

Aus dem
Institut für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Optimierung der T-Zell-Beladung mit magnetischen Nanopartikeln zur
ZNS-Bildgebung mittels MRT in einem Mausmodell der Multiplen
Sklerose

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Maureen Smyth
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl
2. Prof. Dr. med. M. Taupitz
3. Prof. Dr. med. G. Stoll

Datum der Promotion: 08.04.2011

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einführung	10
<i>1.1. Multiple Sklerose</i>	10
1.1.1. Inzidenz und Atiologie	10
1.1.2. Symptome	10
1.1.3. Pathogenese	11
1.1.4. Diagnose	13
1.1.5. Therapie	15
<i>1.2. Das Prinzip der Zellbeladung und -verfolgung</i>	16
1.2.1. Konzept	16
1.2.2. Partikel	16
2. Herleitung	18
3. Materialien	20
<i>3.1. Lösungen</i>	20
<i>3.2. Weitere Substanzen</i>	21
<i>3.3. Geräte und Laborartikel</i>	22
<i>3.4. Mäuse</i>	23
<i>3.5. Eisenoxidpartikel</i>	23
4. Methoden	23
<i>4.1. Zellkultur</i>	23
4.1.1. Humane Zelllinien	23
4.1.2. Einfrieren von Zellen	24
4.1.3. Murine Zellen	24
4.1.4. PLP-spezifische T-Zellen	24
<i>4.2. Durchflusszytometrie</i>	25
<i>4.3. Beladung mit magnetischen VSOP-Partikeln</i>	26
4.3.1. Humane Zellen	26
4.3.2. Murine T-Zellen	26
<i>4.4. passive EAE</i>	27
<i>4.5. Histologie</i>	29
4.5.1. Aufbereitung der Organe für die Histologie	29
4.5.2. Berliner-Blau-Färbung	30
4.5.3. Hematoxilin-Eosin-Färbung	31
<i>4.6. MRT</i>	31
4.6.1. Phantommessungen	31
4.6.2. Relaxometrie	32
4.6.3. Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	32
4.6.4. <i>In vivo</i> Applikation der Magnetresonanztomographie	32
5. Ergebnisse	33
<i>5.1. Humane Zelllinien</i>	33
5.1.1 HeLa-Beladung	33
<i>5.2. T-Zell-Beladung</i>	38
<i>5.3. Induktion der EAE durch beladene T-Zellen</i>	42
<i>5.4. Intrathekale Injektion beladener Zellen</i>	46

6. Diskussion	47
6.1. Methode der Zellverfolgung	47
6.2. Beladung mittels Very Small Iron Oxide Particles (VSOP)	50
6.3. Beladung unter Einsatz von VProt	50
6.3.1. HeLa-Zellen	53
6.2. T-Zellen	54
6.4. In vivo Applikation	55
6.4.1. Induktion der EAE	55
6.4.2. MRT	56
7. Zusammenfassung	59
8. Literaturverzeichnis	62
9. Appendix	73
9.1. Danksagung	73
9.2. Lebenslauf	74
9.2. Erklärung	75
9.4. Publikationsliste	76

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese der MS	12
Abbildung 2: Monokristalline USPIO und polykristalline SPIO-Partikel im Vergleich	17
Abbildung 3: Relaxationszeiten nach Beladung von HeLa-Zellen mit Inkubationszeiten von 6h und 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen VProt bzw. VSOP	34
Abbildung 4: Vergleich der Beladung von HeLa-Zellen mit 6h Inkubationszeit und 1 mM VSOP (A) bzw. VProt (B)	34
Abbildung 5: Vergleich der Beladung von HeLa-Zellen mit 0,5 mM VProt nach A) 6h und B) 24h	35
Abbildung 6: Mikroskopischer Vergleich beladener HeLa-Zellen nach Inkubation für 24h mit 1 mM VSOP in A) bzw. 1 mM VProt in B)	35
Abbildung 7: Konzentrationsreihe zur Bestimmung der minimalen Beladungskonzentration von HeLa-Zellen mit 4h Inkubationszeit	36
Abbildung 8: Beladung von HeLa-Zellen mit VProt bei einer Inkubationszeit von 4h bei Konzentrationen von 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM	37
Abbildung 9: Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Überprüfung der Reinheit und Vitalität der T-Zellen nach der magnetischen CD3-Zellsortierung	38
Abbildung 10: Beladungseffizienz nach 10h Inkubation der T-Zellen mit einer Konzentration von 0,5 mM VProt bzw. VSOP	39
Abbildung 11: Berliner-Blau-Färbung von T-Zellen nach 10h Inkubation mit A) 0,5 mM oder B) 1 mM VSOP	40
Abbildung 12: FACS-Ergebnisse zum Vergleich der Zellvitalität zwischen Kontrollproben und beladenen Zellen	40
Abbildung 13: Zeitreihe zur Beladung von T-Zellen mit 1 mM VProt bzw. VSOP. Veränderung der Relaxationszeiten nach 1h, 4h, 8h, und 21h Inkubation	41
Abbildung 14: MRT-Messungen von Phantomen mit 1000 T-Zellen/ μ l Agarose	42
Abbildung 15: Exemplarischer zeitlicher Score-Verlauf einer Maus nach passiv induzierter EAE mit 6×10^6 VProt beladenen T-Zell-Blasten	43
Abbildung 16: Repräsentativer zeitlicher Score-Verlauf einer Maus nach passiv induzierter EAE mit 11×10^6 VProt beladenen T-Zell-Blasten.	43
Abbildung 17: T1 gewichtete Sequenz an Tag 9 nach T Zell Transfer nach Gd-Injektion zeigt periventrikuläres Leakage	44

Abbildung 18: T1-gewichtete MRT mit Blut-Hirn-Schrankenstörung im Bereich des Cerebellums	45
Abbildung 19: In der H&E-Färbung lassen sich unmittelbar nach der MRT periventrikulär, perivaskulär und cerebellär Leukozyteninfiltrationen nachweisen	45
Abbildung 20: Korrelierende Histologie und T2*-gewichtete MRT Bilder nach intrathekaler Injektion von 50 000 beladenen T-Zellen	47
Abbildung 21: Clathrin-vermittelte Makropinozytose als Aufnahmemechanismus für Proteine mit argininhaltigen Domänen	52
Tabelle 1: Klinischer Score der EAE	28
Tabelle 2: Exemplarische Ermittlung der Eisenaufnahme in die Zellen mittels Atomabsorptionsspektrometrie	37

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
aEAE	Aktive experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BB	Berliner Blau
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovine serum albumine
CD	Cluster of differentiation
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CLIO	Crosslinked iron oxide particles
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTI	Diffusion tensor imaging
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	Läsion im entorhinalen Kortex
EDSS	Expanded disability status score
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
Fe	Eisen
FE	Eisenoxide
FPA	Parese der Vorderbeine (front limb paralysis)
FPL	Plegie der Vorderbeine (front limb plegia)
Gd	Gadolinium-DTPA
H&E	Hämatoxilin und Eosin
HLA	Human leucocyte antigen
HMV	High molecular weight
HPA	Parese der Hinterbeine (hind limb paralysis)
HPL	Plegie der Hinterbeine (hind limb plegia)
H-MRS	Protonen-MR-Spektroskopie
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma

IL-2	Interleukin-2
MBP	Myelin basic protein
MEON	Monomer-beschichtete elektrisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel
MHC	Major histocompatibility complex
MION	Monocrystalline iron oxide particles
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTI	Magnetization transfer imaging
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NAWM	Normal appearing white matter
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
pEAE	Passive experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Preteolipid Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
PPMS	Primär chronisch progrediente MS
RNS	Ribonukleotidsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RRMS	Schubförmig remittierende MS
RRW	Rightening reflex weakness
SJL	Lewis Mäuse
SPIO	Superparamagnetic iron oxide particles
SPMS	Sekundär progrediente MS
TA	Transfektionsagens
TPA	Parese des Schwanzes (<i>tail paralysis</i>)
TPL	Plegie des Schwanzes (<i>tail plegia</i>)
USPIO	Ultrasmall SPIO

VEP	Visuell evozierte Potenziale
VProt	VSOP-Protamin (Protamin-gekoppeltes VSOP)
VRR	Virchow-Robin-Räume
VSOP	Very small iron oxide particle
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einführung

1.1. Multiple Sklerose

1.1.1. Inzidenz und Atiologie

Multiple Sklerose (MS) ist eine demyelinisierende Erkrankung des ZNS, der vermutlich eine autoimmune Reaktion vordergründig gegen Myelin-spezifische Antigene zugrunde liegt und die von einer starken neuroinflammatorischen Komponente begleitet wird. Deutschland gehört mit einer Prävalenz von ca. 140 000 zu den Ländern, in denen sie häufig ist. Bis zu einem gewissen Grad lässt sich dieser Anstieg sicherlich durch eine verbesserte Diagnostik, Früherkennung und damit erhöhte, flächendeckende Erkennung der Erkrankung zurückführen. Meist tritt die Erstmanifestation zwischen dem 20.-40. Lebensjahr auf. Das weibliche Geschlecht dominiert dabei mit einer Verteilung von ca 2:1. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse hat ergeben, dass sich diese Dominanz des weiblichen Geschlechts in den letzten Jahren ausgebaut hat, wohingegen sich das Nord-Süd Gefälle der Prävalenz der Erkrankung, welches bisher als Charakteristikum der MS galt, im Laufe der letzten Jahre nivelliert hat [1]. Multiple Sklerose ist multifaktoriell bedingt. Das Risiko wird sowohl durch Umweltfaktoren, als auch durch eine genetische Prädisposition determiniert, wie die positive Korrelation mit bestimmten Polymorphismen im HLA-DRB1-Locus [2] oder den Olig-1-coding variants [3] zeigt. In der neueren Literatur wird sogar ein Zusammenhang zwischen Suszeptibilitätsloci in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der MS vermutet [4;5]. Der Einfluss der Umweltfaktoren schlägt sich nicht nur im Nord-Süd-Gefälle der Prävalenz nieder, sondern auch in der vermeintlichen Assoziation mit infektiösen Auslösern, wie EBV, Chlamydia pneumoniae, Masern- oder Rötelnvirus, die heute stark diskutiert wird. Vor allem die signifikante Assoziation der Schübe im Verlauf der Erkrankung mit vorangegangenen viralen Infektionen des Respirations- und Harntraktes, sowie der im Serum von MS-Patienten erhöhte Antikörper-Titer scheinen diese Hypothese zu stärken [6-9].

1.1.2. Symptome

Die MS ist eine vielgestaltige Erkrankung. Ca. 85% der Patienten zeigen eine sogenannte schubförmig remittierende Form (*relapsing remitting MS/RRMS*), in der sich Krankheitsschübe und Remissionsphasen abwechseln. Häufig entwickelt sich daraus eine sekundär chronisch progrediente Form (*secondary progressive MS/SPMS*), in der keine Remissionsphasen mehr zu

verzeichnen sind. In ca. 15% der Fälle kommt es hingegen zu einer primär chronisch progredienten MS (*primary progressive MS/PPMS*).

Nicht nur die Verlaufsformen der MS sind vielfältig, sondern auch ihre Symptome. Kraftminderungen, Sehstörungen, Ataxie aber auch sensorische Störungen können frühe Anzeichen der Erkrankung sein. Mit Progression der Erkrankung können sich ebenfalls Blasendysfunktion, Fatigue und Paralysen manifestieren. Auch kognitive Defizite können auftreten. Diese umfassen Gedächtnisstörungen und Konzentrationsschwäche. Störungen auf affektiver Ebene können in Form einer Depression hinzutreten. Die Progression der Symptome kann mit dem sogenannten EDSS (*Expanded Disability Status Score*) objektiviert werden. Dieser berücksichtigt die Einschränkung der Gehfähigkeit sowie anderer funktioneller Systeme [10] und erlaubt damit eine sehr approximative Einschätzung des Krankheitszustandes des Patienten und seiner Entwicklung unter Medikation.

1.1.3. Pathogenese

Die immunologische Pathogenese der Erkrankung ist sehr komplex und bedarf noch intensiver Forschung. Nach dem momentanen Verständnis der Erkrankung werden im initialen Stadium der inflammatorischen Reaktion Lymphozyten mit enzephalitogenem Potential in der Peripherie aktiviert, um daraufhin ins ZNS zu migrieren. Über die nach der Aktivierung an der Zelloberfläche der T-Zellen exprimierte Integrine adhären sie dort an Endothelzell-Rezeptoren und passieren die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Der Übertritt ins Parenchym erfolgt vermutlich erst nach Voraktivierung der geprimten $CD4^+$ T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) im perivaskulären Raum, dem sogenannten Virchow-Robin-Raum (VRR) (Abb.1) [11]. Jüngst publizierte Daten, die eine temporäre Erweiterung der VRR bei MS Patienten im Schub belegen, stützen diese These [12]. Durch die Reaktivierung der pathogenen T-Zellen wird die Sekretion zusätzlicher proinflammatorischer Zytokine induziert, die zu einer Stimulation der Mikroglia, einer weiteren Öffnung der BHS und einer Chemotaxis weiterer Entzündungszellen zum Ort des Geschehens führt.

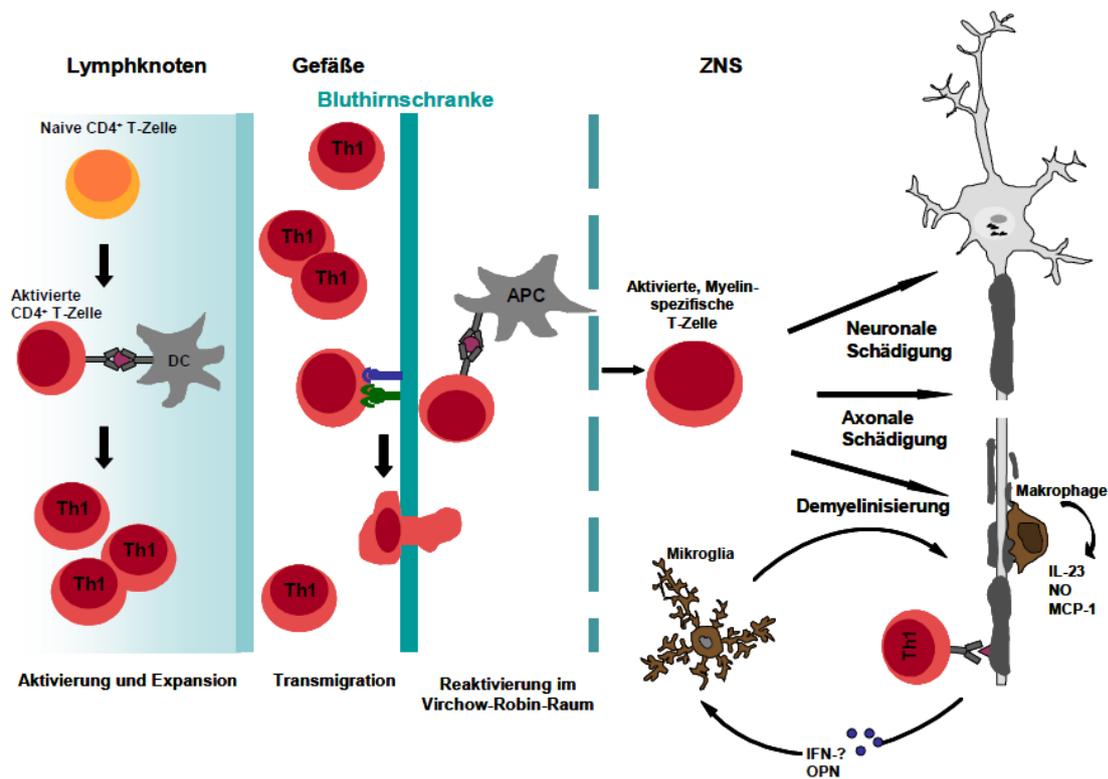


Abbildung 1: Pathogenese der MS (siehe Text). Modifiziert nach Platten et al. [13]. A) Aktivierung naiver T-Zellen in peripheren Lymphorganen durch dendritische Zellen (DC) welche Myelinantigene über MHC-II präsentieren und darauf folgende Expansion der autoreaktiven T-Zellen. B) Aktivierte, myelinspezifische T-Zellen zirkulieren im peripheren Gefäßsystem, bevor sie über Adhäsionsmoleküle am Gefäßendothel adhären und die Transmigration in den perivaskulären Raum vollziehen. C) Im perivaskulären Raum befinden sich CD11c⁺ DCs, die autoreaktiven T-Zellen erneut Myelinantigene präsentieren, diese reaktivieren und damit ihre Pathogenität steigern. D) Die enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen erkennen auf den Myelinumscheidungen der Axone ihre Autoantigene. Daraufhin sezernieren sie proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) oder Osteopontin (OPN). Dadurch nimmt ruhende Mikroglia vermutlich einen Makrophagen- oder DC-ähnlichen Phänotyp an. Makrophagen-ähnliche Mikroglia sezerniert daraufhin neben zytotoxischen Mediatoren wie NO oder MCP-1 weitere proinflammatorische Zytokine, wie IL-23, die die inflammatorische Reaktion aufrechterhalten.

Als morphologisches Korrelat dieser neuroinflammatorischen Komponente zeigen sich perivaskuläre Zellinfiltrate, die v.a. Makrophagen, Plasmazellen und CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen aufweisen. Die prädominante Rolle in der Pathogenese aktiver Läsionen der MS spielen CD4-vermittelte Komponenten [14]. Im Visier liegen hier vor allem CD4⁺ T-Zellen, sogenannte T-Helfer-Zellen vom TH1- oder Th17-Typ [15]. Jüngst wird auch die Hypothese einer Rolle der CD8⁺ T-Zellen untersucht [16]. Offen ist jedoch nach wie vor, welche Antigene des ZNS den Angriffspunkt der autoimmunogenen Zellen im ZNS darstellen. Mehrere Myelinantigene stehen hier zur Diskussion. Die wichtigsten, auf denen auch zahlreiche Tiermodelle basieren, sind das

Myelin Basic Protein (MBP), Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) und Proteolipid Protein (PLP) [17-21]. Antikörper gegen MOG konnten bereits im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden [22].

Der durch den Angriff der Immunzellen auf antigene Strukturen im ZNS initiierte Prozess führt in erster Linie zu einer lokalen Demyelinisierung, aber auch zu einem Verlust von Oligodendrozyten und Axonen, gefolgt von einer reaktiven Gliose in chronischen Läsionen. In diesen chronischen Läsionen dominiert die Hypozellularität, mit Zurückbleiben einer sogenannten Glianarbe [23]. Doch die Auswirkungen dieser Immunreaktion beschränken sich nicht nur auf diese Läsionen, sondern betreffen auch die makroskopisch und kernspintomographisch unauffällige weiße Substanz. Man spricht von „*normal appearing white matter*“ (NAWM), weil auch diese einen diffusen Schaden mit axonaler Degeneration aufweisen kann [24;25] und sich ein proinflammatorisches und ein neuroprotektives Milieu die Waage halten [26;27].

Trotz der demyelinisierenden Komponente ist die MS keine Erkrankung ausschließlich der weißen Substanz. Heute wissen wir, dass meist auch eine Beteiligung der grauen Hirnsubstanz besteht [28;29]. Jüngst wurde neben Demyelinisierung und axonalem Schaden auch die Rolle eines direkten neuronalen Schadens diskutiert. Es konnte eine direkte Interaktion von Immunzellen mit Neuronen beobachtet werden, die mittels Kalziumeinstrom zum Neuronenuntergang [30] und damit zu ganz neuen Erkenntnissen in der Pathogenese der MS führte.

1.1.4. Diagnose

Zur leitliniengerechten Diagnose der MS können verschiedene Parameter herangezogen werden [31]. Diese Kriterien beinhalten unter anderem den Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor von MS Patienten, der zurückzuführen ist auf die vermehrte Sekretion von Immunglobulinen durch Plasmazellen. Weiterhin werden evozierte Potentiale, wie z.B. die visuell evozierten Potentiale (VEP), zur Diagnose herangezogen.

Der wohl wichtigste Parameter zu Bestimmung der Krankheitsaktivität und des Therapieansprechens zugleich ist jedoch die Magnetresonanztomographie (MRT). Allerdings korrelieren kernspintomographische Befunde nur schwach mit dem klinischen Verlauf, man spricht von einem klinisch-radiologischen Paradoxon [32], welches im Folgenden kurz erläutert werden soll. Ein neuer Schub geht meist mit einem fokalen Auftreten inflammatorischer, demyelinisierender Läsionen im ZNS einher, in denen oft auch ein diffuser axonaler Schaden,

sowie Ödeme und Entzündung nachgewiesen werden können [33;34]. Als bildgebendes Korrelat sind im MRT zeitlich und örtlich disseminierte Läsionen zu finden. In T1-gewichteten MRT-Sequenzen sind hypointense Bereiche zu finden, die als „*black holes*“ bezeichnet werden können. In T2-gewichteten Sequenzen manifestieren sich hingegen hyperintense Areale, die sich am häufigsten im Corpus callosum, in der periventrikulären weißen Substanz und dem Hirnstamm befinden. Doch auch wenn die Patienten keine neue klinische Symptomatik aufweisen, so kann im MRT oft eine ausgeprägte Krankheitsaktivität zu verzeichnen sein, denn 6 von 7 Läsionen gehen ohne jegliche Symptomatik und somit ohne neuen Schub einher [8]. Weiterhin korreliert das Auftreten symptomatischer Läsionen bei neuen Schüben nicht unbedingt mit einer bleibenden Behinderung, da ihnen häufig Remissionen folgen. Vor allem in frühen Stadien der Erkrankung korreliert die totale Läsionslast im MRT nur schwach mit dem Grad der körperlichen Behinderung [35]. Die Entwicklung zahlreicher und großer Läsionen ist jedoch mit einem erhöhten Risiko für eine bleibende Behinderung assoziiert [36].

