

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszerale und Transplantationschirurgie,
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung und Evaluierung eines mikroskaligen, oligonukleotid-
gekoppelten Eisenoxidpartikels zur Stimulation kultivierter primärer
humaner Hepatozyten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annekatri Leder

aus Gotha (Thüringen)

Datum der Promotion: 09. September 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract.....	3
1. Abstract (<i>english</i>).....	5
2. Einleitung und Zielstellung.....	6
3. Methoden und Ergebnisse.....	8
4. Diskussion.....	17
5. Literaturverzeichnis.....	21
6. Vorträge und Poster Präsentationen.....	23
7. Eidesstattliche Versicherung.....	25
8. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen.....	26
I. Anhang.....	28
I.I. Originalarbeiten.....	28
I.II. Lebenslauf.....	48
I.III. Publikationsliste.....	64
I.IV. Danksagung.....	65

1. Abstract

Die Leberzelltransplantation ist eine erfolversprechende Therapie zur Behandlung angeborener Stoffwechseldefekte der Leber sowie des akuten Leberversagens. Im Rahmen der Leberzelltransplantation bieten Partikel-basierte Transfektionssysteme (*engl. Particle based delivery systems*; PDS), die auf der Inkorporation von Eisenoxidpartikeln in Leberzellen beruhen, perspektivisch die Möglichkeit der Kombination von Diagnostik und Therapie.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung und Evaluierung eines multifunktionalen oligonukleotid-gekoppelten biokompatiblen mikroskaligen Eisenoxidpartikels (sMPIO- α -LNA) zur Verfolgung transplantierte Leberzellen im MRT und dessen therapeutische Manipulation mittels RNA Interferenz. Der sMPIO bestand aus nanoskaligen Magnetitpartikeln, welche homogen in einer SiO₂-basierten Polymermatrix eingebettet waren. Die Oberfläche der Partikel wurde mit Carboxylgruppen konjugiert, was die Anbindung funktioneller Gruppen und therapeutischer Wirkstoffe ermöglichte. In dieser Arbeit wurden *antisense Locked Nucleic Acids* (α -LNAs) an die Oberfläche des sMPIOs gekoppelt.

Die zentrale Funktion des sMPIOs bestand in der Erzeugung eines reproduzierbaren hypointensen MRT-Signals. Hierfür wurden zwei Oberflächenmodifikationen (Poly-L-Lysin, Streptavidin) hinsichtlich ihrer Inkorporationsfähigkeit in Leberzellen getestet. Es konnte eine signifikante Signalauslöschung ab einer Zellzahl von 1.000 primären humanen Hepatozyten bzw. von 5.000 Zellen der Zelllinie Huh-7 in der T2*-gewichteten Sequenz erzielt werden.

Für die Verwendung des Partikels als intrazellulären Stimulus der zu transplantierenden Hepatozyten wurde die Let7g-spezifische α -LNA an den Partikel kovalent gebunden. Die Depletion von über 80% der endogenen microRNA (miRNA) Let7g induzierte 24 Stunden nach Partikelinkubation eine Hochregulation der Zellzyklus-assoziierten Proteine Cyclin D1 und c-Myc. Nachfolgende Proteomanalysen offenbarten weitere Zielproteine, von denen vier als Interaktionspartner der Let7g bekannt sind. Die Transplantation von Partikel-markierten Zellen zeigte nach sieben Tagen eine verstärkte

1. Abstract

Signalauslöschung im MRT. Das Engraftment der Hepatozyten sowie die Eisenoxidpartikel konnten histologisch nachgewiesen werden.

Die Entwicklung des neuartigen Partikels ermöglicht die theragnostische Anwendung in der Leberzelltransplantation. Darüber hinaus ist eine Nutzung des Partikels in der Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen denkbar.

1. Abstract (*english*)

The liver cell transplantation is a promising therapy for the treatment of inborn metabolic liver disease and acute liver failure. In the course of liver cell transplantation particle based delivery systems (PDS) consisting of iron oxide particles incorporated in liver cells might provide a tool for combination of diagnosis and therapy.

The aim of this study was to design a multifunctional oligonucleotide-labeled biocompatible micron-sized iron oxide particle (sMPIO- α -LNA), which combines MRI cell tracking and therapeutic manipulation of primary human hepatocytes by miRNA targeting.

The sMPIO consisted of nanometer-scaled magnetite-particles, which were distributed homogeneously in a silica-based polymer matrix. The polymeric shell was covered with carboxyl groups allowing the binding of functional groups and therapeutic agents. In this study antisense locked nucleic acids (α -LNA) were covalently bound to the surface of the sMPIO.

The main purpose of the sMPIO was to enable a reproducible hypointense MRI signal. Therefore two different surface modifications (Poly-L-Lysin, Streptavidin), which were coupled onto particle surfaces, were tested regarding the incorporation capacity into liver cells. The results showed that 1,000 primary hepatocytes and 5,000 cells of the cell line Huh-7 could be quantified in a T2* weighted imaging.

In order to cause an intracellular stimulus of transplanted hepatocytes, a α -LNA specific for the depletion of the microRNA (miRNA) Let7g was covalently bound to the particle surface. The Let7g depletion (80%) resulted in up-regulation of the cell cycle associated target proteins Cyclin-D1 and c-Myc. In further proteome analyses, additional target proteins, which were regulated by sMPIO- α -LNA treatment, were detected. Four of them were identified as interaction partners of Let7g. The transplantation of sMPIO-labeled cells caused an enhanced signal loss in MRI after seven days. The engraftment of the liver cells as well as the iron oxide particles could be visualized by histological staining.

The new particle might be used as a theragnostic tool for cell transplantation and additionally for diagnosis and therapy of malignoma.

2. Einleitung und Zielstellung

Im Fokus der Regenerationsmedizin steht die morphologische und funktionelle Wiederherstellung von Geweben bzw. Organen. Die Leberzelltransplantation gilt als vielversprechende minimal-invasive Alternative und könnte zur Unterstützung konventioneller Therapien, wie der Leberteiltransplantation eingesetzt werden.¹ Hierbei ist es entscheidend, den therapeutischen Effekt im Empfängerorgan durch Stimulation der Proliferation bzw. Differenzierung der transplantierten Zellen zu steigern. Derzeit werden weltweit vielversprechende Ansätze zur Manipulation von Zellen vor und während der Transplantation verfolgt.² Insbesondere das Prinzip der RNA-Interferenz, vermittelt durch miRNAs scheint ein vielversprechendes therapeutisches Werkzeug zu sein. miRNAs sind nicht kodierende RNA Sequenzen und fungieren als Regulatoren in der posttranskriptionalen Genexpression.³ Ein Beispiel für die therapeutische Inhibition von miRNAs ist das Therapeutikum „Miravirsen“, ein LNA-basiertes (*Locked nucleic acids; LNA*) antisense-Oligonukleotid, welches zur Behandlung chronisch infizierter HCV-Patienten entwickelt wurde und sich derzeit in der klinischen Prüfung befindet.⁴ Für eine effiziente Transfektion derartiger antisense-LNAs zur Depletion intrazellulärer miRNAs werden häufig virale Systeme sowie kationische bzw. liposomale Partikel verwendet. Die Limitation vieler Partikel-basierter Transfektions-Systeme (*engl. Particle based delivery systems; PDS*) liegt in deren Immunogenität und möglichen karzinogenen Auswirkungen sowie in der fehlenden Möglichkeit der Zellverfolgung nach Transplantation.⁵ Die diagnostische und interventionelle Radiologie ermöglicht zahlreiche Optionen für die Detektion transplantierte Zellen. In der Klinik wird hierfür häufig die Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt und nanoskalige superparamagnetische Eisenoxid-haltige Partikel (*engl. superparamagnetic iron oxide particle; SPIO*) als Kontrastmittel verwendet.⁶ Die Vorteile basieren auf der geringen Toxizität und Vermeidung ionisierender Strahlung. Um einen ausreichenden Kontrast im MRT zu erzeugen, ist eine hohe Partikelbeladung der Zelle entscheidend. Grundlegend stellt die Detektion transplantierte partikelmarkierter Zellen im Abdomen eine große Herausforderung dar, da die Aufnahmen im MRT stark von der intestinalen Peristaltik und der Atmung des Patienten abhängig ist. Umso mehr liegt das Augenmerk auf der Verbesserung des Kontrastes, des Signal-Rausch-Verhältnisses und der graphischen

