

Aus dem
CharitéCentrum 8 für Chirurgische Medizin
Chirurgische Klinik
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum
Direktor: Professor Dr. med. Johann Pratschke

Habilitationsschrift

**Entwicklung und Evaluation von Konzepten zur Partikel-
vermittelten Verfolgung transplantierte Leberzellen in der
Magnetresonanztomographie**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Nathanael Johannes Raschzok
geboren in Neuendettelsau

Eingereicht:	August 2016
Dekan:	Prof. Dr. Axel Radlach Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. Brigitte Vollmar
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. Michael Oertel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Leberzelltransplantation	4
1.2. Konzepte zur nicht-invasiven Lokalisierung transplanteder Leberzellen	7
1.3. Zellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln	10
1.4. Zielsetzungen	12
2. Eigene Arbeiten	15
2.1. Quantifizierung der Zellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln	15
2.2. <i>In vitro</i> Vergleich von nanoskaligen und mikroskaligen Eisenoxidpartikeln	22
2.3. Evaluierung im Schweinmodell: Bildgebung und Applikationsrouten	33
2.4. Evaluierung im Schweinmodell: Nachverfolgung unter Echtzeit-Bedingungen	47
2.5. Entwicklung von Silikat-basierten mikroskaligen Eisenoxidpartikeln	55
2.6. Weiterentwicklung der Silikat-basierten Eisenoxidpartikel: Ultralokoregionäre Lokalisierung und Manipulierung transplanteder Zellen	68
3. Diskussion	78
4. Zusammenfassung	85
5. Liste der in dieser Schrift zusammengefassten Publikationen	86
6. Literatur	87
7. Danksagung	93
8. Erklärung	94

1. Einleitung

Die Leber ist eines der wichtigsten Organe des menschlichen Organismus. Ihre Funktionen umfassen die Entgiftung des Körpers von Protein-gebundenen Toxinen, die Synthese von Proteinen wie z.B. Gerinnungsfaktoren und Albumin, und die Regulation wichtiger Regelkreisläufe wie z.B. der Säure-Base-Haushalt oder die Energieversorgung des zentralen Nervensystems (1). Wenn es durch virale Hepatitiden oder durch chronische Einwirkung von Hepatotoxinen zu einem zirrhotischen Umbau der Leber gekommen ist, ist ein Ersatz des Organs durch eine Transplantation notwendig (2). Auch bei angeborenen hepatischen Stoffwechselerkrankungen ist eine Heilung oftmals nur durch eine Lebertransplantation möglich (3). Artifizielle oder bioartifizielle Leberunterstützungssysteme, welche die Funktion der Leber in Teilen ersetzen können, ermöglichen lediglich eine temporäre Überbrückung der Leberfunktion bis zu einer möglichen Regeneration oder Transplantation (4).

Die Lebertransplantation stellt heute ein etabliertes und standardisiertes Therapieverfahren für das akute und chronische Leberversagen, für bestimmte Stadien des Hepatozellulären Karzinoms, und für angeborene Leberstoffwechseldefekte dar (2). Allerdings ist die Verfügbarkeit der Lebertransplantation durch die Abhängigkeit von Spenderorganen limitiert. In Deutschland dürfen Organe ausschließlich nach Hirntod des Spenders oder im Rahmen einer Lebendspende entnommen werden. Bedingt durch die zurückgehende Spendebereitschaft in der Bevölkerung, ist es insbesondere in den letzten Jahren zu einem deutlichen Rückgang der Anzahl an Lebertransplantationen gekommen (5). Aufgrund der Weiterentwicklungen in der Intensivmedizin und dem zunehmende Alter der Bevölkerung stehen oftmals vorgeschädigte, *marginale* Organe zur Transplantation zur Verfügung, welche mit einem erhöhten Risiko für eine Transplantatdysfunktion oder ein Transplantatversagen assoziiert sind (6). Im Labor durch Verfahren des *tissue engineering* erzeugtes Lebergewebe könnte eine mögliche Lösung für den Organmangel darstellen, diese Konzepte haben jedoch noch nicht die Phase der klinischen Anwendung erreicht (4). Demensprechend steht einem stetig abnehmenden Organangebot eine konstant hohe Zahl von Patienten auf der Warteliste gegenüber.

1.1. Leberzelltransplantation

Die Leberzelltransplantation wird seit den 1970er Jahren als mögliche Alternative zur Lebertransplantation entwickelt (7,8). Leberzellen können mittels eines enzymatischen Verdauerverfahrens aus dem Gewebeverbund isoliert und in Suspension entweder in die Leber oder an ektope Implantationsorte implantiert werden. Die Transplantation in die Leber kann entweder über die V. porta oder über eine zuführende Mesenterialvene erfolgen. Als ektope Implantationsorte stehen beispielweise die Milz oder das Omentum majus zur Verfügung. Transplantierte Zellen werden entweder nach Durchwanderung der Endothelzellbarriere in der Empfängerleber integriert oder siedeln sich im ektope Gewebe an (9). Die Galleexkretion erfolgt über die ableitenden Strukturen der Leber oder, nach ektope Implantation, systemisch durch Exkretion in den Blutkreislauf (10). Die transplantierten Zellen sollen das Empfängerorgan besiedeln und idealerweise die erkrankten Zellen verdrängen. Beim akuten oder chronischen Leberversagen soll so die Funktion der Leber unterstützt oder ersetzt werden, bei angeborenen hepatischen Stoffwechseldefekten soll durch die gesunden Leberzellen, welche das fehlende Gen exprimieren, der entsprechende Gendefekt korrigiert werden (11).

Im Vergleich zur Lebertransplantation bietet die Leberzelltransplantation verschiedene konzeptuelle Vorteile (8,12):

- I) Leberzellen können aus Spenderorganen isoliert werden, welche für die Organtransplantation aufgrund von Veränderungen des Parenchym, der Gefäßanatomie oder aufgrund von Verletzungen nicht geeignet sind. Darüber hinaus können mehrere Empfänger mit den Zellen eines Spenderorgans behandelt werden.
- II) Leberzellen können nach der Isolierung kryokonserviert werden und dadurch – im Gegensatz zur Organtransplantation – geplant und bedarfsweise appliziert werden.
- III) Die Leberzelltransplantation ist deutlich weniger invasiv als die Organtransplantation und bietet sich dementsprechend für die Therapie von sehr jungen oder kritisch kranken Patienten an.
- IV) Durch die Ansiedelung in der Empfängerleber oder an einem ektope Implantationsort können die transplantierte Leberzellen ihre metabolische

Funktion für den Empfängerorganismus bereitstellen, während die erkrankte Leber nicht entfernt werden muss und die Chance auf Regeneration verbleibt.

- V) Darüber hinaus können autologe Leberzellen beispielsweise bei bestimmten Gendefekten vor der Transplantation gentherapeutisch manipuliert werden.

Nach erfolgreicher Evaluierung und Etablierung im Kleintiermodell wurde die Leberzelltransplantation für alle großen Indikationen der Lebertransplantation untersucht. Kleinere Fallserien und Einzelfallberichte zur Therapie des akuten Leberversagens zeigen jedoch kein überzeugendes Ergebnis. Bei in der Literatur bislang beschriebenen 37 Fällen kam es lediglich bei 8 Patienten zu einer vollständigen Wiederherstellung der Leberfunktion, 6 Patienten mussten nach Leberzelltransplantation mit einer Lebertransplantation behandelt und 23 Patienten verstarben trotz Leberzelltransplantation. Als Ursachen für dieses unbefriedigende Ergebnis werden eine nicht ausreichende Zellmenge sowie die für die Zellansiedelung ungünstige Umgebung in der erkrankten Leber diskutiert. Klinische Untersuchungen zur Leberzelltransplantation beim chronischen Leberversagen erzielten ein noch schlechteres Ergebnis. Bei den in der Literatur beschriebenen Fällen konnte in keinem Fall eine dauerhafte Heilung des Patienten erreicht werden (8,12).

Im Gegensatz dazu hat die klinische Evaluierung der Leberzelltransplantation bei hepatischen Stoffwechselerkrankungen im Neugeborenen- oder Kindesalter deutlich vielversprechendere Ergebnisse erzielt. Bei angeborenen Störungen der Entgiftungsfunktion der Leber, wie beispielsweise dem Crigler-Najjar Syndrom Typ 1, der Glykogenspeichererkrankung oder bei Erkrankungen des Harnstoffzyklus, wurde ein temporärer metabolischer Vorteil durch die Leberzelltransplantation beschrieben. Es gelang in fast allen beschriebenen Fällen, die Patienten über ein Intervall von einigen Monaten oder wenigen Jahren bis zu einer konsekutiven Organtransplantation zu stabilisieren. Für den Faktor-VII-Mangel wurde in einem Bericht von zwei Patienten beispielsweise eine Verringerung des Faktor-VII-Bedarfs um 70 % beschrieben. In der Mehrzahl der Fälle musste jedoch auch bei diesen Patienten zweizeitig eine Lebertransplantation durchgeführt werden (11,12).

Diese Ergebnisse zeigen, dass zahlreiche Verbesserungen notwendig sind, um die Leberzelltransplantation zu einem erfolgreichen klinischen Verfahren weiter zu entwickeln. Neben der begrenzten Verfügbarkeit von humanen Leberzellen für die Transplantation (13) stellen insbesondere die unzureichende Ansiedelung der transplantierten Leberzellen in den Zielorganen sowie ihr zeitlich begrenztes Überleben die grundsätzlichen Probleme für die erfolgreiche klinische Etablierung dieses Therapieverfahrens dar (14). Aus Kleintiermodellen ist beispielweise bekannt, dass bis zu 70-80% der transplantierten Zellen in den Sinusoiden verbleiben und dort vom angeborenen Immunsystem abgebaut werden (15,16). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von histo-pathologischen Untersuchungen von Leberexplantaten nach vorausgegangener Leberzelltransplantation über die Pfortader zur Therapie von hepatischen Stoffwechselerkrankungen im Kindesalter. Spenderleberzellen konnten in Form von Mikrothromben im Endstromgebiet der Pfortader, jedoch nicht im Parenchym der Empfängerlebern nachgewiesen werden (14). Möglicherweise hat der Applikationsweg einen Effekt auf das Anwachsverhalten der transplantierten Zellen: Im Kleintiermodell wird ein erfolgreiches Anwachsen von Zellen in der Empfängerleber sowohl nach Transplantation über die Pfortader als auch nach Applikation in die Milz und konsekutiver Translokation über das portovenöse System berichtet. Während die intrasplenische Injektion das etablierte Verfahren für die Leberzelltransplantation und Zellansiedelung in der Leber im Nagermodell darstellt (17), gibt es beim Menschen – abgesehen von Fallberichten (18,19) – keine gesicherten Daten über den Verbleib von Leberzellen nach Transplantation in die Milz. Eine nicht-invasive Nachverfolgung der transplantierten Zellen ist bislang nicht möglich, da transplantierte Zellen mittels der klinisch etablierten bildgebenden Verfahren nicht dargestellt werden können (12). Durch die Messung von spezifischen Stoffwechselprodukten der transplantierten Zellen kann lediglich eine Aussage über deren metabolische Aktivität, nicht jedoch über ihr Anwachsverhalten oder hinsichtlich einer möglichen Zellproliferation getroffen werden (20). Gewebeproben für histologische Untersuchungen können entweder durch Leberbiopsie oder im Rahmen einer konsekutiven Lebertransplantation gewonnen werden und lediglich Momentaufnahmen von der Situation im Empfängerorganismus abbilden (21). Dementsprechend konnte bislang nicht geklärt werden, wann und wo es im Patienten zu einem Verlust der transplantierten Zellen kommt und welcher

Applikationsweg die besten Bedingungen für ein erfolgreiches Anwachsen der Zellen bietet.