Nicht nur die zelluläre Infiltration, die sich als Läsion im MRT bemerkbar macht, sondern auch eine gesteigerte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke markieren die Entstehung der frühen MS-Läsion. Sie kann außerdem aufgrund der erhöhten Permeabilität der BHS durch Übertritt von Gadolinium (Gd) ins Gewebe im MRT sichtbar gemacht werden [37]. Die genaue Sequenz und Interaktion dieser Prozesse, sowie deren Rolle in der Genese neuer Läsionen und der Progression der Erkrankung bleiben jedoch weiterhin unverstanden. Das MRT ist eine elegante Methode, um genau dieses Zusammenspiel zu visualisieren und weitere Aspekte der pathophysiologischen Vorgänge der MS *in vivo* zu ergründen. Letztendlich soll dieser Fortschritt es auch ermöglichen, die Frühdiagnose der Erkrankung zu vereinfachen. Denn was heute immernoch fehlt sind Werkzeuge größerer Sensitivität, die es ermöglichen, die MS schon in früheren Stadien zu erkennen und damit den Krankheitsverlauf frühzeitig stärker beeinflussen zu können. Das MRT bietet hierzu eine hervorragende Grundlage, da es eine sensitive, nicht-invasive Untersuchungsmethode mit wenigen Kontraindikationen und ohne Strahlenbelastung für den Körper darstellt. Einige Ansätze neuer MR-Verfahren werden im Folgenden erörtert. Neben dem routinemäßigen Einsatz in der Klinik wird die MRT auch experimentell eingesetzt, um dynamische Prozesse der Neuroinflammation und Neurodegeneration zu messen [38]. Mittels Protonen-MR-Spektroskopie (H-MRS) konnte in akuten MS-Läsionen ein Anstieg an Cholin- und Lactat-Resonanzintensitäten schon in sehr frühen Stadien der Erkrankung nachgewiesen werden [39;40]. Auch eine Korrelation zwischen dem Abfall von N-Acetyl-Aspartat (NAA) in der H-MRS und dem axonalen Verlust in MS-Läsionen wird diskutiert [41;42]. Das sogenannte „*Magnetization Transfer Imaging*“ (MTI) erlaubt eine verbesserte

Charakterisierung von Läsionen, insbesondere des Ausmasses der De- und Remyelinisierung [43]. Durch die Diffusionsbildgebung kann ferner die Unterbrechung von sogenannten „*white matter tracts*“ dargestellt werden [44], Perfusions-gewichtetes MRT ermöglicht die Quantifizierung von Veränderungen der zerebralen Perfusion, die der Entstehung der charakteristischen Plaques vorausgehen [45;46]. Doch diese Methoden können leider nicht die zelluläre Dynamik des Geschehens berücksichtigen, die einen essentiellen Baustein im Verständnis der Pathogenese bildet.

1.1.5. Therapie

Im akuten Krankheitsschub ist die Therapie mit Glukokortikoiden etabliert. Eine weitere Säule bilden immunmodulatorische Substanzen, wie das Interferon- β (IFN- β). Für IFN- β 1b konnte in Studien eine Reduktion der Schübe in der schubförmig remittierenden Form der MS, sowie eine Verzögerung der Behinderungsprogression bei einem Einsatz der Therapeutika in frühen Krankheitsstadien gezeigt werden. Auch IFN- β 1a ist für die Behandlung der MS zugelassen [49]. Eine weitere Alternative bietet das Glatirameracetat (Copaxone), bei welchem die Induktion neurotropher Faktoren zur Entfaltung seiner Wirkung eine Rolle spielen könnte [50]. Studien legen eine vergleichbare Wirksamkeit wie die der Interferone nahe [51].

Bei der primär oder sekundär progredienten Form der MS hingegen kommen auch Cyclophosphamid, Methotrexat oder Mitoxantrone als eskalierendes Therapieregime zum Einsatz. Zunehmend erlangen auch monoklonale Antikörper wie das Natalizumab an Bedeutung [49]. Der potentielle Einsatz von Stammzellen bei erkrankten Patienten erregt zunehmend wissenschaftliches Interesse, befindet sich derzeit jedoch ausschließlich im experimentellen Stadium. Eine Unterstützung des vorhandenen ZNS-Stammzell-Repertoires, sowie die Differenzierung der transplantierten Zellen zu Neuronen und Oligodendrozyten werden hier als Wirkmechanismus diskutiert [52]. Bevor solche Therapieoptionen zur Anwendung gelangen können, müssen das Migrationsverhalten von transplantierten Zellen *in vivo*, sowie deren Interaktionen mit den Immunzellen vor Ort bekannt sein. Hierzu werden in erster Instanz nicht-invasive bildgebende Verfahren zum zellulären Imaging markierter Zellen benötigt.

Trotz der ständigen Fortschritte in der pharmakologischen Entwicklung neuer Substanzen bleibt die MS eine therapeutisch schwer beeinflussbare Erkrankung, bei der die Patienten von einer sehr unspezifischen Therapie nur mäßig profitieren. Es fehlen bis heute die Zielstrukturen für spezifische therapeutische Ansätze. Dies liegt nicht zuletzt am noch mangelnden Verständnis für

die pathogenetischen Mechanismen und deren Dynamik. Daher ist ihre Aufklärung eine unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung neuer, effektiverer therapeutischer Strategien.

1.2. Das Prinzip der Zellbeladung und -verfolgung

1.2.1. Konzept

Trotz der zahlreichen Fortschritte auf dem Gebiet der Entwicklung neuer MRT-Techniken bieten diese bisher bei MS Patienten allerdings noch nicht die Möglichkeit, mechanistische Hintergründe der Pathogenese und Dynamik der Krankheit zu ergründen. Intravenöse Injektion von Gadolinium, einem paramagnetischen Kontrastmittel, erlaubt die Visualisierung von Erkrankungsherden, deren Auftreten jedoch nicht unbedingt mit der klinischen Manifestation einhergehen muss. Die Methode der Zellmarkierung und -verfolgung bietet hier eine Möglichkeit, die Rolle verschiedener Immunzellen in der Pathogenese zu ergründen.

Mittels bildgebender Verfahren werden Zellen *in vivo* visualisiert, die zuvor *ex vivo* mit intra- oder extrazellulären Substanzen markiert wurden. Diese werden je nach bildgebendem Verfahren gewählt. Im Falle der kernspintomographischen Bildgebung werden Partikel gewählt, die dazu in der Lage sind, die Relaxivitäten der ^1H -Atome in ihrer Umgebung zu verändern. Das Ausmaß der Abnahme der Signalintensität in Regionen, die mit Eisen beladene Zellen enthalten, ist abhängig von der Eisenkonzentration in den Zellen, der vorhandenen Zellkonzentration, den T2/T2*-Relaxationszeiten des umgebenden Mikromilieus, der Stärke des eingesetzten Magnetfeldes, sowie der angewandten Sequenz. Paramagnetische Metalle wie Gadolinium und Mangan beeinflussen vor allem T1-Relaxation, wohingegen superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIO), vor allem T2- und T2*-Relaxation reduzieren.

1.2.2. Partikel

Gadoliniumchelate wurden in der Vergangenheit erfolgreich zur Zellmarkierung eingesetzt, doch die niedrige Relaxivität und die geringe Biokompatibilität machen Gadolinium nicht zu einem optimalen Beladungsagens.

Heute werden sogenannte SPIO (superparamagnetic iron oxide particles) bevorzugt, weil diese eine ausgeprägtere Verkürzung der Relaxationszeiten induzieren können [53]. Dieser Terminus wird als Oberbegriff für relativ große Partikel mit einem Gesamtdurchmesser von 50-120 nm gebraucht. Die Größe der Partikel ist darauf zurückzuführen, dass sie meist mehrere Eisenoxidkerne aufweisen und daher auch als polykristalline magnetische Nanopartikel

bezeichnet werden. Sie sind von einer Polymerhülle umgeben, die meist aus einem Dextran oder Dextranverbindungen besteht. Der große Durchmesser der SPIO birgt allerdings verschiedene Nachteile. So werden sie aufgrund ihrer Größe häufig durch Plasmaproteine opsonisiert und dadurch häufig durch phagozytierende Zellen ingestiert und aus dem Kreislauf beseitigt. Ferner wird die Passage durch Endothlien und die Penetration von Geweben erheblich erschwert [54]. Dies schließt die Anwendung in vielen Krankheitsmodellen aus. Im Gegensatz hierzu bilden die sogenannten USPIO (*ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles*), auch MION (*monocrystalline iron oxide particles*) genannt, eine Gruppe mit wesentlich geringerem Durchmesser, der um die 20 nm beträgt. Dabei wird ein einziger Eisenoxidkern von einer Polymerschicht umhüllt (Abb.2). Eine etwas andere Partikelgruppe sind die sog. CLIO (*crosslinked iron oxides*) deren Name auf die weitere Stabilisierung durch Grenzvernetzung der Hüllmoleküle verweist. Dies soll die Anheftung von Peptiden an die Hülle ermöglichen.

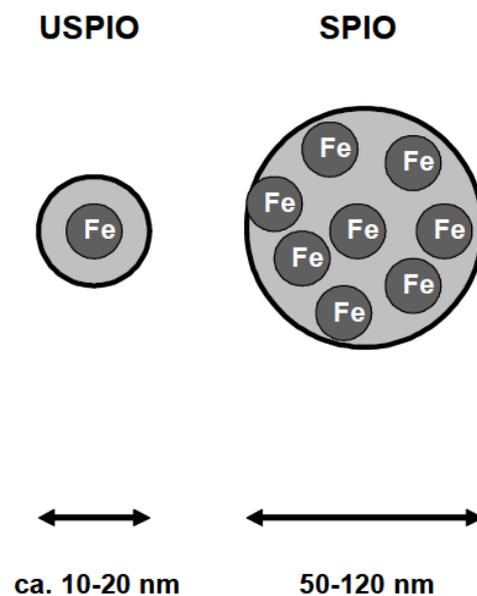


Abbildung 2: Graphische Darstellung der monokristallinen USPIO und polykristallinen SPIO Partikel im Vergleich. Die Abbildung ist modifiziert nach Modo et al. 2005 [55].

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete VSOP (*very small iron oxide particle*) unterscheidet sich grundsätzlich von den oben genannten. Es ist ein monokristallines Partikel, dessen Hülle jedoch nicht aus einem Polymer wie dem Dextran, sondern aus dem monomeren Zitrat besteht, welches eine zusätzliche elektrostatische Stabilisierung bewirkt. Dies ist wichtig, um eine Aggregation der Partikel zu verhindern. VSOP kann dem Oberbegriff der MEON (Monomer-

beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel) zugeordnet werden und besitzt einen Gesamtdurchmesser von 8-10 nm. Es zeigt eine erhöhte T2-Relaxivität und eine effiziente Aufnahme in Zellen. Dies macht VSOP zu einem guten Kandidaten zur Zellmarkierung und weiteren Visualisierung der Zellen *in vivo* [56;57]. Die Zitrahülle bietet ferner die Möglichkeit, Peptide oder Proteine zu koppeln, um die Labellingeigenschaften zu verbessern oder die Anheftung unterschiedlicher fluoreszierender Farbstoffe, wie z.B. Rhodamin, durchzuführen, welches eine duale Bildgebung mittels MRT und Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht [57]. Bisher wurde VSOP bereits erfolgreich für die Beladung von mononukleären Zellen und sequenzieller Visualisierung mittels 7T MRT nach intravenöser Injektion in einem Mausmodell der zerebralen Ischämie eingesetzt [58]. Auch in einem Mausmodell der MS [32] zeigte VSOP eine sehr gute Verträglichkeit und konnte erfolgreich zur Darstellung entzündlicher Läsionen nach intravenöser Injektion appliziert werden.

2. Herleitung

Die MS ist eine Erkrankung, die zu einer frühen Invalidität der Patienten führen kann und daher gravierende Konsequenzen für Patienten und ihre Angehörigen birgt. Die therapeutischen Möglichkeiten sind bislang sehr limitiert. Dies liegt nicht zuletzt am mangelnden Verständnis der Pathogenese. Bei der MS handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die vermutlich durch autoreaktive T-Zellen initiiert wird. Die Rolle von T-Zellen in der Erkrankungsentwicklung ist bisher nicht hinreichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neue Methode zu etablieren, die die nicht-invasive Verfolgung von T-Zellen *in vivo* ermöglicht. Sie soll eingesetzt werden, um einen Beitrag zur Aufklärung pathogenetischer Mechanismen der Neuroinflammation und Neurodegeneration zunächst im Rahmen der EAE, letztendlich aber auch für andere Krankheitsmodelle, zu liefern. Obwohl die Markierung und das *in vivo* Zelltracking von Makrophagen und Stammzellen schon weitestgehend optimiert sind, stellen T-Zellen auf Grund der fehlenden phagozytotischen Kapazität weiterhin eine große Herausforderung dar. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine neuartige Gruppe von Partikeln eingesetzt, die eine sehr viel effizientere Aufnahme in die Zellen ermöglichen soll. Repräsentant dieser von Zitrat umhüllten Partikel ist das sogenannte VSOP (*very small iron oxide particle*). Gekoppelt an Protaminsulfat, einem vielfach bewährten Transfektionsagens, soll sich die Transfektionskapazität der VSOP-Partikel potenzieren und dadurch auch die Beladung von Zellen ermöglichen, die kaum phagozytotische Kapazitäten besitzen. Das aus der Konjugation von VSOP und Protaminsulfat hervorgehende

VProt wurde hinsichtlich seiner Beladungsfähigkeit, sowie dem potentiellen Einfluss auf Vitalität und Funktion der beladenen Zellen eingehend untersucht und mit nativen VSOP verglichen. Im *in vitro* System wurde zunächst ein effizientes Beladungsprotokoll mit VProt für die humanen HeLa-Zellen erstellt, um vorab eine Einschätzung von Beladungszeiten und -konzentrationen zu ermöglichen, die bei effektiver Partikelaufnahme eine möglichst geringe Toxizität gewährleisten. Im Anschluss wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf frische enzephalitogene T-Zellen von SJL/J-Mäusen übertragen, um ein Methodenprotokoll für die effiziente Beladung von T-Zellen mit VProt zu etablieren. Daraufhin wurden die beladenen T-Zellen *in vivo* in einem Mausmodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), auf den Erhalt ihres enzephalitogenen Potenzials untersucht. Die Applikation von Gadolinium-DTPA diente dazu, in der MRT Permeabilitätsstörungen der Blut-Hirn-Schranke in T1-gewichteten Sequenzen sichtbar zu machen. Darüberhinaus wurde die intrathekale Injektion VProt enthaltender T-Zellen angewendet, um schließlich die Fähigkeit dieser T-Zellen zur Signalgebung im MRT zu ermitteln. Die Transition dieser Methode von „*Bench to Bedside*“ in den humanen Organismus soll zu einem späteren Zeitpunkt die Übertragbarkeit auf die MS, sowie ein weites Spektrum weiterer Pathologien ermöglichen. Durch das auf diesem Wege erlangte bessere Verständnis der Pathogenese können gezielt therapeutische Möglichkeiten ausgelotet und durch Verkürzung des Zeitraums bis zur Diagnosestellung zukünftig auch ein früheres therapeutisches Eingreifen erreicht werden.

3. Material

3.1. Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Phosphatgepufferte Kochssalzlösung (PBS)	137,0 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,2
Waschmedium für den CD3 sort Dynal	PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺ 0,1% BSA (bovine serum albumine)
Waschmedium für Zellkultur (FCS-Medium)	RPMI-1640 5% FCS 1% HEPES 1% Penicillin/Streptomycin
Zellkulturmedium für murine Zellen	RPMI-1640 10% FCS (fetales Kälberserum) 1% L-Glutamin 1% HEPES 0,1% Mercaptoethanol 1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	FCS 10% DMSO
FACS-Puffer	PBS 0,5% w/v BSA 1% Natriumazid (NaN ₃ , Sigma)
Paraformaldehyd (PFA)	PBS 4% Paraformaldehyd

3.2. Weitere Substanzen

Agarose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Antikörper (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BSA	Sigma, Steinheim, Deutschland
Complete Freund's Adjuvant (CFA)	Difco Laboratories, Detroit, USA
DMSO	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's PBS	Sigma, Steinheim, Deutschland
Einbettmedium (Tissue-Tek)	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Gibco Invitrogen Corp., Paisley, Schottland UK
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES-Puffer	Gibco Invitrogen Corp., Paisley, Schottland UK
IL-2	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	CuraMED Pharma, Karlsruhe, Deutschland
Killernarkose: Xylazin-Hydrochlorid,	Bayer Pharma, Leverkusen, Deutschland
Rompun 2%	
L-Glutamin	Gibco Invitrogen Corp., Paisley, Schottland UK
Magnevist (Dimeglumingadopentetat)	Schering, Deutschland
Mycobacterium tuberculosis H37Ra	Difco Laboratories, Detroit, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Azid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PLP ₁₃₉₋₁₅₁ murines Proteolipid Protein, p139-151	Activotec Pepteuticals, Charité, Berlin
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protamin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RPMI1640	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypanblau	Sigma Cell Culture, Irvine, UK

(0,4% Trypan Blau in 0,81% NaCl und
0,06% KPO₄)

VSOP C200

Ferropharm GmbH, Teltow, Deutschland

3.3. Geräte und Laborartikel

FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CellQuest™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Relaxometer Minispec	Bruker Minispec MQ40, 0.94 T, Karlsruhe, Deutschland
AAS(Atomabsorptions- spektrometer)	Solaar, Unicam, Cambridge, UK
Olympus BX-51 Mikroskop	U-MNIBA Olympus BX-51,Hamburg, Deutschland
7T Kleintier-MRT	Pharmascan 70/16AS Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland
Cryostat	Jung Cryostat 2800 Frigocut-E, Cambridge Instruments, Nussloch, Germany
Inkubatoren Heraeus	Kendro Lab. Products, Hanau Germany
Megafuge 1.0Heraeus	Kendro Lab. Products, Hanau Germany
Sterile Werbank	Kendro Lab. Products, Hanau Germany
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Steriles Einwegmaterial	Falcon, Heidelberg, Deutschland
6-,12-,24-well-Mikrotiterplatten	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Ein-und Mehrkanalpipetten	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
FACS-Messröhrchen	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellsieb 80 µm	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Dynal Separationsmagnet	Dynal Invitrogen, Oslo, Norway
DynaBeads®	Dynal Invitrogen, Oslo, Norway
Dynal® Mouse T Cell Negative Isolation Kit	Dynal Invitrogen, Oslo, Norway
MRT, Pharmascan 70/16AS	Bruker Biospin, Ettlingen, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

3.4. Mäuse

Der SJL/J Stamm ist ein etablierter und häufig eingesetzter Mausstamm, da die EAE bei diesen Mäusen gut reproduzierbar ist. Für *in vivo* Versuche und Zellkultur wurden 6-8 Wochen alte SJL Weibchen von Charles River (Sulzfeld/Sulza, Deutschland) erworben. Die Käfige wurden mit maximal 6 Mäusen ausgestattet und in einer pathogenarmen Umgebung gehalten. Die Tiere erhielten Futter und Wasser nach Belieben. Alle Versuche wurden durch die Tierschutzkommission des LAGeSo (Antragsnummer G0106/05) genehmigt und nach nach Richtlinien der European Communities Council Directive (86/609/EEC) durchgeführt.

3.5. Eisenoxidpartikel

Die für die im Folgenden beschriebenen Versuche verwendeten Eisenoxidpartikel VSOP C200 und Protamin-gekoppelten VSOP (VProt) wurden von Prof. Dr. M. Taupitz, AG Experimentelle Radiologie, Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

4. Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1. Humane Zelllinien

Für die Beladungsversuche wurde die humane HeLa-Zelllinie verwendet. Diese Zervixkarzinomzelllinie wurde bei der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) erworben. Die Zellen wurden in Kulturmedium aus MEM mit 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin supplementiert kultiviert und in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in 95% Luft bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen von 75-90% Konfluenz in 75 cm² Kulturflaschen wurden die Zellen alle 2 bis 4 Tage subkultiviert und mit einer Dichte von 13 000 Zellen/cm² ausgesät. Dazu wurden die Zellen in der Kulturflasche zweimal mit jeweils 10 ml PBS w/o Ca²⁺ Mg²⁺ gewaschen und anschließend mit 0,25% Trypsin inkubiert. Das Trypsinieren wurde dann durch Zugabe von 10 ml FCS Medium unterbrochen, die Zellen wurden resuspendiert, in 50 ml Röhrchen überführt mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Nach 10min Zentrifugation bei 1200 rpm konnten die Zellen wieder in 10ml Kulturmedium ausgesät werden.

4.1.2. Einfrieren von Zellen

Die gesamte Prozedur des Einfrierens muss auf Eis geschehen. Auch die Lösungen sollten hierzu auf Eis stehen. Die Zellen wurden zentrifugiert und das entstandene Pellet auf Eis in 500 µl Einfriermedium aufgenommen. Dazu werden 100 µl einer Lösung aus 20% DMSO in RPMI mit 1% HEPES zugegeben. Das Zellgemisch wurde gut resuspendiert, dann 10 min bei -20°C und anschließend bei -80°C gelagert.

4.1.3. Murine Zellen

Zur Durchführung der Beladungsversuche, sowie für die Induktion der EAE für *in vivo* Versuche, wurden frische murine T-Zellen verwendet.

Frisch isolierte murine T-Zellen wurden drei Tage wie unten beschrieben restimuliert bevor sie mit IL-2 und VSOP C200 oder VSOP-Protamin inkubiert wurden.

4.1.4. PLP-spezifische T-Zellen

PLP-spezifische T-Zellen wurden mit PLP-Peptid 139-151 immunisierten SJL Weibchen entnommen. Dazu wurde den Mäusen jeweils 100 µl eines Immunisates aus 250 µg PLP (murine proteolipid peptide p139-151), 800 µg Mycobacterium tuberculosis H37Ra emulgiert in 100 µl Complete Freund's Adjuvant (CFA) und 100 µl Phosphate buffered saline (PBS) in jede Fußsohle gespritzt.

Nach 10 Tagen wurden die reaktiv vergrößerten poplitealen, paraaortalen und inguinalen Lymphknoten nach zervikaler Dislokation der Mäuse extrahiert und in Waschmedium überführt. Präparationsbesteck wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und die Mäuse wurden in Ethanol getaucht, bevor die Lymphknoten herauspräpariert wurden. Durch Mazerieren der Lymphknoten in einem Sieb mit einem Porendurchmesser von 80 µm, konnte eine Zellsuspension mit Immunzellen isoliert werden, die dann weitere 3 Tage *in vitro* mit 12,5 µg PLP in Kulturmedium (RPMI 1640 supplementiert mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Pen/Strep, 1% HEPES und 0,1% Mercaptoethanol) restimuliert wurden. Restimulation der Zellen fand bei einer Zellkonzentration von 4×10^6 Zellen/ml statt in einer 12 Loch-Platte bei einer Atmosphäre von 5% CO₂ bei 37°C.

Durch diese besondere Kultivierung der Zellen wurden die in der Kultur vorhandenen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) PLP-spezifisch stimuliert, sodass nur PLP-spezifische T-Zellen

kostimulatorische Signale erhielten und in Kultur proliferieren konnten. Dies diente somit neben dem Setzen eines Proliferationsreizes auch als eine Stufe der Vorselektion der T-Zellen.