2. Einleitung und Zielstellung

Auflösung. Zur Beantwortung können Ultra-Hochfeld-MRTs mit höheren Magnetfeldstärken (> 7 Tesla) eingesetzt werden. Diese stehen jedoch nicht jeder klinischen Einrichtung zur Verfügung und werden derzeit fast ausschließlich in der Gehirnforschung eingesetzt. Aufgrund des erhöhten Eisengehaltes (1 pg Fe/Partikel) unseres sMPIOs gegenüber herkömmlich eingesetzten SPIOs (10^{-6} - 10^{-7} pg Fe/Partikel) kann eine signifikant höhere $R2/R2^*$ molare Relaxation erreicht werden und die beschriebene Problematik umgangen werden.⁷ Die Verwendung von mikroskaligen Eisenoxidpartikeln zur Darstellung transplanteder Zellen im Abdomen bietet somit eine komfortable, reproduzierbare und kostengünstige Alternative.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung eines multifunktionalen, biokompatiblen, superparamagnetischen Mikropartikels für die Detektion Partikel-markierter Leberzellen im MRT und deren therapeutische Manipulation mittels miRNA-Targeting (Abbildung 1).

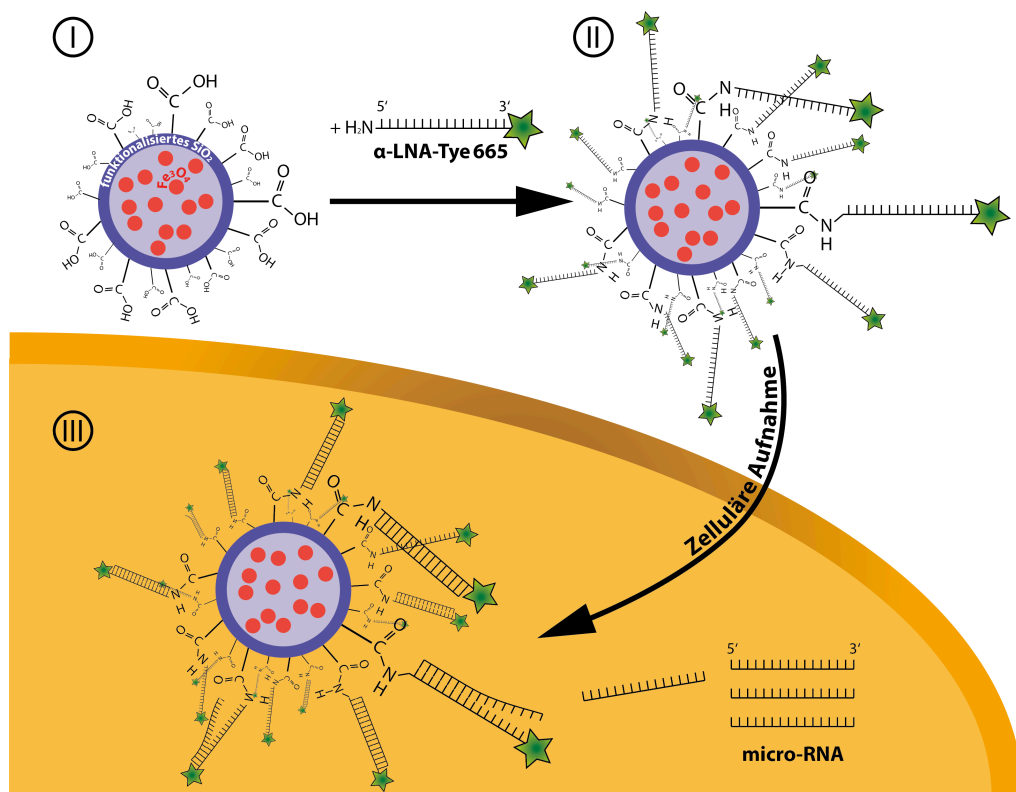


Abbildung 1: Schema der sMPIO- α -Let7g und der Partikel-basierten Depletion: superparamagnetischer, silica-basierter, carboxylierter Mikropartikel (sMPIO) (I); kovalente Kopplung von α -LNA-Tye665 und Partikelinkorporation (II); Partikel-basierte Depletion intrazellulärer miRNAs (III) (Modifiziert aus *Biomaterials*, 2015; 51: 129-137: Annektrin Leder et.al. "Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells.")

3. Methoden und Ergebnisse

Die verwendeten mikroskaligen superparamagnetischen Eisenoxidpartikel auf Siliziumdioxid-(SiO₂) Basis (*engl. silica-based micron-sized iron oxide particle*; sMPIO) wurden in enger Kooperation mit der Firma *microparticles* GmbH (Berlin, Deutschland) entwickelt. Die Basispartikel bestehen aus homogen verteilten Magnetit-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 10 - 15 nm, welche in eine SiO₂-basierte Polymermatrix eingebunden sind. Die superparamagnetischen Polymer-Partikel wurden für die Detektion im MRT konstruiert und ermöglichen über die kovalente Belegung der Partikeloberfläche mit Carboxylgruppen (COOH), die Kopplung diagnostischer bzw. therapeutischer Substanzen.

Nachfolgend wurden die Partikeloberflächeneigenschaften in der Rasterelektronenmikroskopie untersucht und die Partikelgröße mit einem Coulter Multisizer II (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA) ermittelt. Dabei konnten die gewünschten monodispersen und sphärischen Eigenschaften des Partikels bestätigt und eine Partikelgröße von 1,18 µm Durchmesser ermittelt werden.

Zur Evaluierung der Inkorporationsfähigkeit des Partikels in Hepatozyten wurde die Partikeloberfläche modifiziert. Um die Adhäsion des Partikels an die Zellmembran zu erhöhen und dessen intrazelluläre Aufnahme zu verbessern, wurde nach Aktivierung der COOH-Gruppen Poly-L-Lysin (PLL) kovalent an die Oberfläche des Partikels gebunden. Darüber hinaus wurde Streptavidin (SA), ein bakterielles Protein mit hoher Affinität zu Biotin auf der Partikeloberfläche fixiert, welches den Einsatz des Partikels für diagnostische Zwecke erweitert. Die modifizierten sMPIOs (COOH-sMPIO, PLL-sMPIO und SA-sMPIO) wurden hinsichtlich ihrer Inkorporationsfähigkeit in Leberzellen untersucht. Die Etablierung der Partikelaufnahme wurde zunächst an der hepatozellulären Karzinomzelllinie Huh-7 durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden die Zellen mit COOH-sMPIOs, PLL-sMPIOs und SA-sMPIOs in einer Konzentration von 10 bis 100 Partikel pro Zelle bei 37°C für vier Stunden inkubiert. Die im Medium überschüssigen Partikel wurden nach Inkubationsende mit einer Pufferlösung aus der Kultur ausgewaschen. Für die Bestimmung der Partikelaufnahme wurden die Zellen in einer adhärennten Kultur bis zu sieben Tagen kultiviert und mittels Lichtmikroskopie randomisiert ausgezählt. Die intrazelluläre Lokalisierung wurde mit Transmissions-

3. Methoden und Ergebnisse

Elektronenmikroskopie (TEM; Charité Berlin) verifiziert. Die verwendeten sMPIOs konnten nach einem Zeitraum von vier Stunden in Zellkernnähe lokalisiert und in der TEM bestätigt werden (Abbildung 2A, B).

Die Inkubation von 100 Partikeln pro Zelle ergab nach Quantifizierung der Partikelaufnahme für COOH-sMPIO 15 ± 4 Partikel pro Zelle. Eine Markierung mit PLL-sMPIO ergab eine signifikant höhere Partikelaufnahme von 23 ± 6 Partikel pro Zelle, jedoch zeigten sich hier intra- und extrazelluläre Cluster. Bei der Markierung mittels SA-sMPIO konnten lediglich 5 ± 1 Partikel pro Zelle gezählt werden. Poly-L-Lysin und Streptavidin wurden daher als funktionelle Oberflächen für weitere therapeutische Studien ausgeschlossen. Mit allen Partikeln konnte eine Markierungseffizienz von über 90% erzielt werden, lediglich bei SA-sMPIO lag die Effizienz bei $72\% \pm 11\%$. Für die Anwendung des sMPIOs in der MRT-Bildgebung wurde eine optimale Partikelinkubationszahl von 100 Partikeln pro Zelle für Huh-7 Zellen ermittelt.

