

Aus dem Institut für Röntgendiagnostik  
Klinikum rechts der Isar  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Rummeny)

**Magnetresonanztomographie und Autoradiographie der  
in vivo Verteilung von Kontrastmittel-markierten  
zytotoxischen T-Lymphozyten in HER2/neu positiven  
NIH3T3 Tumoren**

Reinhard Meier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. H. E. Daldrup-Link  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-  
Schmidtke

Die Dissertation wurde am 03. Juli 2006 bei der Technischen  
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 24. Januar 2007 angenommen.

*meiner Familie*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>9</b>
2.1	Immuntherapie .....	9
2.2	Positronen-Emissions-Tomographie .....	10
2.2.1	Physikalische Grundlagen .....	10
2.2.2	Produktion Radionuklide.....	11
2.2.3	Markierung von Biomolekülen .....	12
2.2.4	2-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-deoxyglucose .....	13
2.2.5	Autoradiographie .....	15
2.3	Magnetresonanztomographie.....	17
2.3.1	Physikalische Grundlagen .....	17
2.3.2	MR-Kontrastmittel.....	18
2.3.3	Indikationen für Kontrastmittel .....	27
2.4	Hämatopoetische Stammzellen.....	29
2.4.1	Entstehung des Stammzellsystems.....	29
2.4.2	Komponenten des Immunsystems .....	31
2.4.3	Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen.....	36
2.4.4	Methoden der Zellmarkierung und bildgebende Verfahren.....	37
2.5	Tiermodell.....	40
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1	Natürliche Killerzellen NK-92-scFv(FRP5)-zeta.....	41
3.2	Tierexperimente .....	42
3.2.1	Tiermodell.....	42
3.2.2	Anästhesie.....	43
3.2.3	Tumormodell .....	44

---

3.2.4	Injektion NK-92-Zellen .....	45
3.3	Zellmarkierung mit [ <sup>18</sup> F]FDG.....	45
3.3.1	In vitro Versuche .....	45
3.3.2	In vivo Versuche.....	46
3.3.3	Autoradiographie .....	47
3.4	Zellmarkierung mit Eisenoxiden .....	49
3.4.1	MR-Zellmarkierungstechniken.....	49
3.4.2	In vitro Versuche .....	50
3.4.3	In vivo Versuche.....	51
3.4.4	MRT-Gerät und Pulssequenzen .....	51
3.5	Pathologisch-anatomische Aufarbeitung .....	52
3.5.1	Präparation und Fixierung der Gewebeproben.....	52
3.5.2	Histologie.....	52
3.5.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	53
3.5.4	Fe <sup>2+</sup> -Berliner-Blau Färbung .....	53
3.5.5	Immunhistochemische Färbung .....	53
3.6	Statistische Berechnung und Dokumentation.....	55
3.6.1	Autoradiographie .....	55
3.6.2	Magnetresonanztomographie.....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Zellmarkierung mit [ <sup>18</sup> F]FDG.....	57
4.1.1	In vitro Versuche .....	57
4.1.2	In vivo Versuche.....	62
4.2	Zellmarkierung mit Resovist .....	66
4.2.1	In vitro Versuche .....	66
4.2.2	In vivo Versuche.....	69
4.3	Histopathologie.....	72
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>82</b>

---

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>102</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung</b>	<b>104</b>

# 1 Einleitung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine Subpopulation der Lymphozyten und spielen eine essentielle Rolle in der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Immunabwehr gegen virusinfizierte und maligne Zellen. Verschiedene Forscher werteten die antitumorale Aktivität der NK-Zellen, den Mechanismus der Immunantwort, Abwehrstrategien der malignen Zellen und die Risiken von Nebenwirkungen aus [86;109;126]. Krebstherapien mit NK-Zellen können von zwei Seiten angegangen werden: Entweder durch Aktivierung der endogenen NK-Zellen durch systemische Applikation von Zytokinen [61;74] oder durch adoptierte Übertragung der ex vivo vermehrten und aktivierten autologen oder Spender bezogenen NK-Zellen [76;130]. Der jüngste Ansatz schließt die Anwendung von klinisch nutzbaren zytotoxischen NK-Zelllinien mit ein [112].

Die humane NK-Zelllinie NK-92 [36] ist hoch zytotoxisch gegen maligne Zellen von verschiedenster Herkunft, ohne aber körpereigene Zellen zu beschädigen. Aufgrund dieser Selektivität wird derzeit das Potential der NK-92-Zellen für adoptive Therapien in Phase I Studien untersucht. Neben den NK-92-Zellen exprimiert eine genetisch modifizierte Variante, genannt NK-92-scFv(FRP5)-zeta, einen chimären Antigenrezeptor, der die zytotoxische Aktivität von NK-92 gegen HER2 exprimierende Zellen richtet [114]. HER2 (Synonyme: HER2/neu, ErbB2) ist ein auf der Oberfläche der Zellmembran exprimierter Rezeptor. Eine HER2 Überexpression ist in vielen humanen Tumoren von epithelalem Ursprung beobachtet worden und wurde mit Wachstum und Entwicklung der Tumore in Verbindung gebracht [45;78]. Im Vergleich zu den NK-92-Zellen lysieren NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen spezifischer und effizienter HER2 exprimierende Tumorzellen verschiedenster Herkunft und zeigen in der klinischen Anwendung eine signifikante Wachstumsverzögerung der HER2-positiven Zellen [114]. Jedoch ist die Identifikation der Responder und Non-Responder dieser zellbasierten Immuntherapien immer noch auf die Diagnose

einer Verminderung der Tumorgröße einige Wochen nach der Verabreichung der Zellen angewiesen. Eine Methode, welche die Markierung und Verfolgung der verabreichten NK-Zellen erlauben würde, könnte eine Akkumulation dieser Zellen im Tumorgewebe verifizieren oder widerlegen und damit Responder und Non-Responder direkt nach Verabreichung der NK-Zellen identifizieren.

Gegenwärtig verfügbare Zellmarkierungstechniken basieren auf radioaktiven, fluoreszierenden oder (super-)paramagnetischen Marker [1;23;25;29;54;62;68;79]. Markierungstechniken mit radioaktiven Markern für Positronenemissionstomographie (PET) zeigen eine hohe Sensitivität, aber begrenzte räumliche Auflösung und das Risiko einer radiotoxischen Zellschädigung [1;29;62;68]. Markierungstechniken mit fluoreszierenden Markern bieten eine hohe Sensitivität, aber ebenfalls eine begrenzte räumliche Auflösung, eine beschränkte Eindringtiefe und sind außerdem derzeit beschränkt auf experimentelle Anwendungen [23;79]. Markierungstechniken mit Kontrastmitteln für magnetische Resonanz (MR) haben den Vorteil weniger toxisch als die radioaktiven und fluoreszierenden Marker zu sein und bieten eine nahezu mikroskopische anatomische Auflösung [25;54;68]. Jedoch sind diese beschränkt durch eine begrenzte Sensitivität, die eine hoch effiziente Markierungstechnik erfordert, um die zu untersuchende Zelle mit einer großen Anzahl von Kontrastmittelmolekülen zu beladen. Derartig optimierte Markierungsmethoden sind bereits für verschiedene hämatopoetische Zellpopulationen, u.a. Lymphozyten, Monozyten und hämatopoetische Vorläuferzellen entwickelt worden [25;54;67;68;95;98;124;131]. Für Non-Phagozytierende Zelltypen ist als Markierungstechnik eine Transfektion erforderlich, d.h. eine Internalisierung der Kontrastmittelmoleküle in die Zelle mit Hilfe von Liposomen, Proteinen oder viralen Vektoren [25;54;68;95;98;124;131]. Genetisch hergestellte Lymphozyten haben sich bereits einer Transfektion unterzogen, um neue genetische Informationen in die Zelle zu transportieren. Eine anschließende Sekundärtransfektion, z.B. für die Internalisierung von Kontrastmittel, hat eine bekanntlich geringere Effizienz als die Primärtransfektion. Folglich müssen Zellmarkierungsprotokolle für genetisch entwickelte Zellen maßgeschneidert und optimiert sein.

Die Zielsetzungen dieser Arbeit waren:

- (1) die Markierung von nicht-modifizierten NK-Zellen und genetisch modifizierten NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen mit Eisenoxid-MR-Kontrastmitteln einerseits und radioaktiven [<sup>18</sup>F]FDG PET-Kontrastmitteln andererseits zu optimieren.
- (2) die Migration, das Homing und die Akkumulation der in Mäuse intravenös injizierten markierten NK-92-scFv(FRP5)-zeta (gerichtet gegen HER2/neu Rezeptoren) und NK-92 Zellen (nicht gerichtet gegen HER2/neu Rezeptoren) in HER2/neu positiven Tumoren mit MR-Bildgebung und Autoradiographie zu verfolgen.
- (3) die Vorteile und Nachteile beider Ansätze, der Eisenoxid-basierten in vivo Methode und der Radiotracer basierten ex vivo Methode zu vergleichen.

---

## 2 Grundlagen

### 2.1 Immuntherapie

Onkologische Immuntherapien zielen auf die Zerstörung maligner Zellen mittels immunologischer Methoden hin. Diese Methoden greifen teilweise am Immunsystem an und stets wird eine Steigerung der Immunabwehr beabsichtigt. Ohne Kenntnis des Tumorantigens kann nur eine globale Aktivierung vorgenommen werden. Dafür werden Thymuspeptide, Zytokine sowie pflanzliche und bakterielle Substanzen verwendet. Bei Kenntnis des Tumorantigens können spezifische aktivierte T-Zellen oder monoklonale spezifische Antikörper verwendet werden. Die genannten Methoden werden in vivo und in vitro/ex vivo angewandt. Der letztgenannte Weg bedient sich beispielsweise lymphokinaktiver Killerzellen (LAK-Zellen), die aus dem Blut des Patienten gewonnen und unter Kulturbedingungen maximal stimuliert werden, bevor sie dem Patienten zurückgegeben werden.

Eine Steigerung der Antigenität kann durch Infektion mit apathogenen Viren oder durch Zytokine erfolgen, wobei letztere auf die Ausprägung von HLA-Merkmalen und damit auf die zytotoxische Immunreaktion Einfluss nehmen. Diese Methoden haben in der humanen Immunonkologie eine untergeordnete Bedeutung. Dauerheilungen konnten bisher nicht erzielt werden.

Eine effiziente Immunprophylaxe ist in Spezialfällen möglich. Wenn die Induktion eines Tumors auf Viren zurückgeht, kann durch aktive Immunisierung mit abgetöteten Viren die Virusinfektion und damit die Tumorentstehung unterbunden werden. So wird von der aktiven Schutzimpfung gegen Hepatitis-B-Virus ein – allerdings erst in den kommenden Jahren – erkennbarer

Rückgang des primären Leberzellkarzinoms erwartet [10]. Eine Übersicht über die verschiedenen Methoden der Immuntherapien ist in Tabelle 1 zu sehen.

**Tabelle 1: Immuntherapie humaner Tumoren [24]**

<b>Methode</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Mechanismus</b>
Adaptiv	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transfer Faktoren</li> <li>- Lymphozyten (LAK Zellen)</li> <li>- Immun-RNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transfer von spezifischer Immunität</li> </ul>
Mediatoren und Hormonell	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lymphokine (Interferon, Interleukin 2 und LAK Zellen)</li> <li>- Zytokin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erhöht die Immunantwort</li> </ul>
Passiv	<ul style="list-style-type: none"> <li>- unmodifizierte oder gekoppelte Antikörper (monoklonal)</li> <li>- Plasmapherese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Direkter Effekt auf den Tumor</li> <li>- Entfernung der inhibitorischen Faktoren</li> </ul>

## 2.2 Positronen-Emissions-Tomographie

### 2.2.1 Physikalische Grundlagen

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erlaubt nicht nur die Registrierung eines radioaktiven Zerfalls und dessen Ort, sondern darüber hinaus die Bestimmung der Aktivitätskonzentration in diesem Bereich. Dadurch stellt PET ein modernes nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren für die medizinische Forschung und Diagnostik dar. Es bietet die Möglichkeit, auf nichtinvasivem Weg physiologische Größen oder Stoffwechselfparameter in vivo nicht nur qualitativ sondern vor allem auch quantitativ zu erfassen. Die Quantifizierung setzt eine Koinzidenzmessung voraus, bei der die im zu untersuchenden Gewebe verursachte Schwächung der Strahlung im Vorfeld bestimmt werden muss. Die Messung der Aktivitätskonzentration basiert auf der

rechnerischen Eliminierung dieser Schwächung. Für die Koinzidenzmessung sind mindestens zwei einander gegenüberliegende Detektoren notwendig, die ein Ereignis wahrnehmen. Hierfür eignet sich der  $\beta^+$ -Zerfall, da in dessen Folge zwei gegenläufige  $\gamma$ -Quanten entstehen, die räumlich getrennt erfasst werden können. Bei Kernzerfällen, die ausschließlich  $\gamma$ -Strahlung emittieren, ist diese getrennte Detektion nicht möglich. Die biologisch relevanten Elemente wie  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  und  $^{15}\text{O}$  sind Positronenemittierende Nuklide, die nach Rekombination mit einem Elektron zwei  $\gamma$ -Quanten von 511 keV und einem Winkel von 180 aussenden (Tabelle 2) [80].

**Tabelle 2: Eigenschaften der wichtigsten Positronenstrahler für die PET [80]**

Radionuklid	Bildungsreaktion	Halbwertszeit [min]	$E_{\max} \beta^+$ [keV]	Häufigkeit des $\beta^+$ -Zerfalls [%]
$^{11}\text{C}$	$^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$	20,38	960,1	99,76
$^{13}\text{N}$	$^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N}$ bzw. $^{12}\text{C}(d, n)^{13}\text{N}$	9,965	1198,5	99,80
$^{15}\text{O}$	$^{15}\text{N}(p, n)^{15}\text{O}$ bzw. $^{14}\text{N}(d, n)^{15}\text{O}$	2,037	1732,0	99,90
$^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ bzw. $^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$	109,71	633,2	96,90
$^{68}\text{Ga}$	$^{68}\text{Ge}$ -Generator	68,0	1899,1	89,00
$^{75}_{\text{Br}}$ [4]	$^{76}\text{Se}(p, 2n)^{75}\text{Br}$ bzw. $^{78}\text{Kr}(p, \alpha)^{75}\text{Br}$	100	1740	75,5

## 2.2.2 Produktion Radionuklide

Für die Produktion der genannten Radionuklide ist ein relativ niedrigenergetischer Teilchenbeschleuniger, wie das in dieser Arbeit verwendete Zyklotron des MRI mit einer Beschleunigungsenergie von ca. 11 MeV, in der Nähe der [27]. des Zyklotrons angebrachten Ionenquelle, werden geladene Teilchen (z.B. Protonen, Deuteronen oder negativ geladene Wasserstoffionen) erzeugt. Diese Teilchen werden durch ein Hochfrequenzfeld im Hochvakuum beschleunigt und durchlaufen eine Spiralbahn mit

zunehmendem Radius. Sie gewinnen an Energie, bis sie am Rand der Vakuumkammer aus dem Magnetfeld gelenkt werden, und über ein Strahlentransportsystem auf das Target, d.h. auf das für die entsprechende Kernreaktion benötigte Targetgas, fokussiert werden [127].

Für die vorliegende Arbeit würde  $^{18}\text{F}$  über eine  $^{18}\text{O}(p, n) ^{18}\text{F}$ -Reaktion hergestellt. Das bedeutet, dass  $^{18}\text{F}$  durch Eindringen eines Protons und Herausschlagen eines Neutrons aus einem Sauerstoffkern produziert wurde, wobei  $^{18}\text{O}$  in Form von  $^{18}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$  mit einem Anreicherungsgrad von 97% vorlag. Nach der Bestrahlung wurde das erzeugte  $^{18}\text{F}$  über eine Rohrleitung in eine heiße Zelle geleitet und dort für die Synthese von 2-( $^{18}\text{F}$ )-Fluoro-2-Deoxy-D-Glukose nach dem Verfahren von Hamacher et al. [37] verwendet. Die Vorteile dieses Verfahren liegen in der einfachen Herstellung der Ausgangssubstanz, der leichten Entfernung der Acetyl-Schutzgruppen mit HCl und einer hohen Ausbeute von  $^{18}\text{F}$ -FDG [37].

### 2.2.3 Markierung von Biomolekülen

Sowohl zu Forschungszwecken als auch in der Nuklearmedizin kommen prinzipiell zwei Gruppen radioaktiv markierter Substanzen zum Einsatz:

Bei der ersten Gruppe wird innerhalb eines Moleküls formal ein stabiles Nuklid gegen eines seiner radioaktiven Isotope ersetzt. Da die Unterschiede im chemischen Verhalten von Isotopen eines Elements ab der zweiten Periode aufgrund der geringen Massendifferenzen vernachlässigbar sind, weisen radiomarkierte und native Verbindungen die gleiche biologische Wirkung auf. Beispiele hierfür sind [ $^{11}\text{C}$ ]- bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin, [ $^{11}\text{C}$ ]Acetat, [ $^{11}\text{C}$ ]Ethanol, [ $^{15}\text{O}$ ]Wasser oder [ $^{13}\text{N}$ ]Ammoniak [97;108]. Derartige Verbindungen eignen sich zu Tracerstudien, mit deren Hilfe sowohl Stoffwechselforgänge als auch die Pharmakokinetik bzw. -dynamik von Arzneimitteln aufgeklärt oder verschiedene medizinische Parameter wie z. B. die Durchblutung von Geweben bestimmt werden können. Die zweite Gruppe umfasst Verbindungen, bei denen einzelne Atome oder Atomgruppen durch nicht verwandte Radionuklide substituiert werden. Sind die Wirkungsradien nativer Gruppierungen mit denjenigen der radioaktiven Substituenten identisch, erhält man isogeometrisch substituierte

Analoga. Diese können in einem gewissen Umfang am Stoffwechselgeschehen teilnehmen, werden meist aber nicht bis zu den finalen Metaboliten umgesetzt. Häufig ist derjenige Schritt in einer Reaktionskaskade gehemmt, in dem der isogeometrische Substituent direkt verändert oder abgespalten werden soll. Erfolgt dieser Schritt enzymatisch, vermag das betroffene Enzym sein analoges Substrat unter Umständen nicht unverändert wieder freizugeben. Das Enzym wird dauerhaft blockiert. In dessen Folge reichert sich das analoge Substrat zunächst als Enzymkomplex, in höherer Konzentration auch frei in allen Zellen an, die einen identischen Stoffwechselschritt aufweisen. Wenn das Analogon weder anderweitig metabolisiert noch unmetabolisiert aus den Zellen ausgeschleust werden kann, wirken die betroffenen Zellen als metabolische Falle für dieses Analogon, wobei das Metabolic Trapping den gesamten Zellstoffwechsel zum Erliegen bringen kann. Das analoge Substrat selbst wird als Antimetabolit bezeichnet. Wird das Enzym nicht dauerhaft blockiert, kann ebenfalls eine Anreicherung des analogen Substrats erfolgen. Hierbei wird der Zellstoffwechsel meist dahingehend gestört, dass sich das Analogon im gehemmten Schritt wiederholt dem Enzym anbietet und durch dessen temporäre Blockade die Reaktionskaskade verlangsamt.

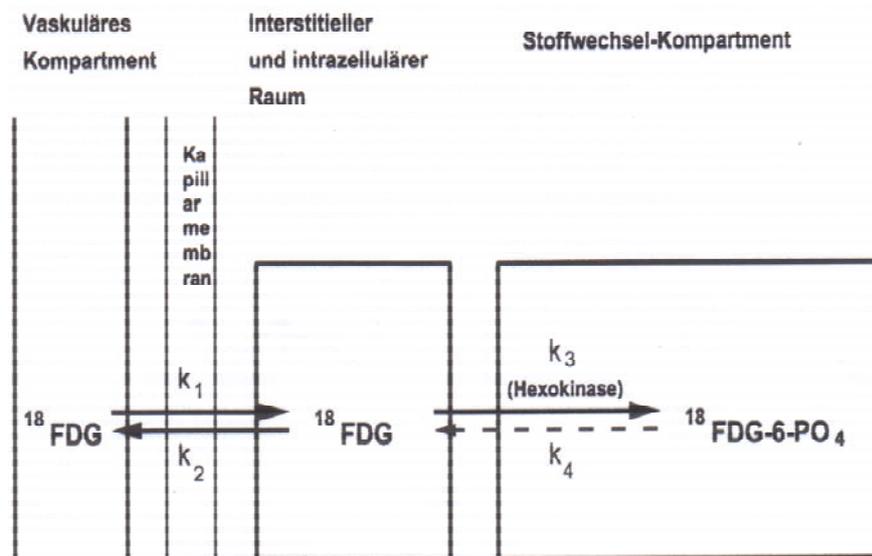
Aus nuklearmedizinischer Sicht ist das Metabolic Trapping von großem Interesse, weil dadurch bestimmte Zellarten nichtinvasiv von den übrigen Zellen unterschieden und beispielsweise mittels PET beobachtet werden können. Speziell die Tumordiagnostik bedient sich dieses Hilfsmittels [97;108].

#### **2.2.4 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-deoxyglucose**

Bei der 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-deoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) handelt es sich um ein radioaktiv markiertes Glukoseanalogon, das durch den Austausch der Hydroxylgruppe am zweiten Kohlenstoffatom durch <sup>18</sup>F radioaktiv markiert wird. [<sup>18</sup>F]FDG wird zwar über den gleichen Mechanismus wie Glukose in die Zelle aufgenommen und durch die Hexokinase phosphoryliert, danach aber nicht mehr weiter verstoffwechselt. Daher akkumuliert [<sup>18</sup>F]FDG-6-P in der Zelle, das sog. Trapping, und wird erst nach sehr langsamer Hydrolyse zu freiem FDG abgebaut und wieder in das Blutplasma zurücktransportiert [127]. Dieser

Vorgang ist jedoch während des Messzeitraums von einer Stunde zu vernachlässigen. Die im [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET gemessenen Aktivitätswerte reflektieren folglich eine definierte Reaktion, nämlich die durch die Hexokinase katalysierte Phosphorylierung der Glukose, d.h. den ersten Schritt im biochemischen Ablauf des Glukoseverbrauchs. Damit liefert [ $^{18}\text{F}$ ]FDG das energiespezifische Maß der allgemeinen Funktion [82].

Mit Hilfe des für die in vivo Untersuchung des Menschen modifizierten Drei-Kompartiment-Modells nach Sokoloff et al. [100] kann aus der Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FDG relativ zuverlässig die regionale metabolische Rate der Glukose (rCMRglc) bestimmt werden [82].



**Abbildung 1:** Drei-Kompartimentmodell nach Sokoloff et al [100] zur Berechnung des regionalen Glukosestoffwechsels. Die Transportkonstante  $k_4$  entspricht der Rückreaktion zu FDG und kann innerhalb der ersten 60 min vernachlässigt werden.

Wie Abbildung 1 zeigt, wird in diesem Modell der Austausch des FDG zwischen Blut und Gewebe, durch Vernachlässigen der Durchblutung und der Rückreaktion von FDG-6-P zu freiem [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, auf drei Transportparameter  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  beschränkt. Zusätzlich werden die vier Kompartimente, in denen [ $^{18}\text{F}$ ]FDG nachweisbar ist, durch Zusammenfassen des interstitiären und des zellulären Raumes auf drei Kompartimente reduziert [127]. Nach dieser Vereinfachung kann man die rCMRglc nach der Gleichung:

$$rCMR_{glc} = C_p/LC \times k_1k_3/(k_2 + k_3)$$

aus der im Blutplasma gemessenen  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aktivität  $C_p$ , den drei Transport-Parametern, und aus einer experimentell bestimmten „lumped constant“ (LC), die die Unterschiede in den Transport- und Phosphorylierungsraten zwischen Glukose und FDG korrigiert, berechnen.

Für die Anwendung des Sokoloff-Modells sind allerdings dynamische Aufnahmen und kontinuierliche Blutabnahmen nötig. Es wird deswegen in der Regel eine einfachere, für eine statische PET-Messung geeignete Modifikation dieses Modells nach Phelps et al. [82] angewandt, die allerdings mit einer größeren Messungenauigkeit behaftet ist [127]. Hierbei wird auf eine absolute Quantifizierung verzichtet, und die Datenauswertung, nach Normierung der Aktivität auf den globalen Mittelwert, anhand eines weiter unten beschriebenen semiquantitativen voxelweisen Vergleichs durchgeführt. Diese Methode eignet sich insbesondere zur Erfassung relativer intraindividuelle Veränderungen der  $rCMR_{glc}$  im Rahmen wiederholter [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET Untersuchungen.

Die relativ lange physikalische Halbwertszeit des  $^{18}\text{F}$  von 109,7 min und die biologische Halbwertszeit (clearance time) der  $^{18}\text{F}$ -2-Fluor-Deoxy-D-Glukose von ca. 60 bis 100 min lassen jedoch im Gegensatz zu regionalen Blutflussmessungen mit radioaktivem Wasser, nur wenige Wiederholungen der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET Untersuchungen pro Person zu. Allerdings erhält man durch die bei einer Messung erfassbare hohe Impulsrate eine gute Bildqualität. Die gemessenen Werte spiegeln dabei den Glukosemetabolismus über einen Untersuchungszeitraum von etwa zehn Minuten nach Beginn der Tracer-Injektion wieder. Die Bestimmung des Glukosemetabolismus mit FDG eignet sich somit zur Untersuchung von länger andauernden physiologischen und pathologischen

### 2.2.5 Autoradiographie

Antoine-Henri Becquerel hat 1896 die radioaktive Strahlung der Pechblende durch Schwärzung einer photographischen Platte entdeckt. Das älteste Verfahren zum Nachweis radioaktiver Strahlung, die Autoradiographie, beruht auf der Tatsache, dass diese Strahlung auf einer photographischen Emulsion

dieselbe Wirkung wie Licht- und Röntgenstrahlung ausübt. Die Autoradiographie gehört zu den wichtigsten Nachweismethoden ionisierender Strahlung.

Die Methode der Ganzkörperautoradiographie, mit deren Hilfe es möglich ist, die Verteilung von radioaktiv gelabelten Substanzen in Geweben von Labortieren zu ermitteln, wurde erstmals von Ullberg [115] vorgestellt. Heute ist es kaum noch vorstellbar, dass die Personen damals während der Schnittabnahme in einem auf  $-15\text{ °C}$  gekühlten Raum arbeiten mussten, um das Mikrotom zu bedienen. Die Technik der Schnittabnahme konnte seitdem deutlich modifiziert und verbessert werden. Sie erfolgt heute mit einem Hochpräzisions-Großschnittkryomikrotom, wie es auch für diese Arbeit zur Verfügung gestanden hat.

Mit der Entwicklung der neuen Imageplatten, welche sich durch eine im Vergleich zu früher verwendeten, konventionellen Röntgenfilmen um eine etwa 100 mal höhere Sensitivität gegenüber der radioaktiven Strahlung auszeichnen, konnte die Empfindlichkeit deutlich erhöht werden. Nicht mehr erforderlich ist zudem die Verwendung von Chemikalien zur Entwicklung bzw. eine Dunkelkammer. Die Platten können durch Belichtung gelöscht und wieder verwendet werden. Die erhaltenen Autoradiogramme werden digital gespeichert und verarbeitet und müssen nicht mehr in Filmarchiven gelagert werden. Die Imageplatten können mit Hilfe eines Bio-Imaging Analyzer Systems (BAS) ausgewertet werden [71].

Die Platten sind mit hochdispersen Leuchtstoffkristallen, Barium-Fluorid-Halogenid  $\text{BaFX:Eu}^{2+}$  ( $X = \text{Cl, Br, I}$ ), beschichtet. Wenn eine radioaktiv markierte Probe mit der Platte in Kontakt gebracht wird, wird dessen Energie auf diesen photostimulierbaren Leuchtstoff transferiert und gespeichert. Wenn die so exponierte Imageplatte dann im Scanner durch einen Helium-Neon-Laser (rotes Licht, 633 nm) erneut angeregt wird, gibt sie die gefangenen Elektronen als sichtbares blaues Licht (etwa 400 nm) frei. Dieser Prozess wird als photostimulierbare Lumineszenz (PSL) bezeichnet (Fujifilm Produktinformationen). Die Autoradiographie wird demnach heute auch als Autoradioluminographie bezeichnet [41].