An Tag 3 wurden die Zellen geerntet und die T-Zellen durch magnetische Sortierung isoliert. Hierzu wurden DynaBeads® verwendet, die aus einem Gemisch aus monoklonalen Antikörpern bestehen, die gegen CD11b, CD16/32, CD45R und Ter-119 gerichtet sind. Diese Antikörper sind an magnetische Beads gekoppelt. Wenn Immunzellen mit diesen magnetischen Beads inkubiert werden, binden alle diejenigen Zellen, die CD11b, CD16/32, CD45R and Ter-119 auf ihrer Oberfläche exprimieren an die vorhandenen Antikörper. CD3⁺ Zellen jedoch, also T-Zellen, binden nicht. Stellt man das Röhrchen mit der Zellsuspension nun in eine Magnetsäule, haften alle Bead-gebundenen Zellen und dies führt dann zu einer Depletion jener Zellen, die nicht CD3 auf ihrer Oberfläche exprimieren. In der Folge erhält man eine Zellsuspension mit CD3⁺ Zellen. Dies nennt sich ein negativer Sort. Die durch Durchflusszytometrie ermittelte Reinheit der auf diese Art und Weise gewonnen T-Zellen, betrug bei den durchgeführten Versuchen ca. 80-95%. Die T-Zellen wurden daraufhin mit 10 µl IL-2/ml Kulturmedium bei 2.10⁶ Zellen/ml in einer 12 well Platte ausplattiert und eine Stunde bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert, sodass die Zellen sich am Boden absetzten. Nach einer Stunde wurden dann VSOP-Protamin (VProt) oder das unkonjugierte VSOP C200 (VSOP) hinzugefügt. Dies geschah in unterschiedlichen Konzentrationen und mit unterschiedlichen Inkubationszeiten um die Beladungsbedingungen zu optimieren.

4.2. Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung der Reinheit und Vitalität der zu transferierenden Zellen, sowie der Vitalität der VSOP-beladenen Zellen wurden die Zellen vor und nach dem Sorten mittels Durchflusszytometrie überprüft. Auch die Güte der CD3-Sortierung wurde unmittelbar nach dem Zellsortieren mittels FACS überprüft.

Beim sogenannten „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS) werden bei der Passage von Zellen durch einen Laserstrahl optische Signale emittiert, die registriert und aufgezeichnet werden. Die Durchflusszytometrie kann eingesetzt werden zur Zellzählung, zur Detektion und quantitativen Bestimmung verschiedener Oberflächenmoleküle oder auch intrazellulärer Komponenten. Hierzu werden die interessierenden Komponenten (Rezeptoren, Signalmoleküle, Zytokine, intrazelluläre Moleküle, etc.) mit einem Fluoreszenzfarbstoff nach einer Antigen-Antikörper Reaktion markiert und in eine Einzelzellsuspension überführt. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen dann in dieser Einzelzellsuspension einzeln

an einem Laser vorbeigelenkt, dessen Wellenlänge der Emission des Fluoreszenzfarbstoffes angepasst ist. Je nach Zellgröße und Granularität werden Teile des Lichts abgelenkt und mittels Photomultiplier detektiert. Der Forward Scatter (FSC) reflektiert hierbei das Volumen der Zelle, wohingegen der Side Scatter (SSC) von der Granularität der Zellen und der Kernstruktur abhängt.

Für die CD3-Färbung wurden 500 000 Zellen pro Röhrchen und Probe abpipettiert, für 7 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet nach einem Waschschrift in FACS-Puffer mit 0,5 µl Anti-mouse-CD3-FITC und 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubationszeit bei 4°C wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Nach Resuspension der Pellets in 400 µl FACS-Puffer, wurden die Proben am FACS gemessen. Pro Probe wurde auch ein ungefärbter Leerwert mitgemessen. Alle Proben wurden mit und ohne PI gemessen, um die Zellvitalität zu beurteilen.

Bestimmung der Zellvitalität

Zellvitalität wurde mittels Trypanblau-Zählung und FACS-PI-Färbung durch Zugabe von 1 µl einer PI-Lösung mit der Konzentration 0,1 mg/ml auf 400 µl Zellsuspension mit FACS-Puffer ermittelt. Propidiumiodid kann die perforierte Membran von toten Zellen, jedoch nicht von lebenden Zellen penetrieren und wirkt dann als Nukleinsäureinterkalator. In Kombination mit Annexin-V erlaubt es die Unterscheidung von apoptotischem und nekrotischem Zelluntergang. Um den Anteil PI-positiver Zellen und damit toter Zellen zu determinieren, wurde zur Auswertung ein Gate über die PI-positive Zellpopulation gelegt.

4.3. Beladung mit magnetischen VSOP-Partikeln

4.3.1. Humane Zellen

Zum Beladen wurden 3×10^6 Zellen in einer Kulturschale in 10 ml Medium versetzt und mit verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten von VProt oder unkomplexiertem VSOP C200 kultiviert.

4.3.2. Murine T-Zellen

Nach der CD3-Sortierung wurden die Zellen mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml Mausmedium und nach Zugabe von $10 \mu\text{l/ml}$ IL-2 ausplattiert und 1h inkubiert, damit die Zellen sich absetzen konnten. Dann wurden die Zellen 1, 4, 6, 8, 24h mit verschiedenen Eisenoxidpartikeln, dem VSOP C200 oder VProt inkubiert. Außerdem wurden verschiedene Zellkonzentrationen sowie unterschiedliche Konzentrationen der Partikel zur Beladung eingesetzt.

Die Zellen wurden anschließend geerntet und zweimal mit PBS gewaschen bevor die entsprechenden Zellzahlen für FACS, Relaxometrie, Mikroskopie und Eisenbestimmungen abgenommen wurden oder letztendlich für den adoptiven T-Zell Transfer zur Induktion der passiven EAE eingesetzt wurden.

4.4. passive EAE

Die EAE ist eine autoimmune Erkrankung des ZNS, die durch enzephalitogene T-Zellen ausgelöst wird, die sich gegen autologe Epitope des Myelins richten und repräsentiert durch die Ähnlichkeit im Krankheitsverlauf sowie der Pathogenomie und -genese der Erkrankung ein gängiges Tiermodell der Multiplen Sklerose. Die EAE kann auf unterschiedliche Weise induziert werden. Die sogenannte aktive EAE wird durch Immunisierung mit Myelinpeptiden, wie dem (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) MOG, (*proteolipid protein*) PLP oder (*myelin basic protein*) MBP induziert, wohingegen die passive EAE, auch „*adoptive transfer EAE*“ genannt, durch den Transfer *in vitro* oder *in vivo* prästimulierter autoreaktiver T-Zellen ausgelöst wird [59]. Um die enzephalitogenen T-Zellen zu generieren werden Mäuse mit ganzen Proteinen oder Peptidfragmenten von Proteinen aus dem Myelin in Adjuvans immunisiert. Daraufhin wird das Peptid von APCs der Haut aufgenommen, prozessiert und hinterher den zirkulierenden T-Zellen in den Lymphknoten präsentiert, die daraufhin verschiedene Prozesse in Gang setzen. Diese stimulierten Zellen führen letztendlich zu Demyelinisierung und Inflammation, die mit Infiltration von lympho- und monozytären Infiltraten einhergehen, sowie einer Permeabilitätssteigerung der BHS. Doch obwohl die EAE ein weit verbreitetes und anerkanntes Modell für die Multiple Sklerose [60] ist, korrespondiert die EAE nicht genau mit den klinischen und pathophysiologischen Merkmalen der MS oder deren Antwort auf Therapien [61]. Zur Induktion der Erkrankung wurden T-Zellen eingesetzt, die wie oben beschrieben kultiviert wurden. Hierzu wurden die Zellen nach Beladung geerntet und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und zweimal gewaschen. Nach Zählen der Zellen mittels Trypanblau und

Neubauer-Kammer wurden $6-15 \cdot 10^6$ Blasten pro Eppendorf-Gefäß in jeweils 300 µl Mausmedium aufgenommen. Zur Induktion der pEAE wurden pro Maus je 300 µl intraperitoneal injiziert. Dabei wurde mit einer Sterican-Kanüle Nr.20 0,45x25mm im unteren Abdomen auf der Mitte der Verbindungslinie zwischen beiden Hüftgelenken im 60° Winkel eingestochen und zur Injektion ein flacherer Winkel von ca 30° eingenommen, um eine bessere Verteilung der Zellen im peritonealen Raum zu ermöglichen. Von diesem Tag 0 an (d0) wurden die Mäuse einem täglichen Scoring nach dem in Tab.1 aufgeschlüsselten System unterzogen.

Score	Klinisches Korrelat
0	keine
0,5	TPA
1	TPL oder TPA + RRW
1,5	TPL + RRW oder TPA-L + RRW + HPA
2	TPL + RRW + HPA
2,5	TPL + RRW + HPA-L
3	TPL + RRW + HPL
4	TPL + RRW + HPL + FPA
4,5-5	TPL + RRW + HPL + FPL

Tabelle 1: Klinischer Score der EAE-Evaluierung

Der klinische Verlauf beginnt mit einer aszendierenden Parese, die sich erst im Schwanz manifestiert und nach einem initialen Tonusverlust später zu Paralyse und letztendlich Plegie des Schwanzes führt. Darauf folgt die Schwächung des sog. „rightening reflex“, der Fähigkeit der Maus sich nach einer abrupten Drehung auf den Rücken durch den Untersucher wieder aufzurichten. Dies wird als sogenannte „rightening reflex weakness“ (RRW) bezeichnet. Es folgt eine Paralyse (HPA) und schließlich Plegie (HPL) der Hinterbeine und schließlich der Vorderbeine (FPA/FPL). Um eine Objektivierung zu ermöglichen, wurde für das Monitoring der Erkrankung ein Scoring-System eingeführt, welches die Symptomkomplexe einem bestimmten Score zuteilt (Tab.1). Die EAE kann, wie die MS auch, einen schubförmig remittierenden Verlauf oder eine primär chronisch progrediente Verlaufsform annehmen.

Dieses experimentelle Prozedere wurde mit VProt beladenen Zellen an 5 Mäusen exemplarisch getestet. Die entsprechenden gesunden Kontrollmäuse waren in Hinblick auf Alter und Spezies

gemacht. Zur Induktion der EAE wurden pro Maus die Zellen aus ca. 8-10 immunisierten Mäusen benötigt.

4.5. Histologie

4.5.1. Aufbereitung der Organe für die Histologie

Nach Durchführung der *in vivo* MRT wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Xylazinhydrochlorid und 16% Ketamin euthanasiert und auf Eis transkardial perfundiert. Dazu wurden die Mäuse nach Einsetzen der Areflexie als Zeichen der ausreichenden Anästhesie auf einer Korkplatte fixiert und das Fell mit Ethanol besprüht, um hygienisches und sauberes Arbeiten zu erleichtern. Daraufhin konnte das Fell eingeschnitten und stumpf vom Peritoneum gelöst werden. Die Fixation des Sternums mit einer Pinzette erlaubte dann die Inzision des Diaphragmas und der Pleura, sodass das Herz vom Brustkorb gelöst werden konnte, der dann eröffnet und abgetragen wurde. Da dies eine bessere Sicht auf das Herz erlaubt war es anschließend möglich, den linken Ventrikel bei noch vorhandenem Herzschlag mit einer Perfusionsnadel zu punktieren und nach Fixierung mit einer Klammer den rechten Vorhof zu inzidieren, um ein Abfließen der Perfusionsflüssigkeit zu gewährleisten. Anschließend wurde der Kreislauf über die Perfusionsnadel mit 40 ml kaltem PBS 0,2/0,1 mM von Blut freigespült. Darauf folgten 40 ml kaltes 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS, um die Gewebe zu fixieren.

Gehirn, Rückenmark, Leber, Milz und zervikale, sowie inguinale Lymphknoten wurden herauspräpariert und über Nacht in 4% PFA postfixiert um Auto- und Heterolyse des Gewebes zu verhindern. Zur Extraktion von Gehirn und Rückenmark wurden die Schädelkalotte und die Wirbel mit einer Schere eröffnet und die Organane mittels Pinzette herauspräpariert.

Ein ascendierender Sucrose-Gradient von jeweils 24 Stunden in 10%, 20% und letztendlich 30%iger Sucrose-Lösung in 0,1 mM PBS führte zur Entwässerung der Organe. Zur Einbettung wurden die entnommenen Organe in mit Tissue Tek[®] gefüllte Alu-Förmchen gelegt. Ein Becherglas mit 2-Methylbutan wurde in flüssigen Stickstoff getaucht um eine langsame Temperatursenkung zu erzielen. Die eingebetteten Organe wurden dann in das gekühlte 2-Methylbutan getaucht und dann bei -80°C gelagert.

Histologische Schnitte der so hergestellten gefrorenen Blöcke wurden mit 20 µm oder 40 µm Dicke an einem Kryostaten (Jung cryostat 2800 Frigocut-E, Cambridge Instruments, Nussloch, Germany) angefertigt und auf Objektträger übertragen. Der Gefrierblock wurde in den

Kryostaten eingespannt und mit einer Klinge geschnitten. Die Schnitte schieben sich auf das Messer unter das Streckbrettchen, welches das Einrollen der Schnitte verhindert. Diese wurden dann mit einem Tropfen PBS auf die Objektträger übertragen, um Falten zu vermeiden.

4.5.2. Berliner-Blau-Färbung

Zur Visualisierung der mit Eisen beladenen Zellen wurde die Berliner-Blau-Färbung an Schnitten und an mit Zellen beschichteten Deckgläsern durchgeführt. Die Berliner-Blau-Färbung ist eine gängige Methode um Eisen in Gewebe darzustellen und wird heute standardmäßig zum Nachweis eisenbeladener Zellen oder eisenhaltiger Kontrastmittel eingesetzt.

Kaliumhexaferrocyanoferrat(II) $K_3[Fe(CN)_6]$ weist Fe^{3+} nach der folgenden Formel nach: $FeCl_3 + K_4Fe(CN)_6 = KFeFe(CN)_6^- + 3KCl$. Dabei entsteht ein blaues Pigment, das sogenannte Berliner Blau (Prussian blue). Die Formel dieses Berliner Blau Pigments lautet $Fe_4[Fe(CN)_6]_3 \times H_2O$ oder $KFe[Fe(CN)_6]_3 \times H_2O$.

Berliner-Blau-Färbung einzelner Zellen

Runde Deckgläser wurden in einer 24 Lochplatte mit Ethanol und PBS gespült, bevor sie 24 Stunden im Brutschrank mit Poly-L-Ornithin beschichtet werden konnten. Nach mehreren Waschschrritten wurden die so vorbereiteten Deckgläser für mindestens 2 Stunden mit den beladenen Zellen inkubiert, bevor sie mit 4% PFA fixiert wurden. Nach zwei Waschschrritten mit PBS und Aqua dest. wurden die Zellen 5 min mit der wässrigen Kaliumferrozyanidlösung und anschließend 30 min mit der sauren Kaliumferrozyanidlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. im well konnten die Deckgläser mittels Immumount auf die Objektträger gelegt und somit fixiert werden.

Berliner-Blau-Färbung an Gewebeschnitten

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte jeweils 10 min in PBS und Aqua dest. gespült, bevor sie 5 min in die wässrige 10%ige Kaliumferrozyanidlösung getaucht wurden. Dann wurden sie in die saure Kaliumferrozyanidlösung überführt. Diese ist eine 20%ige HCL-Lösung, die im Verhältnis von 1:2 mit einer wässrigen 10%igen Kaliumferrozyanidlösung gemischt wird. Nach 30 min wurden die Schnitte zweimal in Aqua dest. gespült. Es schlossen sich 3 min Färbung mit 0,1%iger Kernechtrotlösung mit einem Tropfen Eisessig $C_2H_4O_2$ zur Gegenfärbung der Kerne an. Zur Herstellung der Kernechtrot-Lösung wurden 0,2 g Kernechtrot in 200 ml Aqua dest. unter dem Abzug eingerührt, anschließend gefiltert und ein Tropfen Eisessig hinzugegeben.

Nach einem weiteren Waschschrift in Aqua dest. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach 15 min in Xylol eingedeckelt.

4.5.3. Hematoxilin-Eosin-Färbung

Um die Verteilung des Entzündungsmusters zu evaluieren, wurde außerdem eine Hämatoxilin und Eosin (H&E)-Färbung an Gewebeschnitten durchgeführt.

Die Schnitte wurden nach dem Auftauen ca. 30 min bei 50°C getrocknet und anschließend 10 min in PBS getaucht. Nach weiteren 5 min in Aqua dest. wurden die Schnitte für 10 min in Hämalaunlösung sauer nach Mayer/Hämatoxylin angefärbt, welches die Zellkerne blau färbt, und 10 min unter fließendem Wasser gewaschen, um überschüssige Farbe zu entfernen. Es folgten 2 min in einer Eosin-Lösung aus 15 ml einer Eosin-Stock-Lösung, bestehend aus 3 g Eosin mit 93 ml Ethanol 96% in 87 ml Aqua dest., auf 200 ml Aqua dest. und 1 Tropfen Essigsäure, welche das Zytoplasma rot färbt. Zum Entwässern wurden die Schnitte nach kurzem Schwenken in Aqua dest. in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%, 80%, 96% und letztlich 100% Ethanol für jeweils 2 min in die jeweilige Konzentration getaucht. Um den Alkohol wieder aus den Schnitten zu entfernen wurden diese 15 min in Xylol gelagert, bevor sie mit dem Einschlussmedium Entellan eingedeckt werden konnten.

4.6. MRT

4.6.1. Phantommessungen

Um *in vitro* evaluieren zu können, wieviele beladene Zellen in einem Voxel präsent sein müssen, um ein Signal im 7T MRT zu generieren, wurden mit beladenen Zellen sogenannte Agarose-Phantome hergestellt und im 7T MRT analysiert. Hierzu wurden Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Zellzahlen in 500 µl erhitzter 1%iger Agarose in Aqua dest. aufgenommen und in PCR-Röhrchen gefüllt, die dann in einem mit Agarose gefüllten 50 ml Röhrchen plaziert wurden, um Artefakte von Luftblasen zu verhindern. Diese Phantome wurden anschließend mit einer T2*-gewichteten Sequenz mit den Parametern TR 1200 ms, TE 5.6 ms, 1 mm Schichtdicke, FOV 4x3.06 cm im 7-Tesla Kleintier-MRT gemessen. Die Dichte der schwarzen Punkte korrelierte hierbei mit der Beladungs- und damit mit der Signalintensität der beladenen Zellen.

4.6.2. Relaxometrie

Die Relaxivität R_2 (spin-spin Relaxationsrate, $1/T_2$ pro Mol Fe in VSOP) wurde ermittelt durch Messungen mit einem Bruker Minispec 0.49. Um vor der Messung überschüssiges Eisen aus den Proben zu entfernen, wurden die T-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Waschmedium aufgenommen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml oder $0,15 \cdot 10^6$ Zellen/300 μ l. In einem Wasserbad wurden die Proben auf 40°C erwärmt, um die Temperatur der Proben der im Relaxometer anzugleichen und damit Artefakte durch Temperaturdifferenzen zu verhindern, da die T_2 -Zeit der Proben maßgeblich durch die Temperatur letzterer beeinflusst wird. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben zum Messen in den Relaxometer gestellt. Die Messung erfolgte dann nach Einstellung der Parameter, die den Relaxivitäten der Proben angepasst wurden. Die Parameter Recycle Delay (RD), Tau und Gain wurden so adäquat für die jeweilige Probe gewählt, sodass bei einem Abfall der Intensität um über 5% der Recycle Delay verlängert wurde. Je höher die T_2 -Relaxationszeit, desto größer musste somit RD gewählt werden. Dies ist wichtig, damit die Protone Zeit haben auszurelaxieren, bevor der nächste Impuls gesetzt wird, um eine Verfälschung der Werte zu vermeiden.

4.6.3. Atomabsorptionsspektrometrie

Der Eisengehalt der beladenen Zellen wurde quantitativ mittels Atomabsorptionsspektrometrie ermittelt. Um die Zellen zu lysieren wurden 6×10^5 Zellen mit 50 μ l HCl 32% bis zur völligen Dissolution der Zellen inkubiert und anschließend mit 3ml Aqua dest. aufgefüllt. Die Messung der Proben erfolgte mit einem Atomabsorptionsspektrometer (Solaar, Unicam, Cambridge, UK) im Rahmen einer Kooperation mit der AG Taupitz aus dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum Berlin (NWFZ, Charité-Universitätsmedizin Berlin).

4.6.4. In vivo Applikation der Magnetresonanztomographie

Kernspintomographische Untersuchungen wurden an einem 7 Tesla Kleintier-MRT (Pharmascan 70/16AS, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) mit einer 20 mm RF-Quadratur-Volumen-Kopfmagnetspule durchgeführt. Zur Erhaltung der Körpertemperatur wurden die Mäuse auf einem Heizkissen mit zirkulierendem, 40°C warmem Wasser gelegt. Zur Narkose der Tiere wurde 1-1,5% Isofluran eingesetzt, welches den Tieren während der Untersuchung permanent unter Beimischung von O_2 zugeleitet wurde. Die Isofluran-Menge wurde konstant der Atemfrequenz angepasst, die unter ständiger Beobachtung stand und bei ca. 40-50/min gehalten

wurde, um getriggerte Sequenzen zu ermöglichen. Es wurden T1-gewichtete Sequenzen vor und nach intravenöser Injektion von 100-200 µl 1:4 mit NaCl verdünntem Gadolinium (Gd, 0,5 mmol/kg Dimeglumingadopentetat) in die Schwanzvene durchgeführt, um Blut-Hirn-Schrankenstörungen aufzudecken. Gd ist ein nierengängiges paramagnetisches Kontrastmittel, welches in T1-gewichteten Aufnahmen ein hyperintenses Signal verursacht und routinemäßig in der Klinik eingesetzt wird. Aufnahmen wurden in axialer und koronarer Schnittführung durchgeführt. Longitudinal wurden Scans von Tieren nach adoptivem T-Zell Transfer von VProt markierten T-Zellen und von Tieren nach adoptiven T-Zell-Transfer von unmarkierten T-Zellen, sowie von gesunden Kontrolltieren durchgeführt. Die Tiere wurden longitudinal bis zu einem Score von maximal 3.5 verfolgt und anschließend perfundiert. Im Rahmen der intrathekalen Injektion beladener T-Zellen wurde außerdem in der gleichen Sitzung vor der Verabreichung des Gadoliniums eine T2*-gewichtete Sequenz eingesetzt, um die Visualisierung der VSOP markierten T-Zellen zu ermöglichen.