Für die Bestimmung der Zelltoxizität des Partikels wurden die Zellen bis zu 18 Stunden mit sMPIOs in unterschiedlichen Konzentrationen markiert und deren mitochondriale Aktivität analysiert. Hierbei konnte kein negativer Effekt auf die Zelle festgestellt werden. Nach Evaluierung der Partikelaufnahme wurde das Potential der Signalauslöschung vom Partikel im MRT (Institut für Radiologie, Charité Berlin) untersucht. Hierfür wurden native und sMPIO-markierte Zellen trypsiniert, in PBS aufgenommen und in einem Agarosegel-Phantom im *in vitro* MRT gemessen. Die Bildanalyse wurde mit einem klinischen 3-Tesla MRT und einer 4-Kanal Phased-Array Spule durchgeführt.

Die Analyse der Sequenzen nach konzentrationsabhängiger Markierung korrelierte mit der lichtmikroskopisch ermittelten Partikelaufnahme der Zellen. Die Signalauslöschung stieg mit Konzentration inkorporierter Partikel an. Im T2*-gewichteten Sequenz konnte die Signalauslöschung ab einer Zellzahl von 5.000 Zellen bei einer Markierung von PLL-sMPIOs und ab einer Zellzahl von 10.000 Zellen bei einer Markierung von COOH-sMPIOs detektiert werden. Mit einer Markierung von SA-sMPIOs war, aufgrund der geringen Partikelaufnahme der Zellen, eine Detektion erst ab einer Zellzahl von 25.000 Zellen möglich.

Im Anschluss wurden Versuche an primären humanen Hepatozyten und Ratten-Hepatozyten durchgeführt. Die primären humanen Hepatozyten wurden nach Vorgabe

des genehmigten Ethikvotums (EA2/137/09) aus Leberresektaten und Rattenhepatozyten aus Fischer-344-Rattenlebern (LAGeSo Genehmigungs-Nr.: O 0459/09) mit steigender Partikelkonzentration markiert. Die intrazelluläre Lokalisierung FITC-gekoppelter Partikel wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt (Abbildung 2C).

Die fluoreszenzmikroskopische Bewertung der Lokalisation der Partikel in primären humanen Hepatozyten zeigte wie in den vorausgegangenen Untersuchungen mit Huh-7 Zellen eine Akkumulation der Partikel in Zellkernnähe.

Zur Bestimmung der Zellschädigung wurde Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Harnstoff täglich aus den Medienüberständen entnommen. Eine signifikante Zellschädigung konnte nicht festgestellt werden.

Aus den Ergebnissen der MRT-Bildanalyse zur Evaluierung einer effizienten Signalauslöschung wurde eine optimale Markierung von mindestens 20 inkorporierten Partikeln pro Zelle ermittelt. Um dies zu erreichen war eine initiale Inkubation mit 60 Partikeln pro Zelle erforderlich. Eine Signalauslöschung konnte mit allen verwendeten Partikeln ab einer Zellzahl von 1.000 Zellen im T2*-gewichteten MRT nachgewiesen werden (Abbildung 2D).

Die statistische Analyse erfolgte mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) Test und der *Post-hoc-multiple-comparison* (Wilcoxon) Test. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als statistisch signifikant beurteilt.

3. Methoden und Ergebnisse

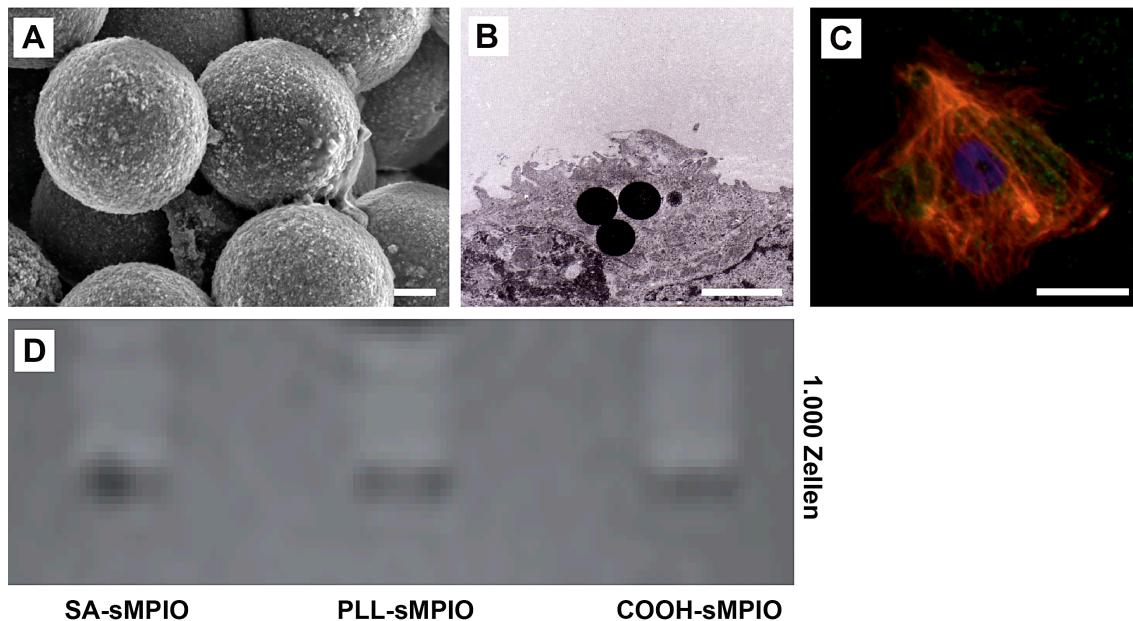


Abbildung 2: Darstellung monodisperser und sphärischer Eigenschaften mittels Rasterelektronenmikroskopie, **A** (Maßstab: 200 nm); Darstellung der intrazellulären Lokalisation des sMPIOs in Huh-7 Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie **B** (Maßstab: 2,5 µm); Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des sMPIOs in primären humanen Hepatozyten **C** (Maßstab: 5 µm); *in vitro* MRT-Aufnahme von sMPIO-markierten primären humanen Hepatozyten, die Nachweisgrenze liegt bei 1.000 Zellen bei einer Markierung von 60 Partikeln pro Zelle. **D** (modifiziert aus Cell Transplantation: 2013; 22(11): 1959-1970; Raschzok et al. „Functionalizable silica-based micron-sized iron oxide particles for cellular magnetic resonance imaging.“)

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Inkorporation von sMPIOs in verschiedenen Zellen eine stabile und reproduzierbare Detektion im MRT ermöglicht werden kann.

Nach der Entwicklung des sMPIOs stand der Einsatz des Partikels als Carrier für α -LNA zur Manipulation endogener miRNAs, sowie das Monitoring sMPIO-markierter Zellen im klinischen MRT im Mittelpunkt des Promotionsvorhabens.