1.2. Konzepte zur nicht-invasiven Lokalisierung transplanierter Leberzellen

Zur nicht-invasiven Lokalisierung und Nachverfolgung von transplantierten Leberzellen werden in der Literatur Radionuklid-basierte Verfahren, optische Verfahren, und die Magnetresonanztomographie (MRT) beschrieben und in einer eigenen vorab publizierten Übersichtsarbeit zusammengefasst (12):

Radionuklid-basierte Verfahren wie die Szintigraphie, Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) oder die Positronen-Emissions-Computertomographie (PET-CT) zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus (22,23). Leberzellen können entweder *in vitro* vor oder *in vivo* mit dem entsprechenden Radionuklid markiert werden. Die *in vivo* Markierung bedient sich hierbei der spezifischen Rezeptorexpression von Leberzellen, wie z.B. dem Asialoglycoprotein-Rezeptor, welcher eine selektive Aufnahme von intravenös applizierten Radionukleotiden wie z.B. Technetium-99m markiertem Galactosyl-Serumalbumin ermöglicht (24). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit Radionukliden markierte Leberzellen wurden bereits klinisch für die nicht-invasive Nachverfolgung von transplantierten Leberzellen verwendet. In der erstmaligen Beschreibung einer Leberzelltransplantation in Menschen durch Mito et al. aus dem Jahr 1992 wurden die transplantierten Leberzellen mittels Technetium-99m visualisiert (25). In Rahmen dieser Studie waren bei Patienten mit Zirrhose oder chronischer Hepatitis autologe Leberzellen aus Leberteileresektaten gewonnen und mittels intrasplenischer Injektion in die Milz retransplantiert worden. Durch ihre selektiven Bindungsaffinität für Technetium-99m konnten transplantierte Hepatozyten nach 11 Monaten in der Milz der Empfänger nachgewiesen werden, wenngleich mit Ausnahme eines Patienten kein klinischer Effekt durch die Leberzelltransplantation erzielt werden konnte. Sterling und Fisher et al. konnten mit demselben Verfahren allotransplantierte Leberzellen in einem Patienten bis zu 23 Tage nach Transplantation nachweisen (26). Bohnen et al. gelang es, *in vitro* mit Indium-111 markierte Leberzellen bis zu 48 Stunden nach Applikation über die Pfortader

in der Leber eines Patienten mit Ornithin-Transcarbamylase-Mangel zu visualisieren (27). Hickey et al. zeigten in einer kürzlich erschienenen Arbeit, dass Leberzellen nach Transfektion mit dem Natrium-Iodid Symporter-Gen durch die selektive Aufnahme von Radionuklid-markiertem Iodid acht Monate nach allogener Zelltransplantation im Schweinmodell mittels PET-CT nachgewiesen werden konnten (28). Radionuklid-basierte Verfahren können dementsprechend zur nicht-invasiven Darstellung der Verteilung transplantierte Leberzellen an ektopen Implantationsorten genutzt werden. Zum Nachweis transplantierte Zellen in der Empfängerleber ist entweder eine *ex vivo* Markierung mit einem Radionuklid mit begrenzter Halbwertszeit vor Transplantation oder eine bislang für die klinische Anwendung nicht zugelassene genetische Manipulation notwendig, um die Expression eines für eine selektive Bindung eines Radionuklid-Tracers erforderlichen Rezeptors zu induzieren. Ein Einzelzell-Nachweis transplantierte Leberzellen mittels Radionuklid-basierter Verfahren wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Optische Verfahren basieren auf der Detektion von Biolumineszenz oder Fluoreszenz mittels konventioneller Intravitalmikroskope oder neueren Verfahren wie beispielsweise der quantitativen Fluoreszenztomographie (29). Koenig et al. beschrieben erstmals die Anwendung eines optischen Verfahrens zur Visualisierung von transplantierte Hepatozyten (30). Dipeptidylpeptidase-positive Leberzellen konnten in der Leber von Dipeptidylpeptidase-negativen Ratten durch Zuhilfenahme eines Cy5.5-markierten Antikörpers über einen Zeitraum von 16 Wochen nach intra-splenischer Applikation nachverfolgt werden. Die klinische Anwendung von optischen Verfahren ist jedoch aufgrund der begrenzten Eindringtiefe optischer Verfahren von wenigen Millimeter bis Zentimeter limitiert.

Die MRT bietet als strahlungsfreies, klinisch etabliertes und weitgehend flächendeckend verfügbares bildgebendes Verfahren sowohl eine hohe räumliche Auflösung (Submillimeterbereich) als auch einen hohen Weichteilkontrast. Da MRT-Untersuchungen ohne eine relevante Beeinträchtigung des Patienten vielfach wiederholt werden können, scheint die MRT für die Langzeit-Nachverfolgung von transplantierte Leberzellen besonders geeignet zu sein (31,32). Die MRT basiert auf der Anregung von

Wasserstoffprotonen durch eine Kombination von statischen und hochfrequenten magnetischen Feldern. Durch ein kurzzeitig angelegtes hochfrequentes Wechselfeld (energiearme Radiowellen) lässt sich die Magnetisierung der Protonen aus der Richtung des statischen Feldes auslenken, was zu einer Präzession der Atomkerne um die Feldrichtung des statischen Magnetfeldes führt. Diese Präzessionsbewegung der Gewebemagnetisierung induziert eine elektrische Spannung in einer Messspule, aus der sich ein Abbild des untersuchten Areales konstruiert lässt. Nach Abschalten des hochfrequenten Magnetfeldes richten sich die Wasserstoffkerne durch Energieabgabe an die umgebenden Moleküle (Spin-Gitter-Relaxation, T1) und an die Umgebung (Spin-Spin-Relaxation, T2) wieder parallel zum statischen Magnetfeld aus. Die Relaxationszeit gibt die Zeit an, welche die Kerne hierfür benötigen. Diese charakteristische Relaxation ist von der molekularen Umgebung abhängig, wodurch sich verschiedene Gewebearten charakteristisch unterscheiden und zu unterschiedlichen Helligkeiten im resultierenden Bild führen. Der Kontrast eines Bildes wird durch die T1- und T2/T2*-Relaxation sowie die Protonendichte bestimmt und durch die Wichtung eines Kontrastparameters betont (33,34). Die Auflösung der MRT hängt maßgeblich von der Feldstärke des Magnetresonanztomographen und damit von der Größe der verwendeten Spulen ab. Klinische Magnetresonanztomographen verwenden in der Regel eine Feldstärke von 1,0 – 3,0 Tesla, die Größe der Empfangsspule ist durch die Größe des zu untersuchenden Körperteils bedingt. Eine Reduktion der Feldstärke oder eine Vergrößerung der Spule führt zu einer Verminderung der Sensitivität, des Kontrasts, und der Bildauflösung (35). Um transplantierte Zellen mittels MRT zu visualisieren, ist eine Markierung mit einem intrazellulären Kontrastmittel erforderlich. Hierfür werden bevorzugt superparamagnetische Eisenoxidpartikel genutzt, welche eine starke Störung des Magnetfelds induzieren. Wenn diese Partikel einem externen Magnetfeld ausgesetzt werden, führt die Orientierung der magnetischen Dipole zu einer lokalen Unterbrechung des Magnetfelds. Partikel-markierte Zellen imponieren in T2- oder T2*-gewichteten Sequenzen als Signalauslöschungen, ihre Detektierbarkeit hängt von der Menge an inkorporierten Partikeln, den magnetischen Eigenschaften der Partikel, und der Partikelgröße ab (36).

1.3. Zellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln

Superparamagnetische Eisenoxidpartikel mit einer Größe von mehr >50 nm (*superparamagnetic iron oxide particles*, SPIO) bis zu mehreren Mikrometern wurden erfolgreich für die Markierung von Leberzellen evaluiert. Sie bestehen aus einem Eisenkern und einer Beschichtung, welche eine Aggregation und Toxizität durch Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) verhindern sollen.

In einer eigenen ersten Vorarbeit wurden superparamagnetische, nanoskalige Eisenoxidpartikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm zur Markierung von primären humanen Hepatozyten verwendet (37). Die Oberfläche dieser mit Aminosilan beschichteten *MagForce*-Partikel (MagForce Applications GmbH, Berlin, Germany) war mit dem Membrantranslokationspeptid Tat des Humanen Immundefizienz-Virus funktionalisiert worden. Dies ermöglichte eine Markierung von in Adhäsion kultivierten Leberzellen in einer Inkubationszeit von nur einer Stunde. Mit einem klinischen Magnetresonanztomographen mit einer Feldstärke von 3,0 Tesla und einer 2 cm durchmessenden Oberflächenspule konnten Partikel-markierte Zellen im Agarose-Phantom mit einer T2*-gewichteten Sequenz als punktuelle Signalauslöschungen visualisiert werden. Puppi et al. verwendeten *Endorem/Feridex*-Eisenoxidpartikel (Guebert GmbH, Sulzbach, Deutschland) mit einem Durchmesser von 50-180 nm, zur Markierung von primären humanen Hepatozyten (38). Diese Dextran-beschichteten SPIO-Nanopartikel waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen als leberspezifisches Kontrastmittel für die klinische Anwendung zugelassen (39). Wie von Puppi et al. beschrieben, können in Adhäsion kultivierte humane Leberzellen nach 18-stündiger Inkubationsphase mit *Endorem*-Partikeln markiert werden. Die Inkubation führt zu einer Zeit- und Dosisabhängigen Zunahme der intrazellulären Eisenkonzentration, jedoch auch zu einer verminderten Proteinsynthese der markierten Leberzellen. Puppi et al. zeigten mittels einem experimentellen 7,0 Tesla MRT eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an SPIO-markierten Leberzellen und einem Signalabfall in der MRT. Als minimale detektierbare Zellzahl wurden 2.000 markierte Zellen/ μ l identifiziert. Die bildgebenden Eigenschaften der *Endorem/Feridex*-markierten Leberzellen wurden in der Maus *in vivo* evaluiert: Zwei Stunden nach intrasplenischer Transplantation von SPIO-markierten humanen Hepatozyten konnte ein Signalabfall in der Leber gemessen

