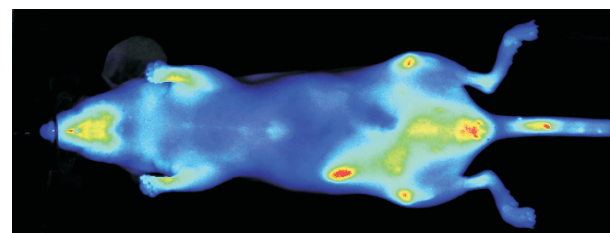
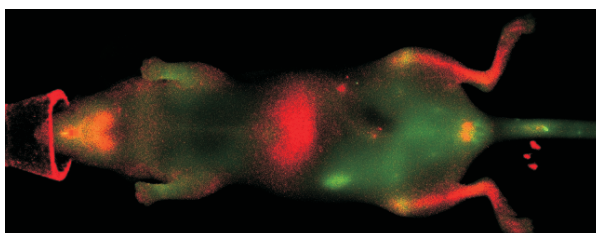
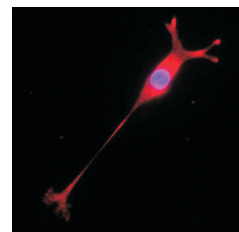
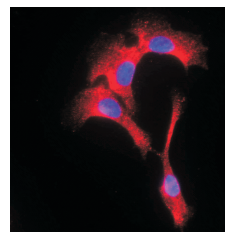
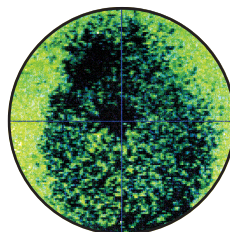
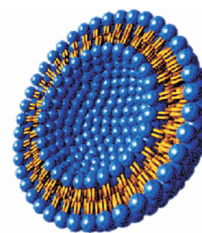


DISSERTATION

**MOLEKULARE BILDGEBUNG:
DIE DETEKTION VON TUMOREN ÜBER
NAHINFRAROT - SONDEN SOWIE
MAGNETISCHE LIPOSOMEN**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH - NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN - ALBRECHTS - UNIVERSITÄT ZU KIEL
VORGELEGT VON DIPLOM - PHARMAZEUTIN
MANUELA MEINCKE
KIEL, MAI 2009



Anatomisches Institut – Medizinische Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Molekulare Bildgebung:
Die Detektion von Tumoren über
Nahinfrarot-Sonden sowie magnetische Liposomen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von Diplom-Pharmazeutin
Manuela Meincke

Kiel, Mai 2009

Referent/in: Professor Dr. Rolf Mentlein
Korreferent/in: Professor Dr. Eric Beitz
Tag der Disputation: 06.07.2009
zum Druck genehmigt: 06.07.2009

Professor Dr. Lutz Kipp
(Dekan)

Per aspera ad astra

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Molekulare Bildgebung	3
1.1.1 Optische Bildgebung	5
1.1.2 Magnetresonanztomographie (MRT)	7
1.1.3 Computertomographie (CT)	10
1.1.4 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	11
1.1.5 Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT)	12
1.1.6 Sonographie	13
1.2 Detektion von Tumorzellen	14
1.2.1 Der epidermale Wachstumsfaktor und sein Rezeptor	15
1.2.2 Der Chemokinligand SDF-1 und seine Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7	17
1.2.3 Liposomen	20
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	25
2 Material	27
2.1 Chemikalien	27
2.2 Antikörper, DNA- und Proteinstandards, Enzyme und TaqMan-Primer	29
2.3 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel	31
2.4 Liposomen	32
2.5 Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenzfarbstoffe	33
2.5.1 Cyanin-Farbstoffe	33
2.5.2 IRDye 800CW	34
2.6 Verwendete kommerzielle Testsysteme	35
2.7 Nährmedien, Gebrauchs- und Pufferlösungen	36
2.7.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur	36
2.8 Verbrauchsmaterialien	40
2.9 Geräte	42

3 Methoden	43
3.1 Allgemeine Hinweise	43
3.2 Zellkultur	44
3.2.1 Verwendete Zelllinien	45
3.2.2 Kultivierung der Zellen	47
3.2.3 Subkultivierung der Zellen	48
3.2.4 Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zellen	49
3.2.5 Test auf Mykoplasmen	50
3.2.6 Zellzahlbestimmung in der NEUBAUER-Zählkammer	53
3.2.7 Beschichtung von Glasoberflächen für die Zellkultur	54
3.2.8 Test auf Toxizität und Proliferation	55
3.3 Methoden zur Genexpressionsanalyse	58
3.3.1 Quantitative <i>Real Time</i> rt-PCR	58
3.3.2 Isolierung von Proteinen	66
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und <i>Western Blot</i> Analyse	68
3.4 Immunzytochemische Färbungen	75
3.5 Kopplung von Antikörpern an Eisenoxid-Nanopartikel	77
3.6 <i>Dot-Spot</i> -Analyse	79
3.7 Ultrafiltration	80
3.8 Liposomen	82
3.8.1 Herstellung der Liposomen	82
3.8.2 Größenbestimmung über Photonen-Korrelation-Spektroskopie .	85
3.9 Photometrische Bestimmung des Eisengehaltes	87
3.10 Anfärbung intrazellulär aufgenommener Eisenoxid-Nanopartikel	88
3.11 Nachweis von Tumorzellen mittels Eisenoxid-Liposomen über MRT	89
3.11.1 Einbettung des Zellpellets in Polyacrylamid	90
3.11.2 Nachweis der Zellen auf Polyethylenterephthalat-Membranen . . .	90
3.12 Fluoreszenzmarkierung tumorspezifischer Liganden und Antikörper	91
3.12.1 Konjugation der Fluoreszenzfarbstoffe	93
3.12.2 Aufreinigung der Fluoreszenzkonjugate	95
3.13 In-vitro-Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen	99
3.14 Aktivitätsbestimmung der Dipeptidylpeptidase IV	101
3.15 Statistische Analyse	102
3.16 In-vivo-Versuchsreihe am murinen Tumormodell	102

4	Ergebnisse	105
4.1	Eignung Eisenoxid-beladener Liposomen für die molekulare Bildgebung	105
4.1.1	Größe und physikalische Stabilität der Liposomen	105
4.1.2	Bestimmung der unspezifischen Aufnahme von Eisenoxid-beladenen Liposomen in Gliomazellen	107
4.1.3	Einfluss des Polyethylenglykol (PEG)-Gehalts auf die unspezifische Aufnahme der Liposomen	109
4.1.4	Einfluss verschiedener Liposomen auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie U 343	110
4.1.5	Detektion von Tumorzellen über MRT	112
4.1.6	Visualisierung unterschiedlicher Zelllinien durch Eisenoxid-beladene Liposomen im MRT	114
4.1.7	Histochemische Anfärbung intrazellulären Eisenoxids	115
4.2	Optische Bildgebung mit Nahinfrarot (NIR)-Sonden	117
4.2.1	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Cy7 und IRDye 800 in Abhängigkeit ihrer Konzentration	117
4.2.2	Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800 . .	118
4.2.3	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Cy7 und IRDye 800 an der Gliomazelllinie A 764 in Abhängigkeit ihrer Konzentration . .	120
4.2.4	Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800 an der Gliomazelllinie A 764	121
4.2.5	Konjugation und Aufreinigung der Konjugate	122
4.2.6	Genexpressionsmuster tumorspezifischer Rezeptoren und deren Liganden in humanen Tumorzellen	124
4.2.7	Mikroskopische Fluoreszenzfärbungen über Cy3-Konjugate	126
4.2.8	Einfluss der Zellzahl auf die Markierungsintensität	129
4.2.9	Einfluss der Konzentration auf die Markierungsintensität	132
4.2.10	Einfluss der Inkubationszeit auf die Markierungsintensität	134
4.2.11	Spezifische Bindung und kompetitive Hemmung der Fluoreszenzkonjugate	136
4.2.12	Einfluss der Konjugate auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie A 764	138
4.2.13	Überprüfung selektiver Zellschädigung durch die Fluoreszenzkonjugate	139
4.2.14	Untersuchungen der durch NIR-Konjugate vermittelten Signaltransduktion	141

4.3	In-vivo-Versuchsreihe	145
4.3.1	In-vivo-Detektion von Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zeit	148
4.3.2	In-vivo-Detektion von Tumorzellen (MCF7) durch SDF-1 - IRDye 800 im Vergleich zu RGD-IRDye 680	150
4.3.3	In-vivo-Detektion von Tumorzellen (MCF7 und A764) durch SDF-1-IRDye 800 im Vergleich zu RGD-IRDye 680	152
5	Diskussion	155
5.1	Passives <i>Drug Targeting</i> mit Eisenoxid-beladenen Liposomen über MRT .	156
5.2	Zelluläre Aufnahme von Eisenoxid-beladenen Liposomen	160
5.3	Physiologische Verträglichkeit von Liposomen	161
5.4	Detektion von Tumorzellen über Magnetresonanz	162
5.5	Optische Bildgebung	163
5.6	Aktives <i>Targeting</i> über NIR-Sonden	166
5.7	Markierungsintensität in Abhängigkeit verschiedener Parameter	169
5.8	Biokompatibilität der NIR-Fluoreszenzsonden	172
5.9	Untersuchung der durch NIR-Konjugate vermittelten Signaltransduktion	173
5.10	In-vivo-Detektion von subkutanen Tumoren über NIR-Sonden	174
5.11	Ausblick	178
6	Zusammenfassung	179
7	Summary	181
	Literaturverzeichnis	183
	Abbildungsverzeichnis	197
	Tabellenverzeichnis	201
	Publikationen, Vorträge und Poster	203

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
APC - Gen	<i>adenomatous polyposis coli - Gen</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>american type culture collection</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	<i>charge - coupled device</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
C _t	Schwellenwert (<i>threshold cycle</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol (-dihydrochlorid)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPP VI	Dipeptidylpeptidase (CD 26)
DSPC	1,2-Distearoyl - sn - glycerol - phosphocholin
DSPE	1,2-Distearoyl - sn - glycerol - phosphoethanolamin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECGM	<i>endothelial cell growth medium</i>
ECGS/H	<i>endothelial cell growth supplement/heparin</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	EGF - Rezeptor

ERK	<i>extracellular signal - regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence - activated cell sorting</i>
FAM	Fluorescein
FDG	18F - Fluordesoxyglucose
FGF	Fibroblasten - Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GTE - Puffer	Glucose/TRIS/EDTA - Puffer
HEPES	2 - [4 - (2 - Hydroxyethyl) - 1 - piperazinyl] - ethansulfonsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	Nabelschnurendothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
ICG	Indocyanin - Grün
IDC	Invasives duktales Karzinom (<i>invasive ductal carcinoma</i>)
INT	2 - [4 - Iodophenyl] - 3 - [4 - nitrophenyl] - 5 - phenyltetrazoliumchlorid
ISC	<i>intersystem crossing</i>
I - TAC	<i>interferon - inducible T - cell alpha chemoattractant (CXCL11)</i>
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i>
MAPK	Mitogen - aktivierte Protein Kinasen
MCF7	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
MLV	Multilamellare Vesikel
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3 - (4,5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	Trenngrenze/Porengröße (<i>molecular weight cut off</i>)
NAD ⁺	Nicotinamid - Adenin - Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid - Adenin - Dinukleotid (reduzierte Form)
n.d.	nicht detektierbar
NF _κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHS	N - Hydroxysuccinimid

NIR	Nahinfrarot
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase - Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie (<i>photon correlation spectroscopy</i>)
PDL	Poly - D - Lysin
PDT	Photodynamische Therapie
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PET	Photonen - Emissions - Tomographie
PI3-K	Phosphatidyl - inositol - 3 - kinase
PS	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	Ras - aktivierbarer Faktor
Ras	Rat sarcoma
RES	Retikuloendotheliales System
RGD	Arginin - Glycin - Asparaginsäure
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROX	Interner Referenzfarbstoff
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
rt-PCR	Reverse Transkriptase PCR (<i>reverse transcriptase pcr</i>)
SDF-1	<i>stromal cell - derived factor-1 (CXCL12)</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPECT	Einzelphotonen - Emissions - Computertomographie
SPIO	Superparamagnetisches Eisenoxid (<i>superparamagnetic iron oxide</i>)
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i>
TAE - Puffer	TRIS - Acetat - EDTA - Puffer
TAMRA	6 - Carboxytetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBST	<i>TRIS buffered saline tween</i>
TE - Puffer	TRIS/EDTA - Puffer
TEMED	N,N,N,N - Tetramethylethylendiamin

TGF α	Transformierender Wachstumsfaktor α (<i>transforming growth factor α</i>)
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TRIS	TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ULV	Unilamellare Vesikel
UNG	Uracil-N-Glycosylase
USPIO	Ultraschall superparamagnetisches Eisenoxid (<i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>)
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VPG	Vesikuläre Phospholipid Gele
VSOP	Sehr kleine superparamagnetische Eisenoxid-Partikel (<i>very small superparamagnetic iron oxide particles</i>)

Nicht gesondert aufgeführt sind allgemein übliche Abkürzungen und Maßeinheiten.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen etc. in dieser Beilage auch ohne besondere Kennzeichnung berechtigen nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes 2007 stellen Tumore hinter vaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache (25,6 %, Tendenz steigend) in Deutschland dar. Dabei leisten schon heute Bildgebungsverfahren und Labordiagnostik wertvolle Dienste bei der Früherkennung, allerdings erst dann, wenn die entsprechende Person bereits erkrankt ist und Symptome von z.B. Tumorerkrankungen zeigt. Ein Erkennen der Erkrankungen zu einem früheren Zeitpunkt ist daher von hohem klinischen Interesse und Gegenstand aktueller Forschungen.

Obwohl bei operativen Eingriffen (Standardtherapie z.B. bei malignen Tumoren) zunehmend minimalinvasive Prozeduren mit Katheter- und Endoskoptechniken verwendet werden, sind dennoch Chirurgen oft auf die rein visuelle Unterscheidung von gesunden und pathogenen Gewebeeigenschaften angewiesen [1]. Damit ist eine der schwierigsten Entscheidungen in der Krebschirurgie die Bestimmung der Randzonen während der Tumoresektion. Bei einigen Einsatzgebieten (Neurochirurgie) ist der weitestgehende Erhalt von gesundem Gewebe unerlässlich, während bei anderen onkologischen Verfahren das maligne Wachstum ins Gewebe großzügiger verfolgt werden kann als visuell zu beurteilen ist. In beiden Fällen können einzelne maligne Zellen oder Zellcluster übersehen werden, wodurch ein erneutes Auftreten der Krankheit nach einiger Zeit erfolgen kann (Rezidiv) [2]. Durch die Kombination von neuen sensitiven Bildgebungsverfahren mit geeigneten Kontrastmitteln sollten sich maligne Zielgewebe früher identifizieren und leichter von gesundem Gewebe differenzieren lassen. Einzelne, maligne Zellen, die sich dann mit Hilfe von optischen Kontrastmitteln unter Fluoreszenzlicht detektieren ließen, könnten während des operativen Eingriffs lokalisiert und selektiv entfernt werden. Die Entwicklung geeigneter Kontrastmittel für die frühzeitige und spezifische Markierung von Tumorzellen war daher Mittelpunkt dieser Arbeit.

Die Problematik des klinischen Alltags, Tumore nach aktuellen Standardmethoden vollständig zu entfernen, wurde anhand eines In-vivo-Versuches¹ am murinen Tumormodell nachgestellt (siehe Abbildung 1.1). Stabil mit einem Expressionsvektor für den Fluo-

¹Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Kalthoff, Molekulare Onkologie, UK - SH

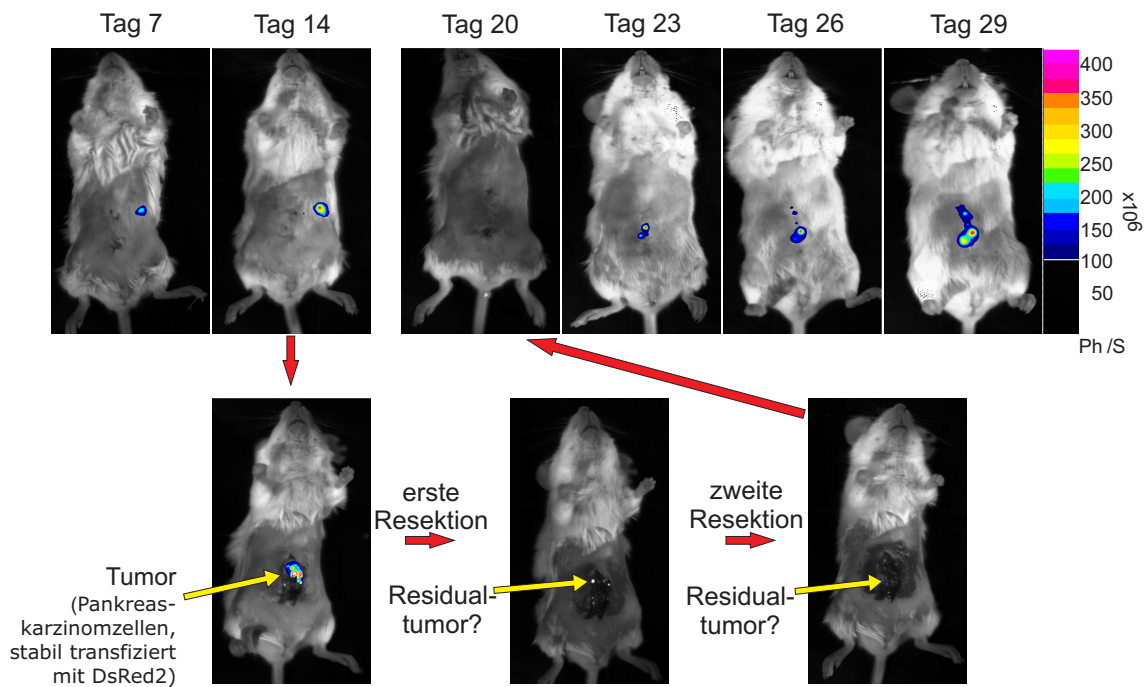


Abbildung 1.1: Residuales Tumorstadium nach zweifacher Resektion.

Anhand einer In - vivo - Versuchsreihe am murinen Tumormodell (orthotop) wurde das residuale Wachstum von stabil mit einem Expressionsvektor für den Fluoreszenzfarbstoff DsRed 2 transfizierten Pankreastumorzellen (PancTu) fluoreszenzoptisch über einen Zeitraum von 29 Tagen verfolgt (Night Owl, Berthold Technologies). Zwei Resektionen des Tumors erfolgten nach Standardmethoden am Tag 14¹.

Fluoreszenzfarbstoff DsRed 2 transfizierte Pankreaskarzinomzellen wurden Versuchsmäusen orthotop transplantiert und das Zellwachstum über Fluoreszenzemission bildgebend über 29 Tage verfolgt. Am Tag 14 wurde der Tumor über eine Inzision freigelegt und in der Fluoreszenzkammer optisch dargestellt, bevor der Tumor anschließend operativ aus dem Versuchstier entfernt wurde. Im Anschluss an die Tumorsektion wurde die Versuchsmaus erneut auf ein Fluoreszenzsignal hin untersucht. Verbliebene Tumorzellen leuchteten auf, die visuell nicht erkennbar waren. Auch nach einer zweiten Resektion konnten residuale Tumorzellen beobachtet werden. Innerhalb der nächsten zwei Wochen wurde in weiteren Fluoreszenzuntersuchungen eine zunehmende Proliferation dieser Tumorzellen und damit die Entstehung eines Rezidives festgestellt und visualisiert.

Dieser Versuch verdeutlicht die aktuelle Herausforderung einer vollständigen Tumorsektion und den Nutzen der Fluoreszenzbildgebung während der operativen Entfernung maligner Zellen.

Das Ziel der optischen Fluoreszenzbildgebung ist aber nicht nur auf die Detektion residueller Tumorzellen beschränkt. So liegen jeder Erkrankung molekulare Veränderungen zugrunde, die vor der phänotypischen Ausprägung auftreten. Die Aufgabe ist es daher, eine Erkrankung bereits auf molekularer Ebene zu erkennen. Damit wird nicht nur ein frühzei-

tiges Aufdecken einer Erkrankung möglich, sondern darüber hinaus können individuelle Tumortherapien mit Verlaufskontrollen hinsichtlich Tumorprogression/Tumorregression erfolgen.

1.1 Molekulare Bildgebung

Bei der *molekularen Bildgebung* handelt es sich um die „In-vivo-Charakterisierung und Messung von biologischen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene“ [3]. Das Ziel der molekularen Bildgebung besteht darin, an Stelle der erst später auftretenden morphologischen Veränderungen bereits die mit der Entwicklung von Krankheiten verbundenen molekularen Veränderungen abzubilden und zu quantifizieren. Diese können bis zu sechs Jahre vor dem Auftreten erster Raumforderungen im Körper nachgewiesen werden [4]. Mit nuklearmedizinischen, tomographischen sowie fluoreszenzoptischen Methoden stehen eine Reihe moderner bildgebender Verfahren für eine frühzeitige Diagnose von Erkrankungen zur Verfügung. Diese lassen sich hinsichtlich ihrer Auflösung und ihrer Möglichkeiten unterscheiden, Informationen auf anatomischer oder funktioneller Ebene zu erhalten. Die Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die aktuellen bildgebenden Methoden. Auf die wesentlichen Funktionen und Bedeutungen der einzelnen Verfahren wird anschließend kurz eingegangen. Damit diese bildgebenden Verfahren zu der molekularen Bildgebung hinzugezählt werden können, ist die Verwendung von Kontrastmittel notwendig, um die molekularen Veränderungen darzustellen. Ohne Kontrastmittel können optische Bildgebung, Magnetresonanztomographie, Computertomographie sowie Sonographie keine molekularen Veränderungen der Erkrankungen anzeigen und sind

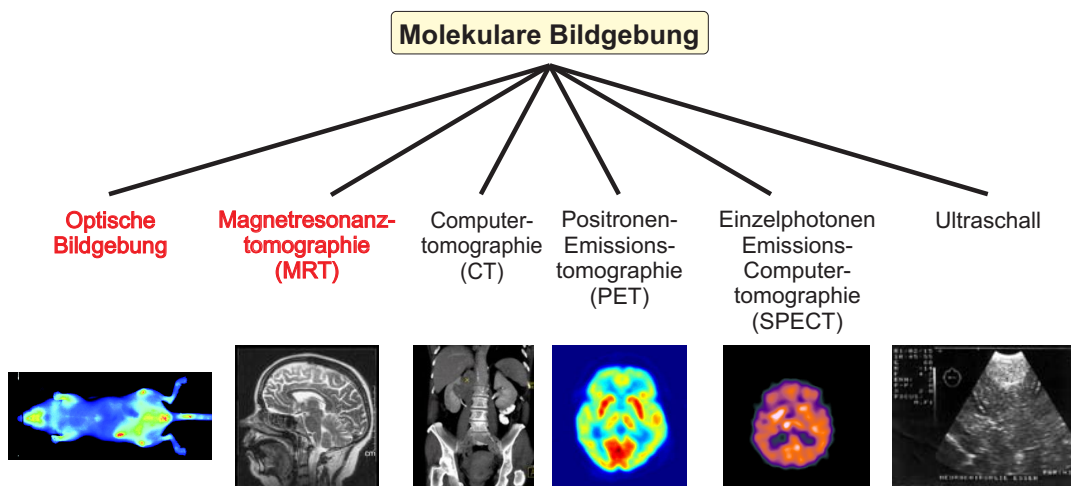


Abbildung 1.2: Übersicht über aktuelle Verfahren in der *molekularen Bildgebung*.

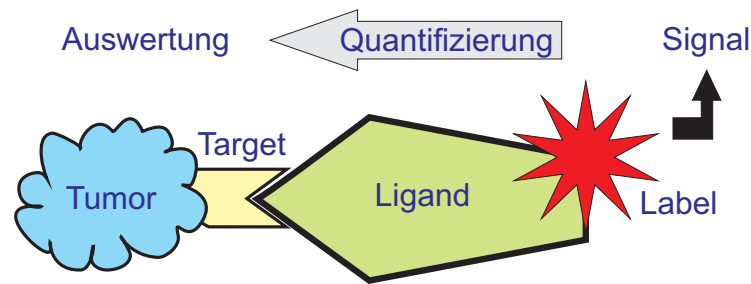


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau und Funktion spezifischer Kontrastmittel (Sonden).

Über die Bindung eines spezifischen Kontrastmittels, bestehend aus Ligand und *label*, an eine ausgewählte Zielstruktur (*Target*) wird durch Erhalt eines Signals eine Detektion z.B. von Tumorzellen möglich. Eine weitere Auswertung kann über die Quantifizierung des Signals erfolgen.

auf die Aufnahmen anatomischer Strukturen beschränkt. Die Photonen-Emissions-Tomographie sowie Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie können aufgrund ihrer funktionellen Bildgebung per se den molekularen Bildgebungsverfahren zugeordnet werden.

Neben der Auswahl eines geeigneten Verfahrens ist eine weitere Voraussetzung für die zielgerichtete Detektion von Tumorzellen die Identifizierung molekularer Zielstrukturen (*Targets*). Das Vorkommen dieser *Targets* sollte auf das Tumorgewebe limitiert sein, um darüber eine Unterscheidung zu gesundem Gewebe zu ermöglichen. Als potentielle *Targets* können Proteine, die von Tumorzellen überexprimiert werden (Rezeptoren, Enzyme), oder Nukleinsäuren mit spezifischen RNA- oder DNA-Sequenzen ausgesucht werden. Ist die Zielstruktur gefunden, müssen geeignete Kontrastmittel (Sonden) bestimmt werden. Diese setzen sich aus einem Liganden (z.B. Peptide, Antikörper) und einem Signalmolekül (*label*) zusammen. Die Liganden zeichnen sich möglichst durch eine hohe Affinität und Spezifität zur entsprechenden Zielstruktur aus, um über die Bindung an das *Target* zusammen mit dem Signalmolekül das Auffinden des Tumors zu ermöglichen. Die Wahl des Signalmoleküls (radioaktiv, superparamagnetisch oder fluoreszierend) richtet sich nach Art der Darstellung (funktionell oder anatomisch) und nach dem bildgebenden Verfahren. So wurden in dieser Arbeit Eisenoxid-Nanopartikel für die Bildgebung über Magnetresonanz sowie Fluoreszenzfarbstoffe für die optische Bildgebung ausgewählt. Die Abbildung 1.3 stellt abschließend die Zusammenhänge von *Target*, Kontrastmittel (Ligand und *label*) und Detektion noch einmal schematisch dar.

Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die einzelnen molekularen Bildgebungsverfahren. Im Folgenden werden diese bildgebenden Verfahren näher erläutert. Für die Detektion von Tumorzellen mit den in dieser Arbeit entwickelten Kontrastmittel wurden die *Magnetresonanztomographie* (MRT) sowie *fluoreszenzoptische Methoden* als bildgebende Verfahren ausgewählt und daher ausführlicher beschrieben.

Tabelle 1.1: Vergleich von Bildgebungsverfahren [5]

Verfahren	Auflösung	Sensitivität	Kosten	Aufwand
Optisch	+	++	Niedrig	Einfach
MRT	+++	+	Hoch	Mittel
PET/SPECT	+	+++	Hoch	Kompliziert, belastend
Ultraschall	++	+	Niedrig	Einfach

1.1.1 Optische Bildgebung

Die *optische Bildgebung* umfasst Verfahren, bei denen Licht des **visuellen** (VIS) bis **nahinfraroten** (NIR) Spektrums zur Gewebedifferenzierung verwendet wird. So kann z.B. über eine Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen an ausgewählte Liganden eine spezifische Bindung an entsprechende Zielstrukturen auf Tumorzellen erreicht werden. Die Detektion dieser Zellen erfolgt anschließend über das emittierte Fluoreszenzlicht des Kontrastmittels. In Unterkapitel 3.12 (S. 91) wird die Fluoreszenzentstehung beschrieben.

Die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes ist abhängig von seiner Anregungs- und Emissionswellenlänge. Sichtbares Licht (Wellenlängen von 380-780 nm) [6] penetriert nur wenige Millimeter das Gewebe [7], da sich die Intensität des Lichtes durch Streuung, Brechung und Absorptionen an Zellmembranen/Zellorganellen mit zunehmender Eindringtiefe abschwächt. Dagegen kann Licht des NIR-Spektrums (Wellenlängen von 700-1000 nm) Eindringtiefen von mehreren Zentimetern erreichen [8]. Ursache hierfür ist eine geringe Absorption von Licht durch Gewebe, Hämoglobin und Wasser im langwelligen Bereich (*diagnostisches Fenster*, siehe Abbildung 1.4). Zusätzlich ist die Autofluoreszenz des Gewebes im NIR-Bereich relativ gering und führt zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis [8].

Für eine (In-vivo-) Anwendung sind bestimmte Eigenschaften eines idealen NIR-Fluorochroms entscheidend:

- Emissionsmaximum bei Wellenlängen zwischen 700 nm und 1000 nm (*diagnostisches Fenster*)
- hohe Fluoreszenzquantenausbeute
- geringe Überschneidung zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum
- Photostabilität
- biologische Verträglichkeit
- Möglichkeit gezielter chemischer Kopplung (z.B. über eine NHS-Estergruppe)

Aufgrund der Erfüllung dieser Eigenschaften haben sich insbesondere Cyaninfarbstoffe in den letzten Jahren als geeignete Fluorochrome herausgestellt und sich als optische Kontrastmittel bewährt [10]. Daher wurden diese für den experimentellen Teil dieser Arbeit für die Entwicklung optischer NIR-Sonden ausgewählt und an ausgesuchte Liganden konjugiert.

Neben diesen passiven NIR-Sonden lassen sich *aktivierbare Kontrastmittel* über eine enzymatische Umsetzung in einen fluoreszierenden Zustand versetzen [11]. Die Grundlage bietet hierfür die gegenseitige Fluoreszenzauslöschung (*quenching*) bei enger räumlicher Nähe der Fluorochrome. Werden diese an ein Trägermolekül gekoppelt, so kommt es innerhalb dieses Moleküls durch gegenseitigen Energietransfer unter den Fluorochromen zu einer annähernd vollständigen Signalauslöschung. Erst nach proteolytischer Abspaltung (z.B. durch Proteasen) und Freisetzung der Fluorochrome lässt sich ein Fluoreszenzsignal detektieren. Vor dem Hintergrund, dass viele Tumore eine deutliche Überexpression von Proteasen aufweisen [12], ist eine effektive Tumordetektion mit Hilfe dieser Kontrastmittel ebenfalls möglich.

Eine weitere bekannte Möglichkeit zur Fluoreszenzmarkierung zellulärer Veränderungen besteht in der Verwendung von *quantum dots*, bei denen es sich um wenige Nanometer große fluoreszente Nanopartikel handelt, deren Kern aus Halbleitermaterialien wie CdSe, CdTe, InP oder ähnlichem besteht. Die bekannten *quantum dots* zeigen bei ihrer Verwendung in biologischen Systemen jedoch das *blinking*-Phänomen, d.h. die Nanopartikel

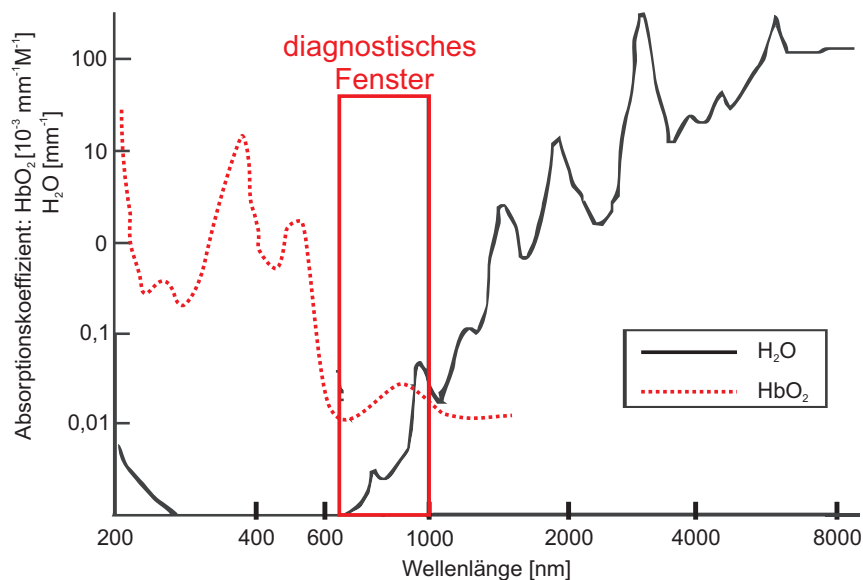


Abbildung 1.4: Absorptionsbeiträge von Wasser (H_2O) und Oxyhämoglobin (HbO_2) von 200 bis 8000 nm. Innerhalb dieses *diagnostischen Fensters* ist die Absorption des Wassers und Oxyhämoglobins minimal [9].

wechseln zwischen einem fluoreszenten und einem nicht-fluoreszenten Zustand. Durch dieses Phänomen sind die *quantum dots* insbesondere für die In-vivo-Anwendung weniger geeignet. Zudem kann das *blinking* auch einen Zerfall des Nanopartikelkerns anzeigen, aufgrund dessen toxisches Cadmium in den Körper freigesetzt werden kann. Dies ist besonders nachteilig, da die *quantum dots* beispielsweise in der Leber oder in der Milz akkumulieren [13].

Die optische Bildgebung im nahen Infrarot-Bereich stellt eine vielversprechende Methode dar, die es ermöglicht, nichtinvasiv Strukturveränderungen zu untersuchen, bevor pathologische Symptome auftreten. Stoffwechselfunktionen, Genexpressionsmuster sowie molekulare Veränderungen an Zellen können damit hochselektiv anhand von spezifischen Kontrastmitteln detektiert und frühzeitig analysiert werden [3].

1.1.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die *Magnetresonanztomographie* (MRT), auch Kernspintomographie genannt, ist ein modernes Schnittbildverfahren, das zur Darstellung von Struktur und Funktion der Gewebe und Organe im Körper eingesetzt wird. Durch die Verwendung sehr starker Magnetfelder sowie elektromagnetischer Impulse im Radiofrequenzbereich können auf nichtinvasive Weise Schichtaufnahmen erzeugt werden, die eine Beurteilung der Organe und krankhafter Organveränderungen erlauben. Ein MR-Tomograph ist in der Abbildung 1.5 dargestellt.

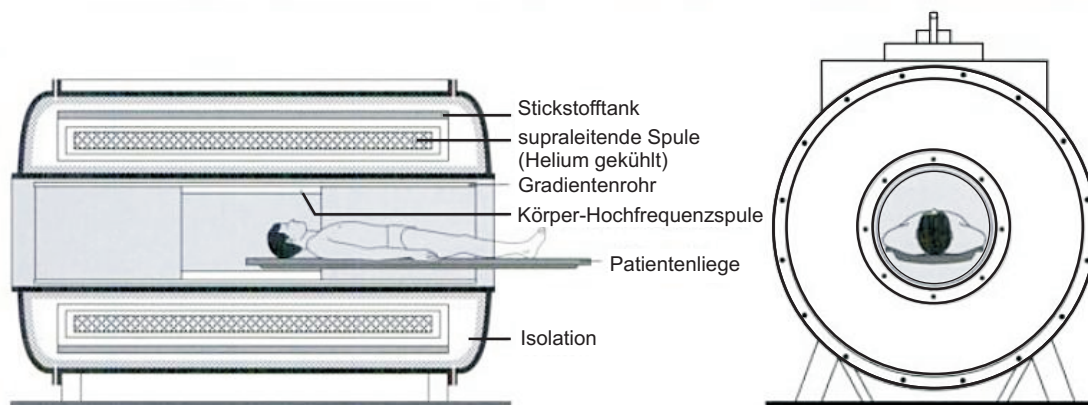


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung eines Magnetresonanztomographen (Längs- und Querschnitt) [14]. Das Hauptmagnetfeld wird mittels eines widerstandsfreien Stromflusses durch die supraleitende Spule (Helium gekühlt) erzeugt. Das Gradientenrohr enthält die für die Ortskodierung notwendigen Gradienten-Spulen und die Shim-Spulen zur Homogenisierung des Magnetfeldes. Die Körper-Hochfrequenzspule kann sowohl als Sende- wie auch als Empfängerspule verwendet werden.

Eine Voraussetzung für die bildgebende Darstellung von Gewebe über MR-Tomographie ist das Vorhandensein positiv geladener Atomkerne (Protonen). Diese besitzen einen Eigendrehimpuls (*Kernspin*), wodurch die Atomkerne vergleichbar mit rotierenden Kreisel sich um ihre eigene Achse drehen (Präzession) und dadurch ein magnetisches Moment erhalten [15]. In der MRT entsteht der bildgebende Kontrast durch Wechselwirkungen dieser magnetischen Momente mit eingestrahlten Radiofrequenzimpulsen. Da Wasserstoffatome sowohl einen Kernspin aufweisen als auch in großen Mengen im menschlichen Körper vorkommen, ist es für die tomographische Darstellung über Magnetresonanz besonders gut geeignet.

Das tomographische Messverfahren besteht im Prinzip aus drei Schritten. Da normalerweise die Kernspins der Wasserstoffkerne gleichverteilt in alle beliebigen Richtungen zeigen, werden diese zunächst durch ein sehr starkes äußeres Magnetfeld (1-3 Tesla) parallel ausgerichtet. Durch die Summierung der (durch die Kernspins entstehenden) magnetischen Momente bildet sich eine Magnetisierung parallel zum äußeren Magnetfeld aus (longitudinale Magnetisierung).

Mit Hilfe von Radiofrequenzimpulsen (mit der Resonanzfrequenz des Wasserstoffs) lassen sich anschließend die ausgerichteten Wasserstoffkerne anregen, die Ausrichtung ihrer Drehachsen und damit die Richtung der Magnetisierung verändern (Abnahme der longitudinalen Magnetisierung, Zunahme einer transversalen Magnetisierung). Zusätzlich bekommen alle präzidierenden Spins dieselbe Phase, so dass diese nun phasensynchron um ihre zueinander parallelen (aber verkippten) Achsen kreisen.

Nach dem Radiofrequenzimpuls richten sich im dritten Schritt die Präzessionsachsen der Spins wieder entlang des äußeren Magnetfeldes aus (*Relaxation*; Rückgang des Transversalmagnetfeldes). Die Atomkerne geben die Energie ab, die sie durch den eingestrahlten Radiofrequenzimpuls aufgenommen hatten. Dabei unterscheiden sich die entsprechenden *Relaxationszeiten* nach dem Radiofrequenzimpuls für verschiedene Gewebearten charakteristisch und führen zu verschiedenen Signalstärken (Helligkeiten) im resultierenden Bild. Die transversale Magnetfeldkomponente ist mit Empfangsspulen messbar.

Durch wiederholende Anregungen und Messungen werden die erhaltenen Daten in Bildinformationen umgerechnet und Schnittbilder erstellt.

Das Signal eines bestimmten Gewebes wird hauptsächlich durch den Gehalt an Wasserstoffkernen sowie den speziellen chemischen und physikalischen Eigenschaften des Gewebes geprägt. Aufgrund des unterschiedlichen Gehaltes und Vorliegens von Wasserstoffatomen kann gesundes von krankhaftem Körpergewebe sowie gesunde Gewebe voneinander abgegrenzt werden [15]. Knochengewebe kann wegen seines geringen Wasser- und Fettgehalts unter Routinebedingungen nicht dargestellt werden. Knochenerkrankun-

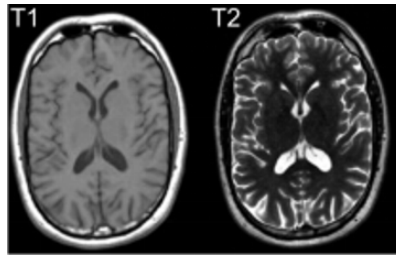


Abbildung 1.6: T₁- und T₂-gewichtete MRT - Aufnahmen (axiale Schnittebene) [17].
 T₁-Gewichtung mit guter Kontrastierung zwischen grauer und weißer Substanz (links) und
 T₂-Gewichtung mit starkem Liquorkontrast (rechts).

gen dagegen (z.B. Entzündungen, Tumore) sind aufgrund der gesteigerten Durchblutung und des damit verbundenen Wassergehalts besser zu erkennen als bei Röntgen- bzw. CT-Untersuchungen [16]. Durch bestimmte Messanordnungen (zeitliche Abfolge und Stärke des Magnetfeldgradientens und Radiofrequenzen) können verschiedene Kontraste in den entstehenden Bildern dargestellt werden. Zwei wichtige Kontraste spiegeln die T₁- und T₂-Relaxation des Gewebes wieder. Ein Vergleich von T₁- und T₂-gewichteten Aufnahmen ist in der Abbildung 1.6 dargestellt.

- T₁-Gewichtung (longitudinale Relaxation)

Nach dem Radiofrequenzimpuls richten sich die Kernspins durch die Abgabe der vorher gewonnenen Energie, in Form von Wärme (*Spin-Gitter-Wechselwirkung*), wieder entlang des äußeren Magnetfeldes aus. Dieser Prozess der Wiederausrichtung bzw. des Wiederaufbaus der Längsmagnetisierung wird als „T₁-Relaxation“ bezeichnet und hängt wesentlich von der Wärmeleitfähigkeit des Gewebes ab. Gewebe mit schnellem Wärmetransfer (kurze T₁-Relaxationszeit, z.B. Fettgewebe) stellen sich in T₁-gewichteten Bildern hell und Gewebe mit langsamem Wärmetransfer dunkel dar (längere T₁-Relaxationszeit, z.B. Liquor). Diese Gewichtung eignet sich daher gut zur anatomischen Darstellung von Organstrukturen und insbesondere nach Kontrastmittelgabe (Gadolinium) zur besseren Abgrenzbarkeit unbekannter Strukturen (z.B. Tumor).

- T₂-Gewichtung (transversale Relaxation)

Nach dem Radiofrequenzimpuls verlieren die Spins zusätzlich ihre Phasensynchronität, wobei ein Energieaustausch zwischen benachbarten Protonen stattfindet (*Spin-Spin-Wechselwirkung*). Der damit verbundene Rückgang der Transversalmagnetisierung wird als T₂-Relaxation bezeichnet. Gewebe, die eine Transversalmagnetisierung relativ lange aufrechterhalten können, stellen sich in T₂-gewichteten Bildern hell dar (z.B. Wasser) [15]. Dadurch eignet sich diese Gewichtung zur Dar-

stellung von Ergussbildungen und Ödemen sowie zur Abgrenzung von Zysten gegenüber soliden Tumoren.

Die tatsächlich beobachtete Relaxationszeit ist oft deutlich kürzer als durch die Spin-Spin-Wechselwirkung erklärbar. Störungen des transversalen Magnetfeldes z.B. durch magnetische Eigenschaften der Umgebung (Eisenoxid-Nanopartikel) können zu schneller verlaufenden Dephasierungseffekten führen. Dieser schnellere Relaxationsprozess wird als T_2^* -Relaxationszeit beschrieben. Somit kann der Rückgang der Transversalmagnetisierung als Summe der T_2 - und T_2^* -Effekte verstanden werden [15].

Sollte die Abgrenzung von Geweben nicht ohne weiteres möglich sein, stehen gut verträgliche Kontrastmittel zur Verfügung, mit denen weitere Aussagen zu der untersuchten Körperregion möglich werden. Diese Kontrastmittel sind auf Basis von Gadoliniumverbindungen (Magnevist[®]) und superparamagnetischen Eisenoxidverbindungen (Resovist[®]) entwickelt worden. Resovist[®] wurde als Referenzsubstanz in den eigenen Versuchen mitgeführt.

1.1.3 Computertomographie (CT)

Die *Computertomographie* (CT) ist ein röntgendiagnostisches Verfahren mit rechnergestützter Auswertung. Dabei werden Röntgenaufnahmen aus unterschiedlichen Richtungen aufgenommen und ein dreidimensionales Bild erstellt (schnittbildgebendes Verfahren). Es handelt sich hierbei um eine der wesentlichsten diagnostischen Möglichkeiten in der Radiologie.

Während der Tomographie-Untersuchung dreht sich senkrecht zur Körperachse kontinuierlich eine Röntgenröhre, die mit einer Hochspannung von 120 bis 150 kV einen fächerförmigen Röntgenstrahl erzeugt, der den Körper in der gewünschten Ebene durchstrahlt. In Abhängigkeit von Dichte und Dicke des durchstrahlten Gewebes wird der Strahl mehr oder weniger stark absorbiert. Gegenüber der Röhre befinden sich, halbkreisförmig angeordnet, zahlreiche Detektoren, die, abhängig von der auftreffenden Röntgenstrahlenintensität, elektrische Signale erzeugen. Diese Signale werden von einem Rechenalgorithmus zur Bilderstellung genutzt. Die Strahlenbelastung beträgt bei der Computertomographie je nach Untersuchung zwischen drei und zehn Millisievert für den untersuchten Bereich. Diese Strahlenexposition ist, verglichen mit der einer konventionellen Aufnahme zum Beispiel des Thorax von etwa 0,3 mSv, relativ hoch. Zum Vergleich: Die natürliche Strah-

lenexposition auf Meereshöhe in Deutschland beträgt nach Angaben des Bundesamtes für Strahlenschutz ca. 2,1 mSv pro Jahr.

1.1.4 Positronen - Emissions - Tomographie (PET)

Die *Positronen - Emissions - Tomographie* (PET) ist ein bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin zur Erstellung von Schnittbildern lebender Organismen, indem es die Verteilung eines radioaktiv markierten Biomoleküls (*tracer*) im Organismus dreidimensional sichtbar macht und damit biochemische und physiologische Funktionen abbildet (*funktionelle Bildgebung*).

Das meist verwendete Nuklid in der PET ist das radioaktive Isotop des Fluor ($^{18}_9\text{F}$). Es wird mit Hilfe eines Zyklotrons hergestellt und hat eine Halbwertszeit von etwa 110 Minuten. Neben $^{18}_9\text{F}$ werden hauptsächlich radioaktive Isotope der Elemente Kohlenstoff ($^{11}_6\text{C}$), Stickstoff ($^{13}_7\text{N}$), Sauerstoff ($^{15}_8\text{O}$), Rubidium ($^{82}_{37}\text{Rb}$) und Gallium ($^{68}_{31}\text{Ga}$) eingesetzt [18].