In den ersten Versuchen zeigte sich eine ineffiziente Kopplung von 5'Amino-LNAs an die bisher verwendeten sMPIOs. Dementsprechend wurde die Oberfläche der sMPIOs modifiziert, sodass die kovalente Kopplung miRNA-spezifischer α -LNA an die Partikeloberfläche möglich war. Hierzu wurde eine Partikel-Schale aus SiO₂-basierten Nanopartikeln auf die vorherige SiO₂-Polymerschicht des sMPIOs synthetisiert (*microparticles* GmbH, Berlin). Hierdurch vergrößerte sich die Partikeloberfläche, sodass die Anzahl funktioneller Oberflächengruppen (-COOH) im erforderlichen Maß

erhöht werden konnte. Zur Kopplung von antisense-Oligonukleotiden wurden 3'-Tye665-5'-Amino-LNAs der Firma Exiqon (Vedbæk, Dänemark) verwendet. Das 5'-Amino-Ende der LNAs konnte nach 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)-Aktivierung der Partikel-gebundenen COOH-Gruppen zur Säureamid-Bindung umgesetzt werden. Die Beladung der sMPIOs mit LNA-Molekülen lag nun im Bereich von 0,1 - 1 $\mu\text{mol/g}$ und damit deutlich über den Werten der ursprünglichen sMPIOs. Zur Bestätigung der funktionellen Eigenschaften des sMPIOs wurden α -LNAs mit hoher Bindungsaffinität an miRNAs aus der Let7 Familie an die Carboxylgruppen gekoppelt. Es wurden folgende Antisense-Sequenzen eingesetzt: 5'AmMC6ACTGTACAACTACTACCTC (sMPIO- α -Let7g) für *in vitro* Studien mit humanen Hepatozyten sowie 5'AmMC6ACTATAACAACCTCCTACCTC (sMPIO- α -Let7e) für *in vivo* Untersuchungen zur Detektion partikel-markierter Rattenhepatozyten. Als funktionelle Negativ-Kontrolle diente die Sequenz 5'AmMC6GTGTAACACGTCTATACGCCCA (sMPIO- α -NC).

Primäre humane Hepatozyten wurden über Nacht adhärent kultiviert, am nächsten Tag gewaschen und es erfolgte ein Mediumwechsel. Die Hepatozyten wurden anschließend mit sMPIO, sMPIO-NC bzw. sMPIO- α -Let7g in einer Konzentration von 60 Partikeln pro Zelle für vier Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden nicht inkorporierte Partikel aus der Kultur ausgewaschen.

Zur Validierung der Effizienz der Partikel-gebundenen miRNA-Depletion wurde als Kontrolle die liposomale Transfektion freier α -LNAs verwendet. Hierfür wurden die Hepatozyten mit Lipofectamine® RNAiMAX (Carlsbad, USA) und 100 pmol α -Let7g pro 1×10^6 Zellen behandelt. Die Zellen aller Versuchsgruppen wurden anschließend bis zu fünf Tage kultiviert. Die Asservierung der Überstände zur Bestimmung von Albumin und Zelllysaten zur Analyse von RNA bzw. Proteinen erfolgte täglich.

Die Colokalisation des sMPIO- α -LNA wurde mittels Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes (Tye665) an das 3' Ende der α -LNA bestimmt. Nach dreidimensionaler Analyse der konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) konnte die intrazelluläre Colokalisation des Partikel-LNA Konstrukts in der Nähe des Zellkerns visualisiert und bestätigt werden. Parallel

hierzu wurden lichtmikroskopische Aufnahmen vitaler Hepatozyten während der Versuchszeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden bewertet. Die Erkenntnisse aus den konfokalmikroskopischen Aufnahmen konnten hierbei bestätigt werden.

Als dritte Methode der Visualisierung der Partikelaufnahme wurden die Zellen nach Partikel-Markierung fixiert und die zellkernnahe Lokalisation der Partikel mittels Berliner-Blau-Färbung dargestellt. Zur Bestimmung toxischer Eigenschaften der Partikelmarkierung auf die Atmungskette der Zellen wurde die mitochondriale Aktivität gemessen. Es konnte kein negativer Effekt auf die Atmungskette der Zelle nach Partikelmarkierung festgestellt werden.

Der Nachweis des intrazellulären Partikel-gestützten „Knockdowns“ der Let7g erfolgte zunächst mittels TaqMan-Real-Time-PCR (qRT-PCR; StepOnePlus real-time PCR System, Applied Biosystems, USA). Hierfür wurde die RNA aus den Zelllysaten isoliert und das miRNA-Expressionslevel für die Let7g gemessen. Die qRT-PCR zeigte eine erhebliche Reduktion von über 80% des Let7g-Expressionslevels der Zelle 24 bzw. 48 Stunden nach sMPIO- α -Let7g Markierung gegenüber unbehandelten (nativ), sMPIO- und sMPIO-NC-markierten Zellen (Abbildung 3A). Dieser Effekt war nahezu vergleichbar mit dem einer liposomalen Transfektion freier α -LNA. Für den alternativen Nachweis in der Northern Blot Analyse wurde die isolierte RNA in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf einer positiv geladenen Nitrozellulosemembran fixiert. Zur Detektion wurden spezifische Digoxigenin-gekoppelte Sonden verwendet. Hier zeigte sich eine nahezu vollständige Reduktion der endogenen Let7g nach 24 Stunden (Abbildung 3D).

Ziel der Partikel-gestützten Transfektion von α -LNA ist – neben einer effizienten Inhibition von miRNAs – die Nutzung des supprimierenden Effektes auf spezifische Target-Gene. Der „Knockdown“ der Let7g führt in der frühen Phase des Zellzyklus unter anderem zur Stimulation der Zellzyklus-assoziierten Proteine Cyclin D1 und c-Myc. Hierfür wurden die Zelllysate in einem Polyacrylamid-Gel fraktioniert und auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Proteinexpression wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper mittels Röntgenfilmtechnik detektiert. Als konstant exprimierte endogene Kontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Bereits 24 Stunden nach Partikelinkubation konnte eine signifikante

3. Methoden und Ergebnisse

Stimulation von Cyclin D1 ($p = 0,0319$) und c-Myc ($p = 0,0159$) im Vergleich zu nativen Zellen detektiert werden (Abbildung 3B, C).

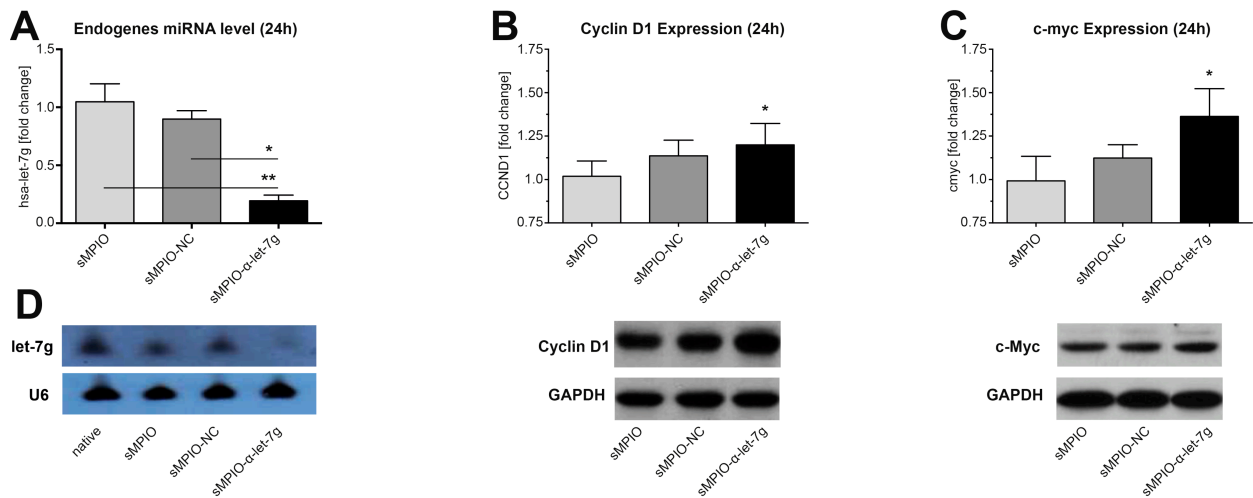


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Expressionsänderung der endogenen Let-7g nach Partikel-basierter Depletion im Vergleich zu sMPIO und sMPIO-NC mittels qRT-PCR nach 24 Stunden. **A** Western Blot Analyse der Cyclin D1 und c-Myc Expression 24 Stunden nach Partikelmarkierung normalisiert auf die endogene Kontrolle GAPDH. **B, C** Röntgenfilmaufnahme des endogenen Let-7g Levels und der endogenen Kontrolle, U6snRNA. **D** (modifiziert aus *Biomaterials*, 2015; 51: 129-137: Annkatrin Leder et.al. "Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells.")

