98.
55. Hall, P.A., Watt, F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, 106(4): S. 619-33.
56. Morrison, S.J., Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1(8): S. 661-73.
57. Potten, C.S., Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110(4): S. 1001-20.
58. Margolis, J., Spradling, A. (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 121(11): S. 3797-807.
59. Forge, A., Li, L., Corwin, J.T., Nevill, G. (1993). Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science*, 259(5101): S. 1616-9.
60. Graziadei, P.P., Levine, R.R., Monti Graziadei, G.A. (1979). Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience*, 4(6): S. 713-27.
61. Liu, J., Solway, K., Messing, R.O., Sharp, F.R. (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*, 18(19): S. 7768-78.
62. Kee, N.J., Preston, E., Wojtowicz, J.M. (2001). Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res*, 136(3): S. 313-20.
63. Yagita, Y., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Takasawa, K., Miyata, T., Okano, H., Hori, M., Matsumoto, M. (2001). Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*, 32(8): S. 1890-6.
64. Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 8(9): S. 963-70.
65. Parent, J.M., Vexler, Z.S., Gong, C., Derugin, N., Ferriero, D.M. (2002). Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol*, 52(6): S. 802-13.
66. Doe, C.Q. (1996). Asymmetric cell division and neurogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 6(5): S. 562-6.
67. Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*, 31(5): S. 727-41.
68. Qian, X., Goderie, S.K., Shen, Q., Stern, J.H., Temple, S. (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development*, 125(16): S. 3143-52.
69. Sun, Y., Goderie, S.K., Temple, S. (2005). Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron*, 45(6): S. 873-86.
70. Svendsen, C.N., Skepper, J., Rosser, A.E., ter Borg, M.G., Tyres, P., Ryken, T. (1997). Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. *Brain Res Dev Brain Res*, 99(2): S. 253-8.
71. Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135: S. 1127-8.

72. Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5): S. 2074-7.
73. Luskin, M.B., Parnavelas, J.G., Barfield, J.A. (1993). Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci*, 13(4): S. 1730-50.
74. Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16(6): S. 2027-33.
75. Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2): S. 337-44.
76. Kaplan, M.S. (1985). Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. *Ann N Y Acad Sci*, 457: S. 173-92.
77. Palm, K., Salin-Nordstrom, T., Levesque, M.F., Neuman, T. (2000). Fetal and adult human CNS stem cells have similar molecular characteristics and developmental potential. *Brain Res Mol Brain Res*, 78(1-2): S. 192-5.
78. Arsenijevic, Y., Villemure, J.G., Brunet, J.F., Bloch, J.J., Deglon, N., Kostic, C., Zurn, A., Aebischer, P. (2001). Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol*, 170(1): S. 48-62.
79. Johansson, C.B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., Frisen, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res*, 253(2): S. 733-6.
80. Palmer, T.D., Ray, J., Gage, F.H. (1995). FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, 6(5): S. 474-86.
81. Palmer, T.D., Markakis, E.A., Willhoite, A.R., Safar, F., Gage, F.H. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, 19(19): S. 8487-97.
82. Palmer, T.D., Schwartz, P.H., Taupin, P., Kaspar, B., Stein, S.A., Gage, F.H. (2001). Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature*, 411(6833): S. 42-3.
83. Seaberg, R.M., van der Kooy, D. (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci*, 22(5): S. 1784-93.
84. Shihabuddin, L.S., Ray, J., Gage, F.H. (1997). FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol*, 148(2): S. 577-86.
85. Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, 16(23): S. 7599-609.
86. Kruttwig, K., Proliferations- und Differenzierungskapazität neuraler Vorläuferzellen des Rattenkleinhirns. 2005, Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. S. 122.
87. Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., McKay, R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, 10(24): S. 3129-40.
88. Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*, 6(11): S. 3543-57.
89. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17): S. 3389-402.
90. Carlotti, F., Bazuine, M., Kekarainen, T., Seppen, J., Pognonec, P., Maassen, J.A., Hoeben, R.C. (2004). Lentiviral vectors efficiently transduce quiescent mature 3T3-L1 adipocytes. *Mol Ther*, 9(2): S. 209-17.
91. Mautino, M.R., Ramsey, W.J., Reiser, J., Morgan, R.A. (2000). Modified human immunodeficiency virus-based lentiviral vectors display decreased sensitivity to trans-dominant Rev. *Hum Gene Ther*, 11(6): S. 895-908.
92. Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A., Charneau, P. (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 96(13): S. 4103-10.
93. Follenzi, A., Ailles, L.E., Bakovic, S., Geuna, M., Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet*, 25(2): S. 217-22.

94. Seppen, J., Rijnberg, M., Cooreman, M.P., Oude Elferink, R.P. (2002). Lentiviral vectors for efficient transduction of isolated primary quiescent hepatocytes. *J Hepatol*, 36(4): S. 459-65.
95. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72(12): S. 9873-80.
96. Barry, S.C., Harder, B., Brzezinski, M., Flint, L.Y., Seppen, J., Osborne, W.R. (2001). Lentivirus vectors encoding both central polypurine tract and posttranscriptional regulatory element provide enhanced transduction and transgene expression. *Hum Gene Ther*, 12(9): S. 1103-8.
97. Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 23(4): S. 628-33.
98. Barry, S.C., Seppen, J., Ramesh, N., Foster, J.L., Seyama, K., Ochs, H.D., Garcia, J.V., Osborne, W.R. (2000). Lentiviral and murine retroviral transduction of T cells for expression of human CD40 ligand. *Hum Gene Ther*, 11(2): S. 323-32.
99. Seppen, J., Barry, S.C., Klinkspoor, J.H., Katen, L.J., Lee, S.P., Garcia, J.V., Osborne, W.R. (2000). Apical gene transfer into quiescent human and canine polarized intestinal epithelial cells by lentivirus vectors. *J Virol*, 74(16): S. 7642-5.
100. Iweala, O.I. (2004). HIV diagnostic tests: an overview. *Contraception*, 70(2): S. 141-7.
101. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): S. 680-5.
102. Fernandez-Patron, C., Castellanos-Serra, L., Rodriguez, P. (1992). Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. *Biotechniques*, 12(4): S. 564-73.
103. Hardy, E., Ramon, J., Saez, V., Baez, R., Tejada, Y., Ruiz, A. (2008). Detection of PEGylated proteins in polyacrylamide gels by reverse staining with zinc and imidazole salts. *Electrophoresis*, 29(11): S. 2363-71.
104. Riemer, J., Hoepken, H.H., Czerwinska, H., Robinson, S.R., Dringen, R. (2004). Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem*, 331(2): S. 370-5.
105. Stewart, M. (1993). Intermediate filament structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 5(1): S. 3-11.
106. Reifemberger, G., Bilzer, T., Seitz, R.J., Wechsler, W. (1989). Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in ethylnitrosourea-induced rat gliomas and glioma cell lines. *Acta Neuropathol*, 78(3): S. 270-82.
107. Santa Cruz Biotechnologies, Produktinformationen www.scbt.com.
108. Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4): S. 585-95.
109. Sugawara, K., Kurihara, H., Negishi, M., Saito, N., Nakazato, Y., Sasaki, T., Takeuchi, T. (2002). Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest*, 82(3): S. 345-51.
110. Easter, S.S., Jr., Ross, L.S., Frankfurter, A. (1993). Initial tract formation in the mouse brain. *J Neurosci*, 13(1): S. 285-99.
111. Dennis, K., Uittenbogaard, M., Chiaramello, A., Moody, S.A. (2002). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III beta-tubulin gene. *Gene*, 294(1-2): S. 269-77.
112. Katsetos, C.D., Del Valle, L., Geddes, J.F., Assimakopoulou, M., Legido, A., Boyd, J.C., Balin, B., Parikh, N.A., Maraziotis, T., de Chadarevian, J.P., Varakis, J.N., Matsas, R., Spano, A., Frankfurter, A., Herman, M.M., Khalili, K. (2001). Aberrant localization of the neuronal class III beta-tubulin in astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med*, 125(5): S. 613-24.
113. Katsetos, C.D., Kontogeorgos, G., Geddes, J.F., Herman, M.M., Tsimara-Papastamatiou, H., Yu, Y., Sakkas, L.I., Tsokos, M., Patchefsky, A.S., Ehya, H., Cooper, H.S., Provencio, J., Spano, A.J., Frankfurter, A. (2000). Differential distribution of the neuron-associated class III beta-tubulin in neuroendocrine lung tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 124(4): S. 535-44.
114. Karl, C., Couillard-Despres, S., Prang, P., Munding, M., Kilb, W., Brigadski, T., Plotz, S., Mages, W., Luhmann, H., Winkler, J., Bogdahn, U., Aigner, L. (2005). Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence. *J Neurochem*, 92(2): S. 264-82.
115. Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25(9-10): S. 1439-51.
116. Cassimeris, L., Spittle, C. (2001). Regulation of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol*, 210: S. 163-226.

117. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3): S. 379-91.
118. Solter, D., Knowles, B.B. (1979). Developmental stage-specific antigens during mouse embryogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 13: S. 139-65.
119. Gooi, H.C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B.B., Solter, D., Evans, M.J. (1981). Stage-specific embryonic antigen involves alpha 1 goes to 3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature*, 292(5819): S. 156-8.
120. Chou, D.K., Ilyas, A.A., Evans, J.E., Costello, C., Quarles, R.H., Jungalwala, F.B. (1986). Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy. *J Biol Chem*, 261(25): S. 11717-25.
121. Ariga, T., Kohriyama, T., Freddo, L., Latov, N., Saito, M., Kon, K., Ando, S., Suzuki, M., Hemling, M.E., Rinehart, K.L. Jr., Kusunoki, S., Yu, R.K. (1987). Characterization of sulfated glucuronic acid containing glycolipids reacting with IgM M-proteins in patients with neuropathy. *J Biol Chem*, 262(2): S. 848-53.
122. Bronner-Fraser, M. (1986). Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev Biol*, 115(1): S. 44-55.
123. Bronner-Fraser, M. (1987). Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody. *Dev Biol*, 123(2): S. 321-31.
124. Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S., Nirenberg, M. (1979). Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(10): S. 4913-7.
125. Kasai, N., Yu, R.K. (1983). The monoclonal antibody A2B5 is specific to ganglioside GQ1c. *Brain Res*, 277(1): S. 155-8.
126. Saito, M., Kitamura, H., Sugiyama, K. (2001). The specificity of monoclonal antibody A2B5 to c-series gangliosides. *J Neurochem*, 78(1): S. 64-74.
127. Chen, Y.T., Holcomb, C., Moore, H.P. (1993). Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14): S. 6508-12.
128. Iwasaki, K., Hailemariam, K., Tsuji, Y. (2007). PIAS3 interacts with ATF1 and regulates the human ferritin H gene through an antioxidant-responsive element. *J Biol Chem*, 282(31): S. 22335-43.
129. de Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R., DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(23): S. 7870-3.
130. Golubovskaya, V.M., Kweh, F.A., Cance, W.G. (2009). Focal adhesion kinase and cancer. *Histol Histopathol*, 24(4): S. 503-10.
131. Mitra, S.K., Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5): S. 516-23.
132. Veronese, F.M., Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*, 10(21): S. 1451-8.
133. Chandler, L.P., Chandler, C.E., Hosang, M., Shooter, E.M. (1985). A monoclonal antibody which inhibits epidermal growth factor binding has opposite effects on the biological action of epidermal growth factor in different cells. *J Biol Chem*, 260(6): S. 3360-7.
134. Simpson, J.H., Bland, K.S., Fetter, R.D., Goodman, C.S. (2000). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell*, 103(7): S. 1019-32.
135. Perls, M. (1867). Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Virchows Archiv*, 39(1): S. 42-48.
136. Romeis, B. (1989). *Mikroskopische Technik*. 17 ed, Herausgeber: Böck, P. Urban und Schwarzenberg, München.
137. Markwardt, C.B. Non-Linear Least Squares Fitting in IDL with MPFIT. in *Astronomical Data Analysis Software and Systems XVII*. 2008.
138. Scholzen, J., Entwicklung eines Kalibrierphantoms für die optische Bildgebung am Rattenkopf, in *Fachbereich Photoingenieurwesen und Medientechnik*. 2006, Diplomarbeit, Fachhochschule Köln: Köln.
139. Paxinos, G., Franklin, K.B.J. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Compact 2nd ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, USA.
140. Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (2006). Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry*, 45(32): S. 9639-47.
141. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22(12): S. 1567-72.

142. Mansfield, J.R., Gossage, K.W., Hoyt, C.C., Levenson, R.M. (2005). Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt*, 10(4): S. 41207.
143. Kaijzel, E.L., van der Pluijm, G., Lowik, C.W. (2007). Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression. *Clin Cancer Res*, 13(12): S. 3490-7.
144. Abe, T., Wakimoto, H., Bookstein, R., Maneval, D.C., Chiocca, E.A., Basilion, J.P. (2002). Intra-arterial delivery of p53-containing adenoviral vector into experimental brain tumors. *Cancer Gene Ther*, 9(3): S. 228-35.
145. Nishizaki, M., Fujiwara, T., Tanida, T., Hizuta, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y., Bouvet, M., Roth, J.A., Tanaka, N. (1999). Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin Cancer Res*, 5(5): S. 1015-23.
146. Jossierand, V., Texier-Nogues, I., Huber, P., Favrot, M.C., Coll, J.L. (2007). Non-invasive in vivo optical imaging of the lacZ and luc gene expression in mice. *Gene Ther*, 14(22): S. 1587-93.
147. Li, Z., Suzuki, Y., Huang, M., Cao, F., Xie, X., Connolly, A.J., Yang, P.C., Wu, J.C. (2008). Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells*, 26(4): S. 864-73.
148. Mitchell, M.D., Kundel, H.L., Axel, L., Joseph, P.M. (1986). Agarose as a tissue equivalent phantom material for NMR imaging. *Magn Reson Imaging*, 4(3): S. 263-6.
149. Blechinger, J.C., Madsen, E.L., Frank, G.R. (1988). Tissue-mimicking gelatin-agar gels for use in magnetic resonance imaging phantoms. *Med Phys*, 15(4): S. 629-36.
150. Reimer, P., Tombach, B. (1998). Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions. *Eur Radiol*, 8(7): S. 1198-204.
151. Kustermann, E., Himmelreich, U., Kandal, K., Geelen, T., Ketkar, A., Wiedermann, D., Strecker, C., Esser, J., Arnhold, S., Hoehn, M. (2008). Efficient stem cell labeling for MRI studies. *Contrast Media Mol Imaging*, 3(1): S. 27-37.
152. Suzuki, Y., Cunningham, C.H., Noguchi, K., Chen, I.Y., Weissman, I.L., Yeung, A.C., Robbins, R.C., Yang, P.C. (2008). In vivo serial evaluation of superparamagnetic iron-oxide labeled stem cells by off-resonance positive contrast. *Magn Reson Med*, 60(6): S. 1269-75.
153. Sipe, J.C., Filippi, M., Martino, G., Furlan, R., Rocca, M.A., Rovaris, M., Bergami, A., Zyroff, J., Scotti, G., Comi, G. (1999). Method for intracellular magnetic labeling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents. *Magn Reson Imaging*, 17(10): S. 1521-3.
154. Frank, J.A., Miller, B.R., Arbab, A.S., Zywickie, H.A., Jordan, E.K., Lewis, B.K., Bryant, L.H. Jr., Bulte, J.W. (2003). Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology*, 228(2): S. 480-7.
155. Josephson, L., Tung, C.H., Moore, A., Weissleder, R. (1999). High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem*, 10(2): S. 186-91.
156. Pintaske, J., Helms, G., Bantleon, R., Kehlbach, R., Wiskirchen, J., Claussen, C.D., Schick, F. (2005). A preparation technique for quantitative investigation of SPIO-containing solutions and SPIO-labelled cells by MRI. *Biomed Tech (Berl)*, 50(6): S. 174-80.
157. Vlaardingerbroek, M.T., Boer den, J.A. (2004). *Magnetresonanzbildgebung*. Springer-Verlag, Berlin. S. 302.
158. Tanimoto, A., Pouliquen, D., Kreft, B.P., Stark, D.D. (1994). Effects of spatial distribution on proton relaxation enhancement by particulate iron oxide. *J Magn Reson Imaging*, 4(5): S. 653-7.
159. Stark, D.D., Bradley, W.G. (1988). *Magnetic resonance imaging*. C.V. Mosby Co, St. Louis, USA.
160. Majumdar, S., Zoghbi, S., Pope, C.F., Gore, J.C. (1988). Quantitation of MR relaxation effects of iron oxide particles in liver and spleen. *Radiology*, 169(3): S. 653-8.
161. Brauner, T., Hulser, D.F. (1990). Tumor cell invasion and gap junctional communication. II. Normal and malignant cells confronted in multicell spheroids. *Invasion Metastasis*, 10(1): S. 31-48.
162. Nederman, T., Norling, B., Glimelius, B., Carlsson, J., Brunk, U. (1984). Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*, 44(7): S. 3090-7.
163. Sutherland, R.M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*, 240(4849): S. 177-84.
164. Mueller-Klieser, W. (1987). Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol*, 113(2): S. 101-22.
165. Gimi, B., Mori, N., Ackerstaff, E., Frost, E.E., Bulte, J.W., Bhujwalla, Z.M. (2006). Noninvasive MRI of endothelial cell response to human breast cancer cells. *Neoplasia*, 8(3): S. 207-13.

166. Shapiro, E.M., Skrtic, S., Koretsky, A.P. (2005). Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med*, 53(2): S. 329-38.
167. Brandl, M., Tonn, J.C., Kotitschke, K., Goldbrunner, R., Kerkau, S., Haase, A. (1995). Quantitative NMR microscopy of multicellular tumor spheroids and confrontation cultures. *Magn Reson Med*, 34(4): S. 596-603.
168. Huang, S., Vader, D., Wang, Z., Stemmer-Rachamimov, A., Weitz, D.A., Dai, G., Rosen, B.R., Deisboeck, T.S. (2008). Using magnetic resonance microscopy to study the growth dynamics of a glioma spheroid in collagen I: A case study. *BMC Med Imaging*, 8: S. 3.
169. Bernas, L.M., Foster, P.J., Rutt, B.K. (2007). Magnetic resonance imaging of in vitro glioma cell invasion. *J Neurosurg*, 106(2): S. 306-13.
170. Fehlaue, F., Muench, M., Rades, D., Stalpers, L.J., Leenstra, S., van der Valk, P., Slotman, B., Smid, E.J., Sminia, P. (2005). Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: inhibition of cell proliferation and cell migration. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(11): S. 723-32.
171. McCaffrey, A., Kay, M.A., Contag, C.H. (2003). Advancing molecular therapies through in vivo bioluminescent imaging. *Mol Imaging*, 2(2): S. 75-86.
172. Gross, S., Abraham, U., Prior, J.L., Herzog, E.D., Piwnica-Worms, D. (2007). Continuous delivery of D-luciferin by implanted micro-osmotic pumps enables true real-time bioluminescence imaging of luciferase activity in vivo. *Mol Imaging*, 6(2): S. 121-30.
173. Qiao, Y., Spitz, M.R., Guo, Z., Hadeyati, M., Grossman, L., Kraemer, K.H., Wei, Q. (2002). Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes. *Mutat Res*, 509(1-2): S. 165-74.
174. Fischer, U., Meese, E. (2007). Glioblastoma multiforme: the role of DSB repair between genotype and phenotype. *Oncogene*, 26(56): S. 7809-15.
175. Peissner, W., Kocher, M., Treuer, H., Gillardon, F. (1999). Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 71(1): S. 61-8.
176. Qvarnstrom, O.F., Simonsson, M., Eriksson, V., Turesson, I., Carlsson, J. (2009). gammaH2AX and cleaved PARP-1 as apoptotic markers in irradiated breast cancer BT474 cellular spheroids. *Int J Oncol*, 35(1): S. 41-7.
177. Pratten, M.K., Lloyd, J.B. (1986). Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 881(3): S. 307-13.
178. Bowen, C.V., Zhang, X., Saab, G., Gareau, P.J., Rutt, B.K. (2002). Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells. *Magn Reson Med*, 48(1): S. 52-61.
179. Shapiro, E.M., Skrtic, S., Sharer, K., Hill, J.M., Dunbar, C.E., Koretsky, A.P. (2004). MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(30): S. 10901-6.
180. Dodd, S.J., Williams, M., Suhan, J.P., Williams, D.S., Koretsky, A.P., Ho, C. (1999). Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J*, 76(1): S. 103-9.
181. Peldschus, K., Kaul, M., Lange, C., Nolte-Ernsting, C., Adam, G., Itrich, H. (2007). Magnetic resonance imaging of single SPIO labeled mesenchymal stem cells at 3 Tesla. *Rofo*, 179(5): S. 473-9.
182. Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C.H., Tang, X.W., Cory, D., Scadden, D.T., Weissleder, R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 18(4): S. 410-4.
183. Heyn, C., Bowen, C.V., Rutt, B.K., Foster, P.J. (2005). Detection threshold of single SPIO-labeled cells with FIESTA. *Magn Reson Med*, 53(2): S. 312-20.
184. Heyn, C., Ronald, J.A., Mackenzie, L.T., MacDonald, I.C., Chambers, A.F., Rutt, B.K., Foster, P.J. (2006). In vivo magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation. *Magn Reson Med*, 55(1): S. 23-9.
185. Foster-Gareau, P., Heyn, C., Alejski, A., Rutt, B.K. (2003). Imaging single mammalian cells with a 1.5 T clinical MRI scanner. *Magn Reson Med*, 49(5): S. 968-71.
186. Bednov, A., Ulyanov, S., Cheung, C., Yodh, A.G. (2004). Correlation properties of multiple scattered light: implication to coherent diagnostics of burned skin. *J Biomed Opt*, 9(2): S. 347-52.
187. Pogue, B.W., Patterson, M.S. (2006). Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *J Biomed Opt*, 11(4): S. 041102.