Die PET-Radiopharmaka bestehen aus Biomolekülen, wie z.B. Zucker, Peptiden und DNA-Bestandteilen, die mit einem dieser Radionuklide markiert sind. Der Organismus kann sie nicht von ihren nicht-radioaktiven Pendants unterscheiden. Sie gehen daher in den gewöhnlichen Stoffwechsel ein und ermöglichen eine Darstellung natürlicher Zellfunktionen (Stoffwechsel, Proteinbiosynthese). Aufgrund seines radioaktiven Zerfalls kann anschließend das Radionuklid im Körper aufgespürt werden.

$^{18}_9\text{F}$ -Fluorodesoxyglucose (FDG) wird von Zellen über einen speziellen Glucosetransporter, der in Tumorzellen überexprimiert vorliegt, genauso wie Glukose aufgenommen, obwohl an einer Stelle des Moleküls eine Hydroxylgruppe durch das Radionuklid $^{18}_9\text{F}$ ersetzt ist. Da FDG-6-phosphat nach der Phosphorylierung nicht weiter umgesetzt wird, findet eine Anreicherung im Tumorgewebe statt. Die Verteilung von FDG im Körper erlaubt somit Rückschlüsse auf den Glukosestoffwechsel verschiedener Gewebe. Dies ist besonders für die frühe Diagnose von Krebserkrankungen von Vorteil, da Tumorzellen aufgrund eines erhöhten Stoffwechsels meist viel Glukose verbrauchen und FDG daher dort entsprechend akkumuliert.

Trifft während der Tomographie-Messung ein durch Zerfall des Radionuklids entstandenes Positron auf ein Elektron, werden beide vernichtet (*Annihilation*). Es entstehen zwei hochenergetische Photonen (Gammastrahlung) einer Energie von exakt 511 keV, die sich in einem Winkel von 180° voneinander entfernen. Diese Vernichtungsstrahlung trifft gleichzeitig (koinzident) zwei Detektoren, worüber der Nachweis und die Ortsbestimmung der Positronenemission erfolgen. Werden zwei γ -Quanten einer Energie von

511 keV zeitgleich nachgewiesen (typische Zeitfenster der Nachweiselektronik: 4,5 bis 15 Nanosekunden), wird dies als Positron-Elektron-Vernichtung auf der gedachten Linie zwischen den signalgebenden Detektoren interpretiert (Koinzidenzlinie).

PET ist ein hochempfindliches und funktionelles Verfahren, bei dem sich Aktivitätsanreicherungen jedoch anatomisch nicht immer gut lokalisieren lassen, da in PET-Aufnahmen in erster Linie Stoffwechselprozesse aufgezeigt werden. Hinzu kommt die begrenzte Ortsauflösung von etwa 4-6 mm. Ein PET/CT kombiniert die hohe Ortsauflösung (von bis zu 0,35 mm) und detailreiche Anatomiedarstellung des CT mit den hochempfindlichen Stoffwechsellinformationen aus der PET. Auch eine Kombination aus PET und MRT ist bereits entwickelt worden.

1.1.5 Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT)

Die *Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie* (SPECT) gehört wie die PET zu den funktionellen bildgebenden Verfahren, bei denen die erzeugten Bilder vor allem Aufschluss über Stoffwechselabläufe im untersuchten Körper geben. Damit zählen die SPECT sowie die PET per se zu den molekularen Bildgebungsverfahren.

Basierend auf dem Prinzip der Szintigrafie werden bei der SPECT γ -emittierende Nukleotide ($^{99m}_{43}\text{Te}$; Halbwertszeit: 6 h) verwendet, die in der Regel kostengünstiger und langlebiger als die bei der PET-Bildgebung verwendeten Positronen-emittierenden Nukleotide sind. SPECT ist daher nicht nur einfacher in der Anwendung, es lassen sich auch mehrere Isotope gleichzeitig abbilden und somit Multiparameter-Messungen durchführen [4].

Die Morphologie des Körpers lässt sich hingegen nur grob beurteilen, da diese in den abgebildeten Stoffwechsellinformationen nicht oder nur teilweise enthalten und außerdem die Auflösung anderer Verfahren unterlegen ist. Neuere Gerätesysteme wie SPECT/CT erlauben die Kombination der Vorteile der morphologischen und funktionellen Bildgebung. Die daraus resultierenden Fusionsbilder ermöglichen die genaue Zuordnung funktioneller Auffälligkeiten zu den anatomischen Strukturen. Dieses Verfahren hat besondere Bedeutung bei der Beurteilung verschiedener Krebserkrankungen und deren Verlaufsuntersuchungen.

1.1.6 Sonographie

Die *Sonographie* (Ultraschallbildgebung) basiert auf dem Prinzip von Schallwellen und deren Reflexion (*Echogenität*).

Dabei wird ein Schallkopf an den Körper gehalten, der mittels elektrisch angeregter Piezokristalle mechanische Wellen mit hoher Frequenz (1 bis 40 Megahertz) und geringer Energie erzeugt. Ein spezielles Gel zwischen Schallkopf und Körper verhindert, dass die Körperoberfläche selbst reflektiert, womit ein großer Teil der Schallwellen nutzlos vernichtet würde. Die Wellen werden von verschiedenen Gewebearten im Körper unterschiedlich stark reflektiert und legen je nach räumlicher Tiefe unterschiedlich lange Wege zurück. Aus dem (ebenfalls vom Schallkopf, nur in umgekehrter Funktionsweise) aufgenommenen und in elektrische Impulse verwandelten Echo lässt sich so ein Bild des Schallstrahls im Körper berechnen, wobei die Punkte je nach Stärke des Echos unterschiedlich hell gezeichnet werden. Flüssigkeiten wie beispielsweise Blut reflektieren nur wenig (dunkel), Knochen und gasgefüllte Hohlräume dagegen sehr stark (hell). Indem der Strahl während der Aufnahme in seiner Richtung variiert wird, lässt sich so das zweidimensionale Bild eines ganzen Kreissektors gewinnen. Je höher die Frequenz der Wellen, desto besser wird die Auflösung der Bilder, allerdings sinkt damit auch die „Blicktiefe“ in den Körper.

Da die Sonographie im Vergleich zu tomographischen Bildgebungsverfahren eine relativ geringe Raum- sowie Kontrastauflösung besitzt, können für die Ultraschalluntersuchungen spezifisch bindende Kontrastmittel herangezogen werden. Durch die Darstellung molekularer Veränderungen wird dann die Sonographie den molekularen Bildgebungsverfahren hinzugezählt. So konnten Ellegala et al. [19] die Tumorangio-genese bei Ratten erfolgreich bildgebend darstellen, indem sie Kontrastmittel verwendeten, die aus Mikrobläschen bestanden (*microbubbles*), die gegen endotheliale Oberflächenmarker (VEGFR) gerichtet waren. Die sonographische Bildgebung bietet den Vorteil, dass ausschließlich nicht-ionisierende Strahlung verwendet wird. Daher wird sie häufig für ergänzende anatomische Zusatzinformationen zu nuklearmedizinischen Bildern eingesetzt.

1.2 Detektion von Tumorzellen

Aufgrund zunehmender Kenntnisse über molekulare Abläufe von Tumorentwicklung und maligner Tumorprogression werden immer mehr Angriffspunkte (*Targets*) für eine gezielte Tumorthherapie gesucht. Das Vorkommen dieser *Targets* ist auf das Tumorgewebe beschränkt, um darüber eine Unterscheidung zu gesundem Gewebe zu ermöglichen. Anders als bei bisherigen Standardmethoden (Chemotherapie, Strahlentherapie) besteht darüber auch die Möglichkeit der individualisierten Tumorthherapie. Das Auffinden geeigneter molekularer Zielstrukturen kann zur Vermeidung von ineffektiven Behandlungsstrategien und Optimierung des Medikationsprofils (Wirkstoffauswahl) dienen. Darüber hinaus werden spezifische Kontrastmittel verwendet, die an ausgewählte Angriffspunkte hoch selektiv binden, um z.B. Tumorzellen frühzeitig zu detektieren. Dabei ergeben sich drei mögliche Angriffsebenen für ein spezifisches *Targeting*, die schematisch in der Abbildung 1.7 dargestellt sind:

- die Tumorzellen selbst (1)
- die Stromazellen (Fibroblasten) (2)
- die Endothelzellen der tumorversorgenden Blutgefäße (3)

Aufgrund der Ergebnisse eigener Expressionsstudien wurden als *Targets* für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal*

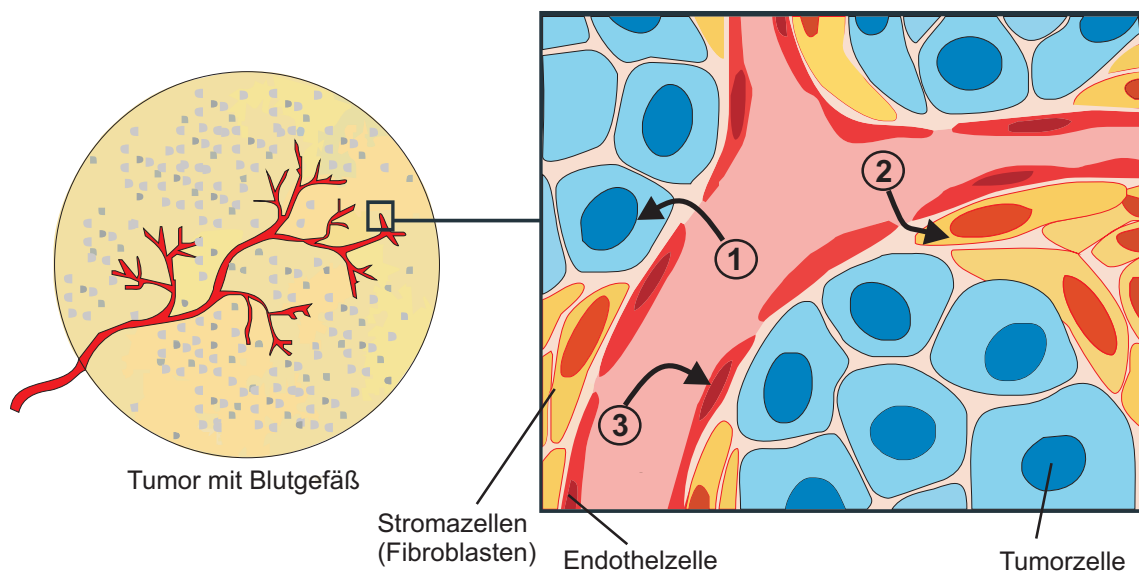


Abbildung 1.7: Mögliche Zielstrukturen der optischen Bildgebung über NIR - Sonden. (1) Tumorzellen; (2) Stromazellen (Fibroblasten); (3) Tumorendothelzellen

growth factor receptor, EGFR) und die Rezeptoren CXCR4 sowie CXCR7 aus der CXC - Chemokinrezeptorfamilie ausgewählt. Da diese in Tumoren überexprimiert sind, kann eine Detektion der Tumorzellen per se als auch des Tumorendothels anhand von geeigneten Sonden an den entsprechenden Rezeptoren erfolgen.

1.2.1 Der epidermale Wachstumsfaktor und sein Rezeptor

Viele humane Tumore überexprimieren sowohl Wachstumsfaktoren als auch deren Rezeptoren. Letztere sind daher prinzipiell für die Detektion über fluoreszenzmarkierte Sonden bildgebend erreichbar. Epitheliale Tumore produzieren häufig den epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) sowie den transformierenden Wachstumsfaktor α (*transforming growth factor- α* , TGF- α). Ihre Rezeptoren sind die EGF-Rezeptoren (auch *human epidermal growth factor receptor*, HER1, genannt), HER2, HER3 sowie HER4 [20]. Ihr Aufbau umfasst eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine hydrophobe transmembranäre Domäne sowie eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität [21]. Die extrazelluläre Domäne enthält neben den Bindungsstellen für den Liganden noch zwei Regionen, die sich durch einen hohen Gehalt an Cysteinresten auszeichnen und damit die Sekundär- und Tertiärstruktur stabilisieren können.

Die Bindung von EGF an seine monomeren Rezeptoren führt über ligandeninduzierte Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors zur Bildung von Dimeren und Einleitung der Signaltransduktion. Dabei wird zunächst eine intrinsische Tyrosinkinase durch Autophosphorylierung zweier Tyrosinreste aktiviert, die in der extrazellulären Domäne des Rezeptormoleküls lokalisiert ist. An die phosphorylierte Stelle binden zytoplasmatische Adapterproteine und leiten so eine Reihe von komplexen Signalkaskaden ein [22]. Ein Hauptsignalweg des EGF-Rezeptors ist die Ras-Raf-mitogen-aktivierte-Protein-kinase (MAPK)-Kaskade (siehe Abbildung 1.8). Die Aktivierung von Ras eröffnet eine mehrstufige Phosphorylierungskaskade, die letztendlich in der Aktivierung der MAPK mündet. Endpunkte dieser Kaskaden sind Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die z.B. die Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, aber auch Metastasierung und Angiogenese steuern [23]. Nach erfolgter Aktivierung werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe internalisiert und abschließend entweder recycelt oder in Lysosomen abgebaut [20].

EGF wird zunächst als membranständige Proform (1207 Aminosäuren) exprimiert, die aus einer zytoplasmatischen Domäne, einer hydrophoben Region (Verankerung in der Zellmembran) sowie einer extrazellulären Domäne besteht (siehe Abbildung 1.9). In die-

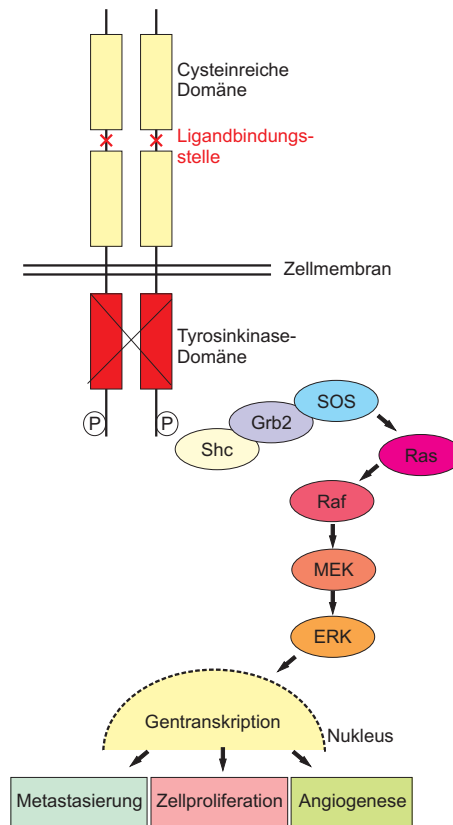


Abbildung 1.8: Signaltransduktion des EGF - Rezeptors.

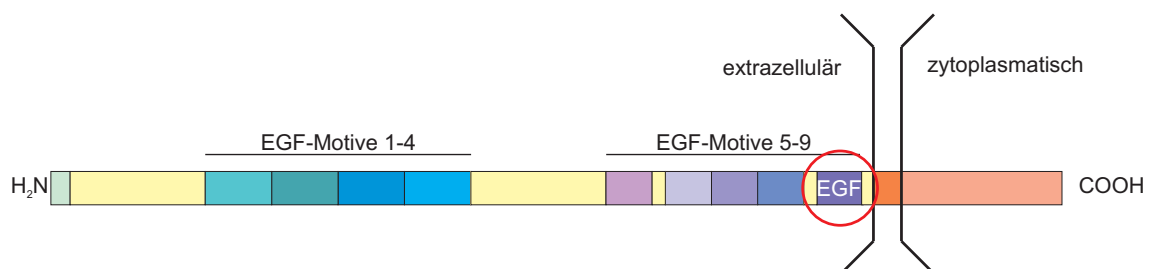


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Proform des epidermalen Wachstumsfaktors EGF.

ser extrazellulären Domäne (Motiv 1-9) befindet sich u.a. die Aminosäuresequenz des löslichen EGF-Peptids (Motiv 9; 53 Aminosäuren; Molekulargewicht: 6 kDa; Abbildung 1.10), welche durch proteolytisches Spalten freigesetzt werden kann [24].

Durch die gezielte enzymatische Freisetzung reguliert die Zelle das Gleichgewicht von Zell-assoziierten und löslichen Wachstumsfaktoren der EGF-Familie.

Für die experimentellen Versuche in dieser Arbeit wurde das EGF-Peptid als Ligand ausgesucht, da die entsprechenden EGF-Rezeptoren auf den Tumorzellen überexprimiert und daher bildgebend erreichbar sind.

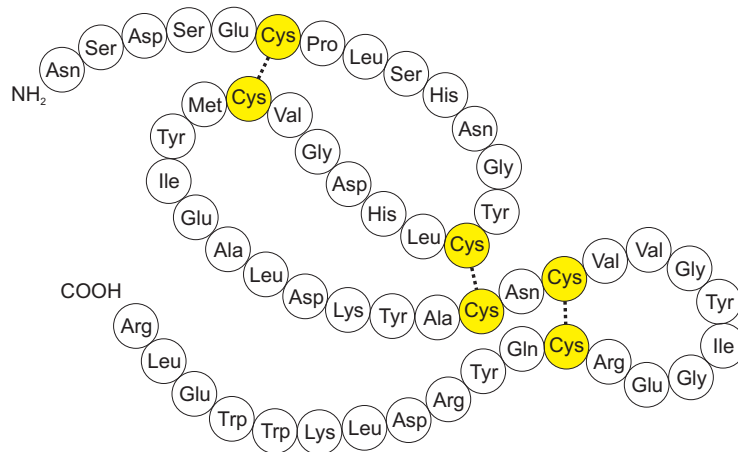


Abbildung 1.10: Aminosäuresequenz des löslichen epidermalen Wachstumsfaktors EGF. Gelb gekennzeichnet sind die Disulfidbindungen, die zur Stabilität des Moleküls beitragen.

1.2.2 Der Chemokinligand SDF-1 und seine Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine mit chemotaktischer Wirkung dar („*Chemotaktische Zytokine*“). Chemotaxis ist definiert als eine zielgerichtete Migration der Zellen entlang eines Gradienten aus chemotaktischen Faktoren in das Gebiet mit deren höchster Konzentration.

Die komplexe Familie der Chemokine umfasst 47 Mitglieder, deren Funktionen auch außerhalb immunologischer Prozesse beschrieben wurden. Neben der chemotaktischen Wirkung auf Leukozyten und Rekrutierung zu Infektionsherden sowie sekundären lymphatischen Organen, spielen Chemokine eine bedeutende Rolle bei Tumorentstehung, -wachstum und -metastasierung, Angiogenese und Angiostase [25], Embryogenese, Expression von Adhäsionsmolekülen, Hämatopoese [26] und HIV-Infektion [27].

Allen Chemokinen ist ein Molekulargewicht von 8-14 kDa, meist basische Eigenschaften und starke Konservierung der vier Cysteinreste gemeinsam. Dabei werden zwei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dem dritten sowie zwischen dem zweiten und dem vierten Cysteinrest ausgebildet. Anhand der Position der ersten beiden Cysteinreste in der N-terminalen Region des Polypeptides lassen sich Chemokine in vier Subfamilien aufteilen: CXC-, CC-, CX₃C- und XC-Chemokine [28], je nachdem, ob ein Aminosäurerest (CXC), kein Aminosäurerest (CC) oder drei Aminosäurereste (CX₃C) zwischen den Cysteinen liegen bzw. nur ein Cysteinrest vorhanden ist (XC) [28,29].

Für die Chemokinliganden sind 19 heptahelikale Transmembranrezeptoren bekannt, von denen einige nur ein Chemokin binden, während andere mit mehreren Liganden inter-

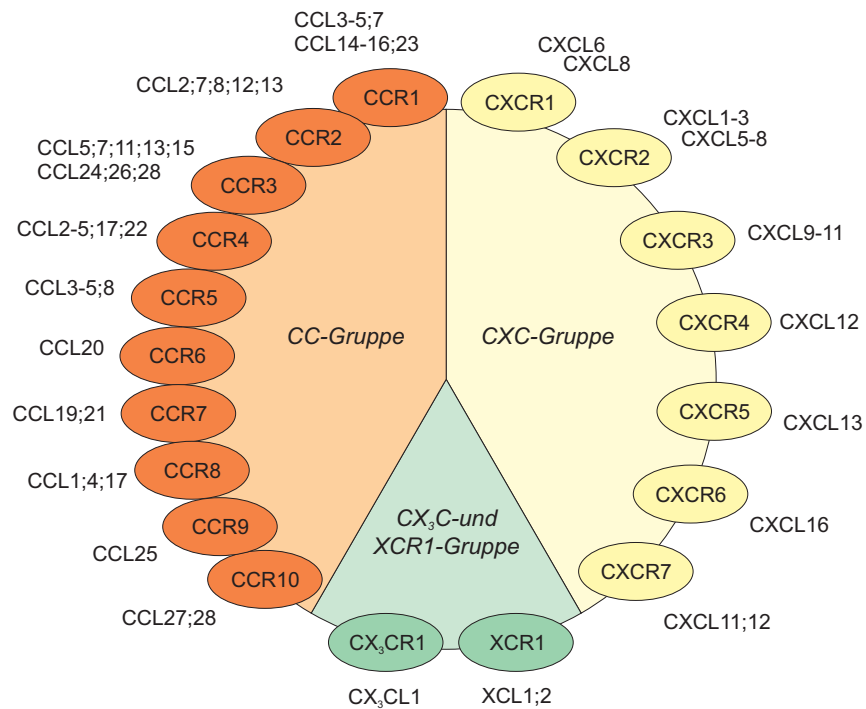


Abbildung 1.11: Übersicht über die Chemokinrezeptoren mit entsprechenden Liganden.

agieren. Allen gemeinsam ist, dass immer von einer Rezeptorart nur Chemokine einer Subfamilie gebunden werden. Daher werden die Rezeptoren ebenfalls entsprechend in Subfamilien eingeteilt, deren Vertreter mit CCR, CXCR, CX₃CR und XCR bezeichnet werden [30]. Eine Übersicht der Chemokinrezeptoren mit entsprechenden Liganden zeigt die Abbildung 1.11.

Neben einer strukturellen Einteilung kann auch eine Klassifizierung der Chemokine anhand deren Funktionen und Expressionsmuster vorgenommen werden, bei der die Chemokine als inflammatorische oder homöostatische Chemokine definiert werden. Die homöostatischen Chemokine werden konstitutiv in bestimmten Zelltypen und Geweben exprimiert. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Immunsystems und beeinflussen die Hämatopoese. Im Gegensatz dazu sind die inflammatorischen Chemokine nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch bestimmte Stimuli während einer Entzündungsreaktion induzierbar. Sie veranlassen die Migration von Leukozyten zu den geschädigten/infizierten Arealen und beeinflussen somit die Immunantwort und den Wundheilungsprozess. Die Expression dieser Chemokine steht unter Kontrolle der proinflammatorischen Zytokine.

Das Wirkungsprinzip der Chemokinrezeptoren gleicht dem aller G-gekoppelten Rezeptoren. Nach Bindung der Chemokinliganden verändern die Chemokinrezeptoren ihre

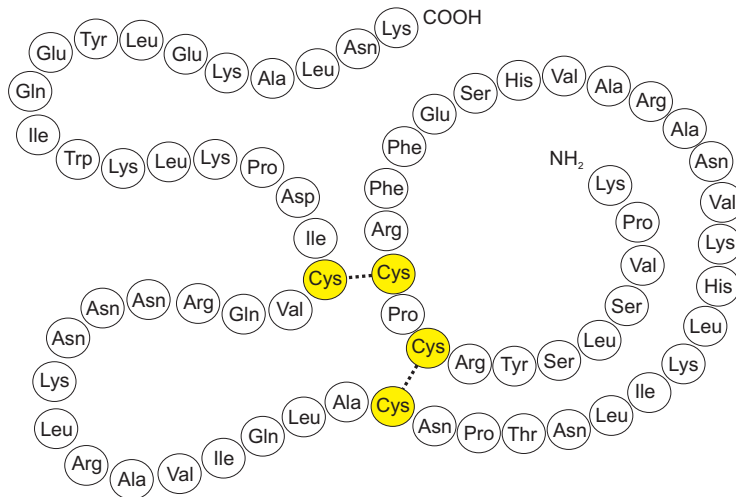


Abbildung 1.12: Aminosäuresequenz des *stromal derived factor-1 alpha* (SDF-1 α). Gelb gekennzeichnet sind die Disulfidbindungen, die zur Stabilität des Moleküls beitragen.

Konformation, sodass das heterotrimere G-Protein, welches im Zytosol an den Rezeptor gebunden vorliegt, in seine Untereinheiten α und $\beta\gamma$ -Dimer zerfällt, wodurch wiederum eine Vielzahl von intrazellulären Zielmolekülen aktiviert werden (z.B. Adenylatcyclase, Phospholipasen, GTPasen (z.B. Rho, Rac oder Cdc42)). Darüber hinaus können wichtige Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, wie z.B. der bereits beschriebene MAPK-Weg, PI3-K (Phosphatidyl-inositol-3 kinase)-Weg oder der NF κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells)-Weg.

Im Gegensatz zum EGF werden die Chemokinliganden bis auf zwei Ausnahmen (Fraktalin/CX3CL1 und SR-PSOX/CXCL16) als kleine lösliche Moleküle sezerniert.

Der *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1, systematische Bezeichnung: CXCL12, Molekulargewicht: 8 kDa, die Aminosäuresequenz ist in der Abbildung 1.12 dargestellt) gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine. Dieser vermittelt seine Effekte über eine Bindung und Aktivierung der an der Zelloberfläche exprimierten Chemokinrezeptoren CXCR4 sowie CXCR7. Aufgrund des übermäßigen Vorkommens dieser Chemokinrezeptoren auf Tumorzellen wurde SDF-1 für den experimentellen Abschnitt dieser Arbeit als Ligand der NIR-Sonden für die Detektion von Tumorzellen ausgewählt.

SDF-1 wird in hoher Konzentration im Knochenmark produziert und dient hier der Rekrutierung und Verankerung von hämatopoetischen Stammzellen. Darüber hinaus wird SDF-1 von weiteren Organen freigesetzt, insbesondere der Lunge, der Milz und der Leber. Eine verstärkte Expression von SDF-1 kann in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden [31].

Da viele Tumore die SDF-1-Rezeptoren CXCR4 und/oder CXCR7 exprimieren, zeigt

SDF-1 eine chemotaktische Wirkung auf die meisten Tumorzellen. Diese chemotaktische Wirkung ist eine der Hauptursachen für die Bildung von Metastasen, die Orte mit hoher SDF-1-Produktionsrate betreffen, insbesondere Knochenmark, Lunge und Leber [32]. Darüber hinaus unterstützt SDF-1 über eine Förderung der Angiogenese das Tumorstadium [32]. Zusätzlich zur chemotaktischen Wirkung von SDF-1 auf Stammzellen, Tumorzellen und Entzündungszellen konnte für dieses Chemokin eine hemmende Wirkung auf HI-Viren nachgewiesen werden. Diese wird auf eine SDF-1-induzierte Internalisierung des Rezeptors CXCR4, ein Co-Rezeptor für die Aufnahme von HIV-1 in die Wirtszellen, zurückgeführt [31].

Aufgrund der hohen Bindungsaffinität des SDF-1 zu seinen beiden Chemokinrezeptoren, die auf zahlreichen Tumorzellen überexprimiert sind, lassen sich diese Zellen anhand von SDF-1 markierten NIR-Sonden detektieren und stellen geeignete Kontrastmittel für die optische Bildgebung dar.

1.2.3 Liposomen

Bereits Anfang des 20. Jahrhundert entwickelte Paul Ehrlich die Idee, Medikamente gezielt an ihren Wirkort zu transportieren. Sogenannte Zauberbulen (*magic bullets*) sollten dies ermöglichen. Mitte der 60er Jahre wurde diese Idee wieder aufgenommen und versucht, mit Hilfe von Nanopartikeln zu verwirklichen [33, 34]. Der Wirkstofftransport ist eine Teildisziplin der Arzneimittelverabreichung, für die sich die englische Bezeichnung *drug delivery* etabliert hat. Der Bedarf an *Drug Delivery*-Systemen ist groß, da sich mit ihnen prinzipiell eine ganze Reihe von Problemen überwinden lassen, die bei der üblichen Applikation von Wirkstoffen auftreten:

- Der Wirkstoff ist in wässrigen Medien unlöslich
- Der Wirkstoff reichert sich nicht hinreichend im Zielgewebe an, wohl aber in anderen Gewebearten und führt so zu unerwünschten Nebenwirkungen
- Viele Wirkstoffe sind chemisch labil und werden zersetzt, bevor sie das Zielgewebe erreicht haben
- Biologische Barrieren wie z.B. die Zellmembranen oder die Blut-Hirn-Schranke können vom Wirkstoff nicht überwunden werden, so dass der Ort der Wirkung unerreichbar bleibt

Derzeit gibt es viele Wirkstoffe, die trotz ihres hohen pharmakologischen Potentials aufgrund dieser Probleme das Zielgewebe entweder gar nicht oder nur zu einem Bruchteil der verabreichten Menge erreichen und somit als Medikamente nicht zum Einsatz kommen können. Die *Drug Delivery*-Systeme sollen daher den Wirkstoff während des Transports zum Zielgewebe vor dessen Zersetzung schützen, sich passiv oder aktiv im Zielgewebe anreichern (*Drug Targeting*) und die Freigabe des Wirkstoffes mit einem kontrollierten Zeit-Dosis-Profil ermöglichen (*controlled release*).

Es gibt eine Vielzahl von Nanometer großen Trägersystemen, deren Eignung für *Drug Delivery*-Anwendungen derzeit untersucht wird, wie z.B. Liposomen [35], die im experimentellen Teil dieser Arbeit mit Eisenoxid-Nanopartikeln befüllt und für die Bildgebung von Tumorzellen über Magnetresonanz verwendet wurden [36].

Liposomen sind kleine Hohlkugeln, die aus Phospholipid-Doppelschichten (*bilayer*) bestehen (siehe Abbildung 1.13). Ihre Grundbausteine setzen aus amphiphilen Phospholipidmolekülen zusammen, die sich in wässrigen Medien spontan zu Liposomen zusammenlagern. In der kugelförmigen Doppelschicht stehen die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide in Kontakt mit Wasser und die hydrophoben Enden zeigen von beiden Seiten zur Schichtmitte.

Liposomen sind durch die Art der am Membranaufbau beteiligten Lipide und ihrer Anzahl an Lipiddoppelschichten charakterisiert. Entsprechend ihrer Morphologie können Liposomen in kleine (*small unilamellar vesicle, SUV*), große (*large unilamellar vesicle, LUV*) einschichtige (unilamellare) und mehrschichtige (multilamellare) Vesikel eingeteilt werden [37].

Seit ihrer Entdeckung Mitte der 60er Jahre werden Liposomen auf ihre Eignung als *Drug Delivery*-Systeme hin untersucht. Sie weisen dabei ein breites Anwendungsspektrum auf, da es mehrere Möglichkeiten gibt, Wirkstoffmoleküle zu transportieren. So können

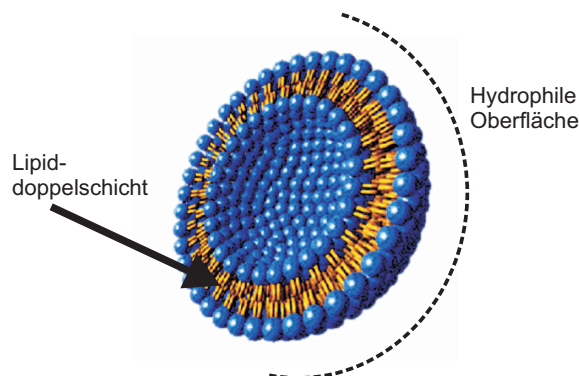


Abbildung 1.13: Schematischer Querschnitt durch ein Liposom.

hydrophile Moleküle in den wässrigen Innenraum eingeschlossen, ionische Moleküle an die Membran adsorbiert und lipophile Moleküle in den inneren Membranbereich inkorporiert werden. In der Abbildung 1.13 ist schematisch der Aufbau eines Liposoms dargestellt. Durch die Wahl der Membranlipide, der Lamellenzahl und der Größe der Liposomen kann der Beladungsgrad mit Wirkstoffen variiert und die Wirkstofffreisetzung beeinflusst werden. Für hydrophile Wirkstoffe stellen die Membranen eine Permeationsbarriere dar, so dass vor allem bei der Verwendung von multilamellaren Liposomen eine retardierte Wirkstoffabgabe erreicht wird und sich damit ein Depoteffekt ergibt.

Durch ihre natürlichen Grundbausteine (Phospholipide) besitzen Liposomen eine hohe Bioakzeptanz. Ihre Verabreichung erfolgt bevorzugt intravenös. Auch eine orale Gabe ist möglich, jedoch erfordert sie eine Modifizierung der Lipidschicht, um sie vor einer Zerstörung im Gastrointestinaltrakt zu schützen.

Frühe Hoffnungen, Liposomen als *Drug Delivery*-Systeme für Krebstherapeutika einsetzen zu können, erwiesen sich als eine Herausforderung. Es stellte sich heraus, dass Liposomen vom Immunsystem innerhalb weniger Minuten als körperfremd erkannt und durch die Makrophagen in Leber und Milz aus dem Blutstrom eliminiert werden [38]. In den späten 80er Jahren fand man jedoch eine Lösung für dieses Problem. So gelang es, die Liposomenoberfläche mit sperrigen und wasserlöslichen Liganden zu versehen, wie z.B. Polyethylenglykol (PEG), die ein Erkennen durch Antikörper (*Opsonierung*) und damit die Aufnahme durch die Makrophagen stark vermindern (*Stealth*-Effekt). Somit lässt sich die Blutverweildauer deutlich erhöhen [38,39]. Tumorzellen, die infolge einer ausgeprägten Neubildung von Blutgefäßen (Tumor-Angiogenese) gut durchblutet werden, kommen somit entsprechend lange mit den pegylierten Liposomen in Kontakt und nehmen sie in tiefere Kompartimente des Tumors auf, wo nach Auflösung der Liposomenhülle die Eisenoxid-Nanopartikel freigesetzt werden. Nach diesem Prinzip wären diese Tumore bildgebend über MRT erreichbar.

Früheren Auffassungen zufolge gelangten Liposomen durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle. Fusogene Eigenschaften kationischer Lipide stützten diese These [40,41]. Neuere Untersuchungen mit modernen mikroskopischen Techniken haben jedoch gezeigt, dass die Hauptaufnahme über Endozytose erfolgt [42–45]. Nach dem derzeitigen Wissensstand können Endozytosemechanismen auf Grund ihrer Charakteristik, wie Größe aufzunehmender Partikel und Beteiligung von Rezeptoren, weiter in Phagozytose oder Endozytose in engerem Sinne klassifiziert werden [46]. Letztere umfasst rezeptorvermittelte Endozytose sowie Pinozytose [47].

Endozytotisch aufgenommene Partikel wie z.B. Liposomen gelangen ins Endosom und enden oft in Lysosomen [48], in denen sie schließlich enzymatisch abgebaut werden [49].

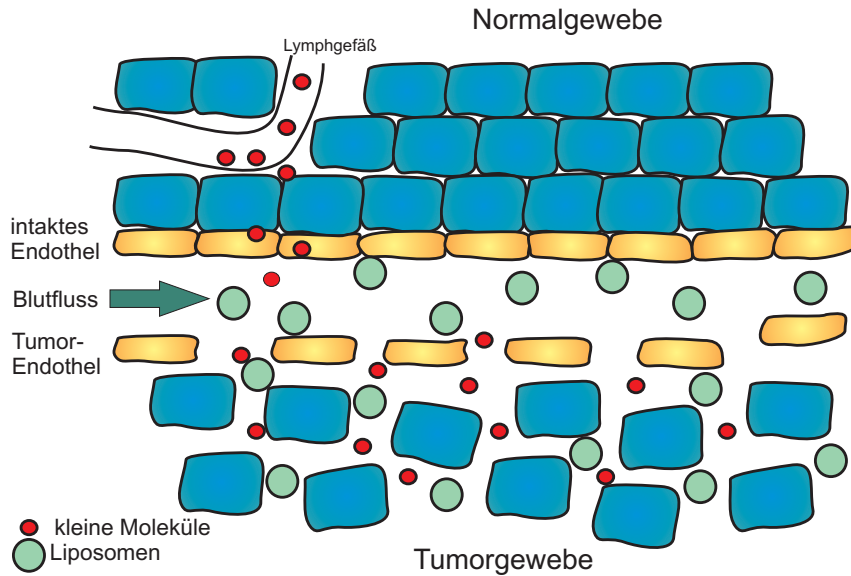


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der Anreicherung von Liposomen im Tumor- und Normalgewebe.

Um eine selektive Anreicherung der Liposomen im Tumorgewebe zu erreichen, kann durch die Verwendung von PEG zusätzlich die Endozytose minimiert und die Blutverweildauer erhöht werden.

Werden Liposomen als *Drug Delivery*-Systeme für Tumortheraeutika eingesetzt, so nutzt man meistens das passive *Tumortargeting* aus. Diese Methode beruht darauf, dass sich wenige Nanometer große Partikel in Tumorgeweben aufgrund der hier erhöhten Permeabilität der Blutgefäße und der vergrößerten Zellzwischenräume von selbst anreichern (siehe dazu Abbildung 1.14) [50–52]. Damit sind keine Liganden für ein spezifisches Binden an die Zielstrukturen notwendig.

Die Freigabe des Wirkstoffs aus den Liposomen erfolgt nach mehreren Mechanismen. Eine langsame Abgabe von wasserlöslichen Wirkstoffen findet durch dessen Diffusion durch die Lipidmembran statt. Durch die Wahl geeigneter Lipide oder zusätzlicher Transportproteine können die Liposomen in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen, z.B. pH-Wert, Temperatur, Enzymwirkung oder einem elektrischen Feld „durchlässig“ werden und so den Wirkstoff an den Zielort abgeben.

Liposomen werden bereits seit einiger Zeit erfolgreich in kosmetischen Hautschutz- oder Heilsalben eingesetzt. Pharmazeutische Produkte folgten den ersten Anwendungen, darunter u.a. Zytostatika (*Caelyx*[®]), Mykostatika (*Pevaryl Lipogel*[®]) und Antibiotika (*MiKasome*[®]). Eines der wichtigsten Einsatzgebiete der Liposomen im *Drug Delivery* ist die Krebstherapie. Mitte der 90er Jahre ist in den USA mit *Doxil*[®] das erste liposomale

Tumorthapeutikum zugelassen worden. Ursprünglich wurde es für die Indikation des häufig bei HIV-Infektionen auftretenden Karposi Sarkoms eingesetzt, aber mittlerweile konnte der Einsatzbereich auch auf andere Krebsvarianten ausgeweitet werden. *Dauno-Xome*[®] und *Myocet*[®] sind zwei weitere zugelassene liposomale Tumorthapeutika. Bei allen drei Arzneimitteln werden Anthracycline (Zytostatika) als Wirkstoffe eingesetzt, die per se zu einer Schädigung der Herzfunktion führen können [53]. Durch die liposomale Verkapselung dieser Wirkstoffe können Nebenwirkungen minimiert werden.

Obwohl die Liposomen zu den am besten untersuchten *Drug Delivery*-Systemen gehören, ist die Anzahl der liposomalen Arzneimittel auf dem Markt immer noch gering. Grund hierfür sind zahlreiche technische Probleme, wie u.a. die geringe Lagerstabilität für die meisten liposomalen Formulierungen und der hohe Preis pharmazeutisch nutzbarer Liposomen.

Neben der liposomalen Verkapselung von Wirkstoffen für eine selektive Anreicherung im Tumorgewebe wird in dieser Arbeit das Ziel verfolgt, Liposomen mit Kontrastmitteln (Eisenoxid-Nanopartikel) für die MRT zu beladen und damit eine spezifische Tumormarkierung zu erreichen.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Kontrastmittel für ein passives bzw. aktives *Drug Targeting* zur molekularen Bildgebung von Tumorzellen zu entwickeln und zu optimieren.

Für das **unspezifische** (passive) *Drug Targeting* von Tumorzellen wurden Eisenoxid-beladene Liposomen hergestellt und die Detektion von Tumorzellen anhand dieser magnetischen Liposomen *in vitro* über Magnetresonanztomographie untersucht.

Für das passive *Targeting* standen dabei folgende Punkte im Vordergrund:

- Optimierung der Herstellung von Eisenoxid-beladenen Liposomen hinsichtlich Stabilität und Beladungsdichte
- Charakterisierung der unspezifischen Aufnahme von konventionellen Liposomen durch Tumorzellen im Vergleich zu Liposomen mit PEG-modifizierter Oberfläche
- Bestimmung der *In-vivo*-Verträglichkeit über *In-vitro*-Proliferations- und Zytotoxizitätstests
- Überprüfung der Eignung von magnetischen Liposomen in Hinblick auf eine Detektierbarkeit von Tumorzellen über Magnetresonanztomographie

Im Bereich der optischen Bildgebung bestand das Ziel, zielgerichtete Fluoreszenzsonden im Nahinfrarot-Bereich zu entwickeln und für eine *In-vivo*-Anwendung zu optimieren.

Für das **spezifische** (aktive) *Targeting* standen dabei folgende Punkte im Vordergrund:

- Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes für die optische Markierung von Tumorzellen im Nahinfrarot-Bereich
- Bestimmung geeigneter *Targets* durch die Bestimmung tumorspezifischer Rezeptoren über Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene
- Charakterisierung der Fluoreszenzintensität von Tumorzellen nach Inkubation mit den hergestellten Fluoreszenzsonden hinsichtlich unterschiedlicher Parameter (z.B. Zellzahl, Sondenkonzentration, Inkubationszeit)
- Bestimmung der Spezifität und Selektivität der Konjugat-Rezeptor-Bindung
- Charakterisierung des Proliferationsverhaltens von Tumorzellen in Gegenwart von Fluoreszenzkonjugaten und Überprüfung auf eine mögliche Zytotoxizität

- Bestimmung der biologischen Aktivität der Sonden, um einen möglichen proliferationsfördernden Effekt festzustellen und zu minimieren
- Nachweis der Bindung des Kontrastmittels an entsprechende Rezeptoren über Immunfluoreszenzfärbungen
- Auswahl eines geeigneten Tumormodells sowie Überprüfung der Effektivität der Fluoreszenzsonden in Bezug auf eine zielgerichtete Detektion der Tumorzellen anhand einer In-vivo-Versuchsreihe

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Art.-Nr.
Aceton	Roth	5025.5
Acetonitril	Roth	HN40.1
Acrylamid Bis - Lösung 30 % (29:1)	Serva	10687
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck	1012001000
Amphotericin B	Biochrom	A2612
Bradford Reagenz	BioRad	500-0006
Bromphenolblau	Merck	108122
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol	01399-1
Calciumchlorid Dihydrat	Merck	2382
Chloroform	Roth	8617.1
Citronensäure Monohydrat	Roth	5110.1
Cholesterol	Sigma	C3045
DAPI	Merck	268298
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	D2650
dNTP - Mix	Fermentas	R1121
1,4 - Dithiothreitol (DTT)	Roth	6908.1
DSPC	Lipoid	565171-1
DSPE	Lipoid	654005-1
rh EGF	Immunotools	11343406
Eisessig	Merck	1.00063.2500
Ethidiumbromid	Merck	111608
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka	03680
fetales Kälberserum (FKS Gold)	PAA Lab.	B11-102

Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller	Art.-Nr.
GBX Entwickler	Kodak	P7042
GBX Fixierer	Kodak	P7167
Glucose (D+)-Monohydrat	Roth	108342
Gentamycin	Biochrom	A2710
(L-) Glutamin Lösung	Roth	3772.1
Glycin	Roth	3908.2
Glycerin	Roth	3783.1
HEPES	Biomol	H3375
ImmuMount	Thermo Scientific	9990402
Isopropanol (100 %)	Merck	109634
Kaliumchlorid	Merck	1.04936
Kaliumhexacyanoferrat	Merck	104971
Kernechtrubin	Chroma	10937
Magermilchpulver	Heirler	3030
Methanol	Roth	8388
Magnesiumchlorid - Hexahydrat	Roth	105833
Methylcellulose	Sigma	M-0512
MPEG 2000 - DSPE	Lipoid	882012-1
Natriumhydroxid Plättchen	Merck	6498.1000
Natronlauge 1M	Roth	K021.1
Natriumchlorid	Merck	106404
Natriumvanadat	Sigma	72060
Paraformaldehyd	Sigma	158127
Penicillin/Streptomycin - Lösung	Invitrogen	15140-122
Poly - (D-) Lysin (PDL)	Sigma	P7280
Random Hexamer Primer	Amersham Biosciences	70RP01-1
Saccharose	Roth	4621.1
Salzsäure 1M	Roth	K025.1
rh SDF-1 α	Immunotools	11343365
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	5136.1
Sephadex G-10 Superfine	Amersham Biosciences	17001001
Sephadex G-15 Superfine	Amersham Biosciences	17002001

Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller	Art.-Nr.
Sephadex G-25 Superfine	Amersham Biosciences	17003101
Sephadex S-300	Amersham Biosciences	17004101
Superdex 200	Pharmacia Biotech	17104310
TEMED	Biorad	161-0801
Titrisol	Merck	109967
Trifluoressigsäure	Fluka	91699
Tris	Sigma	T1378
Triton x-100	Merck	108603
Trizol Reagenz	Invitrogen	15596040
Trypanblau - Lösung (0,9 %)	Sigma	T6146
Trypsin - EDTA	Sigma	59429C
Tween	Calbiochem	655205
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth	8070.1

2.2 Antikörper, DNA - und Proteinstandards, Enzyme und TaqMan - Primer

Tabelle 2.2: Übersicht über verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Art.-Nr.
α Endoglin (H- 300)	Santa Cruz Biotech	sc-20632
Alexa Fluor 488 Ziege - anti - Kaninchen	Molecular Probes	31627
Alexa Fluor 555 Ziege - anti - Maus	Molecular Probes	A31621
α EGFR	Santa Cruz Biotech	sc-03
α pERK 1/2 (Kaninchen)	Cell Signaling Technology	9101S
α ERK 2 (Maus)	Santa Cruz Biotech	sc-1647

Tabelle 2.3: Übersicht über verwendete DNA - und Proteinstandards

DNA - und Proteinstandards	Hersteller	Art.-Nr.
<i>DNA - Standards:</i>		
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas	SM0338
GeneRuler 100 bp DNA	Fermentas	SM0328
Ladder Plus 1 kb DNA Step Ladder	Promega	G6941
<i>Protein - Standards:</i>		
PageRuler Prestained	Fermentas	SM0671
Protein Ladder	Fermentas	SM0671

Tabelle 2.4: Übersicht über verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller	Art.-Nr.
DNase RQ1 (RNase - frei)	Promega	M6101
Ligase, T4 DNA Ligase	Promega	M179A
Pfu DNA Polymerase	Fermentas	EP0501
GoTaq DNA Polymerase (500 units, 5u/μl)	Promega	21489805
Revert Aid H Minus M- MuLV	Fermentas	EP0451
Reverse Transkriptase	Promega	20M530B
RNase A (DNase - frei)	Sigma	R6513
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	4326708
Trypsin	Sigma	T4799

Tabelle 2.5: Übersicht über verwendete TaqMan - Primer

Primer	ID - Nummer	Reportersequenz
hGAPDH	Hs99999905_m1	GCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTT
Endoglin	Hs00164438_m1	TCCCAACGGGCCCCTCACAGCTGGA
EGF	Hs00488293_m1	ACTTAAACTGGGCAAATCACTTGGA
SDF-1 α	Hs00171022_m1	CCCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAA

2.3 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel

Die Eigenschaft von Zellen des *Mononukleären Phagozyten System* (MPS) (veralteter Begriff: *Retikuloendotheliales Systems* (RES)), unspezifisch Partikel aus der Blutbahn aufzunehmen, führte zur Entdeckung von superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (*superparamagnetic iron oxide*, SPIO), die als immunospezifische Kontrastmittel in der MR-Tomographie eingesetzt werden. Neben der Diagnostik von Leber und Milz liegen Schwerpunkte in der Lymphknotendiagnostik sowie auf morphologischen und funktionellen MR-Untersuchungen des Knochenmarks. Weitere Anwendung finden SPIO in der MR-Angiographie, Thrombosedagnostik oder Hyperthermie. Ein weiterer Ansatz finden SPIO in der Verwendung als Kontrastmittel zur Untersuchung der Vaskularisation von Tumoren, wobei dieser Einsatz durch zahlreiche Publikationen für die molekulare Bildgebung bestätigt wird [16].