Die Autoradiographie stellt in erster Linie ein qualitatives Nachweisverfahren dar. Da über einen breiten Bereich eine lineare Beziehung zwischen der Menge an Radioaktivität und der Abbildungsdichte besteht [72], kann sie unter bestimmten Bedingungen auch zu quantitativen Bestimmungen herangezogen werden. Umfassende Validierungen hierzu wurden weltweit im Rahmen gemeinsamer Bemühungen mehrerer pharmazeutischer Unternehmen, unter anderen auch dem Institut für Pharmakokinetik und Metabolismus der Firma Merck, durchgeführt [102] sowie komplexe Empfehlungen bezüglich einer Standardisierung der Methode gegeben [103].

Die Autoradiographie kann unter anderem auch zur Lokalisation von Radioaktivität auf Flächen, wie beispielsweise auf Papierchromatogrammen oder Elektrophoresestreifen oder als Mikroautoradiographie in histologischen Schnitten verwendet werden.

## **2.3 Magnetresonanztomographie**

### **2.3.1 Physikalische Grundlagen**

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wurde bereits 1946 durch Bloch und Purcell beschrieben. Durch die Einführung von Gradientenfeldern gelang Lauterburg 1973 erstmals die räumliche Zuordnung und damit die erste bildhafte Darstellung von verschiedenen Objekten [73]. Mit diesen Grundlagen wurde ein Verfahren in die medizinische Bildgebung eingeführt, welches sich seitdem rasant weiterentwickelt hat, so dass es sich heute in der klinischen Diagnostik etabliert hat.

Die physikalischen Grundlagen der Kernspinresonanz, Mechanismen der Relaxation und die verschiedenen zur Bildgebung verwendeten Sequenzen werden in wissenschaftlichen Standardwerken ausführlich erläutert [53;56;92;107]. Aufgrund der zentralen Bedeutung dieser Arbeit werden die Grundlagen der MR-Kontrastmittel hier ausführlicher dargestellt.

### 2.3.2 MR-Kontrastmittel

Die Bildkontraste in der MRT lassen sich einerseits auf gerätespezifische Parameter wie die Feldstärke, die Gradienten und die Sequenzen und andererseits auf gewebespezifische Parameter wie die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$ , die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$ , die Protonendichte und die Flussgeschwindigkeit zurückführen [111]. Die ohnehin schon hervorragende Fähigkeit Kontraste zwischen den Weichteilgeweben darzustellen, lässt sich in der Kernspintomographie mittels verschiedener Kontrastmittel noch weiter verstärken. Diese wirken nicht direkt signalmindernd, sondern beeinflussen das Signal durch Änderung der lokalen magnetischen Umgebung des Gewebes und somit hauptsächlich über Änderung der Relaxationszeiten  $T_1$  und/oder  $T_2$  der Protonen des Zielgewebes. Diese Beeinflussung bezeichnet man als indirekten Wirkmechanismus [92].

Substanzen, die als Kontrastmittel geeignet sind, müssen zur Beeinflussung der Relaxation von Protonen ungepaarte Elektronen aufweisen, wobei jedes dieser ungepaarten Elektronen in einem separaten Elektronenorbital (Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons) platziert ist. Alle diese ungepaarten Elektronen weisen einen parallelen Spin auf, der sich zu einem Netto-Elektronenspin addiert. Dies bezeichnet man als Paramagnetismus. Durch das entstehende magnetische Moment der ungepaarten Elektronen entsteht ein starkes, fluktuierendes magnetisches Wechselfeld neben den Protonen, das deren Relaxation stimuliert: Die mit der Präzessionsfrequenz von Protonen übereinstimmende Frequenzkomponente verkürzt die  $T_1$ -Relaxationsszeit. Die Verkürzung der  $T_2$ -Relaxationszeit ist eine Folge von Schwankungen des lokalen Magnetfeldes und des daraus resultierenden Verlustes an Phasenkohärenz [88;92]. Die Relaxivitäten  $R_1$  und  $R_2$  ( $\text{mmol s}^{-1}$ ) sind ein Maß für die Wirksamkeit eines Kontrastmittels und unabhängig von Eisenkonzentration [92]. Erläuterung dieser Mechanismen liefern die Arbeiten von Solomon [101] und Bloembergen [9]. Diese wurden in den Formeln der Abbildung 2 zusammengefasst und in den Grafiken der Abbildung 3 veranschaulicht [107].

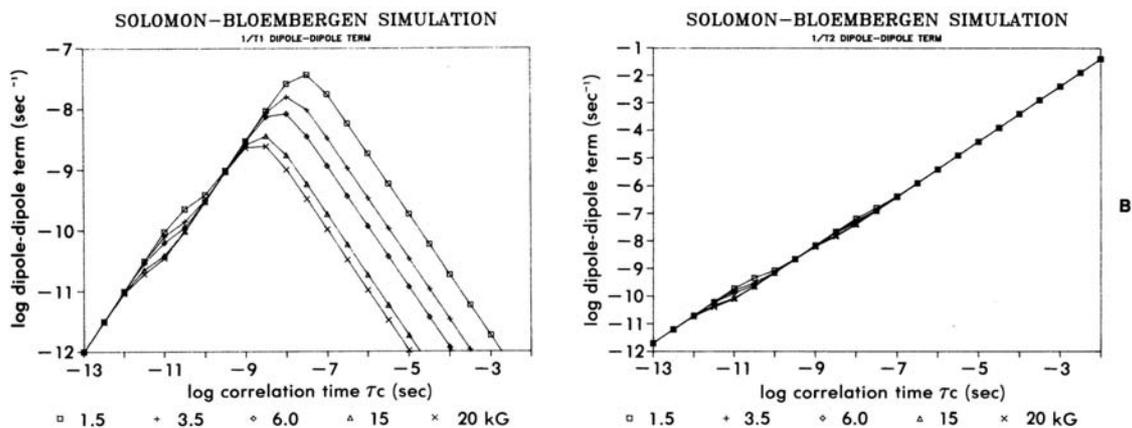
$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{15} \left[ \frac{S(S+1)\gamma^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left( \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1 + \omega_S^2 \tau_c^2} \right) \right] + \frac{2}{3} \left[ \frac{S(S+1)A^2}{h^2} \left( \frac{\tau_e}{1 + \omega_S^2 \tau_e^2} \right) \right]$$

dipole-dipole terms scalar terms

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{15} \left[ \frac{S(S+1)\gamma^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left( 4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1 + \omega_S^2 \tau_c^2} \right) \right] + \frac{1}{3} \left[ \frac{S(S+1)A^2}{h^2} \left( \tau_e + \frac{\tau_e}{1 + \omega_S^2 \tau_e^2} \right) \right]$$

**Abbildung 2: Formel von Solomon und Bloembergen zur mathematischen Erklärung dipolarer und scalarer Interaktionen zwischen ungepaarten Elektronen und Protonen [107].**

MR-Kontrastmittel können nach dem Kompartiment, welches sie markieren (intrazellulär oder extrazellulär), ihrem Signalverhalten (positives vs. negatives Signalverhalten) oder ihren magnetischen Eigenschaften (diamagnetisch, paramagnetisch, ferromagnetisch, superparamagnetisch) unterschieden werden. Zur detaillierten Erörterung der MR-Kontrastmitteleinteilung sei auf die Arbeit von Laniado [52] verwiesen.



**Abbildung 3: Dipol-Dipol Relaxationsraten 1/T1 (links) und 1/T2 (rechts), wie von der Solomon-Bloembergen Theorie berechnet [107].**

Legt man die magnetischen Eigenschaften des MR-Kontrastmittels zugrunde, so stellt die magnetische Suszeptibilität im Magnetfeld ein wesentliches Charakteristikum der KM dar. Als Suszeptibilität wird das Verhältnis zwischen induzierter Magnetisierung und externem Magnetfeld bezeichnet. Die Art der Magnetisierbarkeit lässt im Wesentlichen zwischen zwei Formen von Kontrastmitteln unterscheiden, den paramagnetischen und den superparamagnetischen Kontrastmitteln (Abbildung 4).

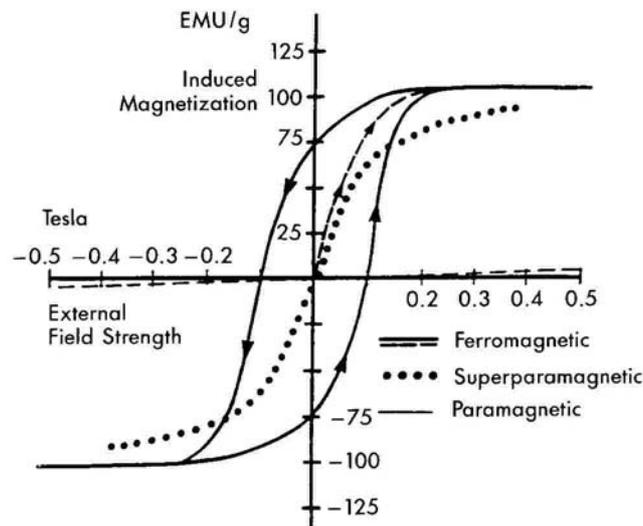


Abbildung 4: Magnetische Suszeptibilität: Vergleich von paramagnetischen, ferromagnetischen und superparamagnetischen Kontrastmitteln [107].

### 2.3.2.1 Paramagnetische Kontrastmittel

Paramagnetische Substanzen (Gadolinium-Gd<sup>3+</sup>-, Dysprosium-Dy<sup>3+</sup>-, Eisen-Fe<sup>2+</sup>- und Fe<sup>3+</sup>-, Mangan-Mn<sup>2+</sup>-Ionen) richten sich bei einem äußeren Magnetfeld parallel zu diesem aus, so dass die Substanz selbst magnetisiert ist (positive Suszeptibilität). Sie sind durch ungepaarte Elektronenspins gekennzeichnet. Paramagnetische Substanzen bewirken - abhängig von ihrer Konzentration - eine Verkürzung der Relaxationszeiten T1 oder T2, allerdings steht in den üblichen klinisch angewandten Dosen die Verkürzung der T1-Relaxationszeit im Vordergrund. Diese bewirkt in T1-gewichteten MR-Aufnahmen eine Signalerhöhung. Solche KM werden daher als "T1-Kontrastmittel" bezeichnet, die typischen Vertreter sind Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-BOPTA, Mn-DPDP. Während paramagnetische Substanzen in SE-Sequenzen kaum einen Einfluss auf die T2-Zeit haben, tritt dieser bei Anwendung von schnellen GE-Sequenzen stärker in den Vordergrund.

**Tabelle 3: Magnetisches Moment und Anzahl ungepaarter Elektronen von Metallionen [92]**

Metallionen	Anzahl ungepaarter Elektronen	Magnetisches Moment (Bohr-Magnetom)
<b>Übergangsmetalle:</b>		
Cu <sup>2+</sup>	1	1,7-2,2
Cr <sup>3+</sup>	3	3,8
Fe <sup>2+</sup>	4	5,1-5,5
Mn <sup>2+</sup>	5	5,9
Fe <sup>3+</sup>	5	5,9
<b>Lathaniden :</b>		
Gd <sup>3+</sup>	7	8,0

### **2.3.2.2 Superparamagnetische (SPIO) und ultrakleine superparamagnetische (USPIO) Eisenoxid-Kontrastmittel**

Eisenoxid-Kontrastmittel enthalten Magnetite oder Ferrite. Sie bestehen aus einem Kristallkern mit multiplen Eisenoxid-Aggregaten, der von einer stabilisierenden Hülle aus Dextran- oder Carboxydextran-Molekülen umgeben ist [88]. Dieses „coating“ verbessert die Verträglichkeit und verhindert eine in vivo Aggregation [92]. Die Größe der Partikel variiert von 20 bis 120 nm. Zu den Anwendungsgebieten zählen die Leber- und Lymphknotenuntersuchung durch die MRT, und neuerdings auch die MRT des Knochenmarkes, die MR-Angiographie, Lymphozyten-Marking und Rezeptor-Imaging [27].

SPIO und USPIO besitzen paramagnetische Eigenschaften, d.h. sie entwickeln in einem äußeren Magnetfeld selbst schwach magnetische Eigenschaften. Bei Anreicherung im Gewebe führen sie zu einer Abschwächung bzw. Auslöschung des MRT-Signals, das Gewebe stellt sich schwarz dar [121]. Die Eisenoxid-Kontrastmittel zeigen primär einen T2-Effekt, der zu einer Signalabschwächung auf T2-gewichteten Bildern führt [125]. Hierbei ist die T2-Relaxationszeit umgekehrt proportional zum Partikeldurchmesser und proportional zur Partikelanzahl. Aus diesem Grund besitzen die SPIO einen deutlich stärkeren T2-Effekt als die USPIO [18]. Superparamagnetische Kontrastmittel gelten als

„Störfelder“, die die Homogenität des von außen angelegten Feldes  $B_0$  beeinflussen. Verantwortlich dafür sind lokale Effekte, die aufgrund weiterreichender Wechselwirkungen durch das große magnetische Moment Feldinhomogenitäten erzeugen [88]. In T2-gewichteten Bildern ist dies erkennbar durch einen konsekutiven Signalabfall des entsprechenden Zielgewebes, also einer negativen SI [88;125]. Aus diesem Grund bezeichnet man superparamagnetische Kontrastmittel auch als negative Kontrastmittel.

Auf T1-gewichteten Bildern wird die T1-Relaxationszeit von Blut und Gewebe durch die SPIO selektiv verkürzt. Daraus resultiert eine Erhöhung der SI auf T1-gewichteten Bildern. Die T1-Relaxivität der superparamagnetischen Kontrastmittel ist um den Faktor zwei bis sechs schwächer als ihre T2-Relaxivität. Der T1-Effekt der USPIO ist dagegen deutlich größer als der der SPIO. Die Aufnahme in die Zellen ist für die einzelnen Kontrastmittel zellspezifisch und erfolgt auf unterschiedliche Weise, sie ist bei den jeweiligen Kontrastmitteln beschrieben. Eisenoxid-Kontrastmittel werden von den Organen des retikuloendothelialen Systems wie Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark spezifisch aufgenommen und unterliegen dem physiologischen Eisenmetabolismus [88;116;125].

Die Eisenoxide werden in den physiologischen Eisenstoffwechsel eingeschleust, also in das Hämoglobin eingebaut. Dort zeigen sie auch das gleiche Eliminationsverhalten wie endogenes Eisen, also eine sehr langsame Ausscheidung. Beim Menschen liegt die Eisenausscheidung bei ca. 1 mg pro Tag, bei menstruierenden Frauen verdoppelt sich diese Menge annähernd [81]. Die Eisenpartikel verbleiben mehrere Wochen im Organismus und werden dann überwiegend über die Fäces ausgeschieden. Die Urinausscheidung liegt bei <1%. Nach 84 Tagen sind 16-21% des injizierten Eisens wieder ausgeschieden [81].

Die Eisenoxide haben ein Molekulargewicht von  $> 1$  kDa. Die Größe ist mit der von Plasmaproteinen vergleichbar. Physiologisch verhalten sich diese Kontrastmittel daher als Makromoleküle. Ihr Verteilungsvolumen entspricht annähernd dem Blutvolumen von Geweben [92].

### Ferumoxides (Endorem®)

Das superparamagnetische Eisenoxidkontrastmittel Endorem® (Laboratoire Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) besteht aus Magnetite  $\text{Fe}^2\text{O}^3/\text{Fe}^3\text{O}_4$ -Partikeln ( $\text{Fe}_{24}\text{O}_{32}$ ). Synonyme sind advanced magnetic imaging (AMI-25), der Name während der klinischen Entwicklung, und Ferridex®, der Handelsname in den USA, über die Firma Berlex.

Die mit Dextran ummantelten Eisenoxid-Partikel weisen einen Durchmesser von 80 bis 120 nm auf [48;118]. Die Ladung der Hülle ist neutral. Die Osmolalität beträgt 340 mOsm/kg und der pH-Wert liegt bei 6,0 bis 8,0.

Ferumoxides gehört zu den zellspezifischen Kontrastmitteln, die sich im RES von Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark anreichern. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch Phagozytose. In einem gesunden Organismus werden ca. 80% der Injektionsdosis von den Kupfferschen Sternzellen der Leber, 6% von den Makrophagen der Milz und nur ein geringer Teil vom Knochenmark aufgenommen [123]. Mit dieser geringen Menge wird bereits eine verbesserte Detektion von Knochenmark-Tumoren erreicht [6;93].

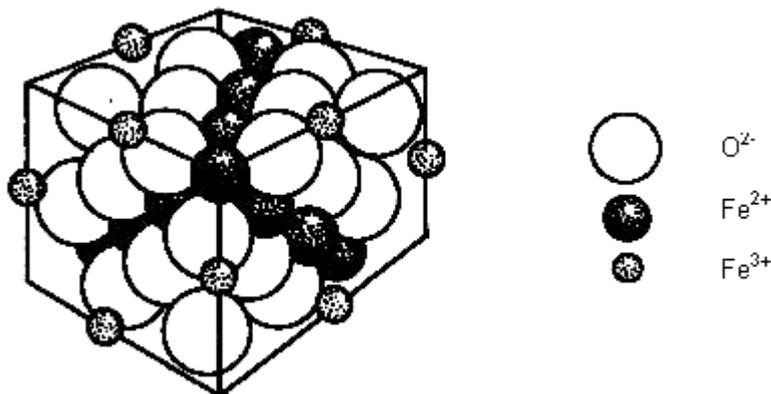


Abbildung 5: Kristallstruktur von Endorem® ( $\text{Fe}_{24}\text{O}_{32}$ ) [48;107]

Bei Leberkranken kann sich die Kontrastmittel-Aufnahme der Milz gegenüber der Leber verstärken, und die Leber kann die Kontrastmittel unregelmäßig aufnehmen [27]. Da sich in malignen Lebertumoren keine RES-Zellen befinden, nehmen diese das Kontrastmittel nicht auf. Dadurch erscheint das gesunde Lebergewebe nach Kontrastmittelinjektion auf T2-gewichteten MR-Bildern

signalarm, und das Tumorgewebe meist signalreich [88].

Das seit 1994 zugelassene Endorem<sup>®</sup> wurde bisher primär für die Diagnostik von fokalen Leberläsionen eingesetzt [6;123]. Klinische Untersuchungen zeigen, dass durch den Einsatz von Endorem<sup>®</sup> die Sensitivität der MRT für die Detektion von Lebertumoren gegenüber der nativen MRT gesteigert werden konnte [120]. Seit 1988 wurde Ferumoxides im Rahmen zahlreicher Studien erforscht und stellt das erste Beispiel für injizierbare Nanopartikel dar [48].

Endorem<sup>®</sup> ist eine injizierbare Suspension von schwarzer bis braun-rötlicher Farbe und liegt als Infusionslösungskonzentrat vor. Eine 8 ml-Ampulle enthält 120 bis 133 mg paramagnetisches Eisen (II, III)-oxid. Dies entspricht 89,6 mg Eisen. Zusätzliche Bestandteile sind Dextran 10, wasserfreie Zitronensäure, Mannitol und Wasser für Injektionszwecke. Eine Dosis Endorem<sup>®</sup> sollte mit 100 ml 5%iger Glucoselösung als Infusion über 30 Minuten gegeben werden. Die Bluthalbwertszeit liegt beim Menschen bei ca. 20 min [118]. Endorem<sup>®</sup> ist bei sachgemäßer Anwendung gut verträglich und hat geringe Nebenwirkungen. In der klinischen Erprobung eines ersten Präparates traten zum Teil folgende unerwünschte Wirkungen auf: Schmerzen im Lumbalbereich (4,8%), Thoraxschmerzen (1,5%), Flush (1%), Hitzegefühl (1%), Dyspnoe (0,7%), leichte Blutdruckveränderungen (0,7%), Kopfschmerzen (0,6%) und Übelkeit (0,6%) [51]. Durch Austausch des Lösungsmittels und Verabreichung geringerer Dosierungen konnten Überempfindlichkeitsreaktionen reduziert werden. Die Dosierung beträgt 0,84 mg (10-15 µmol) Eisen/kg Körpergewicht [48].

**Tabelle 4: Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Endorem®: a) pro Ampulle (8ml) und b) pro 100 ml [48]**

<b>Endorem</b>		
<b>Zusammensetzung</b>	a) spezifisch	b) zentesimal
Eisenoxid	q.s. 89,6 mg Eisen	q.s. 1,12 g Eisen
Andere Bestandteile:		
Dextran	60,8 mg	0,76 g
Citrat	2,7 mg	0,034 g
Mannitol	490,4 mg	6,13 g
Wasser zu Injektionszwecken	q.s. 8 ml	q.s. 100 ml

<b>Eigenschaften</b>	<b>Parameter</b>	
Osmolalität	340 mOsm/kg	340 mOsm/kg
Viskosität	1,3 mPa.s (20 °C)	1,3 mPa.s (20 °C)
PH	6,0-8,0	6,0-8,0

### **Ferucarbotran (Resovist®)**

Resovist® ist ein leberspezifisches eisenoxidhaltiges MR-Kontrastmittel, das als Bolus verabreicht werden kann und damit auch eine Bildgebung in der frühen Anflutungsphase erlaubt. Die Detektion von Läsionen ist schon nach 10 Minuten bis mindestens 8 Stunden möglich. Die Aufnahme erfolgt mittels  $T_2/T_2^*$ -gewichteter MR-Sequenzen wie dem herkömmlichen  $T_2$ -Spin-Echo (SE) oder den MR-Sequenzen mit schneller Bildfolge (Fast-Spin-Echo/Turbo-Spin-Echo). Diagnostische Informationen über die intrahepatischen Gefäße lassen sich z.B. mittels MR-angiographischen Time-of-Flight (TOF)-Sequenzen innerhalb von 20 min nach der Injektion gewinnen.

Resovist® enthält superparamagnetische Eisenoxid-Partikel (SPIO), die mit Carboxydextran ummantelt sind (Ferucarbotran). Diese Ummantelung verhindert eine Aggregation der Partikel und hält sie in einer stabilen Suspension. Ferucarbotran besitzt eine niedrige Viskosität und ist blutisoton. Der hydrodynamische Durchmesser der ummantelten Partikel liegt im Bereich

von 45 bis 60 nm. Die Größe der Teilchen hat einen großen Einfluss auf die magnetischen Eigenschaften, aber auch auf die Geschwindigkeit, mit der die Partikel von den Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen werden, zum Beispiel von den Kupffer'schen Sternzellen der Leber.

Dieses Kontrastmittel ist einfach in der Handhabung: Fertigspritzen mit festgelegten Dosierungen erlauben eine unkomplizierte Bolusgabe. Für Patienten unter 60 kg werden 0,9 ml-Spritzen, für Patienten über 60 kg 1,4 ml-Spritzen angeboten. Durch die schnelle und fast vollständige Aufnahme der Substanz durch die Kupffer'schen Sternzellen der Leber können mit Resovist® innerhalb von 15 bis 20 Minuten alle notwendigen Informationen für eine umfassende und zuverlässige Diagnostik akquiriert werden.

Resovist® hat einen sehr starken Effekt auf die T1- und T2-Relaxationszeit. Wegen der hohen T2-Relaxivität eignet sich das Kontrastmittel besonders für T2/T2\*-gewichtete Aufnahmen. Durch die relativ hohe T1-Relaxivität sind aber auch T1-gewichtete Aufnahmen möglich. Ferucarbotran kann deshalb sowohl zur Differenzierung von benignen und malignen Leberläsionen als auch zu ihrem Nachweis bzw. Ausschluss eingesetzt werden.

Resovist® wird schnell vom retikuloendothelialen System (RES) aufgenommen. Etwa 85% der Dosis werden dabei von den Kupffer-Zellen der Leber phagozytiert. Durch die sehr hohen Konzentrationen wird lokal ein starker T2-Effekt erzielt, der die Leber auf T2-gewichteten Bildern dunkler erscheinen lässt. Bereits 10 Minuten nach der Injektion ist Ferucarbotran hinreichend stark im gesunden Lebergewebe angereichert (Akkumulationsphase), so dass sich Metastasen und maligne Primärtumoren, die kein oder nur sehr wenig Resovist® aufnehmen, deutlich vom gesunden Lebergewebe hervorheben. Bei der Detektion von fokalen Leberläsionen ist die MRT mit Resovist® selbst der CT-gestützten arteriellen Portographie (CTAP) überlegen.

Resovist® zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit aus. So gibt es keine Anwendungsbeschränkung für Patienten mit Nieren- oder Leberinsuffizienz. Die in den klinischen Studien beobachteten Nebenwirkungen entsprechen nach Art und Häufigkeit jenen von unspezifischen MR-Kontrastmitteln. Die am häufigsten berichteten Nebenwirkungen waren Schmerzen, Vasodilatation und

Parästhesie. Das in Ferucarbotran enthaltene Eisen beträgt ca. 1% des normalen Eisengehaltes des Körpers und wird in die natürlichen Eisenspeicher aufgenommen. Diese Dosis ist etwa vergleichbar mit der Menge an Eisen, die innerhalb von 2-3 Tagen mit der Nahrung aufgenommen wird [94].

**Tabelle 5: Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Resovist® [94]**

<b>Resovist</b>		
<b>Zusammensetzung</b>	0,9 mL Resovist	1,4 mL Resovist
Ferucarbotran	486 mg	756 mg
Eisen	0,45 mmol	0,7 mmol
Andere Bestandteile:		
Milchsäure	k.A.	k.A.
Mannitol	k.A.	k.A.
Natriumhydroxid	k.A.	k.A.
Wasser für Injektionszwecke	k.A.	k.A.

<b>Eigenschaften</b>	<b>Parameter</b>	
Osmolalität bei 37° C	333 mOsm/kg H <sub>2</sub> O	333 mOsm/kg H <sub>2</sub> O
Viskosität bei 37° C	1,03 mPa.s	1,03 mPa.s
Dichte bei 37° C	1,057 g/mL	1,057 g/mL
pH	5,5 - 7,0	5,5 - 7,0

### 2.3.3 Indikationen für Kontrastmittel

Kontrastmittel gelten im Sinne des Arzneimittelgesetzes als Medikamente und müssen viele Anforderungen wie organspezifische Anreicherung, gute Verträglichkeit, leichte und zumutbare Applikation, Stoffwechsellinaktivität, schnelle Ausscheidung und ökonomische Verordnungsweise erfüllen [42].

Tabelle 6: Übersicht über einige MR-Kontrastmittel

Kontrastmittel	Synonyme	Größe	Ummantelung	Ladung
<b>Eisenoxide</b>				
SPIO (>50 nm)	Ferumoxides, Endorem <sup>®</sup> , AMI- 25 (Guerbet)	80-120 nm	Dextran	neutral
USPIO (<50 nm)	Ferumoxtran, Sinerem <sup>®</sup> , AMI- 227 (Guerbet)	30-60 nm	Dextran	neutral
USPIO	P7228 (Guerbet)	20-40 nm	Carboxy- dextran	negativ
SPIO	Nanomag <sup>®</sup> - Transferrin (Micromod)	50 nm	Dextran	
SPIO	Ferucarbotran, Resovist <sup>®</sup> , (Schering)	45-60 nm	Carboxy- dextran	neutral
<b>Gadolinium-Präparate</b>				
Gadolinium- Chelate	Gadopentetat, Gd-DTPA, Magnevist <sup>®</sup> (Schering)		-	3-fach negativ
Digadolinium- Porphyrine	Gadophrin (Schering)		-	negativ

Durch die Entwicklung von MR-Kontrastmitteln konnte die diagnostische Aussagekraft verbessert und das Indikationsspektrum der MRT erweitert werden. Durch die parallele Entwicklung neuer, schnellerer MR-Techniken und einer Vielzahl von Kontrastmitteln erfolgte eine rasante Weiterentwicklung und die Erschließung neuer Anwendungsgebiete der MRT. Zukünftig sind

Fortschritte z.B. in der Koronarangiographie und in der Darstellung der Tumorangiogenese zu erwarten [92]. Klinische Anwendungen von Kontrastmitteln in der MRT haben wesentliche Vorteile der kontrastverstärkenden Untersuchungen gegenüber Nativuntersuchungen gezeigt. Dazu gehören eine verbesserte Sensitivität, bessere Detailerkennbarkeit und die Möglichkeit nichtinvasiver funktioneller Untersuchungen [92]. Auch können bei der Verwendung von Kontrastmitteln Aussagen über Perfusionseigenschaften von Organen und die Kapillarpermeabilität z.B. bei Störungen der Blut-Hirn-Schranke und der Knochenmark-Blut-Schranke gemacht werden [89].

Die Klassifizierung der Kontrastmittel erfolgt anhand der Bioverteilung. Von der Selektivität der Bioverteilung und der absoluten Konzentration des Kontrastmittels im Zielgewebe hängt der diagnostische Wert einer Kontrastmittel-unterstützten MRT ab [92].