werden, während nicht-markierte Zellen keine Signaländerungen induzierten. Diese MRT-Untersuchungen erfolgten allerdings *ex vivo* nach Einbettung der Lebern in einem Agarose-Phantommodell, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Erste Ergebnisse zur Detektierbarkeit von SPIO-markierten Zellen in der Leber unter klinischen Bedingungen wurden von Shi et al. beschrieben (40). Mesenchymale Stammzellen wurden mit Endorem/Feridex-Partikeln markiert und über die Pfortader in die Leber von Schweinen mit D-Galactosamin-induziertem akuten Leberversagen transplantiert. Shi et al. beobachteten dabei einen Signalabfall der Leber in einer MRT-Untersuchung sechs Stunden nach intrahepatischer Zellapplikation und konnten dies mit Berliner-Blau-positiven Zellen korrelieren. Der Signalverlust in der MRT zeigte sich an den darauffolgenden Untersuchungstagen rückläufig. In Zusammenfassung zeigen diese Ergebnisse, dass die Markierung von Leberzellen mit SPIO zu einem in der MRT nachweisbaren Signalabfall führt. Eine Visualisierung einzelner Zellen konnte in diesen beschriebenen Arbeiten jedoch nicht erzielt werden.

Die Größe des Signalabfalls eines superparamagnetischen Partikels im Magnetfeld ist größer als die physikalische Größe des Partikels („*Blooming-Effekt*“). Mikroskalige Eisenoxidpartikel induzieren im Vergleich zu nanoskaligen Partikel mit gleichem Eisengehalt einen stärkeren Effekt auf die Hypointensität im MRT-Bild (41). Um diese Vorteile für die Nachverfolgung transplantierte Leberzellen mittels MRT zu nutzen, wurden mikroskalige Eisenoxidpartikel als intrazelluläres Kontrastmittel für transplantierte Leberzellen evaluiert. Shapiro et al. verwendeten kommerziell verfügbare, mikroskalige Eisenoxidpartikel (MPIO, Bangs Laboratories, IN, USA) mit einem Durchmesser von 0,96 – 5,9 µm für die Markierung von murinen Hepatozyten (42). Mittels experimenteller Magnetresonanztomographen mit Feldstärken von 7,0 und 11,0 Tesla gelang *in vitro* ein Einzelzellnachweis MPIO-markierter Zellen. In einer Folgearbeit zeigten Shapiro et al., dass murine Hepatozyten nach Markierung mit 1,63 µm durchmessenden MPIOs und unter Verwendung eines Magnetresonanztomographen mit einer Feldstärke von 7,0 Tesla, einer 35 mm durchmessenden Oberflächenspule und einer T2*-gewichteten Sequenz *in vivo* auf Einzelzellniveau detektiert werden konnten (43). Kontrollgruppen mit Partikelsuspension, nicht-markierten Leberzellen und avitale MPIO-markierten Leberzellen zeigten lediglich

unspezifische Signaländerungen. In einer eigenen Vorarbeit wurde ein Protokoll zur Markierung von in Adhäsion kultivierten primären humanen Hepatozyten mit MPIOs mit einem Durchmesser von 1,6 µm etabliert (44). Nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden konnte eine Markierung von annähernd 100% der inkubierten Zellen mit durchschnittlich 18 Partikel/Zelle erzielt werden. Da eine kolorimetrische Bestimmung des Eisengehalts der MPIO-markierten Zellen aufgrund der Partikel-Enkapsulierung mit einem Polymer aus Styrol und Divinylbenzol nicht möglich war, wurde die Partikelaufnahme lichtmikroskopisch durch Auszählen der Partikel ermittelt. MPIO-markierte humane Hepatozyten konnten *in vitro* im Agarose-Phantommodell unter Verwendung einer 2cm durchmessenden Oberflächenspule und eines klinischen Magnetresonanztomographen mit einer Feldstärke von 3,0 Tesla auf Einzelzellniveau visualisiert werden. Eine ähnlich effiziente Markierung gelang durch eine Inkubation in einem Rotationsbioreaktor (45). Während einer Nachbeobachtungsphase von 6 Tagen konnte anhand der Transaminasenfreisetzung sowie Harnstoff- und Albuminproduktion kein negativer Effekt der Partikelmarkierung auf in Adhäsion kultivierte humane Hepatozyten festgestellt werden.

1.4. Zielsetzungen

Die Markierung mit Eisenoxidpartikeln soll eine nicht-invasive Nachverfolgung von transplantierten Leberzellen mittels MRT unter klinischen Bedingungen ermöglichen (Abb. 1). Die zum Zeitpunkt der wissenschaftlichen Arbeit vorliegenden Publikationen zeigten, dass eine Markierung von humanen Leberzellen mit Eisenoxidpartikeln *in vitro* möglich ist und dass Partikel-markierte Leberzellen unter experimentellen Bedingungen mittels MRT visualisiert werden können.

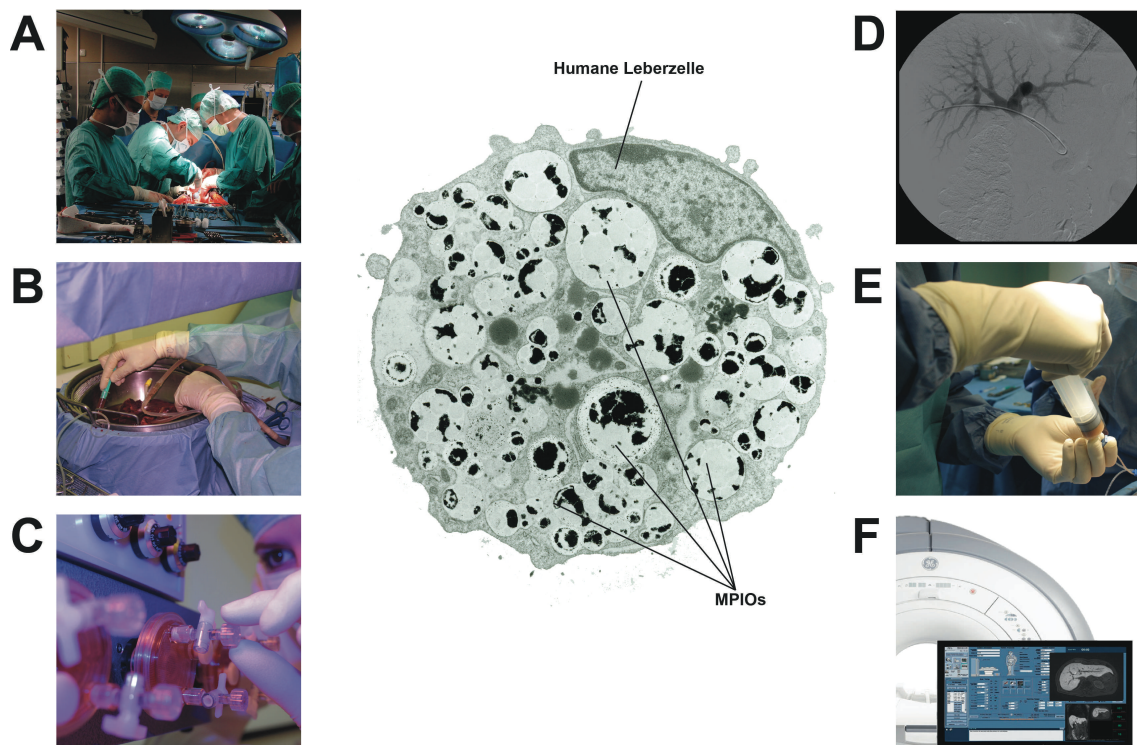


Abbildung 1: Nicht-invasive Nachverfolgung transplanteder Leberzellen mittels MRT.

(A) Explantation eines marginalen Spenderorgans. (B) Leberzellisolierung durch enzymatischen Lösung der Zell-Matrix-Verbindungen. (C) Zellmarkierung mit MPIO in Suspensionskultur. (D) Interventionelle Katheteranlage in die Pfortader. (E) Applikation von Leberzellen in Suspension. (F) Bildgebung mittels MRT.

(Abb. 1 modifiziert aus 12, mit Genehmigung von Future Medicine Ltd)

Um das Konzept der Partikel-vermittelten Verfolgung transplanteder Leberzellen in der MRT für eine mögliche klinische Anwendung zu überprüfen und weiterzuentwickeln, ergaben sich zum Zeitpunkt der wissenschaftlichen Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Quantifizierung der Partikel-Aufnahme: Um die Partikel-Beladung von Leberzellen mit Eisenoxidpartikeln zu quantifizieren, sollte ein Messverfahren entwickelt werden, mit welchem der Eisengehalt von SPIO- und MPIO- Partikel-markierten Zellen gemessen kann.
2. *In vitro* Vergleich der Markierungseffizienz, der bildgebenden Eigenschaften, und der Effekte von nano- und mikroskaligen Eisenoxidpartikeln auf humane Leberzellen: Humane Hepatozyten sollten unter vergleichbaren Bedingungen mit

SPIO und MPIO markiert und *in vitro* charakterisiert werden, um ihre Wertigkeit für eine mögliche klinische Anwendung einzuschätzen.

3. *In vivo* Evaluierung der bildgebenden Eigenschaften von MPIO-markierten Leberzellen im Großtiermodell: Basierend auf dem im Rahmen von eigenen Vorarbeiten etablierten Protokoll zur Markierung von humanen Hepatozyten mit MPIO sollte untersucht werden, ob MPIO-markierten Zellen unter klinischen Bedingungen mittels MRT nachverfolgt werden können.
4. Entwicklung von biokompatiblen und funktionalisierbaren mikroskaligen Eisenoxidpartikeln: Da die kommerziell verfügbaren MPIO-Eisenoxidpartikel aufgrund ihrer Beschichtung nicht für eine klinische Anwendung geeignet waren, sollten biokompatible mikroskalige Eisenoxidpartikel mit vergleichbaren bildgebenden Eigenschaften entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen die in folgenden Aufsätzen (46-51) vorab publizierten Teilergebnisse zusammengefasst werden.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Quantifizierung der Zellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln (46)

Raschzok N, Billecke N, Kammer NN, Morgul MH, Adonopoulou MK, Sauer IM, Florek S, Becker-Ross H, Huang MD. Quantification of cell labeling with micron-sized iron oxide particles using continuum source atomic absorption spectrometry. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Dec;15(4):681-6.