SPIO ist der Überbegriff für alle in der MR-Tomographie als Kontrastmittel eingesetzten superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel. Innerhalb dieser Substanzgruppe findet sich die Untergruppe der Partikel mit vergleichsweise größerem Durchmesser (etwa 50 - 150 nm oder größer), die historisch bedingt auch als SPIO bezeichnet werden. Dagegen wird die Untergruppe der Partikel mit kleinerem Durchmesser (um etwa 20 nm) abgegrenzt und als Ultrakleine Superparamagnetische Eisenoxidpartikel bezeichnet (*Ultra-small SPIO*, USPIO). Die als SPIO bekannten Partikel sind meist mit Polymeren, wie z.B. Dextran oder Carboxydextran, umhüllt, um die Eisenoxide vor Oxidation zu schützen und Antigene oder Antikörper an die Hülle binden zu können, um damit Zellen über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose zu markieren. Ein generelles Problem jedoch besteht in der Anreicherung der Partikel in Leber und Milz durch unspezifische Phagozytose von MPS-Zellen.

Die nachfolgende Tabelle 2.6 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Eisenoxid-Nanopartikel.

Tabelle 2.6: Übersicht über verwendete Eisenoxid-Nanopartikel

Partikel	Eisenkern	Hülle	Partikeldurchmesser	Hersteller
Resovist	Maghemit/ Magnetit	Carboxyl- dextran	60 nm	Schering
kolloidales Fe ₃ O ₄	Magnetit	keine	10 nm	Dr. N. Buske
Nanomag 70 (N70)	Maghemit	Dextran	70 nm	Micromod

Maghemit = Fe₂O₃; Magnetit = Fe₃O₄

2.4 Liposomen

Die verwendeten Bestandteile für die Herstellung der Liposomen sind in den nachfolgenden Abbildungen 2.1, 2.2 und 2.3 dargestellt.

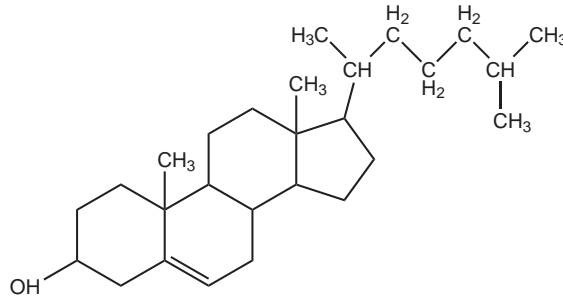


Abbildung 2.1: Cholesterol

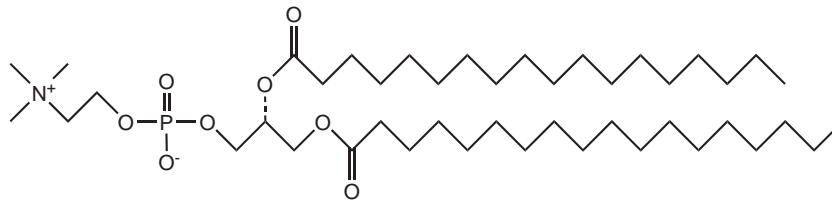


Abbildung 2.2: DSPC (1,2-Diateroyl-sn-glycero-3-phosphocholin)

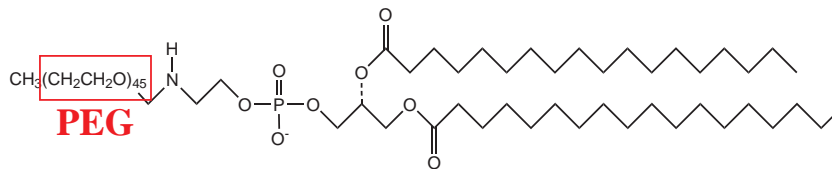


Abbildung 2.3: DSPE - PEG (2000)

(1,2-Diateroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-poly(ethylenglycol)2000])

Tabelle 2.7: Übersicht über verwendete Liposomen - Membranbestandteile

Membranbestandteil/Lipid	Hersteller	Art.-Nr.
Cholesterol (386 g/mol)	Sigma - Aldrich	C3045
DSPC (790 g/mol)	Lipoid GmbH	565
DSPE - PEG (2000) (2805 g/mol)	Lipoid GmbH	882

2.5 Nahinfrarot (NIR) - Fluoreszenzfarbstoffe

Ansprüche an Fluoreszenzfarbstoffe:

- Emissionsmaximum im nahen Infrarot-Bereich ($\lambda \geq 700$ nm; höhere Gewebepenetration, geringe Gewebeabsorption)
- Photostabilität (kein frühzeitiges „Ausbleichen“)
- N-Hydroxysuccinimid (NHS) - Estergruppe (Kopplung)
- hohe Fluoreszenzquantenausbeute
- keine zytotoxischen Eigenschaften

Diese Kriterien erfüllten u.a. die Cyaninfarbstoffe Cy7 und IRDye 800CW und wurden daher für die In-vitro-/In-vivo-Versuche dieser Arbeit jeweils als NHS-Ester ausgewählt. Für die immunzytochemischen Färbungen war es möglich, in einem niedrigeren Wellenlängenbereich zu messen. Daher wurde hier der Cyaninfarbstoff Cy 3 verwendet. In der Tabelle 2.8 sind die verwendeten Fluoreszenzmarker tabellarisch dargestellt.

Tabelle 2.8: Übersicht über verwendete Fluoreszenzmarker

Fluoreszenzmarker	Hersteller	Art.-Nr.
Cy 3 NHS - Ester	GE Healthcare	PA13101
Cy 5 NHS - Ester	GE Healthcare	15101
Cy7 NHS - Ester	GE Healthcare	17101
DAPI	Sigma - Aldrich	32670
IRDye 800CW NHS - Ester	LiCor Biociences	929-70020

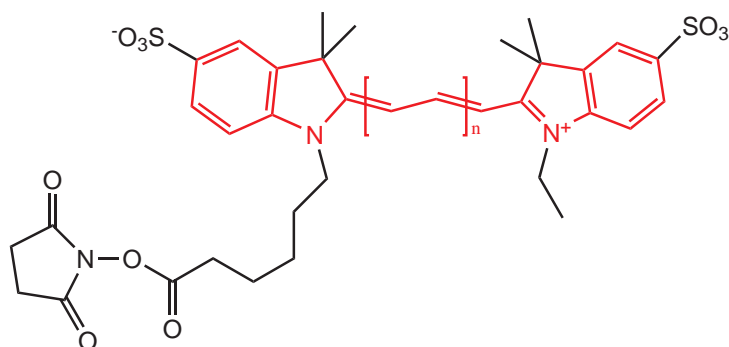
2.5.1 Cyanin - Farbstoffe

Die Cyaninfarbstoffe sind Fluoreszenzfarbstoffe auf Polymethinbasis, die sich durch verbesserte fluoro-optische, chemische und thermische Eigenschaften im Vergleich zu anderen erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffen auszeichnen. Dadurch sind die Cyanine gerade für Anwendung im Bereich der optischen Bildgebung interessant geworden.

Die Cyanine mit der allgemeinen Struktur $R_2 N^+ = CH[CH=CH]_n - NR_2$ wurden in DMSO gelöst und waren bei 4 °C über mehrere Wochen lagerungsfähig. Die Cyanine zeichneten sich u.a. durch eine NHS-Estergruppe aus, die eine Konjugation an freie Aminogruppen tumorspezifischer Liganden/ Antikörper zuließen. In Abbildung 2.4 ist die Grundstruktur der Cyaninderivate dargestellt und in der Tabelle 2.9 sind die verwendeten Cyaninfarbstoffe zu erkennen.

Tabelle 2.9: Übersicht über die Cyaninfarbstoffe

	Cy 3	Cy 5	Cy 7
Molekulargewicht [g/mol]	766	792	818
Absorptionsmaximum [nm]	550	649	747
Extinktion [$M^{-1}cm^{-1}$]	150.000	250.000	200.000
Emissionsmaximum [nm]	570	670	776
Quantenausbeute	$\geq 0,15$	$\geq 0,28$	-

**Abbildung 2.4:** Allgemeine Struktur der Cyaninderivate.

(n = 1: Cy 3; n = 2: Cy 5; n = 3: Cy 7; rot = delokalisiertes π -Elektronensystem)

2.5.2 IRDye 800CW

Ebenso wie die Cyaninfloureszenzfarbstoffe besitzt auch der IRDye 800CW (LiCor Biosciences) eine NHS-Estergruppe, über die der Farbstoff unter identischen Kopplungsbedingungen an ausgewählte Peptide/Antikörper konjugiert wurde. Aufgrund seiner Absorption und Emission (siehe Tabelle 2.10 und Abbildung 2.6) bei längeren Wellenlängen ist im Vergleich zu den anderen Cyaninen die Eindringtiefe ins Gewebe erhöht und der Hintergrund aufgrund der geringen Gewebeeigenfluoreszenz während der Messung vermindert. In Abbildung 2.5 ist die Struktur des IRDye 800CW Farbstoffes dargestellt. Er wird im weiteren Verlauf der Arbeit als IRDye 800 bezeichnet.

Tabelle 2.10: Übersicht über IRDye 800CW NHS - Ester

	IRDye 800CW
Molekulargewicht [g/mol]	1166,2
Absorptionsmaximum [nm]	774
Extinktion [$M^{-1}cm^{-1}$]	300.000
Emissionsmaximum [nm]	789
Quantenausbeute	-

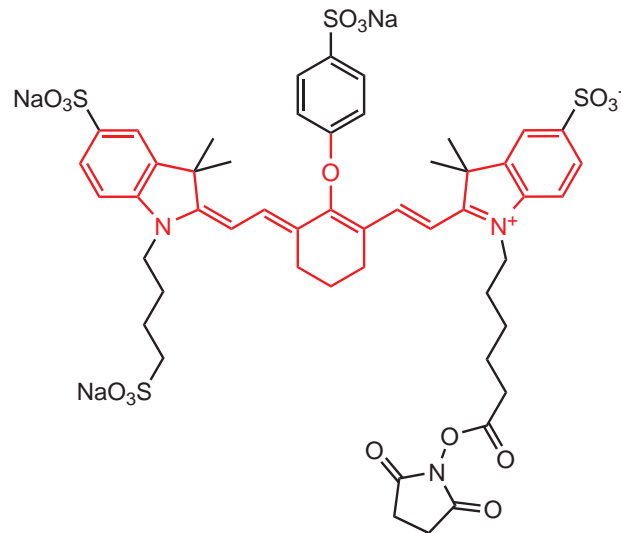


Abbildung 2.5: IRDye 800CW (rot = delokalisiertes π -Elektronensystem)

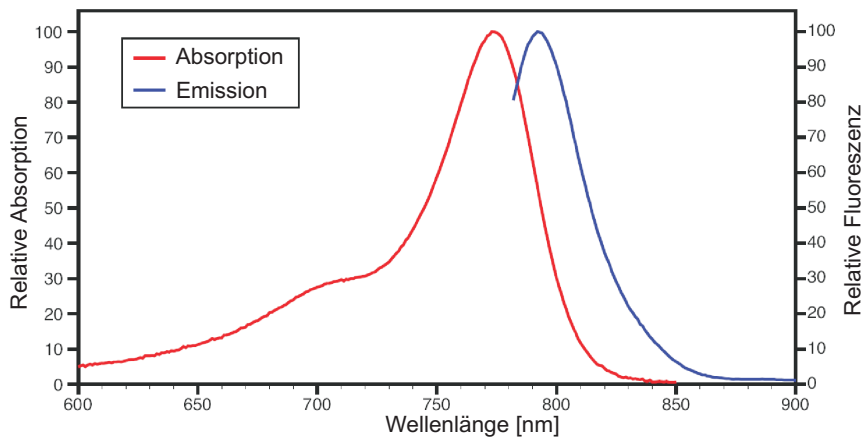


Abbildung 2.6: Spektrum des IRDye 800CW NHS - Esters.

2.6 Verwendete kommerzielle Testsysteme

Tabelle 2.11: Übersicht über verwendete Testsysteme

Testsysteme	Hersteller	Artikelnummer
TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems	4331182
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega	E2920
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche	11644793001
CyQuant Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes	c-7026

2.7 Nährmedien, Gebrauchs- und Pufferlösungen

2.7.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Astrozytenmedium

Zusammensetzung DMEM (Gibco BRL Invitrogen, 42430) mit:

4,5 g/l Glucose
4 mM L - Glutamin
25 mM HEPES ohne Pyruvat

ansetzen: 515 ml DMEM
+ 60 ml FKS (10 %)
+ 6 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
+ 12 ml L - Glutamin (3 %)

Endothelzellmedium

Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) (PromoCell, C-22010)

Supplement Pack (PromoCell, C-39210)

ansetzen: 557 ml ECGM
+ 15 ml FKS (5 %)
+ 12 ml L - Glutamin (3,0 %)
+ 6 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
+ 0,5 ml rhEGF (0,1 ng/ml)
+ 0,5 ml hbFGF (1 ng/ml)
+ 2 ml Heparin (0,4 %)

Stimulationsmedium (serumfrei)

Zusammensetzung DMEM (Gibco BRL Invitrogen, 42430) mit:

4,5 g/l Glucose
4 mM L - Glutamin
25 mM HEPES ohne Pyruvat

ansetzen: 575 ml DMEM
+ 5,93 g BSA (1 %)
+ 6 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
+ 12 ml L - Glutamin (3 %)

weitere Lösungen und Puffer

- Fetal Bovine Serum (FKS Gold)	PAA, A15-649
- Penicillin/Streptomycin - Lösung	Gibco BRL Invitrogen, 15140-122
- OPTI - MEM Reduced Serum Medium	Gibco BRL Invitrogen, 11058-021
- BSA - Stammlösung	10 %ig (w/v) in PBS - Puffer ansetzen, aliquotieren, bei -20 °C einfrieren
- 5 x Colorless GoTaq Flexi Buffer (1 ml)	Promega, 19118205
- dNTP - Mix (10 mM each; 1 ml)	Fermentas, R0192
- PBS - Puffer pH 7,2	0,20 g KCl (→ 2,7 mM) 0,24 g KH ₂ PO ₄ (→ 1,8 mM) 8,00 g NaCl (→ 136 mM) 1,44 g Na ₂ HPO ₄ (→ 10 mM) ad 1 l mit H ₂ O bidest., autoklavieren
- Trypsin/EDTA - Lösung (Passagieren von Zellen)	24 ml PBS - Puffer 1 ml 2,5 % Trypsin (→ 1500 Units/ml) 37 mg EDTA (→ 4 mM) steril filtrieren, bei -20 °C lagern
- DNase - Lösung	1 mg DNase in 5 ml H ₂ O bidest., steril filtrieren
- Ampicillin - Stammlösung (0,14 M)	500 mg Ampicillin (50 mg/ml) ad 10 ml mit H ₂ O bidest.
Die Antibiotika - Stammlösungen wurden sterilfiltriert (FP30/0,2 CA-S Filtereinheit, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und bei -20° C gelagert.	
- Glukose - Stammlösung (2 M, 40 % w/v)	200 g Glukose 500 ml H ₂ O bidest. bei 60 °C im Wasserbad gelöst.
- MgCl ₂ - Stammlösung (1 M)	20,33 g MgCl ₂ x 2 H ₂ O bidest. ad 100 ml mit H ₂ O bidest.
- Kaliumacetat - Stammlösung (3 M) pH 5,5	29,44 g Kaliumacetat ad 100 ml mit H ₂ O bidest.

- EDTA - Stammlösung (0,5 M) pH 8,0	186,1 g EDTA 800 ml H ₂ O bidest. 20 g NaOH-Plätzchen pH- Wert einstellen, ad 1 l mit H ₂ O bidest.
- GTE - Puffer (Birnboim & Doly, 1979)	2,5 ml 2 M Glucose - Stammlsg. (→ 50 mM) 2,5 ml TRIS/HCl - Lösung pH 8 (→ 25 mM) 2,0 ml EDTA - Lösung pH 8 (→ 10 mM) ad 100 ml mit H ₂ O bidest. autoklavieren
- NaOH - Lysispuffer	2,0 ml 10 N NaOH - Stammlsg. (→ 0,2 N) 10 ml SDS - Stammlösung (→ 1 %) ad 100 ml mit H ₂ O bidest.
- TRIS/HCl - Stammlösungen (1 M) pH 6,8 bzw. 7,6	121,1 g TRIS 800 ml H ₂ O bidest. pH- Wert einstellen, ad 1 l mit H ₂ O bidest.
- Kaliumacetat - Puffer	60 ml 5 M Kaliumacetat - Lsg. 12 ml Eisessig 29 ml H ₂ O bidest.
- TE - Puffer	1 ml TRIS/HCl - Stammlösung 200 µl EDTA - Stammlösung pH- Wert einstellen, ad 100 ml mit H ₂ O bidest.

Membranisolierung

- Lysispuffer pH 7,4 (Zellmembranen)	5 mM HEPES 2 mM Natriummetavanadat
- Aufnahmebuffer pH 7,4 (Zellmembranen)	20 mM HEPES 140 mM NaCl 2 mM Natriummetavanadat

Zellhomogenatisierung

- Tritonlysispuffer	50 mM	TRIS pH 7,8
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 %	Triton-X-100
	2 mM	Natriummetavanadat

SDS - PAGE und Western Blot

- Probenpuffer	0,23 g	SDS (→ 80 mM)
(SDS - Ladepuffer)	1,25 ml	Gelpuffer II
	1,00 ml	Glycerin (→ 10 % v/v)
	0,50 ml	2 - Mercapto - Ethanol (→ 5 % v/v)
	7,25 ml	H ₂ O bidest.
- Probenpuffer (4x) für geringe Proteinkonzentrationen	1,0 g	SDS (→ 251 mM)
	6,3 ml	Gelpuffer II
	5,0 ml	Glycerin (→ 36 % v/v)
	2,5 ml	2 - Mercapto - Ethanol (→ 18 % v/v)
- Elektrodenpuffer pH 8,2 - 8,3	15,2 g	TRIS pH 8,2 - 8,3 (→ 25 mM)
	72,0 g	Glycin (→ 0,19 M)
	5,00 g	SDS (→ 3,5 mM)
		ad 5 l mit H ₂ O bidest.
- Gelpuffer I pH 8,8	1,5 M	TRIS/HCl
	0,4 %	SDS
- Gelpuffer II pH 6,8	0,5 M	TRIS/HCl
	0,4 %	SDS
- Lauffrontanzeiger	gesättigte Bromphenolblaulösung	
- Transferpuffer pH 9,0	25 mM	TRIS
	192 mM	Glycin
	10 %	(v/v) Methanol

- TBST (TRIS buffered Saline Tween) pH 7,5	50 mM 150 mM 1 mM 0,1 %	TRIS NaCl EDTA (v/v) Tween
- "Strip" - Puffer pH 2,5	0,1 M	Glycin
- "Strip" - Waschpuffer pH 7,5	0,1 M	TRIS
- TAE - Stammlösung (10x)	48,4 g 20 ml 11,4 ml	TRIS (→ 40 mM) 0,5 M EDTA (→ 1 mM) Eisessig (→ 0,2 M)
		pH 8,0 einstellen, ad 1 l mit H ₂ O bidest.
- Auftragspuffer (6x)	25 µl 25 µl 1,5 ml	Bromphenolblau (→ 0,25 %) Xylencyanol (→ 0,25 %) Ficoll (→ 15%)
		ad 10 ml mit H ₂ O bidest.

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.16: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Art.-Nr.
Membranfilter (0,45 µm)	Sartorius	18406-47-N
Ultrafiltrationsmembran YM10	Amicon Millipore	13622
Einmalkanüle Fine-Ject (0,7 x 30 mm)	Henke Sass Wolf	4710007040
Einmalspritzen, Terumo Syringe	Becton Dickinson	DG87701
Zellkultur		
Kryoröhrchen CryoTube Vials	Nunc	379418
Petrischalen (35 x 10 mm)	Sarstedt	83.1800
Petrischalen (100 x 20 mm)	Sarstedt	83.1802
Petrischalen (150 x 20 mm)	Sarstedt	83.1803
Pipetten, serologische (5 ml)	Sarstedt	86.1253.001
Pipetten, serologische (10 ml)	Sarstedt	86.1254.001

Tabelle 2.16: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller	Art.-Nr.
Pipetten, serologische (25 ml)	Sarstedt	86.1685.001
Pipettenspitzen (0,5- 10 µl)	Roth	9260.1
Pipettenspitzen (5 - 100 µl)	Roth	B002.1
Pipettenspitzen (100 - 1000 µl)	Roth	2679.1
Röhrchen (30 ml)	Sarstedt	60.543.001
Skalpell	neo Lab	11568
Sterilfilter Filtropur (0,20 µm)	Sarstedt	83.1826.001
Zellkulturflaschen (25 cm ²) Vented Cap	Sarstedt	83.1810.302
Zellkulturflaschen (75 cm ²) Vented Cap	Sarstedt	83.1813.002
Zellkulturplatten (6 - Well)	TPP	92006
Zellkulturplatten (24 - Well)	Costar Corporation	3524
Zellkulturplatten (96 - Well)	TPP	92096
Zellkulturplatten (96 - Well, U - shape)	greiner bio - one	650185
Zellschaber (24 cm)	TPP	99002
Zentrifugenröhrchen (10 ml)	Sarstedt	62.9924.284
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt	62.547.254
Immunzytochemie		
Deckgläschen (22 x 22 mm)	Menzel Gläser	BB022022A1
Objektträger Superfrost (76 x 26mm)	Roth	1879
Western Blot		
Blottingpapier, Protean®	Biorad	1703969
Hyperfilm ECL (18 x 24 cm)	GE Healthcare	RPN3103K
PVDF - Membran Hybond - P	GE Healthcare	RPN1416F
PE - Schlauchfolie	Eydam	14012
Nitrocellulose Membran BioMax MS - 1 Film (18 x 24 cm)	Kodak	8222648001EA
Optical Film Compression Pad	Applied Biosystems	4333292
Real Time rt - PCR		
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt	95.1994
Real Time PCR Platten (96 - Well)	Sarstedt	72.1978.502

2.9 Geräte

Tabelle 2.17: Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Rührzelle	Millipore 8050
ABI PRISM-7000 Sequence Detection System (PCR)	Applied Biosystems
Analysenwaage L610	Sartorius Laboratory
Begasungsbrutschrank B 5060 EC / CO ₂	Heraeus
Elektrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech
Filmkassette Hypercassette (18 x 24 cm)	Amersham Biosciences
Fluoreszenzspektrometer F-2000	Hitachi
Heißluft-Sterilisator UT 5050 EK	Heraeus
Heizblock	Eppendorf
Hochdruckdampf-Sterilisator	Schütt
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Liposo Fast Extruder	Avestin Inc.
Magnetrührer MR 2000	Heidolph
Mikroprozessor pH-Meter 762	Knick
Mikroskop, invers (Zellkultur) CK2	Olympus
Mikroskop Axiovert 200M (invers) + Apotome	Zeiss
Mikrowellengerät	Panasonic
MRT-Scanner (3 Tesla Philips Achieva)	Philips Medical Systems
NEUBAUER-Zählkammer	Hecht-Assistent
Odyssey Infrared Imaging System	LiCor Biosciences
Semi-Dry-Blotter Trans-Blot SD	Bio-Rad Laboratories
Schüttler (Western Blot)	Gerhardt
Sterile Werkbank HeraSafe	Heraeus
Superdex Peptide PC 3.2/30 (Trennsäule)	Pharmacia Biotech
Thermocycler T Gradient	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
UV/VIS-Spektrometer U-2000	Hitachi
Vertikal-Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories
Vortex-Mixer VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad	Memmert

3 Methoden

3.1 Allgemeine Hinweise

Bei der Kultivierung von Zellen ist eine gute Laborpraxis von grundlegender Bedeutung. Nur durch strenge Sorgfalt bei den einzelnen Arbeitsschritten lässt sich eine mikrobiologische Kontamination verhindern.

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen (Porendurchmesser der Filter 0,2 μm).

Die Erhaltungskulturen wurden in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die regelmäßige mikroskopische Untersuchung der Zellkulturen erfolgte vor und nach jedem Arbeitsschritt am Invertmikroskop (CK2, Olympus, Hamburg), da eine Beurteilung des Aussehens der Zellkultur einen Aufschluss über den Versuchserfolg ergeben kann. Alle verwendeten Kulturmedien, PBS-Puffer sowie Trypsin/EDTA wurden steril filtriert und unmittelbar vor dem Gebrauch im 37 °C Wasserbad temperiert. Für die Versuchsreihen wurden nur Zellen bestimmter Passagen verwendet. Um morphologische Veränderungen, die durch häufiges Passagieren auftreten können, zu vermeiden, wurden maximal 12 Passagiervorgänge vorgenommen. Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter der Sterilbank durchgeführt. Diese wurde vor Gebrauch zunächst mit 70 % Ethanol gereinigt und dann durch Umluftfiltration in einen sterilen Zustand gebracht.

Die verwendeten Materialien für die Zellkultur waren entweder vom Hersteller steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Verwendung in einem Autoklaven über 20 Minuten bei 121 °C dampfsterilisiert. Sofern bei einigen der folgenden Methoden und Inkubationsschritten keine Temperaturen angegeben sind, wurden diese bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2 Zellkultur

In den Jahren 1951/1952 wurde erstmals aus menschlichen Zellen eine dauerhafte Zelllinie außerhalb des Organismus angelegt (*HeLa-Zellen*, [54]). Mittlerweile sind Zelllinien diverser Zellarten unterschiedlicher Organismen gut charakterisiert, etabliert und werden seitdem als immortalisierte Zelllinien in biologischen und medizinischen Laboren kultiviert. Sie sind aus der heutigen Wissenschaft nicht mehr wegzudenken, um etwa die Wirkung von Arzneistoffen oder Giften auf Zellen zu untersuchen und bieten daher in vielen Fällen eine Alternative zu den ethisch hoch umstrittenen Tierversuchen.

Bei der *Primärkultur* handelt es sich um Zellen, die unmittelbar vor ihrer Kultivierung im Labor einem Organismus entnommen wurden. Die Wachstumsgeschwindigkeit und Teilungsaktivität der Primärkultur sind stark von der jeweiligen Zellart abhängig. Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte endet die Teilungsaktivität bei den meisten Zellarten (z. B. menschliche Fibroblasten) durch dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontakthemmung) und sterben sukzessiv ab.

Im Unterschied zu Primärzelllinien sind etablierte *Zelllinien* nicht in ihrer Lebensdauer begrenzt (immortalisierte Zellen). Sie lassen sich über einen nahezu unbegrenzten Zeitraum kultivieren und eignen sich zur Untersuchung grundlegender Zellfunktionen sowie für immunologische, virologische oder toxikologische Tests. Möglich wird ihre „Unsterblichkeit“ durch eine Modifikation der genetischen Informationen, die zu einer Änderung der Eigenschaften - insbesondere des Wachstumsverhaltens - der Zellen führt (*Transformation*). Einerseits lassen sich diese Zellen aus Tumoren gewinnen (Tumorzelllinien), andererseits ist die Transformation während der Kultivierung der Zellen zu erreichen, indem sie karzinogenen Substanzen oder ionisierender Strahlung ausgesetzt werden. Trotz der Veränderung einiger Zelleigenschaften kann die entsprechende Zelllinie aufgrund weiterhin bestehender Gemeinsamkeiten mit der ursprünglichen Zellart bei vielen Untersuchungen verwendet werden. Die Vergleichbarkeit des Ausgangsmaterials ist beim Einsatz von etablierten Zelllinien gegeben und daher bei verschiedenen Testverfahren von großem Vorteil.

Die in dieser Arbeit verwendeten etablierten humanen Zelllinien sind in der Tabelle 3.1 aufgeführt, auf die anschließend näher eingegangen wird.

3.2.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten etablierten humanen Zelllinien

Zelllinie	Typ	Herkunft
HT 29	Kolonkarzinom	Molekulare Onkologie (Universität Kiel)
MDA-MB-231	Mammakarzinom	Toshiyuki Yoneda (University of Texas, San Antonio)
MCF7	Mammakarzinom	Neurochirurgie (Universität Kiel)
HUVEC	Endothelzellen	PromoCell GmbH (Heidelberg)
A 764	Gliomazellen	Neurochirurgie (Universität Kiel)
U 118	Gliomazellen	Deutsches Krebsforschungsinstitut (Heidelberg)
U 343	Gliomazellen	Deutsches Krebsforschungsinstitut (Heidelberg)

- **HT 29-Zelllinie** ATCC: HTB-38

Die Zelllinie HT 29 wurde 1964 aus einem primären Adenokarzinom des Kolons einer 44 Jahre alten Frau etabliert. Dieser Tumor wird als heterotransplantabel beschrieben und bildet gut differenzierte Tumore ersten Grades aus. HT 29-Zellen besitzen einen hypertriploiden Karyotyp mit 17,5 % Polyploidie. Die Verdopplungszeit beträgt 40-60 h [55]. Als Kulturmedium wurde für die adhärent wachsenden Tumorzellen Astrozytenmedium mit 10 % fetalem hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS, 10.000 Einheiten/10.000 µg pro ml) verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

Charakteristika: mutiertes *Adenomatous Polyposis Coli-Gen* (APC), wenig freies β-Catenin

- **MDA-MB-231-Zelllinie** ATCC: HTB-26

MDA-MB-231-Brusttumorzellen wurden ursprünglich aus Flüssigkeitsansammlungen im Pleuraraum (pleurale Effusion) einer 51 Jahre alten kaukasischen Frau mit weit verbreiteten Metastasen eines invasiven Adenokarzinoms der Brust (*invasive ductal carcinoma*, IDC) isoliert [56]. Durch die 23-stündige Verdopplungszeit wachsen die hoch invasiven MDA-Zellen schnell zu einem konfluenten *Monolayer* [57]. Als Kulturmedium wird für die adhärent wachsenden MDA-MB-231-Zellen Astrozytenmedium mit 10 % fetalem hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS, 10.000 Einheiten/10.000 µg pro ml) verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

Charakteristika: Verlust der Expression der E-Cadherin-, Östrogen und Progesteronrezeptoren, hohes Metastasierungspotential, hoch invasiv [58].

- **MCF7-Zelllinie** ATCC: HTB-22

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF7 wurde 1970 aus dem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen Frau gewonnen, deren metastasiertes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war [59]. Die epithelialen MCF7-Zellen besitzen einen hohen Differenzierungsgrad und wachsen als Monolayer mit rosettenförmiger Anordnung. Die zytogenetische Analyse der gut charakterisierten Zelllinie ergab einen fast tetraploiden Chromosomensatz mit durchschnittlich 89 Chromosomen. MCF7-Zellen weisen unter anderem Rezeptoren für Estrogene, Androgene und Progesteron auf und gelten aufgrund des hohen Estrogenrezeptorgehalts von 70 bis 90 fmol/mg Protein [60] als hormonabhängig. Als Kulturmedium wird für die schnell adhärent wachsenden MCF7-Zellen (Verdopplungszeit etwa 29 Stunden) Astrozytenmedium mit 10 % fetalem hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS, 10000 Einheiten/10000 µg pro ml) verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

- **HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) - Zelllinie** ATCC: CRL-1730

Die in dieser Arbeit verwendeten HUVE-Zellen wurden aus dem Endothel (Intima) der Nabelschnurvenen von Neugeborenen isoliert. Sie wurden von der Firma PromoCell in proliferierender Form zu 500.000 Zellen in einer TC-75CN-Kulturflasche bezogen. Sie sind bereits vom Hersteller negativ auf das Vorhandensein von Bakterien, Pilzen und humanpathogenen Viren, wie HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet worden. Als Wachstumsmedium wird für die adhärent wachsenden HUVE-Zellen (Verdopplungszeit etwa 36 Stunden) Endothelzellmedium verwendet, welches mit einer Zusatzlösung (Supplement Mix) ergänzt wurde. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

Charakteristika: Expression von Stickstoffmonoxid (NO) zur Regulation des Tonus der Gefäßmuskulatur [61].

- **U 118: Humane Glioblastom Zelllinie** ATCC: HTB-15

Ein von J.Ponten und Mitarbeitern etablierter maligner Hirntumor (Glioblastoma multiforme; Klassifikation: Grad IV) von einem 50 Jahre alten kaukasischen Mann.

- **U 343: Humane Glioblastom Zelllinie**

Ein von J.Ponten und Mitarbeitern 1968 etablierter maligner Hirntumor (Glioblastoma multiforme; Klassifikation: Grad IV) von einer kaukasischen Person. Anfärbung von GFAP (*glial fibrillary acidic protein*; Astrozyten-Marker): 95 % Zellen positiv (einheitliche Morphologie) [62]

- **A 764: Humane Glioblastom Zelllinie** (Klassifikation: Grad IV)

Charakteristika der verwendeten Gliomazellen: Gliomazellen infiltrieren destruktiv z.T. als einzelne Zellen das umgebende Hirngewebe (Gehirnparenchym) [63,64].

3.2.2 Kultivierung der Zellen

3.2.2.1 Kulturbedingungen

Aufgrund der Proliferation der Zellen erfolgt eine Anreicherung von Abfallprodukten im Medium sowie eine Abnahme der zugesetzten Nährstoffe. Durch einen damit verbundenen Anstieg des pH-Wertes kommt es etwa alle drei bis vier Tage zu einem Farbumschlag des im Nährmedium enthaltenen Indikators Phenolrot von rot nach gelb. Befinden sich die Zellen in einer subkonfluenten Wachstumsphase, so wird das verbrauchte Nährmedium abgesaugt und durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Menge beträgt je nach Kulturflaschengröße 10 ml (TC-25 CN; 25 cm²) bzw. 20 ml (TC-75 CN; 75 cm²).

3.2.2.2 Kultivierung von Brusttumor- und Gliomazelllinien

Die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37 °C in 5 % (v/v) CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Als Kulturgefäße dienten meist TC-75 CN Gewebekulturflaschen. Sowohl MDA-MB-231- und MCF7-Zellen als auch die Gliomazelllinien U 343, U 118 und A 764 wachsen sehr gut in einem Medium, welches für Astrozyten verwendet wird. Das hier verwendete Astrozytenmedium setzt sich folgendermaßen zusammen:

DMEM - A - Medium:	DMEM-Medium	(Invitrogen)
	FKS	(→ 10 %) (PAA)
	Penicillin/Streptomycin	(→ 1 %) (Invitrogen)
	L - Glutamin	(→ 3 %) (Roth)

Das Medium wurde als 500 ml Lösung angesetzt und die sterilfiltrierten Zusätze hinzugegeben. Eine 500 ml Flasche Astrozytenmedium ist bei einer Temperatur von 4 °C ca. 2-3 Wochen lagerfähig. Sobald der Zellrasen in den Kulturgefäßen optische Konfluenz erreichte, wurden die Zellen subkultiviert oder für Versuche ausgesät. Die Subkultivierung erfolgte ein- bis zweimal pro Woche.

3.2.2.3 Kultivierung der HUVE - Zellen

Aufgrund einer möglichen Veränderung des Expressionsmuster sowie im Wachstumsverhalten lassen sich primäre HUVE - Zellen in Kultur nur bis zur Subkultur 12 - 13 halten; für Versuche sollten jedoch ausschließlich Zellen verwendet werden, die sich in einer Passage ≤ 10 befinden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C , 5% (v/v) CO_2 -Konzentration und gesättigter Wasserdampfatosphäre, wobei die Zellen alle zwei Tage frisches Medium erhielten. Für die kontinuierliche Haltung der Zellen wurden kleine Kulturflaschen (25 cm^2) verwendet, bestimmte Arbeitsschritte, beispielsweise Zellmembranisolierungen für *Western Blots*, erforderten jedoch eine Kultur auf großen Zellkulturflaschen (75 cm^2). Als Wachstumsmedium diente das *Endothelial Cell Growth Medium* (siehe Unterpunkt 2.12), welches mit einem *Supplement Mix* (siehe Unterpunkt 2.12) ergänzt wurde. Nach Zugabe der Lösung weist das Nährmedium folgende Wachstumsfaktoren auf:

ECGS/H	(Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin) ($\rightarrow 0,4\%$ (v/v))
FKS	(Fetales Kälberserum) ($\rightarrow 5,0\%$ (v/v))
rhEGF	(Epidermal Growth Factor) (0,1 ng/ml)
hbFGF	(Basic Fibroblast Factor) (1,0 ng/ml)

Es hatte sich gezeigt, dass die Vitalität der Zellen am längsten erhalten bleibt, wenn sie nicht häufiger als einmal pro Woche subkultiviert wurden.

3.2.3 Subkultivierung der Zellen

3.2.3.1 Subkultivierung der nicht - endothelialen Zellen

Zunächst wurde das Wachstumsmedium, PBS - Puffer und Trypsinlösung in einem Wasserbad bei 37°C für 20 min aufgewärmt. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen einmal mit 5-10 ml warmen PBS - Puffer gespült. Überschüssiger Puffer wurde mit Hilfe der Vakuumpumpe abgesaugt. In jede kleine Kulturflasche (25 cm^2) wurden nun 3 ml, in jede große Kulturflasche (75 cm^2) 5 ml warme Trypsin/EDTA - Lösung (0,1 % Trypsin (1500 BAEE Units/ml, Sigma-Aldrich) und 0,2 % EDTA in PBS - Puffer) pipettiert. Die Lösung wurde durch Schwenken der Flasche gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt und nach 15 Sekunden wieder sorgfältig abgesaugt. Während der Inkubation für 5 min bei 37°C und 5 % CO_2 -Konzentration im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab. Die Zellen konnten anschließend in 5 ml FKS -haltigen Astrozytenmedium

aufgenommen werden. Bestandteile des FKS inaktivieren Trypsin, so dass eine Trypsin-Neutralisierungslösung hier nicht notwendig ist. Die Zellen wurden in der NEUBAUER-Kammer gezählt, auf die gewünschte Zellzahl verdünnt, wieder ausgesät und weiter bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

3.2.3.2 Subkultivierung der endothelialen Zellen (HUVE - Zellen)

Die Subkultivierung von HUVE-Zellen erfolgte prinzipiell entsprechend der o.g. Vorgehensweise. Da diese Zellen jedoch empfindlicher als die übrigen eingesetzten Zellen sind, wurde der Protokollablauf leicht abgeändert. HUVE-Zellen bilden auf den Plastikoberflächen der Kulturbedeälter keinen geschlossenen Zellrasen. Es ist daher wichtig, die Zellen bereits bei einer optischen Konfluenz von höchstens 80 % zu subkultivieren. Vor der Trypsinbehandlung wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen (s.o.). Die fünfminütige Inkubation in Gegenwart von Trypsin erfolgte bei Raumtemperatur (eine Inkubation bei 37 °C hat sich als unvorteilhaft erwiesen), wobei wiederum nach 15 Sekunden überschüssige Trypsinlösung sorgfältig entfernt wurde. Die Endothelzellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:5 in frischem serumhaltigen Endothelzellmedium ausgedünnt („gesplittet“) und dann ausgesät.

3.2.4 Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zellen

3.2.4.1 Einfrieren und Lagern der Zellen

Wurden bestimmte Zellen oder Zelllinien vorübergehend nicht benötigt, so wurden diese bis zu einem späteren Gebrauch eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Zu diesem Zweck ließ man die Zellen zunächst bis zum Erreichen der optischen Konfluenz wachsen. Die Kultivierung erfolgte bevorzugt in großen Kulturflaschen (75 cm²), da die Zellen in Aliquots von zwei Millionen (besser: vier Millionen) Zellen eingefroren werden. Eine große Kulturflasche mit optisch dichtem Zellrasen weist durchschnittlich etwa zehn Millionen Zellen auf. Die Zellen wurden zunächst mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung, entsprechend dem Vorgehen bei der Subkultivierung, von den Flaschenböden abgelöst. Die Aufnahme der Zellen erfolgte in 2 ml FKS-haltigem Medium bei kleinen Flaschen (25 cm²) bzw. 5 ml bei großen Flaschen (75 cm²). Nun wurde in einer NEUBAUER-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge pico) in 10 ml (bzw. in seltenen Fällen in 50 ml) Zentrifugentröhrchen mit konischem Boden (Sarstedt). Das Sediment wurde nun

in DMSO-haltigem (9 % (v/v)) Astrozytenmedium aufgenommen, wobei das DMSO als Frostschutzmittel dient. Das Volumen wurde so gewählt, dass die erhaltene Zellsuspension eine Zellzahl von zwei Millionen (bzw. vier Millionen, s.o.) Zellen pro 1,8 ml aufwies. Die auf diese Weise vorbereiteten Ansätze wurden in 1,8 ml Kryoröhrchen pipettiert und in einen auf -80 °C temperierten Kühlschrank gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte zur endgültigen Lagerung eine Überführung in flüssigen Stickstoff.

3.2.4.2 Auftauen der Zellen

Die Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die 1,8 ml Kryoröhrchen wiesen jeweils zwei (bzw. vier) Millionen Zellen in 1,8 ml DMSO-haltigen (9 % (v/v)) Medium auf. Nach einem schnellen Auftauen der Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C wurden die Zellen in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Astrozytenmedium + 10 % (v/v) FKS überführt, wodurch die zytotoxische DMSO-Konzentration verringert wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min (Tischzentrifuge Biofuge pico), um u.a. das DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment (Zellpellet) in 3 ml Astrozytenmedium + 10 % (v/v) FKS aufgenommen. Nun wurden die Zellen in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) ausgesät und wie bei den unter 3.2.3 beschriebenen Bedingungen bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂-Konzentration und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und gegen Frisches ersetzt. Das Auftauen eingefrorener HUVE-Zellen erfolgte auf dieselbe Art und Weise, nur dass anstelle des Astrozytenmediums hier das bereits beschriebene Endothelzellmedium zum Einsatz kam.

3.2.5 Test auf Mykoplasmen

Benötigte Reagenzien:

- 5 x Colorless GoTaq Flexi Buffer
- 5 x Colorless GoTaq Flexi Buffer
- dNTP-Mix, 10 mM each; 1 ml
- GoTaq DNA Polymerase, 500 units, 5u/μl
- MgCl₂, 25 mM; 750 μl
- Primer-Mix (MWG BioTech)
- (Myco-3'-01/-02; 02-3126-5/6; 02-3126-6/6)
- (Myco-5'-01/-02/-03/-04; 02-3126-1/6,-2/6,-3/6,-4/6)

Bei *Mykoplasmen* handelt es sich um sehr kleine, selbstständig vermehrungsfähige Bakterien aus der Klasse der Mollicutes [65]. Sie besitzen keine Zellwand und sind nur durch eine Zytoplasmamembran vom umgebenden Milieu abgegrenzt, wobei diese Eigenschaft dazu führt, dass Mykoplasmen nicht durch Sterilfiltration aus Medien entfernt werden können. Die Zellwandlosigkeit bedingt auch ihre pleomorphe Zellgestalt mit einem Durchmesser von $\leq 1 \mu\text{m}$. Die meisten Mykoplasmen sind unbeweglich, nur einzelne Arten zeigen eine gleitende Fortbewegung auf flüssigkeitsbedeckten Oberflächen [66]. Im Vergleich zu anderen Prokaryonten besitzen Mykoplasmen ein sehr kleines Genom, bestehend aus einem zirkulären, doppelsträngigen DNA-Molekül, dessen Größe zwischen 550 und 2200 kb liegt. Diese limitierte genetische Information ist daher auch mit eingeschränkten biosynthetischen Möglichkeiten verbunden, die sich in einer Reduktion verschiedener Zellstrukturen und Zellfunktionen äußert [67]. Aufgrund der dadurch bedingten parasitären Lebensweise sind Mykoplasmen auf essentielle Stoffwechselkomponenten einer Wirtszelle oder eines Wirtsorganismus angewiesen. Die Bindung von Mykoplasmen an das Wirtsgewebe erfolgt über Oberflächenadhäsine und Adhäsionsorganellen [65].

Durch das Fehlen einer Zellwand sind Mykoplasmen unempfindlich gegenüber Antibiotika, die auf die Zellwand von Bakterien wirken wie z.B. β -Laktamantibiotika.