5. Ergebnisse

5.1. Humane Zelllinien

5.1.1 HeLa-Beladung

Die HeLa-Zelllinie wurde verwendet um die Labellingkonzentrationen und Inkubationszeiten zu optimieren. Um die minimale Inkubationszeit zu bestimmen, die ausreicht um eine effiziente Beladung zu ermöglichen, wurden zunächst Inkubationszeiten von 6h und 24h verglichen (Abb.3). Hierzu wurden die HeLa-Zellen mit 0,5 mM VProt, 1 mM VProt oder 1 mM VSOP inkubiert und Zellen zur Kontrolle ohne Partikel kultiviert. Bis auf die Zugabe der Partikel wurden alle Zellchargen gleich behandelt. Die nach Ablauf der Inkubationszeiten erhobenen T2-Relaxationszeiten zeigten schon nach 6h eine sehr effiziente Beladung der mit VProt beladenen Zellen. Die Verkürzung der Relaxationszeiten von 1655 ms bei den Kontrollzellen auf 187,5 ms bei den mit 0,5 mM VProt beladenen Zellen spricht für eine starke Aufnahme der Eisenoxidpartikel in die Zellen. Mit der Zunahme der Beladungskonzentration auf 1mM VProt konnte eine weitere Verkürzung der Zeiten auf 107,6 ms erreicht werden. Auch die mit VSOP inkubierten Zellen zeigten verkürzte Relaxationszeiten auf bis zu 1109,3 ms, blieben jedoch deutlich über den Werten der mit VProt beladenen Zellen. Dieser relaxometrische Befund korrelierte mit mikroskopischen Aufnahmen der Berliner Blau gefärbten HeLa-Zellen (Abb.4-6). Die mit 1 mM VSOP inkubierten Zellen zeigten hier nach 6h nur wenige intrazelluläre Partikel,

während die Zellen nach Inkubation mit 1 mM VProt eine Vielzahl intrazellulärer Einschlüsse vorzuweisen hatten (Abb.4).

Die Aufnahme der Partikel wurde mit Zunahme der Inkubationszeit auf bis zu 24h nicht signifikant gesteigert, die Relaxationszeiten differierten nicht signifikant von den nach 6h Inkubation erhobenen Werten (Abb.3) und auch die mikroskopischen Bilder unterschieden sich nicht wesentlich (Abb.5). Die in der Relaxometrie weitere Verkürzung der T2-Zeiten nach 24 Stunden ist vermutlich überwiegend auf eine vermehrte Anheftung der Partikel an die Außenseite der Zellmembran zurückzuführen, wie in der Mikroskopie zu sehen ist (Abb.5 + 6). Zusammenfassend lag die Effizienz der Beladung mit VProt damit deutlich über derjenigen mit VSOP.

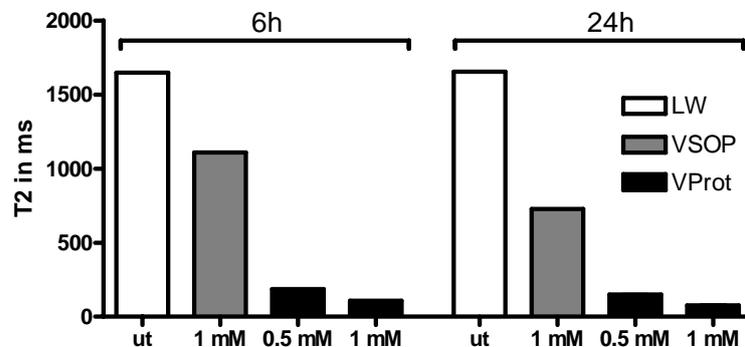


Abbildung 3: Relaxationszeiten nach Beladung von HeLa-Zellen mit Inkubationszeiten von 6h und 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen VProt bzw. VSOP. Dabei zeigte die Beladung mit VProt deutlich kürzere Relaxationszeiten bei gleicher Konzentration (1 mM). Weiterhin konnte bei einer Beladung mit 0,5 mM bereits nach 6h eine sehr ausgeprägte Aufnahme von VProt, nicht jedoch von VSOP beobachtet werden.

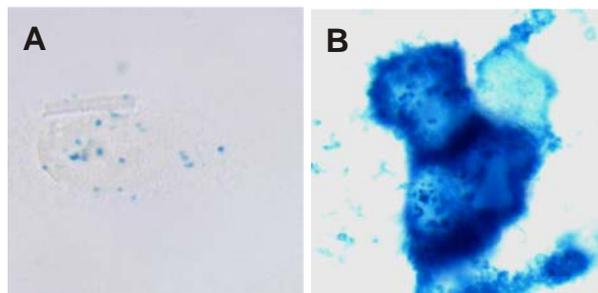


Abbildung 4: Vergleich der Beladung von HeLa-Zellen mit 6h Inkubationszeit und 1 mM C200 (A) bzw VProt (B). Die Visualisierung der Verteilung der Eisenpartikel wurde mittels Berliner-Blau-Färbung ermöglicht, in der eine starke Anreicherung blau dargestellter Eisenpartikel in den mit VProt beladenen HeLa-Zellen sichtbar wird, wohingegen die mit der gleichen Konzentration von C200 beladenen HeLa-Zellen nur wenige blaue intrazelluläre Partikel aufweisen.

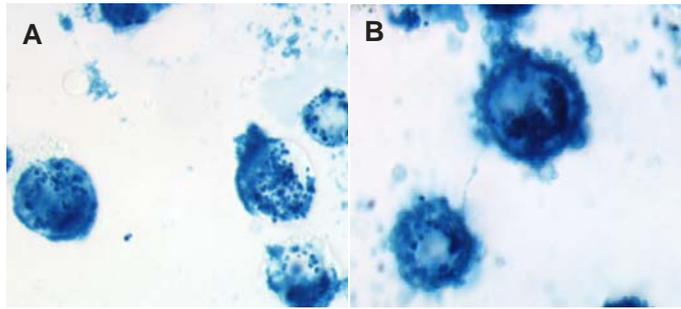


Abbildung 5: Vergleich der Beladung von HeLa-Zellen mit 0,5 mM VProt nach A) 6h und 24h in B). Die Berliner-Blau-Färbung lässt auch nach 24h keine wesentlich gesteigerte Aufnahme der Eisenoxid-Nanopartikel erkennen. Sowohl nach 6h, als auch nach 24h weisen die Zellen eine sehr starke Blaufärbung und damit auch eine ausgeprägte Beladung mit VProt-Nanopartikeln auf.

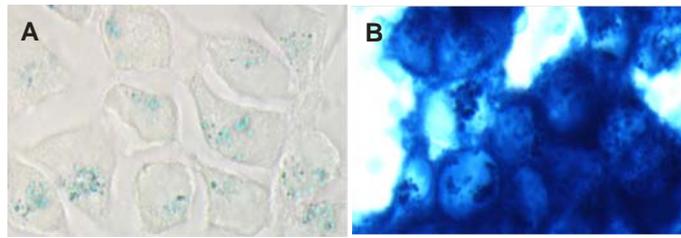


Abbildung 6: Vergleich beladener HeLa-Zellen nach Inkubation für 24h mit 1 mM VSOP in A) bzw. 1 mM VProt in B). Es ist ein deutlicher Unterschied in der Intensität der aufgenommenen und angefärbten Nanopartikel sichtbar.

Nachdem bei Standardbedingungen ein sehr effizientes Labelling mit VProt erreicht werden konnte, wurde überprüft wie das erstellte Beladungsprotokoll optimiert werden kann.

Um die minimale Konzentration zur effizienten Beladung der HeLa-Zellen zu finden, wurde eine Konzentrationsreihe angefertigt, die die Konzentrationen 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM abdeckte, bei einer Inkubationszeit von 4h (Abb.7, Abb.8).

In einer Reihe von Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Relaxationszeiten schon bei Konzentrationen von 0,05 mM VProt bei einer Inkubationszeit von 4h signifikant von einem Kontrollwert von 1598,3 ms auf einen von 677,8 ms abfielen ($p < 0,001$) und somit ein suffizientes Labelling widerspiegeln (Abb.7). Bei einer Konzentration von 0,1 mM zeigte sich eine Relaxationszeit von 544,45 ms, die einer Aufnahme von 1,48 pg Eisen pro Zelle entsprach (Tab.2). Bei einer Steigerung der Konzentration auf 0,5 mM VProt fiel die Relaxationszeit auf 96,65 ms ab. Bei der maximal eingesetzten Konzentration von 1 mM VProt konnte nach 4h Inkubation eine Verkürzung der T2-Zeiten auf 68,75 ms beobachtet werden. Dabei betrug die

maximale Eisenaufnahme 25,82 pg Fe pro Zelle (Tab.2). Die mittels Relaxometrie vermutete gesteigerte Menge aufgenommener Nanopartikel konnte mit der Darstellung multipler zytoplasmatischer Einschlüsse mittels Berliner-Blau-Färbung histologisch bestätigt werden (Abb.8). Mit steigender Konzentration wurde hier eine verstärkte Aufnahme blau angefarbter Eisenoxidpartikel sichtbar.

Diese Versuche ermöglichten es, den Beweis für die Effizienz des neuartigen VProt-Nanopartikels anzutreten, welches eine signifikante Verbesserung im Gegensatz zur Beladung mit dem nativen VSOP 200 darstellt. So konnte auf den Ergebnissen aus den Versuchen mit humanen Zellen basierend, die Erstellung eines Beladungsprotokolls für T-Zellen initiiert werden.

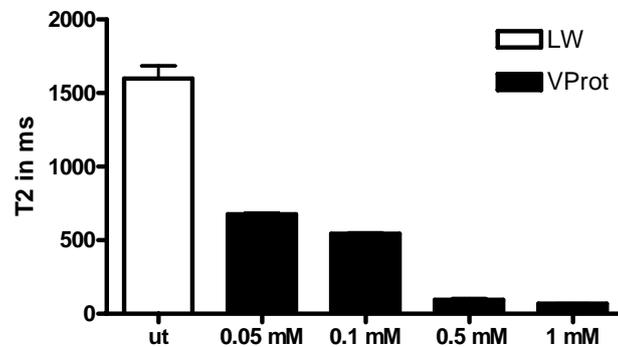


Abbildung 7: Konzentrationsreihe zur Bestimmung der minimalen Beladungskonzentration von HeLa-Zellen bei 4h Inkubationszeit. Zur Ermittlung der Effizienz der Beladung der Zellen mit steigender Konzentration an VProt wurden Relaxationszeiten (T2) mittels Relaxometrie gemessen.

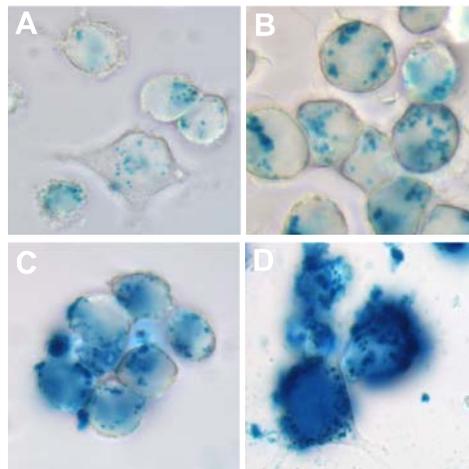


Abbildung 8: Beladung von HeLa-Zellen mit VProt wurde mittels Berliner-Blau-Färbung dargestellt. Bei einer Inkubationszeit von 4h konnte mit steigender Konzentration eine steigende Partikelaufnahme in zytoplasmatische Endosomen festgestellt werden (A: 0,05 mM, B: 0,1 mM, C: 0,5 mM, D: 1 mM). Eine effektive Aufnahme konnte schon bei einer Konzentration von 0,05 mM beobachtet werden. Bei allen Konzentrationen konnte eine homogene zytoplasmatische Aufnahme beobachtet werden, doch mit steigender Inkubationsdauer wurde auch eine zunehmende Anheftung der Partikel an die Außenseite der Zellen beobachtet.

Zellen	Kontrastmittel	Inkubationszeit	Konzentration	Fe in pg/Zelle
T Zellen	VProt	10h	0.5 mM	1.57
			1 mM	9.99
	VSOP C200		0.5 mM	3.06
			1 mM	7.22
Hela-Zellen	VProt	4h	0.05 mM	1.48(M)/ 1.64(R)
			0.1 mM	3.39 / 3.31
			0.5 mM	9.17 / 10.73
			1 mM	25.82 / 12,67
HeLa-Zellen	VProt	6h	0.5 mM	30.91
			1 mM	93.59
	VSOP C200		1 mM	0.5

Tabelle 2: Die Eisenaufnahme in die Zellen wurde exemplarisch mittels Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Fe/Zelle ist P-LW (Leerwert ist von ermittelten Werten abgezogen).

5.2. T-Zell-Beladung

Nach der Optimierung der Beladungsparameter sich rasch teilender Zellen wie der HeLa-Zellen, die relativ bereitwillig angebotene Nanopartikel annehmen, sollten die gewonnen Ergebnisse nun auf T-Zellen übertragen werden, um auch in diesem komplexeren Zellsystem die Beladung zu optimieren.

Um die Reinheit der T-Zell-Kulturen zu überprüfen, wurde vor und nach CD3-Sortierung die Reinheit und Vitalität der CD3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abb.9). Vor der Sortierung konnten 46,04% der Zellen in der Probe als CD3⁺ Zellen identifiziert werden, diese wiesen eine Vitalität von 72,5% auf. Nach dem CD3-Sort wurden in den Proben 84,27% CD3⁺ Zellen erfasst, mit einem Anteil von 87,3% PI-negativen und damit vitalen Zellen. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Reinheit der Kulturen durch die Stimulation mit APCs vor der Beladung verbessert wurde.

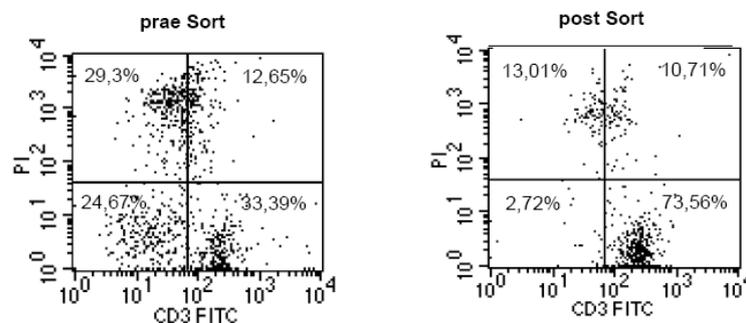


Abbildung 9: Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Überprüfung der Reinheit und Vitalität der T-Zellen nach der magnetischen CD3-Sortierung. Im Vergleich sind hier die prozentualen Ansätze an CD3-, sowie PI-positiven T-Zellen dargestellt.

Daraufhin wurde in einem ersten Schritt untersucht, welche Eisenkonzentration bei den unterschiedlichen Partikeln mindestens nötig ist, um eine ausreichende Aufnahme in die T-Zellen zu ermöglichen. Hierzu wurden T-Zellen für 10h mit jeweils 0,5 mM und 1 mM VSOP oder VProt inkubiert und daraufhin in Hinblick auf die Relaxationszeiten, Mikroskopie, Eisengehalt und Vitalität verglichen. Ein suffizientes Labelling konnte schon nach 10h

Inkubation mit 0,5 mM VProt erzielt werden, bei einer T2-Relaxationszeit von 337,9 ms im Vergleich zu 889 ms bei mit VSOP beladenen Zellen, bei einem Leerwert von 1551,3 ms (Abb.10). Mit einer Steigerung der Konzentration auf 1 mM Fe/ml konnte die Aufnahme von Partikeln erneut gesteigert werden. So konnte bei den T2-Zeiten ein Abfall auf bis zu 152,2 ms bei Inkubation mit 1 mM Fe/ml VProt beobachtet werden. Dies lag weit unter den bei der Beladung mit nativem VSOP erreichten T2-Zeiten, die bei 804 ms lagen. Weiterhin konnte die steigende Aufnahme der Partikel mit einem Anstieg der Konzentration von 0,5 mM auf 1 mM für VSOP und VProt auch mikroskopisch bestätigt werden (Abb.11). Die um einiges effizientere Aufnahme von VProt (Abb.11, C, D) im Gegensatz zum VSOP (Abb.11, A, B) spiegelte sich mikroskopisch wider. Ferner ergab die Beladung mit VProt ein homogeneres intrazelluläres Verteilungsmuster der Partikel, als nach der Beladung mit nativem VSOP C200.

VProt Konzentrationen von 1 mM wurden außerdem gut toleriert. Es gab keinen Anstieg in der Anzahl PI-positiver, damit toter Zellen, im Vergleich zum Leerwert. Mittels Durchflusszytometrie wurde für die Kontrollzellen eine Vitalität von 97,42% ermittelt. Für T-Zellen, welche mit 1 mM VProt beladen wurden, konnte eine Vitalität von 97,95% erfasst werden, wohingegen mit 1 mM VSOP inkubierte T-Zellen einen Wert von 97,11% aufwiesen (Abb.12). Dies zeichnet eine sehr gute Toleranz der T-Zellen gegenüber der verwendeten magnetischen Nanopartikel aus.

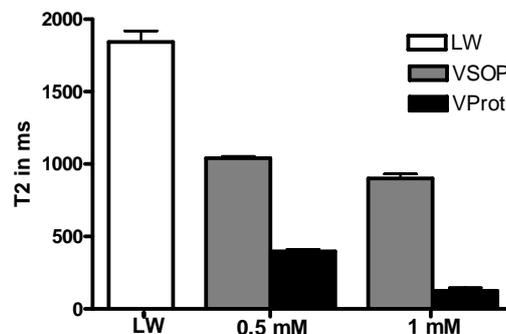


Abbildung 10: Beladungseffizienz wurde durch Bestimmung der NMR T2-Relaxationszeiten nach 10h Inkubation der T-Zellen mit gleichen Konzentrationen von VProt bzw. VSOP determiniert. Der stärkere Abfall der T2-Relaxationszeit durch VProt im Gegensatz zu VSOP zeigt die verbesserte Aufnahme des VProt durch die T-Zellen. Schon bei einer Konzentration von 0,5 mM zeigt sich hier eine signifikant verringerte T2-Zeit für VProt.

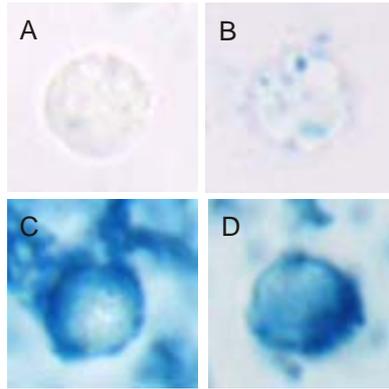


Abbildung 11: Berliner-Blau-Färbung von T-Zellen nach 10h Inkubation mit 0,5 mM A) oder 1 mM B) VSOP. Es sind nur sehr wenige intrazelluläre Partikel sichtbar, die mit steigender Konzentration zunehmen, aber nie die Intensität von den VProt beladenen Zellen erreicht. Diese zeigen schon bei Inkubation mit 0,5 mM C) eine intensive Partikelaufnahme, die bei Steigerung der Konzentration auf 1 mM D) zunimmt. Doch auch der an der Zellmembran anhaftende Anteil der Partikel nimmt hier zu.

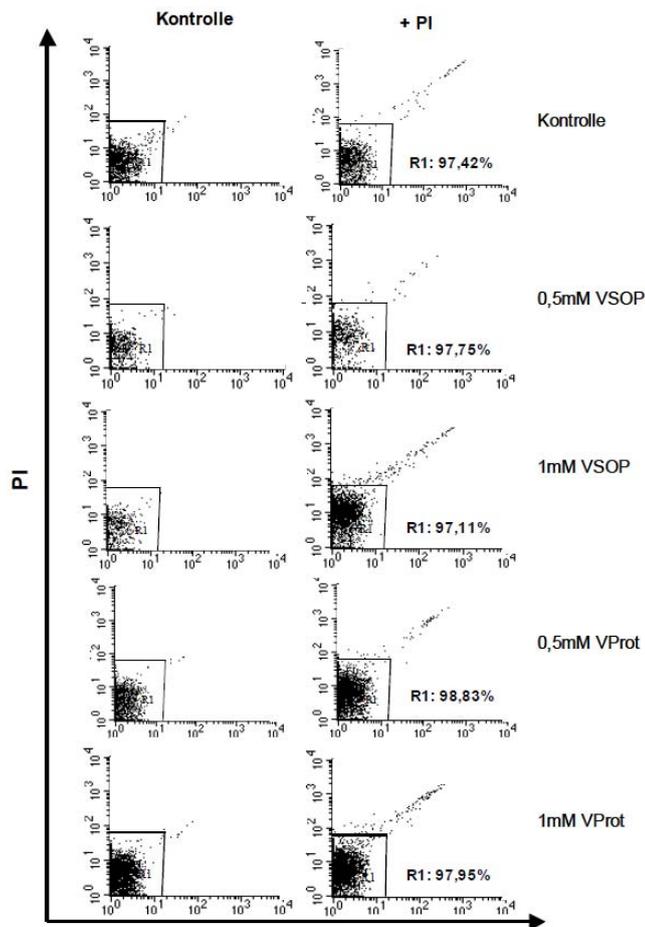


Abbildung 12: FACS-Ergebnisse zeigen keinen Unterschied in der Zellvitalität zwischen Kontrollproben und den beladenen Zellen.

Die sich als am effizientesten erwiesene Konzentration von 1 mM wurde dann in einem weiteren Versuchsansatz eingesetzt, um die minimale Inkubationszeit zu bestimmen, die für eine ausreichende Beladung nötig ist. Nach 1h, 4h, 8h, und 21h wurden Proben zur Untersuchung mittels Mikroskopie, Relaxometrie und Durchflusszytometrie abgenommen und analysiert. Dabei konnte bereits nach einer Inkubationszeit von 1h ein signifikanter Abfall der T2-Relaxationszeiten für beide Partikel beobachtet werden (Abb.13). Im Vergleich zum Leerwert von 1392 ms, waren die Zeiten für die VSOP beladenen Zellen nach 4h bei 808,5 ms und für die mit VProt beladenen Zellen bei 773 ms. Nach weiteren 4h wiesen die VProt beladenen Zellen mit 268,3 ms eine erheblich geringere Relaxationszeit auf, als die VSOP-beladenen Zellen mit 717,5 ms. Dies zeigt einen klaren Vorteil für VProt bei der Beladung von T-Zellen. Es ermöglicht mit einer geringeren Konzentration und einer geringeren Inkubationszeit eine effizientere Beladung als das native VSOP. Dies bietet einen erheblichen Vorteil in Hinblick auf Zelltoxizität und -überleben, die ein besseres Outcome ermöglichen, wenn die Inkubationszeit verkürzt werden kann.