Zur Ermittlung weiterer Zielproteine erfolgte 48 Stunden nach Partikelinkubation eine Proteomanalyse durch die Firma Proteome Factory AG (Berlin, Deutschland). Die Proteinlysate wurden in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels nanoLC-ESI-MS/MS unter Verwendung der Software *Mascot search engine* (*Matrix Science*, London, England) und einer nationalen Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, USA) analysiert. Aus der Analyse der 2D-Gele ergaben sich 22 Proteine, von denen vier als Interaktionspartner der Let7g identifiziert wurden. Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur sowie des Datenvergleiches aus einer vorangegangenen *in vivo* Studie zur Bestimmung regulierter miRNAs während des Regenerationspeaks nach Leberteilresektion, ergaben einen Zusammenhang zwischen den analysierten Proteinen und für die Leberregeneration relevanten miRNAs.^{8,9,10,11}

Die statistischen Differenzen der Ergebnisse wurden mittels Student's t-Test, nicht-parametrischem Mann-Whitney-U-Test, ANOVA bzw. nicht-parametrischem Kruskal-

3. Methoden und Ergebnisse

Wallis-Test ermittelt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als statistisch signifikant beurteilt.

Abschließend wurden in einem *in vivo* Transplantationsmodell, zur Detektion sMPIO- α -Let7e markierter Rattenhepatozyten im MRT, Leberzellen aus männliche Fischer-344-Ratten, welche als Spendertiere dienten, in weibliche Retrorsin-vorbehandelte Ratten transplantiert. 8×10^6 vitale sMPIO- α -Let7e markierte Zellen bzw. native Zellen wurden in die Milz appliziert und zwei Tage vor bzw. sieben Tage nach Zelltransplantation im MRT analysiert. Für die Untersuchungen wurde ein klinisches MRT mit einer Feldstärke von 3-Tesla und einer 4-Kanal Phased-Array Spule verwendet. Die anschließende Bildanalyse erfolgte über die T2*-Gewichtung. Die Auswertung repräsentativer MRT-Aufnahmen zeigte eindeutige Signalauslöschungen in der Leber, welche in den unbehandelten Tieren nicht nachgewiesen werden konnten.

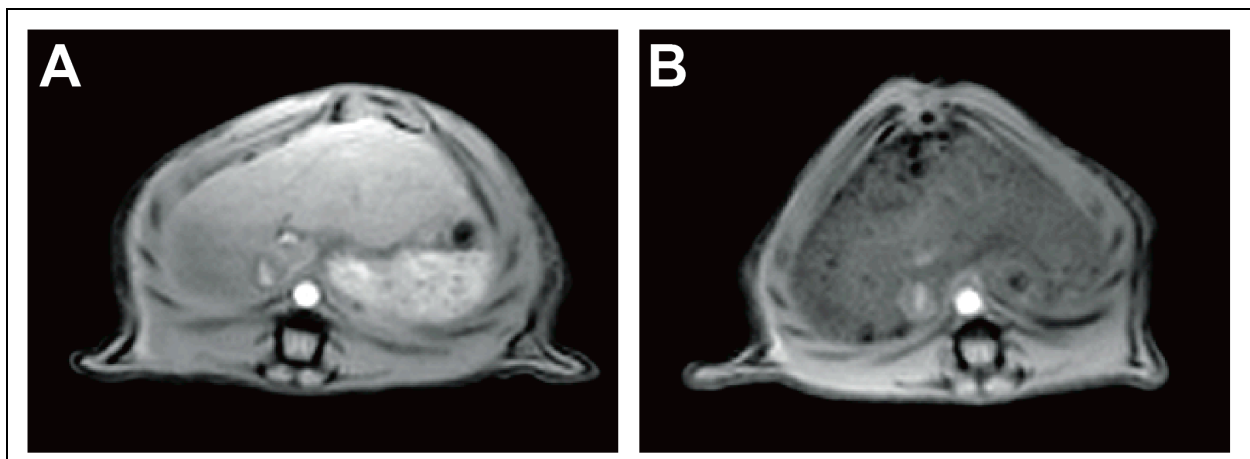


Abbildung. 4: MRT Aufnahmen zwei Tage vor (A) und sieben Tage nach (B) Zelltransplantation (modifiziert aus Biomaterials, 2015; 51: 129-137: Annekatri Leder et.al. "Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells.")

Für den Nachweis proliferierender Hepatozyten wurde den Tieren eine Stunde vor Finalisierung Bromdesoxyuridin (BrdU; Dako, Dänemark), ein Thymidin-Analogon, appliziert. Anschließend erfolgte die immunhistologische Auswertung BrdU-positiver Zellen. Die hypothetisierte Proliferation der transplantierten Hepatozyten durch die Let7e-Depletion konnte *in vivo* jedoch nicht bestätigt werden. Mittels Berliner Blau Färbung der Eisenoxid-haltigen Partikel und dem Nachweis transplantiertes männlicher

3. Methoden und Ergebnisse

Hepatozyten im weiblichen Empfängertier, konnte die Anreicherungen transplantierte und Partikel-markierter Leberzellen in der Leber eindeutig bestätigt werden.

4. Diskussion

Das Konzept eines neuartigen multifunktionalen superparamagnetischen monodispersen mikroskaligen Eisenoxidpartikels zur nicht-invasiven Zellverfolgung mittels MRT und der Manipulation endogener miRNAs mittels partikel-gestützter Depletion konnte erfolgreich realisiert werden. Der Partikel kann somit in der Zelltherapie mit der Möglichkeit eines miRNA-Targeting und simultaner Zellverfolgung eingesetzt werden.

Im ersten Teil der Untersuchungen zur Detektion des sMPIOs im MRT konnte gezeigt werden, dass eine eindeutige Signalauslöschung ab einer Zellzahl von 1.000 Zellen bei einer Partikelbeladung von 20 Partikeln pro Zelle in der T2* gewichteten Bildgebung möglich ist. Um ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen, ist bei einer Markierung mit Nanopartikeln, aufgrund des geringeren Eisengehaltes gegenüber Mikropartikeln, eine höhere Partikelbeladung pro Zelle notwendig.⁷ Gleichzeitig ermöglichen die monodispersen Eigenschaften des Partikels eine reproduzierbare Bildgebung.

Eine effiziente Zellmarkierung ist jedoch von vielen verschiedenen Faktoren abhängig – so unter anderem auch von der Oberflächenladung des Partikels. Eine positive Ladung wird bei nicht-phagozytierenden Zellen für eine effiziente Partikelaufnahme als begünstigend beschrieben.¹² Dies konnte nach Kopplung des positiv geladenen Peptids Poly-L-Lysin bestätigt werden. Jedoch führt die Markierung von PLL-markierten sMPIOs zu einer Akkumulation innerhalb und außerhalb der Zelle. Demzufolge wurden für weitere therapeutische Anwendungen die negativ-geladenen COOH-sMPIOs verwendet, welche zwar eine geringere Markierungseffizienz pro Zelle aufweisen, aber nicht zur Akkumulation neigen. Gleichzeitig können diese Partikel für eine kovalente Kopplung therapeutischer Wirkstoffe leicht modifiziert werden.

Eine weitere wichtige Anforderung an den Partikel ist eine geringe Zytotoxizität, welche durch die Siliziumoxid-Schale ermöglicht wurde. Siliziumoxid ist biokompatibel und äußerst reaktionsträge, wodurch eine Intoxikation des Magnetits ausgeschlossen werden kann. Dies konnte mittels Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der Huh-7 Zellen und der Messung von Leberschädigungsparametern (AST, ALT) bei primären humanen Hepatozyten nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Da die Leber eine hohe enzymatische Aktivität besitzt, ist die systemische Applikation kleiner therapeutischer funktioneller Einheiten, unter anderem von antisense-miRNAs hinsichtlich ihrer Stabilität und Funktionalität problematisch. Um diese Hindernisse zu umgehen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit α -LNAs kovalent an die Carboxylgruppen des Partikels gebunden. Somit konnte eine hohe Stabilität und eine geringe Zugänglichkeit gegenüber Nukleasen gewährleistet werden. Ein weiterer Vorteil der kovalenten Bindung besteht in der intrazellulären Verfolgung des therapeutischen Effektes. Die kovalente Bindung von antisense-Oligonukleotiden an die Oberfläche superparamagnetischer Partikel, wurde bislang nur von Hwang et al beschrieben.¹³ Alle weiteren beschriebenen Partikel-gestützten Transfektionssysteme zur miRNA Depletion in der Zelle beruhen auf dem Einsatz nicht-magnetischen Materials und ermöglichen demnach keine Zellverfolgung im MRT.¹⁴

Mit der Kopplung der α -LNAs an der Oberfläche des Partikels konnte eine effiziente Depletion von über 80% der Let7g erreicht werden. Der hieraus resultierende funktionelle Effekt zeigte sich in einer vermehrten Expression der zellzyklus-assoziierten Proteine Cyclin D1 und c-Myc. Beide Proteine sind als Targets der Let7g bekannt. Die Let7-Familie war für die Evaluierung des Partikel-gestützten ‚Knockdowns‘ interessant, da sie in zahlreichen Prozessen wie z.B. der Zelldifferenzierung, der Tumorgenese als auch der Leberregeneration beteiligt ist.^{8,9,10,11} Dennoch konnte der Nachweis proliferativer Eigenschaften *in vivo* noch nicht erbracht werden. In einer unabhängigen Proteomanalyse konnten jedoch weitere Proteine nachgewiesen werden, welche in leberregenerativen Prozessen involviert sind.