Allgemein besitzen Mykoplasmen keine typischen Virulenzgene wie z.B. Toxine oder Invasine. Deren Minimalgenom lässt nur essentielle Gene zu, für Virulenzgene ist zu wenig Platz. Daher können Mykoplasmen toxische metabolische Zwischenprodukte benutzen, die sie überregulieren [48]. Diese Faktoren können

a.) das Immunsystem des Wirten deregulieren und Entzündungsreaktionen erzeugen und

b.) eine Zerstörung des Gewebes direkt durch gewisse sekretierte metabolische Produkte wie z.B. H_2O_2 hervorrufen. Diese Arten von Virulenzfaktoren wirken auf kurze Distanz, weshalb die Adhäsion über Oberflächenadhäsine und Adhäsionsorganellen essentiell für die Virulenz der Mykoplasmen ist [48]. Daher wurden alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit mykoplasmafreien Zellen durchgeführt und eine regelmäßige Kontrolle der Zellen auf eine Kontamination durch Mykoplasmen durchgeführt.

3.2.5.1 Test auf Mykoplasmen mittels Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase - Kettenreaktion* ist eine Methode, die sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet. Es handelt sich um eine enzymatische Vervielfältigung einer spezifischen DNA - Sequenz (hoch konservierte Region der 16s rRNA im Mykoplasmen - Genom). Die zyklisch verlaufende Reaktion basiert auf drei Teilschritten, die mit unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bei 94 °C denaturiert (*Denaturierung*) und dadurch in Einzelstränge aufgetrennt. Die Anlagerung (*Hybridisierung*) der spezifischen Primer an die komplementären Sequenzen der DNA - Stränge erfolgt nach Temperatursenkung, die für jedes Primerpaar charakteristisch ist. Die Oligonukleotidmoleküle dienen als Startpunkte für die DNA - Polymerase, die von ihnen ausgehend durch Einbau von Desoxyribunukleotidtriphosphaten (dNTPs) neue, komplementäre DNA - Stränge synthetisiert. Die *Elongation* durch die DNA - Polymerase läuft bei einer Temperatur von 72 °C ab. Mehrfache Wiederholungen des Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation führen zu einer exponentiellen Vermehrung der spezifischen, beidseitig von den Oligonukleotiden flankierten DNA - Sequenz. Die Amplifikationsprodukte lassen sich nach Gelelektrophorese mittels Ethidiumbromidfärbung oder durch Färbung mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen darstellen. Zur Vermeidung falsch - positiver Ergebnisse zeigt die mitgeführte interne Kontrolle an, ob die Amplifikation erfolgreich war, Positiv - und Negativkontrolle erleichtern die Interpretation der Ergebnisse.

Durchführung:

Durch Agarosegelelektrophorese wurden die DNA - Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt und anhand des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid durch Einlagerung in die DNA unter UV - Licht sichtbar gemacht. Die Auftrennung der amplifizierten DNA - Fragmente erfolgte in einem 2 % -igen horizontalen Agarosegel. Die Agarose wurde dazu in einem Erlenmeyerkolben ausgewogen und in TAE 1x Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55 - 60 °C wurde die Agaroselösung in eine gereinigte Elektrophoresekammer luftblasenfrei gegossen, ein Probenkamm eingesetzt und das Gel auspolymerisieren lassen. Währenddessen wurden die Proben wie in Tabelle 3.2 angegeben für das Beladen des Gels vorbereitet.

Nach Entfernen des Probenkammes und Überschichten des Gels mit TAE 1x - Puffer wurden jeweils 10 µl der Proben bzw. 20 µl des Standards für die Größenbestimmung in die einzelnen Auftragstaschen gegeben, der Deckel auf die Elektrophoreseapparatur gesetzt und die DNA - Fragmente bei einer anliegenden Spannung von 75 V für ca. eine Stunde

Tabelle 3.2: Pipettierschema Mykoplasmen - PCR

	Standard	Probe	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Probe	-	10 µl	10 µl	10 µl
loading dye	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
H ₂ O dest.	16 µl	10 µl	10 µl	10 µl
DNA - Ladder	4 µl	-	-	-
Auftragsmenge	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl

im Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und in ein Ethidiumbromidbad für 30 Minuten gelegt. Zur Auswertung wurde das Agarosegel im durchscheinenden UV - Licht (Blaulichttransilluminator) bei einer Wellenlänge von 460 - 480 nm mit einer Digitalkamera aufgenommen.

3.2.6 Zellzahlbestimmung in der NEUBAUER - Zählkammer

Um eine genaue Kontrolle des Zellwachstums zu gewährleisten, wurde die Anzahl der Zellen in der NEUBAUER - Zählkammer bestimmt. Dies ist nicht nur für eine kontinuierliche Kultur der Zellen, sondern auch für vergleichbare Ergebnisse der einzelnen Versuche notwendig. Wurden die Zellen zu dünn ausgesät, wuchsen sie schlecht, zu dicht ausgesäte Zellen mussten hingegen oft subkultiviert werden. Die einfachste Methode zur Bestimmung der Zellzahl ist die Auszählung unter dem Mikroskop mittels einer NEUBAUER - Zählkammer.

Die Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen geschieht durch die Anfärbung der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren kann. Durch defekte Membranen toter Zellen kann der Farbstoff jedoch in deren Zytoplasma gelangen, sich an die Zellproteine binden und die abgestorbenen Zellen blau anfärben. Im Mikroskop erscheinen lebende Zellen daher hell mit blau kontrastiertem Rand, während tote Zellen sich durch ihre dunkelblaue Färbung deutlich von lebenden Zellen abheben. Durch die zytotoxische Wirkung des Trypanblaus kommt es bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblaus zu einem Anstieg an toten Zellen. Der Bewertungsmaßstab dieser Vitalitätsbestimmung ist die Membranbeschaffenheit und nicht die innere Struktur und Funktionstüchtigkeit der Zelle.

Eine NEUBAUER - Zählkammer besteht aus einer etwa 5 mm dicken Glasplatte in den Abmessungen eines Objektträgers. Die Oberfläche der Zählkammer ist durch eingravierte Linien in ein feines Raster unterteilt. Auf der Kammer sind 9 Großquadrate mit einer Seiten-

länge von jeweils 0,2 mm aufgebracht. Ein Großquadrat enthält jeweils 16 Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von jeweils 0,05 mm. Durch leichtes Andrücken eines Deckgläschens bis zum Erscheinen von Newtonschen Ringen wird ein Abstand zwischen der Unterseite des Deckgläschens und der Oberfläche des Objektträgers von genau 0,1 mm erhalten, wodurch sich ein Volumen über einem Großquadrat von $0,004 \text{ mm}^3$ ergibt. Zur Bestimmung wurde die Anzahl an lebenden Zellen von jeweils fünf Kleinquadraten summiert. Da die fünf Kleinquadrate ein Volumen von $0,02 \text{ }\mu\text{l}$ aufweisen und die Zellen durch die Trypanblaulösung 1 : 2 verdünnt wurden, lässt sich die Zellzahl nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellanzahl (pro ml Suspension)} = \text{Zellanzahl (in fünf Kleinquadraten)} \cdot 10^5 \quad (3.1)$$

Durchführung:

Von der Zellsuspension wurden $30 \text{ }\mu\text{l}$ abgenommen und mit $30 \text{ }\mu\text{l}$ Trypanblau in 0,9 % (v/v) NaCl-Lösung gemischt. Bereits abgestorbene Zellen lassen sich durch Trypanblau anfärben und gehen nicht mit in die Zählung ein. Die Zellsuspension wurde durch Auf- und Abpipettieren in einen homogenen Zustand gebracht und in die mit einem Deckgläschen versehene Zählkammer gefüllt. Durch Kapillarkräfte wurde die Zellsuspension nach dem Aufbringen auf den Objektträger in die Kammer gezogen. Mit der Zellzählung (Auszählen von fünf Kleinquadraten) wurde sofort begonnen, da die Zytotoxizität des Trypanblaus zu einer Ergebnisverfälschung führen könnte. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis durch die Trypanblaulösung wurde die Zellzahl pro Milliliter Suspension ermittelt.

3.2.7 Beschichtung von Glasoberflächen für die Zellkultur

Benötigte Reagenzien: Poly-D-Lysin-Lösung

0,02 % → Stammlösung, 1:10 mit H_2O bidest. verdünnen (unsteril)

0,002 % → gebrauchsfertig (steril)

Für immunzytochemische Nachweismethoden wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Um die Adhäsion dieser Zellen an der Oberfläche der Deckgläschen zu verbessern und über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, wurden die Deckgläschen vorher mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet. PDL ist ein synthetisches Molekül (Lysin = basische Aminosäure), welches zur Verbesserung der Zellhaftung an Plastik- oder Glasoberflächen verwendet wird, indem es die adhäsiven Eigenschaften durch Veränderung der Ladung auf der Gefäßoberfläche von negativ zu positiv verändert. Zusätzlich zur Förderung der

Zelladhäsion verbessert Poly-D-Lysin auch die Adsorption von Serum oder extrazellulären Matrixproteinen an das Kultursubstrat.

Durchführung:

Vor der PDL-Beschichtung wurden die Deckgläser zunächst mit 96 %igem Ethanol gereinigt. Nach dem Trocknen der Deckgläser wurde jedes Deckgläschen mit 100 µl sterilfiltrierter PDL-Lösung (0,002 %) bedeckt und anschließend für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur unter der Sterilwerkbank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen zweimal mit H₂O bidest. gespült und etwa eine Stunde lang getrocknet. Die auf diese Weise vorbereiteten Deckgläschen wurden bis zum Einsatz in sterilen Petrischalen aufbewahrt.

3.2.8 Test auf Toxizität und Proliferation

3.2.8.1 Bestimmung der Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH - Test)

Benötigte Reagenzien: LDH Cytotoxicity Detection Kit

Der *LDH-Test* ist ein sehr häufig angewandter In-vitro-Zytotoxizitätstest, dessen Prinzip auf der Bestimmung der Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) im Zytoplasma basiert, das aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt wird und somit im Überstand (in vitro im Zellkulturmedium) nachweisbar ist. Anhand dieses LDH-Tests ist es somit möglich, ein eventuelles zytotoxisches Potential von den in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzkonjugaten auf die Zellen festzustellen.

Die Laktatdehydrogenase ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das sehr schnell bei beschädigten/zerstörten Membranen in das Zellkulturmedium abgegeben wird und dessen Aktivität mittels eines enzymatischen Tests bestimmt wird. Wie in der Abbildung 3.1 dargestellt, finden dabei zwei Redoxreaktionen statt. Im ersten Schritt wird Laktat durch die Oxidoreduktase LDH zu Pyruvat oxidiert, während das Coenzym NAD⁺ durch die

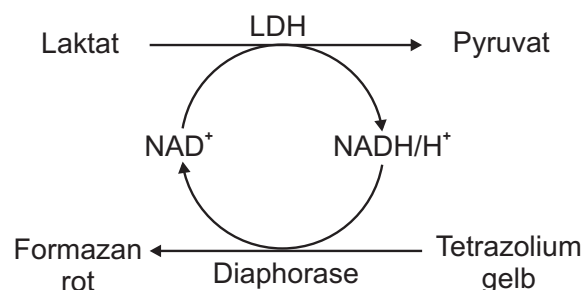


Abbildung 3.1: Reaktionsschema während des LDH - Tests.

Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu NADH/H⁺ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testreagenz enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen NADH/H⁺ auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz bei gleichzeitiger Oxidation von NADH/H⁺ zu NAD⁺ reduziert wird. Diese Farbstoffbildung kann kolorimetrisch mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen werden. Je höher der Grad der Zellschädigung ist, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Überstand (Medium). Diese Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen. Als Referenz dienen Kontrollansätze, d.h. Zellen, die unter Zugabe des Detergenz Triton-X-100 (1 %, in Zellkulturmedium verdünnt) vollständig lysiert wurden und deren Substratumsetzung daher als maximal (100 %, Positivkontrolle, *High Control*) eingestuft wird, bzw. solche, die nur mit reinem Zellkulturmedium behandelt wurden und deshalb eine minimale (0 %, Negativkontrolle, *Low Control*) LDH-Enzymaktivität im Überstand besitzen.

Durchführung:

In kleinen Petrischalen (Ø 35 mm) wurden zunächst 50.000 Zellen in 500 µl Astrozytenmedium (10 % (v/v) FKS) ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank (37 °C) wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS-Puffer gespült und in serumfreiem Stimulationsmedium (1 % BSA) weiterinkubiert. Nach einer sowie nach zwei Stunden wurde erneut das Medium gegen frisches Stimulationsmedium gewechselt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Fluoreszenzkonjugate (10 ng/ml und 100 ng/ml) als auch DMSO 4 % als ein Beispiel für eine LDH-freisetzende und somit zytotoxische Substanz den Zellen zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation im Brutschrank (37 °C) wurde das Medium abgenommen, für 10 min bei 250 rpm zentrifugiert und der LDH-Test mit dem Überstand durchgeführt. Dazu wurden 100 µl des Zellüberstands in eine 96-Well Platte pipettiert, 100 µl der Reaktionslösung bestehend aus lyophilisierten NAD⁺, Diaphorase, INT und Laktat zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Absorption mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 492$ nm gemessen. Um die prozentuale Zytotoxizität zu bestimmen, wurde der Durchschnitt der gemessenen Absorptionen berechnet. Durch Einsetzen der Werte in folgende Formel konnte das prozentuale zytotoxische Potential berechnet werden (alle Werte abzüglich Hintergrund):

$$\text{Zytotoxizität[\%]} = \frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Negativkontrolle}}}{OD_{\text{Positivkontrolle}} - OD_{\text{Negativkontrolle}}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

3.2.8.2 Bestimmung der Proliferation über DNA - Quantifizierung

Benötigte Reagenzien: CyQuant Cell Proliferation Assay Kit

Um einen Einfluss der unterschiedlichen Konjugate auf die Proliferation von Zellen zu untersuchen, können u.a. radioaktiv markierte Nukleotide oder Aminosäuren verwendet werden. Jedoch sind nicht - radioaktive Methoden aufgrund der einfacheren Handhabung vorteilhafter. Daher wurde die Zellproliferation in dieser Arbeit mittels *CyQuant Cell Proliferation Assay Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt, welches eine schnelle, sensitive und reproduzierbare Methode zur Zellzahlbestimmung darstellt.

Das CyQuant - Testkit besteht aus einem Lysispufferkonzentrat (Komponente B, 20 x), aus einem konzentrierten CyQuant GR Farbreagenz (Komponente A, 400 x in DMSO) und aus dem DNA - Standard (Bakteriophage λ - DNA, Komponente C, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TRIS/EDTA - Puffer). Der Test beruht auf der Bindung des CyQuant GR Farbstoffs an die zellulären Nukleinsäuren resultierend in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals, die mit einem Fluoreszenzspektrometer verfolgt werden kann. Der an die Nukleinsäuren gebundene Farbstoff weist dabei ein Anregungsmaximum bei $\lambda = 480 \text{ nm}$ und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 520 \text{ nm}$ auf. Der Detektionsbereich des CyQuant - Testkits liegt zwischen 50 und 50.000 Zellen, in dem die Fluoreszenzintensität proportional mit eingesetzter DNA - Menge mit hinreichender Übereinstimmung korreliert. Dabei entspricht ein DNA - Gehalt von 50 ng etwa 10.000 Zellen.

Durchführung:

Für den Proliferationsassay wurden die entsprechenden Zellen in kleinen Petrischalen ($\varnothing 35 \text{ mm}$, Sarstedt, 50.000 Zellen/Petrischale) in FKS - haltigem Astrozytenmedium ausgesät und je nach Versuchsordnung kultiviert. Nach Ablauf der versuchsspezifischen Stimulationszeit (im Brutschrank bei 37°C) wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit PBS - Puffer gewaschen und anschließend die Kulturschalen samt Zellrasen trocken bei -20°C eingefroren. Für die weitere Zellaufarbeitung wurde zunächst der Zelllysispuffer entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt. Dazu wurden 1 ml Lysispufferkonzentrat mit 19 ml H_2O bidest. verdünnt (ausreichend für etwa 40 Tests). 20 μl einer 0,8 U/ μl RNase - Lösung wurden mit 180 μl H_2O bidest. verdünnt und dem Lysispuffer zugegeben. Auf die noch gefrorenen Zellkulturschälchen wurden anschließend 250 μl Lysispuffer gegeben und die Ansätze bei Raumtemperatur über 60 min inkubiert. Es folgte das Abkratzen des Zellrasens mit Zellschabern und die Überführung der Zellsuspension in sterile Eppendorf - Reaktionsgefäße. Für die Zellzahlbestimmung diente als Standard eine 1 : 100 Verdünnung der Bakteriophage λ - DNA des Testsystems (2 μl

Tabelle 3.3: Pipettierschema Proliferationsassay

	Probe	DNA - Standard	Leerwert
Lysat	50 μ l	-	-
DNA - Standard	-	50 μ l	-
CyQuant - Lysispuffer	200 μ l	200 μ l	250 μ l
2 x CyQuant GR Farbreagenz	250 μ l	250 μ l	250 μ l

Bakteriophage λ -DNA + 198 μ l verdünnter Lysispuffer). Das GR Farbreagenz wurde mit Lysispuffer 1 : 200 verdünnt (50 μ l GR Farbreagenz pro 10 ml Lysispuffer). Für Messung wurden die Proben anhand der Tabelle 3.3 in neue Eppendorf - Reaktionsgefäße pipettiert. Nach kurzem Durchmischen der Ansätze erfolgte eine Inkubation über fünf Minuten bei Raumtemperatur, wobei die Proben vor Licht geschützt wurden, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden. Abschließend wurde die Fluoreszenz der Ansätze im Fluoreszenzspektrometer bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Anregung}} = 480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}} = 520 \text{ nm}$ gemessen. Für die Auswertung wurden zunächst aus den Dreifach-Bestimmungen die Mittelwerte berechnet. Die Kontrolle (= unbehandelte Zellen) wurde gleich 100 % gesetzt und die Proben darauf bezogen.

3.3 Methoden zur Genexpressionsanalyse

3.3.1 Quantitative *Real Time* rt-PCR

Unter den molekularbiologischen Methoden nimmt die rt-PCR (*reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction = reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion*) einen vorrangigen Platz ein. Das Verfahren beruht auf einer selektiven Vervielfältigung von DNA-Bruchstücken und wurde ursprünglich von Kary Mullis entwickelt, der dafür 1993 den Nobelpreis erhielt. Seither wurden vielfältige Variationen erforscht, die einerseits den sehr spezifischen Nachweis von charakteristischen Erbgut-Sequenzen erlauben (rt-PCR) und andererseits durch Quantifizierung der Fluoreszenzemission in Echtzeit (in *real time*) die die PCR-Reaktion während der exponentiellen Amplifizierungsphase verfolgen (*Real Time* rt-PCR). Diese quantitativen Untersuchungen haben eine große Bedeutung dabei, eine Aussage über die quantitative Expression der zu untersuchenden Gene und der Analyse der Genaktivität zu erhalten.

3.3.1.1 Isolierung der RNA

Benötigte Reagenzien: Nuklease-freies H₂O bidest.

RNase-freier 10 x DNase-Puffer

RNase-freie DNase

20 mM EDTA-Lösung

pd(N)₆ Random Hexamer 5-Phosphate, Sodium Salt

5 x reaction buffer M-MuLV RT

dNTP-Mix

Bevor die PCR durchgeführt werden konnte, wurde zunächst die Gesamt-RNA, bestehend zu etwa 70 % aus rRNA, 15 % tRNA und 3 % mRNA, aus den Tumorzellen isoliert und anschließend über eine reverse Transkription in cDNA überführt.

Durchführung:

Die kultivierten Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml Trizol pro großer Flasche (500 µl pro kleiner Flasche) aufgenommen und in sterile Eppendorf-Reagiergefäße überführt. Trizol besteht aus einem Gemisch aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, das die schnelle Aufarbeitung von RNA aus Zellen und Geweben erlaubt. Für eine späteres Weiterarbeiten konnten nun diese wahlweise bei -20 °C eingefroren werden oder es folgte gleich im Anschluss die Isolierung der RNA. Dazu wurden die Zellhomogenisate acht Minuten bei 800 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer von der RNA abzutrennen, und die Überstände in neue Reagiergefäße pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde kräftig geschüttelt und für weitere drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation bei 12000 rpm über 15 Minuten und 4 °C wurde die Lösung in drei Phasen separiert: in der oberen klaren wässrigen Phase befand sich die RNA, in der trüben Interphase die Proteine und in der unteren roten Phase das Phenol-Chloroform-Gemisch mit der DNA. Die obere RNA-Phase wurde abgenommen und in einem neuen Reagiergefäß mit 500 µl Isopropanol mittels eines Vortex-Mixers geschüttelt und für mindestens zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die RNA präzipitierte. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C über zehn Minuten wurde der Überstand verworfen und das RNA-Sediment in 1 ml 75 %-igem Ethanol resuspendiert, anschließend erneut bei 7500 rpm und 4 °C über fünf Minuten zentrifugiert und an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Zugabe von RNase-freiem Wasser wurde das aus RNA bestehende Pellet bei etwa 60 °C zehn Minuten lang gelöst. Zum Schluss folgte die Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der isolierten RNA. Dafür wurden die Proben zunächst 1:200 mit Aqua bidest. verdünnt und ein Absorptionsspektrum der Wellenlängen von 240 nm bis

300 nm mit Hilfe eines Photometers aufgenommen. Da das Absorptionsmaximum der RNA bei $\lambda = 260$ nm liegt, kann über die gemessene Absorption der RNA-Gehalt der Probe bestimmt werden. Eine Absorption von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Die Reinheit der Probe ergibt sich aus dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ und gilt bei $\geq 1,8$ als rein. Die isolierte RNA wurde bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

3.3.1.2 Reverse Transkription

Durchführung:

Bevor die Gesamt-RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden konnte, erfolgte zunächst ein Abbau von genomischer DNA. Dies ist bedeutsam, da die entsprechende Sequenz der genomischen DNA in der später durchgeführten *Real Time* rt-PCR ebenfalls amplifiziert werden könnte, wodurch sich zu hohe Expressionsraten ergeben könnten. Dazu wurde 1 μg der isolierten Gesamt-RNA mit Nuklease-freiem H_2O auf ein Volumen von 8 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 μl RNase-freiem DNase-Puffer und 1 μl RNase-freier DNase erfolgte der DNA-Abbau bei 37°C für 15 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde durch Zugabe von 1 μl einer 20 mM EDTA-Lösung der DNA-Abbau gestoppt. Durch Inkubation des Ansatzes bei 65°C über zehn Minuten wird die DNase hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt.

Das Umschreiben der Gesamt-RNA (Template) in cDNA erfolgte nun in einer reversen Transkriptase-Reaktion. Diese fand in zwei aufeinander folgenden Schritten statt. In der *Erststrangsynthese* wurde durch die reverse Transkriptase ein zur RNA komplementärer DNA-Einzelstrang synthetisiert. In der *Zweitstrangsynthese* wurde durch die DNA-Polymerase der zur neu synthetisierten einzelsträngigen DNA komplementäre Zweitstrang erzeugt. Für die Erststrangsynthese wurde zu der isolierten RNA 2 μl der Random Hexamer Primer hinzugegeben. Die Proben wurden über 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt (Anlagerung der Primer an die RNA). Anschließend wurden 4 μl reverse Transkriptase Reaktionspuffer und 2 μl dNTP-Mix für die Erststrangsynthese hinzugefügt. Die Ansätze wurden fünf Minuten bei 25°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 μl Reverse Transkriptase wurden die Proben in einem Thermocycler für zehn Minuten bei 25°C (= *Annealing der Primer*), 60 Minuten bei 42°C (= *cDNA Synthese*) und zehn Minuten bei 70°C (= *Stop der Reaktion*) inkubiert.

3.3.1.3 Quantitative rt-PCR

Nach der abgeschlossenen Erststrangsynthese wurden in der anschließenden quantitativen rt-PCR nun selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert. Das Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül wird durch Hitzeeinwirkung aufgeschmolzen (denaturiert). Die Einzelstränge dienen in der Folge als Matrize für die enzymatisch katalysierte Polymerisation von Desoxyribonukleotiden, wodurch wieder doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Die als Primer bezeichneten Oligodesoxyribonukleotide definieren dabei den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie an Orten komplementärer Sequenz mit der Ziel-DNA hybridisieren und als Starter für die Polymerisation dienen. Da die PCR per Definition eine Kettenreaktion ist, steigt die Menge der produzierten Moleküle zunächst exponentiell an. Durch diesen Anstieg einerseits und sinkende Konzentrationen der Substrate andererseits nimmt die Produktion neuer Moleküle nach einer gewissen Anzahl von Zyklen ab und erreicht schließlich ein Plateau. Dabei unterscheidet sich jedoch diese Anzahl von Zyklen je nach Sequenz und Menge der eingesetzten RNA, wodurch ein linearer Zusammenhang zwischen der Zahl der eingesetzten und der amplifizierten Moleküle besteht. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte in dieser Arbeit durch Detektion eines fluoreszierenden Signals, das proportional zur Menge der PCR-Produkte ist. Diese

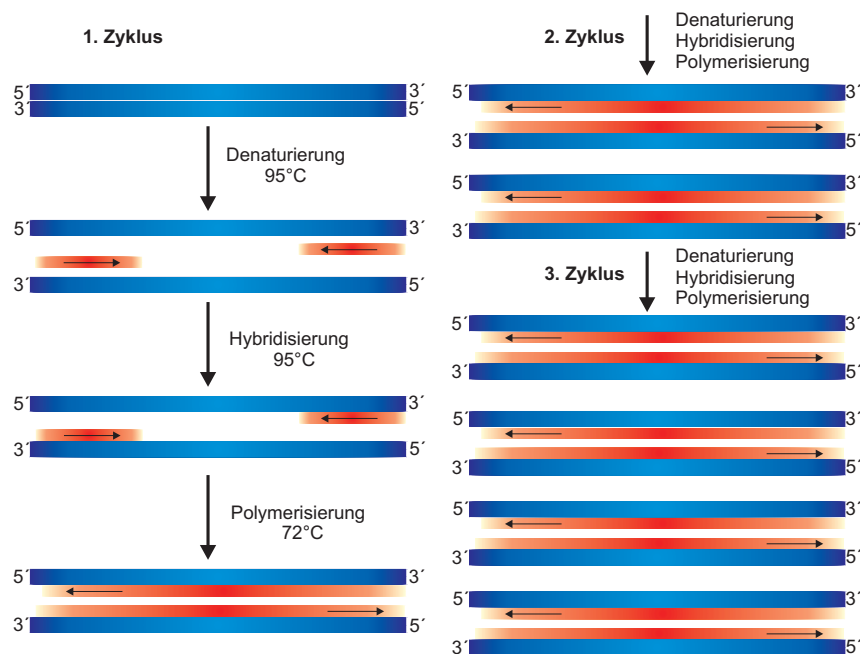


Abbildung 3.2: Prinzip der Polymerase - Kettenreaktion (schematischer Verlauf).
(*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

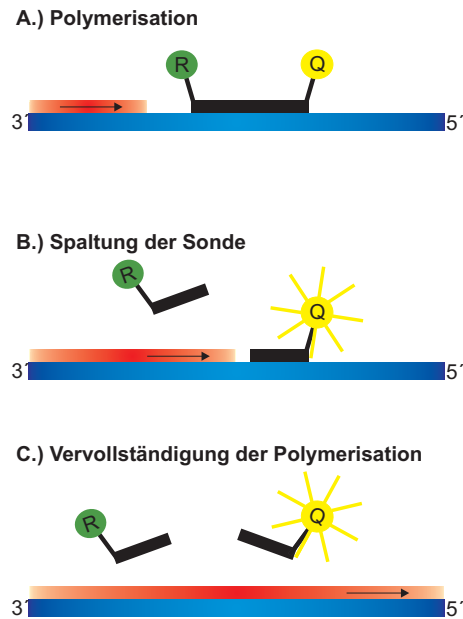


Abbildung 3.3: Prinzip der Real Time rt - PCR (schematischer Verlauf).

1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR - Primer
2. Primer - Verlängerung und Sondenspaltung
3. PCR - Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt
4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter - Signal

Fluoreszenz wird *real time* während jedes Zyklus in jedem einzelnen Feld der 96-Well-Platte gemessen. Das Prinzip der *Real Time* rt-PCR beruht auf einer für die zu amplifizierende Sequenz spezifischen Sonde (*probe*), die zwei Farbstoffe enthält: den Reporter am 5'-(*TAMRA*) und den Quencher am 3'-Ende (*FAM*). Um eine Extension der Sonde während der PCR zu verhindern, ist das 3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert. Ist die Sonde intakt, so unterdrückt die Nähe des Quenchers die Fluoreszenz des Reporters durch eine zwischenmolekulare Energieübertragung. Im Laufe der Polymerisation spaltet die Taq-Polymerase aufgrund ihrer Nukleaseaktivität die Sonde zwischen Reporter und Quencher genau dann, wenn diese mit einem DNA-Strang hybridisiert. Die Fragmente lösen sich und die Polymerisation wird fortgesetzt, ohne dass die exponentielle Vervielfältigung beeinträchtigt wird. Die Trennung von Reporter und Quencher bewirkt einen Anstieg des Fluoreszenzsignals des Reporters, das in jedem Zyklus gemessen wird. Dieser Anstieg tritt nur dann ein, wenn erstens die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und zweitens wenn während der PCR amplifiziert wird (Abbildung 3.3).

Die Fluoreszenzstärke der Felder wird in jedem Zyklus gemessen und zeigt typischerweise einen sigmoidalen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 3.4). Nach anfänglicher Hintergrundfluoreszenz folgt die Phase der exponentiellen Amplifikation, die sich im loga-

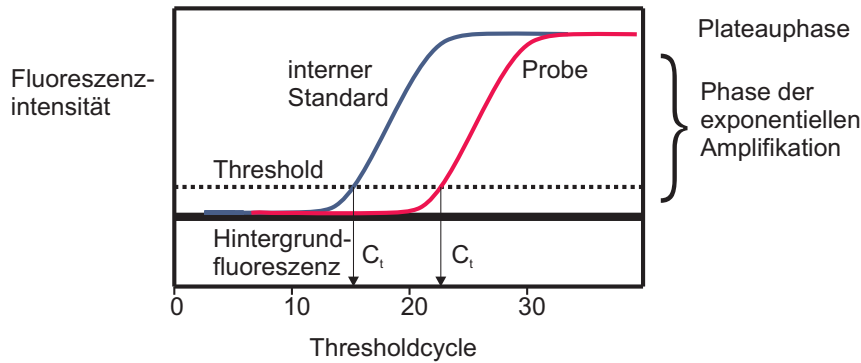


Abbildung 3.4: Bestimmung der C_t -Werte einer Real Time rt-PCR.

Dargestellt sind die anhand von Rohdaten erstellten Kurvenverläufe einer Probe und einem internen Standard. Durch mitgeführte Kontrollen wird ein Schwellenwert (*threshold*) definiert, der Rauschen und Signal trennt. Der C_t -Wert (*threshold cycle*) ist die Nummer des ersten PCR-Zyklus, der ein Fluoreszenzsignal ausstößt, das größer als der Schwellenwert ist. Je mehr Kopien des zu untersuchenden DNA-Segments in einer Probe enthalten sind, desto kleiner ist der zugrunde liegende C_t -Wert.

rhythmischen Maßstab als linearer Anstieg darstellt. In späteren Zyklen kommt es zum oben beschriebenen Plateaueffekt, durch den genaue Quantifizierungen unmöglich werden. Daher ist es nötig, die Berechnungen in der exponentiellen Phase durchzuführen. Dazu wird im Bereich des näherungsweise linearen Kurvenverlaufs ein Schwellenwert gesetzt, bei dem sich die Reporterfluoreszenz erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt (siehe Abbildung 3.4). Die Zykluszahl (*cycle*), bei der die jeweilige Kurve diesen Schwellenwert (*threshold*) kreuzt, wird als C_t -Wert bezeichnet. Je größer die Menge an eingesetzter DNA ist, desto früher kommt es zum Anstieg der Kurve und desto kleiner ist der C_t -Wert. Soll die Real Time rt-PCR nur zur relativen Quantifizierung genutzt werden, ist das Erstellen einer Standardkurve überflüssig. In diesem Fall genügt es, den C_t -Wert des Zielgens auf einen internen Standard zu beziehen und die Differenz aus dem C_t -Wert des Zielgens und dem endogenen Kontrollgen anzugeben (*comparative C_t -method*). Dabei wird davon ausgegangen, wenn die Expression dieses Haushalts- (*house-keeping*) Gens im Probenmaterial erwartungsgemäß hoch ist, auch die Menge der restlichen mRNA in der Probe adäquat sei. Daher wurde dieser Versuch als Quantitätskontrolle angesehen. Eine perfekte endogene Kontrolle sollte die cDNA Menge in jeder Probe reflektieren. Hierfür werden meist *house-keeping*-Gene, wie das der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Glykolyse verwendet. Das Expressionsniveau ist aber auch bei Haushaltsgenen nicht immer konstant, so wird die GAPDH-Expression beispielsweise durch Hypoxie beeinflusst.

Die Ausbeute einer PCR - Reaktion ergibt sich nach [68] aus der Formel:

$$x_n = x_0 \cdot (1 + E_x)^n \quad (3.3)$$

mit: x_n = Kopienzahl beim Zyklus n
 x_0 = Ausgangs - Kopienzahl
 E_x = Amplifikations - Effizienz und
 n = Anzahl der PCR - Zyklen.

Die Anzahl der Zyklen, die für eine 10 - fach höhere Kopienzahl notwendig sind, ergibt sich (bei Annahme einer 100 % -igen Amplifikationseffizienz) aus:

$$10 = 2^n \rightarrow n = \log(10)/\log(2) = 3,32 \quad (3.4)$$

Das PCR - Produkt verzehnfacht sich also unter o.g. Annahme alle 3,32 Zyklen.

Durchführung:

Die PCR erfolgte im Anschluss an die reverse Transkription am Thermocycler ABI Prism 7000 Sequence Detection System von Applied Biosystems. Dafür wurden zunächst die synthetisierten cDNA - Proben 1:10 mit H₂O bidest. auf eine Konzentration von etwa 5 ng/μl verdünnt. Je Vertiefung einer 96 - Well Platte wurde nun der folgende Ansatz nach Tabelle 3.4 pipettiert.

Der Universal PCR Master Mix besteht aus der AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase Uracil N - Glycosylase (UNG), dNTPs mit dUTP, einer passiven Referenz (ROXTM Farbstoff) und optimierten Pufferkomponenten. Die AmpliTaq Gold DNA Polymerase entsprach einer modifizierten Form der AmpliTaq DNA Polymerase. Diese zeigt bei Raumtemperatur keine Aktivität und muss zu ihrer Aktivierung initial für zehn Minuten

Tabelle 3.4: Pipettierschema *Real Time* rt - PCR

Substanz	Volumen
20 x Primer - Mix	1 μl
H ₂ O bidest.	7 μl
cDNA (5 ng/μl)	2 μl
2 x TaqMan Universal PCR Master Mix	10 μl
Gesamtvolumen	20 μl

auf 95 °C erhitzt werden, wodurch die Bildung von Primer-Dimeren verhindert wird. Mittels Uracil N-Glycosylase lassen sich Kontaminationen von Syntheseprodukten vorangegangener PCR-Reaktionen aus dem Ansatz entfernen, wenn bei der Synthese nicht dTTP sondern dUTP zugegeben war. Das Enzym spaltet Uracil-Reste von Polynukleotiden ab, die resultierenden abasischen Polynukleotide werden anschließend durch Hitze abgebaut.

Die Amplifikation erfolgte durch eine PCR mit 40 Zyklen (15 s bei 95 °C Denaturierung, 1 min bei 60 °C Synthese), wobei zwei initiale Temperaturschritte (2 min bei 50 °C UNG-Verdau und 10 min bei 95 °C Aktivierung der Taq-Polymerase, Inaktivierung der UNG) vorausgingen. Aufgrund der Sensitivität dieser quantitativen PCR wurden von jeder cDNA-Probe drei identische PCR-Ansätze (Dreifachbestimmung) durchgeführt und als Ergebnis der Mittelwert und die entsprechenden Standardabweichungen berechnet. Proben, deren C_t -Wert 40 überschritten, wurden verworfen.

Die 96-Well Platte wurde mit Hilfe einer Folie (*sealing tape*) und eines Andruckkissens (*optical film compression pad*) nach oben hin abgedichtet und in das Gerät eingesetzt. Nach Starten der Steuerungssoftware (*sequence detector software version 1.1*) und Eingabe des Platten-Pipettierschemas und der PCR-Parameter erfolgte der Start der PCR. Das verwendete Thermocycler-Programm ist in der Tabelle 3.5 angegeben.

Dieser *TaqMan PCR Assay* basiert auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Bei diesem Assay wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht und deren optimale Länge zwischen 24 und 30 Nukleotiden liegt. Sie selbst kann nicht durch die Polymerase verlängert werden, da das 3'-Ende der Sonde mit einem Phosphatrest blockiert ist. Das 5'-Ende der Sonde ist mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein, FAM) markiert, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (z.B. 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA) trägt. Zwischen den beiden Farbstoffen entsteht ein Fluoreszenz-Resonanz-

Tabelle 3.5: Das in Rahmen der *Real Time* rt-PCR verwendete Thermocycler-Programm.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitraum [min]	Bemerkung
1	50	02:00	UNG-Verdau
2	95	10:00	Aktivierung der TaqPolymerase Inaktivierung der UNG
3	95	00:15	Denaturierung
4	60	01:00	Synthese

Energietransfer (FRET). FRET ist eine Übertragung der Anregungszustände von Elektronen zweier Fluorophore in hoher räumlicher Nähe (10-100 Å). Wenn die intakte Sonde mit den Primern zunächst an den DNA-Strang bindet, wird die Fluoreszenzemission des Reporter-Farbstoffs (FAM: $\lambda_{\text{Emission}} = 518 \text{ nm}$) aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen FRET unterdrückt [69]. Während der PCR trifft die Taq-Polymerase nun auf diese Sonde. Die 5'-3'-Exonuklease der Taq-Polymerase wird aktiviert und die Sonde wird bei der Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung geschnitten. Die freie, nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Wenn es jedoch zum SONDENSCHNITT kommt, wird die räumliche Nähe und damit auch FRET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Das Reporter-Signal wird freigesetzt. Entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenzen kann schließlich mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus detektiert werden. Das Prinzip der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR ist in der Abbildung 3.3 (S. 62) dargestellt.

Mit Hilfe des verwendeten ABI PRISM 7700 Sequence Detector Systems war es möglich, den Verlauf einer Echtzeit-Fluoreszenz-PCR zu verfolgen. Das ABI PRISM 7700 besitzt eine CCD-Kamera (*charge-coupled device camera*). Das Fluoreszenzsignal wird der Kamera über Glasfaserkabel von 96 Probengefäßen zugeführt. Diese CCD-Kamera kann die Fluoreszenzemissionsdaten über einen Wellenlängenbereich von 500 bis 660 nm sammeln. Die Proben sind mit einer durchsichtigen Abdeckung geschlossen. Eine Analyse im geschlossenen Reaktionsgefäß bietet verschiedene Vorteile: Zum einen wird die Gefahr der Kontamination auf ein Minimum reduziert. Zum anderen ist die tatsächliche Arbeitszeit deutlich verringert, weil Post-PCR Schritte wie Gelelektrophoresen entfallen. Die Steuerung des Systems erfolgte vollständig über einen Laptop (Pentium III).

3.3.2 Isolierung von Proteinen

3.3.2.1 Isolierung von Zellproteinen

Benötigte Reagenzien: Stimulationsmedium
Stimulationsfaktoren
Lysispuffer

Um zytosolische Proteine bestimmen zu können, wurden zunächst Gesamtzelllysate hergestellt. Dazu wurden die Zellen in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²) ausgesät und

bis zu etwa 80 % Konfluenz kultiviert. Die so in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Zellen konnten nun durch einen Wechsel des Nährmediums zum Stimulationsmedium (2 ml/Flasche) für mind. 2 h und Zugabe der Stimulationsfaktoren angeregt werden. Zum Lysieren wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend der vorgekühlte Lysispuffer auf den Zellrasen gegeben (250 μ l auf kleine Flaschen (25 cm²), 500 μ l auf große Flaschen (75 cm²)). Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgekratzt und in sterile, eisgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden anschließend die Zellen bei 4 °C und 12000 rpm über zehn Minuten zentrifugiert, die Proteine enthaltenden Überstände in neue Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und das Zellpellet verworfen. Anschließend wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt, um ein späteres, gleichmäßiges Auftragen der Proben auf das Sammelgel sicherzustellen. 25 μ g Protein wurden auf 100 μ l mit SDS-Probenpuffer aufgefüllt und über fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Nun konnten die Proben wahlweise in *Western Blot* Analysen als Membranfraktion eingesetzt oder für eine spätere Weiteraufarbeitung etwa zwei Wochen bei -20 °C eingefroren werden.

3.3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Benötigte Reagenzien: Bradfordreagenz

BSA - Standardlösung

Die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford beruht auf der Anfärbung von Proteinen durch den Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250. Der saure Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 465$ nm, das sich in Gegenwart von Aminosäuren/Proteinen zu $\lambda = 595$ nm verschiebt. Dieser bathochrome Effekt wird durch Komplexbildung zwischen dem anionischen Farbstoff und den kationischen bzw. unpolaren Seitenketten der Aminosäuren ausgelöst [70].

Durchführung:

Die Proteinbestimmung wurde nach dem in Tabelle 3.6 angegebenen Schema durchgeführt.

Für die Messung wurden jeweils 5 μ l der Proben verwendet. Zum Vergleich dienten 10 μ l einer BSA - Lösung (1 mg/ml). Nach einer Inkubation über zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen der Ansätze im Photometer bei einer Wellenlänge von

Tabelle 3.6: Pipettierschema Proteinbestimmung nach Bradford

	Probe	Standard	Leerwert
Zellsuspension	5 μ l	-	-
BSA - Lösung 1 mg/ml	-	10 μ l	-
Biorad - Reagenz	200 μ l	200 μ l	200 μ l
H ₂ O bidest.	795 μ l	785 μ l	795 μ l

$\lambda = 595$ nm gemessen und die Extinktion des Leerwerts subtrahiert. Der Proteingehalt der Proben ergab sich dann nach folgender Formel:

$$\text{Proteingehalt}[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{OD_{595}(\text{Probe})}{OD_{595}(\text{Standard})} \cdot 2 \quad (3.5)$$

3.3.3 Denaturierende SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - PAGE) und Western Blot Analyse

Benötigte Reagenzien: Gelpuffer I und II

Elektrodenpuffer

Lauffrontanzeiger (gesättigte Bromphenolblau - Lösung)

PageRuler, Prestained Protein Ladder (Marker)

Transferpuffer

In einem elektrischen Feld können Proteine aufgrund ihrer Ladung gerichtet bewegt werden (Elektrophorese). Dabei wird die Ladung des Proteins durch dessen Aminosäurezusammensetzung und Anzahl der Aminosäurenreste bestimmt. Daher ist es möglich, die Trenneigenschaften von Proteinmolekülen über die Ladung und die Konzentration der Elektrophoresepufferlösung in einem elektrischen Feld zu beeinflussen.

Für die Gelelektrophorese werden die in SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-Puffer gekochten Zelllysate verwendet. Das im Proben-Puffer enthaltene SDS ist ein anionisches Tensid, welches die Proteine in der Probe denaturiert und sich an diese zu einem SDS-Proteinkomplex bindet. Durch die negativ geladenen Sulfatgruppen wird die Eigenladung der Aminosäuren/Proteine so effektiv überdeckt, dass die Proteine negativ geladen werden. Gleichzeitig löst es Sekundär - und Tertiär - Strukturen, indem es Wasserstoffbrückenbindungen aufspaltet. Zusätzlich enthält der Probenpuffer Dithiothreitol (DTT), welches die

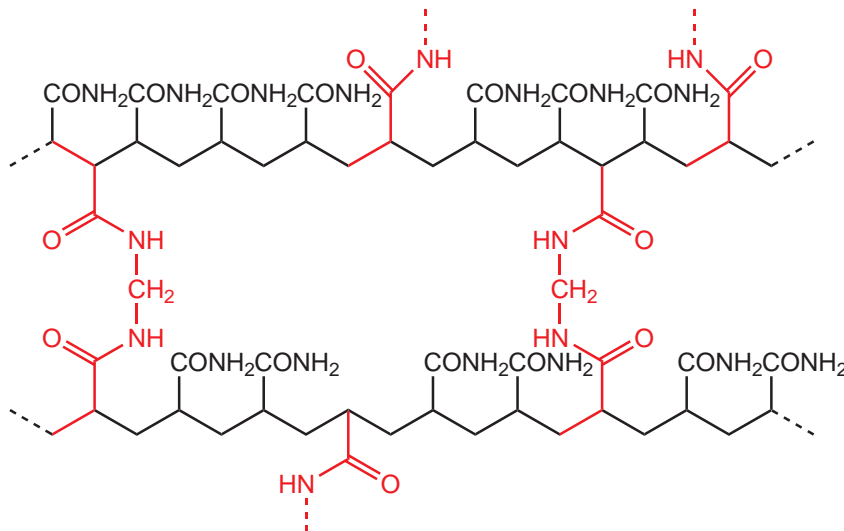


Abbildung 3.5: Aufbau und innere Vernetzung des Polyacrylamidgeles über Acrylamid (schwarz) und Bisacrylamid (rot).

Spaltung von Disulfidbrücken, Streckung von Polypeptiden und Ausgleichen von Unterschieden in der Tertiärstruktur zur Folge hat. Somit ist durch ein konstantes Verhältnis von der Ladung zur Masse eine Auftrennung nach Molekulargewicht in einem Gel mit Molekularsiebeffekt möglich. Die Wanderung der Aminosäuren im elektrischen Feld wird dann nur noch von der Größe der Proteine bestimmt, die durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgeles zu einer unterschiedlichen Wanderungsstrecke führt.