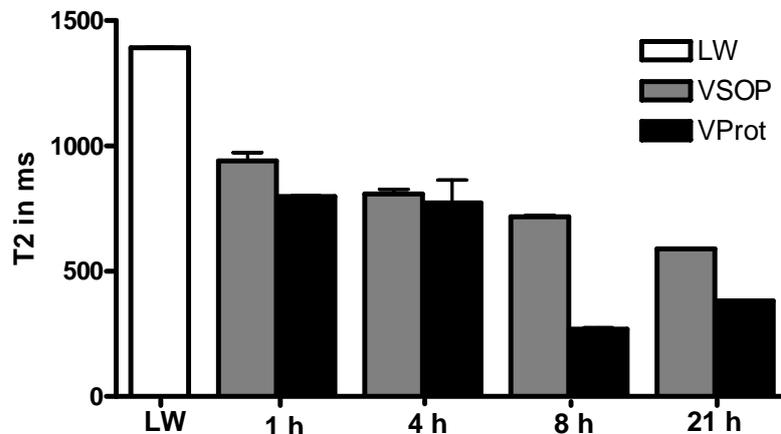


Abbildung 13: Die Zeitreihe zur Beladung von T-Zellen mit 1 mM VProt bzw. VSOP zeigt die Veränderung der Relaxationszeiten nach 1h, 4h, 8h, und 21h Inkubation. Nach 1-4h ist bereits ein signifikanter Abfall der T2-Zeiten sowohl für VSOP, als auch für VProt zu verzeichnen. Nach 8h weist die Beladung mit VProt einen ausgeprägten Vorteil in der Beladung auf.

In vitro ließ sich damit quantitativ, sowie auch qualitativ eine hohe Eisenaufnahme belegen. Doch reicht die Menge der aufgenommenen Nanopartikel, um im MRT ein bildgebendes Signal zu erzeugen? Um dies zunächst *in vitro* zu untersuchen, wurde auf die Erstellung von Agarose-Gelphantomen zurückgegriffen. Hierzu wurden T-Zellen 10h mit 0,5 mM oder 1 mM VSOP

oder VProt inkubiert und in Agarose-Phantome gegossen. Im Vergleich zu regulärem VSOP ergaben die mit VProt beladenen Zellen schon bei einer Konzentration von 0,5 mM Fe/ml im Medium ein ausgeprägtes hypointenses Signal in T2-gewichteten Sequenzen und bestätigte die zuvor beobachtete ausgeprägte Eisenaufnahme (Abb.14). Bei einer Konzentration von 1 mM Fe/ml wurde noch deutlicher, dass mit VProt beladene T-Zellen eine sehr viel größere Menge Eisen enthielten, als die mit VSOP beladenen T-Zellen. Der Einsatz von Agarose-Phantomen ermöglichte somit die Visualisierung der beladenen Zellen im MRT und bestätigte die zuvor labortechnisch erhaltenen Ergebnisse.

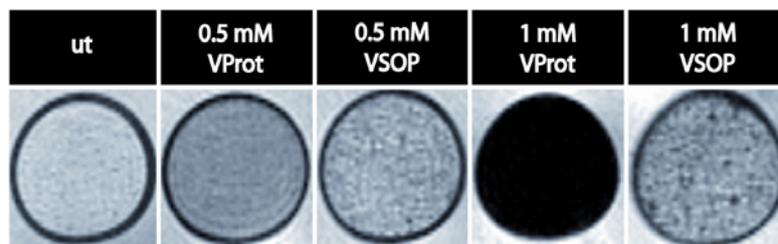


Abbildung 14: Zum Vergleich der Beladungstauglichkeit der beiden Partikel wurden Phantome mit 1000 T-Zellen/ μ l Agarose angefertigt, um die beladenen T-Zellen mittels Magnetresonanz darzustellen. Mit steigendem Eisengehalt der Zellen verstärkt sich auch das im MRT sichtbare Signal und man beobachtet eine zunehmende Hypointensität in T2*-gewichteten Sequenzen.

Diese Ergebnisse ebneten den Weg zur Weiterentwicklung der Methode und damit für den Prozess der Transition in ein *in vivo* System.

5.3. Induktion der EAE durch beladene T-Zellen

Um zu überprüfen, ob auch *in vivo* die Funktion beladener Zellen erhalten bleibt, wurde der Versuch unternommen, mit beladenen Zellen eine passive EAE zu induzieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass T-Zellen nach Inkubation mit 0,5 mM oder 1 mM VProt tatsächlich dazu in der Lage waren, eine EAE zu induzieren.

Die Tiere zeigten im Durchschnitt nach einem Zeitraum von 6 Tagen Symptome und erreichten im Mittel ein Score von 3.5, bevor sie perfundiert wurden (Abb.15, Abb.16).

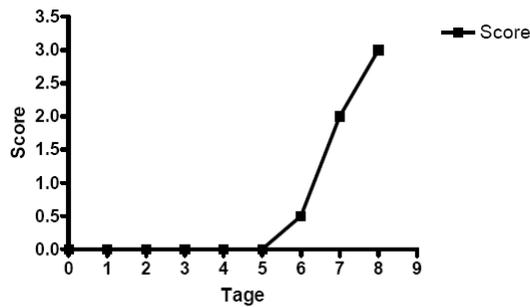


Abbildung 15: Repräsentativer zeitlicher Score-Verlauf einer Maus nach passiv induzierter EAE mit 6×10^6 VProt beladenen Blasten. Ab Tag 9 konnte Gadolinium Leakage im Hirnstamm sowie im Cerebellum nachgewiesen werden (Abb.18). Der Symptomverlauf korrespondierte im zeitlichen Rahmen mit dem der pEAE nach adoptiven Transfer nicht beladener T-Zellen. Dies untermauerte das erhaltene enzephalitogene Potential der mit VProt beladenen T-Zellen.

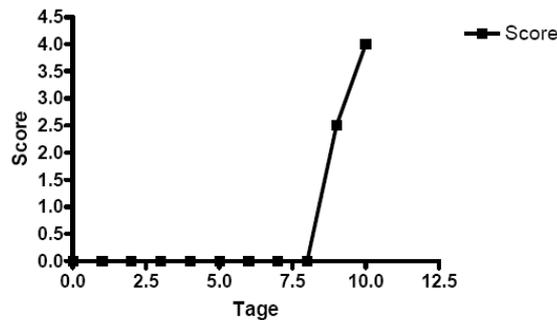


Abbildung 16: Repräsentativer zeitlicher Score-Verlauf einer Maus nach passiv induzierter EAE mit 11×10^6 VProt beladenen Blasten. Ab Tag 10 konnte in der Fornix ein Leakage mittels Gadolinium nachgewiesen werden. Der Krankheitsverlauf korreliert auch hier wieder mit dem der regulären pEAE.

Im 7T Kleintier-MRT konnten schon ab dem 6-9.Tag post injectionem (p.i.) Veränderungen der BHS festgestellt werden. Nach Injektion des Kontrastmittels Gadolinium wurde bei allen Mäusen eine BHS-Störung beobachtet. Diese erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke konnte v.a. periventrikulär (Abb.17), sowie in Bereichen des Cerebellums und des Hirnstamms beobachtet werden (Abb.18). Sie korrelierte meist mit dem Auftreten histologisch nachweisbarer Entzündungsherde mit periventrikulären, cerebellären und perivaskulären (Abb.19) Infiltraten von Entzündungszellen in der H&E-Färbung aufbereiteter Gewebeschnitte. Die Abb.18 zeigt koronare T1-gewichtete Aufnahmen einer an EAE erkrankten Maus an Tag 9 post injectionem mit einem Score von 3 (siehe Abb.15). Der Hirnstamm, sowie das Cerebellum weisen

ausgeprägte hyperintense Areale auf, die durch einen Durchtritt von Gadolinium durch die undichte BHS hervorgerufen werden.

Die in Abb.17 gezeigte Maus wurde klinisch am Tag 10 mit einem Score von 0,5 perfundiert. Trotz milder klinischer Symptomatik und relativ geringer zellulärer Infiltrate in den korrespondierenden histologischen Schnitten zeigte sich im MRT eine ausgeprägte Blut-Hirn-Schrankenstörung.

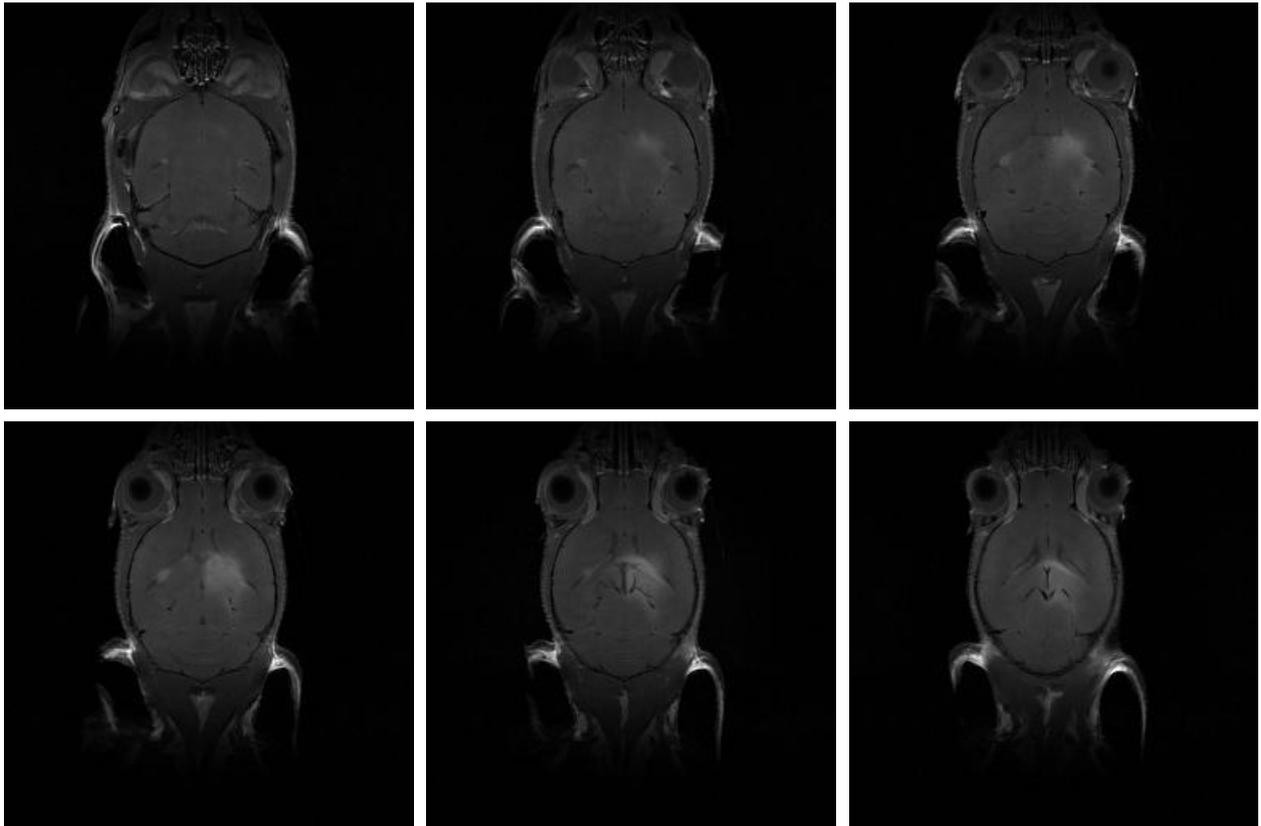


Abbildung 17: Gadolinium-gestützte T1-gewichtete Sequenz an Tag 9 nach T-Zell Transfer. Es ist vor allem periventrikulär ein diffus hyperintenses Areal zu sehen, welches durch ein ausgeprägtes Übertreten des Kontrastmittels durch die gestörte BHS in das Hirnparenchym verursacht wird.

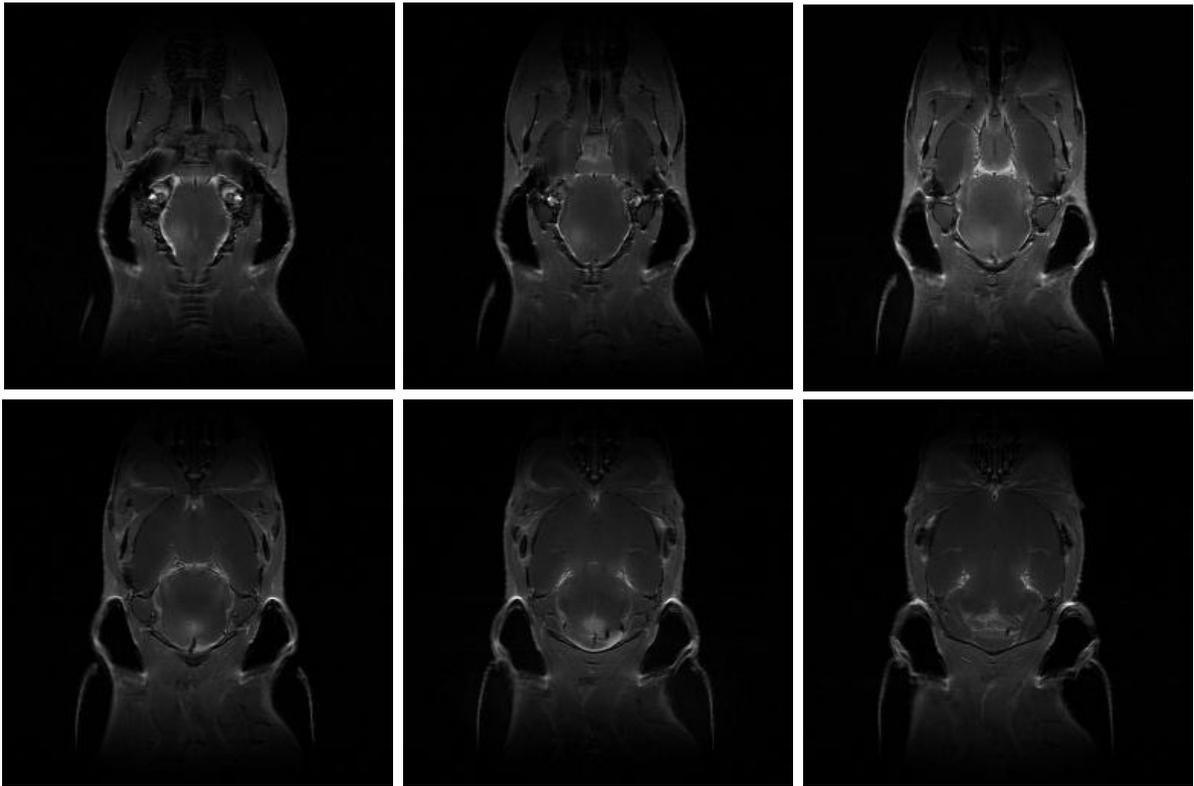


Abbildung 18: T1-gewichtetes MRT korrespondierend zur Histologie in Abb.19 mit Gadolinium-Austritt im Bereich des Cerebellums und des Hirnstamms, die eng mit den in Abb.19 histologisch dargestellten inflammatorischen Infiltraten korrespondiert.

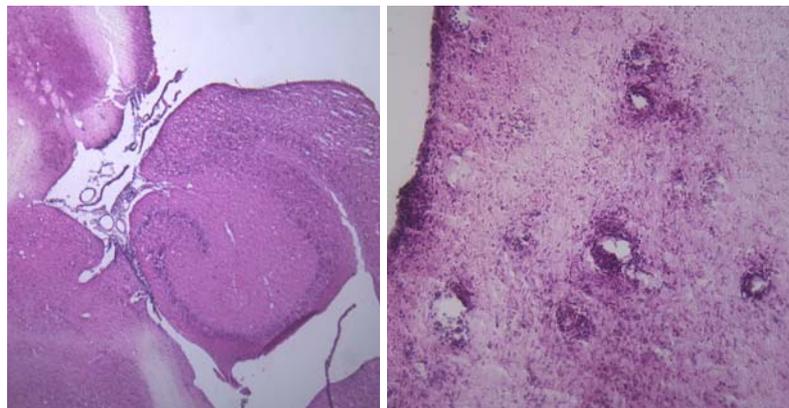


Abbildung 19: In der H&E-Färbung lassen sich unmittelbar nach dem MRT periventriculär, perivaskulär und cerebellär Entzündungszeichen mit Leukozyteninfiltration nachweisen.

5.4. Intrathekale Injektion beladener Zellen

Um kernspintomographisch die Signalauslöschung der mit VProt beladenen T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurde die kontrollierte intrathekale Applikation von T-Zellen durchgeführt. Diese Methode erlaubt die intracerebrale Injektion einer zuvor bestimmten Zellzahl. Im entsprechenden T2*-gewichteten Bild kann die Signalauslöschung beurteilt werden, die von den T-Zellen ausgeht und mit der Eisenbeladung korreliert.

Dazu wurde bei den Mäusen eine Läsion im entorhinalen Kortex (ECL) gesetzt. Die Injektionen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Jana Glumm, Institut für Neuroanatomie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt [62]. In die Läsion wurde dann vorsichtig eine definierte Anzahl Zellen injiziert. Die Mäuse standen unter ständiger Beobachtung und im Verlauf wurden T2*-gewichtete MRT-Scans angefertigt. Die Abb.20 zeigt die MRT-Aufnahmen und histologischen Bilder einer Maus, der 50 000 T-Zellen in die ECL injiziert wurden, die zuvor 10h nach der oben beschriebenen Methode mit 1 mM VProt inkubiert wurden. Der 2h post injectionem angefertigte Scan zeigt im Bereich der ECL eine deutliche hypointense Läsion. Diese ist jedoch möglicherweise durch ein Artefakt überlagert, bedingt durch vom Eingriff verursachte kleinste Lufteinschlüsse. Eine ähnliche Signalauslöschung zeigte sich in der Kontrolle einer Maus, der reines PBS in die ECL injiziert wurde. Doch wie in Abb 20 B zu sehen, verschwindet dieses Signal nach 24h. Nun scheint nur noch der Effekt durch die applizierten T-Zellen für die Hypointensität im Bereich der ECL verantwortlich zu sein.

Unmittelbar nach dem Scan wurden die Mäuse perfundiert und die Gehirne für die Histologie aufbereitet. In Berliner Blau gefärbten Schnitten zeigte sich eine Kollokalisierung der hypointensen Läsion mit den eisenbeladenen Zellen, die in Abb.20 C und D zu sehen sind. Es ist also möglich, mit VProt beladenen Zellen ein bildgebendes Signal zu erzeugen. In Abhängigkeit von den Untersuchungsbedingungen waren im Experiment 50 000 T-Zellen ausreichend für eine deutliche und anhaltende Signalauslöschung.

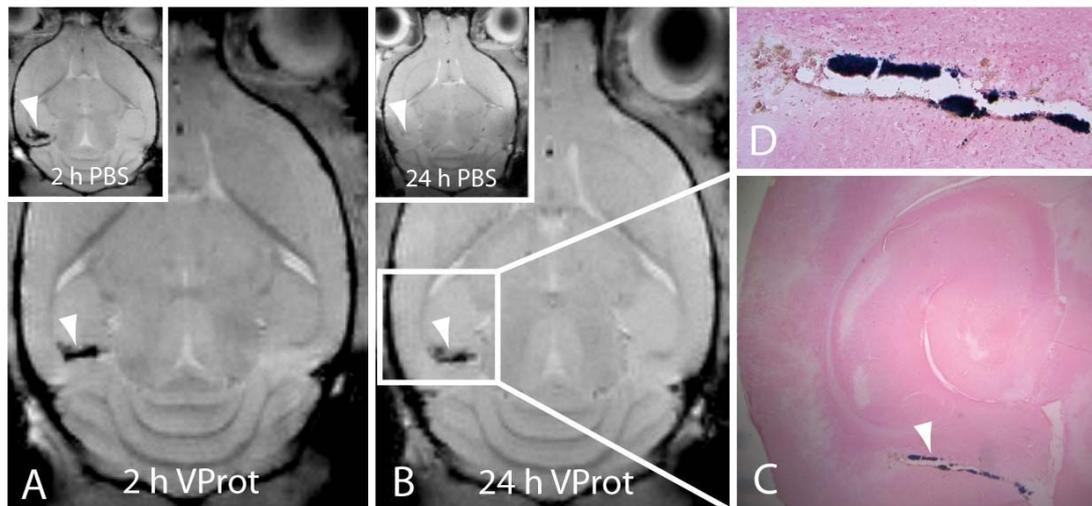


Abbildung 20: Nach der intrathekalen Injektion von 50 000 T-Zellen (entorhinale Kortexläsion, ECL) konnte im T2*-gewichteten MRT nach 2h und 24h ein hypointenses Signal gleicher Lokalisation detektiert werden. In den korrespondierenden histologischen Schnitten gelang in der Berliner-Blau-Färbung der Nachweis von Eisen-beladenen Zellen.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Beladung mit VProt der mit nativem VSOP C200 überlegen ist. Ferner war es möglich, T-Zellen *in vitro* mit dem mit Protamin konjugierten VSOP effektiv zu beladen. Dies zeigten relaxometrische Daten, Eisenbestimmungen mittels Absorptionsspektrometrie, sowie histologische Auswertung. Auch die Verträglichkeit des magnetischen Nanopartikels in markierten Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie belegt werden. Die erhaltene Funktion enzephalitogener T-Zellen konnte weiterhin durch Induktion einer passiven EAE in Mäusen durch Injektion beladener enzephalitogener T-Zellen nachgewiesen werden. Die intrathekale Injektion dieser mit VProt beladenen Zellen ermöglichte schließlich eine erste kernspintomographische Visualisierung der T-Zellen *in vivo*.

6. Diskussion

6.1. Methode der Zellverfolgung

Die Entwicklung neuer Methoden der zellulären Bildgebung hat in den letzten Jahrzehnten durch den technischen Fortschritt zunehmend an Bedeutung gewonnen. Einige Methoden bedienen sich verschiedener Fluoreszenzverfahren. Durch die Kopplung an Fluorophore [63-65] oder der Integration von Luziferase ins Wirtsgenom im Rahmen der sogenannten Biolumineszenzverfahren [66;67] können Zellen nicht-invasiv dargestellt werden. Beide

Verfahren ermöglichen jedoch eine geringere Auflösung als das MRT und die Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe kann mit Phototoxizität einhergehen. Ferner ermöglichen diese Verfahren kein Eindringen in tiefer liegende Gewebeschichten [68].

Der Einsatz von PET oder SPECT zur Visualisierung von Zellen bietet eine geringere Auflösung als das MRT, aber dafür höhere Spezifität der Radioliganden [69-71].