Leberzellen können nach Markierung mit Eisenoxidpartikeln mittels MRT nicht-invasiv dargestellt werden. Die Detektierbarkeit Partikel-markierter Zellen ist unter anderem von der Anzahl von inkorporierten Partikeln pro Zelle abhängig. Die Partikelmarkierung kann über den Eisengehalt der Zellen quantifiziert werden. Während der Eisengehalt von SPIO-markierten Zellen mittels kommerziell verfügbarer kolorimetrischen Tests ermittelt werden kann, basiert die Quantifizierung der Markierung mit mikroskaligen Eisenoxidpartikeln auf der lichtmikroskopischen Auswertung, da die Polymer-Enkapsulierung der MPIO eine Messung des Eisengehalts mit diesen Verfahren verhindert. Ziel dieser Studie war es, die *Continuum Source Atomabsorptionsspektroskopie* (CSAAS) für diesen Zweck zu etablieren. Bei diesem Verfahren werden die Proben vor der Messung durch einen Pyrolyseschritt aufgeschlossen. Porcine Leberzellen wurden mit MPIOs (Bangs Laboratories, IN, USA) markiert und der Eisengehalt der Zellproben wurde mittels einer Eisenlinie untersucht, welche nur 1/600 der Sensitivität der Eisen-Resonanzlinie üblicher spektrometrischer Verfahren aufweist. Der mit der CSAAS gemessene Eisengehalt der markierten Zellen betrug 6 bis 26 pg Eisen/Zelle und korrelierte mit der lichtmikroskopisch ermittelten Partikelaufnahme. Es konnte gezeigt werden, dass die CSAAS eine schnelle Quantifizierung der Partikelmarkierung mit kleinen Zellproben ohne aufwändige Präparationsschritte und lichtmikroskopische Untersuchungen ermöglicht.

Tissue Eng Part C Methods. 2009 Dec;15(4):681-6.
<http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0675>

Quantification of cell labeling with micron-sized iron oxide particles using continuum source atomic absorption spectrometry.

Raschzok N, Billecke N, Kammer NN, Morgul MH, Adonopoulou MK, Sauer IM, Florek S, Becker-Ross H, Huang MD.

2.2. *In vitro* Vergleich von nanoskaligen und mikroskaligen Eisenoxidpartikeln (47)

Raschzok N, Muecke DA, Adonopoulou MK, Billecke N, Werner W, Kammer NN, Zielinski A, Behringer PA, Ringel F, Huang MD, Neuhaus P, Teichgräber U, Sauer IM. In vitro evaluation of magnetic resonance imaging contrast agents for labeling human liver cells: implications for clinical translation. *Mol Imaging Biol.* 2011 Aug;13(4):613-22.

Die aus der Literatur und aus eigenen Vorarbeiten bekannten Ergebnisse zeigen, dass eine Markierung von humanen Leberzellen mit Eisenoxidpartikeln *in vitro* möglich ist. Da die verwendeten Markierungsprotokolle hinsichtlich Inkubationsdauer und Menge an inkorporierten Partikeln divergieren, konnte aus den vorliegenden Arbeiten nicht abgeleitet werden, ob nanoskalige oder mikroskalige Eisenoxidpartikel besser für die Bildgebung unter klinischen Bedingungen geeignet sind. Ebenso war die Frage nach möglichen toxischen Effekte durch die verwendeten Partikel nicht abschließend geklärt, da die verwendeten Partikel nicht unter gleichen Versuchsbedingungen untersucht wurden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Markierung humaner Leberzellen mittels kommerziell verfügbaren SPIO (Endorem, Guebert GmbH, Sulzbach, Deutschland) und MPIO (Bangs Laboratories, IN, USA) *in vitro* verglichen werden. Die Partikelmarkierung wurde mittels CSAAS quantifiziert, Phantom-Untersuchungen wurden mittels eines 3,0 Tesla Magnetresonanztomographen durchgeführt. Die Transferrinrezeptor- und Ferritin-Genexpression, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Transaminasen-Freisetzung sowie die Harnstoffsynthese wurden über eine Kulturdauer von 6 Tagen nach Partikelmarkierung untersucht. MPIO-markierte Zellen induzierten in der MRT eine kräftigere Signalauslöschung als SPIO-markierte Zellen mit ähnlicher Eisenbeladung, jedoch deutlich längerer Inkubationszeit. MPIO hatten keine negativen Effekt auf den zellulären Eisenhaushalt, die Zellschädigungs- und Syntheseparameter der markierten Zellen, wohingegen SPIO zu einer temporären ROS-Bildung und einer nicht-physiologischen Aktivierung des Eisenstoffwechsels führten. Für alle weiterführenden Untersuchungen wurden dementsprechend mikroskalige Partikel verwendet.

Mol Imaging Biol. 2011 Aug;13(4):613-22.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-010-0405-y>

In vitro evaluation of magnetic resonance imaging contrast agents for labeling human liver cells: implications for clinical translation.

Raschok N, Muecke DA, Adonopoulou MK, Billecke N, Werner W, Kammer NN, Zielinski A, Behringer PA, Ringel F, Huang MD, Neuhaus P, Teichgräber U, Sauer IM.

2.3. Evaluierung im Schweinmodell: Bildgebung und Applikationsrouten (48)

Raschzok N, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, Schmeisser S, Adonopoulou MK, Morawietz L, Hiebl B, Schwartlander R, Rüdinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM. Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging. Cell Med. 2010 Dec 22;1(3):123-35.

Mikroskalige Eisenoxidpartikel ermöglichen *in vitro* und im Kleintiermodell einen Einzelzellnachweis Partikel-markierter Leberzellen in der MRT. Um zu untersuchen, ob unter klinischen Bedingungen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob MPIO-markierte transplantierte Leberzellen im Großtiermodell unter klinischen Bedingungen mittels MRT nachverfolgt werden können. Darüber hinaus sollte dieses Verfahren genutzt werden, um verschiedene Applikationsrouten für die Leberzelltransplantation zu evaluieren. MPIO-markierte Zellen (n=10; Bangs Laboratories, IN, USA), native Zellen (n=3), oder Partikel ohne Zellen (n=4) wurden in Minipigs über eine intraportale Infusion in die Leber, mittels direkter Injektion in das Parenchym der Milz, oder mittels retrograder intraarterieller Infusion über die A. gastroepiploica in die Milz transplantiert. Die Empfängertiere wurden wiederholt mittels 3,0 Tesla MRT und Computertomographie über einen Zeitraum von bis zu 8 Wochen nach Transplantation untersucht. Die Immunsuppression erfolgte mit Cyclosporin und Prednisolon. Während ein Einzelzellnachweis *in vivo* nicht gelang, ermöglichte die Markierung mit MPIO eine nicht-invasive Detektion von Zellaggregaten: Nach intraportaler Applikation der MPIO-markierten Zellen konnte mittels MRT eine Mikroembolisierung von transplantierten Zellen in der Leber visualisiert und histologisch verifiziert werden, welche mittels Kontrastmittel-unterstützter Computertomographie nicht dargestellt werden konnte. Direkt in die Milz applizierte Zellen verblieben vor Ort und imponierten als hypointense Signalauslöschungen, wohingegen die intra-arterielle Zellinfusion in die Milz zu einer Translokation und ein Anwachsen der Zellen in der Leber führte. Bei dieser Applikationsroute kam es im Vergleich zur intra-portalen Transplantation über die Pfortader zu einer signifikant niedrigeren Mikroembolisierungs-Rate in der Leber.

Cell Med. 2010 Dec 22;1(3):123-35. eCollection 2010.
<http://dx.doi.org/10.3727/215517910X551053>

Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging.

Raschzok N, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, Schmeisser S, Adonopoulou MK, Morawietz L, Hiebl B, Schwartlander R, Rüdinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM.

2.4. Evaluierung im Schweinmodell: Nachverfolgung unter Echtzeit-Bedingungen (49)

Raschzok N, Pinkernelle J, Billecke N, Nehls K, Powerski M, Sauer IM, Teichgräber U. Feasibility of fast dynamic MRI for noninvasive monitoring during ectopic liver cell transplantation to the spleen in a porcine model. AJR Am J Roentgenol. 2012 Jun;198(6):1417-23.

In der vorbeschriebenen Studie waren MRT-Untersuchungen zu definierten Zeitpunkten nach Leberzelltransplantation durchgeführt worden. Idealweise sollten transplantierte Leberzellen jedoch unter Echt-Zeit-Bedingungen nachverfolgt werden. Das Ziel dieser Studie war, im Großtiermodell zu untersuchen, ob eine Nachverfolgung transplantierter Leberzellen mit der MRT unter Echtzeit-Bedingungen möglich ist. Porcine Leberzellen wurden mit MPIO (Bangs Laboratories, IN, USA) markiert und über einen interventionell in die A. lienalis angelegten Katheter in die Milz von n=5 Schweinen transplantiert. Die Messungen wurden mit einem klinischen Magnetresonanztomographen bei einer Feldstärke von 3,0 Tesla durchgeführt. Mittels einer T2-gewichteten dynamischen *fast spin-echo (fast dynamic)* Sequenz konnte während der Applikation von MPIO-markierten Leberzellen ein zunehmender Signalabfall in der Milz gemessen werden und die Zellapplikation so visualisiert werden. Als Kontrollgruppe diente ein Tier, bei welchem es aufgrund einer Dislokation des Katheters in die A. abdominalis zu einer systemischen Applikation der Zellen gekommen war. Diese Ergebnisse zeigen, dass MPIO-markierte Leberzellen unter klinischen Bedingungen mittels *fast dynamic* MRT unter Echtzeitbedingungen nachverfolgt werden können, dieses Verfahren eignet sich dementsprechend sowohl für präklinische Studien als auch für die Qualitätskontrolle im Rahmen der ektopen Leberzelltransplantation in die Milz.

AJR Am J Roentgenol. 2012 Jun;198(6):1417-23.
<http://dx.doi.org/10.2214/AJR.11.7742>

Feasibility of fast dynamic MRI for noninvasive monitoring during ectopic liver cell transplantation to the spleen in a porcine model.

Raschzok N, Pinkernelle J, Billecke N, Nehls K, Powerski M, Sauer IM, Teichgräber U.

2.5. Entwicklung von Silikat-basierten mikroskaligen Eisenoxidpartikeln (50)

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):1959-70.