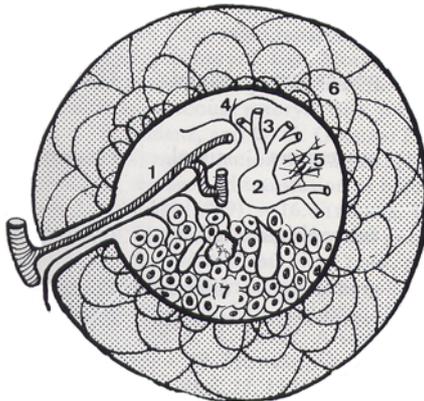
## **2.4 Hämatopoetische Stammzellen**

### **2.4.1 Entstehung des Stammzellsystems**

In der Embryonalphase erfolgt die Differenzierung der Blutzellen zunächst in der Wand des Dottersacks, geht dann auf Leber und Milz über und wird in der fortschreitenden intrauterinen Entwicklung vom roten Knochenmark übernommen. Auf allen Orten der Zellbildung ist zunächst eine zelluläre Matrix vorhanden, die den Zellen die für ihr Wachstum notwendige Mikroökologie bietet. Im Knochenmark werden dann zeitlebens die Blutzellen aus Stamm- und Vorläuferzellen differenziert [47;55].

Alle Zellen des Blutes entwickeln sich aus mesenchymalen Retikulumzellen, die im retikulären Gewebe des Knochenmarkes als pluripotente Stammzellen bezeichnet werden. Die Vorläuferzellen für die Blutzellbildung bezeichnet man als Hämozytoblasten. Die Hämozytoblasten wandeln sich in unipotente Progenitorzellen um, die Stammzellen für die Bildung der unterschiedlichen

Blutzellen darstellen. Diese sogenannten determinierten Stammzellen besitzen zahlreiche Oberflächenrezeptoren. Replikation, Proliferation und Differenzierung der Stammzellen werden durch zahlreiche Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gesteuert [55].



- (1) nutritive Gefäße
- (2)+(3) Sinussystem
- (4) Nervenfasern
- (5) Retikuläres Zellsystem
- (6) Knochenmanschette (Endost, Periost)
- (7) Parenchym (Stammzellsystem: Hämatopoese)

**Abbildung 6: Knochenmark: Elemente der effektiven blutzellbildenden Systeme [31]**

Die primitive humane pluripotente Stammzelle exprimiert CD34, bei der weiteren Entwicklung dienen weitere zellspezifische Oberflächenantigene der Identifikation der Zellen [43].

Die Ontogenese der Hämatopoese ist bei Mäusen und Menschen sehr ähnlich, so dass die Maus ein Modell für das Studium der embryonalen Entwicklung der Stammzellen darstellt [132].

## 2.4.2 Komponenten des Immunsystems

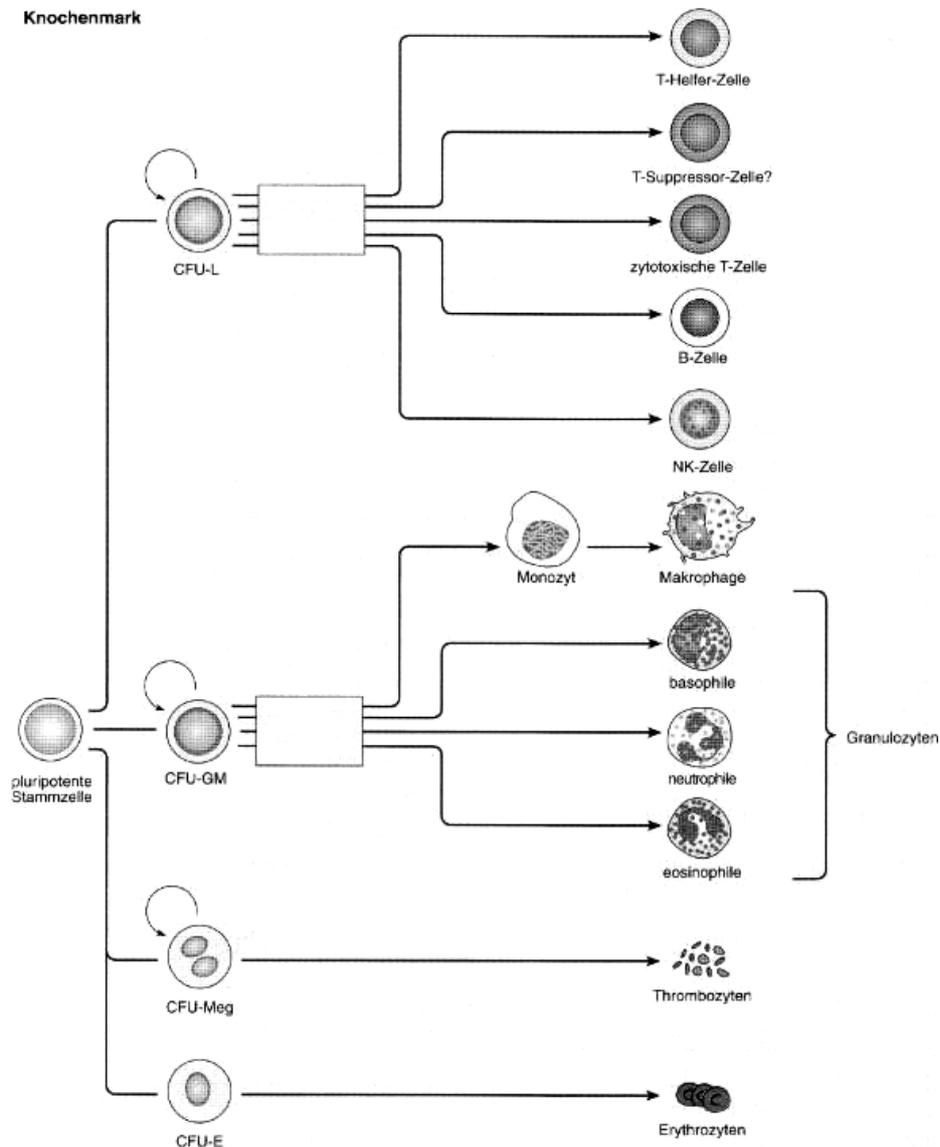


Abbildung 7: Beziehung zwischen den Blutzellen der verschiedenen Linien [10]

### 2.4.2.1 Granulozyten

Aus den Hämoytoblasten differenzieren sich Myeloblasten als Vorläufer für neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Wachstumsfaktoren sind der Granulozytenkolonie-stimulierende Faktor, der Granulozyten-Monozytenkolonie stimulierende Faktor, Interleukin-3 und Interleukin-6, die auch die

Monozytenreifung stimulieren. Gebildet werden die verschiedenen Wachstumsfaktoren von Lymphozyten, Stromazellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Sie sind nicht nur für die Proliferation, sondern auch die Reifung der einzelnen Zellen und für deren spätere Funktion verantwortlich. Die verschiedenen Wirkungen werden von unterschiedlichen Rezeptorabschnitten kontrolliert [64;65]. Aus den Myeloblasten entstehen Promyelozyten, daraus Metamyelozyten, aus denen sich zunächst die stabkernigen und schließlich die segmentkernigen neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten differenzieren. Ab dem Promyelozytenstadium kann man die einzelnen Granulozyten unterscheiden. Der Metamyelozyt ist nicht mehr zur Zellteilung befähigt. Die stabkernigen Granulozyten entwickeln sich durch eine Verdichtung des Zellchromatins. Die reifen, segmentkernigen Granulozyten werden in das Blut abgegeben [128].

#### **2.4.2.2 Lymphozyten**

Im Knochenmark entstehen aus den Hämocytoblasten die Lymphoblasten, aus denen sich Proplasmazyten als Vorläufer für die Plasmazellen und mittlere Lymphozyten als Vorläufer für die B-Lymphozyten differenzieren. Pre-B-Zellen verlieren CD34 und erhalten IgM im Zytoplasma. Im Zuge der weiteren Reifung zur immunkompetenten B-Zelle exprimiert sie IgG auf ihrer Oberfläche. Das IgG Oberflächenmolekül ist ein Charakteristikum reifer B-Zellen. Reife B-Zellen reifen nach Antigenkontakt zu Plasmazellen und produzieren Antikörper. Sie exprimieren kein IgG, besitzen jedoch intrazelluläres Immunglobulin. Ein Teil der B-Zellen verbleibt als sogenannte B-Memory-Zellen [44].

Die T-Zellentwicklung beginnt mit der Besiedlung des Thymus durch die CD34 positiven pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark. Unter Einfluss von verschiedenen Signalen, wobei Interleukin-7 die wichtigste Rolle zu spielen scheint [38], entwickeln sich CD4 positive Zellen, die T-Helfer-Zellen, und CD8 positive Zellen, die T-Suppressor-Zellen.

#### **2.4.2.3 Natürliche Killerzellen**

Natürliche Killerzellen stellen neben den B- und T-Zellen die dritte Gruppe von Lymphozyten dar. Sie können - HLA-Klasse unabhängig - Zielzellen abtöten.

Ihnen kommt somit sowohl bei der Tumorabwehr als auch bei zahlreichen infektiösen Erkrankungen eine wichtige Rolle zu. So hemmen NK-Zellen die Virusreplikation zu Beginn der Virusinfektion, bevor sich HLA-restringierte zytotoxische T-Zellen entwickelt haben.

NK-Zellen stammen von frühen lymphatischen Vorläuferzellen des Knochenmarks ab. Ihre Aktivität ist eng an die Subpopulation der „large granular lymphocytes“ (LGL) gebunden, die bis zu 15% der Blutlymphozyten stellen können. Es handelt sich dabei um nichtphagozytierende CD3/TCR/Ig-negative Lymphozyten, die sich durch die Expression von CD16 und CD56 (NK-Zell-Marker) auszeichnen.

Von der NK-abhängigen Abtötung von Zielzellen wird die sog. „lymphokine activated killer cell“ - Aktivität (LAK-Aktivität) unterschieden, die ebenfalls HLA-unabhängig ist und auch von LGL unter Mitwirkung von IL-2 vermittelt wird. Die Fähigkeit, LAK-Zellen mit IL-2 zu erzeugen, nutzt man heute in der Krebstherapie. Rezeptoren von NK-Zellen und LAK-Zellen, die die Zytolyse vermitteln, sind CD2, CD16 und NK 1.1.

NK-Zellen bilden mit der Zielzelle ein sog. Konjugat. Neben den genannten Rezeptoren sind Adhäsionsmoleküle (Integrine, andere akzessorische Moleküle), Lektine, Antikörper (vgl. Abbildung 8), Oxidationsprodukte und Magnesium für die Stabilisierung des Konjugates wichtig. Im Anschluss an die Konjugatbildung kommt es in den Zellen zu Polaritätsänderungen von mikrotubulären Strukturen, Golgi-Apparat und Lysosomen in der Nähe der Kontaktzone zur Zielzelle. Anschließend werden transmembranös verschiedene Inhaltsstoffe der NK-Zell-Granula (Perforine) freigesetzt, wodurch die Zelllyse einsetzt. In den Zielzellen kommt es zur Porenbildung in der Zellmembran und damit zum Zusammenbruch des Ionengleichgewichts ( $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux, Störung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe etc.). Auch lysosomale Proteasen tragen zu einer Zerstörung der Zielzellen bei. Schematisch ist dies in Abbildung 8 dargestellt.

Ein dritter, an der Zelllyse beteiligter Mechanismus ist die Sekretion von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ , - $\beta$ ), der über spezifische Liganden mit der Zelloberfläche der Zielzelle in Wechselwirkung tritt und den programmierten Zelltod (Apoptose) auslöst.

Die Zellyse nach Kontakt mit der Zielzelle führt nicht automatisch auch zum Zelltod der NK-Zellen. Hier findet eine Regulation des zytolytischen Zellpools statt, deren Mechanismen noch nicht verstanden sind.

NK-Zellen sind wesentlich an der Antikörper-abhängigen Zellvermittelten Zytotoxizität, an der unspezifischen Tumormunität und in der frühen Phase der Abwehr zahlreicher intrazellulärer Pathogene (Viren und intrazelluläre Bakterien) beteiligt. NK-Zellen können ihre Ziele abtöten, ihre Aktivität lässt sich um den Faktor 20 bis 100 durch Exposition mit Interferonen oder den NK-Zellen aktivierenden Faktor IL-12 steigern [10].

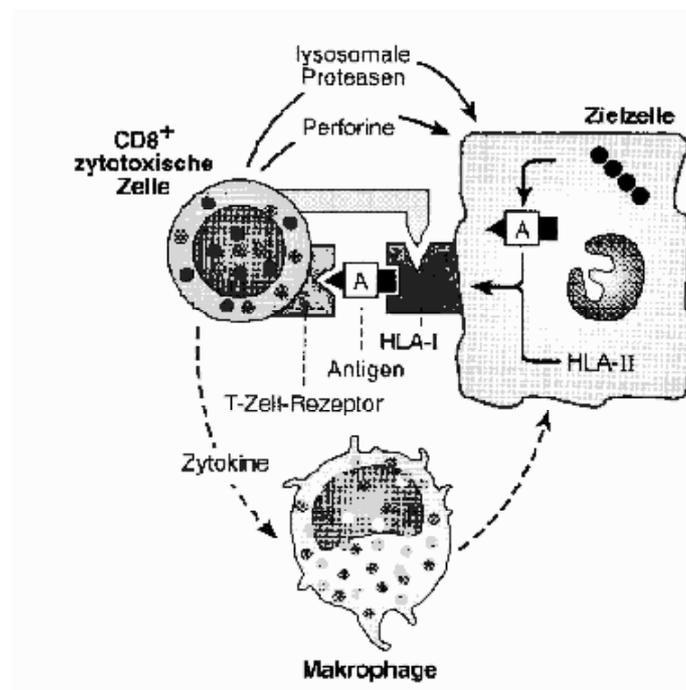


Abbildung 8: NK-Zellvermittelte Zytotoxizität [10]

#### 2.4.2.4 Monozyten

Monozyten und neutrophile Granulozyten stammen beide von einer gemeinsamen Stammzelle ab, der Granulozyten-Monozyten-Koloniebildenden Stammzelle [64]. Über die Stadien der multipotenten und determinierten Vorläuferzellen entwickeln sich durch Zellteilung im Knochenmark die Monoblasten, aus diesen die Promonozyten und schließlich die Monozyten, die nicht mehr teilungsfähig sind und das Knochenmark verlassen [64;77]. Sie wandeln sich im umgebenden Gewebe in Makrophagen um, weshalb man von

einem Monozyten-Makrophagen-System spricht [77]. Makrophagen können sich bei der Maus und beim Menschen auch aus primitiven Makrophagen aus dem Dottersack entwickeln. Es wird angenommen, dass sich fetale Makrophagen schon vor der Entwicklung der adulten Monozyten aus primitiven Dottersackmakrophagen entwickeln [96].

Die Entwicklung der Monozyten und deren Reifung zu Makrophagen werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren gesteuert. Die wichtigsten dabei sind Interleukin-3, der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor, der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor und der Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor [64-66].

#### **2.4.2.5 Erythrozyten**

Im Knochenmark entstehen aus den Hämocytoplasten die Proerythroblasten. Dieser Schritt wird durch das hauptsächlich in der Niere gebildete Hormon Erythropoetin, einem Glykoprotein, gesteuert [49]. Aus den Proerythroblasten entwickeln sich der basophile Normoblast, der polychromatische Erythroblast und der orthochromatische Erythroblast. Durch den zunehmenden Gehalt an Hämoglobin und die Abnahme an Zellorganellen lassen die Zellen sich unterschiedlich stark anfärben [57]. Nach Ausstoßung des Kerns entsteht der Retikulozyt, der das Knochenmark verlässt. Im Blut reift der Retikulozyt zum Erythrozyten aus [55].

#### **2.4.2.6 Thrombozyten**

Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten sind Zytoplasmafragmente von polyploiden Riesenzellen, den Megakaryozyten. Megakaryozyten entstehen unter der Einwirkung von verschiedenen Wachstumsfaktoren, unter anderem Thrombopoetin, aus den Hämocytoplasten. In Tieren mit supprimiertem Knochenmark beschleunigt Thrombopoetin, das in Leber, Niere und wahrscheinlich auch in der Milz produziert wird, ebenso wie Interleukin 3 und 6, die Bildung von Thrombozyten [28].

Aus der pluripotenten Vorläuferzelle entsteht zunächst der Megakaryoblast, der keine weiteren Mitosen mehr durchlaufen kann. Nach mehreren Duplikationen des Chromosomensatzes ohne vollständige Zellteilung (Endomitose) entsteht

eine polyploide Zelle, der Promegakaryozyt, der bereits deutlich größer ist. Nach weiteren Kernteilungen und Vergrößerung des Zytoplasmas entsteht der Megakaryozyt, mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 µm eine der größten Zellen des Organismus. Durch die Abschnürung von Teilen des Zytoplasmas und Fragmentierung entstehen die kernlosen Blutplättchen, die das Knochenmark verlassen und in den Blutstrom übergehen. Ein einziger Megakaryozyt ist in der Lage, während ihrer Lebensdauer von etwa 10 Tagen bis zu 3000 Blutplättchen abzuschneiden [26].

### 2.4.3 Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen

Sämtliche Gewebe des Körpers entstehen aus Stammzellen. Die hämatopoetische Stammzelle wurde in vielen Studien untersucht [84;85;104-106]. Sie wurden charakterisiert nach Oberflächenantigenen, Genexpression, Zellwachstum in vitro und in vivo und ihrer Fähigkeit, nach Transplantation anzuwachsen und sich zu vermehren [13;22;83;84]. Sowohl murine als auch humane Stammzellen exprimieren eine Vielzahl von Zytokin-Rezeptoren und Adhäsionsproteinen. bezeichnet man die Eigenschaft intravenös infundierter hämatopoetischer Stammzellen, sich im Knochenmark und nicht in anderen Organen anzusiedeln. Vermutlich hängt das Homing primär von Adhäsions-Molekül-Interaktionen zwischen Stammzellen, Stromazellen und Extrazellulärmatrix ab. Das Homing scheint drei Stunden nach Injektion der Zellen beendet zu sein. Diese schnelle Beweglichkeit wird erreicht durch Pseudopodien, „proteopodia“ [33].

Es gelang, humane hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut nach 15 Jahren Kryopreservation in subletal bestrahlte Nonobese diabetic severe combined immunodeficient (NOD/SCID) Mäuse zu transplantieren. Sie zeigten die gleichen Wachstumseigenschaften wie Zellen aus frischem Nabelschnurblut [14].

Die Expression zellspezifischer Oberflächenantigene dient der Identifikation der unterschiedlichen Zellen, die primitive humane pluripotente Stammzelle exprimiert CD34 [43].

#### 2.4.4 Methoden der Zellmarkierung und bildgebende Verfahren

Die Zellmembran stellt eine natürliche Barriere für viele exogen einwirkende Moleküle dar. Um diese Eintrittspforte zu überwinden, wurde eine Vielfalt von Strategien entwickelt, um Agenzien über Trägersubstanzen in die Zellen zu schleusen. Anwendungsgebiete ergeben sich u.a. in der Molekularbiologie [60], der Genforschung [19;60] und im Zuge hämatologischer Erkrankungen (Leukämie, Lymphome, aplastische Anämie), Immunsuppressionen, malignen hämatologischen oder nichthämatologischen Neoplasien nach Zelltransplantation zur nichtinvasiven Überwachung des Therapieerfolges. Herkömmliche histologische Verfahren sind invasiv und haben den Nachteil, dass eine langfristige, wiederholte Verfolgung der angewachsenen Zellen in vivo nicht möglich ist. Für nichtinvasive, wiederholbare Diagnoseverfahren erforderlich, wie die PET, die MRT [15;16] und das Optical Imaging [59].

Die Verfolgung von mit radioaktiven Stoffen markierten Zellen erfolgt mit der Positronenemissionstomographie (PET). Über die radioaktive Markierung kann die Migration von Zellen in vivo detektiert werden [2;8]. Radioaktive Stoffe üben radiotoxische Wirkungen auf die Zielzelle aus, und die Verfolgung von radioaktiv markierten Zellen ist durch den Abfall der Radioaktivität außerdem zeitlich begrenzt [29].

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren mit nahezu mikroskopischer Auflösung. Sie ermöglicht die dreidimensionale Darstellung biologischer Strukturen bis hin zu einer Auflösung von 25 bis 50  $\mu\text{m}$ . Die Bildgebung basiert auf der Verteilung von Wasserstoffprotonen, wobei die Signalintensität in einem definierten Volumen eine Funktion der Wasserstoff-Konzentration, dessen Anregung und der Relaxationszeit (T1 und T2) ist [15].

Computer-verstärkte Fluoreszenzmikroskopie (Optical Imaging) ermöglicht eine hochauflösende Bildgebung, die ganze Gewebe und Organismen (100 bis 300 $\mu\text{m}$ ) durchdringen kann. Mit dem Optical Imaging können die Befunde der MRT verifiziert werden [39]. Die Strategien der Zellmarkierung umfassen u. a. Phagozytose [24] und die Verwendung von Transfektions-Agenzien [24;60].

Andere Verfahren nutzen Agenzien, die für die klinische Anwendung noch nicht zugelassen sind. Sie sind aufwendig in ihrer Synthese und werden mit der MRT bei Feldstärken von 4 bis 14 Tesla visualisiert; die meisten MRT-Geräte in klinischem Gebrauch haben eine Feldstärke von bis zu 1,5 Tesla [91].

Eines dieser Verfahren ist die Rezeptor vermittelte Endozytose, mit der Dextran gecoatete MION-46L Eisenoxid-Nanopartikel in die Zelle gelangen. Dafür werden sie zunächst kovalent an einen an den Antitransferrin-Rezeptor bindenden monoklonalen Antikörper gebunden und dann über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Damit können Stammzellen während ihrer normalen Expansion in vitro gelabelt werden. Diese Methode ist limitiert durch die Erfordernis eines speziellen monoklonalen Antikörpers, der ein spezifisches Zelloberflächenantigen erkennt, und sie ist Spezies-spezifisch [16;17].

Membran-Translokations-Signale internalisieren Proteine, Peptide, Oligonukleotide, Nukleinsäuren von Peptiden und Plasmid-DNA. Zu diesen gehören z.B. die HIV-Tat-Peptide, das VP22-Herpes-Virus-Protein und andere synthetische Peptide [7;54].

Das Membrantranslokations-Signal des HIV-Tat-Peptides kann genutzt werden, um superparamagnetische Eisenoxid-Partikel in nichtphagozytierende Zellen einzubringen [7;17]. Es gelang, Chelate dieser Kontrastmittel, angehängt an das HIV-Tat-Peptid, in humane natürliche Killerzellen, in Mäuselymphozyten und Humane Zervix-Karzinom-Zellen einzubringen. Die dabei erreichten Konzentrationen waren ausreichend, um die Zellen in vitro im MRT bei 1,5 Tesla zu detektieren [7].

Mit Hilfe von polykationischen, Eisenoxid-assoziierten Polymeren, den sogenannten Magnetodendrimeren, wurde eine effiziente Möglichkeit gefunden, neuronale und mesenchymale Stammzellen nichtinvasiv im Magnetresonanztomographen bei 4,7 und auch bei  $\leq 1,5$  Tesla darzustellen [15;16]. Die Dendrimere binden über elektrostatische Interaktionen an die SPIOs und werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Der Vorteil

---

dieser Methode ist, dass sie nichtspezifisch ist. Damit kann theoretisch jede Säugetierzelle gelabelt werden, einschließlich multipotenter humaner Stammzellen.

Für die Markierung mit fluoreszierenden Stoffen stehen bifunktionelle Stoffe zur Verfügung, die sowohl die optische, Computer verstärkte Lichtmikroskopie, als auch die magnetresonanztomographische Darstellung ermöglichen. Die erste Klasse dieser Komplexe besteht aus Gadolinium-DOTA mit niedrigem Molekulargewicht, kovalent gebunden an Tetramethylrhodamin. Sie wird genutzt zur Untersuchung der Membranpermeabilität, Interaktion von Gap-junctions und von Läsionen. Die zweite Klasse stellen nicht-membrangängige Polymere mit hohem Molekulargewicht dar, die, einmal in eine Zelle injiziert, dort verbleiben. Der Komplex besitzt ebenfalls einen Metall-Chelator, der paramagnetische Ionen binden kann, das Gadolinium ( $Gd^{3+}$ ) und ein kovalent gebundenes fluoreszierendes Agens, Tetramethylrhodamin [39]. Gadoliniumionen sind toxisch. Eine ausreichende Verträglichkeit ist nur in Form eines Chelates mit fester Bindung des Gadoliniums zu erzielen (Gd-DTPA). Die Komplexe sind umhüllt von einem Polymer-Gerüst mit hohem Molekulargewicht, meist Dextran [12]. Diese bifunktionellen Komplexe sind für die Anwendung im Tierversuch entwickelt worden [39].

## 2.5 Tiermodell

Aufgrund der nicht vorhersehbaren Reaktionen im Organismus durch die Injektion von mit Kontrastmitteln markierten hämatopoetischen Stammzellen sind Tierversuche vor der Anwendung am Menschen obligat.

Durch ihre hohe Stoffwechselaktivität und damit schnellen Umlauf der MR-Kontrastmittel bzw. der injizierten Zellen, gute Möglichkeiten des Handlings und einen geringen Narkotikaverbrauch hat sich die Maus als optimales Tiermodell erwiesen. Für die Injektion von humanen Zellen ist es notwendig, bei den Empfängertieren keine Immunreaktionen auszulösen. In vielen Studien wurden bereits immundefiziente Mäuse nach Injektion humaner Stammzellen auch über einen längeren Zeitraum beobachtet [14].

Bei den in der vorliegenden Arbeit genutzten Tieren handelt es sich um homozygote Mäuse für eine nackte, spontane Mutation des Stammes BALB/c (Nu Nu) mit zwei hauptsächlichen Gen-Defekten, und zwar abnormales Haarwachstum und defekte Entwicklung des Thymusepithels. Obwohl die Mäuse haarlos erscheinen, werden sie mit funktionellen, aber fehlerhaften Haarfollikeln geboren.

Außerdem besitzen die Nacktmäuse eine rudimentäre, nicht funktionelle Thymusanlage, was durch einen Entwicklungsfehler des Thymus begründet ist. Infolgedessen fehlen den homozygoten Nacktmäusen T-Zellen und sie leiden an einer mangelnden zellvermittelten Immunität. Außerdem zeigen homozygote Nacktmäuse partielle Defekte in der Entwicklung der B-Zellen. Über andere endokrine und neurologische Defekte wurde ebenfalls berichtet. Der Gebrauch von Nacktmäusen hat die Anzahl der Thymektomien in der Versuchstierkunde drastisch reduziert [40].

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Natürliche Killerzellen NK-92-scFv(FRP5)-zeta

Die Suspensionen der humanen Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) stammen aus NK-92 Kulturen [46] und wurden freundlicherweise von Christoph Uhrek von dem Georg Speyer Haus der Universität zu Frankfurt bereitgestellt. Diese kontinuierlich wachsende Interleukin-2 abhängige NK-Zelllinie [124] und die transduzierten NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen [46;113] sind hoch zytotoxisch gegen maligne Zellen verschiedener Herkunft ohne aber körpereigene Zellen zu beschädigen [114]. Die in dieser Arbeit verwendete genetisch modifizierte Variante, genannt NK-92-scFv(FRP5)-zeta, exprimiert einen chimären Antigenrezeptor, der die zytotoxische Aktivität von NK-92 gegen HER2 exprimierende Zellen richtet [114]. HER2 (Synonyme: HER2/neu, ErbB2) ist ein auf der Oberfläche der Zellmembran exprimierter Rezeptor. Eine HER2 Überexpression ist in vielen humanen Tumoren von epithelalem Ursprung beobachtet und in Verbindung mit Wachstum und Entwicklung der Tumore gebracht worden [45;78]. Im Vergleich zu den NK-92-Zellen lysieren NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen spezifischer und effizienter HER2 exprimierende Tumorzellen verschiedenster Herkunft und zeigen in der klinischen Anwendung eine signifikante Wachstumsverzögerung der HER2-positiven Zellen [114].

Die NK-Zellen werden in einem X-VIVO 10 Medium (Cambrex, Verviers, Belgien), das mit 5% Hitze-inaktivierten humanen Serum und 100 units/ml IL-2 (Proleukin, Chiron, Emeryville, CA) ergänzt ist, inkubiert. Vor dem Labeling mit MR- und PET-Kontrastmitteln werden die Zellproben zweimal in HF/2 gewaschen, zentrifugiert und das daraus resultierende Zellpellet mit 1 mL

---

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagles Medium, Gibco) resuspendiert. Die Anzahl der zu untersuchenden Zellen wird vor jedem Experiment in einem Cell Counter gezählt.