188. Boxerman, J.L., Hamberg, L.M., Rosen, B.R., Weisskoff, R.M. (1995). MR contrast due to intravascular magnetic susceptibility perturbations. *Magn Reson Med*, 34(4): S. 555-66.
189. Nederman, T., Carlsson, J. (1984). Penetration and binding of vinblastine and 5-fluorouracil in cellular spheroids. *Cancer Chemother Pharmacol*, 13(2): S. 131-5.
190. Kotitschke, K., Tonn, J.C., Goldbrunner, R., Bogdahn, U., Haase, A. (1995). ¹H NMR investigations of tumor spheroids grown from a human glioma biopsy or from a human malignant glioma cell line. *J Magn Reson B*, 109(1): S. 39-43.
191. Nirmla, C., Rao, J.S., Ruifrok, A.C., Langford, L.A., Obeyesekere, M. (2001). Growth characteristics of glioblastoma spheroids. *Int J Oncol*, 19(6): S. 1109-15.
192. Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A., Keshet, E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(3): S. 768-72.
193. Friedrich, J., Ebner, R., Kunz-Schughart, L.A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids-old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol*, 83(11-12): S. 849-71.
194. Milosevic, J., Storch, A., Schwarz, J. (2004). Spontaneous apoptosis in murine free-floating neurospheres. *Exp Cell Res*, 294(1): S. 9-17.
195. Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 12(11): S. 4565-74.
196. Kallifatidis, G., Beckermann, B.M., Groth, A., Schubert, M., Apel, A., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Wenger, T., Wagner, W., Diehlmann, A., Saffrich, R., Krause, U., Eckstein, V., Mattern, J., Chai, M., Schutz, G., Ho, A.D., Gebhard, M.M., Buchler, M.W., Friess, H., Buchler, P., Herr, I. (2008). Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther*, 15(4): S. 231-40.
197. Alam, S., Sen, A., Behie, L.A., Kallos, M.S. (2004). Cell cycle kinetics of expanding populations of neural stem and progenitor cells in vitro. *Biotechnol Bioeng*, 88(3): S. 332-47.
198. Borman, A.M., Le Mercier, P., Girard, M., Kean, K.M. (1997). Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res*, 25(5): S. 925-32.
199. Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Hayakawa, T. (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*, 1(4): S. 376-82.
200. Wong, E.T., Ngoi, S.M., Lee, C.G. (2002). Improved co-expression of multiple genes in vectors containing internal ribosome entry sites (IRESes) from human genes. *Gene Ther*, 9(5): S. 337-44.
201. Wang, Y., Iyer, M., Annala, A.J., Chappell, S., Mauro, V., Gambhir, S.S. (2005). Noninvasive monitoring of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals using improved bicistronic vectors. *J Nucl Med*, 46(4): S. 667-74.
202. Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S., Lee, M.G. (1996). Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques*, 20(1): S. 102-4, 106, 108-10.
203. Svendsen, C.N., Fawcett, J.W., Bentlage, C., Dunnett, S.B. (1995). Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. *Exp Brain Res*, 102(3): S. 407-14.
204. Wirth, M., Bode, J., Zettlmeissl, G., Hauser, H. (1988). Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure. *Gene*, 73(2): S. 419-26.
205. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17): S. 8033-7.
206. Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C., Pastan, I. (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell*, 32(2): S. 639-46.
207. Matuszewski, L., Persigehl, T., Wall, A., Schwindt, W., Tombach, B., Fobker, M., Poremba, C., Ebert, W., Heindel, W., Bremer, C. (2005). Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection, particle size, and surface coating on labeling efficiency. *Radiology*, 235(1): S. 155-61.
208. Jiao, Y., Peng, Z.H., Zhang, J.Y., Qin, J., Zhong, C.P. (2008). Liposome-mediated transfer can improve the efficacy of islet labeling with superparamagnetic iron oxide. *Transplant Proc*, 40(10): S. 3615-8.
209. Thorek, D.L., Tsourkas, A. (2008). Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*, 29(26): S. 3583-90.

210. Flexman, J.A., Minoshima, S., Kim, Y., Miyoshi, S., Cross, D.J., Maravilla, K., Anzai, Y. (2004). Efficiency of transfection and localization of superparamagnetic iron oxide particles in neural progenitor cells using two methods. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 7: S. 5246-9.
211. Rudelius, M., Daldrup-Link, H.E., Heinzmann, U., Piontek, G., Settles, M., Link, T.M., Schlegel, J. (2003). Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30(7): S. 1038-44.
212. Felgner, P.L., Tsai, Y.J., Sukhu, L., Wheeler, C.J., Manthorpe, M., Marshall, J., Cheng, S.H. (1995). Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 772: S. 126-39.
213. Mulder, W.J., Strijkers, G.J., Griffioen, A.W., van Bloois, L., Molema, G., Storm, G., Koning, G.A., Nicolay, K. (2004). A liposomal system for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of molecular targets. *Bioconjug Chem*, 15(4): S. 799-806.
214. Zhu, Y., Feuer, G., Day, S.L., Wrzesinski, S., Planelles, V. (2001). Multigene lentiviral vectors based on differential splicing and translational control. *Mol Ther*, 4(4): S. 375-82.
215. Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M., Darlix, J.L. (2000). An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *J Biol Chem*, 275(16): S. 11899-906.
216. Yu, X., Zhan, X., D'Costa, J., Tanavde, V.M., Ye, Z., Peng, T., Malehorn, M.T., Yang, X., Civin, C.I., Cheng, L. (2003). Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther*, 7(6): S. 827-38.
217. Loebinger, M.R., Eddaoudi, A., Davies, D., Janes, S.M. (2009). Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res*, 69(10): S. 4134-42.
218. Lourenco, S., Boni, S., Furling, D., Cosset, F.L., Cahour, A. (2009). A cell-based bicistronic lentiviral reporter system for identification of inhibitors of the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J Virol Methods*, 158(1-2): S. 152-9.
219. Chinnasamy, N., Shaffer, J., Chinnasamy, D. (2009). Production of multicistronic HIV-1 based lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*, 515: S. 137-50.
220. Szymczak, A.L., Vignali, D.A. (2005). Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin Biol Ther*, 5(5): S. 627-38.
221. Reiser, J., Lai, Z., Zhang, X.Y., Brady, R.O. (2000). Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J Virol*, 74(22): S. 10589-99.
222. Ibrahimi, A., Velde, G.V., Reumers, V., Toelen, J., Thiry, I., Vandeputte, C., Vets, S., Deroose, C., Bormans, G., Baekelandt, V., Debyser, Z., Gijssbers, R. (2009). Highly Efficient Multicistronic Lentiviral Vectors with Peptide 2A Sequences. *Hum Gene Ther*, 20(8): S. 845-60.
223. Chinnasamy, D., Milsom, M.D., Shaffer, J., Neuenfeldt, J., Shaaban, A.F., Margison, G.P., Fairbairn, L.J., Chinnasamy, N. (2006). Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI. *Virol J*, 3: S. 14.
224. Cozzi, A., Corsi, B., Levi, S., Santambrogio, P., Albertini, A., Arosio, P. (2000). Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem*, 275(33): S. 25122-9.
225. Prutki, M., Poljak-Blazi, M., Jakopovic, M., Tomas, D., Stipancic, I., Zarkovic, N. (2006). Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett*, 238(2): S. 188-96.
226. Renton, F.J., Jeitner, T.M. (1996). Cell cycle-dependent inhibition of the proliferation of human neural tumor cell lines by iron chelators. *Biochem Pharmacol*, 51(11): S. 1553-61.
227. Estrov, Z., Tawa, A., Wang, X.H., Dube, I.D., Sulh, H., Cohen, A., Gelfand, E.W., Freedman, M.H. (1987). In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. *Blood*, 69(3): S. 757-61.
228. Donfrancesco, A., Deb, G., Dominici, C., De Sio, L., Inserra, A., Boglino, C., Takahashi, M., Uchino, J., Helson, L. (1995). D-CECaT as preoperative chemotherapy for unresectable neuroblastoma in children over one year of age. *Anticancer Res*, 15(5B): S. 2347-50.
229. Elstner, A., Holtkamp, N., von Deimling, A. (2007). Involvement of Hif-1 in desferrioxamine-induced invasion of glioblastoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 24(1): S. 57-66.
230. Jackson, C.L. (2001). Construction of somatic cell hybrids. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 3: Unit 3.2.
231. Liu, W., Dahnke, H., Rahmer, J., Jordan, E.K., Frank, J.A. (2009). Ultrashort T2* relaxometry for quantitation of highly concentrated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticle labeled cells. *Magn Reson Med*, 61(4): S. 761-6.