Mikroskalige Eisenoxidpartikel induzieren einen starken Kontrast in der MRT und sind daher besonders als Kontrastmittel für die zelluläre Bildgebung im Abdomen unter klinischen Bedingungen geeignet. Allerdings sind die kommerziell verfügbaren MPIO aufgrund der für die Einkapsulierung verwendeten Polymere nicht für die klinische Anwendung geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten für eine klinische Zulassung prinzipiell geeignete, Silikat-basierte mikroskalige Eisenoxidpartikel (sMPIO) mit einer funktionalisierbaren Partikeloberfläche entwickelt und evaluiert werden. Monodisperse sMPIO mit einem Magnetit-Gehalt von mehr als 40%, einem Durchmesser von 1,18 µm und einen Eisengehalt von ca. 1,0 pg Eisen/Partikel wurden mit dem Sol-Gel-Verfahren synthetisiert (microparticles GmbH, Berlin, Deutschland) und die Partikeloberfläche wurde mit COOH-Gruppen funktionalisiert. Fluorescein, Poly-L-Lysin und Streptavidin wurden kovalent an die Partikeloberfläche gebunden. sMPIO ermöglichten eine Markierung von in Adhäsion kultivierten HuH7-Zellen und primären humanen Hepatozyten nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden. Poly-L-Lysin-funktionalisierte Partikel zeigten die schnellste Partikelaufnahme. In der T2*-gewichteten 3,0 Tesla MRT wurde eine Mindestmenge von 1.000 Zellen als Detektierbarkeitsgrenze definiert, wohingegen in der T1-gewichteten LAVA-Sequenz mindestens 10.000 Zellen notwendig waren, um einen ausreichenden Kontrast zu generieren. Die Markierung mit sMPIO hatte keinen negativen Effekt auf die markierten Zellen. Da Silikat-ummantelte Partikel bereits klinisch verwendet worden waren und die Toxizitätsuntersuchungen keine negativen Effekte auf die markierten Zellen zeigten, sind sMPIO potentiell für die klinische Anwendung geeignet.

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 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.

2.6. Weiterentwicklung der Silikat-basierten Eisenoxidpartikel:

Ultralokoregionäre Lokalisierung und Manipulierung transplanteder Zellen (51)

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 May;51:129-37.

*Geteilte Erstautorenschaft

Partikel-basierte Systeme zur therapeutischen Manipulierung und Nachverfolgung transplanteder Zellen in der MRT basieren gewöhnlich auf nanoskaligen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln. Im Rahmen dieser Arbeit sollten multifunktionale mikroskalige Eisenoxidpartikel entwickelt werden, welche einen Nachweis der markierten Zellen in der MRT sowie eine ultralokoregionäre Bindung von spezifischen microRNAs auf der Partikeloberfläche zum Zweck der therapeutischen Manipulierung mittels RNA-Interferenz ermöglichen. Darüber hinaus sollten die Partikel mit Fluorochromen markiert werden. Antisense-Oligonukleotide (α -LNA) spezifisch für die humane microRNA let-7g wurden hierfür kovalent an die Oberfläche von mit DAPI modifizierten sMPIO (microparticles GmbH, Berlin, Deutschland) gebunden. *In vitro* Untersuchungen mit primären humane Hepatozyten zeigten eine Partikelaufnahme nach 4 Stunden Inkubationsdauer. Die Partikelmarkierung führte zu einer signifikanten Depletierung der Ziel-microRNA let-7g (80%), zu einer Hochregulation der Ziel-Proteine Cyclin D1 und c-My, und zu einer spezifischen Veränderung auf Proteom-Ebene. sMPIO- α -LNA-markierte Zellen konnten *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden und nach intrasplenischer Transplantation im Rattenmodell mit klinischer MRT visualisiert werden. Diese neuartigen Partikel erlauben aufgrund ihrer theranostischen Eigenschaften neben der Detektierbarkeit in der MRT eine microRNA-basierte Manipulierung der Zielzellen und könnten dementsprechend für eine Nachverfolgung und Proliferationsstimulierung von transplanteden Leberzellen genutzt werden.

Biomaterials. 2015 May;51:129-37.
<http://dx.doi.org/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 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.

3. Diskussion

Die klinische Leberzelltransplantation befindet sich nach wie vor in der Entwicklungs- und Erprobungsphase (8,13). Da die für die nicht-invasive Nachverfolgung von transplantierten Leberzellen entwickelten Konzepte – mit Ausnahme einiger Nuklid-basierten Verfahren – noch nicht für die klinische Anwendung geeignet sind, können grundsätzliche Fragen der Leberzelltransplantation wie beispielsweise der optimale Applikationsweg oder der Verbleib der Zellen nach Transplantation nicht geklärt werden. So gibt es in der Literatur beispielsweise keine Hinweise darauf, ob es nach Leberzelltransplantation in die Milz über die *A. lienalis* im Menschen zu der aus dem Kleintiermodell bekannten Translokation der Zellen über das portalvenöse System in die Leber kommt (18,19). Weitere offene Fragen stellen das Langzeitüberleben der transplantierten Zellen und die Reaktion von transplantierten Zellen auf Proliferations-stimulierende Reize dar: Eine Proliferationsstimulation ist erforderlich, um eine Besiedelung der erkrankten Leber mit Spenderzellen und, wie insbesondere bei der Therapie von hepatischen Stoffwechselerkrankungen gewünscht, eine Verdrängung der erkrankten Zellen durch die transplantierten Leberzellen zu induzieren (52). Im Großtiermodell wurde dies beispielsweise durch eine Bestrahlung der Empfängerleber oder durch eine Pfortaderembolisation erzielt (53,54). In einem klinischen Fallbericht von zwei Patienten mit Crigler-Najjar Syndrom wurde eine erfolgreiche Proliferationsstimulierung durch eine Leberteileresektion unmittelbar vor der Leberzelltransplantation beschrieben (55). Für eine systematische Evaluierung dieser Konzepte unter klinischen Bedingungen bedarf es Verfahren zur nicht-invasiven Nachverfolgung transplantierte Leberzellen (56).

Die Magnetresonanztomographie scheint derzeit das am besten für die nicht-invasive Nachverfolgung von transplantierten Leberzellen geeignete Verfahren zu sein, da wiederholte Untersuchungen ohne Limitierungen durch eine Halbwertszeit der für die zelluläre Bildgebung etablierten Kontrastmittel möglich sind und sich das bildgebende Verfahren durch eine hohe Eindringtiefe sowie eine fehlende Strahlenbelastung auszeichnet (12,31). Bezüglich der Wahl des intrazellulären Kontrastmittels für die klinische Anwendung scheinen mikroskalige Eisenoxidpartikel den nanoskaligen Partikeln hinsichtlich der Detektierbarkeit der markierten Zellen überlegen zu sein. Die

zum Zeitpunkt der wissenschaftlichen Untersuchungen vorliegenden Untersuchungsergebnisse mit beiden Partikelgrößen waren jedoch nicht unter vergleichbaren Bedingungen erzielt worden (41).

Um vergleichende Untersuchungen mit nanoskaligen und mikroskaligen Eisenoxidpartikeln durchzuführen, ist ein Verfahren notwendig, mit welchem der Partikelgehalt der markierten Zellen quantifiziert werden kann. Die für die Quantifizierung des Eisengehalts von SPIO-markierten Zellen etablierten kolorimetrischen Verfahren eignen sich nicht für die Messung des Eisengehalts von MPIO-markierten Zellen, da die Polymer-Enkapsulierung der MPIOs im Rahmen der kolorimetrischen Verfahren nicht aufgeschlossen werden kann (46). Als Standard-Verfahren für die Quantifizierung der Partikelmarkierung mit MPIO ist die lichtmikroskopische Auswertung etabliert, dieses Verfahren ist jedoch Untersucher-abhängig und erfordert eine Untersuchung der Zellen in Adhäsion (42,44,57-60). Als quantitatives Verfahren für die Messung des Eisengehalts von MPIO-markierten Zellen wurde in der Literatur die Magnetresonanz-Relaxometrie beschrieben – dieses Verfahren erfordert jedoch eine technisch aufwändige Homogenisierung und Immobilisierung der Zellproben vor der Messung (61). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CSAAS für die Quantifizierung der Zellmarkierung mit MPIO etabliert (46). Im Gegensatz zur konventionellen Absorptionsspektroskopie ermöglicht die CSAAS durch die Verwendung von schwachen Eisenlinien die Messung von Proben mit relativ hohem Eisengehalt. Die Polymerenkapsulierung der MPIO wird während des Pyrolyse-Schrittes aufgebrochen. Im Gegensatz zur Auswertung des Partikelgehalts mittels Lichtmikroskopie kann die Partikelaufnahme unabhängig vom Untersucher und ohne aufwändige Präparationsschritte gemessen werden. Da die Messung in Suspension erfolgt, können die Zellproben direkt vor Transplantation analysiert werden, entweder nach der vor Zelltransplantation notwendigen enzymatischen Ablösen der Zellen aus der Adhäsionskultur oder nach Markierung im Rotationsbioreaktor. Untersuchungen mit MPIO-markierten porcinen Hepatozyten ergaben eine exakte Bestimmung der Partikelmarkierung über die Quantifizierung des Eisengehalts. Allerdings kann das Verfahren weder zwischen vitalen und avitalen Zellen noch zwischen freie Partikeln und intrazellulären Partikeln unterscheiden, hierfür sind Viabilitätsmessungen mittels eines

Trypan-Blau-Test und eine Auftrennung von Partikel-markierten Zellen und freien Partikeln vor der Messung notwendig. Trotz dieser Limitierung wurde die CSAAS in allen darauffolgenden eigenen Untersuchungen zur Quantifizierung des Eisengehalts von MPIO-markierten Zellen genutzt.

Um die Zellmarkierung mit nanoskaligen und mikroskaligen Eisenoxidpartikeln zu vergleichen, erfolgten *in vitro* Untersuchungen mit den kommerziell verfügbaren *Endorem/Feridex*- und MPIO-Partikeln (47). Mit beiden Partikeltypen konnte ein vergleichbarer Eisengehalt erzielt werden, für die Markierung mit SPIO war jedoch eine deutlich längere Inkubationsdauer erforderlich. Die MRT ergab eine Detektionsgrenze von 50.000 MPIO-markierten Zellen, während 250.000 SPIO-markierte Zellen notwendig waren, um eine vergleichbare Signalauslöschung zu induzieren. Untersuchungen zur Charakterisierung der Integrität und metabolischer Aktivität der markierten primären humanen Hepatozyten ergaben keine signifikanten Unterschiede beider Partikel, SPIO führten jedoch zu einer nicht-physiologischen Aktivierung des Eisenstoffwechsels und der Bildung von ROS. Diese Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen: Schäfer et al. hatten eine Hochregulierung des Transferrin-Rezeptors in mesenchymalen Stammzellen und eine Aggravierung einer experimentellen Autoimmun-Enzephalitis im Kleintiermodell durch SPIO beschrieben (62,63). Aufgrund ihrer schlechteren bildgebenden Eigenschaften sowie potentiellen eisentoxischen Effekte wurden nanoskalige Eisenoxidpartikel in den weiteren eigenen Untersuchungen zur Evaluierung des Konzepts der Partikel-vermittelten Nachverfolgung transplantierte Leberzellen in der MRT nicht weiterverfolgt, in der Literatur wurden ebenfalls keine relevanten Ergebnisse zur SPIO-vermittelten Bildgebung nach Leberzelltransplantation im Großtiermodell oder in der klinischen Anwendung publiziert. Alle weiterführenden Untersuchungen erfolgten mit mikroskaligen Eisenoxidpartikeln (48,49,64).