Nach Zelltransplantation der sMPIO- α -LNA markierten Zellen konnte eine signifikante Signalauslöschung in der Leber des Empfängertiers im MRT festgestellt werden. Darüber hinaus bestätigten histologische Auswertungen die Akkumulation sMPIO- α -Let7e in der Leber.

Mit der Entwicklung des Partikels konnte bewiesen werden, dass eine Modulation der Proteinregulation und somit der Einsatz als Therapeutikum auf dem Gebiet der RNA Interferenz möglich ist. Zum anderen zeigte die initiale *in vivo* Studie, dass eine Zellverfolgung im MRT realisierbar ist. Demzufolge können die sMPIOs aufgrund ihres multifunktionalen Potentials als „theragnostische“ Partikel klassifiziert werden.

4. Diskussion

Perspektivisch stellen sie nicht nur in der Leberzelltransplantation, sondern darüber hinaus in der Tumorthherapie ein vielversprechendes therapeutisches Werkzeug dar.

Biomedizinische Grundlage für therapeutische Ansätze mittels RNA Interferenz bildet unter anderem die Evaluierung komplexer miRNA-Expressionssignaturen. Somit können zirkulierende miRNAs aus dem Blut sowie aus anderen Körperflüssigkeiten als potentielle prognostische Marker eingesetzt werden. Folglich wurden in einer klinischen Studie sowohl Proteine als auch miRNAs als Marker für eine akute Rejektion (ACR) nach Lebertransplantation ermittelt.

Die Lebertransplantation ist derzeit bei Patienten mit Leberzirrhose, hepatozellulärem Karzinom (HCC), ausgeprägten metabolischen Erkrankungen bzw. Autoimmunerkrankungen die Behandlung der Wahl. Trotz strenger Überwachung der Patienten und ständiger Optimierung der Immunsuppression tritt eine akute zelluläre Rejektion in 15 - 60 % der Patienten in den ersten postoperativen Monaten auf. Gegenwärtig wird ein Monitoring der Transaminasen der Leber bzw. von Gallensäuresynthesemarkern durchgeführt. Um andere Erkrankungen auszuschließen, wird bei einem Anstieg dieser Marker eine Biopsie entnommen und diese histologisch untersucht. Eine Biopsie stellt jedoch für den Patienten einen zusätzlichen chirurgischen Eingriff dar, der mit Risiken wie Blutungen, Schmerzen und Infektionen verbunden ist. Dem gegenüber wäre die Ermittlung von Biomarkern aus Körperflüssigkeiten eine denkbare nicht-invasive Alternativmethode, die Biopsie-assoziierte Komplikationen umgehen könnte.¹⁵

In der Studie wurden aus Serumproben von 94 Patienten das Proteinlevel von CD44 und CXCL9, welche als Marker für eine Allotransplantatabstoßung beschrieben sind, unmittelbar vor und ein bis vierzehn Tage nach Lebertransplantation bestimmt. Die Untersuchungen ergaben einen signifikanten Abfall von CD44 bei gleichzeitigem Anstieg von CXCL9 bei Patienten mit histologisch bestätigter ACR bereits zu Beginn der postoperativen Phase des Patienten (POD1). Die Kombination beider Biomarker führte zu einem positiven prognostischen Wert von 91% und einen negativen prognostischen Wert von 67% für eine klinische signifikante akute Rejektion. Alle Patienten, die positiv für die Biomarker waren, entwickelten innerhalb der folgenden 6 Monate nach Lebertransplantation eine ACR.¹⁵ Demzufolge könnten diese Biomarker für die

4. Diskussion

Evaluierung einer ACR in den ersten 6 Monaten nach Transplantation eingesetzt werden.

In den weiterführenden Untersuchungen wurden miRNAs sowohl im Blut als auch in der Gallenflüssigkeit bestimmt (*zwei Publikationen in Revision*). In der frühen postoperativen Phase ACR-positiver Patienten zeigte sich in der Galle eine signifikante Hochregulation vier verschiedener miRNAs (miR-122, miR-133a, miR-148a und miR-194). Die miR-122 ist eine leberspezifische miRNA und lässt auf einen Zelluntergang von Hepatozyten schließen. Alle weiteren untersuchten miRNAs sind mit verschiedenen inflammatorischen Prozessen assoziiert. Diese Veränderungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der miRNA Expression und einer Inflammation in der Leber bzw. im Gallengang hin.

Demzufolge könnten miRNAs als nicht-invasiv erhobene prognostische Marker mit einer Dysfunktion der Leber sowie der akuten Rejektion assoziiert werden.

Perspektivisch zeigen die beschriebenen Studien, dass miRNAs sowohl als prognostische Biomarker als auch als therapeutische Ziele verwendet werden können.

5. Literaturverzeichnis

1. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006; 82: 441-449.
2. Fiegel HC, Kaufmann PM, Bruns H, Kluth D, Horch RE, Vacanti JP, et al. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from the laboratory. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(1): 56-66.
3. Ribeiro AO, Schoof CR, Izzotti A, Pereira LV, Vasques LR. MicroRNAs: Modulators of Cell Identity, and their Applications in Tissue Engineering. *Microna*. 2014; 3(1): 45-53.
4. Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biol*. 2012; 199(3): 407-125.
5. Shu Y, Pi F, Sharma A, Rajabi M, Haque F, Shu D, et al. Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014; 66: 74-89.
6. Reimer P, Vosshenrich R. Kontrastmittel in der Radiologie, Aktuelle Zulassung, Empfehlung und Sicherheitshinweise. *Der Radiologe* 2013; 53(2): 153-164
7. Slotkin JR, Cahill KS, Tharin SA, Shapiro EM. Cellular magnetic resonance imaging: nanometer and micrometer size particles for noninvasive cell localization. *Neurotherapeutics*. 2007; 4(3): 428-433.
8. Raschzok N, Werner W, Sallmon H, Billecke N, Dame C, Neuhaus P, et al. Temporal expression profiles indicate a primary function for microRNA during the peak of DNA replication after rat partial hepatectomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300(6): 1363-1372.
9. Deng X, Li W, Chen N, Sun Y, Wei H, Jiang Y, et al. Exploring the priming mechanism of liver regeneration: proteins and protein complexes. *Proteomics*. 2009; 9(8): 2202-2216.
10. Cao H, Yu J, Xu W, Jia X, Yang J, Pan Q, et al. Proteomic analysis of regenerating mouse liver following 50% partial hepatectomy. *Proteome Sci*. 2009; 7:48.

11. Hsieh HC, Chen YT, Li JM, Chou TY, Chang MF, Huang SC, et al. Protein profilings in mouse liver regeneration after partial hepatectomy using iTRAQ technology. *J Proteome Res.* 2009; 8(2): 1004-1013.
12. Eleonore Fröhlich. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 5577-5591.
13. Hwang do W, Song IC, Lee DS, Kim S. Smart magnetic fluorescent nanoparticle imaging probes to monitor microRNAs. *Small.* 2010; 6(1): 81-88.
14. Kim JH, Yeom JH, Ko JJ, Han MS, Lee K, Na SY, et al. Effective delivery of anti-miRNA DNA oligonucleotides by functionalized gold nanoparticles. *J Biotechnol.* 2011; 155(3): 287-292.
15. Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, Morgul MH, Gauger U, Prabowo KA1, Tannus LM, Leder A, Struecker B, Boas-Knoop S, Bartels M, Jonas S, Lojewski C, Puhl G, Seehofer D, Bahra M, Pascher A, Pratschke J, Sauer IM. CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of clinically significant allograft rejection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2015 Sep; 21(9): 1195-1207.