Das Acrylamid bildet zusammen mit Bisacrylamid Querverbindungen zu einem gelartigen Netzwerk nach Zugabe von APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter (siehe Abbildung 3.5) aus. Zusätzlich ist TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin) im Gel enthalten, welches den Polymerisierungsvorgang durch die Katalyse der Radikalbildung aus Ammoniumpersulfat unterstützt. Die Acrylamidkonzentration der verwendeten Trenngele variiert mit dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine. Bei der Verwendung von hohen Konzentrationen an Acrylamid und Bisacrylamid erhöht man den Grad der Vernetzung und verringert somit die Porengröße, so dass kleine Proteine gut aufgetrennt werden. Für eine optimale Auftrennung von großen Proteinen werden niedrigprozentige Gele mit einem geringeren Vernetzungsgrad und damit einer größeren Porengröße eingesetzt. Um eine optimale Auflösung der Proteine zu erhalten, werden zweischichtige Gele verwendet. Dabei werden den eigentlichen Trenngelen großporige Sammelgele vorgeschaltet. Unterschiede im pH-Wert und der Konzentration beider Gele führen dazu, dass die Proteine durch das Auftragen im Sammelgel in engen Banden konzentriert werden, bevor die weitere Trennung im Trenngel erfolgt. Letzteres hat eine

Tabelle 3.7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE

	Trenngel				Sammelgel
	7%	10%	12,5%	15%	4,5%
Gelpuffer I	2,5 ml	2,6 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Gelpuffer II	-	-	-	-	2,6 ml
Acrylamid+Bis	2,33 ml	3,33 ml	4,17 ml	5,0 ml	1,67 ml
H ₂ O bidest.	5,03 ml	4,29 ml	3,29 ml	2,46 ml	5,79 ml
APS (10%)	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

geringe Konzentration an Acrylamid und einen anderen pH-Wert. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in der Tabelle 3.7 zusammengefasst. Während im Trenngel aufgrund der geringen Porengröße der Molekularsiebeffekt für eine Auftrennung verantwortlich ist, ist dieser im Sammelgel nicht von Bedeutung. Dem Trenngel ist ein Puffer zugesetzt, der Chlorid-Ionen (Leitionen) mit einer hohen Ionenbeweglichkeit enthält. Das Sammelgel beinhaltet auch diese Leitionen, jedoch in einer anderen Konzentration bei einem anderen pH-Wert. Dem Elektrodenpuffer wird Glycin als Folgeion zugesetzt, welches zunächst im Sammelgel (pH-Wert 6,8; nahe an dem isoelektrischen Punkt des Glycins) eine geringe elektrophoretische Mobilität hat. Mit Beginn der Elektrophorese werden die Leitionen mit einer hohen Geschwindigkeit bewegt und überholen die Proteine in der Auftragstasche und im Sammelgel. Durch die Konzentrationsabnahme der Leitionen innerhalb dieser Zone resultiert ein Bereich geringerer Leitfähigkeit. Glycin als Folgeion bewirkt nun, dass die Proteine mit höherer Geschwindigkeit bewegt werden als das Folgeion. Somit befinden sich die Proteine in einem Feldstärkegradienten zwischen Leit- und Folgeionen und bilden einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten (*stacking*-Effekt): Die Proteine mit der höchsten Mobilität folgen unmittelbar den Leitionen, während die Proteine mit eher niedriger Mobilität vor den Folgeionen hergeschoben werden. Auf diese Weise erreicht man, dass die Proteine langsam in das Trenngel übertreten und nicht mehr aggregieren. Dadurch wird ebenfalls eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der Zonen erreicht. Der pH-Sprung am Übergang vom Sammelgel zum Trenngel bewirkt eine Ladungsänderung im Zwitterion Glycin, das nun eine höhere Beweglichkeit im Vergleich zu den Proteinen aufweist und sie überholt. Nun befinden sich die Proteine in einem homogenen Puffer mit konstanter Feldstärke. Da im engporigen Trenngel der Molekularsiebeffekt zum Tragen kommt und so die Molekülgröße den entscheidenden Einfluss auf die Beweglichkeit hat, ordnen sich die Proteine neu an.

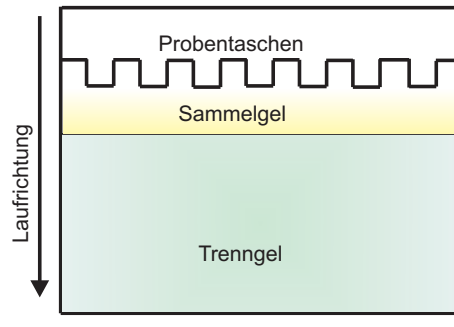


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des zweischichtigen Elektrophoresegels.

Durchführung:

Zunächst wurden die Glasscheiben der Elektrophoresekammer mit 70 %-igem Ethanol gereinigt und in die Gießrahmen vorsichtig eingespannt. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten des Trenngels mit entsprechender Porengröße (siehe Tabelle 3.7; ausreichend für zwei Gele) in ein Plastikgefäß gegeben (TEMED zuletzt), gemischt und in die Gelkammer gefüllt. Danach wird das noch flüssige Trenngel mit 100 %-igem Isopropanol überschichtet, um vorhandene Luftblasen zu entfernen und eine glatte Geloberkante zu erhalten. Nach etwa 15-20 Minuten ist die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen und das Isopropanol konnte durch Abgießen wieder entfernt werden. Das Sammelgel wurde hergestellt, auf das Trenngel vorsichtig aufgegossen und ein Probenkamm für die Probentaschen eingesetzt.

Nach vollständiger Auspolymerisation des Sammelgels konnte der Probenkamm wieder entfernt werden und die Probentaschen wurden vorsichtig mit Aqua bidest. gespült, um Gelreste zu entfernen. Nach Einsetzen der mit Polyacrylamid befüllten Glaskammern in die Elektrophoreseapparatur konnten die Probentaschen mit jeweils 20 μl der Proben (entsprechend 5 μg Gesamtprotein) mit Hilfe einer Hamilton - Spritze befüllt werden. Um einerseits das Molekulargewicht des zu charakterisierenden Proteins zu bestimmen und zusätzlich der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine zu folgen, wurde ein Proteinmolekulargewichtsstandard (7 μl) mitgeführt. Die Geltaschen und die innere Kammer der Elektrophoreseapparatur wurden vorsichtig mit Laufpuffer aufgefüllt. Zusätzlich wurde in das innere Kompartiment ein Tropfen Bromphenolblau gegeben, welches als Laufmarkierung dient. Die Elektrophorese konnte nun bei einer konstanten Spannung von 400 V (340 mA, 25 W; GE Healthcare Electrophoresis Power Supply - EPS1001) gestartet werden. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenollauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte und damit ein ausreichendes Auftrennen der Proteine erfolgt war.

3.3.3.1 Semi-Dry Blotting

Beim *Blotting* werden Proteine oder Nukleinsäuren auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran übertragen. Man verwendet diese Methode nach der elektrophoretischen Auftrennung zum Nachweis spezieller Fraktionen mittels immunologischer Methoden oder anderer spezifischer Ligandenbindungen. Diese Vorgehensweise ist erforderlich, weil die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine oder Nukleinsäuren in den Gelen für hochmolekulare Nachweissubstrate wie Antikörper, DNA oder RNA nicht zugänglich sind. Sie werden deshalb durch einen elektrischen Transfer auf eine Blotfolie übertragen, auf der sie an der Oberfläche hängen bleiben und für die Nachweisreagenzien zugänglich sind. Bei der Übertragung erscheinen die Proteine dann in derselben geometrischen Anordnung wie sie nach der Auftrennung im Gel vorlagen.

Für den elektrophoretischen Transfer hat sich das *Semi-Dry*-Verfahren in den letzten Jahren durchgesetzt. Beim *Semidry-Blotting* werden Gel und immobilisierende Membran zwischen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatmann-Papiere) gelegt, die direkten Kontakt zu zwei Graphitplatten mit hoher Leitfähigkeit haben. Die Whatmann-Papiere dienen dabei als Ionen-Reservoir. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol entfernt das SDS aus den Protein-Detergenz-Komplexen und erhöht die Bindung der SDS-freien Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Der prinzipielle Blot-Aufbau ist in der Abbildung 3.7 schematisch gezeigt.

Damit aber die hydrophobe Membran mit Transfer-Puffer benetzt werden konnte, musste sie zunächst „aktiviert“ werden. Dazu wurde die auf Größe des Trenngels zugeschnittene PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran für 1-2 min in 100 % Methanol gegeben, äquilibriert und anschließend in eiskalten Transferpuffer gelegt. Für den Aufbau der Blot-Apparatur wurden anschließend die Elektroden der Blot-Apparatur mit Transfer-Puffer benetzt und vier Lagen der Whatmann-Papiere ebenfalls in Transfer-Puffer getränkt.

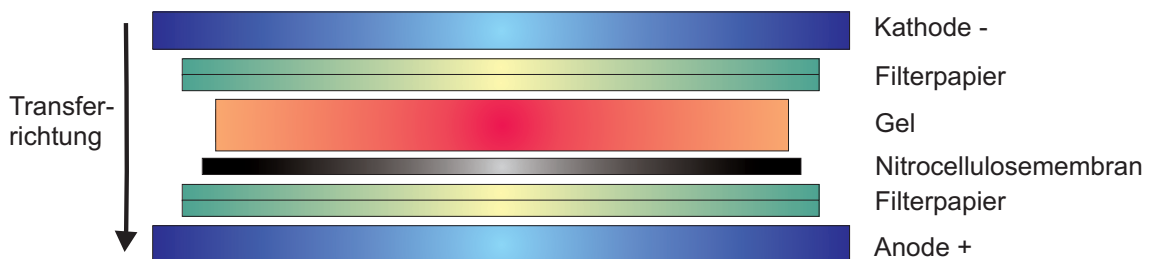


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Blot-Apparatur.

Die negativ-geladenen Proteine wandern aus dem Gel in Richtung der Anode auf die Nitrocellulosemembran.

Der Aufbau erfolgte nun so, dass auf der Anodenseite nach zwei Whatmann-Papieren die PVDF-Membran, das Gel und nach weiteren zwei Whatmann-Papieren die Kathodenseite der Blot-Apparatur aufgelegt wurden. Beim Aufbau dieses „Sandwich“ aus den Whatmann-Papieren, der Nitrocellulose-Membran und des Gels war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bildeten, da dadurch der Proteintransfer verhindert wurde. Daher wurde der Aufbau mit einer Anpressrolle überrollt, um Luftblasen zwischen den Schichtungen zu entfernen. Nach Auflegen der Kathode wurde die Apparatur geschlossen und bei konstanter Stromstärke von 170 mA über 45 min „geblottet“. Die Spannungen lagen zwischen 5 V (zu Beginn) und 25 V (am Ende des Transfers).

3.3.3.2 Detektion der Ziel-Proteine

Im Anschluss an den Proteintransfer erfolgte die Detektion der Ziel-Proteine. Die Spezifität der Detektion hängt in erster Linie davon ab, inwieweit es gelingt, ein unspezifisches Binden des Antikörpers an freie Bindungsstellen der Blot-Membran zu unterdrücken. Dazu wurde die Membran über eine Stunde in Blockingreagenz auf einem Schüttler geschwenkt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzudecken. Als Blockierreagenz wurde in dieser Arbeit 5 % Milchpulver in TBST (*TRIS buffered saline tween*) verwendet. Außerdem eignen sich noch konzentrierte Lösungen von beispielsweise BSA, Ovalbumin, Myoglobin und Hämoglobin. Durch die Proteine im Milchpulver wurden alle freien Bindungsstellen der Membran blockiert. Weitere Proteine konnten somit nicht unspezifisch an die Membran binden. Nach dem Blocken wurde die Membran mit der entsprechenden primären Antikörperlösung, welche im Regelfall aus der 1:1000 Verdünnung eines Antikörpers in 5 % BSA - TBST bestand, in eine Schlauchfolie eingeschweißt. Verdünnung und Art der Lösung variierten jedoch je nach Antikörper und den Bedingungen, die von der Firma vorgeschlagen worden sind. Diese Inkubation erfolgte am besten über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 15 Minuten in TBST-Puffer (> 4 ml Puffer/cm² Membranfläche) gewaschen, um nicht-gebundene Primärantikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Lösung bestand aus einer 1:1000 bis 1:10.000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (anti-Kaninchen bzw. anti-Maus) in 5 % Milchpulver - TBST, der mit dem Enzym Meerrettich - Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gelabelt war. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für 15 Minuten mit TBST auf dem Schüttler gespült. Die Detektion der Protein-Antikörper-Konjugate erfolgte mit dem ECL-Chemilumineszenz-System (*Enhanced-Chemilumines-*

cence, ECL; ECL Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare), welches aus zwei Lösungen bestand: 1. Substrat für die Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (= Luminol, zyklisches Diacylhydrazinderivat) und 2. Peroxidlösung und Phenole. Zunächst wurden die beiden Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt und 1:1 miteinander gemischt. Diese Lösung wurde nun auf die proteinbeladene Seite der Membran pipettiert und gleichmäßig verteilt. Luminol, ein Bestandteil des ECL Western Blotting Detection Kits, wird durch die an den Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase unter alkalischen Bedingungen und unter gleichzeitiger Reduktion des Wasserstoffperoxids oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt. Bei Rückkehr des Substrats in den Grundzustand werden Lichtquanten emittiert, die einen Autoradiographiefilm an der Stelle, auf die das Licht auftrifft, schwärzen kann. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde das Reagenz wieder entfernt, die Blot-Membran in eine dünne Folie eingeschlagen und in eine Filmkassette (HypercassetteTM, GE Healthcare) gelegt. In der Dunkelkammer wurde nun der hochempfindliche, speziell für die Biolumineszenz-Detektion entwickelte Film (Hyperfilm ECL, High Performance Chemiluminescence Film, 18x24 cm, GE Healthcare) aufgelegt. Nach einer Belichtungszeit von 20 Sekunden wurde der Film für einige Minuten im Entwicklerbad entwickelt (Dauer nach Sicht), im Wasserbad kurz gespült und schließlich fixiert. Abschließend wurden die Filme nach dem Trocknen am Computer eingescannt.

3.3.3.3 Auftragskontrolle (*Reblot*)

Ein gleichmäßiges Auftragen der Proteinmenge konnte über einen *Reblot* kontrolliert und sichergestellt werden und wurde nach jedem *Western Blot* durchgeführt.

Dafür wurden zunächst die an die Blot - Membran gebundenen Primär - und Sekundär - Antikörper entfernt („*strippen* der Membran“), wobei die auf der Membran immobilisierten Proteine möglichst wenig beeinflusst werden sollten. Die aus der Filmkassette entnommenen Membranen wurden kurz in Ethanol äquilibriert und anschließend dreimal für jeweils fünf Minuten in 0,1 molarer Glycin - Lösung (pH 2,5) und dreimal für je 15 Minuten in 0,1 molarer TRIS - HCl - Lösung (pH 7,5) gewaschen, um die Primär - und Sekundär - Antikörper von der Membran abzulösen. Es hat sich bewährt, nach mehrmaligem Waschen mit TBST drei - bis fünfmal mit 5 % Milchpulver in TBST über mehrere Stunden zu waschen und parallel gleich wieder unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Manche Antikörper erkennen nach einer solchen Behandlung nicht mehr ihr Antigen, andere wiederum funktionieren sogar noch besser. Anschließend folgte eine Inkubation in 2,5 % -iger Blockierungslösung, in der auch der GAPDH - Antikörper ver-

dünnt und anschließend auf die Blot-Membran aufgetragen wurde. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht folgten am nächsten Tag die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper und die abschließende Detektion analog zu der weiter oben beschriebenen Vorgehensweise.

3.4 Immunzytochemische Färbungen

Benötigte Reagenzien: Aceton/Methanol-Lösung (Verhältnis 1 : 1 (v : v))

Blockierlösung (0,1 % BSA, 0,2 % Glycin in PBS-Puffer)

Primärantikörper (mit PBS-Puffer 1 : 100 (v : v) verdünnt)

Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper

ImmuMount; Thermo Elektron Corp.

Paraformaldehydlösung (4 % in PBS-Puffer)

DAPI-Lösung (Verdünnung 1 : 30000 in PBS-Puffer)

Fluoreszenzkonjugate

Die *Immunzytochemie* nutzt die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung ihrer Antigene, z.B. von Wachstumsfaktoren, an der Zelloberfläche bzw. innerhalb der Zelle sichtbar zu machen. Werden Zellen mit Antikörpern inkubiert, so binden letztere nur dort, wo sich die passenden Antigene befinden. Um diese Bindung nachzuweisen, müssen die Antikörper sichtbar gemacht werden. Bei der *direkten Immunzytochemie* ist der Antikörper mit einem (fluoreszierenden) Farbstoff oder einem Enzym gekoppelt, über die die anschließende Detektion möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alternativ direkt mit dem Fluoreszenzkonjugat (SDF-1-Cy3 sowie EGF-Cy3) die entsprechenden Rezeptoren (CXCR7 sowie EGF-Rezeptor) markiert und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Bei der *indirekten Immunzytochemie* werden primäre und sekundäre Antikörper verwendet. Die primären Antikörper richten sich gegen das in Zellen nachzuweisende Antigen, die sekundären Antikörper gegen die primären Antikörper. Die primären Antikörper sind bezüglich ihrer Herkunft und Spezifität so zu wählen, dass sie sich gegen eine andere als ihrer Herkunftsspezies richten (z.B. Kaninchen anti-Ratte); die sekundären Antikörper so, dass sie sich gegen die Herkunftsspezies der primären Antikörper richten (z.B. Ziege anti-Kaninchen). Zudem sind hier die sekundären Antikörper mit einem Fluorochrom konjugiert, das bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. Dieses Signal zeigt die Anwesenheit des gesuchten Antigens in den untersuchten Zellen an. Um den Antikörpern das Eindringen ins Zytosol

der Zellen zu ermöglichen, müssen die Zellmembranen zunächst mit einem Detergenz permeabilisiert und fixiert werden. Ein dafür geeignetes Detergenz ist eine 4 °C kalte Aceton/Methanol-Lösung. Diese Art der Fixierung ist schonend und wirkt präzipitierend sowie entwässernd. Um eine Permeabilisierung der Membran zu verhindern, um z.B. extrazellulär membrangebundene Antigene nachzuweisen, wurde mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Um zu vermeiden, dass es zwischen den Antikörpern und dem Präparat zu unspezifischen Bindungen kommt, wurden zuvor die unspezifischen Bindestellen der Präparate mit Proteinen abgesättigt („blocken“). In dieser Arbeit wurden dazu die Zellen mit einer Blockierungslösung bestehend aus 0,1 % BSA, 0,2 % Glycin in PBS-Puffer über eine Stunde im Brutschrank (37 °C) inkubiert.

Alternativ zu der Inkubation und Fluoreszenzfärbung mit Primär- und Sekundärantikörpern wurden in dieser Arbeit die hergestellten Fluoreszenzkonjugate (z.B. SDF-1-Cy3) für direkte Fluoreszenzfärbungen verwendet.

Durchführung:

Für die immunzytochemischen Nachweismethoden wurden die Zellen zunächst auf PDL-beschichteten Deckgläschen in sterilen Zellkulturschälchen (etwa 10.000 Zellen pro Deckgläschen) in 2 ml Astrozytenmedium (10 % FKS) ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C für zwei Tage. Anschließend wurde das Nährmedium entfernt und die adhärennten Zellen vorsichtig mit warmen PBS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung der Zellen gab man nun entweder für zehn Minuten ein Aceton-Methanol-Gemisch (4 °C) oder für 20 Minuten eine 4 %-ige Paraformaldehydlösung auf das Deckgläschen. Dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer (jeweils für zehn Minuten) entfernte das Aceton bzw. Paraformaldehyd wieder. Um eine Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Bindungsstellen zu unterbinden und damit das Hintergrundsignal zu minimieren, wurden die Zellen mit der Blockierungslösung bei 37 °C im Brutschrank über eine Stunde inkubiert. Ohne zusätzlichen Spülschritt wurden 100 µl des Primärantikörper auf die Zellen gegeben und in einer feuchten Kammer über Nacht im Kühlraum (4 °C) unter Ausschluss von Licht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen dreimal für fünf Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Es folgte nun die Zugabe von 100 µl des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (Verdünnung 1:1000 mit PBS-Puffer) und die Inkubation über eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank. Nach erneutem dreimaligen Spülen der Deckgläschen mit PBS-Puffer wurde zur Färbung der Zellkerne 30 Minuten mit einer verdünnten DAPI-Lösung (100 µl) inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS-Puffer und einmal mit H₂O bidest. gespült, mit ImmuMount auf Objektträgern eingedeckelt und bei 4 °C

unter Ausschluss von Licht aufbewahrt. Die Messungen erfolgten am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M (invers) + Apotome, Zeiss).

3.5 Kopplung von Antikörpern an Eisenoxid-Nanopartikel

Benötigte Reagenzien: Acetonitril-Lösung

Bromcyan

Dextranummantelte Eisenoxid-Nanopartikel (Nanomag N70)

0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 8,3)

0,2 M TRIS-Puffer (pH 8,5)

Eine universelle Variante zur Kopplung von Peptiden bzw. Antikörpern mit primären Aminogruppen ist die *Bromcyan-Methode*, anhand derer im Rahmen dieser Arbeit die unterschiedlichen Eisenoxid-Konjugate hergestellt worden sind. Sie basiert auf der Reaktion der Hydroxylgruppen der Dextranhülle von Eisenoxid-Nanopartikel mit Bromcyan (*Aktivierung*). Die dabei gebildeten Carbamate bzw. Imidocarbamate sind sehr reaktionsfähig und reagieren leicht mit Aminogruppen zu Isoharnstoffderivaten (siehe dazu das in Abbildung 3.8 gezeigte Reaktionsschema).

Durchführung:

Zu Beginn wurden 1 g Bromcyan in 1 ml Acetonitril unter dem Abzug gelöst und in einem

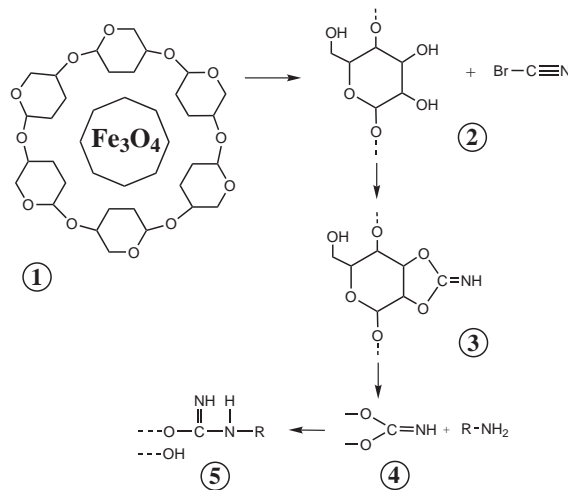


Abbildung 3.8: Übersicht über die Kopplungsmethode.

1. Eisenoxid-Nanopartikel; 2. Aktivierung unter leicht alkalischen Bedingungen (pH 8-9); 3. Gelchromatographische Abtrennung des überschüssigen Bromcyans; 4. Reaktion mit Aminogruppe; 5. Verbindung über eine Imidocarbonatgruppe.

gut verschließbaren Szintillationsgefäß unter Feuchtigkeitsausschluss aufbewahrt. Zur Aktivierung der Hydroxylgruppen der Dextranhüllen (Vorstufe und Voraussetzung der Kopplungsreaktion) wurden 20 µl der hergestellten Bromcyan-Acetonitril-Lösung mit 300 µl Nanomag 70-Eisenoxid-Nanopartikel und 60 µl 0,1 M NaHCO₃-Puffer gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Dadurch wurden die vorhandenen Hydroxylgruppen der Dextranhülle zu reaktiven Carbamaten modifiziert. Während der Reaktionszeit wurde eine Chromatographiesäule (10 x 1 cm) mit Sephadex G-25 Superfine gefüllt und mit 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 8,3) äquilibriert. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf die Säule aufgetragen und mit 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH 8,3) eluiert. Überschüssiges Bromcyan konnte dadurch entfernt und abgetrennt werden. Die braune Frontzone (aktivierte Eisenoxid-Nanopartikel) wurde in Reagiergefäßen aufgefangen (etwa 1 ml) und die Säule anschließend zur Deaktivierung des nicht umgesetzten Bromcyans mit Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %) gespült. Die mit Bromcyan in Berührung gekommenen Verbrauchsmaterialien wurden ebenfalls zur Deaktivierung in eine Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %) gegeben. Die magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel mit der nun aktivierten Dextranhülle wurden mit 20 µg des zu koppelnden Antikörpers vermischt und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei reagierten nun die aktivierten Carbamate mit den am N-Terminus und an den Lysinresten vorliegenden primären Aminogruppen der Antikörper zu Isoharnstoffderivaten. Um restliche Carbamate abzusättigen, die nicht mit den primären Aminogruppen reagiert hatten, wurden am nächsten Tag 60 µl 0,2 M TRIS-Puffer (pH 8,5) zu der Probe hinzugegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend folgte die Abtrennung nicht gebundener Antikörper über eine Chromatographiesäule, gefüllt mit Sephadex S-300 (90 x 1,60 cm) und 0,14 M NaCl mit 20 mM HEPES (pH 7,4). Mit Hilfe des an der Säule angeschlossenen Fraktionssammlers konnten die einzelnen Fraktionen à 2 ml gesammelt und durch eine anschließende *Dot-Spot*-Analyse (siehe Unterpunkt 3.6) auf eine erfolgreiche Kopplung überprüft werden. Die das Konjugat enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und durch anschließende Ultrafiltration (siehe Unterpunkt 3.7) eingengt. Abschließend folgte wie in Unterpunkt 3.9 beschrieben die Bestimmung der Eisenkonzentration der Konjugatlösung.

3.6 Dot-Spot-Analyse

Der hochempfindliche Nachweis eines Proteins ist mit Hilfe der Immundetektion (*Dot-Spot-Analyse*) möglich. Dabei dient die *Dot-Spot-Analyse* der schnellen und qualitativen Überprüfung auf eine erfolgreiche Bindung der verwendeten Antikörper an die Eisenoxid-Nanopartikel. Dazu wurden 5 µl der gesammelten Fraktionen aus der Gelchromatographie direkt auf eine Nitrocellulosemembran punktförmig (*Spots*) aufgetragen. Als Positivkontrolle dienten 2 µl unkonjugierter Antikörper bzw. als Negativkontrolle 5 µl des verwendeten Puffers. Nach dem Trocknen der Membran wurde diese für eine Stunde in 5% Milchpulver in TBST gelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde der mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase, HRP*) konjugierte Sekundärantikörper dem Blockingpuffer zugesetzt und die Membran für eine weitere Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST für jeweils zehn Minuten folgte nun der Nachweis der entstandenen Immunkomplexe bestehend aus Eisenoxid-Nanopartikel, Primär- und Sekundärantikörper sowie der Meerrettichperoxidase über die *Enhanced Chemiluminescence (ECL)*-Methode (Beschreibung der Methode siehe Unterpunkt 3.3.3.2).

Zur Detektion wurde jeweils 1 ml der beiden ECL-Lösungen gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen, um ein Austrocknen zu vermeiden und den aufzulegenden Film (Hyperfilm ECL, High Performance Chemiluminescence Film, 18 x 24 cm, GE Healthcare) vor Feuchtigkeit zu schützen. Abschließend wurde dieser spezielle hochempfindliche Film wie bereits in Kapitel 3.3.3.2 beschrieben, in der Dunkelkammer belichtet und anschließend entwickelt. Eine durch die Lichtemission erfolgte Schwarzfärbung des Films deutet auf eine erfolgreiche Bindung des Antikörpers an die Eisenoxid-Nanopartikel hin.

3.7 Ultrafiltration

Nach der *Dot-Spot*-Analyse wurden die aus der Gelchromatographie erhaltenen Fraktionen (Konjugat) vereinigt und anhand der Ultrafiltration konzentriert, wobei das initiale Volumen von 15 ml auf 1,5 ml verringert werden konnte. Die Ultrafiltration stellt ein druckbetriebenes Membranverfahren dar und schließt bezüglich ihres Trennbereiches, d.h. der Größe der abzutrennenden Partikel bzw. Moleküle, zusammen mit der Mikrofiltration die Lücke zwischen Umkehrosmose und Nanofiltration einerseits und Filtration andererseits (Abbildung 3.9, (A)).

Die Trennung und damit die Konzentrierung der Konjugatlösung beruht bei der Membranfiltration auf den Unterschieden in den hydrodynamischen Radien der Moleküle und kann durch sekundäre Effekte wie elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen beeinflusst werden [71,72]. Bei der Konzentrierung wird zunächst die zu konzentrierende Lösung durch Konvektion an die Oberfläche einer semipermeablen Membran (regenerierte Zellulose) gebracht. Während das Lösungsmittel die Membran unter Einwirkung von Druck durch Stickstoffzufuhr durchdringt, werden die gelösten Komponenten mehr oder weniger vollständig zurückgehalten und eingeengt. Während der gesamten Konzentrierung wurde die Lösung gerührt, um eine Assoziation der Proteine an der Membran zu verhindern (siehe Abbildung 3.9). Die Membran wird durch die Angabe der molekularen Trenngrenze (*molecular weight cutoff*, MWCO) und der Schärfe dieser Trenngrenze charakterisiert. Die Trenngrenze wird durch den Porenradius und die Schärfe der Trenngrenze durch die Porengrößenverteilung bestimmt. Beide Größen werden experimentell durch Filtration von Molmassenstandards ermittelt. Aufgrund der Porengrößenverteilung einer Membran ist es nicht möglich, scharfe molekulare Trenngrenzen zu erreichen. Als MW-

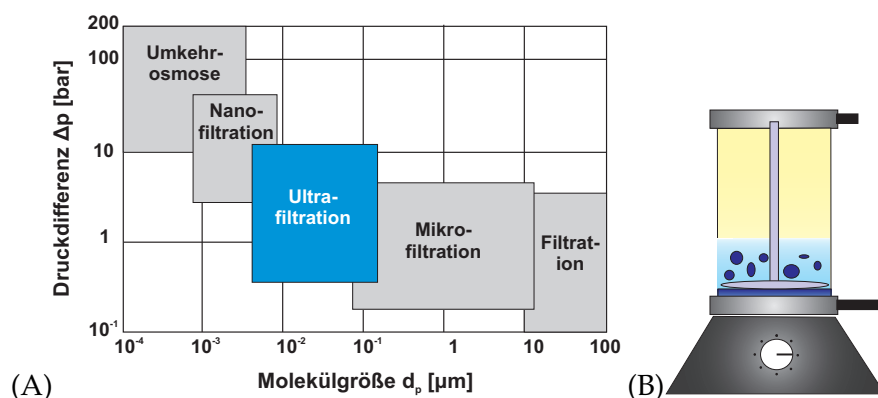


Abbildung 3.9: Übersicht über Trennbereiche unterschiedlicher Trennverfahren (A) sowie über die verwendete Ultrafiltrationseinheit (B).

CO einer Membran wird daher die Molmasse bezeichnet, die mit einem Rückhalt von mindestens 90% aus dem Zulauf entfernt werden kann. Der MWCO hängt sowohl von der Molekülgröße als auch von der Molekülform der für die Bestimmung des Rückhaltes verwendeten Standardsubstanzen ab. Weiter wird die Membranselektivität anhand des Rückhaltevermögens der gelösten Stoffe gemessen [72].

Da Membranverfahren keine extremen Temperaturen, pH-Werte oder Lösemittel benötigen, bieten sie sich für die Konzentrierung bzw. Reinigung empfindlicher Produkte besonders an.

Durchführung:

Die gesammelten Fraktionen aus der Gelchromatographie wurden nach der *Dot-Spot*-Analyse zunächst vereinigt. Nach Aufbau der Ultrafiltrationseinheit wurde die Konjugatlösung auf die Ultrafiltrationsmembran (YM 10; MWCO: 100 000 Da; Filterdurchmesser: 25 mm; Filterfläche: 4,4 cm²) gegeben, die Rührzelle verschlossen, durch Zufuhr eines Stickstoffstromes Druck angelegt und der Magnetrührer zwecks Verringerung bzw. Vermeidung der Deckschichtbildung auf der Membran eingeschaltet. Damit wurde der Ultrafiltrationsvorgang gestartet und die konjugatenthaltenden Fraktionen konzentriert.

3.8 Liposomen

Einen Überblick der einzelnen Herstellungsschritte, auf die nachfolgend detaillierter eingegangen wird, gibt die Abbildung 3.10.

3.8.1 Herstellung der Liposomen

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Liposomen setzt sich (wie anschließend detaillierter beschrieben) aus dem Ansetzen und Herstellen einer Liposomendispersion nach der Filmmethode, gefolgt von mehreren Frier-Tau-Zyklen mit anschließender Extrusion der Liposomendispersion zusammen (siehe Abbildung 3.10). Die Liposomen wurden mit einem Gesamtlipidgehalt von 0,012 mmol Lipid/ml hergestellt, wobei die verwendeten Lipide und das molare Verhältnis der einzelnen Komponenten der Tabelle 3.8 zu entnehmen sind.

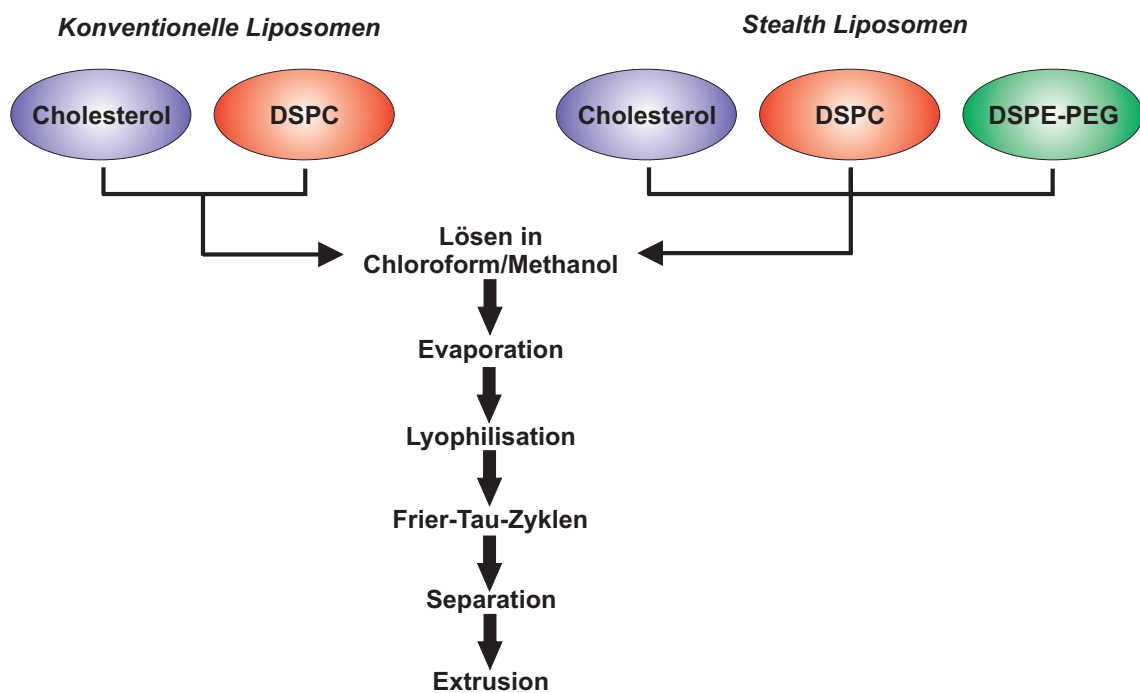


Abbildung 3.10: Fließschema der Liposomen - Herstellung.

Tabelle 3.8: Lipidmembran - Zusammensetzung der verwendeten Liposomen

Membranbestandteil /Lipid	Molekulargewicht g/mol	Stoffmengenverhältnis [mol · mol ⁻¹]	
		unpegyliert	pegyliert
Cholesterol	386,7	1,0	6
DSPC	790,2	2,3	13
DSPE - PEG (2000)	2805,5	/	1

3.8.1.1 Filmmethode

Benötigte Reagenzien: Cholesterol

DSPC

DSPE - PEG (2000)

Eisenoxid - Nanopartikel

Die von Bangham et al. erstmals beschriebene Filmmethode [33] diente ursprünglich zur Herstellung multilamellarer Vesikel (MLV). Hierzu wurden die aus dem Stoffmengenverhältnis berechneten Lipidmengen (siehe Tabelle 3.8) und Membranbestandteile (und evtl. lipophile Wirk- und Hilfsstoffe) in einen Spitzkolben eingewogen und in einem geeigneten organischen Lösungsmittel (hier: Mischung aus Methanol und Chloroform, Volumenverhältnis 1:1 (v/v)) gelöst. Dabei ist Cholesterol neben den Phospholipiden eine wichtige Komponente für den Aufbau von Liposomenmembranen. Wird Cholesterol in eine Phospholipidmischung eingebracht, führt die Interaktion des Cholesterols mit dem Phosphorsäurerest der Lipide zu einer Verfestigung der Membranstrukturen und damit zu einer reduzierten Permeabilität. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend durch Überleiten eines Stickstoffstroms über einen Zeitraum von mindestens zwei Stunden wieder entzogen. Auf der Innenwand des Spitzkolbens entstand ein homogener, transparenter Lipidfilm, der ggf. im Hochvakuum nachgetrocknet werden konnte. Dieser Lipidfilm wurde anschließend mit 10 ml einer Pufferlösung (PBS) hydratisiert und aufgenommen, wobei spontan multilamellare Liposomen (MLV) unterschiedlicher Größe entstanden. Enthielt der Puffer suspendierte Eisenoxid - Nanopartikel, so wurden diese mit in die Liposomen eingeschlossen. Die auf diese Art entstandene Liposomendispersion wurde mit anschließenden Frier - Tau - Zyklen nachbehandelt.

3.8.1.2 Frier - Tau - Zyklen

Mehrfachiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) und anschließendes Auftauen der Liposomendispersion führte zu einer wiederholten Ruptur und Rekonstitution der liposomalen Lipiddoppelschichten (*bilayer*). Dadurch wurde die Einschlusseffizienz von Eisenoxid-Nanopartikel verbessert und die Homogenität der Liposomendispersion erhöht. Die mit der Filmmethode hergestellten Liposomen wurden im Allgemeinen mit dem Ziel weiterverarbeitet, eine definierte, enge Größenverteilung zu erhalten. Dies kann z.B. durch Ultraschall oder über mechanische Verfahren wie die in dieser Arbeit verwendete Extrusion, aber auch durch Hochdruckhomogenisation oder Hochdruckextrusion geschehen.

Während der Frier-Tau-Zyklen wird der Spitzkolben direkt nach Lösen des entsprechenden Lipidfilms in flüssigen Stickstoff getaucht und solange gedreht, bis die komplette Dispersion durchgefroren ist. Anschließend wird der Kolben im Wasserbad bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut (Auftauzeit fünf Minuten). Durch die Wasserbadtemperatur von $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde gewährleistet, dass bei der Herstellung der Liposomen mind. $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ über der Phasenübergangstemperatur des mengenmäßig dominierenden Lipids (hier: DSPC) gearbeitet wurde. Durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen kam es zum Aufbrechen und zur Neubildung der Lipidbilayer, wodurch aus großen multilamellaren Vesikeln (MLV) kleine unilamellare Liposomen (ULV) erhalten wurden. Durch anschließende mehrmalige Zentrifugation bei 2000 rpm über eine Minute wurden anschließend nicht eingeschlossene Eisenoxid-Nanopartikel von den Liposomen abgetrennt.

3.8.1.3 Extrusion

Bei der Extrusion wurde die nach den Frier-Tau-Zyklen resultierende MLV-Dispersion bestehend aus Liposomen unterschiedlicher Größe mehrfach unter Druck durch Polycarbonatmembranen mit einer definierten Porengröße mittels eines in Abbildung 3.11 dargestellten LiposoFast Hand Extruders (Avestin Inc., Mannheim) gepresst (extrudiert)



Abbildung 3.11: Liposo Fast Extruder

mit dem Ziel, einheitlich große Liposomen zu erhalten. Dazu wurden die multi- und unilamellaren Vesikel der Lipiddispersion durch Polycarbonatfilter der Porengröße 200 nm und anschließend 100 nm jeweils 21 mal extrudiert. Durch die ungerade Anzahl an Extrusionsschritten ist gewährleistet, dass die Liposomendispersion nicht dort entnommen wird, wo mit der Extrusion begonnen wurde. Daraus folgt, dass nur extrudierte Partikel und keine größeren Lipidaggregate in der Dispersion vorhanden waren. Durch die dabei auftretenden Scherkräfte wurden große multilamellare Vesikel in kleine *bilayer*-Bruchstücke zerissen, die augenblicklich revesikulieren. In Abhängigkeit vom Porendurchmesser und der Zahl der Extrusionsschritte entstanden so nahezu unilamellare Liposomen, die durch eine homogene Größenverteilung gekennzeichnet sind [73,74].

Wie in Unterpunkt 3.8.2 näher beschrieben, wurden anschließend zur Überprüfung der Größenverteilung die extrudierten Liposomen mittels dynamischer Lichtstreuung (Photonen-Korrelations-Spektroskopie (*photonen correlation spectroscopy*, PCS)) vermessen. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4-6 °C über maximal sieben Tage.

3.8.2 Größenbestimmung über Photonen-Korrelation-Spektroskopie (PCS)

In Hinblick auf ein erfolgreiches *Targeting* von Tumorzellen muss die Größe der Liposomen so gering wie möglich sein [73,74], da das Ausmaß der Aufnahme von Liposomen in direktem Zusammenhang mit der Liposomengröße steht [75]. Damit besitzt die Liposomengröße einen erheblichen Einfluss auf den Erfolg von der Zellmarkierung mit magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln und damit einer Detektierbarkeit dieser Zellen im MRT.

Zur Messung der mittleren Liposomengröße (*Z-Average*) und der Homogenität (*Polydispersität*), als ein dimensionsloses Maß für die Verteilungsbreite der Liposomendispersion, wurde das Verfahren der *Laser-Photonen-Korrelationsspektroskopie* (PCS) angewandt¹. Diese Methode ist ein dynamisches Streulichtverfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen und die am häufigsten verwendete Routinemethode zur Größenbestimmung von Lipiddispersionen [76,77].

Wie in der Abbildung 3.12 dargestellt, wird bei der Messung ein Laserstrahl durch eine partikelhaltige Probe geleitet. Das von den Liposomen verursachte Streulicht wird in einem Winkel von 90 °C zum einfallenden monochromatischen Laserstrahl ($\lambda = 635 \text{ nm}$) mittels eines Photomultipliers detektiert. Das Streuungsintensitätssignal wird von dem

¹Die Messung der Liposomengröße erfolgte im pharmazeutischen Institut (Arbeitsgruppe Prof. Müller) der Universität Kiel

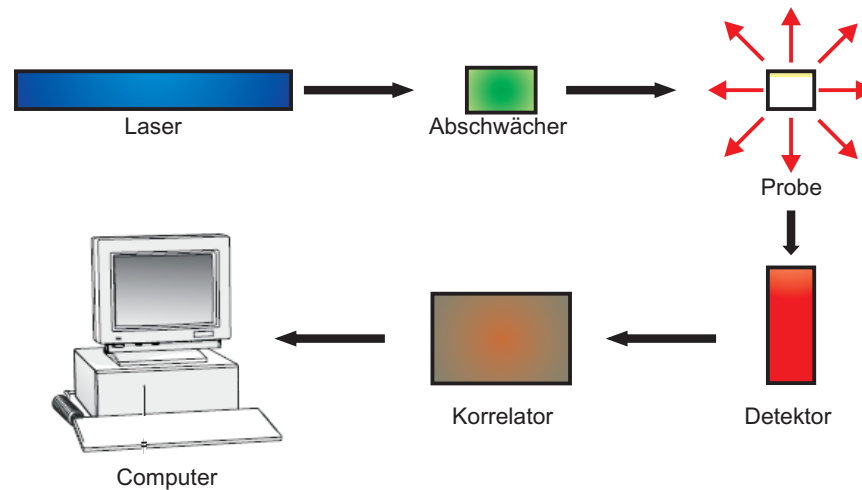


Abbildung 3.12: Überblick über die Laser-Photonen-Korrelationspektroskopie (*photonen correlation spectroscopy, PCS*).

Detektor an einen Korrelator weitergeleitet. Dieser vergleicht die Streulichtintensität von aufeinander folgenden Zeitintervallen, um das Ausmaß der Intensitätsschwankungen zu bestimmen. Diese Daten vom Korrelator werden anschließend an einen Computer weitergeleitet, mit einer speziellen Software analysiert und die Größeninformationen abgeleitet. Somit lässt sich aus den Veränderungen der Streulichtintensität (bedingt durch die Brown'sche Molekularbewegung) der hydrodynamische Durchmesser (*Z-Average*) der Liposomen ableiten und eine Aussage über die Polydispersität der Probe treffen.

Bei den Auswertungen kann unterschieden werden in Intensitäts-, Volumen- und Anzahlverteilung. Da die Intensität des vermessenen Streulichts in der sechsten Potenz vom Durchmesser des Partikels abhängt, handelt es sich in dieser Arbeit bei den angegebenen Werten um die Anzahlverteilung, die linear vom Durchmesser abhängig ist. Damit wurde eine mögliche Beeinflussung von eventuellen größeren Partikeln ausgeblendet und die Gewichtung der gewünschten kleineren Partikel hervorgehoben.

Durchführung:

Die Liposomendispersion wurde vor jeder Größenbestimmung mit sterilfiltriertem PBS-Puffer (1:33) verdünnt, um das Streulicht der einzelnen Liposomen zu detektieren und Mehrfachstreuungen bei zu hoch konzentrierten Lösungen zu vermeiden. Somit wurden zunächst 1000 μl PBS-Puffer durch einen Sterilfilter der Porenweite 0,2 μm filtriert und in eine kleine Polystyrolküvette gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 μl der Liposomendispersion. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Polystyrolküvette in das

Messgerät gestellt und die Messung gestartet. Die Messungen wurden pro Probe dreimal wiederholt, wobei sich jede Einzelmessung aus 13 Untermessungen zusammensetzte. Die Messdauer wurde vom Gerät automatisch gewählt und richtete sich nach der Zählrate. Der *Z-Average* als mittlerer hydrodynamischer Durchmesser der Liposomendispersion ergab sich aus dem Mittelwert der drei Hauptmessungen.

3.9 Photometrische Bestimmung des Eisengehaltes

Benötigte Reagenzien: HCl-Lösung (36 %)

Citrat-/Phosphatpuffer (pH 3)

Spectroquant Testkit

Titrisol (1 mg Fe²⁺/ml)

Unter Zuhilfenahme des Spectroquant Testkits konnte der Eisengehalt von den hergestellten Eisenoxid-Antikörper-Konjugaten sowie der Liposomen als auch der intrazelluläre Eisengehalt nach Inkubation der Zellen photometrisch bestimmt werden ($\lambda = 550 \text{ nm}$). Dabei wird nach Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) durch Thioglycolsäure zweiwertiges Eisen durch eine violette Komplexbildung mit Ferrospectral (Na₂ [3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonsäure)-1,2,4-triazin] nach der Triazin-Methode photometrisch nachgewiesen. Somit wurden durch Reduktion von Fe³⁺ dreiwertige Eisenionen ebenfalls photometrisch miterfaßt.