## **3.2 Tierexperimente**

### **3.2.1 Tiermodell**

Als Versuchstiere werden weibliche Mäuse des Stammes Balb/c Nu Nu mit einem Durchschnittsalter von 8 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von 20 g eingesetzt (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Die Mäusehaltung findet unter sterilen Verhältnissen in einzelbelüfteten Käfigen in einem klimatisierten Raum bei 23 ° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70% in Makrolon-Käfigen Typ III mit Gitterrostabdeckung in Gruppen von vier Tieren statt. Die Einstreu besteht aus entstaubter Weichholzfaser (Labortiereinstreu Fa. Altromin International GmbH, Lage-Lippe) und wird täglich gewechselt. Trinkwasser aus Flaschentränken und Futter (Altromin 1324, Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratte und Maus, Fa. Altromin) stehen den Tieren ad libitum zur Verfügung. In dem fensterlosen Raum wird der Tag-Nacht-Rhythmus über ein automatisches Beleuchtungsprogramm geregelt. Jeweils 12 Stunden Licht (Lichtintensität 60-100 Lux) und Dunkelheit wechseln sich ab, eine Dämmerungsphase fehlt. Der Transport zum MRT erfolgt in den gewöhnlichen Käfigen, die mit einem bakteriendichten Filter versehen werden. Insgesamt werden für diese Arbeit 15 Versuchstiere eingesetzt. Sechs Mäuse werden für die MR-Versuche benötigt, wobei drei von diesen als Kontrollgruppe verwendet werden. Für die nuklearmedizinischen Autoradiographieversuche werden neun Mäuse, davon zwei als Kontrollgruppe, eingesetzt.

Tabelle 7: Anzahl eingesetzter Versuchstiere

Anzahl Versuchstiere	HER2/neu positiv	HER2/neu negativ
MR-Versuche	3	3
AR-Versuche	7	2

### 3.2.2 Anästhesie

Die Tiere werden anästhetisiert und vor, sowie 12 und 24 Stunden nach der Zellinjektion magnetresonanztomographisch untersucht.

Zur Injektionsnarkose verwendet man eine voll antagonistisierbare Anästhesie. Diese besteht aus Medetomidin (1 mg/ml, Domitor®, Fa. Pfizer, New York, USA), Midazolam (5 mg/ml, Dormicum®, Fa. Roche Austria, Wien) und Fentanyl (0,05 mg/ml, Fentanyl® Janssen, Fa. Janssen-Cilag) im Gemisch als Anästhetikum und den Antagonisten Atipamezol (Antisedan® Pfizer, 5 mg/ml), Flumazenil (0,1 mg/ml, Anexate®, Fa. Roche Austria) und Naloxon (0,4 mg/ml, Narcanti®, Fa. Janssen-Cilag,). Die Dosierung ist den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Dosierung Anästhetikum

Gewicht (g)	Medetomidin (µg)	Midazolam (µg)	Fentanyl (µg)	Domitor (ml)	Dormicum (ml)	Fentanyl (ml)	Mischung (ml)
16	8	0,08	0,8	0,007	0,014	0,014	0,035
18	9	0,09	0,9	0,008	0,016	0,016	0,04
20	10	0,1	1	0,009	0,018	0,018	0,045
22	11	0,11	1,1	0,01	0,02	0,02	0,05
24	12	0,12	1,2	0,011	0,022	0,022	0,055
26	13	0,13	1,3	0,012	0,024	0,024	0,06
28	14	0,14	1,4	0,013	0,026	0,026	0,065
30	15	0,15	1,5	0,014	0,028	0,028	0,07

Tabelle 9: Dosierung Antagonist

Gewicht (g)	Atipamezol (mg)	Flumazenil (µg)	Naloxon (µg)	Antisedan (ml)	Anexate (ml)	Narcanti (ml)	Mischung (ml)
16	0,04	8	19,2	0,008	0,08	0,048	0,136
18	0,045	9	21,6	0,009	0,09	0,054	0,153
20	0,05	10	24	0,01	0,1	0,06	0,17
22	0,055	11	26,4	0,011	0,11	0,066	0,187
24	0,06	12	28,8	0,012	0,12	0,072	0,204
26	0,065	13	31,2	0,013	0,13	0,078	0,221
28	0,07	14	33,6	0,014	0,14	0,084	0,238
30	0,075	15	36	0,015	0,15	0,09	0,255

Nach intraperitonealer Injektion von 0,045 ml des Anästhetika-Gemisches (bei einem durchschnittlichen Gewicht der Mäuse von 20 g) in Kopftief- und Halbseitenlage paramedian in den dorsalen Quadranten des Unterbauches tritt die Bewusstlosigkeit nach ca. 15 Minuten ein. Die Atmung ist flach und gleichmäßig. Es treten keine Atemartefakte auf. 10 Minuten nach Antagonisierung erwachen die Tiere. Die dreimalige Anästhesie bleibt ohne erkennbare Nebenwirkungen.

### 3.2.3 Tumormodell

Diese Studie wird nach den Richtlinien des Tierschutzes der Regierung von Oberbayern durchgeführt. Es werden  $2,5-5 \times 10^6$  NIH-3T3 HERIIneu Rezeptor positive Tumorzellen (mouse sarcoma cell line) subkutan in die Schulter von sechs 10 Wochen alten weiblichen Balb/c Nu Nu Nacktmäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 21-24 g injiziert. Das Wachstum und die Entwicklung des Tumors werden durch tägliche Inspektion und Palpation überwacht. Die Tumore entwickeln sich innerhalb von 14-20 Tagen bis zu einer maximalen Größe von 1-1,5 cm.

### 3.2.4 Injektion NK-92-Zellen

Für die intravenöse Injektion in die Maus wird ein Volumen von 300 µl verwendet. Vor der Injektion wird die Zellsuspension nochmals gefiltert.

Die Injektion erfolgt in die laterale Schwanzvene nach Kammeranästhesie mit Äther. Dafür wird die Maus in eine Plastikbox mit Äther-getränkten Tupfern gesetzt. Nach ca. 60 Sek. tritt die Bewusstlosigkeit ein und die Maus wird in Seitenlage fixiert. Durch Eintauchen des Schwanzes in 40 °C warmes Wasser dilatiert man die Schwanzvene. Die Haut wird mit Cutasept® desinfiziert. Die Injektion der Zellsuspension erfolgt mit einer 30 Gauge Insulinspritze.

## 3.3 Zellmarkierung mit [<sup>18</sup>F]FDG

### 3.3.1 In vitro Versuche

Zunächst werden humane hämatopoetische Stammzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen werden, verwendet. Zur Aufbereitung der Stammzellen zentrifugiert man die Zellen, der Überstand wird dekantiert. Nach Durchmischen der Zellsuspension fügt man 40 ml einer Erythrolyse-Lösung (10 mmol HEPES, 40 mmol K-EDTA, 145 mmol NH<sub>4</sub>Cl, 5 mmol KHCO<sub>3</sub>) zu, um die Erythrozyten zu eliminieren. Nach 5 Min. gibt man die verdünnte HEPES-Lösung („Standardlösung“, Hank's balanced salt solution (HBSS), 1% Glucose, 10 mmol HEPES und 2% Fetalem Kälberserum) zu, um den Lyse-Vorgang zu stoppen, zentrifugiert nochmals, und dekantiert den Überstand. Die HEPES-Lösung dient auch als Transportmedium. Durch Filtration durch einen 30 µm Spritzenfilter werden Zelldetritus und mögliche Verunreinigungen, die ein Verklumpen der Zellen begünstigen, entfernt. Dann zählt man die Zellen mittels Cell Counter CASY 1 TT von Schärfe System. Nachdem die Markierung der Stammzellen etabliert ist, werden die von Christoph Uherek bereitgestellten NK-92 5-zeta Zellen verwendet.

Das Markieren sowohl der humanen hämatopoetischen Stammzellen als auch der NK-92-5-zeta-Zellen mit [<sup>18</sup>F]FDG wird durch einfache Inkubation erzielt. Zu

Vergleichszwecken werden Kontrollgruppen in gleicher Weise gelabelt. Es werden 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension von  $0,5 \times 10^6$  NK-92-Zellen, aufgelöst in Medium, in ein Eppendorfcup pipettiert. Anschließend wird 100  $\mu\text{L}$  [ $^{18}\text{F}$ ]FDG mit der gewünschten Aktivität von 0,37 MBq bis 37 MBq dazu getextet. Gleichzeitig mit Gabe der Aktivität wird 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  Insulin (Insuman Basal) pipettiert.

Das Gemisch wird 10 bis 120 Minuten in einem  $37^\circ\text{C}/5\%$  CO<sub>2</sub> Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend mit 1 mL eiskalten PBS abgestoppt und bei 2500 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 5 Minuten abzentrifugiert.

Zum Entfernen der überschüssigen Aktivität wird 2 x mit 1 mL PBS gewaschen. Der Überstand wird abgenommen und die Aktivität des Zellpellets in einem Gamma-Counter (Wallac) gemessen. Dazu werden die Zählraten der Zellpellets für ein Zeitintervall von 1 min bestimmt und in counts per minute (cpm) angegeben. Nach der Messung der Aktivität analysiert man die Zellvitalität mit dem Trypan blue exclusion Test.

Ebenfalls wird die Retention von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG in den Zellen evaluiert. Die markierten Lymphozyten werden mit zellfreiem Plasma bei  $37^\circ\text{C}$  für verschiedene Zeitintervalle (5 - 240 min) inkubiert und dann 5 Minuten lang bei 2500 rpm und  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Darauf kann man die Retention der Markierungsmethode als Relation der Gesamtradioaktivität des Zellpellets und des abgenommenen Überstandes zu der im Zellpellet verbliebenen Radioaktivität berechnen.

### **3.3.2 In vivo Versuche**

Für die in vivo Versuche werden 2 mL Zellsuspension von  $5 \times 10^6$  NK-92-5-zeta-Zellen, aufgelöst in Medium, mit 100  $\mu\text{L}$  [ $^{18}\text{F}$ ]FDG mit einer Aktivität von ca. 300 MBq in einem Eppendorftube vermengt. Gleichzeitig mit Gabe der Aktivität wird 20  $\mu\text{L}/2\text{mL}$  Insulin (Insuman Basal) dazu pipettiert. Das Gemisch wird 60 Minuten in einem  $37^\circ/5\%$  CO<sub>2</sub> Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend mit 4 mL eiskalten PBS abgestoppt und bei 2500 rpm und  $4^\circ\text{C}$  5 Minuten abzentrifugiert. Zum Entfernen der überschüssigen Aktivität wird 2 x mit 4 mL PBS gewaschen. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet im Gamma-Counter gemessen. Mit einer Insulinspritze wird das Zellpellet in einem maximalen Volumen von 200  $\mu\text{L}$  Medium aufgezogen und der Maus durch

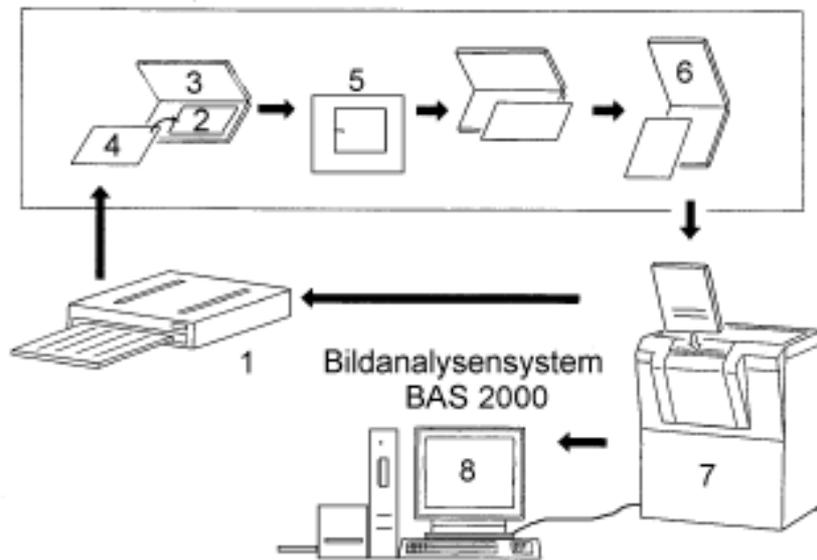
Injektion in die Schwanzvene gespritzt.

Die mit [<sup>18</sup>F]FDG markierten NK-92 5-zeta Zellen werden in die Schwanzvene der tumortragenden Maus injiziert: sieben Mäusen werden NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, die gegen HER2/neu Rezeptoren gerichtet sind, injiziert. Zur Kontrolle werden zwei weiteren Mäusen NK-92 Zellen, die nicht gegen HER2/neu Rezeptoren gerichtet sind, injiziert.

Alle Mäuse werden für die Zellinjektionen mit Äther anästhesiert. Nach Zellinjektion und Abwarten der für die Verteilung der NK-Zellen erforderlichen Zeit von einer Stunde werden die anästhesierten Mäuse durch eine intrakardiale Injektion von 0,5 ml Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos) euthanasiert. Der Tumor wird zusammen mit Proben von Leber, Milz, Lunge, Muskelgewebe und Knochenmark post mortem entnommen. Die eine Hälfte wird für die Autoradiographie verwendet, die andere in 10% Formalinlösung fixiert, eingebettet in Paraffin und für Standard Histopathologie (H&E Färbung) vorbereitet. Zusätzlich wird eine anti-CD57 immunhistochemische Färbung, die sensitiv gegen NK-Zellen ist, durchgeführt, um eine NK-Zellakkumulation in diesen Geweben feststellen zu können.

### 3.3.3 Autoradiographie

Die entnommenen Organproben von Tumor, Leber, Milz, Knochenmark, Lunge und Muskel der zu untersuchenden Mäuse werden in kaltes PBS verbracht, anschließend abgetupft und auf Objektträger eines Kryostaten (Microm, TYP HN 500) mittels O.C.T. Compound (Tissue Tek) aufgefroren. Anschließend fertigt man bei -18 °C Schnitte von 6 µm an. Mit gereinigten und silanisierten Objektträgern werden die Gefrierschnitte aufgenommen und weiter bearbeitet.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise bei Exposition und Scannen der Schnitte [70]**

Diese Objektträger von verschiedenen Schnittebenen der in einem Block eingefrorenen Organe der Maus werden mit der Schnittfläche nach oben auf ein Blatt in Größe der Expositionskassette aufgeklebt. Vor jeder Benutzung werden die Imageplatten eine Stunde im Eraser BAS-IPE 2040 (siehe Abb. 3-7: Nr.1) gelöscht. Den Scanner schaltet man jeweils eine halbe Stunde vor dem Scanvorgang zum Warmlaufen ein.

In einem abgedunkelten Raum werden die zur Exposition vorbereiteten Schnitte (Abb. 3-7: Nr. 2) in spezielle Expositionskassetten (3-7: Nr. 3) gelegt. Die Schnitte werden hierbei waagrecht zur Scanrichtung aufgelegt. Die verschlossene Kassette legt man zur Exposition 24 Stunden in eine spezielle Abschirmungsbox (Abb. 3-7: Nr. 5), die mit Schichten aus extrem strahlungsarmen Blei und sauerstofffreiem Kupfer ausgekleidet ist. Mit Hilfe dieser Box kann die Hintergrundstrahlung aus der Umwelt stark reduziert und somit die Sensitivität der Imageplatten weiter erhöht werden.

Die Imageplatten werden nach Ende der Expositionszeit aus der Expositionskassette entnommen, in eine spezielle Scan-Kassette (Abb. 3-7: Nr. 6) eingelegt und mit dieser unverzüglich in den in dieser Arbeit verwendeten Phosphorlaser 445 (Abb. 3-7: Nr. 7) eingeschoben. Am PC Bildschirm (Abb.

3-7: Nr. 8) wird der BAS Reader 3.01 aufgerufen und die Analyse gestartet.

## 3.4 Zellmarkierung mit Eisenoxiden

### 3.4.1 MR-Zellmarkierungstechniken

Das Markieren der NK-92-5-zeta-Zellen mit Ferumoxides oder Ferucarbotran wird durch einfache Inkubation, Transfektion oder Elektroporation erzielt. Zu Vergleichszwecken wird eine Kontrollgruppe humaner NK-92-5-zeta-Zellen mit Gadopentetate Dimeglumine gelabelt und eine zusätzliche Kontrollgruppe unterzieht sich einfacher Inkubation, Transfektion oder Elektroporation mit kontrastmittelfreiem Medium.

Simple Inkubation erzielt man durch Inkubation von  $1 \times 10^6$  NK-Zellen mit Ferumoxides oder Ferucarbotran bei einer Dosis von 100-300  $\mu\text{g}$  Fe für unterschiedliche Zeitintervalle zwischen 2 bis 24 Stunden in einem 37°C/5% CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37 °C.

Transfektion wird durch Inkubation von  $1 \times 10^6$  NK-Zellen mit Ferumoxides oder Ferucarbotran bei einer Dosis von 100  $\mu\text{g}$  Fe und 20  $\mu\text{l}$  eines Transfektionsagens (Lipofectin, Life Technologies, Gibco BRL) für unterschiedliche Zeitintervalle von 2 bis 24 Stunden in einem 37°C/5% CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37 °C erreicht. Zwei bis vier dieser unilamellaren Liposomen (Größe von 100-200 nm) vereinigen sich mit einem Kontrastmittelmolekül oder -partikel. Dieser lipide Komplex fusioniert mit der Zellplasmamembran und schleust das Kontrastmittel in das Zellzytosol ein [30].

Elektroporation wird mittels eines Elektroporator (Amaxa Biosystems, Köln, Deutschland) und einem speziellen Nukleofektor-Medium für NK-Zellen durchgeführt. Ferucarbotran und Ferumoxides werden bei einer Dosis von 100  $\mu\text{g}$  Fe zu Proben von  $1 \times 10^6$  NK-Zellen in 2,75 ml einer vorgewärmten ergänzenden Nukleofektor-Lösung zugefügt. Die Zellsuspensionen gibt man in 2,0 mm Elektroporationsküvetten und diese werden mit Amaxa Nukleofektor Apparatur bei ansteigenden Spannungen für 0,5-10 s nukleofektioniert. Die

Zellzahl, Kontrastmittelkonzentration und Buffer Volumen wird für alle Experimente konstant gehalten. Nach der Elektroporation werden die Zellen sofort in 2,0 mL Complete Lösung resuspendiert, übertragen auf eine 12-well Platte und darauf für 24 Stunden in einem 37°C/5% CO<sub>2</sub> Inkubator inkubiert [58].

### 3.4.2 In vitro Versuche

Nach dem Markierungsverfahren wäscht man die Zellen mindestens dreimal mit Hepes. Danach werden die Zellen zentrifugiert und die Zellpellets werden durch MR-Bildgebung mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla evaluiert. Die verwendete Pulssequenz ist unter 3.4.4 beschrieben. Nach der Bildgebung werden die Zellproben mit Vitalitätstests, Spektrometrie und Berliner-Blau Färbung analysiert.

Die Vitalität der Zellen wird mit dem Trypan blue exclusion Test und dem MTT Test bestimmt. Für den Trypan blue exclusion Test werden  $2,5 \times 10^5$  NK-Zellen und nicht-markierte Kontrollen mit Trypan blue versetzt. Die Relation der Anzahl der nicht-gefärbten, vitalen Zellen zu der Anzahl der gefärbten, nicht-vitalen Zellen wird berechnet. Für den MTT Test werden verschiedene Proben mit 100 µl Zellsuspension, die  $5 \times 10^4$  NK-Zellen/ml enthalten, für 4 h mit 10 µl der MTT Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazole-2yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide, conc. 5 mg/ml) inkubiert. Die Entwicklung der Formazan Kristalle verfolgt man durch Spektrometrie. Formazan Kristalle entwickeln sich in vitalen Zellen (Detektion bei einer Lichtabsorption von 550-570 nm), während tote Zellen keine Formazan Kristalle bilden. Diese Tests werden mindestens dreimal für beide Zelltypen vor und nach dem Labeling durchgeführt.

Die Eisen (Fe)-Konzentration der mit Eisenoxid markierten Zellen wird durch Atomic Absorption Spectrometry (AAS) quantifiziert. Es wird ein polarisierter Zeeman Atomic Absorptionsspektrometer (Hitachi, Model Z-8200, Japan) verwendet. Bei Bedarf wird die Zellsuspension mit 0.05 M HCl verdünnt. Für die Messungen von Eisen wird der Spektrophotometer auf 248,3 nm eingestellt und mit sechs Standards, die 89,55 - 3,582 µmol/l Fe in 0,05 M HCl enthalten, kalibriert. Zur Qualitätskontrolle verwendet man normale und anormale

lyphochek controls (Bio-Rad Laboratories, München).

Für die Berliner-Blau Färbung wird folgendermaßen vorgegangen. Proben markierter und nicht-markierter NK-Zellen werden zentrifugiert, auf Glas-Objektträger übertragen, mit Merckofix-Lösung von Merck fixiert und nach der Methode von Pearl gefärbt, um intrazytoplasmatische eisenoxidhaltige Kontrastmittelpartikel zu identifizieren.

### **3.4.3 In vivo Versuche**

MR-Bildgebung wird vor und nach der Injektion von  $5 \times 10^6$  mit Ferucarbotran markierten NK-92-5-zeta-Zellen in die Schwanzvene der tumortragenden Maus ausgeführt: drei Mäusen werden NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, die gegen HER2/neu Rezeptoren gerichtet sind, injiziert. Zur Kontrolle injiziert man drei weiteren Mäusen NK-92 Zellen, die nicht gegen HER2/neu Rezeptoren gerichtet sind.

Alle Mäuse werden für die Zellinjektionen mit Äther anästhesiert. Für die MR-Bildgebung wird die oben beschriebene Anästhesie (siehe 3.2.2) verwendet. Am Versuchende, 24 h nach NK-Zell-Injektion, werden die anästhesierten Mäuse durch eine intrakardiale Injektion von 0,5 ml Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos) euthanasiert. Der Tumor wird zusammen mit Proben von Leber und Milz post mortem entnommen, in 10% Formalinlösung fixiert, eingebettet in Paraffin und für Standard Histopathologie (H&E Färbung) vorbereitet. Zusätzlich führt man eine anti-CD57 immunhistochemische Färbung, die gegen NK-Zellen sensitiv ist, durch, um eine NK-Zellakkumulation in diesen Geweben feststellen zu können.

### **3.4.4 MRT-Gerät und Pulssequenzen**

Die Bilder werden mit einem Gyroscan ACS-NT Powertrak 6000 (Philips, The Best Netherlands) Ganzkörpertomographen mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla und einer speziell angefertigten Handgelenk-Spule (Medical Advances, Milwaukee, USA) mit einem Diameter von  $11 \times 11 \times 6$  cm erstellt.

Für die in vitro Versuche werden die Tubes mit den zentrifugierten Zellpellets in einen Wasserbehälter platziert und in die Handgelenk-Spule gestellt.

Bei den in vivo Versuchen untersucht man die mit Injektionsnarkose

anästhesierten Mäuse in Bauchlage in Gruppen zu zwei bis drei Mäusen im MRT. Sie werden mit Klebeband fixiert und in die Handgelenkspule geschoben. Die Nativ-Untersuchungen mit den nachfolgend aufgeführten Sequenzen erfolgen vor der Kontrastmittelinjektion. Die Untersuchungen nach Kontrastmittel-Injektion bzw. nach Injektion der mit Kontrastmittel gelabelten Zellen erfolgen 12 sowie 24 Stunden post injektionem.

Die Zellen und Mäuse werden durch koronare T1-gewichtete 3D FFE 40°/25/2.7 ( $\alpha$ /TR/TE) und koronare T2-gewichtete 3D FFE 20°/25/12 ( $\alpha$ /TR/TE) Sequenzen mit einem Bildausschnitt (Field of View, FOV) von 100 x 80 mm, einer Matrix von 512 x 512 Pixel, 2 Akquisitionen und einer effektiven Schichtdicke von 400  $\mu$ m untersucht. Die in-plane räumliche Auflösung der MR-Bildgebung ist 200 x 150  $\mu$ m. Die in vivo Studien mit Mäusen werden 12 und 24 Stunden nach der intravenösen NK-Zellinjektion ausgeführt.

## **3.5 Pathologisch-anatomische Aufarbeitung**

### **3.5.1 Präparation und Fixierung der Gewebeproben**

Am Versuchsende werden die anästhesierten Mäuse durch eine intrakardiale Injektion von 0,5 ml Pentobarbital (Narcofen<sup>®</sup>, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos) euthanasiert. Femur, Leber und Milz werden von ventral entnommen. Die für die histologische bzw. die immunzytologische Aufarbeitung bestimmten Proben werden in 6% Formalinlösung fixiert.

### **3.5.2 Histologie**

Die Proben werden 24 Stunden in 6% Formalin fixiert. Die Femura entkalkt man mit Ossafix<sup>®</sup> (3% Formaldehyd, 2% Zinkchlorid, 0,9% NaCl). Danach werden die Präparate bei 60 °C in Paraffin eingebettet.

Die in Paraffinkapseln eingebetteten Organproben werden mit einem Schlittenmikrotom in 2-3  $\mu$ m dicke Scheiben geschnitten, in einem Wasserbad (Aqua bidest, 40 °C) gestreckt und auf Objektträger aufgezo-gen. Anschließend

trocknet man die Proben in einem Wärmeschrank bei 37 °C 24 Stunden lang, um ein sicheres Anhaften der Proben auf dem Objektträger zu gewährleisten.

### **3.5.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin schließt sich an. Hierbei färben sich die Zellkerne blau, dagegen Zytoplasma, Bindegewebe, Kollagenfasern und Erythrozyten rot an. Diese Färbung dient der Organübersicht über tierartspezifische Besonderheiten bei der Maus; Stammzellen sind bei dieser Färbung nicht sichtbar.

### **3.5.4 Fe<sup>2+</sup>-Berliner-Blau Färbung**

Für die Berliner-Blau Färbung wird folgendermaßen vorgegangen. Proben markierter und nicht-markierter NK-Zellen werden zentrifugiert, übertragen auf Glas-Objektträger, mit Merckofix-Lösung von Merck fixiert und nach der Methode von Pearl gefärbt, um intrazytoplasmatische Eisenoxidhaltige Kontrastmittelpartikel zu identifizieren.

### **3.5.5 Immunhistochemische Färbung**

Die immunhistochemische Färbung dient der Erkennung humaner, mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierter Zellen. Hierfür verwendet man zwei unterschiedliche Antikörper:

Primärantikörper Monoklonal Maus Antihuman gegen CD57 (Fa. Dako Cytomation GmbH, Hamburg), Verdünnung 1:30, und als Farbstoff das Chromogen DAB (3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), Fa. Dako; die Stammzellen färben sich braun an.

Primärantikörper Monoklonal Maus IgG1 gegen Dextran, DX-1, Verdünnung 1:50, und als Farbstoff das Chromogen Fast Red TR (APAAP-Kit, mit Naphtol AS-MX-Phosphat und Levamisole), Fa. Dako; die NK-Zellen werden rot gefärbt. Mit der CD57-Färbung werden NK-Zellen nachgewiesen. Mit der Dextran-Färbung wird die von Eisenoxid-Kontrastmittel umgebene Dextranhülle nachgewiesen [110].

Nach dem Trockenvorgang werden die Gewebeproben entparaffiniert. Hierfür inkubieren die Schnitte 2 x jeweils 3 Minuten bei Raumtemperatur in 100%

---

Xylol, dann jeweils 2 Minuten in Ethanol in absteigender Konzentration (100%, 96%, 70%, 50%). Abschließend wird mit Aqua destillata 2 Minuten gewaschen. Um ein ausreichendes Signal zu erhalten, müssen die Antigene in den Schnitten demaskiert werden. Hierfür wird ein Schnellkochtopf verwendet, in dem die Objektträger in 2 Litern Citratpuffer bei 250 °C für 7 Minuten erhitzt werden. Anschließend werden die Proben unter kaltem Wasser abgekühlt und gespült. Nach dem Abtrocknen der Schnitte trägt man den Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in einer Menge von ca. 200 µl pro Schnitt auf und lässt die Probe eine Stunde inkubieren. Dann spült man die Probe 3 x mit TRIS-Puffer (0,05 M; pH 7,6). Daraufhin wird der Sekundärantikörper (APAAP, Kaninchen-antiserum gegen Mausimmunglobuline; Brückenantikörper) aufgetragen und für jeweils 30 Minuten inkubiert. Nach dem dreimaligen Spülen mit TRIS-Puffer wird der Immunkomplex aufgetragen und nochmals für 30 Minuten inkubiert. Den Farbstoff gibt man nach erneutem Spülen auf die Probe und inkubiert sie 9 Minuten. Daraufhin wird wieder mit TRIS-Puffer und Aqua destillata gespült und die Gegenfärbung (Hämatoxylin) für 10 Sekunden aufgetragen. Nach dem Abspülen unter warmem Leitungswasser für 1-2 Minuten und dem Eintauchen in Ethanol (aufsteigende Reihe, je 2 Minuten 50%, 70%, 96%, 2 x 100%), erfolgt das Eindeckeln der Schnitte.