Trotz einer Reihe neu entwickelter Visualisierungsmethoden mit der Möglichkeit, Immunzellen im Organismus zu verfolgen, bleibt die Magnetresonanztomographie derzeit das wichtigste Werkzeug zur Beobachtung der zeitlichen und örtlichen Migration beladener Zellen *in vivo*. Es handelt sich hierbei um eine gut verfügbare, nicht-invasive Methode, die somit auch für longitudinale Studien geeignet ist und anderen Methoden durch ihre nahezu unbegrenzte Eindringtiefe überlegen ist. Sie findet unter anderem ihren Einsatz in Studien zur Entwicklung von Tumoren [72], von ZNS-Läsionen bei Schlaganfall [73], zur Pathogenese der EAE [74-76] oder auch zu zukünftigen Stammzelltherapien bei Myokardinfarkt [77;78]. Um solche Zellpopulationen *in vivo* mittels MRT zu verfolgen, werden sie z.B. mit magnetischen Nanopartikeln beladen. Eine Grundvoraussetzung für die effektive Markierung einzelner Zellen zum Einsatz beim *in vivo* Zelltracking ist somit die Entwicklung magnetischer Eisenoxidpartikel, die einen hohen Weichteilkontrast aufweisen. Magnetische Nanopartikel sind dazu in der Lage, ausgeprägte Suszeptibilitätseffekte in T2- und T2*-gewichteten MRT-Sequenzen zu erzeugen und werden meist gut von den markierten Zellen und dem Empfängerorganismus toleriert [82]. Mit der Entwicklung von SPIO standen erstmals Kontrastmittel zur Verfügung, die in T2*-gewichteten Sequenzen sehr sensitiv detektiert werden können und dadurch neue Möglichkeiten der zellulären Bildgebung eröffneten [74;83-85].

In der Vergangenheit wurden zunächst Studien zur Beladung und Verfolgung von Makrophagen durchgeführt, da diese aufgrund ihrer phagozytotischen Kapazität große Mengen an Kontrastmittel aufnehmen können. Diese beladenen Makrophagen konnten schon in einem EAE-Modell im ZNS nachgewiesen werden [86]. Auch Stammzellen eignen sich für eine effiziente Aufnahme von Eisenpartikeln. Beispielsweise wurde so die Verteilung und Lokalisation mesenchymaler Stammzellen bei der Reparatur von Myokardinfarkt induzierten Schäden mittels MRT verfolgt [87]. Ein weiterer Ansatz ist die Erprobung einer stammzellbasierten Therapie mit markierten Lymphozyten in einem Tumormodell [88]. Jüngst wurden sogar humane neuronale Progenitorzellen mit SPIO markiert und konnten somit im MRT verfolgt werden [89].

Der Fokus der hier vorliegenden Arbeit liegt auf der Optimierung der Beladung von T-Zellen. Die zunehmend anerkannte Rolle von T-Zellen in der Pathogenese vieler verschiedener Krankheitsbilder, die bis vor kurzem noch keinen Zusammenhang mit Neuroinflammation vermuten ließen, wie dem Morbus Alzheimer [90] oder Schlaganfall-Erkrankungen [5;91;92], führen zu einer immer größer werdenden Nachfrage an Methoden zur *in vivo* Verfolgung von T-Zellen. Die Beladung immunologischer, nicht-phagozytierender Zellen, wie den Lymphozyten, bietet jedoch eine besondere Herausforderung und stellt Wissenschaftler seit Jahrzehnten auf die Probe. Denn im Gegensatz zu Zellpopulationen wie Makrophagen, die Nanopartikel phagozytieren, nutzen nicht-phagozytierende Zellen den Mechanismus der Endozytose, welche eine wesentlich geringere Aufnahme magnetischer Nanopartikel ermöglicht. Daher ist es bisher nur wenigen Arbeitsgruppen gelungen, eine effiziente Markierung und Verfolgung der Zellen *in vivo* zu gewährleisten. Molekularbiologische Verfahren wie z.B. die Elektroporation sind hier zwar schon eingesetzt worden [79;80], Langzeiteffekte auf Zellfunktion und -vitalität sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt und lassen in ersten Untersuchungen vermehrte Zelllyse erkennen [81]. In einem Rattenmodell konnte die Migration intravenös injizierter T-Zellen in den Hoden verfolgt werden [93]. Lewin et al. und Gareau et al. generierten hypointense Signale mit 50-100 magnetisch markierten Zellen, die ca 10-30pg SPIO enthielten [94;95]. Anderson et al. postulierte eine Zahl von 200 T-Zellen zur Visualisierung von EAE-Läsionen [96], wohingegen Kircher et al. eine Grenze von ca. 3 CLIO-beladener Lymphozyten pro Voxel in seinem experimentellen *in vivo* Modell als untere Zellgrenze beschrieb [97]. Die Beladung mit CLIO-Tat Partikeln ermöglichte weiterhin die Visualisierung der T-Zell Migration zur Milz [98], sowie in einem Tumormodell [97]. Hier wirkte das vom HI-Virus entliehene Tat-Protein als ein Shuttle für die Aufnahme der multipel vernetzten magnetischen CLIO-Partikel in die Zelle. Auch von einer anionischen Zitrahülle umgebene Partikel konnten schon eingesetzt werden, um in einem Modell die Lymphozyten in einem Tumor bei einer Abstoßungsreaktion zu beobachten [99]. Im Gegensatz hierzu stehen in gewisser Weise die Ergebnisse von Moore et al., die durch die Injektion von mit PLL-gekoppelten Eisenoxiden beladene T-Zellen lediglich eine diffuse Hypointensität des Pankreas in T2*-gewichteten Sequenzen erreichten [100]. Weitere Berichte liegen über den *ex vivo* Nachweis einzelner markierter Zellen im MRT vor [101]. Doch die Methoden und die bisher entwickelten Partikel haben sich bisher als unzureichend erwiesen und schließen nach wie vor noch ein breites Anwendungsspektrum aus.

6.2. Beladung mittels Very Small Iron Oxide Particles (VSOP)

Die in dieser Arbeit eingesetzten VSOP-Partikel gehören einer neuartigen Gruppe von magnetischen Nanopartikeln an, die nicht nur durch ihre geringe Größe mit einem Gesamtdurchmesser von lediglich 8-10 nm, sondern auch durch ihre innovative Umhüllung aus Zitrat, welche die Aufnahme in Zellen vereinfachen soll, besticht. Denn die Aufnahme von Eisenoxidpartikeln in Zellen ist von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren abhängig. Die Größe der Partikel, das Coating, das eingesetzte Transfektionsagens, das Kulturmedium, Zell- und Partikelkonzentration, Inkubationszeit, und Temperatur sind wichtige Faktoren, die während der Zellbeladung optimiert werden müssen. Wir haben dies berücksichtigt und die Parameter variiert, um die optimalen Konditionen für das Beladen zunächst von HeLa-Zellen zu finden, die ebenso wenig Phagozytoseeigenschaften aufweisen. Bei Inkubation mit nativen VSOP-Partikeln konnte allerdings nur eine geringe Aufnahme des Eisens beobachtet werden. T2-Relaxationszeiten zeigten nur einen geringen Abfall im Vergleich zum Kontrollwert und in lichtmikroskopischen Aufnahmen konnten in Berliner Blau gefärbten Proben nur wenige intrazelluläre Partikel dargestellt werden. Weiterhin fiel auf, dass auch bei Beladung mit 1 mM VSOP eine Vitalität der Zellen von über 95% zu verzeichnen war. Dies steht im Einklang mit verschiedenen Untersuchungen zur Verträglichkeit von VSOP. Diese zeigten bisher lediglich einen transienten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies, der jedoch keine längerfristigen Auswirkungen auf Zellvitalität und -differenzierung hatte [102-104].

Bei der Beladung von T-Zellen mit VSOP wurden die Partikel ebenfalls nur in geringem Umfang aufgenommen. Lichtmikroskopische Bilder, Phantommessungen, sowie Eisenbestimmungen mittels Atomabsorptionsspektrometrie lieferten ein ähnliches Bild und unterstützten die Ergebnisse aus relaxometrischen Aufzeichnungen. Auch für T-Zellen konnte in der Durchflusszytometrie kein Abfall der Zellvitalität im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden. In zukünftigen Studien mit VSOP-Beladungsprotokollen muss ein besonderes Augenmerk auf diesem Aspekt liegen, denn die Verträglichkeit der eingesetzten Partikel ist in Hinblick auf einen späteren Einsatz im humanen System zur intravenösen Applikation oder magnetischen Zellmarkierung *ex vivo* von Bedeutung.

6.3. Beladung unter Einsatz von VProt

Anhand der mit VSOP erreichten, zunächst wenig zufriedenstellenden Ergebnisse konnte keine ausreichende Beladung von T-Zellen mit nativem VSOP erzielt werden. Es war also nötig, eine Modifikation der Partikel durchzuführen, um ihre Aufnahme von den Zielzellen zu erleichtern.

Es gibt verschiedene Methoden, um die Struktur oder Zusammensetzung von magnetischen Nanopartikeln zu verändern, so dass Oberflächeneigenschaften, elektrostatische Kräfte usw. optimiert werden können, um eine Aufnahme der Partikel in die Zellen zu favorisieren. Neben der direkten Veränderung der zu applizierenden Partikel werden auch sogenannte Transfektionsagenzien (TAs) eingesetzt. Durch die Komplexierung mit Transfektionsagenzien soll eine verbesserte Aufnahme verschiedener Partikel oder Substanzen vor allem in nicht-phagozytierende Zellen gewährleistet werden, ohne die eigentliche Struktur der eingesetzten Partikel verändern zu müssen. Es gibt ein weites Spektrum verschiedener Transfektionsagenzien. Hierzu gehören z.B. virale Proteine [95;98] oder lipidgebundene Transfektionsagenzien. Diese Methoden sind zwar effizient, aber oft weder frei verfügbar, noch von den Gesundheitsbehörden zugelassen [105], da sie Zellviabilität und Proliferation vermindern können. So zeigen lipidgebundene Transfektionsagenzien wie das Lipofectamine hohe Toxizität in niedrigen Dosen, sowie eine Reduktion der Zellproliferation, wohingegen polykationische Substanzen, wie das Polyamin HMW-PLL, eine niedrige Toxizität ohne signifikanten Verlust der Zellproliferation bei effizienter Aufnahme durch Zellen zeigen und daher häufiger als TA verwendet werden [106-108]. Der große Anteil der TAs ist noch nicht für den Einsatz im humanen Organismus zugelassen, da die meisten einen toxischen Effekt zeigen, wenn sie in unkomplexierter Form verabreicht werden [109]. In letzter Zeit hat jedoch ein neuartiges polykationisches TA die Aufmerksamkeit der Wissenschaftler erlangt, das sogenannte Protaminsulfat, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Um die Aufnahme der VSOP-Nanopartikel durch Zellen zu verbessern, wurden diese an Protaminsulfat gekoppelt. Das daraus resultierende VProt besitzt einen Gesamtdurchmesser von ca. 25 nm und wurde in dieser Arbeit eingehend auf seine Zellbeladungsfähigkeit untersucht. Protaminsulfat ist ein polykationisches, niedermolekulares (ca. 4000 Da) Molekül, welches in der Klinik als Antidot bei heparininduzierter Antikoagulation zugelassen ist [110;111], aber auch zur Herstellung verbesserter Formeln von Insulin, wie dem NPH-Insulin, eingesetzt wird. Es wird aus Fischrogen extrahiert und für die kompakte Konfiguration der DNA benötigt. Durch seine argininreichen Domänen (ca. 60-70%) eignet sich das Protamin auch als sogenanntes Transfektionsagens zur Einschleusung von Partikeln in die Zellen [112]. Polykationische Peptide wie das Protamin verleihen den konjugierten Nanopartikeln eine positive Oberflächenladung, die die Anheftung und Aufnahme über die Plasmamembran der Zellen ermöglichen soll. Die Aufnahme solcher Partikel erfolgt meist über endozytotische Mechanismen. Speziell die Makropinozytose gilt als Aufnahmemechanismus für Proteine mit argininhaltigen Domänen, wie dem Polyarginin, HIV-Tat-Protein, Liposomen und auch dem Protaminsulfat [81]. Dabei bildet

die Zelle Membranprotrusionen aus, die die Partikel umschließen und über Bildung eines sogenannten Makropinosoms ins Zytoplasma einschleusen (Abb.21). Dies macht aus Protaminsulfat ein geeignetes Transfektionsagens zur Einschleusung von Substanzen, Partikeln oder auch Peptiden in die Zellen und liefert somit ein breites Anwendungsspektrum.

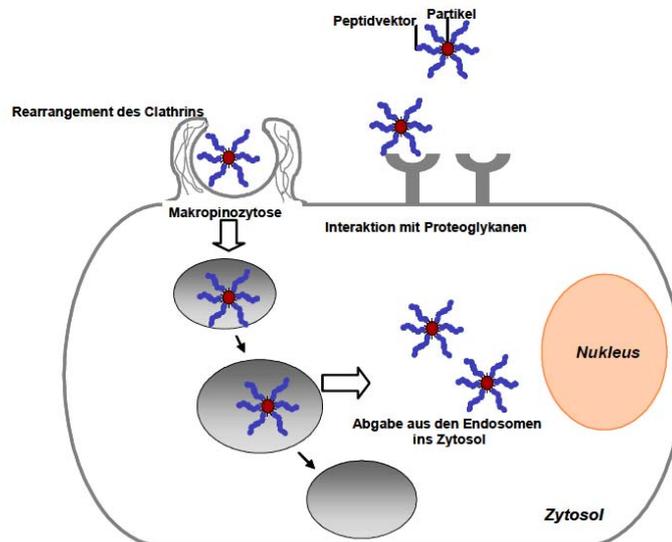


Abbildung 21: Clathrin-vermittelte Makropinozytose als Aufnahmemechanismus für Proteine mit argininhaltigen Domänen. Diese Abbildung ist modifiziert nach Futaki et al. [113].

Dieses schließt die Herstellung nicht-viraler Vektoren zur Transfektion von DNA in Zellen ein [114;115]. Mit Protaminsulfat komplexierte DNA konnte ca. 100 Mal effektiver in Zellen transfiziert werden, als mit PLL komplexierte DNA [116]. Ferner wurde die Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden in den Nukleus bereits in Modellen mit Blasen- oder Prostatakarzinom erprobt [117]. Auch die nukleäre Translokation des Östrogenrezeptors in Mammatumoren der Maus [118] ist schon gelungen. Das Ziel des Großteils einiger dieser Studien ist letztendlich die Entwicklung neuer Strategien für die intrazelluläre Medikamentenaufnahme [119]. Protamin besitzt zudem eine einzige reaktive Aminogruppe, das N-terminale Prolin, sowie eine Carboxylgruppe am C-Terminus. Dies fasilitiert die gezielte Anheftung von Fluorochromen oder Medikamenten an das Protein und liefert damit ein weiteres Attribut dieses TAs.

Auch in der Domäne der magnetischen Zellmarkierung hat sich Protaminsulfat als TA schon mehrfach bewährt. Es zeigte sich für die Beladung von humanen mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen mit Eisenoxiden dem PLL als Transfektionsagens überlegen [106] und ermöglichte ein effektiveres Zelllabelling von mesenchymalen Stammzellen als die

Konjugation mit PLL oder der Einsatz der Elektroporation (ELP), ohne einen Einfluss auf Vitalität, Proliferation oder Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten zu zeigen [120]. Auch Arbab et al. konnten zeigen, dass die Beladung mit Protaminsulfat gekoppelten Eisenoxiden weder die Funktion, noch die Differenzierung von hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen beeinträchtigte [121]. Dies legitimiert die Wahl von Protaminsulfat als TA der Wahl zur Kopplung an VSOP zur Synthese eines verbesserten Partikels, dem VProt.

6.3.1. HeLa-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob nach der Konjugation mit Protamin tatsächlich eine Verbesserung der Aufnahmefähigkeit der VSOP-Partikel eintritt, wurden zunächst HeLa-Zellen untersucht. Diese sind Zellen einer humanen Zervixkarzinomzelllinie, die wissenschaftlich etabliert ist und häufig in der Domäne der Zellmarkierung eingesetzt wird, um neue Partikel und deren Effizienz zu überprüfen [109;112;122-124]. Bei einer Inkubationszeit von 6h mit 1 mM VProt konnte, gemessen anhand der Reduktion der T2-Zeit, eine Verbesserung der Beladung um 60,5% im Vergleich zur Inkubation mit gleicher Konzentration VSOP erreicht werden. Besonders eindrücklich ist der Vergleich verschiedener Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 4h. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 0,05 mM VProt ausreicht, um eine Verringerung der T2-Zeit um insgesamt 57,6% im Vergleich zu unbeladenen Kontrollzellen zu erreichen. Die mit 1 mM VProt inkubierten Zellen erreichten hier sogar einen Abfall der Relaxationszeiten um bis zu 95,7%. Diese Ergebnisse scheinen auch die mittels AAS ermittelten Werte der Eisenbestimmungen widerzuspiegeln. Bei der Beladung mit VProt konnte hier eine Eisenaufnahme von bis zu 93,59 pg pro Zelle verzeichnet werden. Dies stellt eine signifikante Verbesserung der Partikel Aufnahme dar, im Vergleich zu den Ergebnissen, die bis dato durch andere Arbeitsgruppen erzielt werden konnten. Arbab et al. erreichte beim Einsatz des Transfektionsagens Superfect zwar einen Eisengehalt von 15,18 pg Fe/Zelle, musste dafür jedoch eine hohe Toxizität für die Zellen berücksichtigen, die zu einem irreversiblen Zellarrest führte [109]. Beim Einsatz von FE-PLL konnte er eine Aufnahme von 10,25 pg/Zelle erreichen. Hierbei wiesen beladene mesenchymale Stammzellen eine Mortalität von 40% auf, wohingegen HeLa-Zellen keine Alterationen im Vitalitätsanteil aufwiesen. Dabei kann man spekulieren, ob die größere Toxizität der Partikel für mesenchymale Stammzellen auf eine erhöhte proliferative Aktivität der HeLa-Zellen zurückzuführen ist oder vielleicht eine größere Kapazität zur Metabolisierung des freien Eisens dazu beiträgt. Es konnte gezeigt werden, dass maligne Zellen

im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen die Eigenschaft besitzen, den schädlichen Effekt freier Radikale auf die DNA im Nukleus zu neutralisieren [125-127]. Auch dies könnte ein beteiligter Mechanismus sein. Sicher ist jedoch, dass auch in dieser Arbeit HeLa-Zellen nach Inkubation mit VProt einen exzellenten Vitalitätsanteil aufwiesen, der durchschnittlich über 97% lag.

Weiterhin konnte der Nachweis erbracht werden, dass nicht nur die nativen magnetischen Nanopartikel VSOP keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausüben, sondern dass dies auch für die mit Protamin gekoppelten Partikel VProt zutrifft. Dies steht im Einklang mit Arbeiten von Pawelczyk et al. [124], in denen gezeigt werden konnte, dass FE-Pro Labelling für Zellen keine Toxizität aufweist. Das FE-Pro Labelling von HeLa-Zellen und mesenchymalen Stammzellen resultierte zwar in einem transienten Abfall von TfR-1 mRNA- und Proteinlevel, sowie einem transienten Anstieg der mRNA- und Proteinlevel des Ferritins, verursachte jedoch keinen Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies und damit keine Änderung in MTT-Assays. Untermuert werden diese Ergebnisse durch Studien von Arbab et al., in denen eine Beeinträchtigung der Funktion oder Differenzierung von hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen bei Beladung mit FE-Pro ausgeschlossen werden konnte [106]. Ein wichtiger Bestandteil der Forschung im Bereich der Zellbeladung ist sicherlich eben diese Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Kontrastmittel auf verschiedene Parameter, wie der Zellvitalität, Zelldifferenzierung und -proliferation. Für einige der eingesetzten Partikel wurden schon Auswirkungen auf diese Parameter beschrieben, wie beispielsweise eine verminderte suppressorische Funktion CD25⁺ regulatorischer T-Zellen [128].

6.2. T-Zellen

Auf diesen im HeLa-Zellkultursystem erhobenen Daten basierend, wurde das Protokoll zur Beladung von T-Zellen erstellt und optimiert, um auch hier bei niedrigen Inkubationszeiten und -konzentrationen eine möglichst effiziente Eisenaufnahme zu ermöglichen. So konnte schon nach 10h Inkubation mit 0,5 mM VProt im Durchschnitt eine 35,52% stärkere Verkürzung der T2-Zeit im Gegensatz zum Versuchsansatz mit gleicher Konzentration von VSOP verzeichnet werden, die in Ansätzen bis zu 62% erlangte. Die Eisenaufnahme der T-Zellen konnte durch eine Beladung mit 1 mM VProt auf bis zu 9,99 pg gesteigert werden. Dies stellt eine wesentliche Verbesserung im Vergleich zu den üblicherweise erreichten intrazellulären Eisenkonzentrationen bei der Beladung von T-Zellen dar. Diese liegen bei ca. 1-5 pg Fe pro T-Zelle, wohingegen bei der Beladung mit phagozytierenden Zellen Aufnahmekapazitäten von ca. 20 pg beobachtet

werden [81]. Eine weitere Methode, die auf den Einsatz von Antikörpern zurückgreift, ermöglichte Shapiro et al. die überwiegend extrazelluläre Beladung mit Streptavidin-beschichteten MIONs (monocrystalline iron oxide particles) und erreichte somit eine extrazelluläre Beladung von 60 pg Eisen pro Zelle [129]. Doch trotz dieser Fortschritte bleiben die Beladung und *in vivo* Verfolgung von nicht-phagozytierenden Zellen wie T-Zellen weiterhin eine Herausforderung, denn Methoden wie diese zeigen meist einen nachteiligen Effekt in Bezug auf Zellvitalität, Zellproliferation oder -differenzierung oder bieten nach wie vor nur eine unzureichende Beladung der T-Zellen, sodass die Visualisierung einzelner Zellen nicht möglich ist. Die Beladungen mit VProt hingegen gingen mit einer sehr gut erhaltenen Vitalität der Zellen einher, die für Versuchsansätze mit VSOP und VProt gleichermaßen über 97% lagen. Somit erfüllten auch die VProt-Partikel wichtige Kriterien für den *in vivo* Einsatz der Methode.

6.4. *In vivo* Applikation

6.4.1. Induktion der EAE

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis ist ein anerkanntes Tiermodell der MS. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Grenzen der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Mausmodell EAE noch nicht vollständig geklärt sind. Die EAE unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von der MS. So ist sie eine künstlich induzierte Erkrankung, die unter anderem auf der Applikation von Substanzen basiert, die die Durchlässigkeit der BHS steigern, sogenannter Adjuvantien, wohingegen die MS eine spontan auftretende Erkrankung ist, bei der der Pathomechanismus der erhöhten Durchlässigkeit der BHS noch nicht bekannt ist. Ferner beschränkt sich die autoimmune Reaktivität der T-Zellen in Modellen der EAE auf jeweils nur ein Myelinpeptid, wie dem MBP, dem MOG, oder dem in dieser Arbeit angewendetem PLP. Dies kontrastiert die Vielfältigkeit der autoimmunen Komponenten in der Pathogenese der MS. Obwohl der Einsatz der EAE als Modell der MS zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien aus diesen Gründen nicht unumstritten ist [61;130], hat sich dieses Modell mehrfach verdient gemacht. So konnten immerhin basierend auf den Ergebnissen aus diesem Tiermodell die Zulassung diverser anti-inflammatorischer Substanzen, wie dem Natalizumab oder dem Copaxone, erwirkt und neue Aspekte zur Pathogenese der MS, sowie potentielle Surrogatmarker, von Ergebnissen aus diesem Modell abgeleitet werden [60;131]. Trotz der hier erwähnten Limitationen hat das Modell der passiven EAE also bereits einen signifikanten Beitrag zur Aufklärung der Rolle der T-Zellen in der Pathogenese der MS, aber auch im Design neuer therapeutischer Strategien, geleistet [132;133].