Durchführung:

Für die Eichkurve wurde zunächst eine Verdünnungsreihe aus einer Titrisol-Standardlösung (1 mg Fe²⁺/ml) wie folgt hergestellt:

60 µl Titrisol-Standardlösung und 60 µl HCl-Lösung (36 %) wurden zusammengegeben und auf einem Heizblock für zehn Minuten bei 70 °C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. 100 µl dieser Lösung wurden mit Citrat-Phosphatpuffer auf 5 ml aufgefüllt, um die Standardreihe nach der Tabelle in der Abbildung 3.13 anzusetzen.

Nach der Inkubation der Zellen entweder mit Eisenoxid-Antikörper-Konjugaten oder mit Eisenoxid-gefüllten Liposomen wurden diese zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und bei -20 °C eingefroren, um die Zellmembranen aufzubrechen und intrazelluläres Eisenoxid bestimmen zu können. Für die anschließende Bestimmung des Eisengehalts in den Zellen wurden diese wieder aufgetaut und mit 1 ml HCL (36 %) pro Schälchen bedeckt. Nach dem Abkratzen der Zellen mit einem Zellkulturschaber wurden diese in

Standard	Eisengehalt [$\mu\text{g Fe/ml}$]
1	5
2	2,5
3	1,25
4	0,625
5	0,313
6	0,156
7	0,078

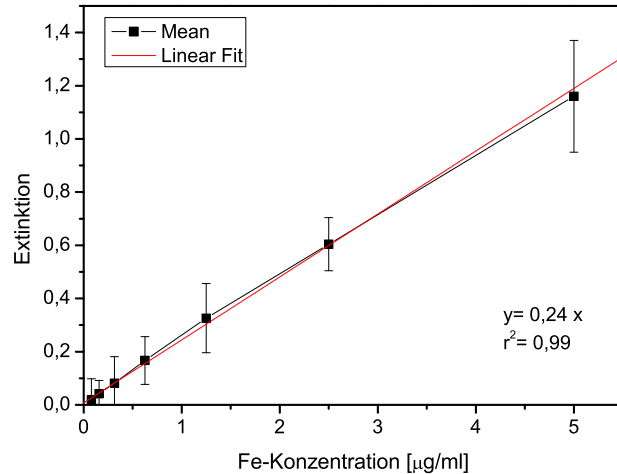


Abbildung 3.13: Photometrische Bestimmung der Eisenkonzentration anhand des Spectroquant Testkits. In der Tabelle sind die Eisenkonzentrationen der Standards angegeben. Nach Bestimmung deren Extinktionen ($\lambda = 550 \text{ nm}$) wurde über lineare Regression die Geradengleichung ermittelt. Anhand dieser konnten die Eisenkonzentrationen der Proben bestimmt werden.

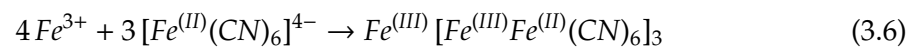
ein Reaktionsgefäß überführt. Für einen Aufschluss der Proben wurden diese sowie die Standards für zehn Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Vorlegen von $100 \mu\text{l}$ des Citrat-Phosphat-Puffers in einer 96-Well-Platte wurden jeweils $100 \mu\text{l}$ der Proben sowie der Standards zugegeben und für die Komplexbildung $15 \mu\text{l}$ der Fe-AN-Lösung aus dem Testkit zugegeben. Nach leichtem 30-minütigem Schütteln auf einem Laborschüttler konnten die Extinktionen der Proben in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden. Nach linearer Regression der Extinktionen der Standardreihe und Erhalt der Geradengleichung ($y = 0,24x + 0$) konnte abschließend der Eisengehalt in den Zellen berechnet werden.

3.10 Anfärbung intrazellulär aufgenommener Eisenoxid-Nanopartikel

Mit der *Berliner Blau-Reaktion* wurde intrazelluläres dreiwertiges Eisen über eine Komplexbildung mit einer Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung histochemisch nachgewiesen. Dadurch konnte eine Aufnahme der mit Eisenoxid-gefüllten Liposomen über Endozytose durch die entsprechenden Zellen festgestellt und nachgewiesen werden. Für die Berliner Blau-Färbung wurden zunächst die entsprechenden Zellen auf PDL-beschichteten Deckgläsern ausgesät (ca. 50.000 Zellen pro Deckgläschen) und für einen Tag im Brutschrank

kultiviert, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Eisenoxid-gefüllten Liposomen versetzt und über einen Zeitraum von einer Stunde im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Es folgte das Spülen der Zellen mit PBS-Puffer und anschließender Fixierung mit einer kalten Aceton-Lösung über zehn Minuten. Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer wurden die fixierten Zellen mit einer 2 %-igen Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung versetzt und für zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde die Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung erst kurz vor dessen Gebrauch in H₂O bidest. angesetzt, mit 1 M Salzsäure in einem Volumenverhältnis von 1 : 1 verdünnt, steril filtriert und auf 37 °C erwärmt.

Über Komplexbildung von dreiwertigem Eisen mit der Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung zu einem dunkelblau gefärbten Komplex nach



konnte das über die Liposomen (intrazellulär) aufgenommene Eisen dargestellt werden. Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer wurden für eine Gegenfärbung der Kerne die Zellen über drei Minuten mit Kernechtrubin (0,1 % in H₂O bidest. mit 5 % Aluminiumsulfat) inkubiert.

3.11 Nachweis von Tumorzellen mittels Eisenoxid-Liposomen über MRT

Nach erfolgreicher Herstellung von Eisenoxid-beladenen Liposomen und Bestimmung deren Eisenkonzentration konnten die entsprechenden Tumorzellen unter versuchsspezifischen Bedingungen mit den Liposomen inkubiert werden. Im Anschluss daran folgte die Detektion der Tumorzellen über die Magnetresonanztomographie (MRT), die die Liposomen über Endozytose unspezifisch aufgenommen hatten. Für die Detektion konnten entweder die Zellen als Zellpellet in ein Polyacrylamidgel eingebettet werden oder der Nachweis erfolgte über Polyethylenterephthalat-Membranen.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Diagnostische Radiologie, Bereich Medizinische Physik, fanden die MR-Untersuchungen der Proben im Institut für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UK-SH) Kiel statt. Die T₂*-gewichteten MRT-Messungen wurden an einem 3 Tesla Philips Achieva in einem auf Raumtemperatur erwärmten PBS-Pufferbad durchgeführt (T₂*-gewichtete Pulse-Sequenz mit

TE/TR = 35/1000; Flipwinkel $\alpha = 50^\circ$; Ortsauflösung 0,15 mm pro Ebene; Schichtdicke: 1,5 mm; Anzahl der Scans: 4).

3.11.1 Einbettung des Zellpellets in Polyacrylamid

Die zwei Tage zuvor in 96-Well Platten ausgesäten Zellen wurden mit PBS-Puffer gespült und anschließend mit der entsprechenden Menge an Eisenoxid-gefüllten Liposomen in Astrozytenmedium (Eisenoxid-Konzentration: 40 $\mu\text{g Fe/ml}$) über einen Zeitraum von einer Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gespült, um nicht-aufgenommene Liposomen zu entfernen und damit eine erhöhte Eisenkonzentration und somit auch eine falsch positive Schwärzung während der MRT-Messungen zu vermeiden.

Das Polyacrylamidgel wurde entsprechend der Zusammensetzung eines 12,5 %-igen Trenngeles, wie es bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet wird (siehe Tabelle 3.7), angesetzt und mit kleinen Vertiefungen versehen. Nach dem Fixieren der Zellen mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung über 20 Minuten wurden die Zellpellets vorsichtig in die Vertiefungen hineingegeben und mit Polyacrylamid luftblasenfrei aufgefüllt. Nach etwa 30 Minuten war das Gel ausgehärtet und konnte für die MRT-Messungen verwendet werden.

3.11.2 Nachweis der Zellen auf Polyethylenterephthalat-Membranen

Für eine bessere und einfachere Handhabung der Zellen für die tomographische Messung wurden die Zellen anstatt in 96-Well Platten auf dünnen Polyethylenterephthalat-Membranen ausgesät, die den Boden von Membraneinsätzen bildeten. Eine genaue Übersicht über diese Membraneinsätze gibt die Abbildung 3.14.

Das Aussäen der Zellen auf diesen Membraneinsätzen hatte gegenüber den 96-Well Platten den entscheidenden Vorteil, dass die Zellen als Monolayer auf der Membran wuchsen

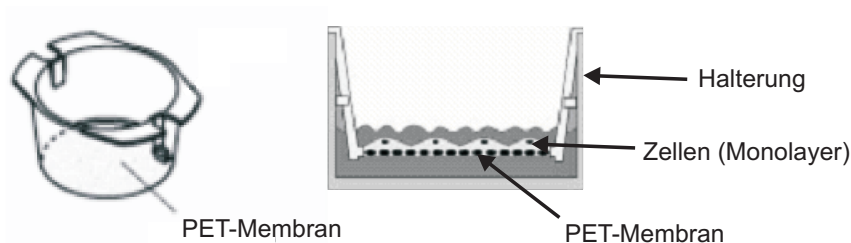


Abbildung 3.14: Polyethylenterephthalat (PET)-Membran

und so auch im MRT dargestellt werden konnten. Da die Membranen selbst keinen Kontrast (Schwärzung) im MRT gaben (siehe Ergebnisteil Unterpunkt 4.6, Seite 112), konnten sie die Visualisierung der Zellen nicht negativ beeinflussen. Dagegen war nach Einbettung der Zellen in einem Polyacrylamidgel das Messen der Zellen nur als Zellpellet möglich.

Die Zellen wurden analog dem Aussäen in den 96-Well Platten nun auf der Membran vorsichtig ausgesät und mit Astrozytenmedium bedeckt. Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank (Anwachsen der Zellen) wurden die Zellen mit PBS-Puffer gespült und anschließend mit den Eisenoxid-beladenen Liposomen (Eisenoxid-Konzentration: 40 µg Fe/ml) über eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer wurden die Zellen mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung über 20 Minuten fixiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer überschichtet und die Membraneinsätze für die MRT-Messungen in 6-Well Platten hineingestellt. Der Nachweis von Eisenoxid-beladenen Zellen erfolgt im MRT über die T_2^* -Relaxationszeit. Eisenoxid verkürzt diese T_2^* -Zeit (Signalverlust $\hat{=}$ Kontrastgewinn).

3.12 Fluoreszenzmarkierung tumorspezifischer Liganden und Antikörper

Aufgrund des besonderen Stellenwertes der Fluoreszenz in dieser Arbeit wird auf die Fluoreszenzerscheinung näher eingegangen. Das Elektronensystem eines Moleküls wird durch die Aufnahme von elektromagnetischer Strahlung vom Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) überführt. Wie aus Abbildung 3.15 ersichtlich, bestehen nach dem Jablonski Termschema für ein angeregtes Molekül verschiedene Möglichkeiten, die aufgenommene Energie wieder abzugeben [78]:

- Strahlung niedriger Energie wird in mechanische Energie (Rotationsbewegungen und Schwingungen des Moleküls) umgewandelt
- strahlungslose Inaktivierung durch Zusammenstöße mit Nachbarmolekülen, z. B. aus dem Lösungsmittel, wobei die Energie in Wärme umgewandelt wird
- Fluoreszenzemission durch Umwandlung der Elektronenanregungsenergie in Lichtenergie
- Phosphoreszenz durch einen strahlungslosen Übergang der Elektronen aus dem Singulett- in Triplettzustände unter Spin-Umkehr und danach Übergang in den Grundzustand unter Lichtemission

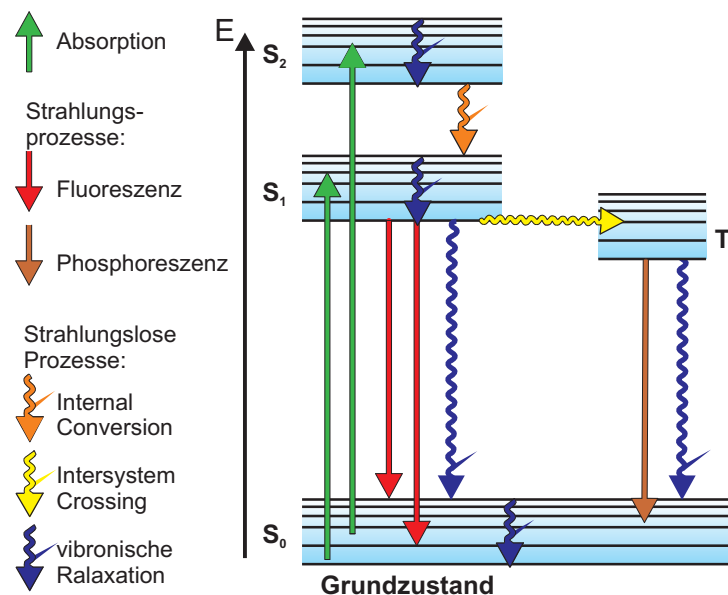


Abbildung 3.15: Jablonski Termschema

Unter dem Oberbegriff Lumineszenz werden die durch Ausstrahlung von Licht gekennzeichneten Erscheinungen Fluoreszenz und Phosphoreszenz zusammengefasst. Fluoreszenz tritt nur während oder unmittelbar nach der Anregung des Elektronensystems auf. Aufgrund der Schnelligkeit der ohne Spin-Umkehr verlaufenden Elektronenübergänge ist sie mit der Lichteinstrahlung beendet. Da die Spin-Umkehr Singulett-Triplett-Singulett mehr Zeit beansprucht, dauert die Phosphoreszenz noch nach der Anregung an [79]. Um Fluoreszenz herbeizuführen, muss das Elektronensystem eines Moleküls zunächst durch Absorption von Licht angeregt werden. Dabei werden die π -Elektronen in einen Schwingungszustand von S₁ angehoben. Nach der Anregung kehrt das Elektron zunächst in den Schwingungsgrundzustand des S₁-Niveaus zurück [78].

Von diesem Zustand sind neben der Fluoreszenz auch andere Übergänge möglich. Neben der spinerlaubten Deaktivierung S₁-S₀ besteht die Möglichkeit, dass das Molekül in einem *Intersystem Crossing* (ISC) in das System der angeregten Triplettzustände über Spinumkehr übergeht [Johnson 2007]. Ein ISC ist für fluoreszenzbasierte Experimente unvorteilhaft, da sich Elektronen für relativ lange Zeit im Triplettzustand aufhalten und nicht für den fluoreszierenden Übergang zur Verfügung stehen. Auch unter diesem Gesichtspunkt sind Cyaninderivate gute Fluoreszenzfarbstoffe.

Wird die Absorption des Lichtes aufgezeichnet, erhält man ein Anregungsspektrum. Wird die Intensität des ausgestrahlten Fluoreszenzlichts gemessen, erhält man ein Emissionsspektrum. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts einer Substanzlösung bestimm-

ter Konzentration bei einer bestimmten Wellenlänge (I_λ) kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$I_\lambda \sim \epsilon \cdot I_0 \cdot \phi \cdot K \quad (3.7)$$

I_λ : Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts

ϵ : Molarer Absorptionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge

I_0 : Intensität des Anregungslichtes

ϕ : Fluoreszenzquantenausbeute

K: Gerätekonstante

Die Rückkehr angeregter Elektronen in den Grundzustand erfolgt in der Reihenfolge, bei der die Lebensdauer des angeregten Zustandes am kürzesten ist. Bei starren Molekülen trifft dies eher für die Fluoreszenz als für die strahlungslose Energieabgabe zu. Fluoreszenz wird daher häufiger bei Stoffgruppen beobachtet, die eine gewisse Starrheit im Molekülaufbau aufweisen. Zu diesen gehören aromatische Systeme, Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen, Carbonylverbindungen oder auch kondensierte Heterozyklen wie z.B. dem Indolin zu finden als Grundgerüst bei den Cyaninfarbstoffen Cy7 und IRDye 800. Dieser für die Fluoreszenz verantwortliche Teil eines Moleküls wird als Chromophor bezeichnet. In organischen Farbstoffen bestehen diese Chromophore aus Systemen konjugierter Doppelbindungen. In ausgedehnten delokalisierten π -Systemen liegt die Energie des $\pi - \pi^*$ -Übergangs ähnlich der von Photonen des sichtbaren und ultravioletten spektralen Bereichs. Daher werden $\pi - \pi^*$ -Übergänge durch UV/VIS-Strahlung angeregt. Während lineare konjugierte Systeme bis zu einer maximalen Wellenlänge von maximal 500 nm absorbieren können, absorbieren starre, planare Strukturen, wie die in dieser Arbeit verwendeten Mitglieder der Carbocyaninfamilie bis in den roten Spektralbereich.

3.12.1 Konjugation der Fluoreszenzfarbstoffe

Benötigte Reagenzien: 0,1 M NaHCO₃-Lösung (pH 9)
 Fluoreszenzfarbstoff (Cy7; IRDye 800)
 Tumorspezifische Liganden/ Antikörper
 (rh EGF; rh SDF-1 α ; α Endoglin)

Eine wichtige Voraussetzung der Kopplungsmethode ist ein möglichst schonendes Umsetzen von Ligand bzw. Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff unter Beibehalt einer hohen

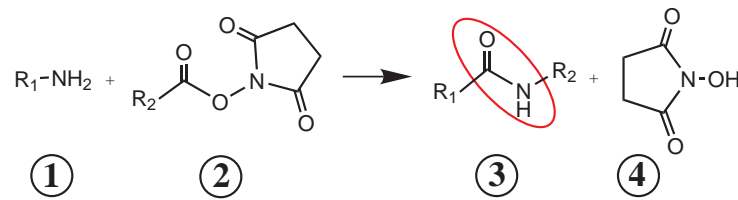


Abbildung 3.16: Reaktionsschema der Fluoreszenzkopplung über eine N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Estergruppe.

(1) Primäre Aminogruppe des Peptides; (2) NHS-Ester des Farbstoffes; (3) Bildung einer Amidbindung (Peptidkonjugat); (4) Abspaltung des NHS-Esters

Rezeptoraffinität und eines starken Fluoreszenzsignals. Eine entsprechende Konjugationsmethode stellt das Umsetzen einer primären Aminogruppe mit einer Estergruppe dar. Hierbei wird das Vorhandensein primärer Aminogruppen in Proteinen (z.B. über eine N-terminale Aminogruppe oder durch das häufige Vorkommen der basischen Aminosäure Lysin innerhalb des Proteins) ausgenutzt. Diese werden mit der N-Hydroxysuccinimid-Estergruppe der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei leicht alkalischen pH-Wert (9,3) umgesetzt und führen unter Bildung einer Amidbindung zu einer stabilen Verbindung. Das Reaktionsschema ist in der Abbildung 3.16 veranschaulicht.

Durch den leicht alkalischen pH-Wert liegen die primären Aminogruppen des Peptids/Proteins ungeladen vor. Diese sind nun in der Lage, über einen nukleophilen Angriff auf das Kohlenstoffatom der Estergruppe des Farbstoffes über die Bildung einer Amidbindung eine kovalente Bindung einzugehen.

Durchführung:

Es war darauf zu achten, dass kein Puffer mit primären oder sekundären Aminogruppen (z.B. TRIS-Puffer) verwendet wurde, da die Möglichkeit einer Bindung mit dem Farbstoff erfolgen könnte. In dieser Arbeit wurde daher 0,1 M Carbonatpuffer (pH9) für die Kopplung eingesetzt.

Weiter war auf optimales Verhältnis zwischen Antikörper/Protein und Farbstoff zu achten. Liegt der Fluoreszenzfarbstoff nicht im Überschuss vor, wäre es möglich, nicht alle Aminogruppen des Antikörpers bzw. des Proteins nutzen zu können und damit eine zu geringe Ausbeute der Kopplung zu erhalten. Bei einem zu großen Überschuss an Farbstoff kommt es dagegen zu der Erscheinung des „*self-quenching*“ und damit zu einem verminderten Fluoreszenzsignal. Als optimal hat sich ein molares Verhältnis von Antikörper bzw. Protein zu Fluoreszenzfarbstoff von 1 : 5 bis 1 : 10 herausgestellt. Zunächst wurden die benötigten Mengen an Antikörper bzw. Protein und Fluoreszenzfarbstoff berechnet und zusammen in Carbonatpuffer angesetzt. Dabei war es wichtig, für die anschließende Aufreinigung über Micro Spin Säulen bzw. über HPLC das Reaktionsvolumen mög-

lichst gering ($\leq 100 \mu\text{l}$) zu halten. Dieser Reaktionsansatz wurde anschließend über einen Zeitraum von zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht inkubiert. Danach folgte die Abtrennung des nicht-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes.

3.12.2 Aufreinigung der Fluoreszenzkonjugate

Um den im Überschuss vorliegenden Fluoreszenzfarbstoff von dem hergestellten Fluoreszenzkonjugat abzutrennen und somit eine unspezifische Anfärbung der Zellen und damit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde der Ansatz entweder über Micro Spin Säulen oder über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt.

3.12.2.1 Aufreinigung über Micro Spin Säulen

Micro Spin Säulen sind kleine aus Kunststoff gefertigte Zentrifugationsgefäße, die mit unterschiedlichen Agarose- und Dextrangelen gefüllt sein können. Sie wurden ursprünglich für die schnelle und einfache Aufreinigung von DNA, inklusiv deren Entsalzung und Umpufferung, entwickelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die mit Sephadex G 25 superfine gefüllten Micro Spin Säulen für die Aufreinigung einiger Ligand-Fluoreszenzkonjugate verwendet. Für die Herstellung des Sephadex-Geles wurde trockenes Sephadex G 25 superfine in PBS-Puffer angesetzt. Je nach Vernetzungsgrad der einzelnen Sephadex-Typen ergibt sich nach der Packung der Micro Spin Säule das „innere Volumen“, das von dem Polydextran-Netzwerk gebildet wird, und das „äußere Volumen“ im Puffer rund um das Gelnetzwerk. Bei Sephadex G 25 beträgt bei einem Gelbettvolumen von 5 ml/g das äußere Volumen 2 ml/g und das innere Volumen 2,5 ml/g. Je nach Sephadex-Typ können nun relativ kleine Moleküle innerhalb oder unterhalb des Trennbereiches in das innere Volumen der Sephadex-Matrix diffundieren, während sich größere Moleküle nur im äußeren Volumen aufhalten können (Trennbereich von Sephadex G 25: 1000-5000 Da). Wird die Sephadex-Säule mit Puffer durchströmt, so werden die größeren Moleküle im äußeren Gelvolumen (Ausschlussbereich) aus der Säule eluiert, während die im Gelnetzwerk befindlichen kleineren Moleküle im Trennbereich der Sephadex-Säule, entsprechend ihrem Molekulargewicht verzögert, die Säule verlassen (= umgekehrter Siebeffekt).

Durchführung:

Nach Herstellung des Sephadex G 25 Geles wurden 250 μl in jede Säule pipettiert und in ein Eppendorfreagiergefäß gestellt, um den Puffer aufzufangen. Nach Zentrifugation bei 700 rpm über eine Minute in der Kühlzentrifuge wurde die Micro Spin Säule in ein neues Reagiergefäß gegeben und das Konjugat auf das Gel pipettiert. Dabei sollte das Volumen des Konjugats nicht 25 μl unter - und 150 μl überschreiten. Durch erneute Zentrifugation bei 700 rpm über zwei Minuten wurde nun das aufgrund seiner Größe (≥ 5000 Da) im äußeren Volumen befindliche Konjugat eluiert und als Filtrat im Eppendorfreagiergefäß aufgefangen. Der nicht-gebundene Fluoreszenzfarbstoff (≤ 1000 Da) wurde im Gel zurückgehalten, das anhand einer leichten Eigenfärbung des Farbstoffes im Gel zu erkennen war.

3.12.2.2 Aufreinigung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Nach dem Ansetzen der Kopplung und Herstellung der Fluoreszenzkonjugate wurde der im Überschuss vorhandene, nicht-gebundene Fluoreszenzfarbstoff von dem Konjugat über die SMART-Anlage (siehe Abbildung 3.17 und Tabelle 3.10) abgetrennt, um durch eine unspezifische Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes falsch positive Färbungen von Zellen zu vermeiden.

Mittels der *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie* (HPLC), eine der modernsten chromatographischen Trenntechniken, können Substanzgemische aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert werden. Diese Methode basiert dabei auf unterschiedlichen Adsorptionseigenschaften von Stoffen aufgrund differierender Polarität, ihrer Löslichkeit, ihrer Molekülgröße sowie der Verteilung zwischen einer flüssigen (mobilen) und einer festen (stationären) Phase. Je nach Art der möglichen Wechselwirkungen der einzelnen Stoffe mit der stationären Phase wirken folgende Trennmechanismen:

- Adsorptions-Chromatographie (Normal Phase)
- Verteilungs-Chromatographie (Reversed Phase)
- Ionenaustausch-Chromatographie
- Ionenpaarbildungs-Chromatographie
- Größenausschluss-Chromatographie
- Affinitäts-Chromatographie

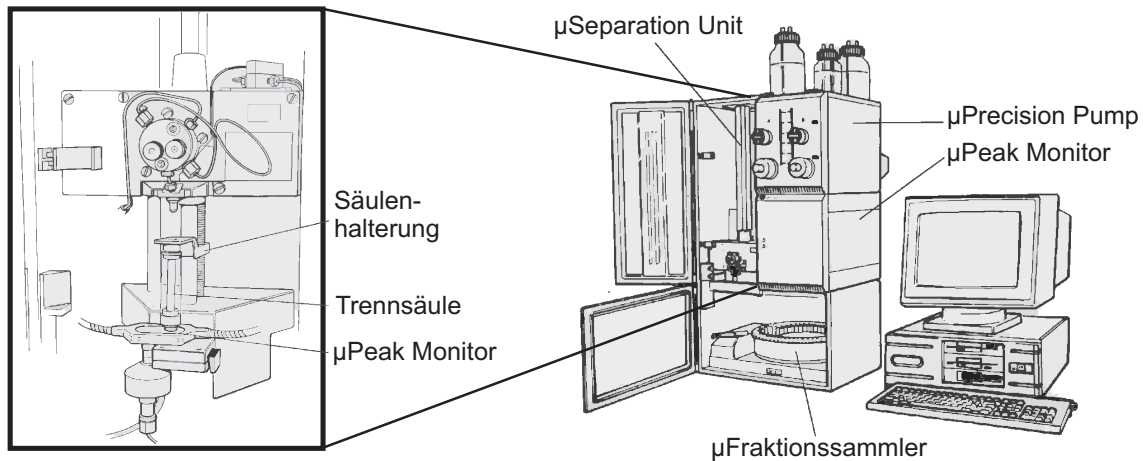


Abbildung 3.17: Übersicht über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - SMART - Anlage.

Tabelle 3.10: Übersicht SMART - Anlage

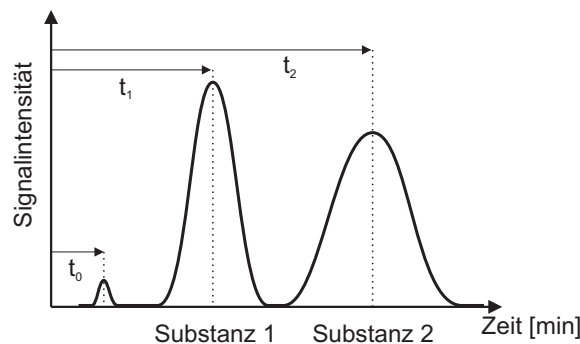
Bestandteile und Eigenschaften	Beschreibung
Injektionsvolumen	100 µl
Trennsäule	Superdex Peptide 3.2/30
Mobile Phase	0,15 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4
Flussrate	100 µl / min
Wellenlängen	214 nm; 254 nm; 280 nm
Fraktionsvolumen	100 µl

Die Aufreinigung der Konjugate erfolgte in dieser Arbeit durch die Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) über eine Superdex Peptide PC 3.2/30 Trennsäule. Die Eigenschaften dieser Trennsäule sind in der Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Bei der Gelfiltration werden die Proteine aufgrund ihrer Größe (hydrodynamischer Durchmesser) durch unterschiedlich tiefes Eindringen in das Trägermaterial (*Molekularsiebeffekt*) aufgetrennt. Dabei sind kleinere Moleküle in der Lage, sich in die Hohlräume der stationären Phase zu „verirren“, sind daher langsamer unterwegs und zeichnen sich somit durch größere Retentionszeiten aus. Dagegen sind Moleküle mit einem größeren hydrodynamischen Durchmesser weniger in der Lage, in die feinen Hohl- und Zwischenräume des Gels einzudringen. Sie werden in der mobilen Phase schneller mitbewegt, können eher detektiert werden und besitzen daher kleinere Retentionszeiten. Das chromatographische Prinzip ist in der Abbildung 3.18 veranschaulicht.

Tabelle 3.11: Übersicht über die Superdex Peptide PC 3.2/30 Trennsäule

Eigenschaften	Beschreibung
Matrix	
Ausschlussgrenze	20000 Da
Optimaler Trennbereich	100 - 7000 Da
Matrix - Zusammensetzung	Kreuzverlinktes Agarose und Dextran
Kerndurchmesser	13 - 15 μm
Säule	
Bett Dimension	3.2 x 300 mm
Bettvolumen	2,4 ml
Max. Druck	2,0 MPa
max. Flussrate	150 $\mu\text{l}/\text{min}$
pH Stabilität	1 - 14

**Abbildung 3.18:** Gelchromatographisches Trennprinzip von Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten. t_0 = Ausschlussvolumen; t_1 = Retentionszeit der Substanz 1; t_2 = Retentionszeit der Substanz 2Durchführung:

Nach der Herstellung des Eluenten (0,15 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4) wurde dieser zunächst filtriert (Wasserstrahlpumpe mit Membranfilter für wässrige Lösungen, Porengröße 0,45 μm) und als Puffer A an die SMART-Anlage angeschlossen. Es folgte der Einbau der Superdex Peptide 3.2/30 Trennsäule, die dann über einen längeren Zeitraum mit Puffer A äquilibriert wurde. Vor jedem Lauf wurden zusätzlich alle Filter im Ultraschallbad über 15 Minuten gereinigt, um einen Anstieg des Druckes durch ein Verstopfen der Filter zu vermeiden. Während des Äquilibrierens wurde darauf geachtet, ob Substanzen von der Säule eluiert wurden und auf eine Verunreinigung der Säule schließen ließen. War dies nicht der Fall, konnte das Ligand-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat auf die Säule mittels einer gereinigten Hamiltonspritze aufgetragen werden. Dazu wurde eine Injektions-Auftragsschleife (mit einem geeigneten Aufnahmevolumen und an die Menge des Konjugats angepaßt) ausgewählt und angeschlossen. Nach Injizieren der Probe in die Probenschleife wurde durch Starten des Programms die Probe mit einer Flussra-

te von 100 µl pro Minute automatisch aufgetragen. Das Eluationsprofil wurde auf dem Monitor verfolgt und auf einen konstanten Druck geachtet. Nach etwa fünf Minuten konnte der Injektionspeak beobachtet werden, der mit einem Abfall der Leitfähigkeit einherging. Nach etwa 20 Minuten kam es zu einem Anstieg der Absorption und der Peak des Konjugats erschien. Nach weiteren zehn Minuten folgte der Peak des ungebundenen Fluoreszenzfarbstoffs. Die Identifikation der Peaks erfolgte durch den Vergleich der ermittelten Retentionszeiten mit den substanzspezifischen Retentionszeiten der Substanzen allein, die unter identischen Versuchsbedingungen (gleiche Flussrate z.B.) übereinstimmen müssen. Das Sammeln der einzelnen Fraktionen startete automatisch nach zehn Minuten nach Starten des Programms. Die einzelnen Fraktionen wurde nach Beenden des Programms auf ihre Fluoreszenz in der Odyssey-Kammer hin überprüft. Die Chromatogramme wurden mittels des SMART-Managers aufgezeichnet und nach Integration der Peakfläche ausgewertet und miteinander verglichen.

3.13 In-vitro-Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen mittels der Fluoreszenzkammer

Die Detektion und Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte unter Verwendung des *LiCor Odyssey Infrared Imaging System*. Grundlage des in dieser Arbeit eingesetzten Odyssey-Detektionssystems war die Anregung der fluoreszenzmarkierten Zellen anhand eines zwei Diodenlasers mit einer Wellenlänge von 685 nm und 785 nm und die anschließende Detektion der Fluoreszenzsignale bei Wellenlängen von 700 nm und 800 nm (Zweikanal-Infrarotdetektor). Das detektierte Signal wurde vom System digital gespeichert und konnte dann mit der Odyssey-Software (*application software version 2.1*) verarbeitet und in ein Bild umgesetzt werden (Die Messparameter sind in Tabelle 3.12 angegeben).

Vorteile dieser Detektion sind u.a. variable Möglichkeiten das der Fluoreszenz entsprechende elektrische Signal zu verstärken, digitale Speicherung des Ergebnisses und ggf. Nachweis zweier verschiedener Proteine durch Verwendung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen.

Für die quantitative Auswertung der erhaltenen Bilder kann der gewünschte Bereich (*region of interest, ROI*) ausgewählt und darüber der Mittelwert der Fluoreszenzintensität in diesem Bereich mit dazugehöriger Standardabweichung ermittelt werden (siehe Abbildung 3.19). Da die detektierte Fluoreszenz jedoch nicht nur vom verwendeten Fluorochrom, sondern auch vom Auftreten von Reflexionen und Streuung beeinflusst wird, ist eine quantitative Auswertung nicht möglich. Aus diesem Grund handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um relative Auswertungen.

Tabelle 3.12: Messparameter LiCor Odyssey - Infrared Imaging System

Parameter		
Auflösung	84 μm	
Focus Offset	1,0 mm	
Kanäle	700 nm	800 nm
Intensität	3,0	1,0
Scan - Fläche	Breite	13 cm
	Höhe	9 cm
Bildgröße	3 MB pro Kanal	

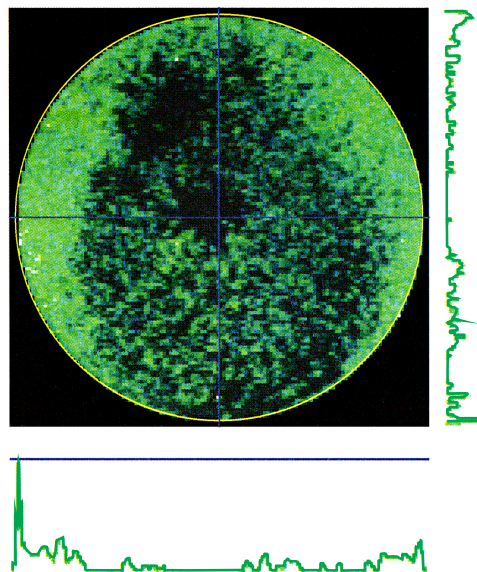
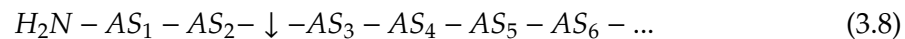


Abbildung 3.19: Quantifizierung der Fluoreszenzmesswerte (LiCor Odyssey - Infrared Imaging System). Nach Erhalt der Messdaten wurde die zu quantifizierende Fläche (*regions of interest*, ROI) ausgewählt und die Intensität der Fluoreszenz über die Fläche integriert.

λ Anregung = 685 nm und 785 nm; λ Emission (IRDye 800) = 789 nm

3.14 Aktivitätsbestimmung der Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV)

Die als CD 26 klassifizierte Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) ist ein Typ II Transmembranprotein und verfügt über eine am Carboxyterminus gelegene extrazelluläre katalytische Domäne, gefolgt von einer cysteinreichen Region, einem glykolysierten Stiel, einer transmembranen Helix und einem kurzen intrazellulären aminoterminalen Abschnitt [80]. Das Enzym spaltet vom N-terminalen Ende eines Oligo- oder Polypeptids Dipeptide ab, wenn sich an zweiter Position des Aminoterminus (AS_2 -Position) bevorzugt Prolinreste befinden. Reste mit anderen Aminosäuren wie Alanin, Glycin oder Serin werden mit geringerer Aktivität umgesetzt. Wenn dagegen bei AS_3 auch ein Prolinrest steht, wird das Peptid durch DPP IV nicht prozessiert. Als Substrate der Serin-Peptidase DPP IV sind Neuropeptide, Peptidhormone, Zytokine und auch Chemokine beschrieben worden [80–82]. Das Chemokin SDF-1 wird dabei nicht nur inaktiviert, sondern auch in einen Rezeptorantagonisten überführt, der an seine beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 sowie CXCR7 mit hoher Affinität bindet, diesen blockiert und nicht mehr aktiviert ([83]). Diese Beobachtungen konnten durch eigene Ergebnisse nachgewiesen werden (siehe dazu Überprüfung der biologischen Aktivität über *Western Blot* Analyse, Unterpunkt 4.2.14, S. 141).



AS = Aminosäure am N-terminalen Ende; die Spaltstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Aktivität der DPP IV wurde wie folgt überprüft: Als Substrat der DDP IV wurde eine 100 mM Glycin-Prolin-4-nitranilid-Lösung in DMSO angesetzt und 0,2 M TRIS/HCl-Puffer (pH 8,5) hergestellt. Vor jeder Messreihe wurden 100 μ l Substrat ad 10 ml Puffer frisch angesetzt (Substratlösung). 500 μ l der Substratlösung wurden mit 498 μ l H_2O und 2 μ l DPP IV versetzt und 1-2 min temperiert. Anschließend wurde in einer Küvette die Extinktionsänderung gegen einen Leerwert über einen Zeitraum von fünf Minuten bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Anregung} = 390$ nm im Photometer verfolgt.

3.15 Statistische Analyse

Als statistische Größen wurden die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung gemäß den üblichen Methoden verwendet. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte über den ANOVA - Test (InStat 3). Die Irrtumswahrscheinlichkeit p galt bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant (markiert mit *) und ebenso für $p < 0,01$ (**), bei $p < 0,001$ wurden die Differenzen als statistisch hochsignifikant gewertet (***).

3.16 In-vivo-Versuchsreihe am murinen Tumormodell

Für die In-vivo-Untersuchungen wurden FoxN1-Mäuse gewählt. Dieser Mausstamm ist ein genetischer Mutant der Hausmaus und zeichnet sich durch das Fehlen des Thymus aus, wodurch nicht nur das Ausbleiben der Körperbehaarung, sondern auch eine starke Verringerung der Anzahl an T-Lymphozyten die Folge ist. Im Thymus findet die Umwandlung von Thymozyten (Prä-T-Lymphozyten) in T-Lymphozyten (T-Zellen) statt. Die Anzahl an B-Zellen bei den Lymphozyten ist in dieser Nacktmaus normal, während reife T-Lymphozyten fehlen. Durch den erheblichen Mangel an T-Lymphozyten hat die Nacktmaus ein stark eingeschränktes Immunsystem, was sie zu einem idealen Wirt für homologe und xenogene Transplantationen macht. So gibt es durch die Transplantation von humanen Tumorzellen keine vom Immunsystem induzierte Abstoßungsreaktion.

Die tierschutzgerechte Haltung erfolgte in transparenten, mit staubfreier Einstreu versehenen Polycarbonatkäfigen unter pathogenfreien Bedingungen (maximal sechs Mäuse pro Käfig). Der allgemeine Gesundheitszustand und die Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser wurde jeden Tag überprüft. Um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu vermeiden, wurden den Mäusen Bepanthen Augen- und Nasensalbe auf die Augen gegeben. Um eine Unterkühlung der Tiere während der Anästhesie zu verhindern, erfolgte die Lagerung der Tiere auf einer Wärmematte. Die Narkose der Mäuse wurde über peritoneale Injektion von Midazolam (5 mg/kg KG), Fentanyl (0,5 mg/kg KG) und Medetomidin (0,5 mg/kg KG) durchgeführt. Anschließend folgte die Applikation der Tumorzellen über subkutane Injektion von 1 Million Zellen (A 764 und MCF 7) in die Flanke der Maus. Ein Überblick über die Versuchsdurchführung ist in der Abbildung 3.20 angegeben.

In der Abbildung 3.21 ist ein Beispiel der farblichen Skaleneinteilung der Fluoreszenzintensitäten dargestellt, wie sie für die bildgebende Darstellung der Fluoreszenzintensitätsmessungen in der *LiCor Odyssey-Fluoreszenzkammer* und des *LiCor Pearl Imager* (LiCor

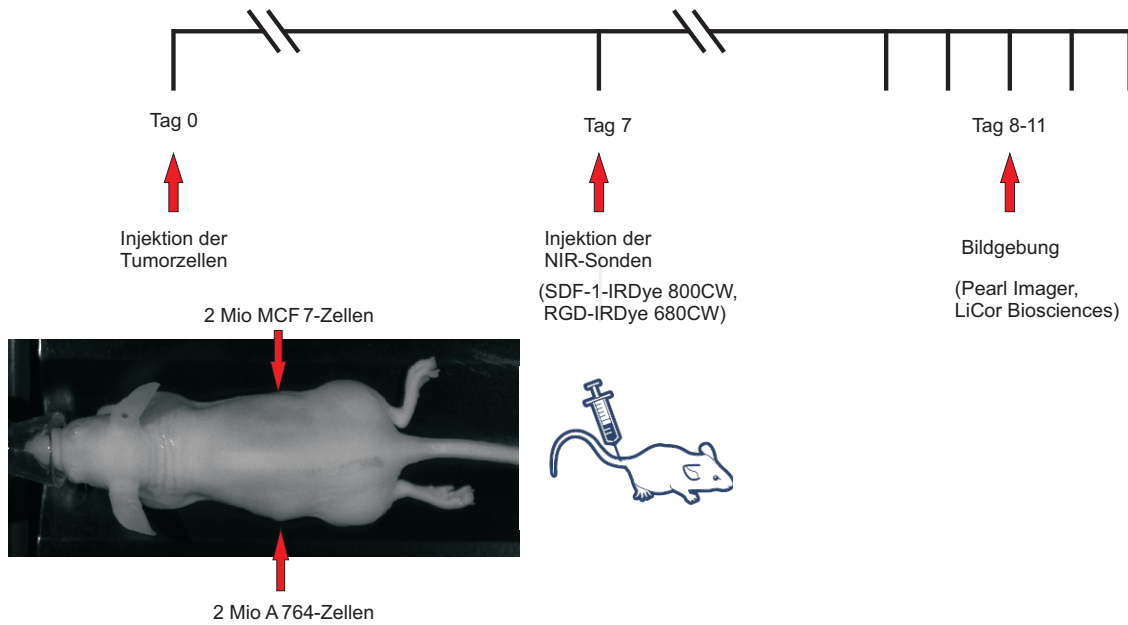


Abbildung 3.20: Verlaufsschema der In-vivo-Versuchsreihen.



Abbildung 3.21: Falschfarbenskala der Fluoreszenzintensität

Biosciences) verwendet werden (*Falschfarbendarstellung*). Bei der Bildaufnahme entsteht ein sogenanntes Falschfarbenbild in der Farbskala von blau bis rot. Dabei entsprechen Farben im Blaubereich niedrigen Fluoreszenzintensitäten, der Rotbereich steht für hohe Intensitäten. Entstehen Fluoreszenzbilder, die ein weißes Fluoreszenzsignal liefern, so befindet man sich im Bereich der Detektionsgrenze des Gerätes. Nach sieben Tagen konnten die Tiere für die folgenden Experimente herangezogen werden. Den Mäusen wurden die Kontrastmittel (SDF-1-IRDye 800 und RGD-IRDye 680) intravenös (100 µl) in die laterale Schwanzvene injiziert und sie am nächsten Tag für anschließende bildgebende Untersuchungen in der Fluoreszenzkammer (Pearl Near Infrared System; LiCor Biosciences) in Narkose gelegt. Nach den Untersuchungen wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte gelegt, bis sie sich erholt hatten und aufgewacht waren. Anschließend wurden sie in die Käfige zurückgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Eignung von Eisenoxid-beladenen Liposomen für die molekulare Bildgebung

4.1.1 Größe und physikalische Stabilität der Liposomen

Die Größe von Liposomen ist entscheidend für die Extravasation in das Tumorgewebe über Endotheldefekte oder Lücken in den Mikrogefäßen des Tumors. Sind jedoch die Liposomen zu groß ($\geq 1 \mu\text{m}$), so erfolgt eine Aufnahme der Liposomen fast vollständig durch Zellen des *Mononukleären Phagozyten System* (MPS) der Leber und Milz. Sind die Liposomen jedoch wesentlich kleiner, so sind sie den Zellen des MPS weniger zugänglich. Sie zirkulieren folglich wesentlich länger in der Blutbahn und können damit mehr Tumorzellen erfolgreich erfassen.

Anhand der in Unterkapitel 3.8.2 (Seite 85) beschriebenen Methode der *Photonenkorrelationspektroskopie* (PCS) konnten die hergestellten unilamellaren Liposomen in Bezug auf ihre Größe näher charakterisiert werden. Darüber hinaus konnte über das Aggregationsverhalten ihre physikalische Stabilität über einen Zeitraum von zwei Wochen bestimmt werden.

Die durch Frier-Tau-Zyklen hergestellten Liposomen wurden mit Hilfe eines Handextruders fraktioniert (Porengröße der Polycarbonatmembranen: 200 nm und 100 nm), mit sterilfiltrierten PBS-Puffer verdünnt (1 : 33) und anschließend in einer Polystyrolküvette die mittlere Größe der Liposomen (*Z-Average*) mit Hilfe der PCS bestimmt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt, wobei sich jede Einzelmessung aus 13 Untermessungen zusammensetzte.