232. Hoepken, H.H., Korten, T., Robinson, S.R., Dringen, R. (2004). Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem*, 88(5): S. 1194-202.
233. Qian, Z.M., To, Y., Tang, P.L., Feng, Y.M. (1999). Transferrin receptors on the plasma membrane of cultured rat astrocytes. *Exp Brain Res*, 129(3): S. 473-6.
234. Jeong, S.Y., David, S. (2003). Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem*, 278(29): S. 27144-8.
235. Hashizume, R., Ozawa, T., Dinca, E.B., Banerjee, A., Prados, M.D., James, C.D., Gupta, N. (2009). A human brainstem glioma xenograft model enabled for bioluminescence imaging. *J Neurooncol*. DOI-10.1007/s11060-009-9954-9.
236. Wang, H.W., Breslin, M.B., Chen, C., Akerstrom, V., Zhong, Q., Lan, M.S. (2009). INSM1-promoter driven adenoviral HSV thymidine kinase cancer gene therapy for the treatment of primitive neuroectodermal tumors. *Hum Gene Ther*. DOI-10.1089/hum.2008.168.
237. Gambarota, G., Leenders, W., Maass, C., Wesseling, P., van der Kogel, B., van Tellingen, O., Heerschap, A. (2008). Characterisation of tumour vasculature in mouse brain by USPIO contrast-enhanced MRI. *Br J Cancer*, 98(11): S. 1784-9.
238. Genove, G., DeMarco, U., Xu, H., Goins, W.F., Ahrens, E.T. (2005). A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. *Nat Med*, 11(4): S. 450-4.
239. Sibille, J.C., Ciriolo, M., Kondo, H., Crichton, R.R., Aisen, P. (1989). Subcellular localization of ferritin and iron taken up by rat hepatocytes. *Biochem J*, 262(2): S. 685-8.
240. Hirsh, M., Konijn, A.M., Iancu, T.C. (2002). Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells. *J Hepatol*, 36(1): S. 30-8.
241. Levi, S., Yewdall, S.J., Harrison, P.M., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A., Arosio, P. (1992). Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem J*, 288 (2): S. 591-6.
242. Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A., Arosio, P. (1988). Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J Biol Chem*, 263(34): S. 18086-92.
243. Lawson, D.M., Artymiuk, P.J., Yewdall, S.J., Smith, J.M., Livingstone, J.C., Treffry, A., Luzzago, A., Levi, S., Arosio, P., Cesareni, G., Thomas, C.D., Shaw, W.V., Harrison, P.M. (1991). Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature*, 349(6309): S. 541-4.
244. Picard, V., Renaudie, F., Porcher, C., Hentze, M.W., Grandchamp, B., Beaumont, C. (1996). Overexpression of the ferritin H subunit in cultured erythroid cells changes the intracellular iron distribution. *Blood*, 87(5): S. 2057-64.
245. Humphries, M.J. (2001). Cell adhesion assays. *Mol Biotechnol*, 18(1): S. 57-61.
246. Benoliel, A.M., Pirro, N., Marin, V., Consentino, B., Pierres, A., Vitte, J., Bongrand, P., Sieleznoff, I., Sastre, B. (2003). Correlation between invasiveness of colorectal tumor cells and adhesive potential under flow. *Anticancer Res*, 23(6C): S. 4891-6.
247. Natarajan, M., Hecker, T.P., Gladson, C.L. (2003). FAK signaling in anaplastic astrocytoma and glioblastoma tumors. *Cancer J*, 9(2): S. 126-33.
248. Basson, M.D. (2008). An intracellular signal pathway that regulates cancer cell adhesion in response to extracellular forces. *Cancer Res*, 68(1): S. 2-4.
249. Bishop, G.M., Robinson, S.R. (2001). Quantitative analysis of cell death and ferritin expression in response to cortical iron: implications for hypoxia-ischemia and stroke. *Brain Res*, 907(1-2): S. 175-87.
250. Elias, J., Marian, B., Edling, C., Lachmann, B., Noe, C.R., Rolf, S.H., Schuster, I. (2003). Induction of apoptosis by vitamin D metabolites and analogs in a glioma cell line. *Recent Results Cancer Res*, 164: S. 319-32.
251. Hardin, J.A., Sherr, D.H., DeMaria, M., Lopez, P.A. (1992). A simple fluorescence method for surface antigen phenotyping of lymphocytes undergoing DNA fragmentation. *J Immunol Methods*, 154(1): S. 99-107.
252. Hallgren, B., Sourander, P. (1958). The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem*, 3(1): S. 41-51.
253. Focht, S.J., Snyder, B.S., Beard, J.L., Van Gelder, W., Williams, L.R., Connor, J.R. (1997). Regional distribution of iron, transferrin, ferritin, and oxidatively-modified proteins in young and aged Fischer 344 rat brains. *Neuroscience*, 79(1): S. 255-61.
254. Double, K.L., Maywald, M., Schmittel, M., Riederer, P., Gerlach, M. (1998). In vitro studies of ferritin iron release and neurotoxicity. *J Neurochem*, 70(6): S. 2492-9.

255. Ben-Shachar, D., Youdim, M.B. (1991). Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats. *J Neurochem*, 57(6): S. 2133-5.
256. Sengstock, G.J., Olanow, C.W., Dunn, A.J., Arendash, G.W. (1992). Iron induces degeneration of nigrostriatal neurons. *Brain Res Bull*, 28(4): S. 645-9.
257. Holtkamp, N., Afanasieva, A., Elstner, A., van Landeghem, F.K., Konneker, M., Kuhn, S.A., Kettenmann, H., von Deimling, A. (2005). Brain slice invasion model reveals genes differentially regulated in glioma invasion. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(4): S. 1227-33.
258. Regan, R.F., Kumar, N., Gao, F., Guo, Y. (2002). Ferritin induction protects cortical astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Neuroscience*, 113(4): S. 985-94.
259. Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Yuan, T.Y., Giffard, R.G. (1998). Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience*, 82(3): S. 915-25.
260. Drysdale, J.W., Munro, H.N. (1966). Regulation of synthesis and turnover of ferritin in rat liver. *J Biol Chem*, 241(15): S. 3630-7.
261. Truty, J., Malpe, R., Linder, M.C. (2001). Iron prevents ferritin turnover in hepatic cells. *J Biol Chem*, 276(52): S. 48775-80.
262. Deans, A.E., Wadghiri, Y.Z., Bernas, L.M., Yu, X., Rutt, B.K., Turnbull, D.H. (2006). Cellular MRI contrast via coexpression of transferrin receptor and ferritin. *Magn Reson Med*, 56(1): S. 51-9.
263. So, P.W., Hotee, S., Herlihy, A.H., Bell, J.D. (2005). Generic method for imaging transgene expression. *Magn Reson Med*, 54(1): S. 218-21.
264. Winnard, P.T. Jr., Kluth, J.B., Kato, Y., Artemov, D., Raman, V. (2007). Development of novel chimeric transmembrane proteins for multimodality imaging of cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 6(12): S. 1889-99.
265. Shuter, B., Wang, S.C., Roche, J., Briggs, G., Pope, J.M. (1998). Relaxivity of Gd-EOB-DTPA in the normal and biliary obstructed guinea pig. *J Magn Reson Imaging*, 8(4): S. 853-61.
266. Shapiro, E.M., Medford-Davis, L.N., Fahmy, T.M., Dunbar, C.E., Koretsky, A.P. (2007). Antibody-mediated cell labeling of peripheral T cells with micron-sized iron oxide particles (MPIOs) allows single cell detection by MRI. *Contrast Media Mol Imaging*, 2(3): S. 147-53.
267. Lang, G.M., Kierek-Jaszczuk, D., Rector, E.S., Milton, A.D., Emmrich, F., Sehon, A.H. (1992). Suppression of antibody responses in rats to murine anti-CD4 monoclonal antibodies by conjugates with monomethoxypolyethylene glycol. *Immunol Lett*, 32(3): S. 247-52.
268. Guse, A.H., Milton, A.D., Schulze-Koops, H., Muller, B., Roth, E., Simmer, B., Wachter, H., Weiss, E., Emmrich, F. (1994). Purification and analytical characterization of an anti-CD4 monoclonal antibody for human therapy. *J Chromatogr A*, 661(1-2): S. 13-23.
269. Hogemann, D., Josephson, L., Weissleder, R., Basilion, J.P. (2000). Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression. *Bioconj Chem*, 11(6): S. 941-6.
270. Lee, S.W., Chang, D.H., Shim, M.S., Kim, B.O., Kim, S.O., Seo, M.H. (2007). Ionically fixed polymeric nanoparticles as a novel drug carrier. *Pharm Res*, 24(8): S. 1508-16.
271. Huh, Y.M., Jun, Y.W., Song, H.T., Kim, S., Choi, J.S., Lee, J.H., Yoon, S., Kim, K.S., Shin, J.S., Suh, J.S., Cheon, J. (2005). In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J Am Chem Soc*, 127(35): S. 12387-91.
272. Sun, C., Sze, R., Zhang, M. (2006). Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. *J Biomed Mater Res A*, 78(3): S. 550-7.
273. Kohler, N., Sun, C., Wang, J., Zhang, M. (2005). Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir*, 21(19): S. 8858-64.
274. Zhang, C., Jugold, M., Woenne, E.C., Lammers, T., Morgenstern, B., Mueller, M.M., Zentgraf, H., Bock, M., Eisenhut, M., Semmler, W., Kiessling, F. (2007). Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res*, 67(4): S. 1555-62.
275. Peng, X.H., Qian, X., Mao, H., Wang, A.Y., Chen, Z.G., Nie, S., Shin, D.M. (2008). Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int J Nanomedicine*, 3(3): S. 311-21.
276. Greene, L.A., Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(7): S. 2424-8.
277. Wang, J.Y., Yang, C.H., Yeh, C.L., Lin, C.H., Chen, Y.R. (2008). NEAP causes down-regulation of EGFR, subsequently induces the suppression of NGF-induced differentiation in PC12 cells. *J Neurochem*, 107(6): S. 1544-55.