Zur Klärung der Frage nach der erhaltenen Funktionalität der mit VProt beladenen enzephalitogenen T-Zellen, wurde daher in der hier vorgelegten Arbeit das Tiermodell der passiven EAE bei SJL/J- Mäusen eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Mäuse nach Applikation beladener T-Zellen klinische Symptome einer EAE entwickelten. Die Progression dieser Klinik entsprach dabei dem zuvor beschriebenen Verlauf im Modell der EAE [32]. Dies spricht für eine erhaltene Enzephalitogenität der mit VProt beladenen Zellen und deutet auf keine bedeutenden Funktionsalterationen hin.

Die Kinetik von Permeabilitätsveränderungen der BHS nach dem Transfer enzephalitogener T-Zellen in SJL/L-Mäuse zeigte in einer systematischen Untersuchung, dass das räumliche Verteilungsmuster der Läsionen im ZNS der Maus, sowie die Präsenz klinisch blander Läsionen, der multifokalen Verteilung der Läsionen entspricht, die bei MS-Patienten beobachtet werden kann [32]. Es konnte also mitunter eine ausgeprägte subklinische Krankheitsaktivität im ZNS festgestellt werden. Die Verteilung des Gadolinium-Leakage beschränkte sich überwiegend auf den Hirnstamm, periventrikuläre Regionen, und das Cerebellum. Das im MRT beobachtete Leakage-Muster des Gadolinium korrelierte somit ebenfalls mit dem bei EAE überwiegend beschriebenen Muster. Diese Befunde unterstreichen wiederum die erhaltene Funktionalität der T-Zellen, da sie offenbar an der gleichen Lokalisation Undichtigkeiten der BHS hervorrufen, wie unbeladene, enzephalitogene T-Zellen [32]. Darüberhinaus konnte nach histologischer Aufbereitung des ZNS-Gewebes eine Übereinstimmung zwischen den Bereichen des Gd-Durchtrittes und ausgeprägten inflammatorischen Zellinfiltraten in der H&E-Färbung aufgezeigt werden.

6.4.2. MRT

Die Beladung von Zellen ist mit unterschiedlichen Methoden möglich. Die Markierung von Zellen mit Fluorochromen ermöglicht z.B. lediglich die Abbildung eines spezifischen Zeitpunktes durch histologische Aufarbeitung oder weitere invasive Verfahren. Der Einsatz von Eisenoxiden hingegen erlaubt es, Zellen zu beladen und diese mittels nicht-invasiver bildgebender Verfahren, wie dem MRT, über längere Zeit zu verfolgen. Durch die Anwendung von T2*-Sequenzen wird die Signalintensität der Gewebe, die Eisenoxide enthalten, hypointens. Daher können beladene Zellen in T2*-gewichteten Sequenzen als hypointenses Signal detektiert werden, wenn die Zellzahl pro Voxel, sowie der Eisengehalt pro Zelle, ausreichend sind. Um die Diskrimination zwischen partikelinduzierten Signalen einerseits und Blutflussartefakten und Gefäßen andererseits zu gewährleisten, welche sich in T2*-gewichteten Sequenzen ebenfalls

hypointens darstellen, wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Isofluran und 100% Sauerstoff anästhesiert. Durch Verhinderung der Dilatation zerebraler Gefäße wurden so Flussartefakte verhindert und die Attribution des Signalverlustes zu beladenen Zellen im Gewebe ermöglicht [134]. Das signalgebende Potential der mit VProt beladenen T-Zellen *in vivo* im MRT konnte in dieser Arbeit gesichert werden. T-Zellen erzeugten im T2*-gewichteten MRT ein ausgeprägtes hypointenses Signal nach intrathekaler Injektion. Dieses signalgebende Potential, die Fähigkeit zur Auslösung einer EAE, sowie die effektive Beladung der applizierten T-Zellen sind essentielle Faktoren, um eine *in vivo* Bildgebung nach intravenöser oder intraperitonealer Applikation zu ermöglichen. Es sind jedoch nicht die einzigen Faktoren, die eine Rolle spielen. Die T-Zellen bleiben trotz Beladung enzephalitogen, doch wieviel VProt die Zellen *in vivo* tatsächlich beinhalten bleibt spekulativ. Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass noch nicht bekannt ist, ob ausschließlich diejenigen Zellen enzephalitogen bleiben, deren VProt-Gehalt durch Dilution nach Zellteilung oder durch initial mangelnde Beladung, zu gering ist, um ein sichtbares Signal in T2*-gewichteten MRT-Aufnahmen zu verursachen. Enzephalitogene T-Zellen könnten initial weniger gut beladen sein oder durch vermehrte Teilungsfähigkeit mehr VProt aus dem Zytoplasma eliminieren. Dies würde dazu führen, dass die exogen zugeführten, ins ZNS eingewanderten enzephalitogenen T-Zellen eine zu geringe Beladungsdichte aufweisen, um eine genügende Signalintensität im MRT zu erreichen. Ein *in vitro* Proliferationsassay mittels CFSE könnte hier Aufschluss bringen. Doch nicht nur die Beladungsdichte, sondern auch die lokale Zelldichte beladener Zellen könnten die Signalgebung beeinflussen. Noch wissen wir nicht, wieviele beladene Zellen nötig sind, um ein sichtbares Signal durch VProt beladene Zellen zu erzielen. Auch eine zu diffuse Verteilung der Zellen im ZNS könnte zu einem Ausbleiben des Signals im MRTs führen. Wenn die Migration nur weniger Zellen ins ZNS ausreicht, um eine EAE zu induzieren, ist es ferner möglich, dass zu wenige T-Zellen ins Parenchym einwandern, um ein Signal zu erzeugen. Da die Pathogenese der EAE nicht hinreichend geklärt ist, könnten wir noch nicht sagen, ob die im ZNS nachgewiesenen Zellen, die die EAE induzieren, die *ex vivo* beladenen injizierten T-Zellen oder endogene T-Zellen darstellen, die womöglich von den exogen zugeführten T-Zellen peripher aktiviert wurden.

Dies sind wichtige Parameter die berücksichtigt werden müssen, wenn es in Zukunft darum geht, die markierten Zellen *in vivo* einzeln zu verfolgen und sichtbar zu machen.

Ein weiterer Parameter, der bei dieser Untersuchung berücksichtigt werden muss, ist die Zeit zwischen Applikation der Zellen und der Suche nach ihnen mittels Bildgebung, denn noch ist nicht klar in welchem zeitlichen Zusammenhang Gd-Leakage und Zellinfiltration stehen. Unter Einsatz von VSOP konnte bereits gezeigt werden, dass Gd-anreichernde Läsionen, die für einen

BHS-Schaden sprechen, dem Auftreten neurologischer Symptome vorausgingen [32]. Dies stützt die These, dass die Korrelation der klinischen Verläufe, sowohl bei der EAE, als auch bei der MS, mit den MRT-Befunden kaum gegeben ist und wir nicht wissen, wieviel Zeit zwischen Infiltration des Parenchyms durch T-Zellen und der klinischen Manifestation der Erkrankung vergeht. Auch Arbeiten von Floris et al. suggerieren, dass das Auftreten von Undichtigkeiten der BHS bei Ratten an einer sehr frühen Stelle im Krankheitsprozess der EAE zu stehen scheint und noch vor der Infiltration monozytärer Zellen eintritt, die durch die Injektion von USPIOs sichtbar gemacht werden konnte. Die durch Gd-Austritt offenbarte erhöhte Permeabilität der BHS korrelierte hierbei allerdings mit dem Auftreten neurologischer Symptome [135]. Weitere Arbeitsgruppen bestätigen, dass die Infiltration monozytärer Zellen und der Zusammenbruch der BHS zwei zeitlich und örtlich unabhängige inflammatorische Prozesse sind [136;137]. Dousset et al. konnten diese Ergebnisse in einer MRT-Studie mit MS Patienten nachvollziehen [138]. Hier bestand teilweise eine Korrelation zwischen USPIO enthaltenden Läsionen und Gd-anreichernden Orten, diese konnten aber auch unabhängig voneinander auftreten. Dies zeigt, dass ein lokaler BHS-Schaden zunächst nicht mit einem Parenchymschaden einhergehen muss. Es zeigt weiterhin, dass eine Destruktion des ZNS-Gewebes nicht unbedingt von einer erhöhten Durchlässigkeit der BHS begleitet werden muss. Dies untermauert die Heterogenität der MS-Läsionen und die Komplexität der pathogenen Mechanismen die hinter der Erkrankung stehen. Auch in dieser Hinsicht ähneln sich die MS und ihr Mausmodell, die EAE.

Beim *in vivo* Einsatz im Mausmodell, der EAE, wird in Zukunft nicht nur das Gehirn, sondern auch das Rückenmark im Fokus stehen müssen, wenn es darum geht die Pathomechanismen der EAE aufzuklären. Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass ein Großteil des pathologischen Geschehens im Modell der passiven EAE (pEAE) sich auf Ebene des Rückenmarkes abspielt, im Gegensatz zur aktiven EAE (aEAE), wo der Fokus des Krankheitsgeschehens vor allem im Gehirn liegt [139]. In der EAE an SJL/J Mäusen wird, basierend auf den Ergebnissen neuropathologischer Studien, eine ascendierende Ausbreitung der Erkrankung angenommen, die vom sakralen Rückenmark aufsteigt [140;141]. Die Beobachtung der Einwanderung von T-Zellen ins Rückenmark könnte somit ein adäquater Endpunkt für weitere Studien sein. Dies setzt jedoch eine technische Ausstattung mit Rückenmarksspulen für das eingesetzte Kleintier-MRT voraus. Anderson et al. konnten zeigen, dass T-Zellen nach 6-9h Inkubation mit dextranbeschichteten Fe-PLL Partikeln im Rückenmark an EAE erkrankter Mäuse mittels MRT visualisiert werden konnten [96].

Fazit ist, dass histologische Methoden und die Kontrastmittelgabe im MRT nicht genügen, um die Fragestellung nach der Pathogenese der EAE und letztendlich der MS, aber auch weiterer

Erkrankungen zu klären. Daher ist dringend eine Verfeinerung der hier eingeführten Methode nötig, um die Prozesse auch auf zellulärer Ebene ergründen zu können. Diese Fragen gilt es in Zukunft zu klären. Diese Arbeit legt mit der Entwicklung einer neuen Beladungsmethode mit dem innovativen magnetischen Nanopartikel VProt den imminent wichtigen Grundstein für die Beantwortung dieser Fragen, sowie für die weitere Entwicklung dieser innovativen Technik zur *in vivo* Visualisierung einzelner Zellen im MRT.

7. Zusammenfassung

Die MS ist heute die häufigste diagnostizierte neuroinflammatorische Erkrankung. Obwohl die MS bereits 1868 erstmals von Jean-Marie Charcot beschrieben wurde, sind wir heute immernoch nicht dazu in der Lage, eine frühzeitige Diagnose der Erkrankung zu stellen, die eine frühere Initialisierung der Therapie erlauben würde. Neben der klinischen Untersuchung bildet die kernspintomographische Diagnostik den zweiten wichtigen Pfeiler zur Diagnostik und Kontrolle des Krankheitsverlaufes, sowie des Therapieansprechens der MS. Es ist daher von essentieller Bedeutung, mehr über die Korrelation von Klinik und inflammatorischer Aktivität im ZNS mit kernspintomographischen Befunden in Erfahrung zu bringen. Dazu ist es notwendig, Methoden zur Aufklärung der Pathomechanismen, die hinter der Erkrankung stehen, zu entwickeln. Auf zellulärer Ebene ist dies durch die *in vivo* Verfolgung markierter Immunzellen möglich. Eine effektive nicht-invasive Methode ist die Markierung der Zellen mit magnetischen Nanopartikeln und die sich anschließende Visualisierung mittels MRT. Obwohl bislang mehrere Versuche unternommen wurden, Lymphozyten *in vivo* zu verfolgen [79;93;96-99;142;143], gestalten sich die Internalisierung magnetischer Nanopartikel und damit auch die Bildgebung weiterhin schwierig. Doch die Nachfrage bezüglich neuer Methoden zur Verfolgung von Lymphozyten in lebendigen Organismen steigt stetig mit der zunehmenden Einsicht, dass Lymphozyten auch in der Pathogenese von Erkrankungen eine Rolle spielen, denen zuvor keine immunologische Komponente zugewiesen wurde, wie dem Morbus Alzheimer [144] oder dem Schlaganfall [5;91;145].

In dieser Arbeit wurden neuartige sehr kleine, mit Zitrat beschichtete magnetische Nanopartikel, sogenannte VSOP-Partikel, zur Beladung von enzephalitogenen T-Zellen eingesetzt. Diese sind kleiner als die üblicherweise eingesetzten, von Polymeren umhüllten, magnetischen Nanopartikel und erfahren zudem durch das Zitrat eine zusätzliche elektrostatische Stabilisierung, die die Labellingeigenschaften verbessert [56]. In verschiedenen Arbeiten konnte bisher gezeigt werden, dass natives VSOP zur Visualisierung von Makrophagen in einem Modell der zerebralen

Ischämie [57] und der EAE [32] eingesetzt werden konnte. Der Großteil der Arbeitsgruppen konzentriert sich auf die Markierung und Verfolgung solcher zur Phagozytose befähigten Zellen, da sie diese Partikel bereitwillig ingestieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Komplexierung von VSOP an Protaminsulfat sowohl die Beladung von HeLa-Zellen, als auch die von T-Zellen signifikant verbessert werden konnten. Bereits nach einer Inkubationszeit von 6h mit 1 mM VProt zeigten HeLa-Zellen eine ausgeprägte Eisenaufnahme, die sich in einem signifikanten Abfall der T2-Relaxationszeiten widerspiegelte. Dieser Abfall der Relaxationszeiten stellte eine um 60,3% stärkere Abnahme der Relaxationszeiten dar, als bei der Beladung von Zellen mit derselben Konzentration nativen VSOPs erreicht werden konnte. Dies bestätigt die effektivere Aufnahme der VProt-Partikel.

Daraufhin wurde ein Beladungsprotokoll für T-Zellen erstellt. Durch den Einsatz von VProt konnten nicht nur Inkubationszeit und Beladungskonzentration verringert werden, sondern auch die Eisenaufnahme der Zellen um ein Vielfaches im Gegensatz zur Beladung mit nativem VSOP verbessert werden. Dabei konnte eine signifikant verbesserte Aufnahme der VProt-Partikel in T-Zellen erzielt werden. Bei einer Inkubationszeit von 10h konnte bei Inkubation mit 1 mM VProt im Vergleich zur Beladung mit VSOP eine um 42% verkürzte Relaxationszeit erreicht werden, die als Surrogatparameter für die Menge aufgenommener magnetischer Eisenpartikel fungiert.

Dabei wurde großen Wert darauf gelegt, die intakte Funktionalität der markierten T-Zellen nachzuweisen. Dazu wurde der Versuch unternommen, mit beladenen enzephalitogenen T-Zellen eine EAE zu induzieren. Die Durchflusszytometrie zeigte für diese Zellen *in vitro* einen Vitalitätsanteil, der mit dem der Kontrollzellen vergleichbar war. Ferner entwickelten die Mäuse post injectionem eine EAE, deren klinischer Verlauf mit dem der Kontrollmäuse übereinstimmte. Ein weiterer wichtiger Parameter, die Verteilung des Gd-Leakage im T1-gewichteten MRT, entsprach ebenfalls dem von Kontrollmäusen. Beladene T-Zellen waren somit Dank ihres erhaltenen enzephalitogenen Potenzials weiterhin dazu in der Lage eine EAE auszulösen. Um den Beleg für das Vorhandensein der inflammatorischen Aktivität im ZNS zu führen, wurden histologische Verfahren herangezogen. Dabei konnte mittels Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung ein für die EAE als typisch geltendes Verteilungsmuster der Zellinfiltrate beobachtet werden, welches mit dem des Gadoliniumaustrittes übereinstimmte. Um der Frage nachzugehen, ob sich mit VProt beladene T-Zellen grundsätzlich im Gehirn mittels MRT visualisieren lassen, wurden diese intrathekal verabreicht. Unmittelbar nach der Applikation konnten in T2*-gewichteten Sequenzen ausgeprägte hypointense Signale nachgewiesen werden, die beweisend für das hohe signalgebende Potential der mit VProt beladenen T-Zellen *in vivo* ist.

Die im Rahmen dieser Dissertation erarbeitete Methode soll die Grundlage dafür schaffen, eine Antwort auf offene Fragen zur Pathogenese der MS zu finden. Sowohl der zeitliche Verlauf der Invasion des ZNS, als auch die räumliche Verteilung der pathogenen autoimmunen T-Zellen im ZNS und der Zusammenhang zu Permeabilitätsveränderungen der BHS sind Aspekte der Pathogenese, die es noch zu klären gilt. Dies könnte Implikationen für die Frühdiagnostik der Erkrankung, sowie für die Erstellung individueller Therapieprotokolle haben, die auf die verschiedenen Formen der MS abgestimmt werden könnten und den Einsatz neuer therapeutischer Ansätze ermöglichen würden.

Die Markierung und Verfolgung von Zellen des Immunsystems sind für eine Vielfalt von Erkrankungen ein Schlüsselfaktor zur Aufklärung der Pathomechanismen und damit zur Erstellung neuer Therapeutika. Neben dieser Anwendung in Feldern mit immunologischem Schwerpunkt, eröffnet diese Forschung in der Domäne der Nanopartikel die Tür zu einem sehr viel umfangreicheren Einsatzspektrum der VProt-Partikel. Neben der Verfolgung von Immunzellen besteht auch das Potential zur Beladung und Verfolgung weiterer Zellpopulationen, wie Stammzellen im Bereich der regenerativen Medizin oder malignen Zellen im Rahmen der onkologischen Forschung. Die Partikel bieten ein breites Anwendungsspektrum zur Erstellung und Überwachung neuartiger diagnostischer und therapeutischer Methoden. Auch die Beobachtung des migratorischen Verhaltens von Stammzellen in verschiedenen Krankheitsmodellen benötigt die Entwicklung neuer Verfahren zur *in vivo* Visualisierung einzelner Zellen. Ferner beschränkt sich der Einsatz dieser magnetischen Nanopartikel nicht ausschließlich auf die Internalisierung letzterer, sondern auch zur Kopplung an spezifische Antigene oder Antikörper können sie eingesetzt werden. Durch die Kopplung magnetischer Nanopartikel an spezifische Antikörper oder Aptamere als Liganden ist ein Einsatz zur Ermittlung von Inflammationsherden [146-148] und dem frühzeitigen Aufspüren und Monitoring von Tumorherden durch nicht-invasive Bildgebung in Erprobung [149;150]. Auch die gezielte Applikation von Chemotherapeutika ist in Zukunft durch diese Methode denkbar [151;152]. Das Potential von VSOP ist bei nachgewiesener guter Bioverträglichkeit, hoher Beladungskapazität und starker T2* Signalauslöschung immens. Sie könnten zusätzlich zu Informationen über die Implikation verschiedener Zelltypen im Pathomechanismus auch über die Rolle verschiedener spezifischer Antigene oder die Wirkung innovativer Medikamente auf die Akteure im Krankheitsgeschehen Aufschluss geben. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode der Zellmarkierung liefert somit die Grundlage für die Weiterentwicklung von Techniken zur Verfolgung verschiedener Zellpopulationen und deren Zellinteraktionen *in vivo*.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 2008; 71(2):129-135.
- (2) Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, et al. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2006; 15(18):2813-2824.
- (3) Goris A, Yeo TW, Maranian M, et al. Novel Olig 1-coding variants and susceptibility to multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(11):1296-1297.
- (4) De Jager PL, Graham R, Farwell L, et al. The role of inflammatory bowel disease susceptibility loci in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2006; 7(4):327-334.
- (5) Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2006; 29(9):518-527.
- (6) Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, et al. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 2002; 125(Pt 5):952-960.
- (7) Correale J, Fiol M, Gilmore W. The risk of relapses in multiple sclerosis during systemic infections. *Neurology* 2006; 67(4):652-659.
- (8) Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52(1):61-76.
- (9) Panitch HS. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994; 36 Suppl:S25-S28.
- (10) Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11):1444-1452.
- (11) Platten M, Steinman L. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med* 2005; 11(3):252-253.
- (12) Wuerfel J, Haertle M, Waiczies H, et al. Perivascular spaces--MRI marker of inflammatory activity in the brain? *Brain* 2008; 131(Pt9):2332-2340.
- (13) Platten M, Steinman L. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med* 2005; 11(3):252-253.
- (14) Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science* 1983; 219(4582):308-310.
- (15) Infante-Duarte C, Waiczies S, Wuerfel J, Zipp F. New developments in understanding and treating neuroinflammation. *J Mol Med* 2008; 86(9):975-985.
- (16) Ji Q, Goverman J. Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1103:157-166.

- (17) Adelman M, Wood J, Benzel I, et al. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 1995; 63(1):17-27.
- (18) Amor S, Groome N, Linington C, et al. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* 1994; 153(10):4349-4356.
- (19) Sun JB. Autoreactive T and B cells in nervous system diseases. *Acta Neurol Scand Suppl* 1993; 142:1-56.
- (20) Traugott U, Raine CS. Acute experimental allergic encephalomyelitis. Myelin basic protein-reactive T cells in the circulation and in meningeal infiltrates. *J Neurol Sci* 1979; 42(3):331-336.
- (21) Yamamura T, Namikawa T, Endoh M, Kunishita T, Tabira T. Passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid apoprotein. *J Neurol Sci* 1986; 76(2-3):269-275.
- (22) Xiao BG, Linington C, Link H. Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol* 1991; 31(2):91-96.
- (23) Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; 354(9):942-955.
- (24) Charil A, Filippi M. Inflammatory demyelination and neurodegeneration in early multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2007; 259(1-2):7-15.
- (25) Evangelou N, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 47(3):391-395.
- (26) Schmierer K, Altmann DR, Kassim N, et al. Progressive change in primary progressive multiple sclerosis normal-appearing white matter: a serial diffusion magnetic resonance imaging study. *Mult Scler* 2004; 10(2):182-187.
- (27) Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren-Wiemers N. Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 2008; 131(Pt 1):288-303.
- (28) Pirko I, Lucchinetti CF, Sriram S, Bakshi R. Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 68(9):634-642.
- (29) Calabrese M, Filippi M, Rovaris M, et al. Morphology and evolution of cortical lesions in multiple sclerosis. A longitudinal MRI study. *Neuroimage* 2008; 42(2):1324-1328.
- (30) Nitsch R, Pohl EE, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F. Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J Neurosci* 2004; 24(10):2458-2464.