In der Abbildung 4.1 ist die Anzahlverteilung von Liposomen ohne Polyethylenglykol (PEG)-Anteil (links) und exemplarisch mit einem PEG-Anteil von 5 % (rechts) dargestellt. Die mit Eisenoxid-beladenen Liposomen zeigten - wie erwartet - nach Extrusion eine enge Größenverteilung um $101 \pm 2,4 \text{ nm}$. Auch bei einem PEG-Gehalt von 5 % bis 15 % unterschied sich die mittels PCS ermittelte Größe der Liposomen nicht wesentlich

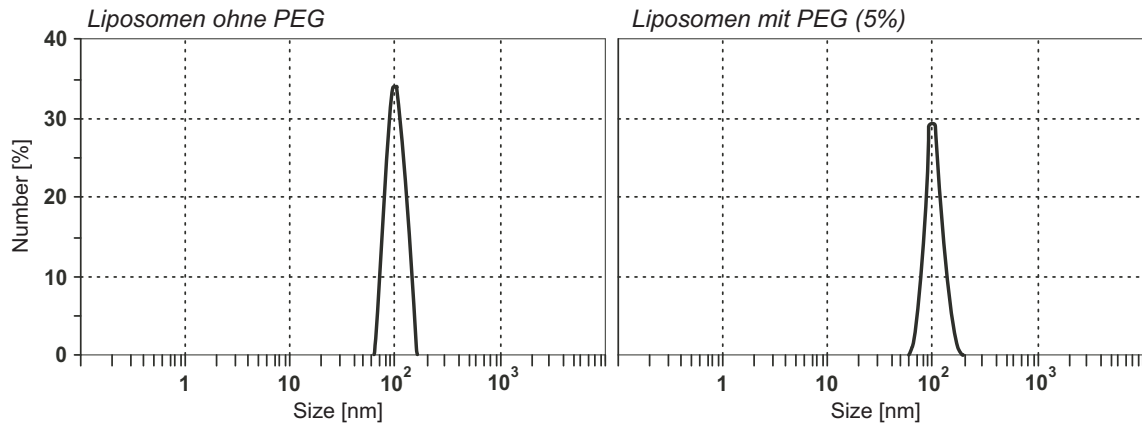


Abbildung 4.1: Bestimmung der Liposomengröße über die Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS). Dargestellt ist die Größenverteilung der Liposomen links ohne und rechts mit 5 % Polyethylenglykol - Anteil. Angegeben ist die Anzahlverteilung der hergestellten, mit Eisenoxid - beladenen Liposomen ($n = 3$).

von der Liposomengröße ohne PEG - Anteil (Größenverteilung bei 5 % PEG um 103 nm, bei 10 % PEG um 107 nm und bei 15 % PEG um 102 nm). In der Abbildung 4.1 ist deutlich die enge Größenverteilung sowohl für unpegylierte als auch für pegylierte Liposomen (PEG - Anteil 5 %) zu erkennen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass die Liposomen nach ihrer Herstellung die gewünschte Größe von etwa 100 nm tatsächlich aufweisen und darüber hinaus die PEG - Zugabe keinen Einfluss auf die Größe der Liposomen ausübt.

Um anschließend eine mögliche Agglomeration der einzelnen Liposomen (unpegyliert) aufzuzeigen und damit eine Aussage über ihre physikalische Langzeitstabilität zu treffen, wurden alle zwei Tage über einen Zeitraum von zwölf Tagen der mittlere Liposomendurchmesser der Lipiddispersion bestimmt. Die Messungen ergaben einen durchschnittlichen *Z - Average* von $105 \pm 3,5$ nm über diesen Zeitraum und sind im Diagramm der Abbildung 4.2 gezeigt. Darin ist deutlich die nur sehr geringe Abweichung der Liposomengröße von der extrudierten Größe (101 nm) erkennbar. Die größte Abweichung war an Tag 8 nach der Herstellung der Liposomen mit einem Durchmesser von 111 nm zu verzeichnen, woraufhin bis Tag 12 die Größe wieder auf 106 nm abnahm. Dieser Versuch lässt den Schluss zu, dass die Liposomendispersion über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen keiner Agglomerationsneigung unterliegt, vorausgesetzt, dass sie unter versuchsgleichen Bedingungen (Kühlschrank, 4 °C) gelagert wird.

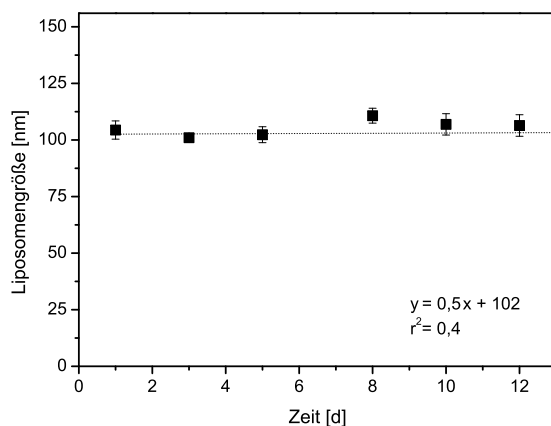


Abbildung 4.2: Bestimmung der physikalischen Stabilität von Liposomen über einen Zeitraum von zwölf Tagen anhand der Photonen - Korrelations - Spektroskopie (PCS).

Dargestellt ist die Liposomengröße über einen Zeitraum von 12 Tagen. Angegeben sind die Mittelwerte der einzelnen Größenmessungen mit Standardabweichung ($n = 3$).

4.1.2 Bestimmung der unspezifischen Aufnahme von Eisenoxid-beladenen Liposomen in Gliomazellen

Um die unspezifische Markierung von Tumorzellen *in vitro* zu analysieren, wodurch u.a. eine anschließende Verfolgung der markierten Tumorzellen (*cell tracking*) möglich wird, wurde zunächst die zeitabhängige Aufnahme von unpegylierten Liposomen in Gliomazellen untersucht. Dazu wurden 10^6 U 343-Zellen ausgesät und nach 24-stündiger Kultivierung mit Eisenoxid-gefüllten Liposomen (Eisenkonzentration: 0,04 mg/ml) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (0,5; 1; 2; 4; 6; 12 und 24 Stunden) versetzt. Um die intrazelluläre Aufnahme der Liposomen mit der Aufnahme anderer Eisenoxid-Nanopartikel vergleichen zu können, wurden parallel U 343-Zellen mit kolloidalem Fe_3O_4 mit und ohne Zusatz des Transfektionsreagenzes Protaminsulfat und mit Resovist als Referenzsubstanz inkubiert. Anschließend wurde der Eisengehalt in den Zellen quantitativ über den photometrischen Eisentest bestimmt und die Messergebnisse vergleichend in der Abbildung 4.3 dargestellt.

Bereits nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten unterschied sich deutlich der intrazelluläre Eisengehalt der mit Eisenoxid-beladenen Liposomen zu den mit nicht-liposomalen Eisenoxid-Nanopartikeln. So hatten die Gliomazellen durch die Inkubation mit Liposomen und Fe_3O_4 -Nanopartikel etwa den gleichen Eisengehalt ($3,81 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen und $3,66 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen). Dieser konnte nur durch das gleichzeitige Versetzen der Zellen von Fe_3O_4 -Nanopartikel mit Protaminsulfat auf $5,9 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen gesteigert werden. Resovist wurde am geringsten intrazellulär aufgenommen ($0,7 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen). Durch weitere Inkubation der Zellen konnte bei allen eingesetzten Eisenoxidpartikeln ei-

ne weitere Aufnahme in die Zellen beobachtet werden. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden zeigte sich die größte Eisenoxidaufnahme (signifikant) bei den Zellen, die mit den Eisenoxid-beladenen Liposomen inkubiert worden waren ($17,3 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen). Dieser ließ sich durch anhaltende Inkubation bis 24 Stunden auf fast $25 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen steigern. Wie die Abbildung 4.3 demonstriert, war noch keine Sättigung der Zellen innerhalb dieses Zeitraumes zu erkennen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein fortbestehendes Versetzen der Gliomazellen mit den Liposomen zu einer weiteren zellulären Aufnahme der Liposomen und damit zu einer weiteren Anreicherung des intrazellulären Eisenoxids führt.

Durch das gleichzeitige Versetzen der Zellen mit Fe_3O_4 -Nanopartikel und Protaminsulfat war es möglich, die Eisenoxidaufnahme innerhalb der Inkubationsdauer von zwölf Stunden im Vergleich zur Inkubation ohne Protaminsulfat deutlich zu erhöhen. So war der Eisenoxidgehalt im Durchschnitt über 55 % gesteigert. Nach 12-stündiger Inkubation kam es zu einer anhaltenden Abnahme des Eisengehalts während des Versetzens der Zellen mit der Kombination aus Fe_3O_4 -Nanopartikel und Protaminsulfat. Eine Differenz der Eisenoxidaufnahme im Vergleich ohne Protaminsulfat konnte nicht mehr festgestellt werden ($16,64 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen ohne Protaminsulfat und $16,4 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen mit Protaminsulfat).

Die intrazelluläre Aufnahme von Resovist war über einen Zeitraum von 24 Stunden am geringsten ($5,6 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen).

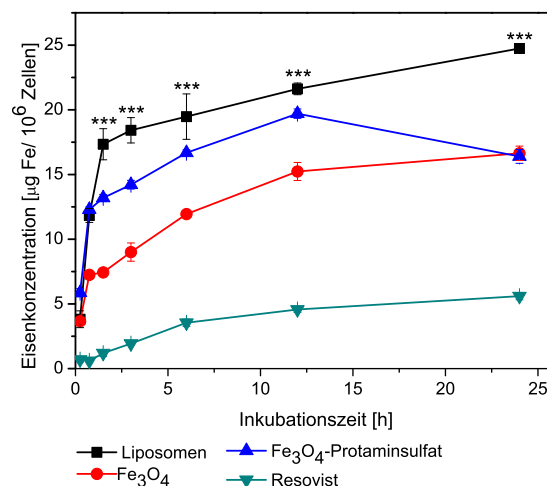


Abbildung 4.3: Bestimmung der unspezifischen Aufnahme von unpegylierten Liposomen im Vergleich zu anderen Eisenoxid - Nanopartikeln in U 343 - Gliomazellen.

Die Bestimmung des Eisengehalts erfolgte photometrisch anhand des etablierten Eisentests nach den Inkubationszeiten 0,5; 1; 2; 4; 6; 12 und 24 Stunden. Die Inkubation erfolgte mit den Eisenoxid-beladenen Liposomen bzw. mit kolloidalen Eisennanopartikeln mit und ohne Zusatz von Protaminsulfat. Als Referenzsubstanz diente Resovist. Die Eisenkonzentration der Liposomen bzw. der weiteren Nanopartikel betrug jeweils $0,04 \text{ mg Fe/ml}$ ($n = 3$, $***p < 0,001$ gegenüber der Aufnahme von Fe_3O_4 -Nanopartikeln).

4.1.3 Einfluss des Polyethylenglykol (PEG)-Gehalts auf die unspezifische Aufnahme der Liposomen

Die Verweilzeit der Liposomen im Plasma lässt sich noch weiter steigern, indem die Oberfläche der Lipidmembran zusätzlich pegyliert wird (*Stealth*-Liposomen). Die Verknüpfung der Liposomenoberfläche mit Polyethylenglykolketten stellt eine sterische Barriere gegen die Interaktion mit Plasmaproteinen (Opsoninen) dar. Dadurch sind diese *Stealth*-Liposomen endogenen Abbaumechanismen noch weniger zugänglich, woraus eine deutlich längere Verweilzeit im Plasma im Vergleich zu nicht-pegylierten Liposomen resultiert. Tumorzellen, die infolge einer ausgeprägten Neubildung von Blutgefäßen (Tumor-Angiogenese) gut durchblutet werden, kommen entsprechend lange mit den pegylierten Liposomen in Kontakt und nehmen sie in tiefere Kompartimente des Tumors auf, wo nach Auflösung der Liposomenhülle die Eisenoxid-Nanopartikel freigesetzt werden.

Um die verminderte Aufnahme der pegylierten Liposomen im Vergleich zu nicht-pegylierten zu bestimmen, wurden Liposomen mit einem PEG-Gehalt von 5%, 10% und 15% hergestellt und deren Aufnahme in Gliomazellen mit der Aufnahme von nicht-pegylierten Liposomen verglichen.

Wie die Abbildung 4.4 eindeutig zeigt, konnte eine stark verminderte Aufnahme durch die Pegylierung der Liposomen erzielt werden. So nahm der Eisengehalt in den Zellen von $11,6 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen auf $1,6 \mu\text{g Fe}/10^6$ Zellen signifikant ($p < 0,001$) ab. Dies entspricht

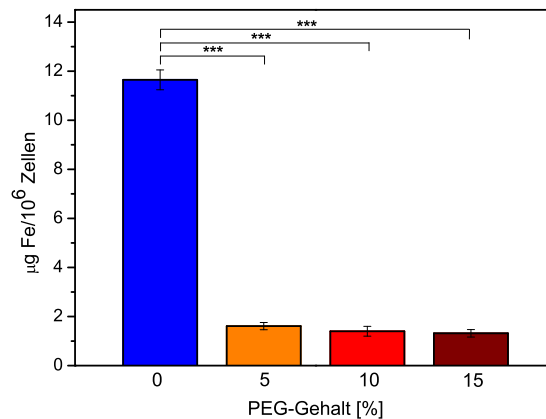


Abbildung 4.4: Einfluss des Polyethylenglykol (PEG)-Gehalts auf die unspezifische Aufnahme der Liposomen.

Vergleichend dargestellt ist der Eisengehalt in U 343-Gliomazellen, die zuvor mit nicht-pegylierten Liposomen als auch mit Liposomen mit 5%, 10% und 15% PEG-Gehalt (Eisenkonzentration: $0,04 \text{ mg Fe/ml}$) über eine Stunde inkubiert worden sind. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung ($n = 3$, $***p < 0,001$).

einer Reduktion um 86 %. Jedoch konnte eine Steigerung des PEG-Anteils von 5 % auf 10 % und auf 15 % die Aufnahme der Liposomen nicht weiter vermindern. Die Abnahme des Eisengehalts in den Zellen betrug durch die Steigerung des PEG-Anteils von 5 % auf 10 % lediglich weitere 1,8 %, von 10 % auf 15 % nur zusätzliche 0,8 %. Mit diesen Ergebnissen konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch einen PEG-Anteil von 5 % eine unspezifische Markierung von Gliomazellen durch Eisenoxid-beladene Liposomen signifikant (** $p < 0,001$) vermindert werden konnte. Dadurch ergibt sich eine gesteigerte Verweilzeit dieser Liposomen auch im Plasma und somit eine verbesserte Aufnahme in das Tumorgewebe durch die verlängerte Kontaktzeit.

Da Liposomen mit einem PEG-Gehalt von 5-15 % in fast gleichem Ausmaß von den Zellen aufgenommen worden sind, ist die Verwendung von Liposomen mit einem höheren PEG-Anteil als 5 % nicht notwendig. Daher wurden für alle weiteren Versuche Liposomen mit 5 %-PEG eingesetzt.

4.1.4 Einfluss verschiedener Liposomen auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie U 343

Im Hinblick auf eine diagnostische Anwendung ist es wichtig, den Einfluss von Liposomen auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen zu untersuchen. Eine etablierte Methode stellt dazu der CyQuant-Proliferationstest dar. Dieser basiert auf der Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes an die Nukleinsäuren lysierter Zellen, wobei die gemessene Fluoreszenz zu dem DNA-Gehalt der Probe und somit zu der Zellzahl direkt proportional ist. Für diesen Versuch wurden die U 343-Gliomazellen 24 Stunden in einem serumfreien Medium mit 1 % BSA unter Zugabe von Liposomen (ohne und mit 5 % PEG-Gehalt) kultiviert. Als Positivkontrolle wurde den Zellen Insulin zugegeben (Endkonzentration: 10 ng/ml). Der Kontrollansatz blieb unbehandelt. Ein DNA-Gehalt von 50 ng entspricht 10.000 Zellen.

Die Abbildung 4.5 stellt die Messergebnisse des Proliferationstests dar. Es zeigte sich durch die Inkubation mit unbeladenen Liposomen eine verminderte Zellproliferation (** $p < 0,01$), die in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle um etwa 10 % abgenommen hatte. Mit Eisenoxid-beladene Liposomen zeigten hingegen einen stärkeren Einfluss auf die Zellproliferation, der mit dem von kolloidalem Eisen identisch ist (Abnahme der Proliferation um 29 % in Bezug auf den Kontrollansatz, *** $p < 0,001$). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die mit Liposomen inkubierten Gliomazellen mit 40 $\mu\text{g Fe/ml}$ oder mit 80 $\mu\text{g Fe/ml}$ versetzt worden waren. Es liegt nahe, dass der Einfluss auf das

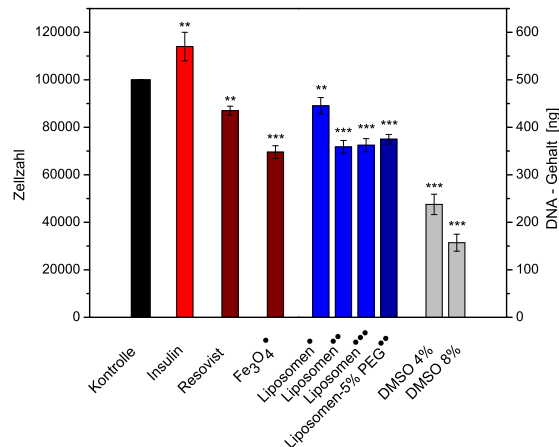


Abbildung 4.5: Einfluss der Liposomen auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie U 343.

Dargestellt ist auf der linken Y - Achse die Zellzahl (unbehandelte Kontrolle = 100.000 Zellen) und auf der rechten Y - Achse der DNA - Gehalt, bestimmt mit Hilfe des CyQuant - Proliferationstests. Als Positivkontrolle diente Insulin (10 ng/ml), als Referenzsubstanz Resovist und als Negativkontrolle DMSO. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden in serumfreiem Stimulationsmedium, die Eisenoxidkonzentration der Stimuli betrug ••0,04 mg Fe/ml bzw. •••0,08 mg Fe/ml, •Liposomen waren ohne Eisenoxid - Nanopartikel. Ein DNA - Gehalt von 50 ng entspricht 10.000 Zellen. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 gegenüber der Kontrolle.

Wachstumsverhalten der Zellen nicht aus Interaktionen mit den Liposomen per se resultierte, sondern durch Wechselwirkungen des kolloidalen Eisenoxids mit den Zellen hervorgerufen worden ist. Pegylierte Liposomen zeigten die gleiche Beeinflussung auf das Proliferationsverhalten wie nicht - pegylierte Liposomen.

Dagegen führte die Inkubation der U 343 - Zellen mit 4 % und 8 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einem stark verminderten Wachstumsverhalten (**p < 0,001). Der Proliferationsabfall betrug bei 4 % DMSO 53 %, bei 8 % DMSO sogar 69 % im Vergleich zu dem Kontrollansatz. Der Proliferationsanstieg nach Behandlung mit Insulin (10 ng/ml, **p < 0,01) betrug etwa 14 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Damit konnte abschließend nur eine geringe Beeinflussung der Liposomen auf das Proliferationsverhalten von Gliomazellen festgestellt werden, welche auf das kolloidale Eisenoxid zurückzuführen ist.

4.1.5 Detektion von Tumorzellen über MRT

Eine Alternative zur Einbettung von Tumorzellen in einem Polyacrylamidgel für die Darstellung von eisenbeladenen Zellen im MRT stellte die Kultivierung und Visualisierung auf bestimmten Kunststoffmembranen dar¹. Um diese für die Darstellung im MRT verwenden zu können, wurden sie zunächst auf Eignung überprüft. Denn eine Voraussetzung war, dass die Visualisierung der Zellen im MRT nicht durch eine Eigenfärbung der Membran negativ beeinflusst wird. Diese Membran zeichnet sich nicht nur dadurch aus, dass die Zellen als Monolayer besser im MRT dargestellt werden können, sondern bieten auch den Vorteil, die Zellen direkt auf der Membran kultivieren und mit den Liposomen bzw. Eisenoxid - Nanopartikeln inkubieren zu können.

Die Abbildung 4.6 stellt die tomographischen Aufnahmen der untersuchten Membranen ohne Zellen (links) und mit 100.000 U 343 - Gliomazellen (rechts) dar. Wie aus der Abbildung zu erkennen, konnte die Membran per se nicht detektiert werden und stellte sich als nicht sichtbar im MRT dar, welches eine der Voraussetzungen für die Verwendung im MRT war. Eine weitere Bedingung bestand in der Nicht-Sichtbarkeit von unbehandelten Zellen. Denn diese würden ebenfalls eine Detektion von Eisenoxid - beladenen Zellen negativ beeinflussen und zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Wie der Abbildung 4.6 rechts zu entnehmen, zeichneten sich unbehandelte Tumorzellen nicht im MRT - Bild ab. Damit waren die Membranen für die Detektion von eisenbeladenen Zellen optimal für die Verwendung im MRT geeignet und der Einfluss aufgenommener Kontrastmittel unmittelbar darstellbar.

¹Eine von Dr. C. Heneweer übernommene Methode, Klinik für Diagnostische Radiologie, UK-SH

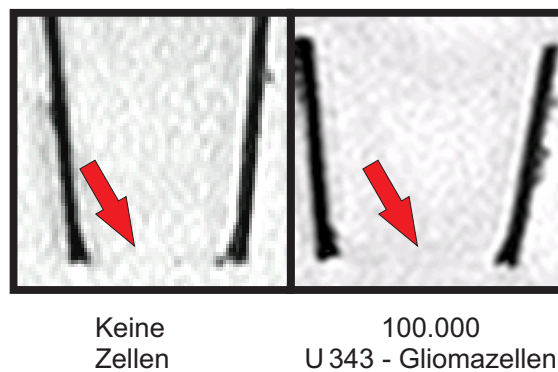


Abbildung 4.6: Visualisierung von Tumorzellen auf Kunststoffmembranen im MRT.

In der linken Darstellung ist die Membran ohne Zellen im MRT gezeigt. In der rechten Darstellung wurden 100.000 U 343 - Gliomazellen ausgesät und die Membran nach Fixierung der Zellen im MRT gescannt. Der rote Pfeil zeigt auf die Membran. Die T_2^* - Messungen wurden an einem 3 T Philips Achieva in einem 25 °C warmen PBS - Pufferbad durchgeführt.

Als MR-Kontrastmittel verkürzen Eisenoxid-basierte partikuläre Substanzen die T_2 - und T_2^* -Relaxationszeit ihres umgebenden Mediums und sind als „negative“ MR-Kontrastmittel entdeckt und für die MR-Tomographie entwickelt worden [16]. Dieser Signalverlust ist an einer „Schwärzung“ (= Kontrastgewinn) in der MR-Aufnahme zu erkennen.

Zur Untersuchung der unspezifischen Aufnahme von Eisenoxid-beladenen Liposomen durch U 343-Gliomazellen und deren Detektion über MRT wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgesät und nach Inkubation mit Eisenoxid-beladenen Liposomen, Resovist als Referenzsubstanz und kolloidalem Eisenoxid mit anschließender Fixierung im 3 T Achieva Philips MRT dargestellt (T_2^* -Messungen; Abbildung 4.7). Als Negativkontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen mitgeführt. In der Abbildung 4.7 sind die Aufnahmen der Membranen gezeigt, auf denen keine oder steigende U 343-Zellzahlen ausgesät

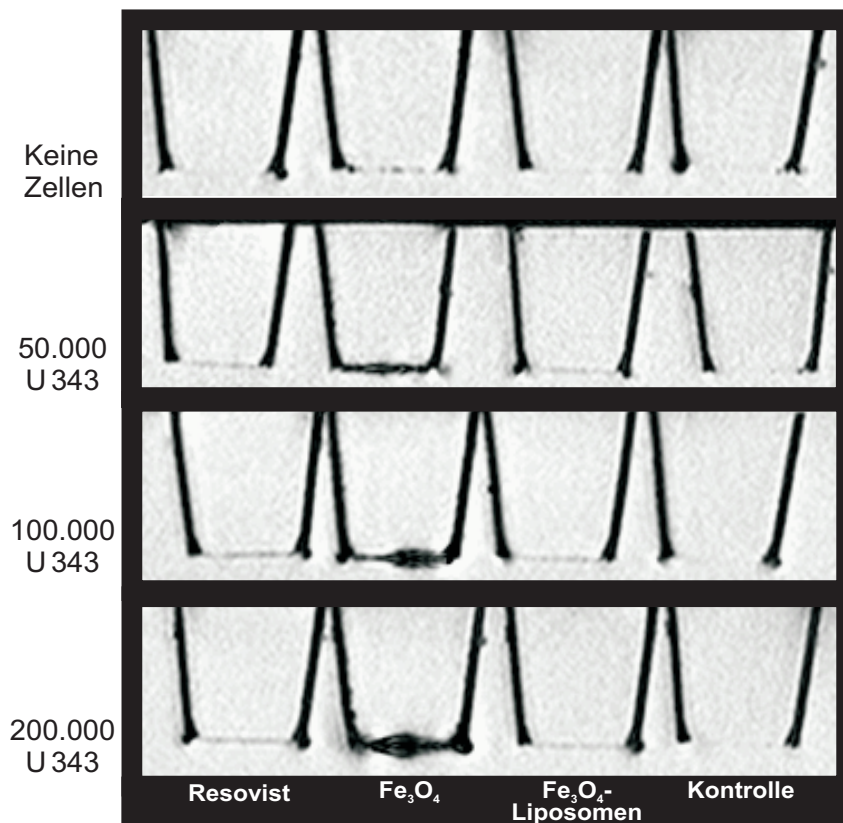


Abbildung 4.7: Visualisierung von Tumorzellen nach Inkubation mit verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikeln im MRT.

Dargestellt sind MRT-Aufnahmen ohne sowie mit 50.000, 100.000 und 200.000 U 343-Gliomazellen auf Membranen, die entweder mit Resovist (Referenzsubstanz), mit kolloidalem Eisenoxid (Fe_3O_4) oder mit Eisenoxid-beladenen Liposomen inkubiert worden sind. Kontrollansätze blieben unbehandelt. Die T_2^* -Messungen wurden an einem 3 T Philips Achieva in einem PBS-Pufferbad ($25^\circ C$) durchgeführt. Die Eisenoxidkonzentrationen betragen jeweils $0,04 \text{ mg Fe/ml}$.

waren. In der oberen Reihe ist keine Signalverminderung für Resovist als auch für die Liposomen zu erkennen. Das bedeutet, dass weder Resovist noch die Liposomen an der Membran anhefteten und damit zu einem falsch positiven Ergebnis hätten führen können. Dagegen zeigt die Membran (ohne Zellen), die mit kolloidalem Eisenoxid versetzt worden war, einen deutlichen Signalverlust im MRT, der sich durch die Anwesenheit von Gliomazellen weiter verstärken ließ. Der Grund dafür ist das Anheften des kolloidalen Eisenoxids an der Membran.

Die Gliomazellen ließen sich durch die Inkubation mit Resovist sowie mit den Liposomen schon ab einer Zellzahl von 50.000 darstellen. Dies ist anhand der Schwärzung im Bereich der Membran erkennbar. Durch steigende Zellzahlen ergab sich aber kein stärkerer Signalverlust bzw. Steigerung des Kontrasts. Bei einem Vergleich des MRT-Signals zwischen Resovist und den Eisenoxid-beladenen Liposomen war kein Unterschied auszumachen, ihr signalmindernder Effekt erscheint vergleichbar stark.

Anhand dieser Versuche konnte nachgewiesen werden, dass Tumorzellen sich durch die vorherige Inkubation mit Eisenoxid-befüllten Liposomen im MRT darstellen lassen. Desweiteren ist ihr signalmindernder Effekt mit dem von der Referenzsubstanz Resovist vergleichbar. Kolloidales Eisenoxid erscheint für die Anwendung in der MR-Tomographie ohne Polymerhülle aufgrund seiner an der Membran anheftenden Eigenschaft ungeeignet.

4.1.6 Visualisierung unterschiedlicher Zelllinien durch Eisenoxid-beladene Liposomen im MRT

In diesem Versuch sollte die tomographische Detektierbarkeit von Tumorzellen mit der von Endothelzellen (HUVEC) nach Kontrastmittelmarkierung verglichen werden.

Es wurden jeweils 100.000 Zellen auf den Membranen ausgesät und nach 24-stündiger Kultivierung mit Eisenoxid-gefüllten Liposomen bzw. mit Resovist als Referenzsubstanz inkubiert. Die Eisenkonzentration während der Inkubation betrug 0,04 mg Fe/ml. Als Negativkontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen mitgeführt. Anhand einer Schwärzung im Bereich der Membran ist deutlich der signalverminderte Effekt durch die Inkubation mit den Eisenoxid-gefüllten Liposomen sowohl bei U 343- als auch bei HUVEC-Zellen zu erkennen (Abbildung 4.8). Auch durch Inkubation der Zellen mit der Referenzsubstanz Resovist ist ein deutlicher Signalverlust verbunden mit einer Schwarzfärbung auf der Membran auszumachen. Die Intensität der Schwarzfärbung durch Eisenoxid-beladene Liposomen (korrelierend mit der T_2^* -Relaxationszeit verkürzenden Wirkung)

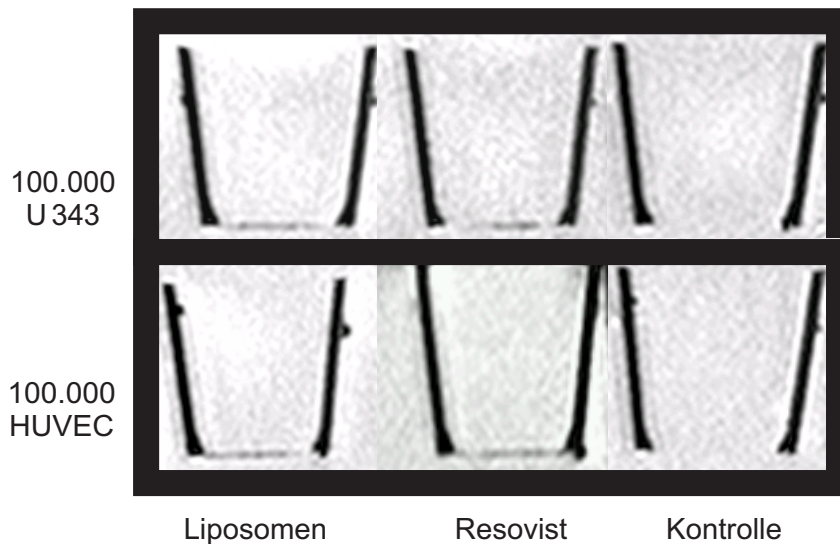


Abbildung 4.8: Visualisierung unterschiedlicher Zelllinien mit und ohne Kontrastmittel.

Dargestellt sind Aufnahmen von U343-Gliomazellen (obere Reihe) und Endothelzellen (HUVEC, untere Reihe) nach Inkubation mit Eisenoxid-beladenen Liposomen bzw. mit Resovist (Referenzsubstanz). Die Eisenoxidkonzentration betrug jeweils 0,04 mg Fe/ml. Kontrollansätze blieben unbehandelt. Die T_2^* -Messungen wurden an einem 3 T Philips Achieva in einem 25 °C warmen PBS-Pufferbad durchgeführt.

war mit der vom Resovist vergleichbar stark. Die Kontrollansätze zeigten - wie erwartet - keinen kontrastverstärkenden Effekt.

Somit wurden sowohl die Tumorzellen als auch die Endothelzellen gleichermaßen markiert.

4.1.7 Histochemische Anfärbung intrazellulären Eisenoxids

Um intrazelluläres Eisenoxid über zytochemische Färbungen (*Berliner Blau Färbung*) nachzuweisen, wurden U343-Gliomazellen auf PDL-beschichteten Deckgläschen ausgesät und, wie im Unterpunkt 3.10 detailliert beschrieben, dreiwertiges Eisen mit Kaliumhexacyanoferrat(II) zu einer dunkelblauen Verbindung komplexiert. Es folgte eine Gegenfärbung mit Kernechtrubin und anschließende Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop.

Wie in der Abbildung 4.9 dargestellt, konnte intrazelluläres dreiwertiges Eisen durch Bildung eines blauen Komplexes mit Kaliumhexacyanoferrat(II) in den Gliomazellen nachgewiesen werden. Durch die Gegenfärbung mit Kernechtrubin färbte sich das Zytoplasma rosa. Als Negativkontrolle wurden die Zellen parallel mit einem Albumin-N70-Konjugat, das nicht aufgenommen wird, versetzt, wobei es zu keiner Blaufärbung der Zellen kam (nicht gezeigt).

Damit konnte eine Aufnahme der mit Eisenoxid-gefüllten Liposomen über Endozytose durch die Gliomazellen festgestellt und nachgewiesen werden.

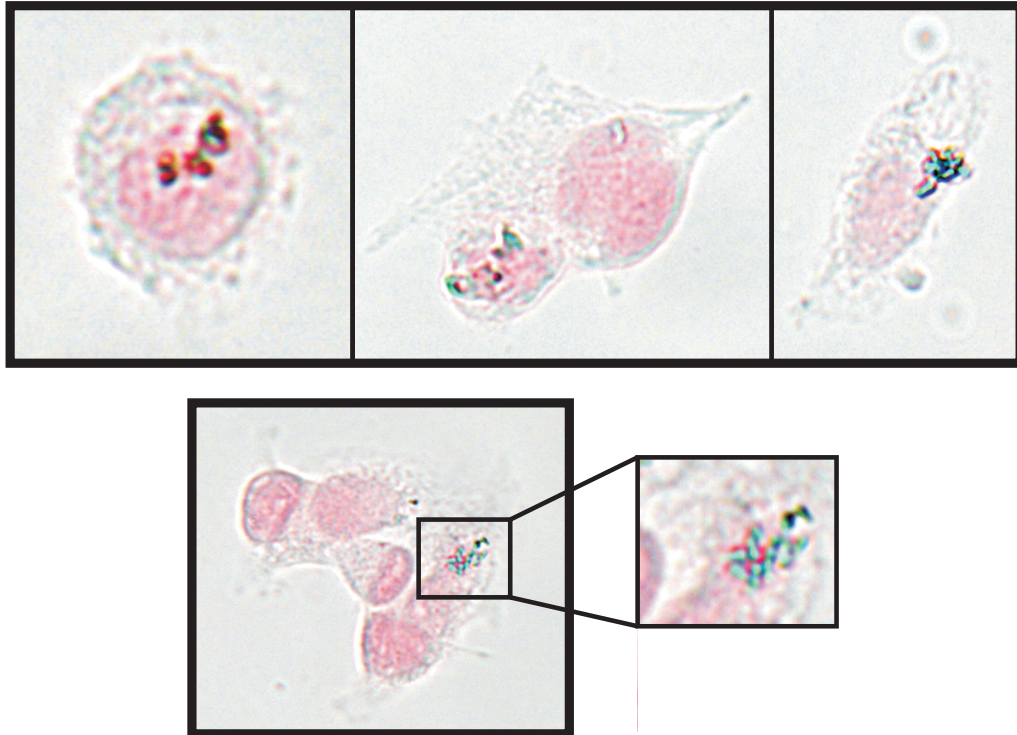


Abbildung 4.9: Histochemische Anfärbung intrazellulären Eisenoxids.
Berliner Blau Färbung mit Kaliumhexacyanoferrat(II) und Gegenfärbung mit Kernechtrubin von U343-Gliomazellen nach vorangegangener Inkubation mit Eisenoxid-beladenen Liposomen.

4.2 Optische Bildgebung mit Nahinfrarot (NIR)-Sonden

Für die Auswahl geeigneter NIR-Sonden wurde zunächst die Fluoreszenzintensität sowie die Stabilität der Cyaninfarbstoffe IRDye 800 und Cy7 untersucht, wodurch eine Auswahl des besseren Farbstoffes für die nachfolgenden Konjugationen und biologischen Experimente getroffen werden sollte.

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen/Vorversuche im Nahinfrarotbereich mit der optischen Odyssee - Fluoreszenzkammer wurde anhand eines zwei Diodenlasers die Proben mit Wellenlängen von 685 nm und 785 nm angeregt und emittiertes Licht der Fluoreszenzfarbstoffe (IRDye 800: $\lambda_{\text{Emission}} = 789 \text{ nm}$; Cy7: $\lambda_{\text{Emission}} = 776 \text{ nm}$) detektiert.

4.2.1 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Cy7 und IRDye 800 in Abhängigkeit ihrer Konzentration

Um die Fluoreszenzintensitäten von Cy7 und IRDye 800 zu vergleichen, wurden folgende Farbstoffkonzentrationen in PBS-Puffer hergestellt:

1 nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM; 100 nM; 300 nM; 1 μM ; 3 μM

Anschließend wurden jeweils 10 μl dieser Ansätze in eine 96-Well-Platte gegeben und die relativen Fluoreszenzintensitäten in der Odyssee-Kammer bestimmt und quantifiziert.

Wie der Abbildung 4.10 zu entnehmen, stiegen bei beiden Farbstoffen die relativen Fluoreszenzintensitätskurven parallel zur Konzentration, unterschieden sich aber signifikant ($***p < 0,001$) voneinander. So zeigten schon IRDye-Konzentrationen ab 1 nM eine deutliche Fluoreszenz, die gegenüber dem Cy7 um über 35 % erhöht war. Durch steigende IRDye-Konzentrationen bis 30 nM ließen sich die relativen Fluoreszenzintensitäten bis auf ein Maximum (= 100 %) steigern. Höhere Konzentrationen des IRDye führten zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals bis auf Anfangsniveau, die durch die Erscheinung des *self-quenching* hervorgerufen wurde. Im Vergleich zum IRDye 800 führten bei dem Cy7-Fluoreszenzfarbstoff erst Konzentrationen ab 300 nM zu sichtbaren Fluoreszenzsignalen. Diese ließen sich durch Erhöhung der Konzentration bis auf 3 μM steigern, erreichten aber bis dahin nur etwa 14 % der maximalen Intensität des IRDye-Farbstoffes. Ob eine weitere Steigerung der Cy7-Konzentration die relativen Fluoreszenzintensitäten erhöhen würde, wäre in einem weiteren Versuch zu überprüfen.

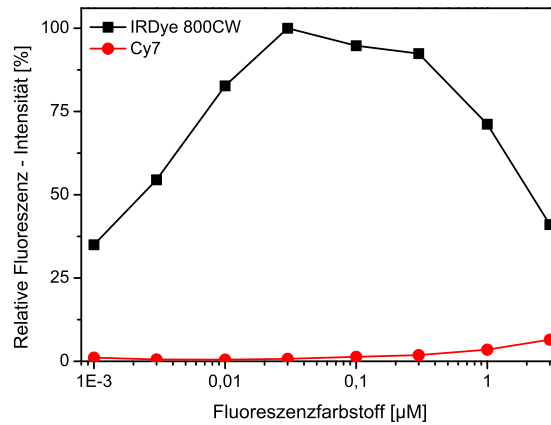


Abbildung 4.10: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von Cy7 gegenüber IRDye 800 mit zunehmender Konzentration.

Dazu wurden steigende Farbstoff-Konzentrationen in eine 96-Well Platte gegeben (jeweils 10 μ l in PBS-Puffer) und die relativen Fluoreszenzintensitäten in der Odyssey-Kammer bestimmt und quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung (max. Standardabweichung unter 3,4% und daher nicht zu erkennen)(n = 3). Maximum = 100%; Odyssey-Kammer: $\lambda_{\text{Anregung}} = 685$ nm und 785 nm; $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye 800}) = 789$ nm; $\lambda_{\text{Emission}}(\text{Cy7}) = 776$ nm.

Abschließend konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zum Cy7 der IRDye-Farbstoff schon bei Konzentrationen ab 1 nM Fluoreszenzintensitäten zeigte, die der Cy7 bis Konzentration von 3 μ M nicht annähernd erreichte. Somit fiel die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes für die weiteren In-vitro-Versuche auf den IRDye 800, der schließlich auch in vivo Anwendung fand.

4.2.2 Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800

Schnelles Ausbleichen von fluoreszenzmarkierten Zellen erschwert immer wieder eine qualitative und quantitative Beurteilung der Markierung. Die Kenntnis der Stabilität kann einerseits als Auswahlkriterium herangezogen werden, andererseits ermöglicht sie die Fragestellung des optimalen Zeitfensters für die Detektion markierter Tumorzellen.

Zur Bestimmung der physiko-chemischen (Lösungs-) Stabilität des IRDye 800 in PBS-Puffer wurde das Verhalten der relativen Fluoreszenzintensität des Farbstoffes über einen Zeitraum von fünf Tagen bestimmt. Dazu wurde die 96-Well Platte aus dem vorangegangenen Versuch (4.2.1) bei Raumtemperatur abgedeckt gelagert und jeweils einmal am Tag die relative Fluoreszenzintensität in der Odyssey-Kammer bestimmt. Die Abbildung 4.11 gibt die relativen Fluoreszenzintensitäten über die Konzentration (A) bzw. über die Zeit (B) wieder. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung. (A) zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten bei steigender Farbstoffkonzentration über

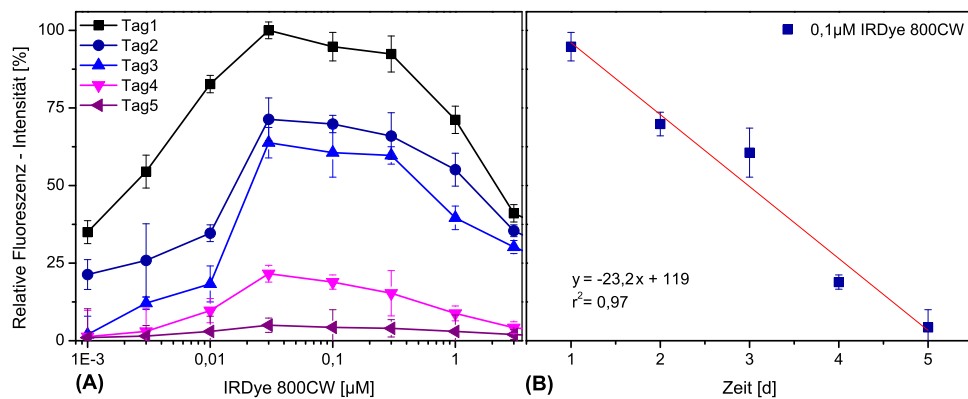


Abbildung 4.11: Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800.

Die in der Odyssey-Kammer gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten wurden quantifiziert und die erhaltenen Ergebnisse über die Konzentration (A) bzw. über die Zeit (B) aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung ($n = 3$). Maximum = 100 %. (A) zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten bei steigender Farbstoffkonzentration über einen Zeitraum von fünf Tagen. Zur Veranschaulichung wurden die Messwerte der Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ separat über die Zeit aufgetragen (B). Dieser Versuch wurde ohne Zellen in PBS-Puffer durchgeführt. $\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye 800}) = 789 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Emission}}(\text{Cy7}) = 776 \text{ nm}$.

einen Zeitraum von fünf Tagen. Zur Veranschaulichung wurden die Messwerte der Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ separat über die Zeit aufgetragen (B), da diese Konzentration für die anschließenden Versuche ausgewählt worden ist. Die Versuche wurden ohne Zellen in PBS-Puffer durchgeführt ($n = 3$).

Anhand des Verlaufes der relativen Fluoreszenzintensität für den IRDye 800 ist eine fast lineare Abnahme der Lösungsstabilität innerhalb eines Zeitfensters von fünf Tagen zu beobachten. So nahm die maximale Fluoreszenzintensität von Tag 1 (= 100 %) innerhalb der ersten 24 Stunden um etwa 30 % (Tag 2) ab. Nach 48 Stunden wurde 62 % der initialen Fluoreszenzintensität gemessen (Tag 3). Es folgte eine weitere Abnahme um 42 % auf ein fünftel der anfänglichen Fluoreszenzintensität. Am Tag 5 verblieb ein restliches Fluoreszenzsignal von etwa 3 %. Damit konnte über lineare Regression eine durchschnittliche Fluoreszenzabnahme von 23,2 % pro Tag bestimmt werden.

Anhand dieses Versuches konnte ein moderates Ausbleichverhalten des IRDye 800 festgestellt und näher charakterisiert werden. Eine Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes innerhalb von drei Tagen war möglich, da innerhalb dieses Zeitraumes der IRDye eine ausreichende Fluoreszenzintensität und -stabilität aufwies. Eine Anwendung über diesen Zeitpunkt hinaus wurde aufgrund der physiko-chemischen Instabilität vermieden.

4.2.3 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Cy7 und IRDye 800 an der Gliomazelllinie A 764 in Abhängigkeit ihrer Konzentration

Um einen Vergleich der beiden Cyaninfarbstoffe IRDye 800 und Cy7 in Bezug auf ihre unspezifische Markierung von Zellen in Abhängigkeit ihrer Konzentration zu erhalten, wurden 30.000 A 764 - Gliomazellen in einer 24 - Well Platte ausgesät und am nächsten Tag mit folgenden Farbstoff - Konzentrationen über eine Stunde im Brutschrank inkubiert:

1 nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM; 100 nM; 300 nM; 1 μ M; 3 μ M

Anschließend wurden die Zellen über 20 Minuten mit einer 4 % -igen Paraformaldehyd - lösung fixiert. Es folgte die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten in der Odyssey - Kammer und die anschließende Quantifizierung der Messergebnisse.

Wie bereits im vorherigen Vergleich der Farbstoffe zeigten sich bei jeder verwendeten Konzentration auch am Zellkulturmodell signifikante Unterschiede in der Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 4.12). So war bereits bei einer IRDye - Konzentration von 1 nM ein deutliches Fluoreszenzsignal zu detektieren. Dies nahm mit steigender Konzentration bis auf ein Maximum (= 100 %) zu, welches bei einer Konzentration von 0,1 μ M erreicht wurde. Höhere Konzentrationen brachten keine weitere Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität, da die Zellen gesättigt waren.

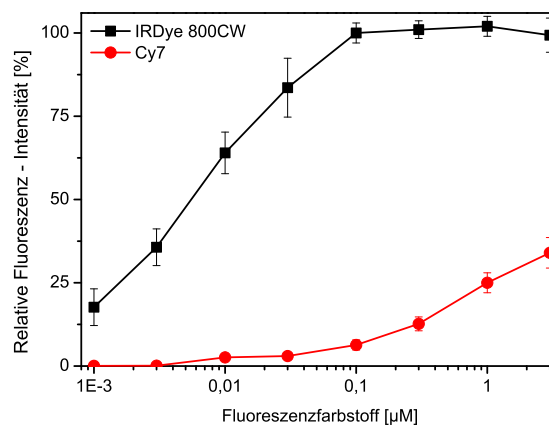


Abbildung 4.12: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von Cy7 gegenüber IRDye 800 mit zunehmender Konzentration.

A 764 - Zellen (30.000 Zellen pro Well) wurden mit steigenden Farbstoff - Konzentrationen über eine Stunde im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die relativen Fluoreszenzintensitäten wurden anschließend in der Odyssey - Kammer bestimmt und quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung ($n = 3$). Maximum = 100 %. λ Anregung = 685 nm und 785 nm; λ Emission (IRDye 800) = 789 nm; λ Emission (Cy7) = 776 nm.