## **3.6 Statistische Berechnung und Dokumentation**

### **3.6.1 Autoradiographie**

#### **Qualitative Auswertung**

Abhängig von der jeweils vorhandenen Radioaktivitätskonzentration stellen sich die einzelnen Gewebe der Mäuse auf den Autoradiogrammen in verschiedenen Graustufen dar. Im Vergleich zur Darstellung der benachbarten Gewebe lassen sich somit diejenigen Bereiche ermitteln, in denen eine Anreicherung von Radioaktivität stattfindet. Die radioaktiv markierten Gewebe werden am Computerbildschirm visuell erfasst, mit dem Originalschnitt verglichen und identifiziert. Um die anatomische Zuordnung zu erleichtern, können die Autoradiogramme außerdem in Originalgröße auf durchsichtige Folie gedruckt werden. Diese Ausdrücke werden direkt auf den Originalschnitt gelegt und mit diesem verglichen. Die so identifizierten Organe und Gewebe können mit Hilfe der Auswertungssoftware beschriftet und als Bitmap-Datei exportiert werden.

#### **Quantitative Auswertung**

Hierzu werden für jede einzelne eingescannte Imageplatte zunächst die Regions of interests (ROI) sowie Hintergrundregionen erfasst, mit deren Hilfe die automatische Umrechnung aller gemessenen Intensitäten erfolgt. Bei der Messung radioaktiver Intensitäten ist es unvermeidlich, dass eine geringe Hintergrundaktivität auf den Platten auch an Stellen gemessen wird, auf denen keine Probe aufgelegt wurde und die eigentlich keine Aktivität enthalten sollten. Dies ist auf die natürliche Radioaktivität oder Kontaminationen der Platten zurückzuführen. Mittels definierter Untergrundregionen kann die Untergrundkorrektur vom Auswerteprogramm automatisch vorgenommen werden. Mit Hilfe der Menüoption „Regions“ werden interessante Bereiche des Autoradiogramms markiert, benannt und die darin automatisch aufgezeichnete Intensität gemessen. Die innerhalb der Region gemessene Intensität, der

Flächeninhalt der Region und alle weiteren für die Auswertung wichtigen Informationen werden im Reportfenster „Region Report“ in Tabellenform angezeigt. Anschließend werden die Einzelwerte der Regionen aufsummiert, um die gewichtete Konzentration (entsprechend dem gewichteten Mittelwert) je Organ zu erhalten. Die Daten werden hierzu im ASCII-Format in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office 2000, Microsoft Corporation, Redmond, USA) exportiert, dort zusammengefasst und berechnet. Die weitere statistische Auswertung des Datenbestandes erfolgt mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 10 für Windows.

### 3.6.2 Magnetresonanztomographie

Die MR-Daten werden über eine Messung der Signalintensität (SI) von Zellpellets, Tumor, Leber, Milz und Knochenmark des Femur innerhalb einer frei wählbaren Untersuchungsregion ROI (region of interest) ausgewertet. Die Ergebnisse werden als SNR-Daten (signal-to-noise ratio, Signal-Rausch-Verhältnis) quantifiziert, da dabei das Rauschen eliminiert wird [75;110].

Das Signal-Rausch-Verhältnis wird berechnet, indem die Signalintensität durch das Rauschen dividiert wird:  $SNR = SI_{\text{tissue}}/SI_{\text{background}}$ . Das Rauschen ist definiert als die Signalintensität der Artefakt-freien Luft des Hintergrundes, hier eine Stelle über der Maus innerhalb der speziell angefertigten Kunststoffform. Die Differenz der SI vor und nach Injektion von Eisenoxidmarkierten NK-Zellen wird mit der Formel  $\Delta SI = (SI_{\text{post}} - SI_{\text{pre}}) / \text{background noise}$  [129] berechnet.

Die quantitativen Werte für die Signalintensitäten von Zellpellets, Tumor, Knochenmark, Leber, Milz und Knochenmark vor sowie nach Injektion von eisenoxidmarkierten NK-Zellen werden als SNR-Daten (signal-to-noise ratio, Signal-Rausch Verhältnis) quantifiziert und als Mittelwerte mit Standardabweichungen aufgeführt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen den Daten vor und 24 Stunden nach Zelinjektion wird mittels t-Test für gepaarte Stichproben analysiert. Die Mittelwerte werden mit dem Scheffe's-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wird für  $p < 0,05$  festgelegt. Alle statistischen Berechnungen werden unter Verwendung des „StatView“ (4.1)-Computerprogramms (Abacus, Berkeley, CA, U.S.A.)

durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellmarkierung mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

#### 4.1.1 In vitro Versuche

Das Labeling der humanen hämatopoetischen Stammzellen mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG führt bei Steigerung der Inkubationszeit und der Radioaktivität zu einem kontinuierlichen Anstieg der in einem Gamma-Counter gemessenen Aktivität des Zellpellets (Abbildung 10, Abbildung 11). Bei einer Inkubationszeit von 60 min zeigt sich eine Plateaubildung der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Aufnahme in die Zelle. Längere Inkubationszeiten bis zu 2 Stunden lassen den [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptake nicht weiter ansteigen. Die Zellvitalität (80-90%) verändert sich mit steigender Inkubationsdauer ( $p < 0,05$ ) nicht signifikant.

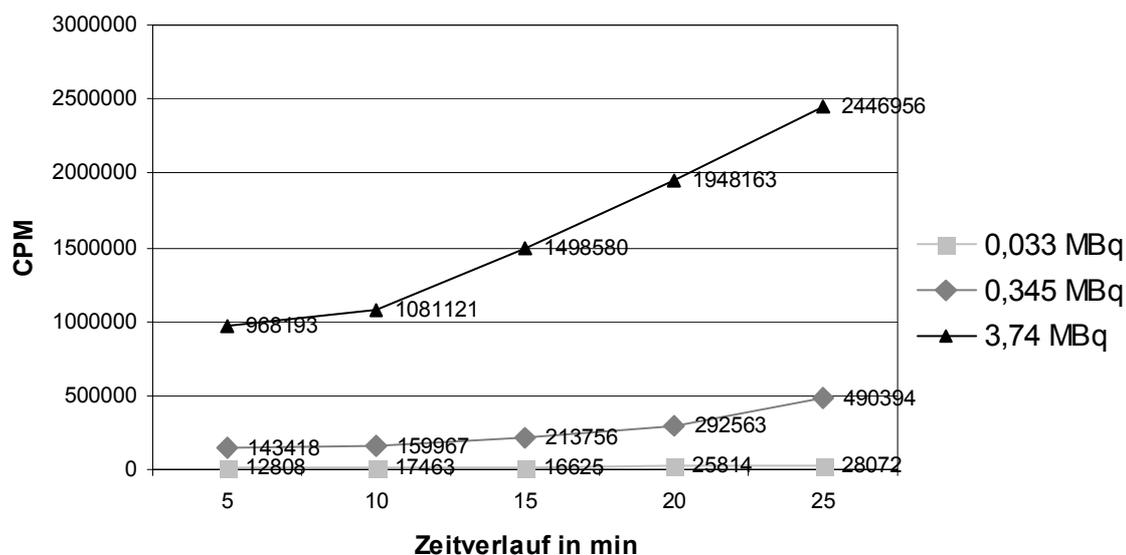
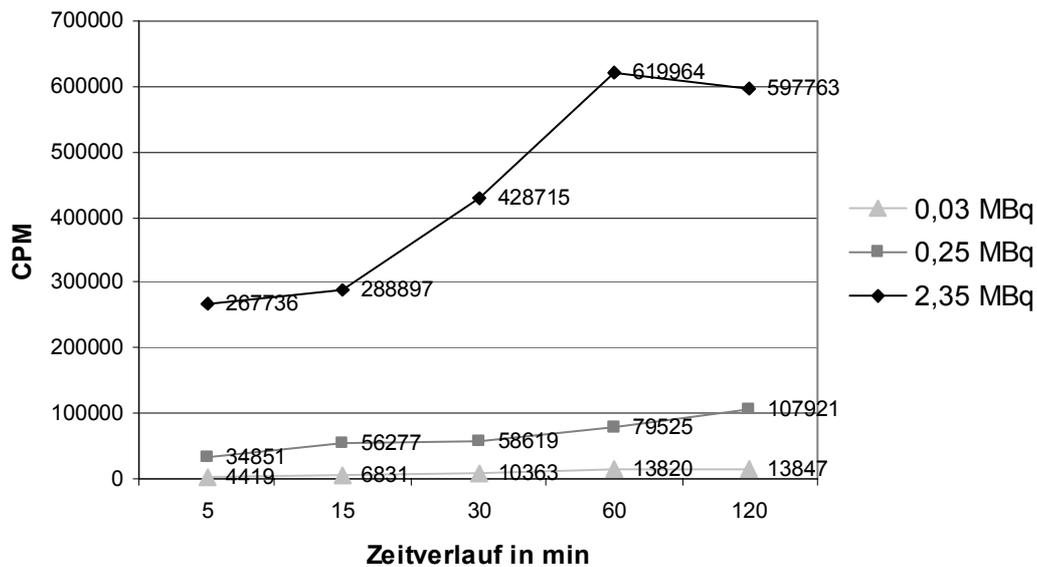


Abbildung 10: Vergleich der Counts per minute (CPM) von  $16 \times 100.000$  mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Aktivität und Inkubationszeit



**Abbildung 11: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 64 x 100.000 mit [<sup>18</sup>F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Aktivität und Inkubationszeit, ohne Zugabe von Insulin**

Eine Steigerung der [<sup>18</sup>F]FDG Aktivitäten führt zu einer proportional steigenden CPM, ist aber auch umgekehrt proportional zu der Zellvitalität. So zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen (90-95%) eine geringe, nicht signifikante ( $p < 0,05$ ) Verminderung der Vitalität (80-90%). Die Retention des radioaktiven Labelingverfahrens wurde berechnet: der Tracer [<sup>18</sup>F]FDG wird mit einer durchschnittlichen Abnahme der zellgebundenen Aktivität von 20% nach 30 min, 35% nach 60 min und 40% nach 120 min wieder freigesetzt.

Eine weitere Steigerung des [<sup>18</sup>F]FDG-Uptake wird durch Zugabe von Insulin (Insuman Basal) erreicht. Hier zeigt sich bei 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  eine Plateaubildung der [<sup>18</sup>F]FDG-Aufnahme in die Zelle. Diese kann nicht signifikant durch höhere Konzentrationen bis 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  gesteigert werden (Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 15).

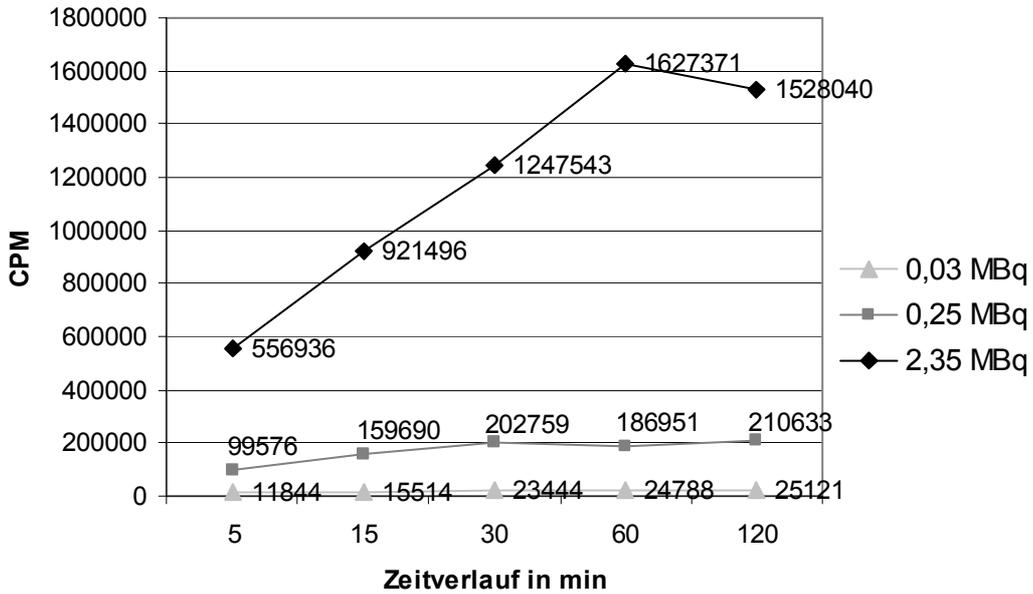


Abbildung 12: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 64 x 100.000 mit [<sup>18</sup>F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Aktivität und Inkubationszeit, mit Zugabe von 10 µL/mL Insulin

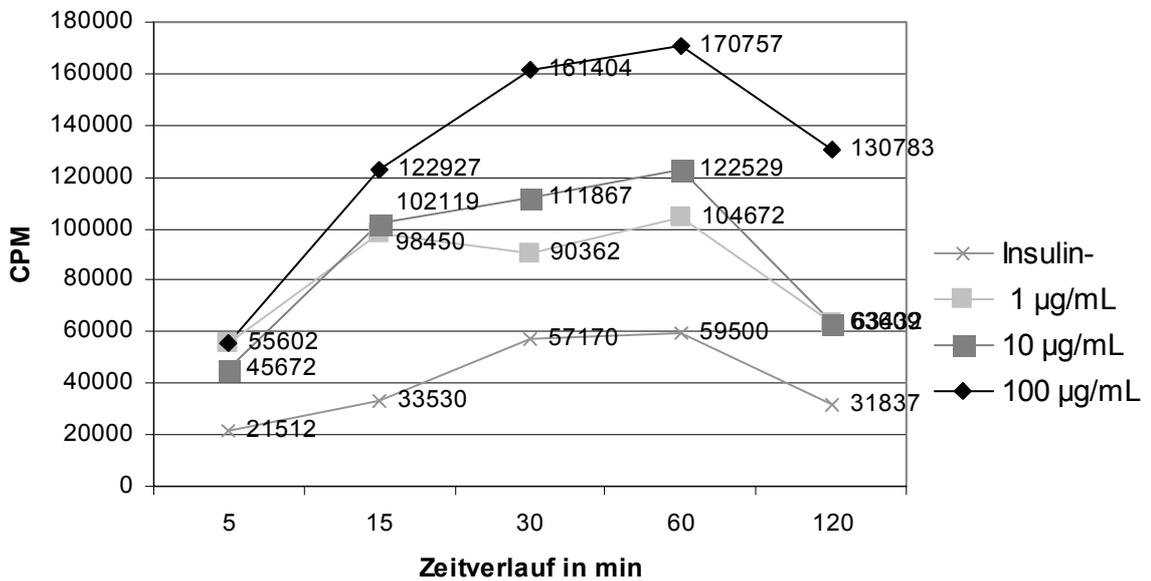


Abbildung 13: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 22 x 100.000 mit [<sup>18</sup>F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von 0,384 MBq

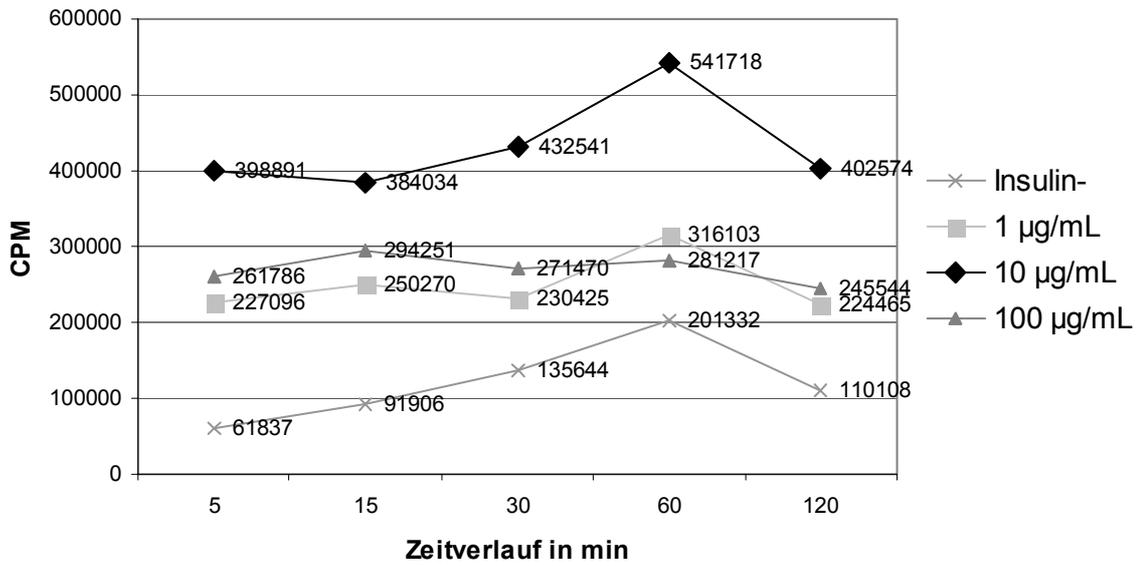


Abbildung 14: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 22 x 100.000 mit [<sup>18</sup>F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von 3,68 MBq

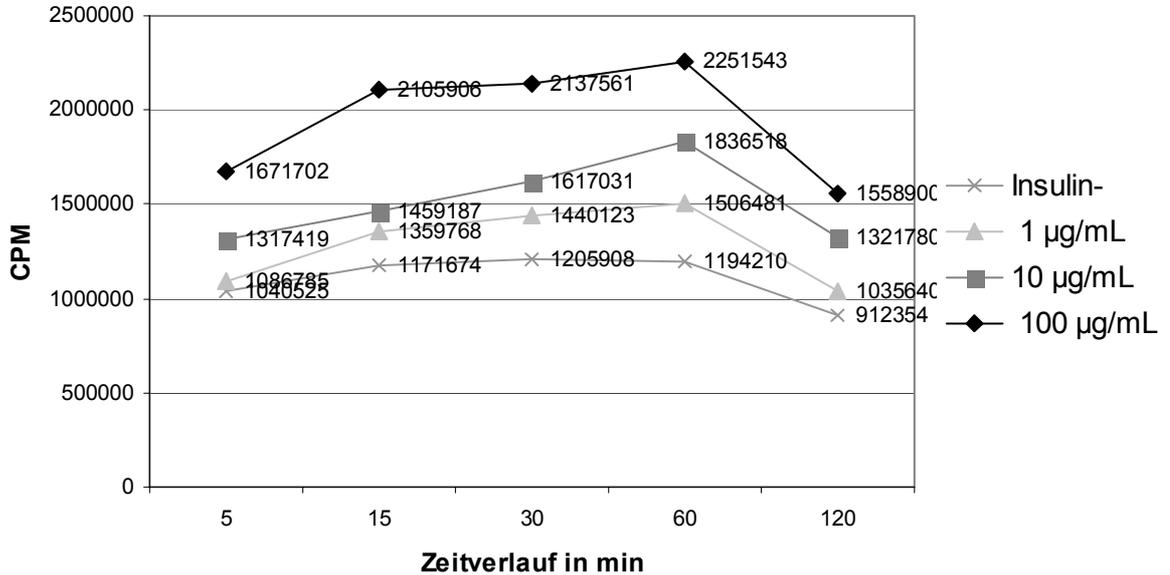
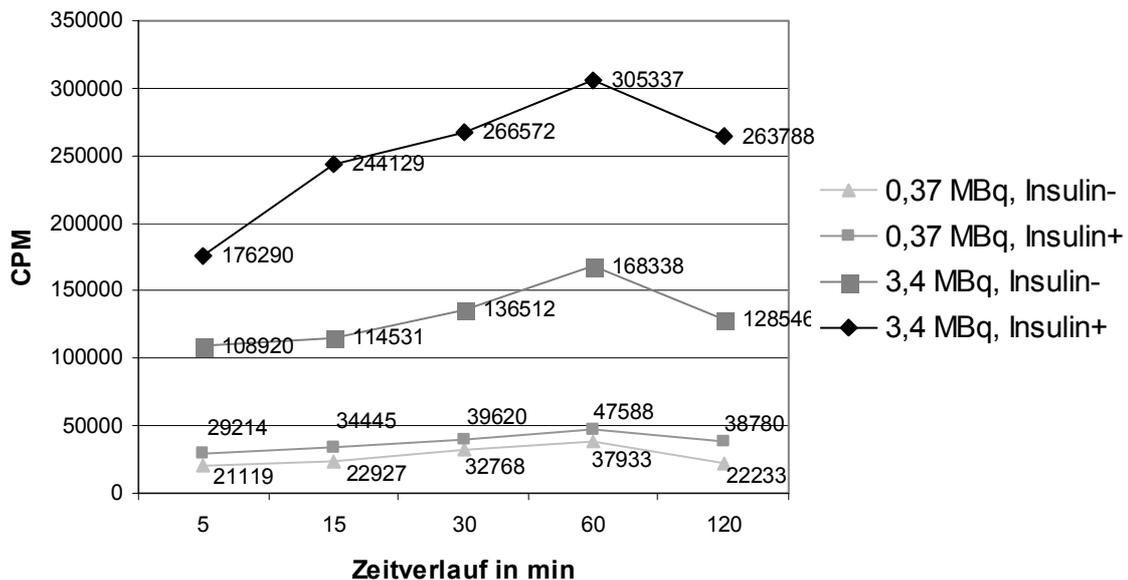


Abbildung 15: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 62 x 100.000 mit [<sup>18</sup>F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von 30 MBq

Die so optimierten Markierungsbedingungen werden darauf analog für die NK-Zellen angewendet. Das Labeling dieser Zellen führt bei Steigerung der Inkubationszeit oder der Radioaktivität ebenfalls zu einem kontinuierlichen Anstieg der Aktivität der Zellpellets. Es zeigt sich auch hier ein Optimum des [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Uptakes bei einer Inkubationszeit von 60 min und einer Insulinkonzentration von 10  $\mu\text{L/mL}$ . Die Erhöhung der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Aktivität führt zu einer proportional steigenden Aktivität der Zellpellets, es zeigt sich keine Plateaubildung (Abbildung 16 und Abbildung 17). Die Zellvitalität (80-90%) verändert sich mit steigender Inkubationsdauer oder steigender [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-Aktivität ( $p < 0,05$ ) nicht signifikant. Der Radiotracer [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wird von den Lymphozyten mit einer durchschnittlichen Abnahme der zellgebundenen Aktivität von 20% nach 30 min, 35% nach 60 min und 40% nach 120 min wieder freigesetzt.



**Abbildung 16:** Vergleich der Counts per minute (CPM) von  $22 \times 100.000$  mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG gelabelten NK-Zellen unter Variation der Inkubationszeit, bei Verwendung von 10  $\mu\text{L/mL}$  Insulin und einer Aktivität von 0,37 MBq bzw. 3,4 MBq [ $^{18}\text{F}$ ]FDG

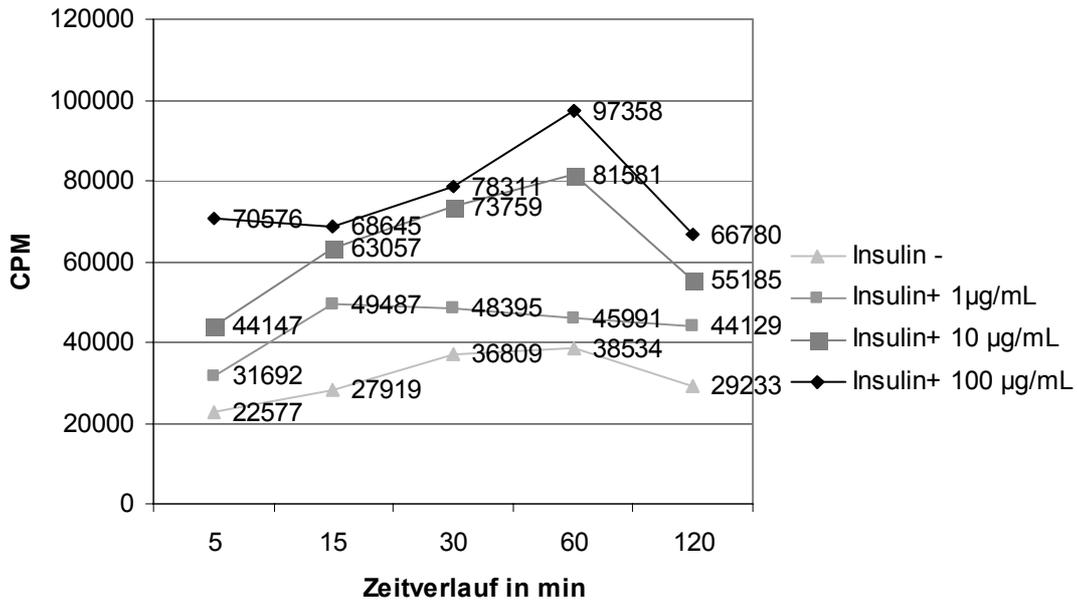


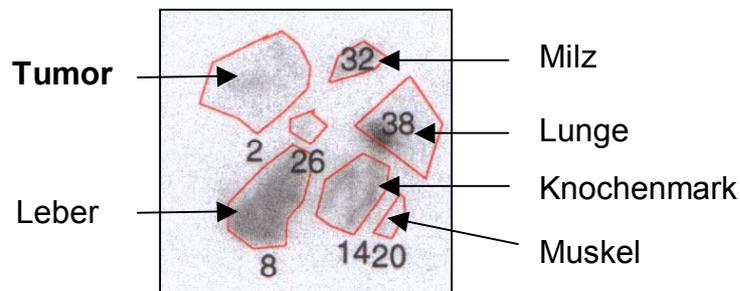
Abbildung 17: Vergleich der Counts per minute (CPM) von  $22 \times 100.000$  mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG gelabelten NK-Zellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von  $0,34 \text{ MBq}$

#### 4.1.2 In vivo Versuche

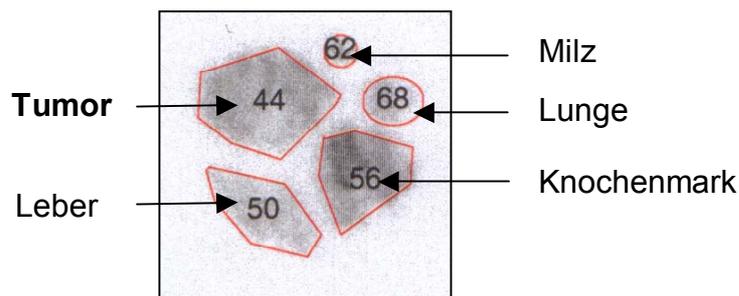
Die Autoradiogramme der nach i.v.-Applikation von mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG markierten NK-Zellen untersuchten Mäuse mit einem HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor zeigen eine über die verschiedenen Organe unterschiedlich verteilte Radioaktivität. Diese wird in den Autoradiogrammen in Abbildung 18 und Abbildung 19 grafisch dargestellt. Abhängig von der jeweils vorhandenen Radioaktivitätskonzentration stellen sich die einzelnen Gewebe der Mäuse auf den Autoradiogrammen in verschiedenen Graustufen dar. Im Vergleich zur Darstellung der benachbarten Gewebe lassen sich diejenigen Bereiche ermitteln, in denen eine Anreicherung von Radioaktivität stattfindet. Dabei ist die Schwärzung des Autoradiogrammes proportional zur aufgenommenen Aktivität in das jeweilige Organ.

Während bei den mit HER2/neu negativen NK-92-Zellen behandelten Mäusen die Leber, Milz, Lunge und Knochenmark stark Aktivität aufnehmen, stellt sich das Tumorgewebe dagegen mit geringerer Aktivität dar (Abbildung 18). Im

Vergleich dazu zeigt die Studie der Mäuse, denen anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, die gegen das HER2/neu Antigen gerichtet sind, infundiert werden, eine sehr viel stärkere Schwärzung und damit auch eine höhere Aktivitätsaufnahme des Tumorgewebes (Abbildung 19).



**Abbildung 18:** Ausschnittvergrößerungen aus Autoradiogrammen von verschiedenen Organen einer Maus mit einem HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor nach i.v.-Applikation von mit [<sup>18</sup>F]FDG markierten, nicht gegen HER2/neu gerichteten NK-Zellen.