278. Tyson, D.R., Larkin, S., Hamai, Y., Bradshaw, R.A. (2003). PC12 cell activation by epidermal growth factor receptor: role of autophosphorylation sites. *Int J Dev Neurosci*, 21(2): S. 63-74.
279. Tseng, C.L., Wang, T.W., Dong, G.C., Yueh-Hsiu Wu, S., Young, T.H., Shieh, M.J., Lou, P.J., Lin, F.H. (2007). Development of gelatin nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting. *Biomaterials*, 28(27): S. 3996-4005.
280. Morales, A.A., Crespo, F.Z., Gandolff, G.N., Iznaga Escobar, N., Perez, N.P., Hernandez, J.C. (1998). Technetium-99m direct radiolabeling of monoclonal antibody for egf/r3. *Nucl Med Biol*, 25(1): S. 25-30.
281. Iznaga-Escobar, N., Torres, L.A., Morales, A., Ramos, M., Alvarez, I., Perez, N., Fraxedas, R., Rodriguez, O., Rodriguez, N., Perez, R., Lage, A., Stabin, M.G. (1998). Technetium-99m-labeled anti-EGF-receptor antibody in patients with tumor of epithelial origin: I. Biodistribution and dosimetry for radioimmunotherapy. *J Nucl Med*, 39(1): S. 15-23.
282. Rosenthal, E.L., Kulbersh, B.D., King, T., Chaudhuri, T.R., Zinn, K.R. (2007). Use of fluorescent labeled anti-epidermal growth factor receptor antibody to image head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Mol Cancer Ther*, 6(4): S. 1230-8.
283. Ke, S., Wen, X., Gurfinkel, M., Charnsangavej, C., Wallace, S., Sevick-Muraca, E.M., Li, C. (2003). Near-infrared optical imaging of epidermal growth factor receptor in breast cancer xenografts. *Cancer Res*, 63(22): S. 7870-5.
284. Yang, L., Mao, H., Wang, Y.A., Cao, Z., Peng, X., Wang, X., Duan, H., Ni, C., Yuan, Q., Adams, G., Smith, M.Q., Wood, W.C., Gao, X., Nie, S. (2009). Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging. *Small*, 5(2): S. 235-43.
285. Ornberg, R.L., Liu, H. (2007). Immunofluorescent labeling of proteins in cultured cells with quantum dot secondary antibody conjugates. *Methods Mol Biol*, 374: S. 3-10.
286. Chen, T.J., Cheng, T.H., Hung, Y.C., Lin, K.T., Liu, G.C., Wang, Y.M. (2008). Targeted folic acid-PEG nanoparticles for noninvasive imaging of folate receptor by MRI. *J Biomed Mater Res A*, 87(1): S. 165-75.
287. Francis, G.E., Fisher, D., Delgado, C., Malik, F., Gardiner, A., Neale, D. (1998). PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques. *Int J Hematol*, 68(1): S. 1-18.
288. Abuchowski, A., McCoy, J.R., Palczuk, N.C., van Es, T., Davis, F.F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem*, 252(11): S. 3582-6.
289. Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N.C., Davis, F.F. (1977). Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem*, 252(11): S. 3578-81.
290. Gursahani, H., Riggs-Sauthier, J., Pfeiffer, J., Lechuga-Ballesteros, D., Fishburn, C.S. (2009). Absorption of polyethylene glycol (PEG) polymers: the effect of PEG size on permeability. *J Pharm Sci*, 98(8): S. 2847-56.
291. Garcia-Garcia, E., Gil, S., Andrieux, K., Desmaele, D., Nicolas, V., Taran, F., Georgin, D., Andreux, J.P., Roux, F., Couvreur, P. (2005). A relevant in vitro rat model for the evaluation of blood-brain barrier translocation of nanoparticles. *Cell Mol Life Sci*, 62(12): S. 1400-8.
292. Kurihara, D., Akita, H., Kudo, A., Masuda, T., Futaki, S., Harashima, H. (2009). Effect of polyethyleneglycol spacer on the binding properties of nuclear localization signal-modified liposomes to isolated nucleus. *Biol Pharm Bull*, 32(7): S. 1303-6.
293. Murad, K.L., Gosselin, E.J., Eaton, J.W., Scott, M.D. (1999). Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification. *Blood*, 94(6): S. 2135-41.
294. Panza, J.L., Wagner, W.R., Rilo, H.L., Rao, R.H., Beckman, E.J., Russell, A.J. (2000). Treatment of rat pancreatic islets with reactive PEG. *Biomaterials*, 21(11): S. 1155-64.
295. Jang, J.Y., Lee, D.Y., Park, S.J., Byun, Y. (2004). Immune reactions of lymphocytes and macrophages against PEG-grafted pancreatic islets. *Biomaterials*, 25(17): S. 3663-9.
296. Lee, D.Y., Park, S.J., Lee, S., Nam, J.H., Byun, Y. (2007). Highly poly(ethylene) glycolylated islets improve long-term islet allograft survival without immunosuppressive medication. *Tissue Eng*, 13(8): S. 2133-41.
297. Bechmann, I. (2005). Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular Med*, 7(3): S. 217-28.
298. Kelly, C.M., Precious, S.V., Scherf, C., Penketh, R., Amso, N.N., Battersby, A., Allen, N.D., Dunnett, S.B., Rosser, A.E. (2009). Neonatal desensitization allows long-term survival of neural xenotransplants without immunosuppression. *Nat Methods*, 6(4): S. 271-3.

299. Royce Hynes, S., McGregor, L.M., Ford Rauch, M., Lavik, E.B. (2007). Photopolymerized poly(ethylene glycol)/poly(L-lysine) hydrogels for the delivery of neural progenitor cells. *J Biomater Sci Polym Ed*, 18(8): S. 1017-30.
300. Cheng, J., Dutra, A., Takesono, A., Garrett-Beal, L., Schwartzberg, P.L. (2004). Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. *Genesis*, 39(2): S. 100-4.
301. Horii, T., Nagao, Y., Tokunaga, T., Imai, H. (2003). Serum-free culture of murine primordial germ cells and embryonic germ cells. *Theriogenology*, 59(5-6): S. 1257-64.
302. Vallier, L., Rugg-Gunn, P.J., Bouhon, I.A., Andersson, F.K., Sadler, A.J., Pedersen, R.A. (2004). Enhancing and diminishing gene function in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22(1): S. 2-11.
303. Arnhold, S., Lenartz, D., Kruttwig, K., Klinz, F.J., Kolossov, E., Hescheler, J., Sturm, V., Andressen, C., Addicks, K. (2000). Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J Neurosurg*, 93(6): S. 1026-32.
304. Hoehn, M., Kustermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Focking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B.K., Schwindt, W., Buhrlé, C. (2002). Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25): S. 16267-72.
305. Ling, V., Neben, S. (1997). In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J Cell Physiol*, 171(1): S. 104-15.
306. Rathjen, J., Lake, J.A., Bettess, M.D., Washington, J.M., Chapman, G., Rathjen, P.D. (1999). Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *J Cell Sci*, 112 (5): S. 601-12.
307. Ben-Shushan, E., Thompson, J.R., Gudas, L.J., Bergman, Y. (1998). Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol*, 18(4): S. 1866-78.
308. Ward, C.M., Barrow, K., Woods, A.M., Stern, P.L. (2003). The 5T4 oncofoetal antigen is an early differentiation marker of mouse ES cells and its absence is a useful means to assess pluripotency. *J Cell Sci*, 116(Pt 22): S. 4533-42.
309. Weinhold, B., Schratt, G., Arsenian, S., Berger, J., Kamino, K., Schwarz, H., Ruther, U., Nordheim, A. (2000). Srf(-/-) ES cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *EMBO J*, 19(21): S. 5835-44.
310. Lake, J., Rathjen, J., Remiszewski, J., Rathjen, P.D. (2000). Reversible programming of pluripotent cell differentiation. *J Cell Sci*, 113 (3): S. 555-66.
311. Bielinska, M., Narita, N., Heikinheimo, M., Porter, S.B., Wilson, D.B. (1996). Erythropoiesis and vasculogenesis in embryoid bodies lacking visceral yolk sac endoderm. *Blood*, 88(10): S. 3720-30.
312. Sakakibara, S., Imai, T., Hamaguchi, K., Okabe, M., Aruga, J., Nakajima, K., Yasutomi, D., Nagata, T., Kurihara, Y., Uesugi, S., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Okano, H. (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol*, 176(2): S. 230-42.
313. Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., Huttner, W.B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23): S. 12425-30.
314. Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 21(2): S. 183-6.
315. Bottenstein, J.E., Sato, G.H. (1979). Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(1): S. 514-7.
316. Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S., Masui, H., Mather, J., McClure, D.B., Ohasa, S., Rizzino, A., Sato, G., Serrero, G., Wolfe, R., Wu, R. (1979). The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol*, 58: S. 94-109.
317. Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35(5): S. 567-76.
318. Brewer, G.J. (1995). Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res*, 42(5): S. 674-83.

319. Dhara, S.K., Hasneen, K., Machacek, D.W., Boyd, N.L., Rao, R.R., Stice, S.L. (2008). Human neural progenitor cells derived from embryonic stem cells in feeder-free cultures. *Differentiation*, 76(5): S. 454-64.
320. Lenka, N., Ramasamy, S.K. (2007). Neural induction from ES cells portrays default commitment but instructive maturation. *PLoS One*, 2(12): S. 1349.
321. Rao, M.S., Mayer-Proschel, M. (1997). Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev Biol*, 188(1): S. 48-63.
322. Chou, D.K., Henion, T.R., Jungalwala, F.B. (2003). Regulation of expression of sulfoglucuronyl carbohydrate (HNK-1), Amphoterin and RAGE in retinoic acid-differentiated P19 embryonal carcinoma cells. *J Neurochem*, 86(4): S. 917-31.
323. Arnhold, S., Wensch, S., Leiser, R., Andressen, C., Addicks, K. (2001). Differential expression of two carbohydrate epitopes, CD15 and HNK-1, in developing vertebrate olfactory receptor neurones. *Eur J Morphol*, 39(2): S. 65-71.
324. Jungalwala, F.B. (1994). Expression and biological functions of sulfoglucuronyl glycolipids (SGGLs) in the nervous system-a review. *Neurochem Res*, 19(8): S. 945-57.
325. Morita, I., Kizuka, Y., Kakuda, S., Oka, S. (2008). Expression and function of the HNK-1 carbohydrate. *J Biochem*, 143(6): S. 719-24.
326. Dang, S.M., Kyba, M., Perlingeiro, R., Daley, G.Q., Zandstra, P.W. (2002). Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng*, 78(4): S. 442-53.
327. Cappuccio, I., Verani, R., Spinsanti, P., Niccolini, C., Gradini, R., Costantino, S., Nicoletti, F., Melchiorri, D. (2006). Context-dependent regulation of embryonic stem cell differentiation by mGlu4 metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 51(3): S. 606-11.
328. Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 18(6): S. 675-9.
329. Arnhold, S., Fassbender, A., Klinz, F.J., Kruttwig, K., Lohnig, B., Andressen, C., Addicks, K. (2002). NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES cell-derived neurons-an immunocytochemical and functional approach. *Int J Dev Neurosci*, 20(2): S. 83-92.
330. Martin-Ibanez, R., Urban, N., Sergent-Tanguy, S., Pineda, J.R., Garrido-Clua, N., Alberch, J., Canals, J.M. (2007). Interplay of leukemia inhibitory factor and retinoic acid on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Neurosci Res*, 85(12): S. 2686-701.
331. Chung, S., Shin, B.S., Hwang, M., Lardaro, T., Kang, U.J., Isacson, O., Kim, K.S. (2006). Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem Cells*, 24(6): S. 1583-93.
332. Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., Smith, A. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol*, 3(9): S. 283.
333. Rathjen, J., Haines, B.P., Hudson, K.M., Nesci, A., Dunn, S., Rathjen, P.D. (2002). Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neuroectoderm population. *Development*, 129(11): S. 2649-61.
334. Matus, A. (1994). Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci*, 17(1): S. 19-22.
335. Laferriere, N.B., MacRae, T.H., Brown, D.L. (1997). Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons. *Biochem Cell Biol*, 75(2): S. 103-17.
336. Tanaka, Y., Kawahata, K., Nakata, T., Hirokawa, N. (1992). Chronological expression of microtubule-associated proteins (MAPs) in EC cell P19 after neuronal induction by retinoic acid. *Brain Res*, 596(1-2): S. 269-78.
337. Shetty, A.K., Turner, D.A. (1998). In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurobiol*, 35(4): S. 395-425.
338. Crino, P.B., Trojanowski, J.Q., Eberwine, J. (1997). Internexin, MAP1B, and nestin in cortical dysplasia as markers of developmental maturity. *Acta Neuropathol*, 93(6): S. 619-27.
339. Tsai, R.Y., McKay, R.D. (2000). Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *J Neurosci*, 20(10): S. 3725-35.
340. Ader, M., Schachner, M., Bartsch, U. (2001). Transplantation of neural precursor cells into the dysmyelinated CNS of mutant mice deficient in the myelin-associated glycoprotein and Fyn tyrosine kinase. *Eur J Neurosci*, 14(3): S. 561-6.
341. Carpenter, M.K., Winkler, C., Fricker, R., Emerich, D.F., Wong, S.C., Greco, C., Chen, E.Y., Chu, Y., Kordower, J.H., Messing, A., Bjorklund, A., Hammang, J.P. (1997). Generation and