Untersuchungen in klinisch relevanten Großtiermodellen sind für die Einschätzung der klinischen Wertigkeit und der möglichen klinischen Umsetzbarkeit des Konzepts der Partikel-vermittelten Nachverfolgung transplantierte Leberzellen jedoch unbedingt erforderlich, da die Detektierbarkeit der Zellen neben den magnetischen Eigenschaften der verwendeten Partikel von der verwendeten Feldstärke des

Magnetresonanztomographen sowie der Größe der Induktionsspule abhängt (65). Zum Zeitpunkt der wissenschaftlichen Untersuchungen waren Magnetresonanztomographen mit Feldstärken bis maximal 3,0 Tesla für die klinische Anwendung etabliert, die Größe der Spulen ist bei Untersuchungen der Leber durch den Umfang des Abdomens bedingt. Daten zur Nachverfolgung von MPIO-markierten Leberzellen unter klinischen Bedingungen waren in der Literatur nicht beschrieben, es lagen jedoch Ergebnisse zur Nachverfolgung transplanteder Inselzellen unter vergleichbaren Bedingungen vor: Toso et al. führten MRT-Untersuchungen nach Transplantation von SPIO-markierten humanen Inselzellen an vier Patienten durch (66). SPIO-markierten Inselzellen konnten als punktuelle Signalauslösungen bis zu 6 Wochen nach Transplantation in der Leber nachgewiesen werden, jedoch ohne Korrelation mit der applizierten Inselzahl. Medarova et al. erzielten ähnliche Ergebnisse im nicht-menschlichen Primatenmodell. Barrett et al. gelangen durch die Einkapsulierung von Inselzellen mit SPIO ein Einzelzellnachweis im Schweinmodell (67). Für die eigenen Untersuchungen zur Detektierbarkeit transplanteder Leberzellen im Minipig-Großtiermodell wurden die kommerziell verfügbaren mikroskaligen MPIO-Eisenoxidpartikeln verwendet. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass MPIO-markierte Leberzellen unter klinischen Bedingungen nicht auf Einzelzellniveau nachverfolgt werden können (48). Als Detektionsgrenze wurde eine Mindestmenge von 10.000 markierten Zellen identifiziert. Ursächlich hierfür wird der im Vergleich zu den mit Inselzellen erzielten Ergebnissen der deutlich geringere Eisengehalt der markierten Leberzellen erachtet: Während die in der Arbeit von Barnett et al. verwendeten enkapsulierten Inselzellen einen Eisengehalt von ca. 81 ng Eisen aufwiesen (67), hatten MPIO-markierte Leberzellen einen Eisengehalt von nur ca. 20 pg. Allerdings konnte nach Transplantation über die Pfortader eine Mikroembolisierung der transplanteden Leberzellen im Pfortader-Endstromgebiet visualisiert werden. Dieses Phänomen ist aus histopathologischen Untersuchungen nach Leberzelltransplantation zur Therapie von hepatischen Stoffwechselerkrankungen im Kindesalter (14) und aus anderen Untersuchungen im Großtiermodell bekannt (68-71), konnte aber mit den bislang zur Verfügung stehenden bildgebenden Verfahren bislang nicht visualisiert werden. Interessanterweise kam es nach Applikation über das arterielle Stromgebiet in die Milz weder MR-morphologisch noch histologisch zu einem Zellanwachsen in der Milz, die histologischen Untersuchungen zeigten jedoch ein ähnlich effizientes

Anwachsen der transplantierten Zellen in der Leber wie nach Applikation über die Pfortader, bei MR-morphologisch signifikant niedrigerer Mikroembolisierungsrate. Diese Daten belegen, dass Leberzellen nach intraarterieller Transplantation in die Milz im klinisch relevanten Großtiermodell in die Leber transloziert werden. In weiteren Untersuchungen im juvenilen Hausschwein gelang es, mittels einer dynamischen T2-gewichteten Sequenz die Zellapplikation in die Milz unter Echtzeit-Bedingungen zu visualisieren (49). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen im Großtiermodell zeigen, dass die Markierung mit MPIO eine nicht-invasive Nachverfolgung transplantierte Leberzellen unter klinischen Bedingungen ermöglicht: Dieses Verfahren kann zur Erfolgskontrolle während Zelltransplantation und zur Visualisierung der Mikroembolisierung transplantierte Zellen im Pfortader-Endstromgebiet genutzt werden und ist dementsprechend von Relevanz für die weitere Entwicklung der Leberzelltransplantation. Ein Einzelzellnachweis der MPIO-markierten Leberzellen ist unter den gegebenen klinischen Bedingungen jedoch nicht möglich.

Für die klinische Translation des Konzepts der Partikel-vermittelten Nachverfolgung transplantierte Leberzellen mittels MRT sind mikroskalige Eisenoxidpartikel notwendig, welche für die klinische Anwendung zugelassen werden können. Die kommerziell verfügbaren MPIO-Partikel sind mit einem Polymer aus Styrol und Divinylbenzol beschichtet. Styrol wird gemäß der Einschätzung des *Office of Research and Development* der *United States Environmental Protection Agency* als Kanzerogen der "Gruppe C" (mögliches Humankanzerogen) eingestuft und ist aus diesem Grund für eine klinische Anwendung nicht geeignet (72). Für die eigene Entwicklung von biokompatiblen mikroskaligen sMPIO-Partikeln wurde aus diesem Grund biologisch inertes Silikat verwendet (50,73). Silikat-basierte nanometer-skalierte Partikel waren bereits von der *United States Federal Drug Agency (FDA)* als Trägersubstanz für gezielte Tumortherapie beim malignen Melanom zugelassen worden (74). Die *in vitro* Evaluierung der sMPIO mit primären humanen Hepatozyten ergab zudem die in den vorausgegangenen Untersuchungen verwendeten MPIO vergleichbare bildgebende Eigenschaften ohne einen Anhalt für toxische Effekte. Zur Funktionalisierung der sMPIO wurde die Silikat-basierte Schale um den inneren Silikat-Magnetit-Kern mit Carboxylgruppen funktionalisiert, die als Ankergruppen zur Anbindung der

Oligonukleotide dienen, aber auch die Variante einer Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglichen. Carboxylgruppen wurde als Ankergruppe gewählt, da kommerziell erhältliche Oligonukleotide als aminofunktionalisierte Komponenten konzipiert sind (75). Durch die Bindung von Antisense-Oligonukleotiden für die humane microRNA (miRNA) let-7g konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sMPIO- α -LNA sowohl für die Nachverfolgung mittels MRT als auch für eine ultralokoregionäre Stimulation markierten Hepatozyten genutzt werden können (51). Die Proliferationsstimulation wird hierbei über einen selektiven Eingriff in den miRNA-Haushalt der Zellen erzielt. miRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 19-22 Nukleotiden. Eine miRNA kann durch die komplementäre Bindung von messenger RNA die Genexpression von bis zu mehreren hundert Zielgenen durch posttranskriptionelle Regulation beeinflussen (76). Unter anderem haben eigene Vorarbeiten hatten gezeigt, dass miRNAs eine wichtige Rolle in der Regulation der Leberzellproliferation nach Leberteilresektion spielen (77-79). Durch sMPIO- α -Let7g konnte eine signifikante Depletierung der intrazellulären let-7g und eine konsekutive Hochregulation der Zielgene dieser miRNA in humanen Hepatozyten erzielt werden. sMPIO- α -LNA-markierte Leberzellen konnten im Rattenmodell nach intrasplenischer Injektion visualisiert werden. Das Konzept der Partikel-vermittelten ultralokoregionären miRNA-Depletion wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. In der Literatur beschriebene Konzepte zur Partikel-vermittelten RNA-Interferenz basierten bislang auf der Freisetzung der Oligonukleotiden nach intrazellulärer Aufnahme der Trägerpartikel (80-82). Die Depletion Regenerations-assoziiertes microRNAs mittels sMPIO- α -LNA ermöglicht eine selektive Proliferationsstimulation transplantierten Leberzellen und könnte dementsprechend eine Lösung für die ineffiziente Besiedelung der Zielorgane durch die transplantierten Zellen darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzepte zur Partikel-vermittelten Nachverfolgung transplantierten Leberzellen in der MRT evaluiert und weiterentwickelt. Es wurde gezeigt, dass mikroskalige Partikel für die Visualisierung transplantierten Zellen mittels MRT unter klinischen Bedingungen prinzipiell besser geeignet sind als nanoskalige Partikel und dass dieses Verfahren zur Beantwortung relevante Fragen wie der Mikroembolisierung transplantierten Zellen im Pfortaderstromgebiet und zur

Qualitätskontrolle während Zelltransplantation genutzt werden kann. Darüber hinaus wurde biokompatible, prinzipiell für die klinische Anwendung geeignete Partikel entwickelt und ein Konzept zur Partikel-vermittelten miRNAs-Depletion zur ultralokoregionären Stimulation und Detektion transplantierte Leberzellen beschrieben. Nicht adressiert wurde die Frage des Langzeit-Verbleibs der Partikel. Da in der MRT der Eisenoxidpartikel detektiert wird, unabhängig davon ob er in einer vitalen oder avitalen Zelle oder außerhalb einer Zelle befindet, kann es zu falsch-positiven Signalauslösungen kommen. Die Zellteilung kann durch Aufteilung der Partikel auf die Tochterzellen zu einem Verlust der Detektierbarkeit führen. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit nicht adressiert, ob das Magnetfeld einen negativen Effekt auf mit mikroskaligen Partikeln markierte Zellen hat (83) – dies ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Trotz dieser Limitierungen wird die Nachverfolgung von Partikel-markierten Zellen in der MRT derzeit als das am Besten geeignete Verfahren für die Evaluierung von Applikationsrouten für die Leberzelltransplantation und die Qualitätskontrolle während und nach der Transplantation erachtet (64).