6. Vorträge und Poster Präsentationen

Die ersten Ergebnisse der Studien zur Entwicklung eines mikroskaligen silica-basierten Eisenoxidpartikels konnten vorgestellt werden auf:

1. Langer CM et al. Development and *in vitro* evaluation of clinically applicable micron-sized silica-based iron oxide particles for cellular imaging with MRI. Joint Congress of Cell Transplant Society & International Xenotransplantation Association (CTS-IXA) in Miami, USA, 2011 (Vortrag)
2. Raschzok N et al. Development and *in vitro* evaluation of Silica-based iron oxide particles for MRI monitoring of liver cell transplantation. Molekulare Bildgebung in Jena, Deutschland, 2014 (Vortrag)
3. Langer CM et al. Development and *in vitro* evaluation of Silica-based iron oxide particles suitable for clinical application of cellular imaging with MRI. 27. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) in Regensburg, Deutschland, 2011 (Poster)
4. Langer CM et al. Development and *in vitro* evaluation of clinically applicable micron-sized Silica-based iron oxide particles for cellular imaging with MRI. 15th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT) in Glasgow, Schottland, 2011 (Poster)

Die Ergebnisse zur Depletion der miRNA-Let7g konnten erstmals vorgestellt werden auf:

1. Leder A et al. Artificial let-7g downregulation for induction of liver regeneration – initial results with hepG2 cells and primary human Hepatocytes. XXXVIII. Conference of the European Society for Artificial Organs in Porto, Portugal, 2011 (Poster)

6. Vorträge und Poster Präsentationen

Die Ergebnisse zur Manipulation primärer humaner Hepatozyten mittels RNA Interferenz konnten vorgestellt werden auf:

1. Raschzok N et al. Silica-Based Micron-Sized Iron Oxide Particles for Detection and Loco-Regional Stimulation of Transplanted Liver Cells. 24th International Congress of The Transplantation Society (TTS) in Berlin, Deutschland, 2012 (Vortrag)
2. Leder A et al. Micron-sized iron oxide particles for detection and locoregional stimulation of transplanted liver cells. XXXIX. Conference of the European Society for Artificial Organs in Rostock, Deutschland, 2012 (Vortrag)
3. Raschzok N et al. Loco-regional detection and stimulation of transplanted liver cells by particle-based miRNA depletion. 12th Congress of the Cell Transplant Society“ in Milan, Italien, 2013 (Vortrag)

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Annekatrin Leder, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung und Evaluierung eines mikroskaligen, oligonukleotid-gekoppelten Eisenoxidpartikels zur Stimulation kultivierter primärer humaner Hepatozyten.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „*Uniform Requirements for Manuscripts* (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zur Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Annekatriin Leder hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Leder A, Raschzok N, Schmidt C, Arabacioglu D, Butter A, Kolano S, de Sousa Lisboa LS, Werner W, Polenz D, Reutzel-Selke A, Pratschke J, Sauer IM. *Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells*. Biomaterials. 2015; 51: 129-137.

Impact Factor: 8,557

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung bei der Erhebung der Primärdaten (Isolierung von primären humanen Hepatozyten aus Resektaten, Partikelmarkierung der Zellen, Durchführung der Analytik qRT-PCR, Western Blot, Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie, Northern Blot, CellTiterGlo Assay, FISH-Typing Methode, Berliner Blau Färbung), Ermittlung der Partikelparameter, selbständige Durchführung der statistischen Auswertung und Erstellung dementsprechender Graphiken und Tabellen, Literaturrecherche, eigenständige Manuskripterstellung und Einreichung des Papers, eigenständige Beantwortung des Reviewers, Revision und erneutes Einreichen des Manuskriptes.

(70 Prozent)

Publikation 2:

Raschzok N, Langer CM, Schmidt C, Lerche KH, Billecke N, Nehls K, Schlüter NB, **Leder A**, Rohn S, Mogl MT, Lüdemann L, Stelter L, Teichgräber UK, Neuhaus P, Sauer IM. *Functionalizable silica-based micron-sized iron oxide particles for cellular magnetic resonance imaging*. Cell Transplant. 2013; 22(11): 1959-1970.

Impact Factor: 3,127

8. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung bei der Erhebung der Primärdaten (Isolierung von primären humanen Hepatozyten aus Resektaten, Betreuung und Durchführung der Zellkultur, des CellTiterGlo Assay), Mitwirkung bei der Analyse und Beurteilung der gewonnen Primärdaten, Mitwirkung der Verfassung und Korrektur des Manuskriptes.
(20 Prozent)

Publikation 3:

Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, Morgul MH, Gauger U, Prabowo KA, Tannus LM, **Leder A**, Struecker B, Boas-Knoop S, Bartels M, Jonas S, Lojewski C, Puhl G, Seehofer D, Bahra M, Pascher A, Pratschke J, Sauer IM. *CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of clinically significant allograft rejection after liver transplantation*. Liver Transpl. 2015; 21(9): 1195-1207.

Impact Factor: 4,241

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung bei der Erhebung der Primärdaten (Betreuung und Durchführung der Proteinaufreinigung aus Serumproben), Korrektur des Manuskriptes.
(10 Prozent)

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

I. Anhang

I.I. Originalarbeiten

Leder A, Raschzok N, Schmidt C, Arabacioglu D, Butter A, Kolano S, de Sousa Lisboa LS, Werner W, Polenz D, Reutzel-Selke A, Pratschke J, Sauer IM.

Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells.

Biomaterials. 2015; 51: 129-137.

Impact factor: 8,557

Raschzok N, Langer CM, Schmidt C, Lerche KH, Billecke N, Nehls K, Schlüter NB, Leder A, Rohn S, Mogl MT, Lüdemann L, Stelter L, Teichgräber UK, Neuhaus P, Sauer IM. *Functionalizable silica-based micron-sized iron oxide particles for cellular magnetic resonance imaging.*

Cell Transplant. 2013; 22(11): 1959-1970.

Impact factor: 3,127

Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, Morgul MH, Gauger U, Prabowo KA, Tannus LM, Leder A, Struecker B, Boas-Knoop S, Bartels M, Jonas S, Lojewski C, Puhl G, Seehofer D, Bahra M, Pascher A, Pratschke J, Sauer IM.

CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of clinically significant allograft rejection after liver transplantation.

Liver Transpl. 2015; 21(9): 1195-1207.

Impact factor: 4,241

Biomaterials. 2015 May; 51: 129-137.

<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.biomaterials.2015.01.065>

Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells.

Leder A¹, Raschzok N², Schmidt C³, Arabacioglu D², Butter A², Kolano S², de Sousa Lisboa LS², Werner W², Polenz D², Reutzel-Selke A², Pratschke J², Sauer IM².

Author information

- ¹ General, Visceral, and Transplantation Surgery, Experimental Surgery and Regenerative Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany. Electronic address: annekatrin.leder@charite.de.
- ² General, Visceral, and Transplantation Surgery, Experimental Surgery and Regenerative Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany.
- ³ Microparticles GmbH, 12489 Berlin, Germany.

Abstract

Particle-based delivery systems for therapeutic manipulation and tracking of transplanted cells by magnetic resonance imaging (MRI) are commonly based on nanometer-sized superparamagnetic iron oxide particles (SPIOs). Here, we present a proof of concept for multifunctional, silica based micron-sized iron oxide-containing particles (sMPIO) that combine fluorescence imaging, MRI tracking, and on-the-spot targeting of specific microRNAs on a particle surface for therapeutic manipulation by RNA interference. Antisense locked nucleic acids (α -LNA) were covalently bound to the surface of silica-based, DAPI-integrated, micron-sized iron oxide particles (sMPIO- α -LNA). In vitro studies using primary human hepatocytes showed rapid particle uptake (4 h) that was accompanied by significant depletion of the targeted microRNA Let7g (80%), up-regulation of the target proteins Cyclin D1 and c-Myc, and specific proteome changes. sMPIO- α -LNA-labeled cells were successfully detected by fluorescence imaging and could be visualized by MRI after intrasplenic transplantation in rats. This new theranostic particle provides a promising tool for cell transplantation where cellular imaging and microRNA-based manipulation is needed.