- transplantation of EGF-responsive neural stem cells derived from GFAP-hNGF transgenic mice. *Exp Neurol*, 148(1): S. 187-204.
342. Ader, M., Schachner, M., Bartsch, U. (2004). Integration and differentiation of neural stem cells after transplantation into the dysmyelinated central nervous system of adult mice. *Eur J Neurosci*, 20(5): S. 1205-10.
343. Eriksson, C., Bjorklund, A., Victorin, K. (2003). Neuronal differentiation following transplantation of expanded mouse neurosphere cultures derived from different embryonic forebrain regions. *Exp Neurol*, 184(2): S. 615-35.
344. Hammang, J.P., Archer, D.R., Duncan, I.D. (1997). Myelination following transplantation of EGF-responsive neural stem cells into a myelin-deficient environment. *Exp Neurol*, 147(1): S. 84-95.
345. Winkler, C., Fricker, R.A., Gates, M.A., Olsson, M., Hammang, J.P., Carpenter, M.K., Bjorklund, A. (1998). Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain. *Mol Cell Neurosci*, 11(3): S. 99-116.
346. Johann, V., Schiefer, J., Sass, C., Mey, J., Brook, G., Kruttgen, A., Schlangen, C., Bernreuther, C., Schachner, M., Dihne, M., Kosinski, C.M. (2007). Time of transplantation and cell preparation determine neural stem cell survival in a mouse model of Huntington's disease. *Exp Brain Res*, 177(4): S. 458-70.
347. Cesnulevicius, K., Timmer, M., Wesemann, M., Thomas, T., Barkhausen, T., Grothe, C. (2006). Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate. *Stem Cells*, 24(12): S. 2776-91.
348. Lakshmipathy, U., Pelacho, B., Sudo, K., Linehan, J.L., Coucouvanis, E., Kaufman, D.S., Verfaillie, C.M. (2004). Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells*, 22(4): S. 531-43.
349. Lorenz, P., Harnack, U., Morgenstern, R. (2004). Efficient gene transfer into murine embryonic stem cells by nucleofection. *Biotechnol Lett*, 26(20): S. 1589-92.
350. Siemen, H., Nix, M., Endl, E., Koch, P., Itskovitz-Eldor, J., Brustle, O. (2005). Nucleofection of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 14(4): S. 378-83.
351. Zeitelhofer, M., Vessey, J.P., Xie, Y., Tubing, F., Thomas, S., Kiebler, M., Dahm, R. (2007). High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc*, 2(7): S. 1692-704.
352. Gresch, O., Engel, F.B., Nesic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Korner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Muller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G., Lun, K. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, 33(2): S. 151-63.
353. Wang, R., Liang, J., Jiang, H., Qin, L.J., Yang, H.T. (2008). Promoter-dependent EGFP expression during embryonic stem cell propagation and differentiation. *Stem Cells Dev*, 17(2): S. 279-89.
354. Lonza, F., Auskunft des technischen Kundendienstes der Firma Lonza zur Expressionseffizienz nach Nucleofektion 2009, Firma Lonza: Köln.
355. Kobayashi, S., Vidal, I., Pena, J.D., Hernandez, M.R. (1997). Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) characterizes a subpopulation of type 1 astrocytes in human optic nerve head. *Glia*, 20(3): S. 262-73.
356. Yanagisawa, M., Yu, R.K. (2007). The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. *Glycobiology*, 17(7): S. 57-74.
357. Fu, Y.J., Laurent, S., Muller, R.N. (2002). Synthesis of a sialyl Lewis(X) mimetic conjugated with DTPA, potential ligand of new contrast agents for medical imaging. *European J Org Chem*, (23): S. 3966-3973.
358. Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S.I., Paulson, J.C. (1990). Elam-1 Mediates Cell-Adhesion by Recognition of a Carbohydrate Ligand, Sialyl-Lex. *Science*, 250(4984): S. 1130-1132.
359. Kogan, T.P., Dupre, B., Beck, P.J., Bjercke, R., Sherwood, S., Tilton, R.G. (1995). Rational Design and Synthesis of Oligosaccharide Mimetics - Selectin Antagonists as Cell-Adhesion Inhibitors. *Abstr Pap Am Chem Soc*, 210: S. 18.
360. Laurent, S., Vander Elst, L., Fu, Y., Muller, R.N. (2004). Synthesis and physicochemical characterization of Gd-DTPA-B(sLex)A, a new MRI contrast agent targeted to inflammation. *Bioconjug Chem*, 15(1): S. 99-103.
361. Barber, P.A., Foniok, T., Kirk, D., Buchan, A.M., Laurent, S., Boutry, S., Muller, R.N., Hoyte, L., Tomanek, B., Tuor, U.I. (2004). MR molecular imaging of early endothelial activation in focal ischemia. *Ann Neurol*, 56(1): S. 116-20.

362. Boutry, S., Burtea, C., Laurent, S., Toubeau, G., Vander Elst, L., Muller, R.N. (2005). Magnetic resonance imaging of inflammation with a specific selectin-targeted contrast agent. *Magn Reson Med*, 53(4): S. 800-7.
363. Sibson, N.R., Blamire, A.M., Bernades-Silva, M., Laurent, S., Boutry, S., Muller, R.N., Styles, P., Anthony, D.C. (2004). MRI detection of early endothelial activation in brain inflammation. *Magn Reson Med*, 51(2): S. 248-52.
364. Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L.A., Technau, G.M., Dickson, B.J. (2002). Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell*, 110(4): S. 415-27.
365. Guthrie, S. (2001). Axon guidance: Robos make the rules. *Curr Biol*, 11(8): S. 300-3.
366. Guthrie, S. (2004). Axon guidance: mice and men need Rig and Robo. *Curr Biol*, 14(15): S. 632-4.
367. Sabatier, C., Plump, A.S., Le, M., Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y., Tessier-Lavigne, M. (2004). The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell*, 117(2): S. 157-69.
368. Kato, M., Dobyns, W.B. (2003). Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 1: S. 89-96.
369. Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., Walsh, C.A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2): S. 257-71.
370. Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S.K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2): S. 247-56.
371. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16): S. 7297-301.
372. Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G. (1999). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9): S. 5177-81.
373. Huh, S.H., Do, H.J., Lim, H.Y., Kim, D.K., Choi, S.J., Song, H., Kim, N.H., Park, J.K., Chang, W.K., Chung, H.M., Kim, J.H. (2007). Optimization of 25 kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery. *Biologicals*, 35(3): S. 165-71.
374. Mellor, H.R., Davies, L.A., Caspar, H., Pringle, C.R., Hyde, S.C., Gill, D.R., Callaghan, R. (2006). Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model. *J Gene Med*, 8(9): S. 1160-70.
375. Tinsley, R.B., Vesey, M.J., Barati, S., Rush, R.A., Ferguson, I.A. (2004). Improved non-viral transfection of glial and adult neural stem cell lines and of primary astrocytes by combining agents with complementary modes of action. *J Gene Med*, 6(9): S. 1023-32.
376. Ladewig, J., Koch, P., Endl, E., Meiners, B., Opitz, T., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Brustle, O. (2008). Lineage selection of functional and cryopreservable human embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells*, 26(7): S. 1705-12.
377. Abe, M., Akbar, F., Matsuura, B., Horiike, N., Onji, M. (2003). Defective antigen-presenting capacity of murine dendritic cells during starvation. *Nutrition*, 19(3): S. 265-9.

Lebenslauf

Name: Klaus Kruttwig
Geburtstag: 15.08.1975
Geburtsort: Haarlem /Niederlande
Nationalität: deutsch

Ausbildung

Seit Oktober. 2005 Promotion im *in vivo*-NMR-Labor des Max-Planck-Instituts für neurologische Forschung Köln

Dez. 2004 – Sept. 2005 Diplomarbeit am Institut I für Anatomie der Universitätsklinik Köln

Juni 2003 – Nov.2005 Hauptstudium Diplom-Biologie an der Universität Köln

Okt. 1996 – Juni 2003 Grundstudium Diplom-Biologie an den Universitäten Köln und Bonn

Juli 1995 – Juli 1996 Zivildienst beim Lazarus Hilfswerk

Juni 1995 Abitur

Anhang

I Konstruktion der Illuminationsplattform

Die Plattform wurde innerhalb dieser Arbeit entwickelt. Der Entwurf und die technische Erstellung wurde von der Firma Biospace Lab, Paris, Frankreich durchgeführt.

Der Aufbau der Plattform wird in Abbildung I dargestellt.