4. Zusammenfassung

Die Leberzelltransplantation stellt ein vielversprechendes Verfahren für die Behandlung von metabolischen Stoffwechselerkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar. Weitere potentielle, derzeit jedoch noch nicht erfolgreich therapierbare Krankheitsbilder sind das akute und chronische Leberversagen. Der metabolische Effekt nach Leberzelltransplantation ist bislang allerdings zeitlich begrenzt. Für die erfolgreiche Weiterentwicklung der Leberzelltransplantation müssen verschiedene Fragen geklärt werden, unter anderem der optimale Applikationsweg, die Proliferation und das Langzeitüberleben der Zellen. Da Leberzellen nach Transplantation mit den klinisch etablierten bildgebenden Verfahren nicht visualisiert werden können, sind Konzepte zur nicht-invasiven Nachverfolgung transplanteder Leberzellen erforderlich.

Leberzellen können *in vitro* oder im Kleintiermodell nach Markierung mit nano- und mikroskaligen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln mittels MRT visualisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein Verfahren zur Quantifizierung der Partikelmarkierung mit Eisenoxidpartikeln entwickelt. Hierauf wurde die Markierung humaner Leberzellen mit kommerziell verfügbaren Eisenoxidpartikeln *in vitro* untersucht und gezeigt, dass mikroskalige Partikel eine effizientere Markierung ermöglichen und einen stärkeren Kontrast in der MRT erzielen als nanoskalige Partikel. Unter klinischen Bedingungen wurde im Schweinemodell gezeigt, dass die Markierung mit mikroskaligen Partikeln eine Visualisierung der Mikroembolisierung transplanteder Leberzellen in der Leber ermöglicht und die Zellapplikation in die Milz unter Echtzeit-Bedingungen nachverfolgt werden kann. Da die kommerziell verfügbaren mikroskaligen Partikel aufgrund ihrer Polymer-Encapsulierung für eine klinische Anwendung nicht geeignet sind, wurden biokompatible Silikat-basierte Partikel mit gleichen bildgebenden Eigenschaften entwickelt und durch Funktionalisierung ihrer Oberfläche mit Antisense-Oligonukleotiden für die ultralokoregionäre Stimulation transplanteder Zellen durch Depletion Proliferations-assoziiertes microRNAs weiterentwickelt.

Das Konzept der Partikel-vermittelten Nachverfolgung transplanteder Leberzellen in der MRT wurde für die klinische Anwendung evaluiert, durch die Entwicklung eines neuartigen theranostischen Partikels weiterentwickelt und dadurch relevante Aspekte der Leberzelltransplantation adressiert

5. Liste der in dieser Schrift zusammengefassten Publikationen

1. **Raschzok N**, Billecke N, Kammer NN, Morgul MH, Adonopoulou MK, Sauer IM, Florek S, Becker-Ross H, Huang MD. Quantification of cell labeling with micron-sized iron oxide particles using continuum source atomic absorption spectrometry. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Dec;15(4):681-6
2. **Raschzok N**, Muecke DA, Adonopoulou MK, Billecke N, Werner W, Kammer NN, Zielinski A, Behringer PA, Ringel F, Huang MD, Neuhaus P, Teichgräber U, Sauer IM. In vitro evaluation of magnetic resonance imaging contrast agents for labeling human liver cells: implications for clinical translation. *Mol Imaging Biol*. 2011 Aug;13(4):613-22.
3. **Raschzok N**, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, Schmeisser S, Adonopoulou MK, Morawietz L, Hiebl B, Schwartlander R, Rüdinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM. Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging. *Cell Med*. 2010 Dec 22;1(3):123-35.
4. **Raschzok N**, Pinkernelle J, Billecke N, Nehls K, Powerski M, Sauer IM, Teichgräber U. Feasibility of fast dynamic MRI for noninvasive monitoring during ectopic liver cell transplantation to the spleen in a porcine model. *AJR Am J Roentgenol*. 2012 Jun;198(6):1417-23.
5. **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):1959-70.
6. 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 May;51:129-37.

* Geteilte Erstautorenschaft

6. Literatur

1. Benninghoff, Drenckhahn D. Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban und Fischer, Band 1;16. Auflage 2003
2. Alqahtani SA. Update in liver transplantation. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012 May;28(3):230-8.
3. Alexander IE, Kok C, Dane AP, Cunningham SC. Gene therapy for metabolic disorders: an overview with a focus on urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2012 Jul;35(4):641-5.
4. Struecker B, Raschzok N, Sauer IM. Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Mar;11(3):166-76.
5. Deutsche Stiftung Organspende, Organspende und Transplantation in Deutschland, Jahresbericht 2015.
6. Tacke F, Kroy DC, Barreiros AP, Neumann UP. Liver transplantation in Germany. *Liver Transpl*. 2016 Apr 15.
7. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis*. 1999;19(1):39-48.
8. Dhawan A. Clinical human hepatocyte transplantation: Current status and challenges. *Liver Transpl*. 2015 Nov;21 Suppl 1:S39-44.
9. Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM. Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin Liver Dis*. 1999;19(1):15-26.
10. Hoppo T, Komori J, Manohar R, Stolz DB, Lagasse E. Rescue of lethal hepatic failure by hepatized lymph nodes in mice. *Gastroenterology*. 2011 Feb;140(2):656-666.e2.
11. Jorns C, Ellis EC, Nowak G, Fischler B, Nemeth A, Strom SC, Ericzon BG. Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver. *J Intern Med*. 2012 Sep;272(3):201-23.
12. Raschzok N, Morgul MH, Stelter L, Sauer IM. Noninvasive monitoring of liver cell transplantation. *Imaging Med*. 2013;5(1):47-61
13. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2012 Feb 27;93(4):342-7.
14. Quaglia A, Lehec SC, Hughes RD, Mitry RR, Knisely AS, Devereaux S, Richards J, Rela M, Heaton ND, Portmann BC, Dhawan A. Liver after hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders in children. *Cell Transplant*. 2008;17(12):1403-14.
15. Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology*. 2002 Nov;123(5):1677-85.
16. Krohn N, Kapoor S, Enami Y, Follenzi A, Bandi S, Joseph B, Gupta S. Hepatocyte transplantation-induced liver inflammation is driven by cytokines-chemokines associated with neutrophils and Kupffer cells. *Gastroenterology*. 2009 May;136(5):1806-17.
17. Ponder KP, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, Ledley FD, Chowdhury JR, Woo SL. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 15;88(4):1217-21.

18. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl.* 2000 Jan;6(1):32-40.
19. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation.* 1997 Feb 27;63(4):559-69.
20. Stéphane X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology.* 2006 Apr;130(4):1317-23.
21. Stéphane X, Najimi M, Smets F, Reding R, de Ville de Goyet J, Sokal EM. Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Aug;5(8):2058-61.
22. Zanzonico P. Principles of nuclear medicine imaging: planar, SPECT, PET, multi-modality, and autoradiography systems. *Radiat Res.* 2012 Apr;177(4):349-64. Epub 2012 Feb 27.
23. Farwell MD, Pryma DA, Mankoff DA. PET/CT imaging in cancer: current applications and future directions. *Cancer.* 2014 Nov 15;120(22):3433-45.
24. Chouhan M, Puppi J, Solanas E, Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD. Hepatocyte labeling with ^{99m}Tc-GSA: a potential non-invasive technique for tracking cell transplantation. *Int J Artif Organs.* 2012 Jun;35(6):450-7.
25. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc.* 1992 Dec;24(6):3052-3.
26. Sterling RK, Fisher RA. Liver transplantation. Living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clin Liver Dis.* 2001 May;5(2):431-60, vii.
27. Bohnen NI, Charron M, Reyes J, Rubinstein W, Strom SC, Swanson D, Towbin R. Use of indium-111-labeled hepatocytes to determine the biodistribution of transplanted hepatocytes through portal vein infusion. *Clin Nucl Med.* 2000 Jun;25(6):447-50.
28. Hickey RD, Mao S, Glorioso J, Elgilani F, Amiot B, Chen H, Rinaldo P, Marler R, Jiang H, DeGrado TR, Suksanpaisan L, O'Connor MK, Freeman BL, Ibrahim SH, Peng KW, Harding CO, Ho CS, Grompe M, Ikeda Y, Lillegard JB, Russell SJ, Nyberg SL. Curative ex vivo liver-directed gene therapy in a pig model of hereditary tyrosinemia type 1. *Sci Transl Med.* 2016 Jul 27;8(349):349ra99.
29. Srinivas M, Aarntzen EH, Bulte JW, Oyen WJ, Heerschap A, de Vries IJ, Figdor CG. Imaging of cellular therapies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Aug 30;62(11):1080-93.
30. Koenig S, Krause P, Hosseini AS, Dullin C, Rave-Fraenk M, Kimmina S, Entwistle AL, Hermann RM, Hess CF, Becker H, Christiansen H. Noninvasive imaging of liver repopulation following hepatocyte transplantation. *Cell Transplant.* 2009;18(1):69-78.
31. Puppi J, Modo M. Use of magnetic resonance imaging contrast agents to detect transplanted liver cells. *Top Magn Reson Imaging.* 2009 Apr;20(2):113-20.
32. Arbab AS, Janic B, Haller J, Pawelczyk E, Liu W, Frank JA. In Vivo Cellular Imaging for Translational Medical Research. *Curr Med Imaging Rev.* 2009 Feb 1;5(1):19-38.
33. Loewenhardt B. *Bildgebende Diagnostik. Technik, Anatomie, Pathologie.* 3. Neubearbeitete Auflage 2006, Fuldaer Verlagsanstalt GmbH & Co.KG