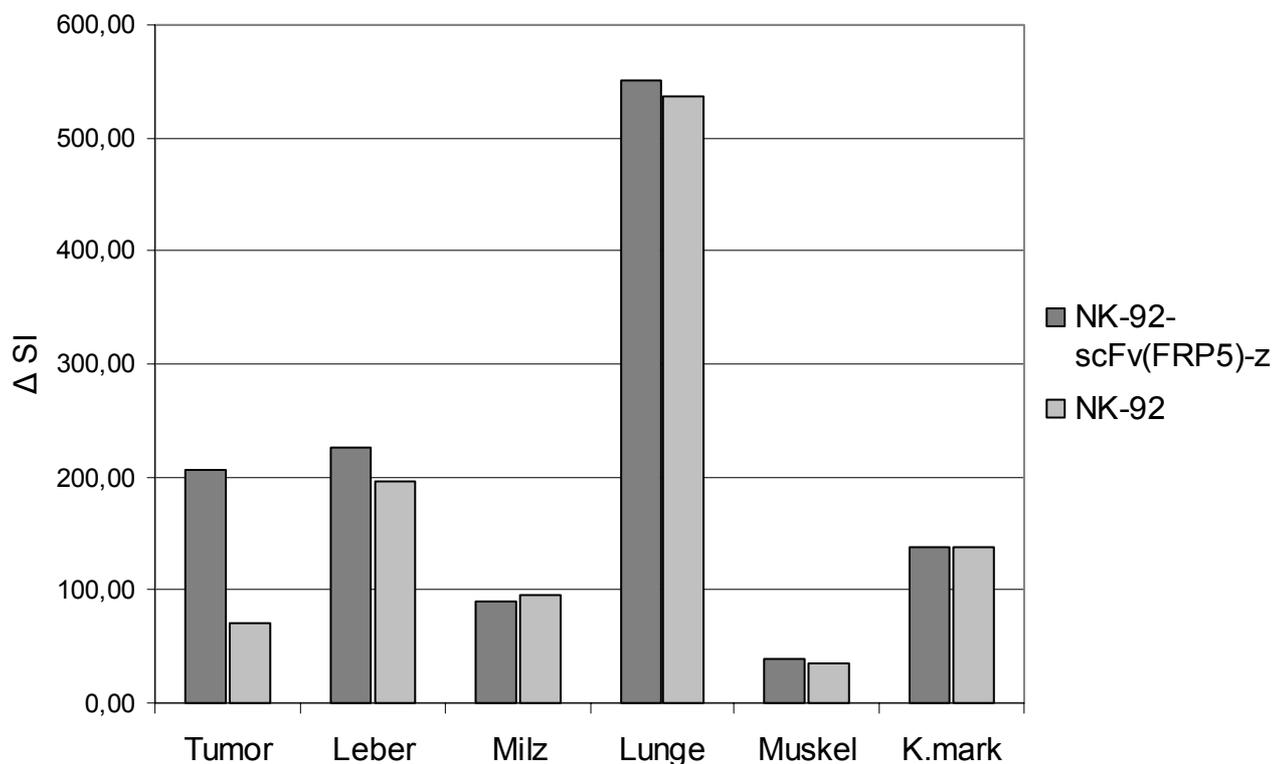
**Abbildung 19:** Ausschnittvergrößerungen aus Autoradiogrammen von verschiedenen Organen einer Maus mit einem HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor nach i.v.-Applikation von mit [<sup>18</sup>F]FDG markierten, gegen HER2/neu gerichteten NK-92-Zellen.

Die innerhalb der region of interest gemessene Radioaktivität wird erfasst. Mit Hilfe der bestimmten Hintergrundaktivität erfolgt die automatische Umrechnung aller gemessenen Intensitäten. Mit diesen Daten können die zwei Ansätze verglichen werden (Abbildung 21 und Abbildung 20).

Diese Daten zeigen zum einen die absolute Aufnahme von Radioaktivität in verschiedenen Organen (Abbildung 20) und zum anderen die Aufnahme der Radioaktivität in ausgewählten Organen im Verhältnis zu der von dem Tumor aufgenommenen Aktivität (Abbildung 21). Es werden zwei Ansätze miteinander verglichen. Einerseits werden Mäusen mit HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren nicht-spezifische, nicht gegen HER2/neu gerichtete und andererseits gegen

HER2/neu gerichtete (anti-HER2/neu) NK-92-Zellen injiziert.

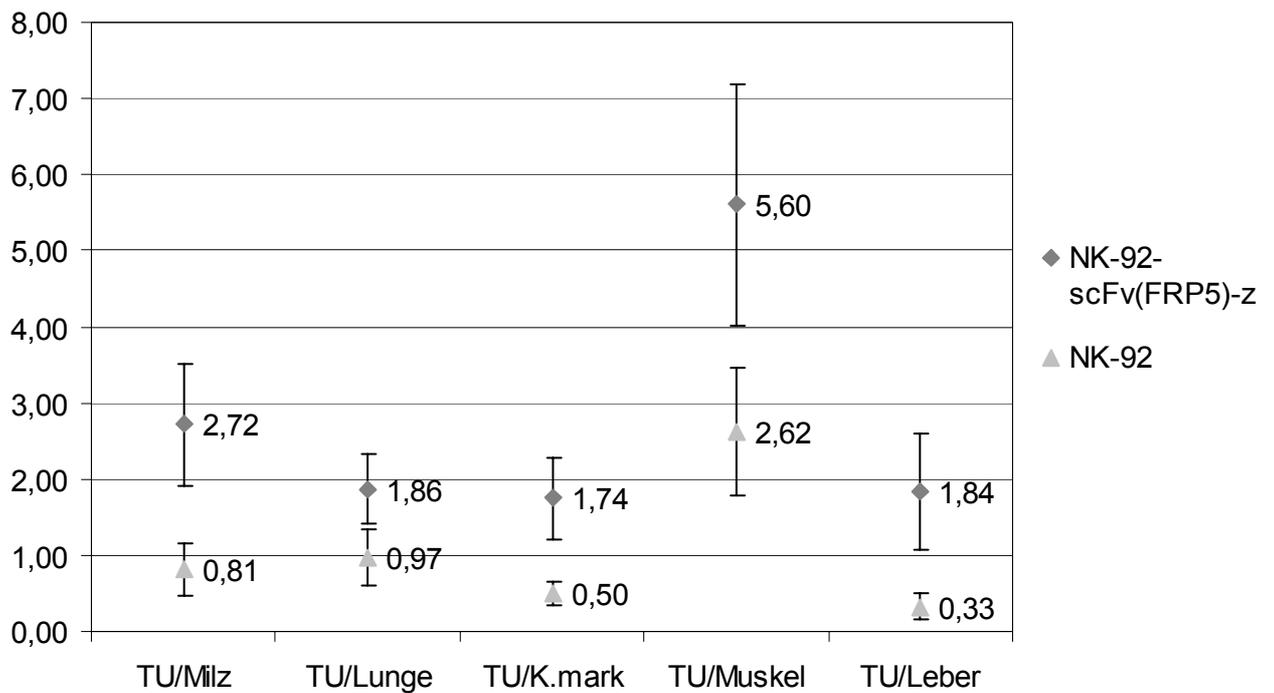
Bei dem Vergleich der gemessenen Signalintensitäten der Autoradiographie in Abbildung 20 lässt sich eine hohe radioaktive Anreicherung in der Lunge erkennen. Am wenigsten wird von dem Muskelgewebe aufgenommen. Das Tumorgewebe der mit den anti-HER2/neu NK-92-Zellen behandelten Mäuse weist im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine 2,9 fache Aufnahme der Radioaktivität auf. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 20: Vergleich der Aufnahme von Radioaktivität in ausgewählten Organen. Es werden zwei Studien mit jeweils HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren tragenden Mäusen nach Injektion der einerseits nicht-spezifischen, nicht gegen HER2/neu gerichteten und andererseits der spezifischen, gegen HER2/neu gerichteten mit [<sup>18</sup>F]FDG gelabelten NK-92-Zellen verglichen.**

Der Quotient aus der Aufnahme von Aktivität des Tumorgewebes im Verhältnis zu den anderen Organen zeigt in der Gruppe nach Injektion der anti-HER2/neu (HER2/neu positiven) NK-92-scFv(FRP5)-z Zellen eine höhere Aktivität als alle anderen Organe (Abbildung 21). Das Tumorgewebe nach Injektion der HER2/neu positiven NK-92-Zellen - normiert auf die Organe - weist im Mittel

eine 3,3 fache und maximal eine 5,6 fache Aktivitätsaufnahme im Vergleich zu dem Tumorgewebe nach Injektion der HER2/neu negativen NK-92-Zellen auf. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (t-test:  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 21: Quotient aus der Aufnahme von Radioaktivität des Tumorgewebes (TU) im Verhältnis zu ausgewählten Organen. Es werden zwei Studien mit jeweils HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren tragenden Mäusen nach Injektion der einerseits nicht-spezifischen, nicht gegen HER2/neu gerichteten und andererseits der spezifischen, gegen HER2/neu gerichteten mit [ $^{18}$ F]FDG gelabelten NK-92-Zellen verglichen.**

## 4.2 Zellmarkierung mit Resovist

### 4.2.1 In vitro Versuche

Effektives Labeling von NK-92-Zellen resultiert in einem deutlichen Signalintensitätsabfall der Eisenoxidmarkierten Zellen bei T2 gewichteter MR-Bildgebung (Abbildung 22).

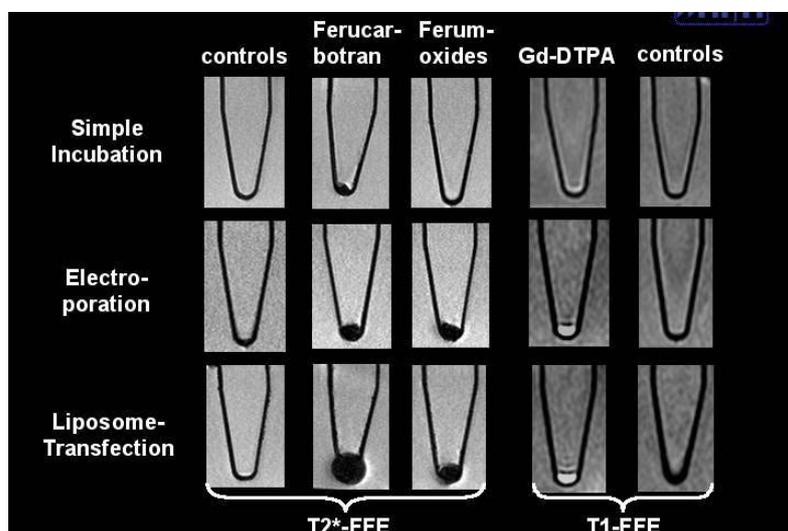


Abbildung 22: MR-Bildgebung von zentrifugierten NK-92-Zellpellets in Tubes. Elektroporation und Transfektion mit Eisenoxidhaltigen Kontrastmitteln führt zu einem starken T2-Effekt bei den zu untersuchenden Zellen.

Die intrazelluläre Eisenoxid-Aufnahme wird mittels Spektrometrie (Tabelle 10) quantifiziert und mit Berliner-Blau Färbung bestätigt (Abbildung 23, Abbildung 24).

Tabelle 10: Der zelluläre Eiseninhalt vor und nach dem Labeling mit Eisenoxidmarkierten Kontrastmitteln wird durch Spektrometrie bestimmt. Für jeden Labeling-Prozess werden die Ergebnisse der optimierten Protokolle mit der maximalen Eisenoxid-Aufnahme und minimal beeinträchtigtster Zellvitalität aufgeführt.

10 <sup>6</sup> NK-92-Zellen	Kontrollen	Ferucarbotran	Ferumoxides
<b>Einfache Inkubation (100 µg Fe/24 h)</b>			
NK-92-Zellen	0.001±0.002 µg Fe	0.81±0.44 µg Fe	0.01±0.002 µg Fe
NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen	0.001±0.004 µg Fe	0.76±0.50 µg Fe	0.02±0.002 µg Fe

<b>Elektroporation (100 µg Fe)</b>			
NK-92-Zellen	0.002±0.005 µg Fe	2.53±0.62 µg Fe	1.32±0.48 µg Fe
NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen	0.004±0.005 µg Fe	2.36±0.49 µg Fe	1.18±0.42 µg Fe
<b>Transfektion (100 µg Fe/24 h)</b>			
NK-92-Zellen	0.001±0.002 µg Fe	2.86±0.80 µg Fe	1.55±0.65 µg Fe
NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen	0.002±0.002 µg Fe	2.94±0.66 µg Fe	1.37±0.48 µg Fe

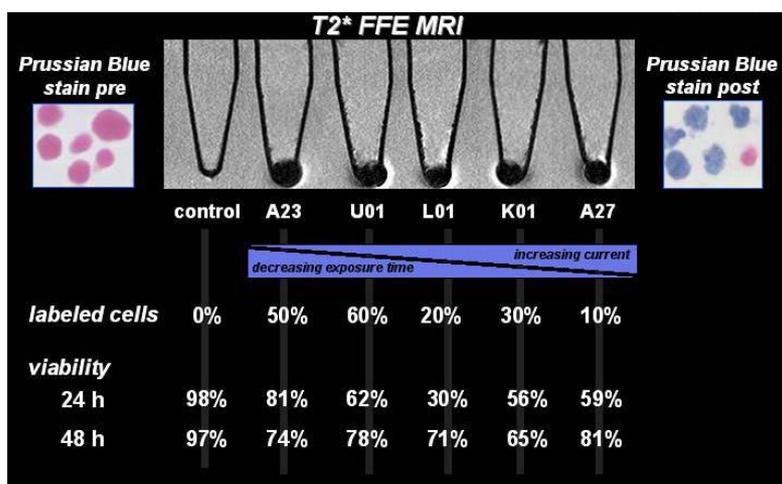


Abbildung 23: Elektroporation von NK-92-Zellen mit Ferucarbotran zeigt eine limitierte Kontrastmittelaufnahme und eine Verminderung der Zellvitalität.

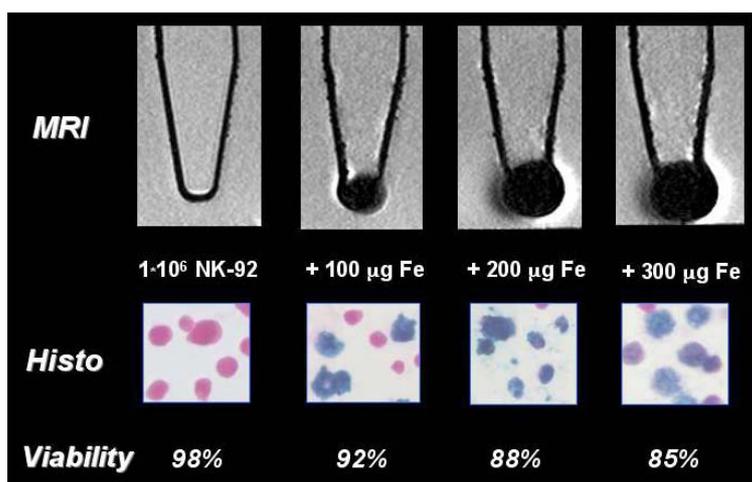


Abbildung 24: Transfektion mit Ferucarbotran führt zu einer hoch effizienten zellulären Eisen-Aufnahme, daraus folgenden deutlichen T2-Effekt der markierten Zellen bei erhaltener Zellvitalität.

Einfache Inkubation erzielt eine nur geringe Kontrastmittelaufnahme von

Ferucarbotran und keinen erkennbaren Effekt bei Ferumoxides, während Elektroporation und Lipofektion eine effektive Zellmarkierung mit beiden Kontrastmitteln ermöglicht (Abbildung 22). Bei allen untersuchten Markierungstechniken ist Ferucarbotran effizienter als Ferumoxides (Abbildung 22, Tabelle 10).

Elektroporation ermöglicht das Markieren von Zellen innerhalb von Millisekunden, aber verursacht eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Minderung der Zellvitalität. Dadurch ist eine verlängerte Zellkulturzeit zur Erholung der beschädigten Zellen notwendig. Durch verschiedene Spannungen und Expositionszeiten kann ein Maximum von 50-60% der Zellen mit Eisenoxid markiert werden. Von diesen waren nach 48 Stunden weniger als 80% vital.

Lipofektion führt bei steigender Inkubationsdauer von bis zu 24 Stunden zu einer linear ansteigenden zellulären Aufnahme von Ferumoxides und Ferucarbotran. Längere Inkubationszeiten von bis zu 48 Stunden lassen die zelluläre Eisenaufnahme nicht weiter ansteigen. Die Zellvitalität verändert sich mit steigender Inkubationsdauer nicht signifikant ( $p < 0,05$ ). Erhöhte Eisenoxidkonzentrationen führen zu einer steigenden zellulären Eisenoxidaufnahme, sind aber auch umgekehrt proportional zu der Zellvitalität. So zeigt sich eine geringe, nicht signifikante Verminderung der Vitalität im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ; Abbildung 24). Durch Lipofektion von Ferucarbotran mit 100  $\mu\text{g}$  Fe für eine Dauer von 24 h können 60% der Zellen bei einer fast unveränderten Vitalität von 92% markiert werden. Durch Lipofektion von Ferucarbotran mit 200  $\mu\text{g}$  Fe für einen Zeitraum von 24 h können 80% der Zellen bei einer geringen Verminderung der Vitalität von 88% markiert werden. Bei einer Lipofektion von Ferucarbotran mit einer Fe-Konzentration von 100  $\mu\text{g}$  für die Dauer von 24 h ist das Minimum an NK-Zellen, die bei MR-Bildgebung erkannt werden können, bei einer Zellzahl von  $2,5 \times 10^5$ . Follow-up Studien weisen eine beibehaltene Markierung und eine erhaltene Zellvitalität für mindestens fünf Tage nach (Abbildung 25).

	control	+ 100 $\mu\text{g}$ Fe	
		24h	5d
<b>MRI</b>			
<b>Fe-labeled</b>	0%	60%	30%
<b>Viability</b>	98%	92%	95%

Abbildung 25: Follow-up MR-Bildgebung nach Lipofektion von NK-92-Zellen mit Ferucarbotran (100  $\mu\text{g}$  Fe, 24 h) zeigt einen anhaltenden Effekt auf die markierten Zellen für 5 Tage.

#### 4.2.2 In vivo Versuche

Nach intravenöser Injektion von  $5 \times 10^6$  mit Ferumoxtran markierten anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen in eine Maus mit implantierten HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor weisen die T2-gewichteten MR-Bilder einen deutlichen Signalabfall dieser Tumore auf (Abbildung 26, Abbildung 27).

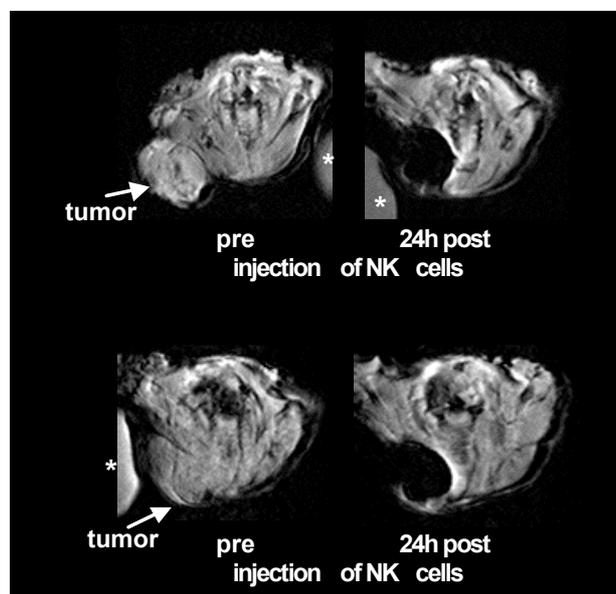
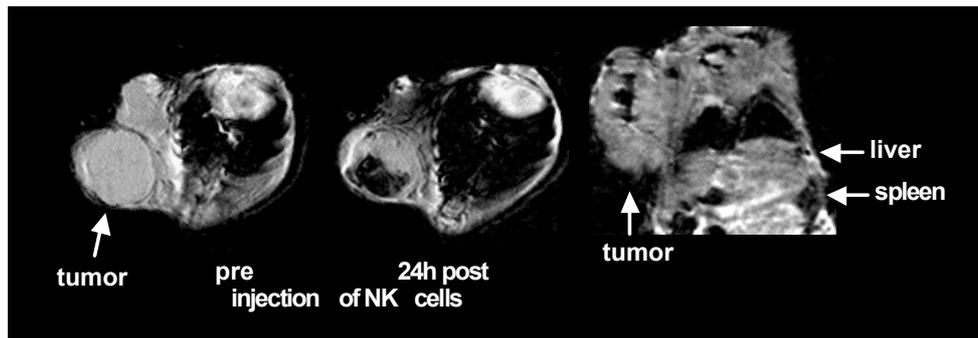


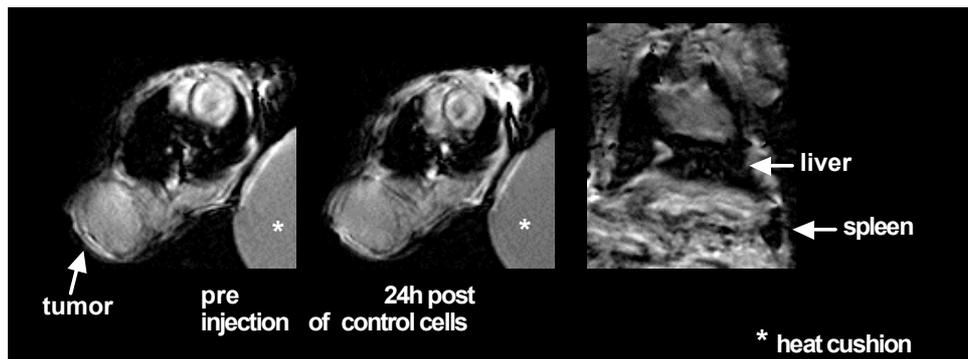
Abbildung 26: T2\*-gewichtete FFE MR-Bilder zeigen eine hohe Signalintensität der HER2/neu+ NIH-3T3 Tumore vor Zellinjektion (siehe Pfeile) und einen deutlichen Signalabfall 24 h nach Injektion von mit Ferucarbotran markierten anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen. (\* heat cushion).



**Abbildung 27:** T2\*-gewichtete FFE MR-Bilder eines anderen HER2/neu+ NIH-3T3 Tumors zeigen einen inhomogenen Abfall der Signalintensität nach Injektion von mit Ferucarbotran markierten anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen. Anscheinend weist dies auf eine fokale Zellakkumulation in dem Tumorgewebe hin. Die Milz zeigt ebenfalls einen Signalabfall, hervorgerufen durch nicht-selektive Akkumulation von einigen der injizierten Zellen in diesem Organ. Hingegen zeigt die Leber keinen Signalabfall nach Injektion der mit Eisenoxid markierten Zellen und schließt damit die Anwesenheit einer relevanten Menge von freiem Kontrastmittel in der injizierten Suspension aus.

Dies deutet auf eine Akkumulation der mit Kontrastmittel markierten Zellen im Tumorgewebe hin. Qualitativ gesehen lassen zwei der Tumore einen homogenen Signalabfall erkennen (Abbildung 26) und einer der Tumore zeigt einen inhomogenen, überwiegend zentralen und dorsalen Signalabfall (Abbildung 27). Die quantifizierten SNR-Daten nach Injektion (p.i.) von mit Ferumoxtran markierten Zellen im Vergleich zu den Nativaufnahmen vor Zellinjektion sind signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich. Die Veränderung der Signalintensität des Tumorgewebes ist  $\Delta SI = 20.99 \pm 10.12$  bei 12 h p.i. und  $\Delta SI = 29.56 \pm 8.56$  bei 24 h p.i.. Die Milz zeigt ebenfalls einen signifikanten Signalabfall nach Zellinjektion ( $p < 0,05$ ) mit  $\Delta SI$  Daten von  $7.09 \pm 2.48$  bei 12 h p.i. und  $7.75 \pm 3.46$  bei 24 h p.i., offenbar hervorgerufen durch nicht-selektive Akkumulation von einigen der injizierten Zellen in diesem Organ. Die Leber zeigt einen geringeren, aber nicht signifikanten Signalabfall nach Zellinjektion ( $p > 0,05$ ; Abbildung 27). Dies deutet auf einen Mangel an einer signifikanten Menge an freien Eisenoxiden in der injizierten Zellsuspension hin. Die Leber  $\Delta SI$  Daten sind  $2.69 \pm 2.13$  bei 12 h p.i. und  $4.22 \pm 1.35$  bei 24 h p.i..

Bei den Kontrollstudien, nach intravenöser Injektion von  $5 \times 10^6$  mit Ferumoxtran markierten, nicht gegen HER2/neu gerichteten NK-92-Zellen in eine Maus mit implantierten HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor, lassen die T2-gewichteten MR-Bilder keinen Signalabfall des Tumors erkennen (Abbildung 28).

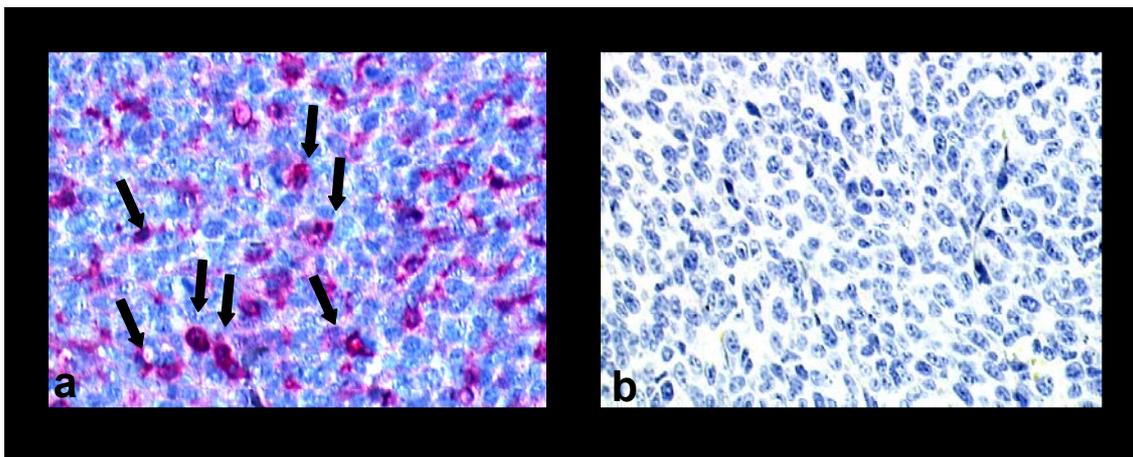


**Abbildung 28:** T2-gewichtete FFE MR-Bilder von HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren zeigen keine Veränderung der Signalintensität vor und nach Injektion der nicht-spezifischen, nicht gegen HER2/neu gerichteten NK-92-Zellen. Leber und Milz hingegen weisen einen Signalabfall auf. Dies indiziert eine nicht-spezifische Zellakkumulation in diesen Organen.

Die entsprechenden Tumor SNR-Daten vor und nach Zellinjektion unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Die Veränderungen in der Signalintensität des Tumorgewebes sind  $\Delta SI = 1.81 \pm 0.79$  bei 12 h p.i. und  $\Delta SI = 3.66 \pm 1.45$  bei 24 h p.i.. In diesen Kontroll-Mäusen hingegen kann nach Zellinjektion ein signifikanter Abfall der Signalintensität der Leber und der Milz beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Die  $\Delta SI$ -Daten der Leber in dieser Gruppe sind  $6.55 \pm 2.34$  bei 12 h p.i. und  $10.58 \pm 4.1$  bei 24 h p.i.. Die  $\Delta SI$ -Daten der Milz sind  $10.79 \pm 3.35$  bei 12 h p.i. und  $13.26 \pm 3.69$  bei 24 h p.i.. Diese Daten weisen auf keine oder eine nur geringe NK-Zell-Akkumulation im Tumorgewebe hin (bei gegebener Sensitivität des MR-Systems), bestätigen aber in Leber- und Milzgewebe eine nicht-selektive Zellakkumulation.

### 4.3 Histopathologie

Entsprechende histopathologische Befunde und immunhistochemische Färbungen bestätigten eine Akkumulation von anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen in HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren (Abbildung 29 a).