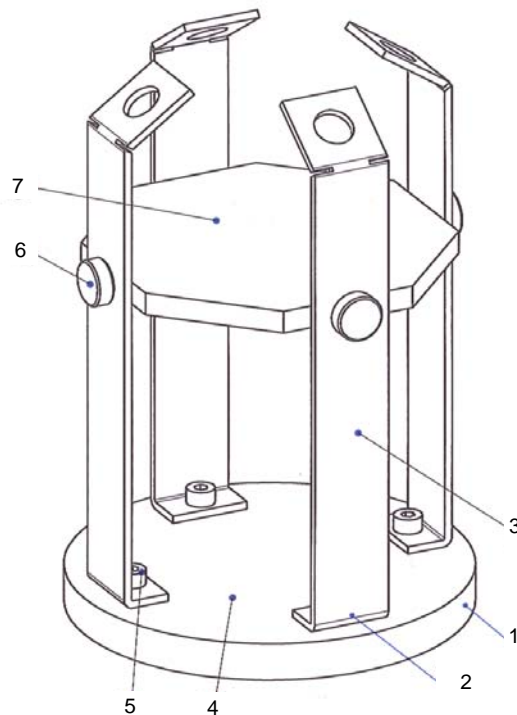
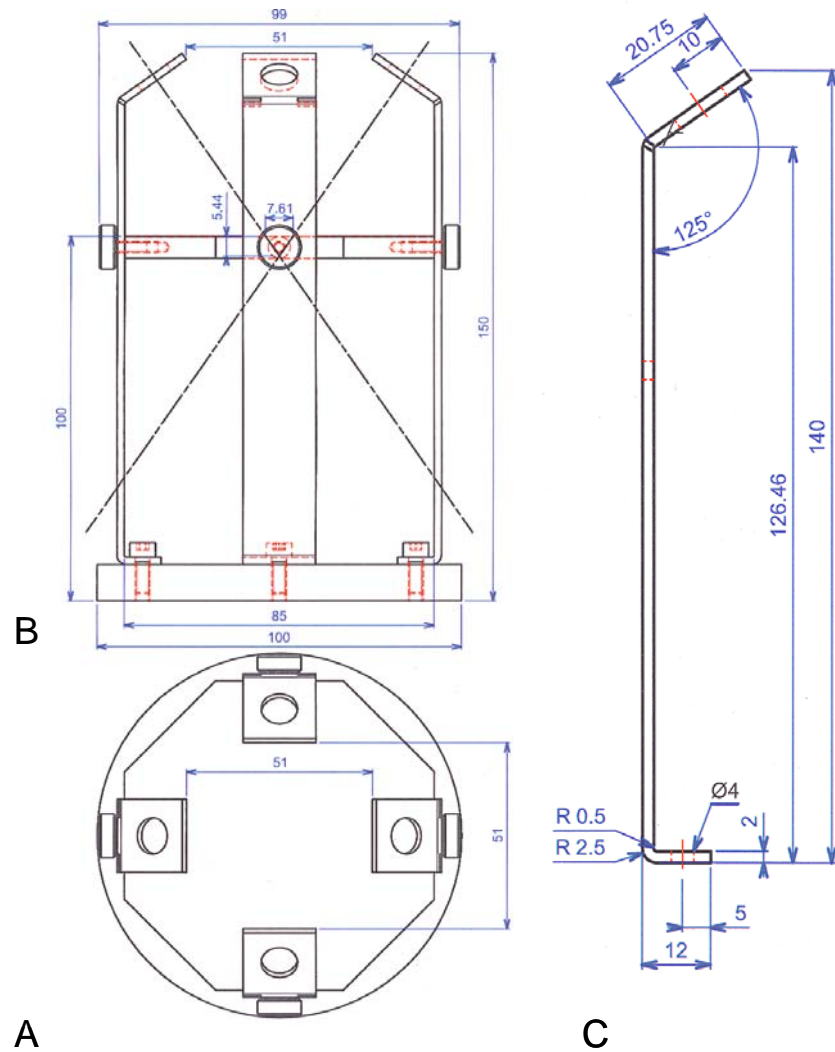


Abbildung I: Übersicht über die technischen Details der Illuminationsplattform:

- 1) Bodenplatte zur Aufstellung auf dem höhenverstellbaren Tisch des Kamerasystems
- 2) Befestigung der Kaltlichtleiterhalterung an die Bodenplatte
- 3) Halterung der Kaltlichtleiter und der oberen Plattform, auf der die Proben platziert werden.
- 4) Oberfläche der Bodenplatte
- 5) Schrauben zur Befestigung
- 6) Befestigung der oberen Plattform
- 7) Die Plattform wurde aus schwarzem Plexiglas gefertigt. Eine Abdeckung mit schwarzer Pappe wurde bei allen Experimenten durchgeführt.

Durch Verwendung der Illuminationsplattform wird die Distanz zur Kamera um 10 cm verringert. Eine seitliche Aufsicht mit den Abmessungen der oberen Plattform für die Platzierung der Proben zeigt Abbildung II.

**Abbildung II: Details der Illuminationsplattform:**

Die Aufsicht auf die obere Plattform verdeutlicht die Abmessungen der Platte, auf der die Probe platziert wird (A). Die seitliche Aufsicht verdeutlicht die Abmessungen der Illuminationsplattform (B). Die Kaltlichtleiter werden in einem Winkel von 125° angebracht um die gleichmäßige Ausleuchtung der Probe sicherzustellen (C).

II Oligonukleotidliste

Tabelle: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Tm (°C)	Lese-richtung*	Beschreibung	Fragmentlänge (bp)
C27	ATGGCCATCATCAAGGAGTT	58	s	mCherry	709
C28	ACTGTGCTGGATATCTGCAG	60	as	mCherry	
C3	TACCCATACGATGTTCCAGATTA	64	s	Ferritin-pGEM	491
C4	AAGTTGGTCACGTGGTCACCCA	68	as	Ferritin-pGEM	
C7	ATCAACCGCCAGATCAACCT	60	s	Ferritin Mm mRNA	365
C8	TGTTCACTCAGATAATACGTC	58	as	Ferritin Mm mRNA	
C9	AACTGCATAAGGCTATGAAGA	58	s	Luziferase	1506
C10	TAAGACCTTTTCGGTACTTCGT	60	as	Luziferase	
C29	GCCCTGCAGAAGGAGCTAGAAC	70	s	Oct3/4 Maus	459
C30	GGAATACTCAATACTTGATCT	56	as	Oct3/4 maus	
C42	AACTGCCGAGTCTCAGATACC	55	s	5T4 maus	506
C43	ATGATACCCTTCCATGTGATCC	55	as	5T4 maus	
C44	GGCAGAAGTAGCGCGACGTT	50	s	Fgf-5 maus	537
C45	TCCGTTGCTCGGACTGCTT	50	as	Fgf-5 maus	
C46	GAGATGAGTGGGAAAACG	55	s	Bmp-2 maus	606
C47	GCAGTAAAAGGCATGATAGC	55	as	Bmp-2 maus	
C48	GATGAAGAATGAGAGAGC	55	s	Zeta-globin maus	406
C49	AGTCAGGATAGAAGACAGG	55	as	Zeta-globin maus	
C50	TGACCCTAAAGCAAGACG	54	s	Rex-1 maus	414
C51	ATAAGACACCACAGTACACACC	54	as	Rex-1 maus	
S9	ATGTGAAGTGTGGCCATCTG	60	s	EGFR Maus	312
S10	AGGAGACTAAGAAGTGCTGA	58	as	EGFR Maus	
S11	CCTGCAAGTGAGATCTCATC	60	s	EGFR Ratte	490
S12	CATCTATGTTGTCCTCTGTC	58	as	EGFR Ratte	
S13	AAGAGACAGAGGAGTGGTAT	58	s	GFAP Maus	518
S14	GTCCTTAATGACCTCACCAT	58	as	GFAP Maus	
S15	ATGCCTTCATGCTGGGTATT	58	s	Musashi Maus	198
S16	TATGAGATGCACGGAATCTG	58	as	Musashi Maus	
S17	TGTCAAGGTCCAGGATGTCA	60	s	Nestin Maus	335
S18	GCTCTAGTCCATTCTCCATC	60	as	Nestin Maus	
S19	GCTGCAAGGTCCAGGATATT	60	s	Nestin Ratte	439
S20	TCCTGTCCCTTGTAAATAGGAG	58	as	Nestin Ratte	
S21	TCCTGTGCAGCAATCACTGA	60	s	Prominin Maus	445
S22	CACAGTCTCAACATCGTCGT	60	as	Prominin Maus	
S25	CAGGTCATCACTATTGGCAA	58	s	beta-Aktin Maus	354
S26	ATCGTACTCCTGCTTGCTGA	60	as	beta-Aktin Maus	

S27	GTCTTTACGGATGTCAACG	56	as	beta-Aktin Ratte	512
S28	TCATGTTTGAGACCTTCAA	52	s	beta-Aktin Ratte	
C11	TCGGCTAGCTATCTTAAGGCGAAATAC TGT	56	s	Robo3 Start + <i>NheI</i>	3202
C12	TCGGCTAGCATTGGCCACCACATTGG TG	58	as	Robo3 Ende + <i>NheI</i>	
C5	TTATCTTAAGGCGAAATACTGT	58	s	robo3 + <i>AflIII</i>	3196
C6	TACTTAAGCTAATTGGCCACCACATTG GTG	58	as	robo3 mit Stopcodon und <i>AflIII</i>	
C55	ATCGCTATTACCATGGTGATG	60	s	CMV	
oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV				

*s: Sinnrichtung,

as: nicht Sinnrichtung. Die Sequenz der as Oligonukleotide ist das reverse Komplement der Zielsequenz.