- (31) McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50(1):121-127.
- (32) Wuerfel J, Tysiak E, Prozorovski T, et al. Mouse model mimics multiple sclerosis in the clinico-radiological paradox. *Eur J Neurosci* 2007; 26(1):190-198.
- (33) Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121 (Pt 1):3-24.
- (34) Zivadinov R, Leist TP. Clinical-magnetic resonance imaging correlations in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2005; 15(4 Suppl):10S-21S.
- (35) Goodin DS. Magnetic resonance imaging as a surrogate outcome measure of disability in multiple sclerosis: have we been overly harsh in our assessment? *Ann Neurol* 2006; 59(4):597-605.
- (36) Rudick RA, Lee JC, Simon J, Fisher E. Significance of T2 lesions in multiple sclerosis: A 13-year longitudinal study. *Ann Neurol* 2006; 60(2):236-242.
- (37) Silver NC, Tofts PS, Symms MR, Barker GJ, Thompson AJ, Miller DH. Quantitative contrast-enhanced magnetic resonance imaging to evaluate blood-brain barrier integrity in multiple sclerosis: a preliminary study. *Mult Scler* 2001; 7(2):75-82.
- (38) Charil A, Filippi M. Inflammatory demyelination and neurodegeneration in early multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2007; 259(1-2):7-15.
- (39) Davie CA, Hawkins CP, Barker GJ, et al. Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1994; 117 (Pt 1):49-58.
- (40) De Stefano N, Matthews PM, Antel JP, Preul M, Francis G, Arnold DL. Chemical pathology of acute demyelinating lesions and its correlation with disability. *Ann Neurol* 1995; 38(6):901-909.
- (41) He J, Inglese M, Li BS, Babb JS, Grossman RI, Gonen O. Relapsing-remitting multiple sclerosis: metabolic abnormality in nonenhancing lesions and normal-appearing white matter at MR imaging: initial experience. *Radiology* 2005; 234(1):211-217.
- (42) Gadea M, Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, et al. Spectroscopic axonal damage of the right locus coeruleus relates to selective attention impairment in early stage relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127(Pt 1):89-98.
- (43) Zivadinov R, Stosic M, Cox JL, Ramasamy DP, Dwyer MG. The place of conventional MRI and newly emerging MRI techniques in monitoring different aspects of treatment outcome. *J Neurol* 2008; 255 Suppl 1:61-74.
- (44) Pagani E, Filippi M, Rocca MA, Horsfield MA. A method for obtaining tract-specific diffusion tensor MRI measurements in the presence of disease: application to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neuroimage* 2005; 26(1):258-265.

- (45) Wuerfel J, Paul F, Zipp F. Cerebral blood perfusion changes in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2007; 259(1-2):16-20.
- (46) Wuerfel J, Bellmann-Strobl J, Brunecker P, et al. Changes in cerebral perfusion precede plaque formation in multiple sclerosis: a longitudinal perfusion MRI study. *Brain* 2004; 127(Pt 1):111-119.
- (47) Gelati M, Corsini E, De Rossi M, et al. Methylprednisolone acts on peripheral blood mononuclear cells and endothelium in inhibiting migration phenomena in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2002; 59(5):774-780.
- (48) Zipp F. Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1):163-171.
- (49) Gold R, Rieckmann P. [Recent advances in the pathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis]. *Nervenarzt* 2007; 78 Suppl 1:15-24.
- (50) Ziemssen T, Kumpfel T, Schneider H, Klinkert WE, Neuhaus O, Hohlfeld R. Secretion of brain-derived neurotrophic factor by glatiramer acetate-reactive T-helper cell lines: Implications for multiple sclerosis therapy. *J Neurol Sci* 2005; 233(1-2):109-112.
- (51) Haas J, Firzlauff M. Twenty-four-month comparison of immunomodulatory treatments - a retrospective open label study in 308 RRMS patients treated with beta interferons or glatiramer acetate (Copaxone). *Eur J Neurol* 2005; 12(6):425-431.
- (52) Karussis D, Kassis I. The potential use of stem cells in multiple sclerosis: an overview of the preclinical experience. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; 110(9):889-896.
- (53) Zhang Z, van den Bos EJ, Wielopolski PA, et al. In vitro imaging of single living human umbilical vein endothelial cells with a clinical 3.0-T MRI scanner. *MAGMA* 2005; 18(4):175-185.
- (54) Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* 2004; 17(7):484-499.
- (55) Modo M, Hoehn M, Bulte JW. Cellular MR imaging. *Mol Imaging* 2005; 4(3):143-164.
- (56) Fleige G, Seeberger F, Laux D, et al. In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol* 2002; 37(9):482-488.
- (57) Stroh A, Faber C, Neuberger T, et al. In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2005; 24(3):635-645.
- (58) Stroh A, Zimmer C, Werner N, et al. Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2006; 33(3):886-897.
- (59) Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(11):904-912.

- (60) Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006; 60(1):12-21.
- (61) Sriram S, Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005; 58(6):939-945.
- (62) Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, Mahlo J, Richter D, Bechmann I. T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol* 2006; 80(4):797-801.
- (63) Alford R, Simpson HM, Duberman J, et al. Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review. *Mol Imaging* 2009; 8(6):341-354.
- (64) Hu S, Yan P, Maslov K, Lee JM, Wang LV. Intravital imaging of amyloid plaques in a transgenic mouse model using optical-resolution photoacoustic microscopy. *Opt Lett* 2009; 34(24):3899-3901.
- (65) Montet-Abou K, Daire JL, Hyacinthe JN, et al. In vivo labelling of resting monocytes in the reticuloendothelial system with fluorescent iron oxide nanoparticles prior to injury reveals that they are mobilized to infarcted myocardium. *Eur Heart J* 2009; 31(11):1410-1420.
- (66) Kim DE, Schellingerhout D, Ishii K, Shah K, Weissleder R. Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 2004; 35(4):952-957.
- (67) Sadikot RT, Blackwell TS. Bioluminescence: imaging modality for in vitro and in vivo gene expression. *Methods Mol Biol* 2008; 477:383-394.
- (68) Oh DJ, Lee GM, Francis K, Palsson BO. Phototoxicity of the fluorescent membrane dyes PKH2 and PKH26 on the human hematopoietic KG1a progenitor cell line. *Cytometry* 1999; 36(4):312-318.
- (69) Bai J, Ding W, Yu M, et al. Radionuclide imaging of mesenchymal stem cells transplanted into spinal cord. *Neuroreport* 2004; 15(7):1117-1120.
- (70) Love Z, Wang F, Dennis J, et al. Imaging of mesenchymal stem cell transplant by bioluminescence and PET. *J Nucl Med* 2007; 48(12):2011-2020.
- (71) Stodilka RZ, Blackwood KJ, Kong H, Prato FS. A method for quantitative cell tracking using SPECT for the evaluation of myocardial stem cell therapy. *Nucl Med Commun* 2006; 27(10):807-813.
- (72) Wu X, Hu J, Zhou L, et al. In vivo tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant gliomas using magnetic resonance imaging. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 2008; 108(2):320-329.
- (73) Sykova E, Jendelova P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2007; 161:367-383.

- (74) Berger C, Hiestand P, Kindler-Baumann D, Rudin M, Rausch M. Analysis of lesion development during acute inflammation and remission in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis by visualization of macrophage infiltration, demyelination and blood-brain barrier damage. *NMR Biomed* 2006; 19(1):101-107.
- (75) Oweida AJ, Dunn EA, Foster PJ. Cellular imaging at 1.5 T: detecting cells in neuroinflammation using active labeling with superparamagnetic iron oxide. *Mol Imaging* 2004; 3(2):85-95.
- (76) Rausch M, Hiestand P, Baumann D, Cannet C, Rudin M. MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE. *Magn Reson Med* 2003; 50(2):309-314.
- (77) Kim YJ, Huh YM, Choe KO, et al. In vivo magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells in rat myocardial infarction; simultaneous cell tracking and left ventricular function measurement. *Int J Cardiovasc Imaging* 2009; 25 Suppl 1:99-109.
- (78) Mani V, Adler E, Briley-Saebo KC, et al. Serial in vivo positive contrast MRI of iron oxide-labeled embryonic stem cell-derived cardiac precursor cells in a mouse model of myocardial infarction. *Magn Reson Med* 2008; 60(1):73-81.
- (79) Daldrup-Link HE, Meier R, Rudelius M, et al. In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 2005; 15(1):4-13.
- (80) Suzuki Y, Zhang S, Kundu P, Yeung AC, Robbins RC, Yang PC. In vitro comparison of the biological effects of three transfection methods for magnetically labeling mouse embryonic stem cells with ferumoxides. *Magn Reson Med* 2007; 57(6):1173-1179.
- (81) Arbab AS, Liu W, Frank JA. Cellular magnetic resonance imaging: current status and future prospects. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3(4):427-439.
- (82) Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM. Technology insight: in vivo cell tracking by use of MRI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3(10):554-562.
- (83) Brochet B, Deloire MS, Touil T, et al. Early macrophage MRI of inflammatory lesions predicts lesion severity and disease development in relapsing EAE. *Neuroimage* 2006; 32(1):266-274.
- (84) Dousset V, Delalande C, Ballarino L, et al. In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance. *Magn Reson Med* 1999; 41(2):329-333.
- (85) Xu S, Jordan EK, Brocke S, et al. Study of relapsing remitting experimental allergic encephalomyelitis SJL mouse model using MION-46L enhanced in vivo MRI: early histopathological correlation. *J Neurosci Res* 1998; 52(5):549-558.
- (86) Oweida AJ, Dunn EA, Karlik SJ, Dekaban GA, Foster PJ. Iron-oxide labeling of hematogenous macrophages in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis and the contribution to signal loss in fast imaging employing steady state acquisition (FIESTA) images. *J Magn Reson Imaging* 2007; 26(1):144-151.

- (87) Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation* 2007; 116(11 Suppl):I38-I45.
- (88) Smirnov P, Lavergne E, Gazeau F, et al. In vivo cellular imaging of lymphocyte trafficking by MRI: a tumor model approach to cell-based anticancer therapy. *Magn Reson Med* 2006; 56(3):498-508.
- (89) Neri M, Maderna C, Cavazzin C, et al. Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking. *Stem Cells* 2008; 26(2):505-516.
- (90) Weiner HL, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(5):404-416.
- (91) Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke* 2007; 38(3):1097-1103.
- (92) Emsley HC, Smith CJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ. Inflammation in Acute Ischemic Stroke and its Relevance to Stroke Critical Care. *Neurocrit Care* 2007; 9(1):125-138.
- (93) Yeh TC, Zhang W, Ildstad ST, Ho C. In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med* 1995; 33(2):200-208.
- (94) Foster-Gareau P, Heyn C, Alejski A, Rutt BK. Imaging single mammalian cells with a 1.5 T clinical MRI scanner. *Magn Reson Med* 2003; 49(5):968-971.
- (95) Lewin M, Carlesso N, Tung CH, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18(4):410-414.
- (96) Anderson SA, Shukaliak-Quandt J, Jordan EK, et al. Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004; 55(5):654-659.
- (97) Kircher MF, Allport JR, Graves EE, et al. In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors. *Cancer Res* 2003; 63(20):6838-6846.
- (98) Dodd CH, Hsu HC, Chu WJ, et al. Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles. *J Immunol Methods* 2001; 256(1-2):89-105.
- (99) Hu DE, Kettunen MI, Brindle KM. Monitoring T-lymphocyte trafficking in tumors undergoing immune rejection. *Magn Reson Med* 2005; 54(6):1473-1479.
- (100) Moore A, Grimm J, Han B, Santamaria P. Tracking the recruitment of diabetogenic CD8+ T-cells to the pancreas in real time. *Diabetes* 2004; 53(6):1459-1466.
- (101) Dodd SJ, Williams M, Suhan JP, Williams DS, Koretsky AP, Ho C. Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J* 1999; 76(1 Pt 1):103-109.

- (102) Fleige G, Seeberger F, Laux D, et al. In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol* 2002; 37(9):482-488.
- (103) Stroh A, Zimmer C, Gutzeit C, et al. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(8):976-984.
- (104) Stroh A, Faber C, Neuberger T, et al. In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2005; 24(3):635-645.
- (105) Frank JA, Zywicke H, Jordan EK, et al. Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents. *Acad Radiol* 2002; 9 Suppl 2:S484-S487.
- (106) Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 2004; 104(4):1217-1223.
- (107) Berger C, Rausch M, Schmidt P, Rudin M. Feasibility and limits of magnetically labeling primary cultured rat T cells with ferumoxides coupled with commonly used transfection agents. *Mol Imaging* 2006; 5(2):93-104.
- (108) Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 2003; 228(2):480-487.
- (109) Arbab AS, Yocum GT, Wilson LB, et al. Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability. *Mol Imaging* 2004; 3(1):24-32.
- (110) Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation. II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 69(5):685-689.
- (111) Gervin AS. Complications of heparin therapy. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 140(5):789-796.
- (112) Reynolds F, Weissleder R, Josephson L. Protamine as an efficient membrane-translocating peptide. *Bioconjug Chem* 2005; 16(5):1240-1245.
- (113) Futaki S. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers* 2006; 84(3):241-249.
- (114) Kim HS, Kim JS, Lee YK, Koo KH, Park YS. An efficient liposomal gene delivery vehicle using Sendai F/HN proteins and protamine. *Cancer Gene Ther* 2008; 15(4):214-224.
- (115) Takeda S, Terazono B, Mishima F, Nakagami H, Nishijima S, Kaneda Y. Novel drug delivery system by surface modified magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6(9-10):3269-3276.

- (116) Sorgi FL, Bhattacharya S, Huang L. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1997; 4(9):961-968.
- (117) Benimetskaya L, Guzzo-Pernell N, Liu ST, Lai JC, Miller P, Stein CA. Protamine-fragment peptides fused to an SV40 nuclear localization signal deliver oligonucleotides that produce antisense effects in prostate and bladder carcinoma cells. *Bioconjug Chem* 2002; 13(2):177-187.
- (118) Vignon F, Rochefort H. Nuclear translocation of the estrogen receptor in autonomous C3H mouse mammary tumors. *Cancer Res* 1978; 38(6):1808-1814.
- (119) Park YJ, Chang LC, Liang JF, Moon C, Chung CP, Yang VC. Nontoxic membrane translocation peptide from protamine, low molecular weight protamine (LMWP), for enhanced intracellular protein delivery: in vitro and in vivo study. *FASEB J* 2005; 19(11):1555-1557.
- (120) Suzuki Y, Zhang S, Kundu P, Yeung AC, Robbins RC, Yang PC. In vitro comparison of the biological effects of three transfection methods for magnetically labeling mouse embryonic stem cells with ferumoxides. *Magn Reson Med* 2007; 57(6):1173-1179.
- (121) Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation* 2003; 76(7):1123-1130.
- (122) Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 2003; 229(3):838-846.
- (123) Ho VH, Barcza A, Chen R, Muller KH, Darton NJ, Slater NK. The precise control of cell labelling with streptavidin paramagnetic particles. *Biomaterials* 2009; 30(33):6548-6555.
- (124) Pawelczyk E, Arbab AS, Pandit S, Hu E, Frank JA. Expression of transferrin receptor and ferritin following ferumoxides-protamine sulfate labeling of cells: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed* 2006; 19(5):581-592.
- (125) Amicarelli F, Colafarina S, Cattani F, et al. Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(8):856-871.
- (126) Shindo Y, Hashimoto T. Ultraviolet B-induced cell death in four cutaneous cell lines exhibiting different enzymatic antioxidant defences: involvement of apoptosis. *J Dermatol Sci* 1998; 17(2):140-150.
- (127) Ziemann C, Burkle A, Kahl GF, Hirsch-Ernst KI. Reactive oxygen species participate in mdr1b mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis* 1999; 20(3):407-414.
- (128) Garden OA, Reynolds PR, Yates J, et al. A rapid method for labelling CD4+ T cells with ultrasmall paramagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging that preserves proliferative, regulatory and migratory behaviour in vitro. *J Immunol Methods* 2006; 314(1-2):123-133.

- (129) Shapiro EM, Medford-Davis LN, Fahmy TM, Dunbar CE, Koretsky AP. 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* 2007; 2(3):147-153.
- (130) Lassmann H. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2007; 163(6-7):651-655.
- (131) Steinman L, Zamvil SS. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol* 2005; 26(11):565-571.
- (132) Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006; 60(1):12-21.
- (133) Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129(Pt 8):1953-1971.
- (134) Himmelreich U, Weber R, Ramos-Cabrera P, et al. Improved stem cell MR detectability in animal models by modification of the inhalation gas. *Mol Imaging* 2005; 4(2):104-109.
- (135) Floris S, Blezer EL, Schreibelt G, et al. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* 2004; 127(Pt 3):616-627.
- (136) Rausch M, Baumann D, Neubacher U, Rudin M. In-vivo visualization of phagocytotic cells in rat brains after transient ischemia by USPIO. *NMR Biomed* 2002; 15(4):278-283.
- (137) Stoll G, Bendszus M. Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience* 2008; 158(3):1151-1160.
- (138) Dousset V, Brochet B, Deloire MS, et al. MR imaging of relapsing multiple sclerosis patients using ultra-small-particle iron oxide and compared with gadolinium. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27(5):1000-1005.
- (139) Muller DM, Pender MP, Greer JM. A neuropathological analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant brain stem and cerebellar involvement and differences between active and passive induction. *Acta Neuropathol* 2000; 100(2):174-182.
- (140) Lassmann H, Ammerer HP, Kulnig W. Ultrastructural sequence of myelin degradation. I. Wallerian degeneration in the rat optic nerve. *Acta Neuropathol* 1978; 44(2):91-102.
- (141) Mattner F, Katsifis A, Staykova M, Ballantyne P, Willenborg DO. Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32(5):557-563.
- (142) Billotey C, Asford C, Beuf O, et al. T-cell homing to the pancreas in autoimmune mouse models of diabetes: in vivo MR imaging. *Radiology* 2005; 236(2):579-587.

- (143) Pirko I, Johnson A, Ciric B, et al. In vivo magnetic resonance imaging of immune cells in the central nervous system with superparamagnetic antibodies. *FASEB J* 2004; 18(1):179-182.
- (144) Weiner HL, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(5):404-416.
- (145) Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, et al. Clinical outcome following acute ischaemic stroke relates to both activation and autoregulatory inhibition of cytokine production. *BMC Neurol* 2007; 7:5.
- (146) Hueber AJ, Stevenson R, Stokes RJ, Graham D, Garside P, McInnes IB. Imaging inflammation in real time--future of nanoparticles. *Autoimmunity* 2009; 42(4):368-372.
- (147) McAteer MA, Sibson NR, von Zur MC, et al. In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nat Med* 2007; 13(10):1253-1258.
- (148) Radermacher KA, Beghein N, Boutry S, et al. In vivo detection of inflammation using pegylated iron oxide particles targeted at E-selectin: a multimodal approach using MR imaging and EPR spectroscopy. *Invest Radiol* 2009; 44(7):398-404.
- (149) Serda RE, Adolphi NL, Bisoffi M, Sillerud LO. Targeting and cellular trafficking of magnetic nanoparticles for prostate cancer imaging. *Mol Imaging* 2007; 6(4):277-288.
- (150) Yang L, Peng XH, Wang YA, et al. Receptor-targeted nanoparticles for in vivo imaging of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(14):4722-4732.
- (151) Farokhzad OC, Karp JM, Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting. *Expert Opin Drug Deliv* 2006; 3(3):311-324.
- (152) Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(16):6315-6320.

9. Appendix

9.1. Danksagung

Für die Überlassung des Themas möchte ich Frau Prof. Frauke Zipp meinen herzlichen Dank aussprechen. Herrn Prof. Ulrich Dirnagl gilt mein besonderer Dank für die Übernahme dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Carmen Infante-Duarte und Dr. Jens Würfel bedanken. Sie haben mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mit Ihrem Engagement die Fertigstellung dieser Dissertation ermöglicht. Bei Eva Tysiak möchte ich mich für die gute Einarbeitung und die konstruktive Zusammenarbeit bedanken.

Danke auch an Frau Dr. Jana Glumm für die fruchtbare Zusammenarbeit, sowie den Mitarbeitern der AG von Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Matthias Taupitz, Prof. Dr. med. Eyk Schellenberger, Dr. med. vet. Jörg Schnorr für die Bereitstellung der Partikel, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke an Herrn Helmar Waisczies für die technische Unterstützung.

Ferner möchte ich allen anderen Mitarbeitern der Cecilie-Vogt-Klinik für Neurologie für die Gespräche und die fachlichen Ratschläge danken.

Ganz besonders möchte ich meinem Freund, Robert Steinicke, für sein Verständnis, die liebevolle Aufmunterung und die unendliche Geduld danken. Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mir durch ihre Unterstützung durch die vielen Höhen und Tiefen dieser Arbeit geholfen hat.

Auch allen anderen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich ganz herzlich!

9.2. Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht in der Online Version dieser Dissertation veröffentlicht

9.2. Erklärung

„Ich, Maureen Smyth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

*Optimierung der T-Zell-Beladung mit magnetischen Nanopartikeln zur ZNS-Bildgebung mittels
MRT in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose*

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 13.10.2010

Unterschrift

9.4. Publikationsliste

Originalarbeiten

Mouse model mimics multiple sclerosis in the clinico-radiological paradox. Wuerfel J, Tysiak E, Prozorowski T, **Smyth M**, Mueller S, Schnorr J, Taupitz M, Zipp F. Eur. J. Neurosci. 2007

Beyond blood brain barrier breakdown – *in vivo* detection of acute neuroinflammatory foci by magnetic nanoparticles in high field MRI. Tysiak E, Ansbach P, Aktas O, Waiczies H, **Smyth M**, Schnorr J, Taupitz M, Wuerfel J. J. Neuroinfl. 2009

In Revision

Electrostatically stabilized magnetic nanoparticles – an optimized protocol to label T cells for *in vivo* MRI. Wuerfel E*, **Smyth M***, Schellenberger E, Prozorowski T, Aktas O, Schulze-Topphoff U, Schnorr J, Wagner S, Taupitz M, Infante C, Wuerfel J. (*equally contributing authors) MAGMA 2010

Kongressbeiträge

In vitro generated repetitively activated MOG-specific Th17 cells are highly encephalitogenic and keep their phenotype *in vivo*. Paterka M, **Smyth M**, Waiczies H, Wuerfel J, Infante-Duarte C, Zipp F, Siffrin V.