**Abbildung 29:** Anti-CD57 immunhistochemische Färbungen, gerichtet gegen NK-Zellen. In Bild A ist ein HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor zu sehen, der 24 h nach Injektion von anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen eine positive Akkumulation von verfarbten Zellen (einige markiert mit Pfeilen) im Tumorgewebe aufweist. In Bild B ist ein Kontrolltumor, ein HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor, abgebildet, der 24 h nach Injektion von nicht gegen HER2/neu gerichteten NK-92-Zellen keine Zellakkumulation im Tumorgewebe erkennen lässt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Magnetresonanztomographie zeigen zwei Tumore eine diffuse Akkumulation von anti-HER2/neu NK-92-Zellen, während ein Tumor eine fokale Akkumulation der NK-Zellen aufweist. Es kann kein wesentliches Merkmal in der zu Grunde liegenden Histopathologie des Tumorgewebes gefunden werden, das die unterschiedliche Verteilung der NK-Zellen erklären könnte. Die histopathologischen Untersuchungen der Kontrolltumoren zeigen keine Akkumulation der nicht gegen HER2/neu gerichteten NK-92-Zellen in den HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren (Abbildung 29 b).

---

## 5 Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass genetisch modifizierte humane NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen effektiv einerseits mit Eisenoxid-MR-Kontrastmitteln wie Ferucarbotran und Ferumoxides und andererseits mit radioaktiven [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET-Kontrastmitteln markiert werden können. Im Anschluss an die intravenösen Injektionen in die tumortragende Maus konnten die Migration, das Homing und die Tumorakkumulation der markierten Zellen mit MR-Bildgebung und Autoradiographie verfolgt werden.

Die hier angewendeten Techniken sind optimiert auf die spezifischen Eigenschaften bereits transfektionierter NK-Zellen und zeigen potenzielle Vorteile gegenüber früher beschriebenen Markierungstechniken von anderen Zelltypen mit unterschiedlichen Markern [1;23;29;54;62;68;79]. Die MR-Markierungs-technik ist nicht invasiv, leicht anzuwenden, führt nicht zu radiotoxischen Zellschäden, bietet eine lang anhaltende Markierung und liefert dreidimensionale Bildgebung mit einer hohen anatomischen Auflösung. Die [ $^{18}\text{F}$ ]FDG Markierungstechnik für die Autoradiographie weist dafür eine hohe Sensitivität auf und ist prinzipiell auch für den Zellenachweis mit PET geeignet. Da klinisch anwendbare Kontrastmittel und Standardgeräte verwendet wurden, sind diese Methoden im Prinzip klinisch anwendbar.

Der Vorteil der NK-zellbasierten Immuntherapie im Vergleich zu der Immun-, Chemo- oder Strahlentherapie ist die hohe und selektive Zytotoxizität gegen Tumorzellen ohne aber toxisch gegen nicht-maligne allogene Zellen zu sein. Außerdem benötigt die Zellzytotoxizität der NK-Zellen keine Sensitivierung und ist nicht eingeschränkt durch MHC-Restriktion. Auf Grund der hohen intrinsischen zytotoxischen Aktivität der NK-92-Zellen gegenüber einer großen Auswahl an Malignomen [46;109;112;130] und dem Fehlen von toxischem und kanzerogenem Potential bei immundefizienten SCID Mäusen [109;130] wurden

---

Phase I/II klinische Studien initiiert. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass zwei Infusionen mit NK-92-Zellen (die höchste Dosis von infundierten NK-92-Zellen bei einem Patienten:  $9,4 \times 10^9$  Zellen) bei Kindern und jungen Erwachsenen mit fortgeschrittenem Krebs gut toleriert wurden und nicht zu toxischen Folgeschäden führten [112]. Das PCR-basierte Monitoring der NK-92 Kinetik im peripheren Blut transfundierter Patienten deckte auf, dass offenbar ein großer Anteil der NK-92-Zellen Minuten nach Beginn der Transfusion die Blutzirkulation verlässt. Da jedoch diese NK-Zellen nicht markiert wurden, konnte in vorausgehenden klinischen Studien ein Homing der NK-92-Zellen in dem Tumorgewebe mittels Bildgebung nicht bewiesen werden. Da aber gerade die NK-Zellakkumulation und -infiltration im Tumorgewebe entscheidend für die therapeutische Effektivität ist, könnten die hier vorgestellten Bildgebungstechniken von großer Bedeutung für weitere Entwicklungen der onkologischen Immuntherapie sein.

Bei Verwendung der vorgestellten Bildgebungsmethoden erhält man eine nicht-invasive Einschätzung der Anwesenheit und der Ausdehnung der NK-Zellakkumulation im Tumorgewebe innerhalb eines Tages nach intravenöser NK-Zellgabe. Dies könnte gründlichere longitudinale Untersuchungen der in vivo Zellbiodistribution, der Homing-Spezifität der genetisch modifizierten NK-Zellsubtypen, der potenziellen Interaktionen bei zusätzlicher Chemotherapie und Gründe für Behandlungsmisserfolge erlauben. Zum Beispiel könnten variierende Resultate der Therapie bei z.B. diffus und fokal akkumulierenden Tumoren, wie in dieser Studie gesehen, untersucht werden. Weitere Anwendungen könnten die Effektivität der zellbasierten Immuntherapie bei verschiedenen histopathologischen Tumortypen, unterschiedlichen Tumor-Grading und -Staging des Tumorwachstums erforschen.

In dieser Studie wurden genetisch modifizierte NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, die gegen HER2-Rezeptoren [114] gerichtet sind, als ein Modell für auf NK-Zellen basierte Immuntherapien untersucht. Als eine therapeutische Alternative wurde bereits der humane monoklonale HER2-spezifische Antikörper Herceptin

---

(Trastuzumab) als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie mit wachsendem klinischen Erfolg für eine signifikante Anzahl von Patienten mit HER2-überexprimierendem metastatischem Brustkrebs appliziert [119]. Eine soeben neu veröffentlichte Studie im ‚New England Journal of Medicine‘ zeigt auf, dass eine adjuvante Chemotherapie mit simultaner Gabe von Trastuzumab bei Frauen mit chirurgisch entferntem HER-2 positiven Brustkrebs zu einer Reduktion der Sterblichkeit um 33% ( $p=0,015$ ) führte und somit eine hervorragende Ansprechrate aufweist [90].

Jedoch konnte eine Tumor-Response nicht bei allen Patienten mit HER2/neu exprimierenden Tumoren erreicht werden. Vom klinischen Standpunkt aus rechtfertigt dies die Entwicklung von alternativen, eventuell sogar effektiveren Methoden, wie z.B. die in dieser Arbeit beschriebene Immuntherapie. Zytotoxische T-Lymphozyten, wie die NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, die genetisch modifiziert wurden, um Antikörper-basierte Rezeptoren auf der Oberfläche zu exprimieren, repräsentieren eine zielgesteuerte Pharmakotherapie mit dem Potential zur verbesserten Tumorkontrastierung und einer erweiterten therapeutischen Effektivität [46;113]. Vom Standpunkt der diagnostischen Bildgebung aus können die hier präsentierten Ergebnisse als ein Proof-of-Concept für in vivo Monitoring von Immuntherapien mit MR-Bildgebung betrachtet und dafür verwendet werden, andere Typen von genetisch entwickelten Zellen genauso zu markieren und mittels Bildgebung zu verfolgen.

Wie in unseren Ergebnissen gezeigt, führt das Labeling zu einer Kontrastmittelaufnahme nur in einem Bruchteil der inkubierten Zellen und variiert in der Effektivität von Zelle zu Zelle. Bei allen Versuchen dieser Arbeit konnte diese ungleiche Verteilung der Kontrastmittel in den Zellen beobachtet werden, so z.B. beim Labeling von hämatopoetischen Zellen, Tumor- und Stammzellen. Dieses Phänomen der von Zelle zu Zelle variierenden Markierungseffektivität wurde auch in anderen Studien bereits erkannt. Es kann sowohl auf die unterschiedliche metabolische Zellaktivität, verschiedene Phasen des Zellzyklus oder ein unterschiedliches Alter der Zellen als auch auf eine variierende Exposition der Zellen zu dem Kontrastmittel zurückzuführen sein [20;50].

---

Nach dem Markierungsverfahren entwickeln die einen Zellen Apoptose, während sich andere teilen. Die internalisierten Kontrastmittelpartikel werden teilweise metabolisiert, willkürlich zwischen sich teilenden Zellen verteilt oder bei sterbenden Zellen wieder freigesetzt [25]. Daraus wird ersichtlich, dass unsere Markierungsmethoden nur präzise Informationen im Hinblick auf das Homing der markierten Zellen im Zielgewebe liefern können. Etwaige Veränderungen der Signalintensität im MRT nach einigen Tagen könnten auf intrazelluläre Kontrastpartikel in Originalzellen und deren nachfolgenden Generationen, auf wieder freigesetzte Partikel oder auch auf Phagozytose von wieder freigesetzten Kontrastmitteln zurückzuführen sein.

Wir haben folgende potenzielle anwendungstechnische Grenzen unserer Methoden erkannt: Die Zellmarkierung mit MR-Kontrastmitteln weist eine bekannt begrenzte Sensitivität im Vergleich zu Zellmarkierungstechniken mit radioaktiven Markern auf, ist bei einigen Patienten kontraindiziert (künstliche Herzklappen, metallene Implantate) und bei vielen Instituten begrenzt verfügbar [1;29;62;68]. Die Sensitivität bei radioaktiven Bildgebungstechniken (PET, Szintigraphie, Autoradiographie) ist um 1000mal höher, dafür ist aber die räumliche Auflösung limitiert, der radioaktive Zerfall beschränkt Langzeit-Follow-Up-Studien und Zellen werden durch die Radiotoxizität ungünstig beeinflusst [1;29;62;68].

[<sup>18</sup>F]FDG-Versuche:

In dieser Studie wurden Zellen mit einem PET-Kontrastmittel erfolgreich markiert und konnten in der Autoradiographie nachgewiesen werden. Das Labeling von Stammzellen und T-Lymphozyten wurde bereits mit verschiedenen nuklearen Radionukliden wie <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc, <sup>125</sup>I und <sup>131</sup>I durchgeführt [4;5;21;35]. Die Pharmakokinetik des in dieser Arbeit verwendeten PET-Kontrastmittels [<sup>18</sup>F]FDG wurde bereits in der Forschung untersucht. [<sup>18</sup>F]FDG wird nicht zu Fruktose-6-P abgebaut, es verbleibt daher in der Zelle als [<sup>18</sup>F]FDG-6P. Dieses kann aber durch die Glukose-6-Phosphatase wieder zu [<sup>18</sup>F]FDG dephosphoryliert werden [100]. Die Markierung von verschiedenen

Zelllinien mit dem Agens [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wurde in der Literatur bereits beschrieben [11;32;63]. So wurde ein Inkubationsoptimum von 30 min, eine Retentionsstabilität der Markierung von 79% und keine Beeinträchtigung der Vitalität beschrieben [63]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls keine Minderung der Vitalität festgestellt und hohe Retentionsstabilitäten von 80% erzielt. Die höchste Kontrastmittelaufnahme erzielten wir hingegen bei einer Inkubationszeit von 60 min. Dies kann auf die Zusammensetzung des Inkubationsmediums, den Zelltyp oder labortechnische Besonderheiten zurückzuführen sein.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die NK-Zellen eine signifikante Menge an [ $^{18}\text{F}$ ]FDG aufnehmen, welche allerdings bei Inkubation länger als zwei Stunden nicht stabil in der Verbindung mit dem Kontrastmittel verbleiben, sondern die Radioaktivität wieder in das Inkubationsmedium zurückgeben. Diese metabolische Instabilität von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG wurde bereits in früheren Arbeiten bemerkt [34;63].

Nach dem Labeling zeigten die mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG markierten NK-Zellen keine signifikante Beeinträchtigung der Vitalität. Diese waren fähig, in das Tumorgewebe zu wandern und sich gezielt in diesem anzureichern. Die Ergebnisse werden durch frühere Untersuchungen an nicht behandelten T-Lymphozyten bestätigt [46;113]. In weiteren Studien wurde aufgezeigt, dass die Fähigkeit der T-Lymphozyten, Tumorzellen zu lysieren und zu proliferieren, durch die Markierung nicht signifikant beeinträchtigt war [11].

Die in dieser Arbeit erzielte durchschnittliche Effizienz der Markierungsmethode von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG war hoch und vergleichbar zu den Werten anderer Forschungsgruppen (64%, [11]). In dieser Arbeit wurde erstmals in der Literatur der Einsatz von Humaninsulin zur Steigerung der Markierungseffizienz untersucht. Wie in den Ergebnissen zu sehen, konnte die Effizienz dadurch signifikant gesteigert werden.

#### Eisenoxid-Versuche:

Unter allen untersuchten Markierungsmethoden war die Elektroporation diejenige, die die Zellvitalität am meisten beeinträchtigte. Das Problem des verwendeten Elektroporator war, dass dieser von verschiedenen Programmen

---

gesteuert wird, welche dem Untersucher nicht erlauben, die Parameter Frequenz, Zeit und Pulstyp einzustellen. Es konnten nur relative Veränderungen der Dauer und der verwendeten Energie zwischen verschiedenen Systemprogrammen erfasst werden; wir hatten keinen Zugriff auf die absoluten Werte, da die herstellende Firma diese als intellektuelles Eigentum deklarierte. Bessere Resultate können eventuell mit anderen Elektroporatorprogrammen, die eine individuellere Einstellung und Optimierung der angewandten Pulsfrequenzen erlauben, erzielt werden.

Die auf Grund einer Akkumulation von mit Eisenoxid markierten Zellen beobachtete Veränderung der Signalintensitäten von Tumor-, Leber- und Milzgewebe ist nicht nur durch die Quantität der Zellen, sondern auch durch die Kompartimentalisierung des Kontrastmittels in der Zelle und der Verteilung der Zellen im Zielgewebe zu erklären. Daher ist die Relation von Veränderungen der Signalintensität im Gewebe und der Anzahl der akkumulierten Zellen nicht linear. Deswegen konnte auch die Anzahl der Zellen, die sich im Tumorgewebe anreicherten, anhand unserer Ergebnisse nicht berechnet werden. Weiterführende Studien könnten diese Frage durch Berechnung von R2-Relaxationszeiten des Tumorgewebes vor und nach Injektion der markierten Zellen klären, da die R2-Relaxationsrate linear mit der Kontrastmittelkonzentration im Zielgewebe korreliert.

Bis fünf Tage nach dem Markierungsprozess zeigten die mit Eisenoxid markierten NK-Zellen keine Beeinträchtigung der Vitalität. Zudem waren die Zellen in der Lage, in das Tumorgewebe zu wandern. Diese Fähigkeit der spezifischen Tumorakkumulation der Zellen wurde durch die Markierung nicht beeinträchtigt und erfolgte identisch zu nicht-markierten Zellen [46;113]. In dieser Arbeit wurden keine zusätzlichen Untersuchungen in Bezug auf die Zellfunktionen vor und nach dem Markierungsverfahren unternommen. In früheren Studien wurde berichtet, dass die Funktion von hämatopoetischen Zellen nicht durch Eisenoxidmarkierungen beeinträchtigt wurde [3;16;24;54;67;68;98;117;131]. Die Fähigkeit der Zellen zur Migration war – wie in unseren Ergebnissen zu sehen – nicht eingeschränkt; ansonsten hätten diese nicht in dem Tumorgewebe akkumulieren können. Weitere Studien

---

müssen etwaige Beeinträchtigungen der Zellen in ihrer Fähigkeit, Tumorzellen zu lysieren, untersuchen.

Bei den Versuchen mit MR-Kontrastmitteln zeigten die Zellen eine für mindestens fünf Tage persistierende und auch im MRT nachweisbare Markierung. Weitere Follow-up Studien werden in Zukunft die langfristige Pharmakokinetik der internalisierenden Eisenoxide untersuchen. Hier ist zu erwarten, dass der Metabolismus der Eisenoxide in T-Lymphozyten analog zu der gut dokumentierten Pharmakokinetik der gleichen Eisenoxidverbindungen nach intravenöser Gabe erfolgt. Der Dextranmantel wird von Dextranase in der Zelle abgebaut und über die Nieren eliminiert, wobei die Eisenmoleküle dem normalen Eisenmetabolismus, z.B. zur Hämsynthese oder zur Speicherung in der Leber, zugeführt werden [122;123]. Von Interesse ist, dass Ferucarbotran ein exzellentes Sicherheitsprofil in Phase I-III Studien zeigte [87;122].

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass humane NK-Zellen mit MR- und PET-Kontrastmitteln markiert werden können und dass die in vivo Distribution dieser markierten Zellen nichtinvasiv mit einem klinischen 1,5 Tesla MR-Tomographen bildlich dargestellt bzw. durch Autoradiographie analysiert werden kann. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden der Bildgebung von NK-Zellen dürfte das Verständnis von Immuntherapien verbessern. Sie wird klinisch verwendet werden, um Migration und Homing der NK-Zellen in humanen Tumoren zu verfolgen.

## 6 Zusammenfassung

**Ziel:** Nachweis der Akkumulation von intravenös injizierten, Eisenoxid- oder [ $^{18}\text{F}$ ]FDG markierten zytotoxischen T-Lymphozyten (NK-92) in HER2/neu positiven NIH3T3 Tumoren mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und Autoradiographie.

**Material und Methoden:** NK-92-Zellen, die nicht gegen HER2/neu gerichtet sind, und genetisch modifizierte NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, die einen für das HER2/neu Antigen spezifischen chimären Antigenrezeptor exprimieren, wurden mit Ferucarbotran oder mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG markiert. Die Effektivität der Markierung wurde mittels Bildgebung, Berliner-Blau Färbung und Spektrometrie bewertet und optimiert.

Fünfzehn Balb/c-Mäusen wurden HER2/neu positive NIH-3T3 Tumore subkutan in die rechte Milchleiste implantiert. Als die Tumore einen Durchmesser von etwa 1 cm erreicht hatten, wurden sechs Mäusen jeweils  $5 \times 10^6$  Ferucarbotran-markierte NK-92-Zellen (n=3) oder NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen (n=3) intravenös injiziert. Die Tumor-Akkumulation dieser Zellen wurde an einem klinischen 1.5 T MRT-Scanner mit T1- und T2\*-FFE-Sequenzen vor, 12 und 24h nach Zellinjektion (p.i.) untersucht. Zusätzlich wurden neun Mäusen  $5 \times 10^6$  [ $^{18}\text{F}$ ]FDG markierte NK-92-Zellen (n=2) oder NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen (n=7) injiziert. Die Tumor-Akkumulation der [ $^{18}\text{F}$ ]FDG markierten Zellen wurde mittels Autoradiographie ex vivo 1h und 2h p.i. dokumentiert. Alle Ergebnisse wurden mit Histopathologien der Tumoren verglichen.

**Ergebnisse:** Nach Injektion der NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, die gegen das HER2/neu Antigen gerichtet sind, zeigte die MRT einen progressiven, ausgeprägten Signalabfall und die Autoradiographie einen deutlich erhöhten [ $^{18}\text{F}$ ]FDG Tracer Uptake in den HER2/neu positiven Tumoren. Dagegen verursachte eine Injektion der NK-92-Kontrollzellen, die nicht gegen das HER2/neu Antigen gerichtet sind, keine Veränderung der MRT-Signalintensität

und keinen nachweisbaren [<sup>18</sup>F]FDG Uptake des Tumorgewebes. Die Anti-CD57-Immunhistochemie bestätigte eine Akkumulation der NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen, aber keine Akkumulation der NK-92-Zellen im Tumorgewebe.

**Schlussfolgerung:** NK-92-Zellen können effizient mit klinisch zugelassenen Eisenoxiden und radioaktiven Tracern markiert werden. Die Akkumulation dieser markierten Zellen in Tumoren kann mittels Bildgebung nachgewiesen werden. Die hier vorgestellten Techniken wären klinisch anwendbar und könnten verwendet werden, um NK-zellbasierte Immuntherapien bei entsprechenden Patienten nichtinvasiv mit bildgebenden Methoden zu dokumentieren und zu kontrollieren.

---

## 7 Summary

**Purpose:** Monitoring of the accumulation of intravenously injected, iron-oxide or [ $^{18}\text{F}$ ]FDG labeled human natural killer (NK) cell line NK-92 in HER2/neu positive NIH3T3 tumors with magnetic resonance (MR) imaging and autoradiography.

**Materials and methods:** NK-92 cells, not directed against HER2/neu receptors, and genetically modified NK-92-scFv(FRP5)-zeta cells, expressing a chimeric antigen receptor specific to the tumor-associated HER2/neu antigen, were labeled with Ferucarbotran or [ $^{18}\text{F}$ ]FDG. Labeling efficiency was evaluated and optimized by imaging, prussian blue stains and spectrometry.

HER2/neu positive NIH-3T3 mammary tumors were implanted in the mammary fat pad of fifteen Balb/c mice. When the size of the tumors was about 1cm in diameter,  $5 \times 10^6$  Ferucarbotran-labeled NK-92 cells (n=3) or NK-92-scFv(FRP5)-zeta cells (n=3) were intravenously injected into six mice. The accumulation of these cells was monitored by a clinical 1.5 T MR-scanner with T1- and T2\*-FFE-sequences before, 12 and 24h after cell injection (p.i.). In addition  $5 \times 10^6$  [ $^{18}\text{F}$ ]FDG labeled NK-92 cells (n=2) or NK-92-scFv(FRP5)-zeta cells (n=7) were intravenously injected into nine mice. The accumulation of the [ $^{18}\text{F}$ ]FDG labeled cells was monitored by autoradiography ex vivo 1h and 2h after cell injection. All data were correlated with histopathology.

**Results:** After injection of NK-92-scFv(FRP5)-zeta cells, directed against HER2/neu antigen, MR showed a progressive signal decline and Autoradiography showed a significantly increased [ $^{18}\text{F}$ ]FDG tracer uptake in HER2/neu-positive tumors. Conversely, injection of NK-92 control cells, not directed against HER2/neu antigen, did not cause significant MR-signal intensity changes and did not cause increased [ $^{18}\text{F}$ ]FDG uptake of the tumor tissue. Anti-CD57 immunohistochemistry stains confirmed an accumulation of the NK-92-scFv(FRP5)-zeta cells, but not of NK-92 cells in the tumor tissue.

**Conclusion:** The human natural killer cell line NK-92 can be efficiently labeled

with clinically applicable iron-oxide and nuclear contrast agents. The accumulation of these labeled cells in tumors can be monitored. The presented cell tracking techniques may be applied to document and monitor NK-cell based immunotherapies in corresponding patients non-invasively.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Adonai N, Nguyen KN, Walsh J, Iyer M, Toyokuni T, Phelps ME, McCarthy T, McCarthy DW, Gambhir SS. Ex vivo cell labeling with  $^{64}\text{Cu}$ -pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (2002) 3030-3035
2. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Ecker T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation*. 107 (2003) 2134-2139
3. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation*. 76 (2003) 1123-1130
4. Bai J, Ding W, Yu M, Du J, Liu Z, Jia B, Li L, Shen L, Tian J, Wang F. Radionuclide imaging of mesenchymal stem cells transplanted into spinal cord. *Neuroreport*. 15 (2004) 1117-1120
5. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 108 (2003) 863-868
6. Bellin MF, Zaim S, Auberton E, Sarfati G, Duron JJ, Khayat D, Grellet J. Liver metastases: safety and efficacy of detection with superparamagnetic iron oxide in MR imaging. *Radiology*. 193 (1994) 657-663
7. Bhorade R, Weissleder R, Nakakoshi T, Moore A, Tung CH. Macrocyclic chelators with paramagnetic cations are internalized into mammalian cells via a HIV-tat derived membrane translocation peptide. *Bioconjug Chem*. 11 (2000) 301-305
8. Blocklet D, Toungouz M, Kiss R, Lambermont M, Velu T, Duriau D, Goldman M, Goldman S.  $^{111}\text{In}$ -oxine and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO labelling of antigen-loaded dendritic cells: in vivo imaging and influence on motility and actin content. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 30 (2003) 440-447
9. Bloembergen N. Proton relaxation times in paramagnetic solutions. *J*

- Chem Phys.* 27 (2006) 572
10. Böcker W DHHP. "Pathologie" *Urban & Fischer*, München, Jena, 2004, 2. Auflage
  11. Botti C, Negri DR, Seregni E, Ramakrishna V, Arienti F, Maffioli L, Lombardo C, Bogni A, Pascali C, Crippa F, Massaron S, Remonti F, Nerini-Molteni S, Canevari S, Bombardieri E. Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes. *Eur J Nucl Med.* 24 (1997) 497-504
  12. Brasch RC, Weinmann HJ, Wesbey GE. Contrast-enhanced NMR imaging: animal studies using gadolinium-DTPA complex. *AJR Am J Roentgenol.* 142 (1984) 625-630
  13. Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol.* 27 (1999) 1113-1123
  14. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (2003) 645-650
  15. Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Lewis BK, van Gelderen P, Zywicke H, Duncan ID, Frank JA. Monitoring stem cell therapy in vivo using magnetodendrimers as a new class of cellular MR contrast agents. *Acad Radiol.* 9 Suppl 2 (2002) S332-S335
  16. Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol.* 19 (2001) 1141-1147
  17. Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, Herynek V, Jordan EK, Duncan ID, Frank JA. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (1999) 15256-15261
  18. Chambon C, Clement O, Le Blanche A, Schouman-Claeys E, Frija G. Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence. *Magn Reson Imaging.* 11 (1993) 509-519
  19. Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques.* 6 (1988) 632-638
  20. Chen R, Greene EL, Collinsworth G, Grewal JS, Houghton O, Zeng H, Garnovskaya M, Paul RV, Raymond JR. Enrichment of transiently transfected mesangial cells by cell sorting after cotransfection with GFP. *Am J*

- Physiol.* 276 (1999) F777-F785
21. Chin BB, Nakamoto Y, Bulte JW, Pittenger MF, Wahl R, Kraitchman DL. <sup>111</sup>In oxine labelled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. *Nucl Med Commun.* 24 (2003) 1149-1154
  22. Cooper DD, Spangrude GJ. (R)evolutionary considerations in hematopoietic development. *Ann N Y Acad Sci.* 872 (1999) 83-93
  23. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Metz S, Piontek G, Pichler B, Settles M, Heinzmann U, Schlegel J, Oostendorp RA, Rummeny EJ. Cell tracking with gadophrin-2: a bifunctional contrast agent for MR imaging, optical imaging, and fluorescence microscopy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 31 (2004) 1312-1321
  24. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, Settles M, Piontek G, Metz S, Rosenbrock H, Keller U, Heinzmann U, Rummeny EJ, Schlegel J, Link TM. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology.* 228 (2003) 760-767
  25. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Piontek G, Metz S, Brauer R, Debus G, Corot C, Schlegel J, Link TM, Peschel C, Rummeny EJ, Oostendorp RA. Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment. *Radiology.* 234 (2005) 197-205
  26. Dale GL. Platelet kinetics. *Curr Opin Hematol.* 4 (1997) 330-334
  27. Earls JP, Bluemke DA. New MR imaging contrast agents. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 7 (1999) 255-273
  28. Eaton DL, de Sauvage FJ. Thrombopoietin and the humoral regulation of thrombocytopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2 (1995) 167-171
  29. Fawwaz RA, Oluwole S, Wang TS, Kuromoto N, Iga C, Hardy MA, Alderson PO. Biodistribution of radiolabeled lymphocytes. *Radiology.* 155 (1985) 483-486
  30. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84 (1987) 7413-7417
  31. Fliedner TM, Nothdurft W, Calvo W. Das Stammzellsystem der Hämatopoese: Physiologische und pathophysiologische Grundlagen. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 74 (1990) 1-18
  32. Forstrom LA, Mullan BP, Hung JC, Lowe VJ, Thorson LM. <sup>18</sup>F-FDG labelling of human leukocytes. *Nucl Med Commun.* 21 (2000) 691-694