34. Pagani E, Bizzi A, Di Salle F, De Stefano N, Filippi M. Basic concepts of advanced MRI techniques. *Neurol Sci.* 2008 Oct;29 Suppl 3:290-5.
35. Medarova Z, Vallabhajosyula P, Tena A, Evgenov N, Pantazopoulos P, Tchipashvili V, Weir G, Sachs D, Moore A. In vivo imaging of autologous islet grafts in the liver and under the kidney capsule in non-human primates. *Transplantation.* 2009 Jun 15;87(11):1659-66.
36. Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* 2004 Nov;17(7):484-99.
37. Morgul MH, Raschzok N, Schwartlander R, Vondran FW, Michel R, Stelter L, Pinkernelle J, Jordan A, Teichgraber U, Sauer IM. Tracking of primary human hepatocytes with clinical MRI: initial results with Tat-peptide modified superparamagnetic iron oxide particles. *Int J Artif Organs.* 2008 Mar;31(3):252-7.
38. Puppi J, Mitry RR, Modo M, Dhawan A, Raja K, Hughes RD. Use of a clinically approved iron oxide MRI contrast agent to label human hepatocytes. *Cell Transplant.* 2011;20(6):963-75.
39. Thorek DL, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng.* 2006 Jan;34(1):23-38.
40. Shi XL, Gu JY, Han B, Xu HY, Fang L, Ding YT. Magnetically labeled mesenchymal stem cells after autologous transplantation into acutely injured liver. *World J Gastroenterol.* 2010 Aug 7;16(29):3674-9.
41. Slotkin JR, Cahill KS, Tharin SA, Shapiro EM. Cellular magnetic resonance imaging: nanometer and micrometer size particles for noninvasive cell localization. *Neurotherapeutics.* 2007 Jul;4(3):428-33.
42. Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med.* 2005 Feb;53(2):329-38.
43. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med.* 2006 Feb;55(2):242-9.
44. Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, Vondran FW, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM. Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography. *J Cell Mol Med.* 2008 Aug;12(4):1384-94.
45. Kammer NN, Billecke N, Morgul MH, Adonopoulou MK, Mogl M, Huang MD, Florek S, Schmitt KR, Raschzok N, Sauer IM. Labeling of primary human hepatocytes with micron-sized iron oxide particles in suspension culture suitable for large-scale preparation. *Artif Organs.* 2011 Apr;35(4):E91
46. Raschzok N, Billecke N, Kammer NN, Morgul MH, Adonopoulou MK, Sauer IM, Florek S, Becker-Ross H, Huang MD. Quantification of cell labeling with micron-sized iron oxide particles using continuum source atomic absorption spectrometry. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009 Dec;15(4):681-6.-100.
47. Raschzok N, Muecke DA, Adonopoulou MK, Billecke N, Werner W, Kammer NN, Zielinski A, Behringer PA, Ringel F, Huang MD, Neuhaus P, Teichgräber U, Sauer IM. In vitro evaluation of magnetic resonance imaging contrast agents for labeling human liver cells: implications for clinical translation. *Mol Imaging Biol.* 2011 Aug;13(4):613-22.
48. Raschzok N, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, Schmeisser S, Adonopoulou MK, Morawietz L, Hiebl B,

- Schwartlander R, Rüdinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM. Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging. *Cell Med.* 2010 Dec 22;1(3):123-35.
49. Raschzok N, Pinkernelle J, Billecke N, Nehls K, Powerski M, Sauer IM, Teichgräber U. Feasibility of fast dynamic MRI for noninvasive monitoring during ectopic liver cell transplantation to the spleen in a porcine model. *AJR Am J Roentgenol.* 2012 Jun;198(6):1417-23.
 50. 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):1959-70.
 51. 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 May;51:129-37.
 52. Soltys KA, Soto-Gutiérrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, Shneider BL, Squires R, Vockley J, Guha C, Roy-Chowdhury J, Strom SC, Platt JL, Fox IJ. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol.* 2010 Oct;53(4):769-74.
 53. Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N, Macaluso F, Liu L, Yamamoto T, Yannam GR, Enke C, Solberg TD, Adelson AB, Platt JL, Fox IJ, Roy-Chowdhury J, Guha C. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. *Hepatology.* 2009 Jan;49(1):258-67.
 54. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, Lin T, Groyer-Picard MT, Vons C, Hadchouel M, Pariente D, Andreoletti M, Franco D, Weber A. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation.* 2006 Oct 27;82(8):1067-73.
 55. Jorns C, Nowak G, Nemeth A, Zemack H1, Mörk LM, Johansson H, Gramignoli R, Watanabe M, Karadagi A, Alheim M, Hauzenberger D, van Dijk R, Bosma PJ, Ebbesen F, Szakos A, Fischler B, Strom S, Ellis E, Ericzon BG. De Novo Donor-Specific HLA Antibody Formation in Two Patients With Crigler-Najjar Syndrome Type I Following Human Hepatocyte Transplantation With Partial Hepatectomy Preconditioning. *Am J Transplant.* 2016 Mar;16(3):1021-30.
 56. Strom S. Tracking Cells Without Leaving a Trace. *Cell Med.* 2011 Feb 3;1(3):113-4.
 57. Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP, Dunbar CE. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):867-72.
 58. Ye Q, Wu YL, Foley LM, Hitchens TK, Eytan DF, Shirwan H, Ho C. Longitudinal tracking of recipient macrophages in a rat chronic cardiac allograft rejection model with noninvasive magnetic resonance imaging using micrometer-sized paramagnetic iron oxide particles. *Circulation.* 2008 Jul 8;118(2):149-56.
 59. Dunning MD, Kettunen MI, French Constant C, Franklin RJ, Brindle KM. Magnetic resonance imaging of functional Schwann cell transplants labelled with magnetic microspheres. *Neuroimage.* 2006 May 15;31(1):172-80.

60. Rodriguez O, Fricke S, Chien C, Dettin L, VanMeter J, Shapiro E, Dai HN, Casimiro M, Ileva L, Dagata J, Johnson MD, Lisanti MP, Koretsky A, Albanese C. Contrast-enhanced in vivo imaging of breast and prostate cancer cells by MRI. *Cell Cycle*. 2006 Jan;5(1):113-9.
61. Williams JB, Ye Q, Hitchens TK, Kaufman CL, Ho C. MRI detection of macrophages labeled using micrometer-sized iron oxide particles. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Jun;25(6):1210-8.
62. Schäfer R, Ayturan M, Bantleon R, Kehlbach R, Siegel G, Pintaske J, Conrad S, Wolburg H, Northoff H, Wiskirchen J, Weissert R. The use of clinically approved small particles of iron oxide (SPIO) for labeling of mesenchymal stem cells aggravates clinical symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis and influences their in vivo distribution. *Cell Transplant*. 2008;17(8):923-41.
63. Schäfer R, Kehlbach R, Müller M, Bantleon R, Kluba T, Ayturan M, Siegel G, Wolburg H, Northoff H, Dietz K, Claussen CD, Wiskirchen J. Labeling of human mesenchymal stromal cells with superparamagnetic iron oxide leads to a decrease in migration capacity and colony formation ability. *Cytotherapy*. 2009;11(1):68-78.
64. Roach DR, Garrett WM, Welch G, Caperna TJ, Talbot NC, Shapiro EM. Magnetic cell labeling of primary and stem cell-derived pig hepatocytes for MRI-based cell tracking of hepatocyte transplantation. *PLoS One*. 2015 Apr 9;10(4):e0123282.
65. Medarova Z, Vallabhajosyula P, Tena A, Evgenov N, Pantazopoulos P, Tchipashvili V, Weir G, Sachs D, Moore A. In vivo imaging of autologous islet grafts in the liver and under the kidney capsule in non-human primates. *Transplantation*. 2009 Jun 15;87(11):1659-66.
66. Toso C, Vallee JP, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, Marangon N, Saudek F, James Shapiro AM, Bosco D, Berney T. Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant*. 2008 Mar;8(3):701-6.
67. Barnett BP, Arepally A, Karmarkar PV, Qian D, Gilson WD, Walczak P, Howland V, Lawler L, Lauzon C, Stuber M, Kraitchman DL, Bulte JW. Magnetic resonance-guided, real-time targeted delivery and imaging of magnetocapsules immunoprotecting pancreatic islet cells. *Nat Med*. 2007 Aug;13(8):986-91.
68. Andreoletti M, Loux N, Vons C, Nguyen TH, Lorand I, Mahieu D, Simon L, Di Rico V, Vingert B, Chapman J, Briand P, Schwall R, Hamza J, Capron F, Bargy F, Franco D, Weber A. Engraftment of autologous retrovirally transduced hepatocytes after intraportal transplantation into nonhuman primates: implication for ex vivo gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2001 Jan 20;12(2):169-79.
69. Maruyama M, Totsugawa T, Kunieda T, Okitsu T, Shibata N, Takesue M, Kurabayashi Y, Oshita M, Nakaji S, Kodama M, Tanaka N, Kobayashi N. Hepatocyte isolation and transplantation in the pig. *Cell Transplant*. 2003;12(6):593-8.
70. Muraca M, Neri D, Parenti A, Feltracco P, Granato A, Vilei MT, Ferrareso C, Ballarin R, Zanusso GE, Giron G, Rozga J, Gerunda G. Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study. *Transplantation*. 2002 Mar 27;73(6):890-6.
71. Vons C, Loux N, Simon L, Mahieu-Caputo D, Dagher I, Andreoletti M, Borgnon J, Di Rico V, Bargy F, Capron F, Weber A, Franco D. Transplantation of

- hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation*. 2001 Sep 15;72(5):811-8.
72. <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/515/dokumente/styrol.pdf>; Zugriff: 07.08.2016
 73. Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S, Moudgil B. Nanoparticles for bioimaging. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006 Nov 16;123-126:471-85.
 74. Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, DeStanchina E, Longo V, Herz E, Iyer S, Wolchok J, Larson SM, Wiesner U, Bradbury MS. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2768-80.
 75. Aboul-Fadl T. Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem*. 2005;12(19):2193-214.
 76. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55.
 77. Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, Frandsen NM, Willenbring H. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology*. 2010 May;51(5):1735-43.
 78. Raschzok N, Werner W, Sallmon H, Billecke N, Dame C, Neuhaus P, Sauer IM. 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 Jun;300(6):R1363-72.
 79. Raschzok N, Sallmon H, Pratschke J, Sauer IM. MicroRNAs in liver tissue engineering - New promises for failing organs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Jul 1;88:67-77.
 80. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. 2010 Apr 15;464(7291):1067-70.
 81. Dobson J. Magnetic micro- and nano-particle-based targeting for drug and gene delivery. *Nanomedicine (Lond)*. 2006 Jun;1(1):31-7.
 82. Wang P, Yigit MV, Ran C, Ross A, Wei L, Dai G, Medarova Z, Moore A. A theranostic small interfering RNA nanoprobe protects pancreatic islet grafts from adoptively transferred immune rejection. *Diabetes*. 2012 Dec;61(12):3247-54.
 83. Bae JE, Huh MI, Ryu BK, Do JY, Jin SU, Moon MJ, Jung JC, Chang Y, Kim E, Chi SG, Lee GH, Chae KS. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 2011 Dec;32(35):9401-14.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johann Pratschke, Direktor der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow Klinikum der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für seine wohlwollende Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit und seine mir täglich gewährte klinische und chirurgische Ausbildung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Igor M. Sauer für seine langjährige Förderung und die Ermöglichung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit in seiner Arbeitsgruppe. Darüber hinaus danke ich allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe sowie allen Kooperationspartnern und Co-Autoren für ihre Unterstützung und Zusammenarbeit. Für die Gewährung des ClinicianScientist-Stipendiums möchte ich mich bei dem BIH CharitéClinicianScientistProgram der Charité – Universitätsmedizin Berlin und des Berlin Institute of Health bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem meinen Eltern, Elfriede und Prof. Dr. theol. Dr. theol. habil. Klaus Raschzok, die mich auf meinem bisherigen Weg stets begleitet und unterstützt haben, und meiner Frau Dr. med. Sonja Raschzok, geb. Wollersheim.

8. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

Dr. med. Nathanael Raschzok