Hs YVIEAFSPAAGNTWRTVADGVQLEHTHTVSLQPNTIYFLVLRVAVGAWGLSESPVSEPVRTQDSSPSRPVEDPWRGQQGLAEVAVRLQEPPIVLGPRTLQVSWTVDGPVQLVQGFVRSWRV 708
 Tg -----ISLEVDVVWLIS-SVYVNLFLHV----- 299
 Dr -----VLTVKESSGLSASPVSE----- 551
 Dm YSVEMYCTNQSRTWIPIASRLSEPIFTVESLTQGAAYMPFIVRAENSLGFSPPSPISEPI TAGKLVGVR----- 620
 Ag YLIEVFSDDMAKGWTTVPFKVSSTSYSPISPNVSYIFIVRAENDQGLGIPSLMSDPVSG----- 609

Mm AGLDQGSWTMLDLQSPHKQSTVLRGLPPGAQIQIKVQVQGGELGAESEPFVTRISIPPEEAPSGPPQGVAVAGGDRNSSVTVSWEPPLPSQRNGVITEYQIWCLGNESRFHLNRSAGWAR 806
 Rn AGLDQGSWTALDVQSPHKQSTVLRGLPPGSQIQIKVQVQGGELGAESEPSVTRISIPPEEAPSGPPQGVAVAGGDRNSSITVSWEPPLPSQQNGVITEYQIWCLGNESRFHLNRSAGWAR 766
 Hs AGPEGGSWTMDLQSPSQSTVLRGLPPGTQIQIKVQAQGGELGAESELSVTRISIPPEEAPSGPPQGVAVAGGDRNSSITVSWEPPLPSQQNGVITEYQIWCLGNESRFHLNRSAGWAR 828
 Tg -----EGTVL 304
 Dr -----YQL 554
 Dm -----DGSESTGTSQLLLLSDV 636
 Ag -----REFNHGEDINLSEA 623

Mm SVTFSGLLPGQIYRALVAATSAGVGVASAPVLVQLPFPAAEPGPVEVSEGLAERLAKVLRKPAFLAGSSAACGALLLGFCAALYRRQKQKELSHYTAFAFYPVAVSFPHSEG-LSGSS 925
 Rn SVMFRGLLPGLLYRAIVAATSAGVGVASAPVLVQLPFPVVAEPGPVEVSEGLAERLSRVLKRPAPFLAGSSAACGALLLGLCAALYRRQKQKELSHYTAFAFYPVAVSFPHSEG-LSGSS 885
 Hs SAMLRGLVPGLLYRTLVAATSAGVGVPSAPVLVQLPSPDLEPGLEVAGLAVRLARVLEPAFLAGSSAACGALLLGLCAALYRRKQKELSHYTAFAFYPVAVSFPHSEG-LSGAS 947
 Tg ATVLQGLVPGVSYRAEVAATSAGVGARSAPVPIHIAPLVEQDVGPAAGSSLTEHLAEVARQPAFIAGVGGACWVILAAFAAWLYSRRRRKELSHFTAFAYTPTGKPVSAAGSQYGLS 424
 Dr PGPPQKPVVTDVTRNSVTLTWPNAHEGGAAVTSYIIIEAFSQAAG----STWQTVADVFVLEKHTATGLSPNTIYLFIVRAVNAYGLSDPSPISEPVRTQDVSPGQGVDRQVQREL 669
 Dm ETLQLQANDVVELLEANASDSTTARLSDIDSGQYIEGFIYARELHSS-EYKMTVLLNKQGGLSSCTVPGLAKASTYEFFLVFPYKSIKVPNSRRMRTLEDVPEAPPYGMIAIQFNRT 755
 Ag QATLSSQVNVNLEENATDTSVRLAWIEIVNGQYVEGFYIYSRKNVNSNGTYRLLTVLHGG-GASACT INGLEKFTYEFFLVFPYKTIQGRPSNSRSTCTLEDVPTASPVNLEAVLLNTS 742

Mm SRPPMGLGPAAYPWLADSWPHPPRSP----SAQEPRGSCCPSNP---DPDDRYNEAGISLYLAQTARGANASGEGPVYSTIDPVGEELQTFHGGFPQHSSGDPSTWSQYAPPEWSEGDS 1038
 Rn SRPPMGLGPAAYPWLADSWPHPSRSP----SAQEPRGSCCPSNP---DPDDRYNEAGISLYLAQTARGANAPGEGPVYSTIDPVGEELQTFHGGFPQHSSGDPSTWSQYAPPEWSEGDS 998
 Hs SRPPMGLGPAPYSWLADSWPHPSRSP----SAQEPRGSCCPSNP---DPDDRYNEAGISLYLAQTARGTAAPGEGPVYSTIDPAGEELQTFHGGFPQHPSGDLGPWSQYAPPEWSEQGDS 1064
 Tg LPSPPSLSTVSPAPVRSNPRAAAGGGYPWLVDWRGGSTASSAGCLGSTERYYNDAGITRYIAQTEQFVGAGEGPVYSSIADSEICTFPRPFQYGTSTYPPGGSQPMDAAASQVPR 544
 Dr EMSVQLHEPVLLTASSVKISWNVDRQ----SQYIQG-----YRLLYRPVGGWSQEVKG---ATERSAVIANLLKGTETEYIKIRPYFNEFQGLDSRSQTLRTPPEVPSAPP 769
 Dm SVFLKWLPPQPNRTRNGILTSYNVVKGLDVHNTTRIFKNMTIDAAAPTLLLANLTGTVYYIAVAAATRVGVGP-FSKPAVLRIDARTQSLDTGYTRYPISRDIADDFLTQTFWVIVLLG 874
 Ag AVYLKWEPP-SNSTINGKLKHYHIIIRGDVHNISKVLTNMTVDGEAPKLLLANLSAGVTYSVIAASTKVGIGP-YSIPSILRLDPHTRRLDHGYTRYPINHDYSHDILTQTFWVIVLLG 860

Mm G-ARGGQKLLGKPVQMPSLSWPEALPPPPSCELSCEGPEEELKGSDDLSEWCPPVPEKSHLVGSSSSGACMVAPARD-----TPSPTSS 1125
 Rn G-ARGGKGLLQKPVQMPSLSWPEALPPPPSCELSCEGPEEELKGSDDLSEWCPPMPEKKHLIDSRSSGACMVAPARGE-----TPSPTSS 1085
 Hs G-AGGKVKLLGKPVQMPSLNWPEALPPPPSCELSCEGPEEELKGSSEPEEWCPPMPERSHLETPSSSGCLVTPSRRE-----TPSPTPS 1147
 Tg GRAEHGARAKLGQAVKAPVSWTELLPPPPSASELSQCAQEEKEEEEEED-----EEDLAERRAPHG-VSTPPRAP-----SPSVTPD 622
 Dr R-AVNVAATVLSNSSSIS-VSQQ----PPPTDMQNGVIQYKVVCLGNDS-----QTRYNIQTVDGSVLSVTLKGL-----LPGVLYQ 842
 Dm S-IIAIVFLFGALVLFKRYQFTKQTSLSLHGNAIGTVRKFPFLLPLNGGAVGAGGSNSTAAAGSGHGLWIDPFSQVWRQAAGGNPGVGSCTTKEQLPGYAQAATAQQGQPFTLLP 993
 Ag S-IIAIVFLFLGAIIFRRIQFMKHSSLNMMHGNAIGTVRKFPFLLPLNP-----NGVWIDPGGG----- 919

Mm YGQQSTATLTPSPDPDPPTDIPHLHQMPPRVPLGPSSPLSVSQPALSSHDGRPVGLGAGPVLVSYHASPSVVPSTASSAPGRTRQVTGEMTPPLHGHRARIRKKPKALPYRREHSPGDL 1245
 Rn YGQQSTATLTPSPDPDPQPPSDIPHLHQMPPRVPLGPSSPLSVSQPALSSHDGRPVGLGAGPIVSYHPSVVPSTASSAPGRTRQVTGEMTPPLHGHRARIRKKTKALPHRREHSPGDL 1205
 Hs YGQQSTATLTPSPDPDPPTDIPHLHQMPPRVPLGPSSPLSVSQPALGIREARPAGLGAAPASPHLSPPAPSTASSAPGRTWQNGEMTPPLQGPRAFRFRKKPKALPYRREHSPGDL 1267
 Tg -GSEGRPPRAPCPPTGKTRGVIKSKRLKPK-----CSRYYREKQMG-----ELPPPLP-----PPGETPGCPLEP-----SGTERRKPQHRP-RDKSSGGVT 706
 Dr VEVAAVTS-----AGVGKHSQPV-----VLLKL-----PAEQPTVTG-----GGSESEENVSLAEQITDVV 894
 Dm DYERLSPLNMPDYAEVACSTFKSPTHGAPPMGGGGGQASLYDSCGAYATTNVVANVLYQNRATKPNQSSGNSNNNHQNDYQSTGMYSAPP SAHYGCLPEKQQQQQQPNLMTTST 1113

```

Ag -----
Mm PPPPLPPPELRDKLALGS-AGSRQHVFPRARAQWGEESGAGSASRG-----PTSSQRGPHPDGKESQGR--GRGLEACRSPNSPQLPLDSCIWSTLKLKLSLVSFIPSK--- 1344
Rn PPPPLPPPEEETSWPLGLRAAGSMSSLEREHSGERRVAQAVPLGAQ-----PPGAQRGPHPDGKESQGN--GRGLEACRSPQSPQIQLDLRVWSTLILSLISFTSSK--- 1305
Hs PPPPLPPPEEASWALELRAAGSMSSLERERSGERKAVQAVPLAAQRVLHPDEEAWLPYSRPSFLSRGQGTSTCSTAGSNSSRGSSSSRGSRGPGRSRSRSQSQRPGQKRREEPR- 1386
Tg ASPSLVPCPADEATPYSKASCPPRGPVSGSCSTTGSASSRG-----SGGSRGHGSGRNRTPGT---GRTPGHRGRTPGHRGEGTGRTPAAPFPCCPPQEKR--- 798
Dr KQPAFIAGIGGACWVILMGFSVWIYCRKRRKELSHYTA SFAYTPA-----VGFPHGESSGLNGRPG----- 956
Dm ASTAILTNSPAKVKKINITENKMDQLEGKSERTNPFNQQQQLLNASNALKQGLGAYANTLAAQMASGGGAGTLRRQRQPKTLYKSENNILGKSGLRQNTMNASVVGAPSNQGMDFLTGGP 1233
Ag -----

Mm -----
Rn -----
Hs -----
Tg -----
Dr -----
Dm PSEGGDFSGGLGKCNSTNQLLNDWASSASIAAPGDYHFGSKQPSKQHLYVKAKDGTWSAVSSDAYQSFKHQQQHHPFLAGSGDNTKSLASVNSLAGDSKFLSSFGSSANV 1342
Ag -----

```

Farbkodierung: in Rot sind kleine, kleine hydrophobe und aromatische Aminosäuren dargestellt. In Magenta sind basische Aminosäuren, in Blau saure Aminosäuren und in Grün hydroxyl-, aminhaltige und basische Aminosäuren gezeigt. Alle anderen Aminosäuren sind in Grau dargestellt. Symbole: `*` bedeuten identische Aminosäuren in allen Sequenzen, `:` konservierte Substitutionen, `.` semikonservierte Aminosäuren.