33. Frimberger AE, Mcauliffe CI, Werme KA, Tuft RA, Fogarty KE, Benoit BO, Dooner MS, Quesenberry PJ. The fleet feet of haematopoietic stem cells: rapid motility, interaction and proteopodia. *Br J Haematol.* 112 (2001) 644-654
34. Gallagher BM, Fowler JS, Gutterson NI, MacGregor RR, Wan CN, Wolf AP. Metabolic trapping as a principle of oradiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [<sup>18</sup>F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J Nucl Med.* 19 (1978) 1154-1161
35. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 169 (2001) 12-20
36. Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia.* 8 (1994) 652-658
37. Hamacher K, Coenen HH, Stocklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med.* 27 (1986) 235-238
38. He W, Kabelitz D. Cytokines involved in intrathymic T cell development. *Int Arch Allergy Immunol.* 105 (1994) 203-210
39. Huber MM, Staubli AB, Kustedjo K, Gray MH, Shih J, Fraser SE, Jacobs RE, Meade TJ. Fluorescently detectable magnetic resonance imaging agents. *Bioconjug Chem.* 9 (1998) 242-249
40. Jackson Laboratory., 2000
41. Kanekal S, Sahai A, Jones RE, Brown D. Storage-phosphor autoradiography: a rapid and highly sensitive method for spatial imaging and quantitation of radioisotopes. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 33 (1995) 171-178
42. Kauffmann GW, Moser E, Sauer R. "Radiologie: Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin" *Urban und Schwarzenberg*, München, 1996, 153
43. Kempuraj D, Saito H, Kaneko A, Fukagawa K, Nakayama M, Toru H, Tomikawa M, Tachimoto H, Ebisawa M, Akasawa A, Miyagi T, Kimura H, Nakajima T, Tsuji K, Nakahata T. Characterization of mast cell-committed progenitors present in human umbilical cord blood. *Blood.* 93 (1999) 3338-3346
44. Kipps TJ. "Functions of B-lymphocytes and plasmacells in immunoglobulin production. Functions of T-lymphocytes: T-cell receptors for antigen. Functions of Natural Killer Cells" *Williams Hematology*, New York, 2000

- 
45. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res.* 77 (2000) 25-79
  46. Klingemann HG, Wong E, Maki G. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2 (1996) 68-75
  47. Kolb HJ, Holler E. Hematopoietic transplantation: state of the art. *Stem Cells.* 15 Suppl 1 (1997) 151-157
  48. Laboratoire Guerbet. "Endorem: Wissenschaftliche Informationen", 1995
  49. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant.* 14 Suppl 2 (1999) 22-28
  50. Lai JC, Yuan C, Thomas JL. Single-cell measurements of polyamidoamine dendrimer binding. *Ann Biomed Eng.* 30 (2002) 409-416
  51. Laniado M, Chachuat A. [The endorem tolerance profile]. *Radiologe.* 35 (1995) S266-S270
  52. Laniado M, Kopp AF. [Current status of the clinical development of MR contrast media]. *Rofo.* 167 (1997) 541-550
  53. Laubenberger T. Magnetresonanzverfahren. Technik der medizinischen Radiologie. Köln: Deutscher Ärzteverlag, 1990: 374-388.
  54. Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol.* 18 (2000) 410-414
  55. Liebich HG. "Funktionelle Histologie" *Schattauer*, Stuttgart, 1993, 114-125, 133-135, 199
  56. Lissner M SM. "Klinische Kernspintomographie" *Ferdinand Enke Verlag*, Stuttgart, 1990
  57. Löffler H RJ. "Atlas der klinischen Hämatologie" *Springer Verlag*, Berlin-Heidelberg-New York, 1999, 26-35
  58. Maasho K, Marusina A, Reynolds NM, Coligan JE, Borrego F. Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *J Immunol Methods.* 284 (2004) 133-140
  59. Mahmood U, Tung CH, Tang Y, Weissleder R. Feasibility of in vivo multichannel optical imaging of gene expression: experimental study in mice. *Radiology.* 224 (2002) 446-451
  60. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA

- transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86 (1989) 6077-6081
61. Maraninchi D, Vey N, Viens P, Stoppa AM, Archimbaud E, Attal M, Baume D, Bouabdallah R, Demeoq F, Fleury J, Michallet M, Olive D, Reiffers J, Sainty D, Tabilio A, Tiberghien P, Brandely M, Hercend T, Blaise D. A phase II study of interleukin-2 in 49 patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 31 (1998) 343-349
  62. Melder RJ, Brownell AL, Shoup TM, Brownell GL, Jain RK. Imaging of activated natural killer cells in mice by positron emission tomography: preferential uptake in tumors. *Cancer Res*. 53 (1993) 5867-5871
  63. Melder RJ, Elmaleh D, Brownell AL, Brownell GL, Jain RK. A method for labeling cells for positron emission tomography (PET) studies. *J Immunol Methods*. 175 (1994) 79-87
  64. Metcalf D. Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular, and clinical aspects. *Science*. 254 (1991) 529-533
  65. Metcalf D. The molecular control of granulocytes and macrophages. *Ciba Found Symp*. 204 (1997) 40-50
  66. Metcalf D. The molecular control of hematopoiesis: progress and problems with gene manipulation. *Stem Cells*. 16 (1998) 314-321
  67. Metz S, Bonaterra G, Rudelius M, Settles M, Rummeny EJ, Daldrup-Link HE. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol*. 14 (2004) 1851-1858
  68. Moore A, Grimm J, Han B, Santamaria P. Tracking the recruitment of diabetogenic CD8+ T-cells to the pancreas in real time. *Diabetes*. 53 (2004) 1459-1466
  69. Moore SG, Dawson KL. Red and yellow marrow in the femur: age-related changes in appearance at MR imaging. *Radiology*. 175 (1990) 219-223
  70. Mori K, Hamaoka T. [Imaging plate-autoradiography system (BAS)]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 39 (1994) 1877-1887
  71. Mori K, Hamaoka T. [Imaging plate-autoradiography system (BAS)]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 39 (1994) 1877-1887
  72. Mori K, Hamaoka T. [Imaging plate-autoradiography system (BAS)]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 39 (1994) 1877-1887
  73. Mourino MR. From Thales to Lauterbur, or from the lodestone to MR imaging: magnetism and medicine. *Radiology*. 180 (1991) 593-612
  74. Mulatero CW, Penson RT, Papamichael D, Gower NH, Evans M, Rudd RM. A phase II study of combined intravenous and subcutaneous inter-

- leukin-2 in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 31 (2001) 67-72
75. Murphy BW, Carson PL, Ellis JH, Zhang YT, Hyde RJ, Chenevert TL. Signal-to-noise measures for magnetic resonance imagers. *Magn Reson Imaging*. 11 (1993) 425-428
76. Nagayama H, Takahashi S, Takahashi T, Ogami K, Ikebuchi K, Tojo A, Tani K, Asano S. IL-2/LAK therapy for refractory acute monoblastic leukemia relapsing after unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 23 (1999) 183-185
77. Nerl C. Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems. In: Begemann H RJ, editor. Klinische Hämatologie. Stuttgart-New York: Thieme-Verlag, 1995.
78. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 19 (2000) 3159-3167
79. Oostendorp RA, Ghaffari S, Eaves CJ. Kinetics of in vivo homing and recruitment into cycle of hematopoietic cells are organ-specific but CD44-independent. *Bone Marrow Transplant*. 26 (2000) 559-566
80. Ostertag H. "PET Instrumentation" *EANM Congress*, Wien, 1991
81. Petersein J, Saini S, Weissleder R. Liver. II: Iron oxide-based reticuloendothelial contrast agents for MR imaging. Clinical review. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 4 (1996) 53-60
82. Phelps ME, Mazziotta JC, Kuhl DE, Nuwer M, Packwood J, Metter J, Engel J, Jr. Tomographic mapping of human cerebral metabolism visual stimulation and deprivation. *Neurology*. 31 (1981) 517-529
83. Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, Ivanova N, Mahan MA, Deanehan JK, Moore KA, Overton GC, Lemischka IR. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science*. 288 (2000) 1635-1640
84. Quesenberry PJ, Stewart FM, Zhong S, Habibian H, McAuliffe C, Reilly J, Carlson J, Dooner M, Nilsson S, Peters S, Stein G, Stein J, Emmons R, Benoit B, Bertoncello I, Becker P. Lymphohematopoietic stem cell engraftment. *Ann N Y Acad Sci*. 872 (1999) 40-45
85. Quesenberry PJ, Stewart MF, Peters S, Nilsson S, Ramshaw H, Rao S, Tiarks C, Zhong S, Frimberger A, Reilly J. Engraftment of hematopoietic stem cells in nonmyeloablated and myeloablated hosts. *Stem Cells*. 15 Suppl 1 (1997) 167-169
86. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 19 (2001) 291-330

87. Reimer P, Balzer T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol.* 13 (2003) 1266-1276
88. Reiser M SW. "Magnetresonanztomographie" *Springer Verlag*, Berlin, 1997, 15, 108-109
89. Richard P MJ. "The Radiologic clinics of North America", 1993
90. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 353 (2005) 1673-1684
91. Rudelius M, Daldrup-Link HE, Heinzmann U, Piontek G, Settles M, Link TM, Schlegel J. Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 30 (2003) 1038-1044
92. Rummeny EJ, Reimer P, Heindl W. "Ganzkörper-Tomographie" *Thieme*, Stuttgart, 2002, 27-35, 207-210, 295-296, 476
93. Saini S, Stark DD, Hahn PF, Wittenberg J, Brady TJ, Ferrucci JT, Jr. Ferri-rite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology.* 162 (1987) 211-216
94. Schering AG. "Eigenschaften von Resovist", 2005
95. Schoepf U, Marecos EM, Melder RJ, Jain RK, Weissleder R. Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *Biotechniques.* 24 (1998) 642-651
96. Shepard JL, Zon LI. Developmental derivation of embryonic and adult macrophages. *Curr Opin Hematol.* 7 (2000) 3-8
97. Shields AF, Mankoff DA, Link JM, Graham MM, Eary JF, Kozawa SM, Zheng M, Lewellen B, Lewellen TK, Grierson JR, Krohn KA. Carbon-11-thymidine and FDG to measure therapy response. *J Nucl Med.* 39 (1998) 1757-1762
98. Smirnov P, Gazeau F, Lewin M, Bacri JC, Siauve N, Vayssettes C, Cuenod CA, Clement O. In vivo cellular imaging of magnetically labeled hybridomas in the spleen with a 1.5-T clinical MRI system. *Magn Reson Med.* 52 (2004) 73-79
99. Smith SR, Williams CE, Davies JM, Edwards RH. Bone marrow disorders: characterization with quantitative MR imaging. *Radiology.* 172

- (1989) 805-810
100. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem.* 28 (1977) 897-916
  101. Solomon I. Relaxation processes in a system of two spins. *Physiol Rev.* 99 (1955) 559
  102. Solon EG, Kraus L. Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry. Survey results on study design, methods, and regulatory compliance. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 46 (2001) 73-81
  103. Solon EG, Lee F. Methods determining phosphor imaging limits of quantitation in whole-body autoradiography rodent tissue distribution studies affect predictions of <sup>14</sup>C human dosimetry. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 46 (2001) 83-91
  104. Spangrude GJ. Characteristics of the hematopoietic stem cell compartment in adult mice. *Int J Cell Cloning.* 10 (1992) 277-285
  105. Spangrude GJ. Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Med.* 45 (1994) 93-104
  106. Spangrude GJ, Smith L, Uchida N, Ikuta K, Heimfeld S, Friedman J, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem cells. *Blood.* 78 (1991) 1395-1402
  107. Stark D, William G, Bradley JR. "Magnetic Resonance Imaging", 2006, 372
  108. Stöcklin G PV. "Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography" *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 1993, 24ff
  109. Tam YK, Miyagawa B, Ho VC, Klingemann HG. Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92. *J Hematother.* 8 (1999) 281-290
  110. Thomas TE, Abraham SJ, Otter AJ, Blackmore EW, Lansdorp PM. High gradient magnetic separation of cells on the basis of expression levels of cell surface antigens. *J Immunol Methods.* 154 (1992) 245-252
  111. Thurn P, Bücheler E, Lackner KJ, Thelen M. "Einführung in die radiologische Diagnostik" *Thieme*, Stuttgart, 1998, 10. Auflage, 25-48
  112. Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res.* 10 (2001) 535-544

- 
113. Uherek C, Groner B, Wels W. Chimeric antigen receptors for the retargeting of cytotoxic effector cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 10 (2001) 523-534
  114. Uherek C, Tonn T, Uherek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann HG, Wels W. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood.* 100 (2002) 1265-1273
  115. ULLBERG S. Studies on the distribution and fate of S35-labelled benzylpenicillin in the body. *Acta Radiol.* 118 (1954) 1-110
  116. van de Berg BC, Lecouvet FE, Michaux L, Labaisse M, Malghem J, Jamart J, Maldague BE, Ferrant A, Michaux JL. Stage I multiple myeloma: value of MR imaging of the bone marrow in the determination of prognosis. *Radiology.* 201 (1996) 243-246
  117. van den Bos EJ, Wagner A, Mahrholdt H, Thompson RB, Morimoto Y, Sutton BS, Judd RM, Taylor DA. Improved efficacy of stem cell labeling for magnetic resonance imaging studies by the use of cationic liposomes. *Cell Transplant.* 12 (2003) 743-756
  118. Vande Berg BC, Lecouvet FE, Kanku JP, Jamart J, Van Beers BE, Maldague B, Malghem J. Ferumoxides-enhanced quantitative magnetic resonance imaging of the normal and abnormal bone marrow: preliminary assessment. *J Magn Reson Imaging.* 9 (1999) 322-328
  119. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 20 (2002) 719-726
  120. Vogl TJ, Hammerstingl R, Pegios W, Hamm B, Eibl-Eibesfeldt A, Woessner B, Lissner J, Felix R. [The value of the liver-specific superparamagnetic contrast medium AMI-25 for the detection and differential diagnosis of primary liver tumors versus metastases]. *Rofo.* 160 (1994) 319-328
  121. Vogl TJ, Hammerstingl R, Schwarz W, Mack MG, Muller PK, Pegios W, Keck H, Eibl-Eibesfeldt A, Hoelzl J, Woessner B, Bergman C, Felix R. Superparamagnetic iron oxide-enhanced versus gadolinium-enhanced MR imaging for differential diagnosis of focal liver lesions. *Radiology.* 198 (1996) 881-887
  122. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol.* 11 (2001) 2319-2331

- 
123. Weissleder R. Liver MR imaging with iron oxides: toward consensus and clinical practice. *Radiology*. 193 (1994) 593-595
  124. Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A, Jr. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging*. 7 (1997) 258-263
  125. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology*. 175 (1990) 489-493
  126. Whiteside TL. Immune cells in the tumor microenvironment - Mechanisms responsible for functional and signaling defects. *Gene Therapy of Cancer*. 451 (1998) 167-171
  127. Wienhard K WRHW. "Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie" *Springer-Verlag*, Berlin, 1989
  128. Winkelstein A, Sacher R, Kaplan S, Roberts G. "White Cell Manual" *F.A. Davis Company*, Philadelphia, 1998
  129. Wolff SD, Balaban RS. Assessing contrast on MR images. *Radiology*. 202 (1997) 25-29
  130. Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, O'Reilly RJ. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res*. 4 (1998) 2859-2868
  131. Yeh TC, Zhang W, Ildstad ST, Ho C. In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med*. 33 (1995) 200-208
  132. Yoder MC. Embryonic hematopoiesis in mice and humans. *Acta Paediatr Suppl*. 91 (2002) 5-8

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Drei-Kompartimentmodell nach Sokoloff et al [100] zur Berechnung des regionalen Glukosestoffwechsels. Die Transportkonstante $k_4$ entspricht der Rückreaktion zu FDG und kann innerhalb der ersten 60 min vernachlässigt werden. ....	14
Abbildung 2: Formel von Solomon und Bloembergen zur mathematischen Erklärung dipolarer und scalarer Interaktionen zwischen ungepaarten Elektronen und Protonen [107]. ....	19
Abbildung 3: Dipol-Dipol Relaxationsraten $1/T_1$ (links) und $1/T_2$ (rechts), wie von der Solomon-Bloembergen Theorie berechnet [107]. ....	19
Abbildung 4: Magnetische Suszeptibilität: Vergleich von paramagnetischen, ferromagnetischen und superparamagnetischen Kontrastmitteln [107]. ....	20
Abbildung 5: Kristallstruktur von Endorem® ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) [48;107] .....	23
Abbildung 6: Knochenmark: Elemente der effektiven blutzellbildenden Systeme [31] .....	30
Abbildung 7: Beziehung zwischen den Blutzellen der verschiedenen Linien [10] .....	31
Abbildung 8: NK-Zellvermittelte Zytotoxizität [10] .....	34
Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise bei Exposition und Scannen der Schnitte [70] .....	48
Abbildung 10: Vergleich der Counts per minute (CPM) von $16 \times 100.000$ mit $^{18}\text{F}$ FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Aktivität und Inkubationszeit .....	57
Abbildung 11: Vergleich der Counts per minute (CPM) von $64 \times 100.000$ mit	

---

[18F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Aktivität und Inkubationszeit, ohne Zugabe von Insulin .....	58
Abbildung 12: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 64 x 100.000 mit [18F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Aktivität und Inkubationszeit, mit Zugabe von 10 µL/mL Insulin.....	59
Abbildung 13: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 22 x 100.000 mit [18F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von 0,384 MBq .....	59
Abbildung 14: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 22 x 100.000 mit [18F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von 3,68 MBq .....	60
Abbildung 15: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 62 x 100.000 mit [18F]FDG gelabelten Stammzellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von 30 MBq .....	60
Abbildung 16: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 22 x 100.000 mit [18F]FDG gelabelten NK-Zellen unter Variation der Inkubationszeit, bei Verwendung von 10 µL/mL Insulin und einer Aktivität von 0,37 MBq bzw. 3,4 MBq [18F]FDG .....	61
Abbildung 17: Vergleich der Counts per minute (CPM) von 22 x 100.000 mit [18F]FDG gelabelten NK-Zellen unter Variation der Inkubationszeit und Konzentration von Insulin bei einer Aktivität von 0,34 MBq ..	62
Abbildung 18: Ausschnittvergrößerungen aus Autoradiogrammen von verschiedenen Organen einer Maus mit einem HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor nach i.v.-Applikation von mit [18F]FDG markierten, <u>nicht gegen HER2/neu gerichteten</u> NK-Zellen.....	63
Abbildung 19: Ausschnittvergrößerungen aus Autoradiogrammen von verschiedenen Organen einer Maus mit einem HER2/neu+ NIH-	

---

3T3 Tumor nach i.v.-Applikation von mit [18F]FDG markierten, <u>gegen HER2/neu gerichteten</u> NK-92-Zellen. ....	63
Abbildung 20: Vergleich der Aufnahme von Radioaktivität in ausgewählten Organen. Es werden zwei Studien mit jeweils HER2/neu+ NIH- 3T3 Tumoren tragenden Mäusen nach Injektion der einerseits nicht-spezifischen, nicht gegen HER2/neu gerichteten und andererseits der spezifischen, gegen HER2/neu gerichteten mit [18F]FDG gelabelten NK-92-Zellen verglichen. ....	64
Abbildung 21: Quotient aus der Aufnahme von Radioaktivität des Tumorgewebes (TU) im Verhältnis zu ausgewählten Organen. Es werden zwei Studien mit jeweils HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren tragenden Mäusen nach Injektion der einerseits nicht- spezifischen, nicht gegen HER2/neu gerichteten und andererseits der spezifischen, gegen HER2/neu gerichteten mit [18F]FDG gelabelten NK-92-Zellen verglichen. ....	65
Abbildung 22: MR-Bildgebung von zentrifugierten NK-92-Zellpellets in Tubes. Elektroporation und Transfektion mit Eisenoxidhaltigen Kontrastmitteln führt zu einem starken T2-Effekt bei den zu untersuchenden Zellen. ....	66
Abbildung 23: Elektroporation von NK-92-Zellen mit Ferucarbotran zeigt eine limitierte Kontrastmittelaufnahme und eine Verminderung der Zellvitalität. ....	67
Abbildung 24: Transfektion mit Ferucarbotran führt zu einer hoch effizienten zellulären Eisen-Aufnahme, daraus folgenden deutlichen T2-Effekt der markierten Zellen bei erhaltener Zellvitalität. ....	67
Abbildung 25: Follow-up MR-Bildgebung nach Lipofektion von NK-92-Zellen mit Ferucarbotran (100 µg Fe, 24 h) zeigt einen anhaltenden Effekt auf die markierten Zellen für 5 Tage. ....	69
Abbildung 26: T2*-gewichtete FFE MR-Bilder zeigen eine hohe Signalintensität der HER2/neu+ NIH-3T3 Tumore vor Zellinjektion (siehe Pfeile)	

und einen deutlichen Signalabfall 24 h nach Injektion von mit Ferucarbotran markierten anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen. (\* heat cushion). ..... 69

Abbildung 27: T2\*-gewichtete FFE MR-Bilder eines anderen HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor zeigen einen inhomogenen Abfall der Signalintensität nach Injektion von mit Ferucarbotran markierten anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen. Anscheinend weist dies auf eine fokale Zellakkumulation in dem Tumorgewebe hin. Die Milz zeigt ebenfalls einen Signalabfall, hervorgerufen durch nicht-selektive Akkumulation von einigen der injizierten Zellen in diesem Organ. Hingegen zeigt die Leber keinen Signalabfall nach Injektion der mit Eisenoxid markierten Zellen und schließt damit die Anwesenheit einer relevanten Menge von freiem Kontrastmittel in der injizierten Suspension aus..... 70

Abbildung 28: T2-gewichtete FFE MR-Bilder von HER2/neu+ NIH-3T3 Tumoren zeigen keine Veränderung der Signalintensität vor und nach Injektion der nicht-spezifischen, nicht gegen HER2/neu gerichteten NK-92-Zellen. Leber und Milz hingegen weisen einen Signalabfall auf. Dies indiziert eine nicht-spezifische Zellakkumulation in diesen Organen..... 71

Abbildung 29: Anti-CD57 immunhistochemische Färbungen, gerichtet gegen NK-Zellen. In Bild A ist ein HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor zu sehen, der 24 h nach Injektion von anti-HER2/neu NK-92-scFv(FRP5)-zeta-Zellen eine positive Akkumulation von verfärbten Zellen (einige markiert mit Pfeilen) im Tumorgewebe aufweist. In Bild B ist ein Kontrolltumor, ein HER2/neu+ NIH-3T3 Tumor, abgebildet, der 24 h nach Injektion von nicht gegen HER2/neu gerichteten NK-92-Zellen keine Zellakkumulation im Tumorgewebe erkennen lässt..... 72

---

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immuntherapie humaner Tumoren [24] .....	10
Tabelle 2: Eigenschaften der wichtigsten Positronenstrahler für die PET [80] .	11
Tabelle 3: Magnetisches Moment und Anzahl ungepaarter Elektronen von Metallionen [92] .....	21
Tabelle 4: Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Endorem®: a) pro Ampulle (8ml) und b) pro 100 ml [48] .....	25
Tabelle 5: Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Resovist® [94] .....	27
Tabelle 6: Übersicht über einige MR-Kontrastmittel .....	28
Tabelle 7: Anzahl eingesetzter Versuchstiere .....	43
Tabelle 8: Dosierung Anästhetikum.....	43
Tabelle 9: Dosierung Antagonist .....	44
Tabelle 10: Der zelluläre Eiseninhalt vor und nach dem Labeling mit Eisenoxidmarkierten Kontrastmitteln wird durch Spektrometrie bestimmt. Für jeden Labeling-Prozess werden die Ergebnisse der optimierten Protokolle mit der maximalen Eisenoxid-Aufnahme und minimal beeinträchtigter Zellvitalität aufgeführt.....	66

---

## 11 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
AR	Autoradiographie
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD-Chip	Charge Coupled Device Chip
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
d. h.	das heißt
Fa.	Firma
FDG	Fluor-Desoxy-Glukose
FFE	Fast Field Echo Sequence
g	Gramm
Gd-DTPA	Gadolinium-Diethylen-Triamin-Pentaacetic-Säure-Komplex
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCL	Chlorwasserstoff
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
keV	Kilo-Elektronvolt
kg	Kilogramm
LAK	lymphokinaktiver Killerzellen
Min.	Minute
mg	Milligramm

---

µg	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mOsm	Milliosmol
MRT	Magnetresonanztomographie
MR	Magnetresonanz-
ms	Millisekunden
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
n	Anzahl
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen, zytotoxische T-Killerzellen, zytotoxische T-Lymphozyten
p	Signifikanz
PBS	Phosphatpuffer (englisch: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PET	Positronenemissionstomographie
R1, R2	Relaxivität eines Kontrastmittels (mmol s) <sup>-1</sup>
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
Sek./s	Sekunde
SI	Signalintensität
SNR	Signal to Noise Ratio
SPIO	Superparamagnetische Eisenoxidkontrastmittel
Tab.	Tabelle
T1, T2*	Spinrelaxationszeiten
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
u.a.	unter anderem
USPIO	ultrakleine superparamagnetische Eisenoxidkontrastmittel
u. v. m.	und vieles mehr
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

---

## 12 Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: Meier Reinhard  
Geburtsdatum: 16.05.1978  
Geburtsort: Erlangen  
Email: reinhardt.meier@gmail.com  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

1988 - 1997 Max-Reger-Gymnasium, Amberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Wehrdienst:**

Juli 1997 - April 1998 Gebirgsmusikkorps 8, Garmisch-Partenkirchen

### **Studium der Wirtschaftswissenschaften:**

Okt. 1999 - Sept. 2000 VWA Stuttgart, Berufsakademie von DaimlerChrysler  
Sept. 2001 - Sept. 2003 Fernuniversität Hagen

Sept. - Dez. 1998 Praktikum, Restaurante la Virgen, Valencia, Spanien

Jan. - März 1999 Praktikum, Grammer AG, Puebla, Mexiko

Jan./Feb. 2000 Praktikum, DaimlerChrysler Vertrieb Global, Berlin

Aug./Sept. 2000 Praktikum, DaimlerChrysler Logistik, Gaggenau

März/April 2004 Praktikum, McKinsey&Company, München

September 2003 Vordiplom der Wirtschaftswissenschaften

**Studium der Medizin:**

Mai 2000 - April 2002	Ludwig-Maximilians-Universität, München
Mai 2002 - April 2006	Technische Universität, München
Sept. 2004 - Feb. 2005	Université de Nice Sophia-Antipolis, Frankreich
Feb./März 2001	Pflegepraktikum, Hôpital St. Roch, Nizza, Frankreich
Aug./Sept. 2002	Famulatur, Krankenhaus St. Marien, Amberg
Feb. - April 2003	Famulatur, Hospital Ipane, Rio de Janeiro, Brasilien
April 2005 - März 2006	Praktisches Jahr: Kardiologie, Université de Nice, Frankreich Radiologie, University California San Francisco, USA Chirurgie, Technische Universität, München
März 2002	Physikum
August 2003	1. Staatsexamen
März 2005	2. Staatsexamen
April 2006	3. Staatsexamen

**Veröffentlichungen:**

Daldrup-Link HE, **Meier R**, Rudelius M, Piontek G, Piert M, Metz S, Settles S, Uherek C, Schlegel J, Rummeny EJ: In-vivo Tracking of genetically engineered anti-HER2/neu directed Natural Killer Cells to HER2/neu positive Mammary Tumors with Magnetic Resonance Imaging. Eur Radiol 15(1): 4-13, 2005

**Meier R**, Daldrup-Link HE, Darge K, Rummeny EJ: Besonderheiten bei der MRT im Kindesalter. Der Radiologe, in press

**Meier R**, Piontek G, Piert M, Uherek C, Wels W, Rudelius M, Schlegel J, Rummeny EJ, Daldrup-Link HE: Nachweis der Akkumulation von intravenös injizierten, Eisenoxid- oder [<sup>18</sup>F]FDG markierten zytotoxischen T-Lymphozyten in HER2/neu+ NIH3T3 Tumoren mittels MRT und Autoradiographie. Deutscher Röntgenkongress 2006. Posterpreis: „summa cum laude“

---

## 13 Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Ernst J. Rummeny danke ich für die Übernahme der Arbeit an die radiologische Fakultät der Technischen Universität München.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Prof. Dr. med. Heike E. Daldrup-Link für die Überlassung des Themas, die freundliche Anleitung sowie für die vielen wertvollen Anregungen und die große Hilfestellung in fachlichen Fragen.

Frau Dr. med. Martina Rudelius und Herrn Guido Piontek danke ich für die Histopathologie und die motivierende Betreuung.

Herrn PD Dr. Morand Piert danke ich für die Betreuung der nuklearmedizinischen Versuche.

Frau PD Dr. Helga Bernhard und Frau Dr. Kerstin Holtz möchte ich für die Bereitstellung des NIH3T3 Tumors danken.

Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Erhardt und Frau Dr. Bettina Wagner möchte ich für die freundliche Betreuung in tiermedizinischen Fragen danken.

Herrn Dr. Oostendorp möchte ich für die Bereitstellung der Stammzelllinien und Herrn Dr. C. Uherek für die Bereitstellung der NK-97-Zellen danken.

Bei Annette und Ruth Steger bedanke ich mich für die Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Eltern und der ganzen Familie danke ich herzlich für die Geduld, die sie für meinen langen Ausbildungsweg aufgebracht haben, die großzügige Unterstützung und den jederzeit gewährten Rückhalt.