Keyword

Antisense oligonucleotides; Hepatocytes; MPIO; MRI; miRNA

Cell Transplant. 2013;22(11):1959-70.

<http://dx.doi.org/10.3727/096368912X661382>

Functionalizable silica-based micron-sized iron oxide particles for cellular magnetic resonance imaging.

Raschzok N¹, Langer CM, Schmidt C, Lerche KH, Billecke N, Nehls K, Schlüter NB, Leder A, Rohn S, Mogl MT, Lüdemann L, Stelter L, Teichgräber UK, Neuhaus P, Sauer IM.

Author information

- ¹ General, Visceral, and Transplantation Surgery, Experimental Surgery and Regenerative Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

Abstract

Cellular therapies require methods for noninvasive visualization of transplanted cells. Micron-sized iron oxide particles (MPIOs) generate a strong contrast in magnetic resonance imaging (MRI) and are therefore ideally suited as an intracellular contrast agent to image cells under clinical conditions. However, MPIOs were previously not applicable for clinical use. Here, we present the development and evaluation of silica-based micron-sized iron oxide particles (sMPIOs) with a functionalizable particle surface. Particles with magnetite content of >40% were composed using the sol-gel process. The particle surfaces were covered with COOH groups. Fluorescein, poly-L-lysine (PLL), and streptavidin (SA) were covalently attached. Monodisperse sMPIOs had an average size of 1.18 μm and an iron content of about 1.0 pg Fe/particle. Particle uptake, toxicity, and imaging studies were performed using HuH7 cells and human and rat hepatocytes. sMPIOs enabled rapid cellular labeling within 4 h of incubation; PLL-modified particles had the highest uptake. In T2*-weighted 3.0 T MRI, the detection threshold in agarose was 1,000 labeled cells, whereas in T1-weighted LAVA sequences, at least 10,000 cells were necessary to induce sufficient contrast. Labeling was stable and had no adverse effects on labeled cells. Silica is a biocompatible material that has been approved for clinical use. sMPIOs could therefore be suitable for future clinical applications in cellular MRI, especially in settings that require strong cellular contrast. Moreover, the particle surface provides the opportunity to create multifunctional particles for targeted delivery and diagnostics.

Keywords

Cell transplantation; Hepatocyte transplantation; Magnetic resonance imaging (MRI); Silica; Theranostics

Liver Transpl. 2015 Sep;21(9):1195-207.

<http://dx.doi.org/10.1002/lt.24164>

CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of clinically significant allograft rejection after liver transplantation.

Raschzok N¹, Reutzel-Selke A¹, Schmuck RB¹, Morgul MH², Gauger U³, Prabowo KA¹, Tannus LM¹, Leder A¹, Struecker B¹, Boas-Knoop S¹, Bartels M², Jonas S⁴, Lojewski C¹, Puhl G¹, Seehofer D¹, Bahra M¹, Pascher A¹, Pratschke J¹, Sauer IM¹.

Author information

- ¹ General, Visceral, and Transplantation Surgery, Experimental Surgery and Regenerative Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.
- ² Visceral, Transplantation, Thoracic, and Vascular Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany.
- ³ Private Statistical Office, Berlin, Germany.
- ⁴ Centre Hépatobiliaire, Hôpital Paul Brousse, Université Paris Sud, Villejuif, France.

Abstract

The diagnosis of acute cellular rejection (ACR) after liver transplantation is based on histological analysis of biopsies because noninvasive biomarkers for allograft rejection are not yet established for clinical routines. CD31, CD44, and chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 9 have previously been described as biomarkers for cross-organ allograft rejection. Here, we assessed the predictive and diagnostic value of these proteins as serum biomarkers for clinically significant ACR in the first 6 months after liver transplantation in a prospective study. The protein levels were measured in 94 patients immediately before transplantation, at postoperative days (PODs) 1, 3, 7, and 14 and when biopsies were performed during episodes of biochemical graft dysfunction. The CD44 serum protein levels were significantly lower at POD 1 in patients who experienced histologically proven ACR in the follow-up compared with patients without ACR ($P < 0.001$). CXCL9 was significantly higher before transplantation ($P = 0.049$) and at POD 1 ($P < 0.001$) in these patients. Low CD44 values (cutoff, <200.5 ng/mL) or high CXCL9 values (cutoff, >2.7 ng/mL) at POD 1 differentiated between rejection and no rejection with a sensitivity of 88% or 60% and a specificity of 61% or 79%, respectively. The combination of both biomarker cutoffs at POD 1 had a positive predictive value of 91% and a negative predictive value of 67% for clinically significant ACR. Moreover, CD44 was significantly lower at the time of ACR ($P < 0.001$) and differentiated the rejection group from patients with graft dysfunction due to other reasons. Our results suggest that CD44 and CXCL9 may serve as predictive biomarkers to identify liver allograft recipients at risk for clinically significant ACR.

I.II. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen
Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

I.III. Publikationsliste

2015

Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, Morgul MH, Gauger U, Prabowo KA, Tannus LM, Leder A, Struecker B, Boas-Knoop S, Bartels M, Jonas S, Lojewski C, Puhl G, Seehofer D, Bahra M, Pascher A, Pratschke J, Sauer IM. CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of clinically significant allograft rejection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2015; 21(9): 1195-1207.

Leder A, Raschzok N, Schmidt C, et al. Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells, *Biomaterials.* 2015; 51: 129-137.

2014

Werner W, Sallmon H, Leder A, et al. Independent effects of sham laparotomy and anesthesia on hepatic microRNA expression in rats. *BMC Res Notes.* 2014; 7: 702.

Struecker B, Butter A, Hillebrandt K, Polenz D, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Leder A, et al. Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014; 4.

2013

Raschzok N, Langer CM, Schmidt C, Lerche KH, Billecke N, Nehls K, Schlüter NB, Leder A. Functionalizable silica-based micron-sized iron oxide particles for cellular magnetic resonance imaging. *Cell Transplant.* 2013; 22(11) :1959-1970.

2010

Ulbrich C, Leder A, Pietsch J, et al. The impact of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on cardiac fibroblasts grown under altered gravity conditions. *Cell Physiol Biochem.* 2010; 26(6): 1011-1022.

Ulbrich C, Westphal K, Pietsch J, Winkler HD, Leder A, et al. Characterization of human chondrocytes exposed to simulated microgravity. *Cell Physiol Biochem.* 2010; 25(4-5): 551-560.

2008

Infanger M, Grosse J, Westphal K, Leder A, et al. Vascular endothelial growth factor induces extracellular matrix proteins and osteopontin in the umbilical artery. *Ann Vasc Surg.* 2008; 22(2): 273-284.

I.IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Igor Maximilian Sauer herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich an meine Arbeitsgruppe richten, welche mich fachlich wie auch moralisch bei der Realisierung meines Promotionsvorhabens unterstützt hat.

Für sein umfangreiches Wissen und unseren regen wissenschaftlichen Austausch möchte ich Herrn Dr. Christian Schmidt besonders danken.

Für die Unterstützung bei der Isolation primärer humaner Hepatozyten und der schönen Zusammenarbeit im Labor möchte ich ein großes Dankeschön an alle Kolleginnen und Kollegen, insbesondere an Frau Antje Butter richten.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Anja Reutzel-Selke und Herrn Dietrich Polenz in erster Linie für ihre moralische und fachliche Unterstützung als auch deren geduldige Hilfe in organisatorischen Fragen beziehungsweise bei alltäglichen Problemen bedanken.

Für die Einführung in den Laboralltag als auch seiner herzlichen Beharrlichkeit möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Steffen Lippert bedanken.

Nicht minder aufreibend waren die Jahre auch für Herrn Christoph Alms und Frau Wiebke Werner, die mich mit ihrer liebevollen Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Abschließend bedanke ich mich mit besonderem Nachdruck bei meiner Familie, welche mich in verzweifelten Momenten aufgebaut und mit Rat an meiner Seite stand.