Die mit Cy7-inkubierten Zellen zeigten dagegen eine schwächere Markierung. Erst ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ konnte ein erstes signifikantes Fluoreszenzsignal ($***p < 0,001$) detektiert werden, welches mit steigender Konzentration zunahm. Dabei war die Zunahme verglichen mit der von IRDye inkubierten Zellen geringer. Auch bei einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ erreichten die mit Cy7-inkubierten Zellen nicht annähernd das Niveau von IRDye-inkubierten A764-Zellen.

Bei einem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Zellen, die mit IRDye bzw. mit dem Fluoreszenzkonjugat EGF-IRDye 800 inkubiert worden sind, zeigte sich bei gleicher Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$) eine um $>95\%$ stärkere Fluoreszenz bei Inkubation mit dem Konjugat. Damit konnte für den Fluoreszenzfarbstoff IRDye eine geringe unspezifische Aufnahme in A764-Zellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Herstellerangaben. Verglichen mit der unspezifischen Cy7-Aufnahme war die vom IRDye jedoch größer.

4.2.4 Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800 an der Gliomazelllinie A764

Zusätzlich zur Untersuchung der Farbstoffstabilität in Abhängigkeit seiner Konzentration (siehe Unterpunkt 4.2, S. 117) wurde die Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800 an der Gliomazelllinie A764 (30.000 Zellen pro Well) über einen Zeitraum von fünf Tagen in PBS-Puffer bestimmt. Dazu wurde jeweils einmal am Tag die relative Fluoreszenzintensität unterschiedlicher IRDye-Konzentrationen in der Odyssey-Kammer gemessen und anschließend quantifiziert ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$).

In der Abbildung 4.13 sind in (A) die Fluoreszenzintensitäten über steigende IRDye-Konzentrationen über fünf Tage aufgetragen. Zusätzlich wurden für eine bessere Veranschaulichung die Messwerte der Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ separat über die Zeit dargestellt (B). Über lineare Regression konnte eine durchschnittliche Abnahme der Fluoreszenzintensität von $18,6\%$ pro Tag ermittelt werden.

Sowie in Abwesenheit (4.2.2) als auch in Gegenwart von Zellen zeigte sich somit eine lineare Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit.

Ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ wurde bereits ein maximales Fluoreszenzsignal erreicht und damit ist die Verwendung einer höheren Konzentration für weitere Versuche nicht notwendig. Sie wurde für die Durchführung anschließender Experimente ausgewählt.

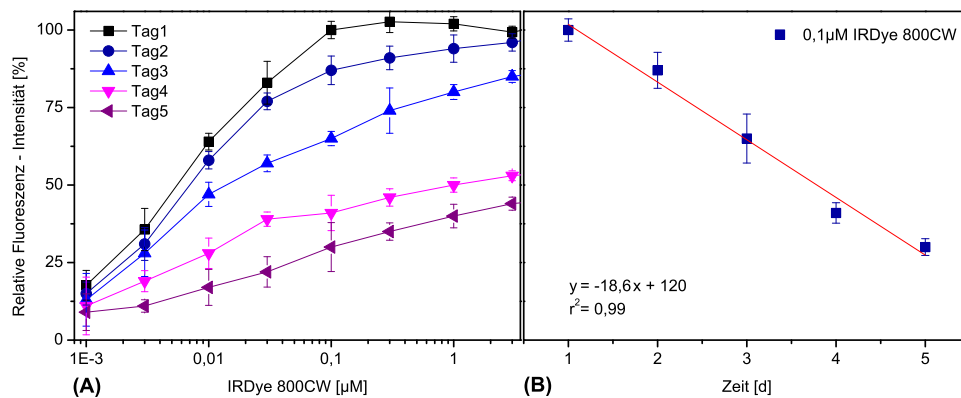


Abbildung 4.13: Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800 in Gegenwart von A 764 - Gliomazellen.

Die in der Odyssey - Kammer gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten wurden quantifiziert und die erhaltenen Ergebnisse über die Konzentration (A) bzw. über die Zeit (B) aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung ($n = 3$). (A) zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten bei steigender Farbstoffkonzentration über einen Zeitraum von fünf Tagen. Zur Veranschaulichung wurden die Messwerte der Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ separat über die Zeit aufgetragen (B). Die A 764 - Zellen (30.000 Zellen pro Well) wurden über eine Stunde mit den angegebenen IRDye - Konzentrationen im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Maximum = 100 %; $\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}} (\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$.

4.2.5 Konjugation und Aufreinigung der Konjugate

Die Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffes an ausgewählte Peptide erfolgte durch das Zusammengeben des IRDye 800 und des Peptids in einem molaren Verhältnis von 1 : 5 bis 1 : 10 in NaHCO_3 -Puffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Ansätze wurden vor Licht geschützt.

Zur Aufreinigung der hergestellten Fluoreszenzkonjugate wurden zwei etablierte Methoden gewählt: die Gelfiltration unter Verwendung von Micro Spin Columns und die Gelchromatographie mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatographie*, HPLC). Dabei erwies sich die Verwendung der Superdex Peptide 3.2-HPLC-Trennsäule als optimal für die Abtrennung überschüssigen, nicht-gebundenen Farbstoffes vom Konjugat aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte. In der Abbildung 4.14 (A) ist exemplarisch die Aufreinigung der Konjugation von SDF-1 und IRDye 800 als Chromatogramm der HPLC dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der Konjugationspeak, aufgefangen in den Fraktionen 1-3, und der Peak des überschüssigen Fluoreszenzfarbstoffes entsprechend der Fraktionen 6-12. Anschließend wurde jede einzelne Fraktion auf ein NIR-Fluoreszenzsignal in der Odyssey - Kammer

($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}} (\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$) hin überprüft. In (B) sind die einzelnen Fraktionen gezeigt, die nach dem Auftragen und der Elution des Farbstoffes IRDye 800 erhalten wurden. Erkennbar ist eine deutliche Fluoreszenz nur in den Fraktionen 10-13. Nach anschließender Elution des Konjugates SDF-1-IRDye 800 tritt dagegen ein zusätzliches Fluoreszenzsignal in den Fraktionen 1-3 übereinstimmend mit dem Chromatogramm der HPLC auf. Damit konnten die Konjugate über die analytische HPLC-Methode aufgereinigt und zusätzlich auf eine erfolgreiche Kopplung in der Odyssey-Fluoreszenzkammer hin überprüft werden. Die Konjugat-enthaltenden Fraktionen wurden abschließend vereinigt und für die weiteren Versuche verwendet.

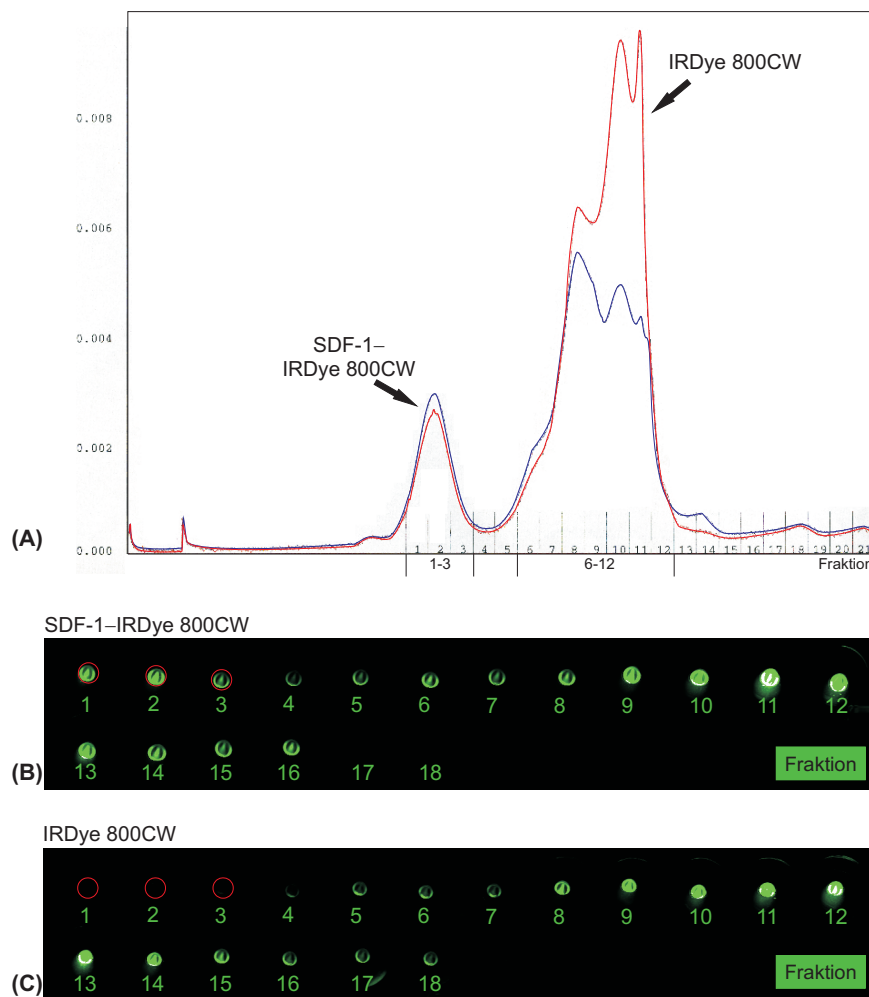


Abbildung 4.14: Aufreinigung der Konjugate über die HPLC-Methode und anschließende Überprüfung der einzelnen Fraktionen auf ein Fluoreszenzsignal in der Odyssey-Fluoreszenzkammer.

(A) Chromatogramm der Konjugation von SDF-1 mit IRDye 800; Rot: $\lambda = 254 \text{ nm}$; Blau: $\lambda = 280 \text{ nm}$
 (B, C) NIR-Fluoreszenzsignal der aufgefangenen Fraktionen nach Auftragen des (B) Konjugats (wie (A)) und (C) des IRDye 800 allein. $\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}} (\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$.

4.2.6 Genexpressionsmuster tumorspezifischer Rezeptoren und deren Liganden in humanen Tumorzellen

Um ein allgemeines Bild über das Vorkommen tumorspezifischer Rezeptoren und deren Liganden in unterschiedlichen humanen Tumoren zu bekommen, wurden zur Verfügung stehende humane Zelllinien auf die mRNA - Expression ausgewählter Liganden und entsprechenden Rezeptoren hin untersucht. Die aus den folgenden Experimenten erhaltenen Informationen waren nicht nur für die weiteren In-vitro-Versuche notwendig, sondern auch für die Wahl eines In-vivo-Modells bedeutsam.

Für die Bestimmung der Genexpressionsmuster wurden unterschiedliche humane Zelllinien (HUVE-Zellen als Endothelzellen; MDA-MB 231 und MCF7 als Mammakarzinomazelllinien; U 118, U 343 und A 764 als Gliomazelllinien und HT 29 als Kolonkarzinomazelllinie) ausgewählt und auf die Genexpression ausgewählter Oberflächenrezeptoren (EGFR, Endoglin, CXCR4 und CXCR7) sowie Liganden (CXCL11/I-TAC und SDF-1) hin untersucht.

Die aus den entsprechenden Zellen mit Hilfe des Trizolreagenzes isolierte mRNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer quantitativen rt-PCR amplifiziert.

Wie aus der Abbildung 4.15 (A) ersichtlich, konnte für den EGF-Rezeptor in allen untersuchten Zelllinien ein geringer ΔC_t -Wert ($\Delta C_t < 8,5$) gleichbedeutend mit einer relativ hohen Expression festgestellt werden. Dabei war dieser Rezeptor in den A 764-Zellen am höchsten exprimiert ($\Delta C_t = 5,2$).

Die Expression des TGF β -Korezeptors Endoglin (Abbildung 4.15, (B)) war ebenfalls in allen Tumorzellen auffindbar. Die stärkste Endoglin-Expression zeigten dabei mit Abstand die Endothelzellen ($\Delta C_t \approx 2,4$).

Eine Expression der beiden chemotaktisch aktiven Zytokine CXCL11/I-TAC und SDF-1 (Abbildung 4.15 (C) und (D)) konnte nicht in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Eine schwache CXCL11-Expression zeigten die Mammakarzinoma- und Kolonkarzinomazellen ($\Delta C_t = 15,4$ MDA-Zellen bzw. $\Delta C_t = 11,1$ MCF7-Zellen; $\Delta C_t = 14,8$ HT 29-Zellen), eine höhere Expression wurde in der Endothelzelllinie sowie in den Gliomazellen U 343 und A 764 nachgewiesen ($\Delta C_t \approx 9$). CXCL11-mRNA konnte dagegen in U 118-Zellen nicht detektiert werden. SDF-1-mRNA war ebenfalls schwach in den HUVE-Zellen exprimiert ($\Delta C_t = 13$). Im Gegensatz zum Chemokinliganden CXCL11 war die SDF-1-Expression allerdings in der Gliomazelllinie U 118 mit einem ΔC_t -Wert von 9 detektierbar. Die Mammakarzinomazellen MDA-MB 231 und MCF 7, die Gliomazellen U 343 und A 764 sowie die HT 29-Zellen zeigten keine SDF-1-Expression.

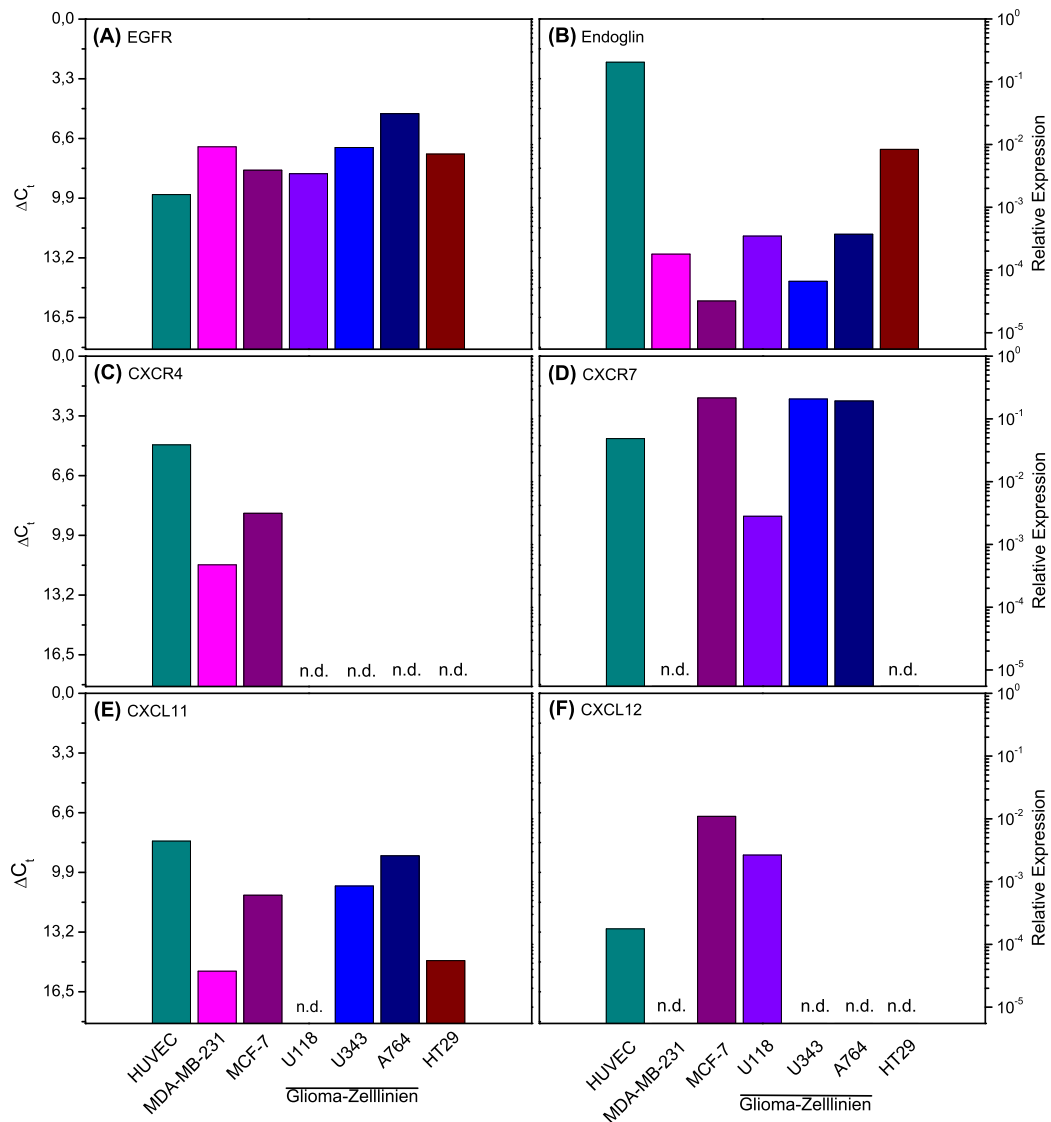


Abbildung 4.15: Genexpressionsmuster tumorspezifischer Rezeptoren und deren Liganden in verschiedenen humanen Tumorzelllinien und Endothelzellen.

Die mRNA-Expression der ausgewählten Liganden bzw. Rezeptoren wurde mit Hilfe der *Real Time* rt-PCR ermittelt. Als Referenz für die Berechnung der ΔC_t -Werte diente die GAPDH-mRNA. Dargestellt sind die ΔC_t -Werte der einzelnen Zelllinien (HUVEC = Endothelzelllinie; MDA-MB 231 und MCF7 = Mammakarzinomzellen; U 118, U 343 und A 764 = Gliomazellen; HT29 = Kolonkarzinomzellen). Da in den Proben vorhandene mRNA-Menge zu den gemessenen ΔC_t -Werten umgekehrt proportional ist, wurden für die Y-Achsen eine inverse Skalierung gewählt, so dass eine bessere Visualisierung der Ergebnisse möglich ist. Dargestellt sind auf der linken Y-Achse die absoluten ΔC_t -Werte, auf der rechten Y-Achse die relative Expression. n.d. $\hat{=}$ nicht detektierbar (unterhalb der Nachweisgrenze von 40 Zyklen).

Eine Expression des SDF-1-Rezeptors CXCR4 (Abbildung 4.15 (E)) konnte nur für die Endothelzellen und die Brusttumorzellen festgestellt werden ($\Delta C_t = 4,9$ (HUVEC), $\Delta C_t = 11,3$ (MDA-Zellen) bzw. $\Delta C_t = 6,8$ (MCF7-Zellen)). CXCR4-mRNA war in den Gliomazellen sowie in den HT 29-Zellen nicht detektierbar.

Eine hohe Expression des alternativen SDF-1-Rezeptors CXCR7 konnte dagegen in allen drei Gliomazelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 4.15 (F)). Dabei zeigten die U343- und A764-Zellen die stärkste Expression mit einem ΔC_t -Wert von $< 2,5$. Die HUVE-Zellen exprimierten ebenfalls CXCR7-mRNA ($\Delta C_t \approx 4,5$). In den Brusttumorzellen sowie in den HT 29-Zellen lag der CXCR7-Rezeptor nach 40 Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion unterhalb der Nachweisgrenze und war nicht detektierbar (n.d.).

Für weitere Versuche wurde die Gliomazelllinie A764 ausgewählt, da sie sowohl den EGF-Rezeptor als auch den Chemokinrezeptor CXCR7 hoch exprimieren.

4.2.7 Mikroskopische Fluoreszenzfärbungen über Cy3-Konjugate an Tumorzellen

Nachdem die Expression des EGF-Rezeptors sowie des Chemokinrezeptors CXCR7 auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, erfolgte nun der Nachweis dieser Rezeptoren auf Proteinebene über mikroskopische Fluoreszenzfärbungen. Dazu wurden die A764-Zellen mit den hergestellten Fluoreszenzkonjugaten (SDF-1-Cy3 und EGF-Cy3) inkubiert und anschließend Fluoreszenzaufnahmen am Mikroskop erstellt.

In den mikroskopischen Aufnahmen der Abbildungen 4.16 und 4.17 ist die Fluoreszenzmarkierung der EGF- und CXCR7-Rezeptoren anhand der hergestellten SDF-1-Cy3- sowie EGF-Cy3-Konjugate deutlich zu erkennen. In den Übersichtsaufnahmen (A) der Abbildungen konnte eine Fluoreszenzmarkierung aller Zellen gezeigt werden. Darüber hinaus wurden wenige, einzelne Zellen exemplarisch abgebildet (C,D), in denen eine Fluoreszenzmarkierung deutlich zu erkennen ist. Anhand der Kontrollfärbung mit Albumin-Cy3 konnte eine rot-fluoreszierende Färbung nicht beobachtet und eine unspezifische Bindung damit ausgeschlossen werden (B). Lediglich die blaue Fluoreszenz der Zellkerne mittels DAPI-Färbung war zu erkennen. Einen Unterschied zwischen den beiden Fluoreszenzkonjugaten in Bezug auf die Markierung der Gliomazellen konnte nicht festgestellt werden. Damit wurde eine selektive Bindung von SDF-1-Cy3 und EGF-Cy3 gezeigt und die Expression entsprechender Rezeptoren auf Proteinebene nachgewiesen.

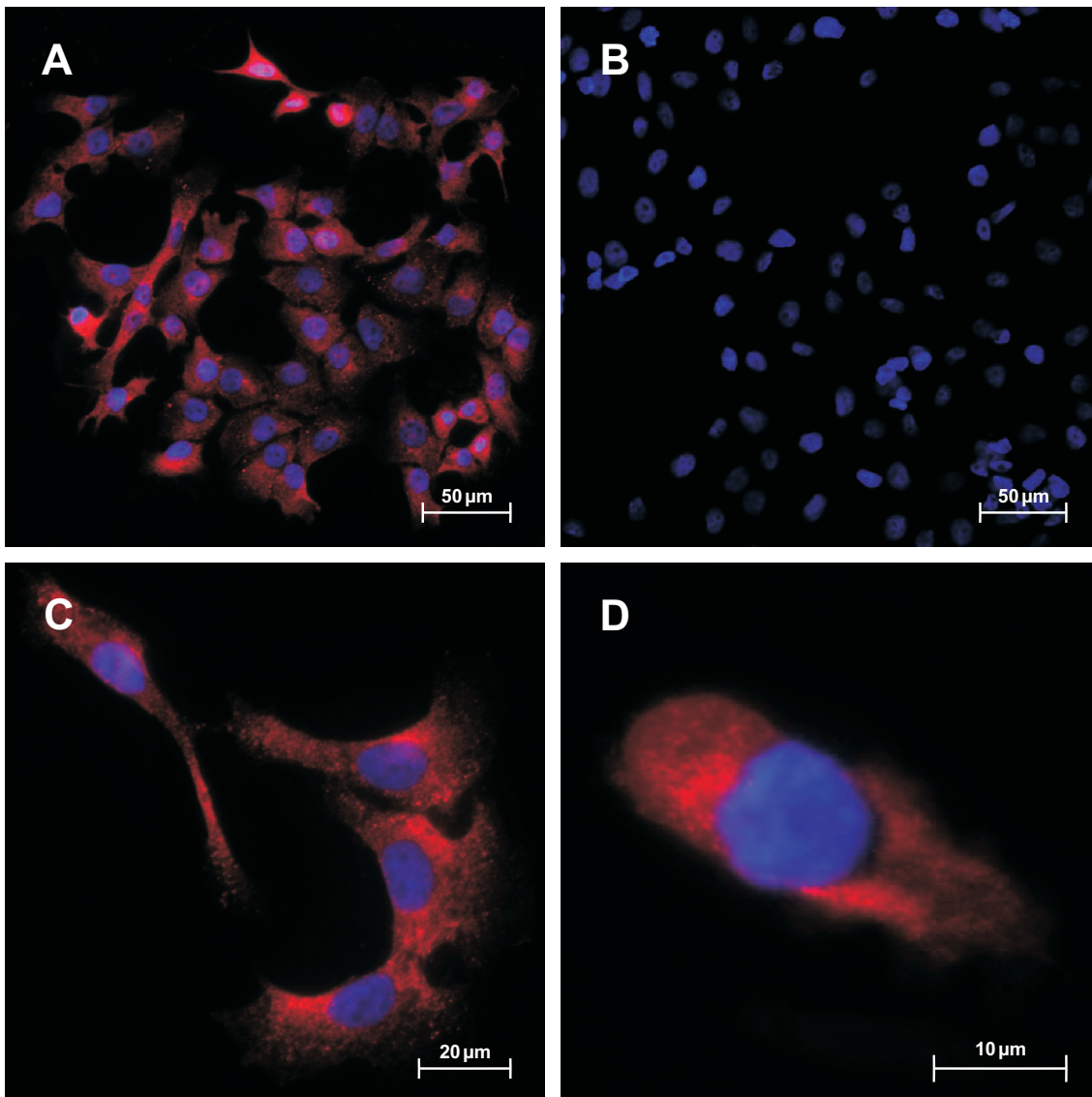


Abbildung 4.16: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des EGF - Rezeptors über EGF - Cy3 auf A 764 Gliomazellen.

Nach 24 - stündiger Kultivierung von 10.000 A 764 - Zellen auf PDL - beschichteten Deckgläschen erfolgte eine Aceton - Methanol - Fixierung (Verhältnis 1 : 1 (v : v)) über 10 Minuten. Der Rezeptornachweis erfolgte durch direkte Fluoreszenzfärbung mit EGF - Cy3 (0,5 nmol/ml, Rot) über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluss ((A),(C) und (D)). Die Zellkerne wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt. Dargestellt wurden repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente ($n \geq 3$). (B) Kontrollfärbung mit BSA - Cy3 (0,5 nmol/ml).

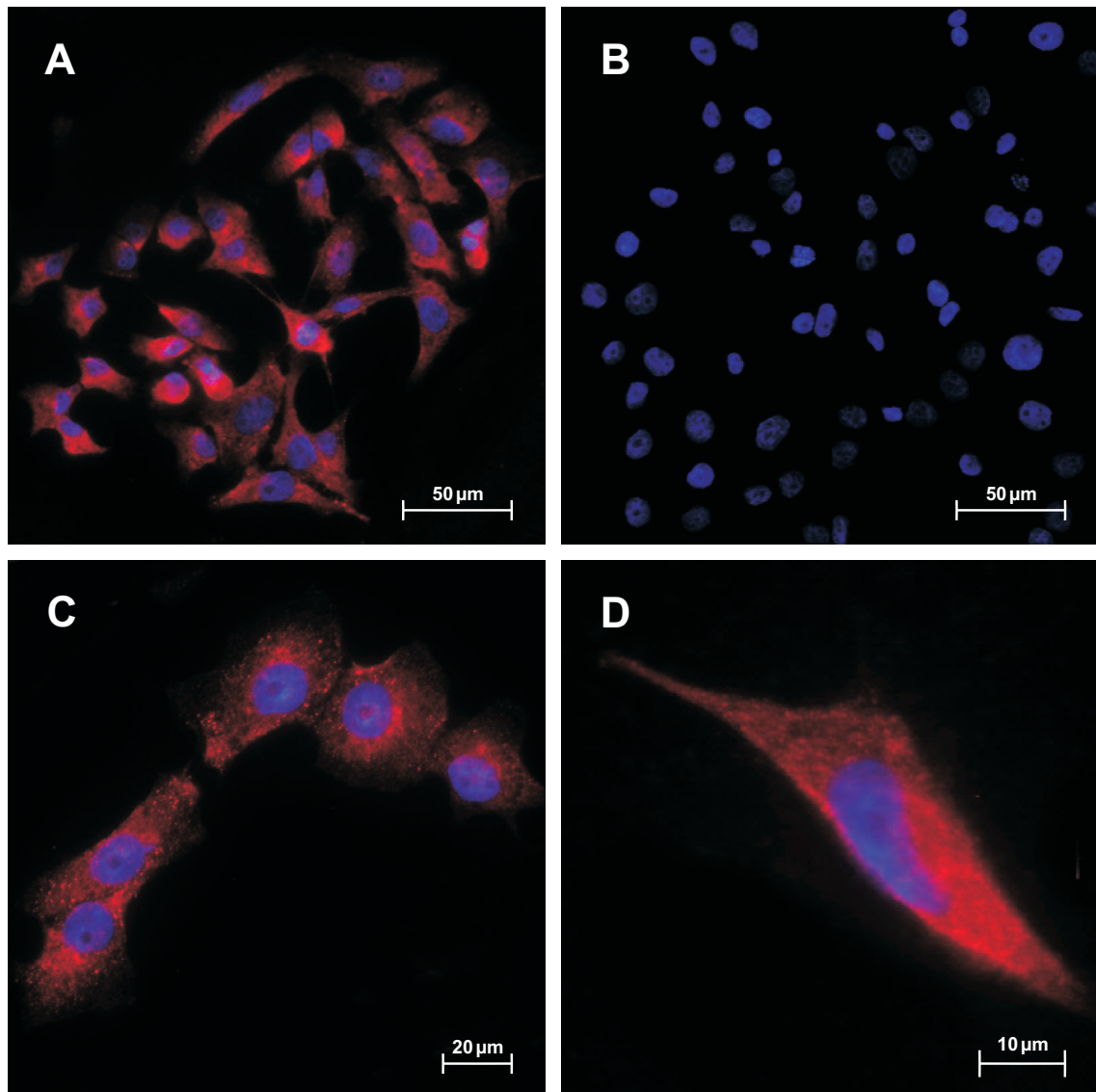


Abbildung 4.17: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Chemokinrezeptors CXCR7 über SDF-1-Cy3 auf A764 Gliomazellen.

Nach 24-stündiger Kultivierung von 10.000 A764-Zellen auf PDL-beschichteten Deckgläschen erfolgte eine Aceton-Methanol-Fixierung (Verhältnis 1:1 (v:v)) über 10 Minuten. Der Rezeptornachweis erfolgte durch direkte Fluoreszenzfärbung mit SDF-1-Cy3 (0,5 nmol/ml, Rot) über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluss ((A),(C) und (D)). Die Zellkerne wurden mit DAPI (Blau) gegengefärbt. Dargestellt wurden repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente ($n \geq 3$). (B) Kontrollfärbung mit BSA-Cy3 (0,5 nmol/ml).

4.2.8 Einfluss der Zellzahl auf die Markierungsintensität

Ein Qualitätsmerkmal der in dieser Arbeit hergestellten Fluoreszenzkonjugate ist u.a. ihre Selektivität und Sensitivität, Zellen zunächst *in vitro* zu markieren. Um dieses Kriterium zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zellzahlen der Gliomazelllinie A764 in 24-Well Platten ausgesät und nach 24 Stunden Kultivierung mit dem hergestellten Fluoreszenzkonjugat EGF-IRDye 800 über eine Stunde versetzt (Konzentration $0,1 \mu\text{M}$). Um ein kommerziell erworbenes EGF-IRDye- und ein selbst hergestelltes EGF-Cy7-Konjugat zu vergleichen, wurden parallel Gliomazellen mit diesen Konjugaten inkubiert. Abschließend wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten in der Odyssey-Kammer bestimmt. Die Abbildung 4.18 gibt die mit der Odyssey-Kammer gemachten Aufnahmen der markierten Zellen wieder.

In Reihe (A) der Abbildung 4.18 sind die mit dem selbst hergestellten SDF-1-Konjugat markierten Zellen gezeigt. Deutlich ist die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität mit steigender Zellzahl zu erkennen. Im Vergleich dazu sind die Intensitäten der mit dem kommerziell erworbenen EGF-IRDye 800-Konjugat inkubierten Zellen wesentlich schwächer (B). Zwar ist auch hier eine Zunahme des Fluoreszenzsignals zu beobachten,

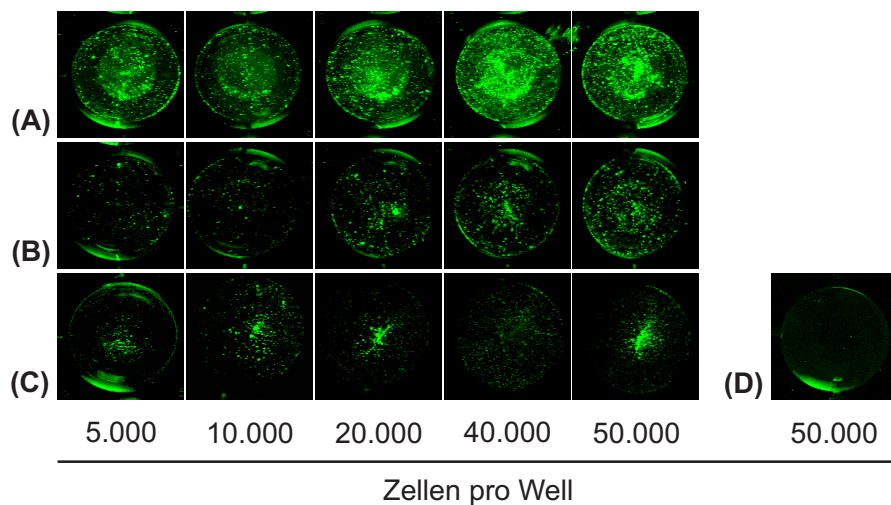


Abbildung 4.18: Einfluss der Zellzahl auf die Markierungsintensität der Tumorzellen mit EGF-IRDye 800.

(A) EGF-IRDye 800 (eigene Konjugation)

(B) EGF-1-IRDye 800 (LiCor Biosciences)

(C) EGF-Cy7 (eigene Konjugation)

(D) BSA-IRDye 800 (= unspezifische Kontrolle)

Dazu wurden jeweils unterschiedliche Zellzahlen der Gliomazelllinie A764 mit den Konjugaten (Konzentration jeweils $0,1 \mu\text{M}$) in Kulturmedium über eine Stunde versetzt. Anschließend wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten in der Odyssey-Kammer bestimmt. $\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}} (\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$.

doch reicht es nicht an das Niveau vom selbst synthetisierten Konjugat heran. Die geringsten Fluoreszenzintensitäten wurden durch Inkubation der Zellen mit EGF-Cy7 erzielt (C).

Mit dem Kontrollkonjugat IRDye-Albumin inkubierte Zellen zeigten bei der höchsten Zellzahl keine Fluoreszenz und damit keine unspezifische Bindung (D).

Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass bei steigender Zellzahl die relative Fluoreszenzintensität der mit EGF-IRDye 800 inkubierten Zellen zunahm und damit sich die EGF-Konjugate zur sensitiven Detektion der Zellen eigneten. Bei einem Vergleich des selbst synthetisierten EGF-IRDye mit einem kommerziell erworbenen Konjugat wies die eigene Konjugation die effektivere Markierung der Zellen auf. Zellzahlen von 5000 waren mit diesem noch sicher zu detektieren.

Das EGF-Cy7-Konjugat stellte aufgrund seiner schwachen Markierung keine Alternative zu den IRDye-Konjugaten dar.

Analog zu der Überprüfung des EGF-IRDye-Konjugats auf die Effektivität der Markierung von Gliomazellen wurde die Effektivität des SDF-1 IRDye-Konjugats untersucht. Dazu wurden 500 bis 50.000 A 764-Gliomazellen ausgesät und mit 0,1 μ M SDF-1-IRDye 800 über eine Stunde im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Für einen besseren Vergleich wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten mit der Odyssey-Kammer quantifiziert und die Ergebnisse in einem Diagramm über die steigende Zellzahl graphisch dargestellt (siehe Abbildung 4.19 (C)). Mit BSA-IRDye inkubierte Zellen dienten als Kontrolle.

Wie in Abbildung 4.19 (A) zu erkennen, korreliert die relative Fluoreszenzintensität mit der Zellzahl. Dabei ist schon ab einer Zellzahl von 500 ein sicheres Fluoreszenzsignal zu verzeichnen.

Erwartungsgemäß zeigen mit BSA-IRDye inkubierte Zellen keine eigene Fluoreszenz, sondern nur die Reflexion des Kunststoffmaterials (B), die überall zu beobachten war.

Durch Auftragung der quantifizierten Messdaten über die Zellzahl ist die Zunahme der Fluoreszenz anschaulich dargestellt (Abbildung 4.19 (C)). Gut zu erkennen ist daraus auch die konstant niedrige Fluoreszenz der Kontrolle. Sie betrug etwa 5 % der maximalen Fluoreszenz, die durch Reflexion am Kunststoffmaterial bedingt war.

Somit konnte auch für mit SDF-1-IRDye 800 inkubierte Zellen eine Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität korrelierend mit steigender Zellzahl nachgewiesen werden. Dabei waren im Gegensatz zu Zellen, die mit dem EGF-Konjugat versetzt waren, bei SDF-1-markierten Gliomazellen bereits Zellzahlen von 500 sicher zu detektieren.

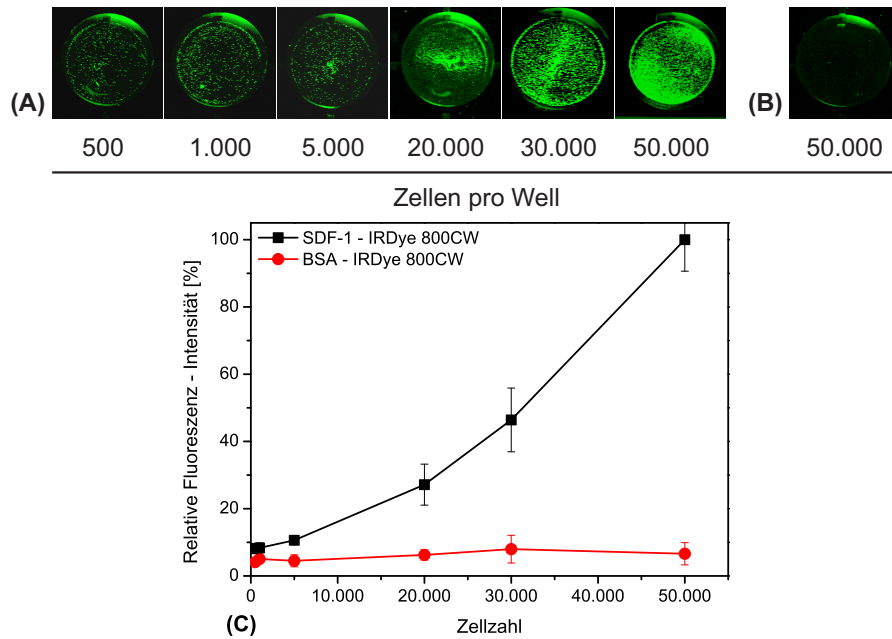


Abbildung 4.19: Abhängigkeit der Markierungsintensität der Tumorzellen mit SDF-1-IRDye 800 von der Zellzahl.

(A) SDF-1 - IRDye 800

(B) BSA - IRDye 800

(C) Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zellzahl

Analog zum vorangegangenen Versuch mit dem EGF-IRDye-Konjugat wurden verschiedene Zellzahlen (A 764) mit SDF-1-IRDye- bzw. mit BSA-IRDye-Konjugat (Konzentration jeweils 0,1 μ M) über eine Stunde versetzt. Anschließend wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten in der Odyssey-Kammer bestimmt und quantifiziert ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}} (\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$). Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n = 3$).

4.2.9 Einfluss der Konzentration auf die Markierungsintensität

Anhand dieses Versuches sollte herausgefunden werden, welche Konjugat-Konzentration ausreichend ist, um 30.000 A764-Gliomazellen sicher markieren zu können. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Fluoreszenzkonjugate hergestellt und die Gliomazellen über eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

In der Abbildung 4.20 sind die Ergebnisse dieses Versuches veranschaulicht. Dabei sind die Aufnahmen der markierten Zellen mit der Odyssey-Kammer mit EGF-IRDye 800 in der oberen Reihe (A), mit SDF-1-IRDye 800 in der unteren Reihe (B) dargestellt. (C) zeigt die Aufnahme von mit BSA-IRDye inkubierten Zellen, in der - wie erwartet - keine fluoreszenzmarkierten Zellen zu erkennen sind. Nach Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten sind die Messdaten quantifiziert und graphisch über die Konzentration aufgetragen (D) worden.

Bei dem Vergleich der beiden Fluoreszenzkonjugate miteinander ist anhand der Fluoreszenzaufnahmen bereits ab einer Konzentration von 10 nM SDF-1-IRDye eine beginnende Markierung der Zellen festzustellen und ab einer Konzentration von 0,1 µM sicher nachzuweisen. Beim EGF-Konjugat ist erst ab einer Konzentration von 30 nM eine initiale Markierung sichtbar, eine sichere Detektion aber ebenfalls bei 0,1 µM möglich. Somit kann das SDF-1-Konjugat schon in einer geringeren Konzentration im Vergleich zum EGF-Konjugat Zellen fluoreszenzoptisch markieren, aber bereits ab einer Konzentration von 0,1 µM zeigen EGF-IRDye markierte Zellen die stärkeren Fluoreszenzintensitäten. Auch in der Konzentration von 0,3 µM zeigt sich das EGF-Konjugat effektiver. Bei der Konzentration von 1 µM lässt sich keine Differenz in den relativen Fluoreszenzintensitäten der beiden Konjugate ausmachen und beide sind vergleichbar gut. Da für eine sichere Markierung und Detektion der Zellen eine Konzentration von 0,1 µM ausreichend war, wurde diese Konzentration in weiteren Versuchen eingesetzt.

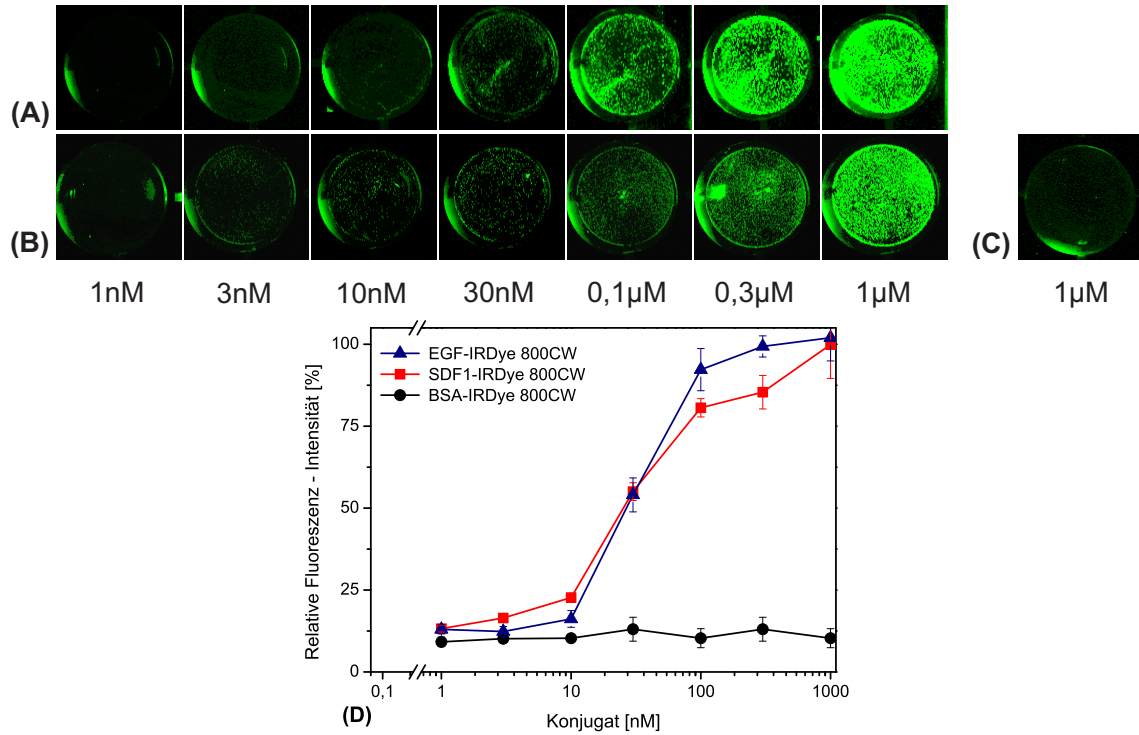


Abbildung 4.20: Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität mit steigender Konjugatkonzentration. (A) und (B) zeigen jeweils die fluoreszenzmarkierten Gliomazellen A 764 nach einer einstündigen Inkubation mit (A) EGF-IRDye 800 und (B) SDF1-IRDye 800 in der Odyssey-Kammer ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$). In (C) sind die Zellen nach Versetzen mit BSA-IRDye 800 abgebildet (unspezifische Kontrolle). Nach Quantifizierung der Messergebnisse sind die erhaltenden relativen Fluoreszenzintensitäten gegen steigende Konjugatkonzentrationen aufgetragen (D). Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen ($n = 3$). Der Messwert mit der maximalen relativen Fluoreszenzintensität aus jeder Messreihe entsprach 100 % und die weiteren Messdaten wurden dazu in Bezug gesetzt.

4.2.10 Einfluss der Inkubationszeit auf die Markierungsintensität

Um zu entscheiden, wie lange Zellen mit der in Versuch 4.2.9 ermittelten Konjugatkonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ inkubiert werden müssen, um eine optimale Markierung der Zellen zu erhalten, wurden in diesem Versuch die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit unterschiedlicher Inkubationszeiten untersucht. Dazu wurden A764-Gliomazellen (30.000 Zellen pro Well) ausgesät und nach 24 Stunden Kultivierung mit EGF-IRDye 800 bzw. mit SDF-1-IRDye ($0,1 \mu\text{M}$) unterschiedlich lange inkubiert. Abbildung 4.21 zeigt die Aufnahmen der Zellen für EGF-IRDye in der oberen Reihe (A) und für SDF-1-IRDye in der unteren Reihe (B). In (C) sind die Zellen nach Versetzen mit BSA-IRDye 800 (Kontrolle) und in (D) unbehandelte Gliomazellen abgebildet. Nach der Quantifizierung der Messergebnisse sind die erhaltenden relativen Fluoreszenzintensitäten gegen steigende Inkubationszeiten aufgetragen ((E) EGF-IRDye 800, (F) SDF-1-IRDye 800).

Eine Fluoreszenzmarkierung der Zellen war bereits mit beiden Konjugaten ab einer Inkubationsdauer von zehn Minuten deutlich auszumachen. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm die relative Fluoreszenzintensität der Zellen für beide Konjugate zu. Dabei lässt sich für mit EGF-IRDye inkubierte Zellen ein linearer Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachten, welches nach einer vierstündigen Inkubation die obere Nachweisgrenze der Odyssey-Kammer nahezu übersteigt. Die Fluoreszenzintensität für SDF-1-IRDye inkubierte Zellen gleicht einer exponentiellen Zunahme. Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Fluoreszenzmarkierung der Zellen schon nach einer Inkubationsdauer von zehn Minuten nachgewiesen werden. Eine optimale Inkubationszeit von einer Stunde wurde für anschließende Versuche ausgewählt.

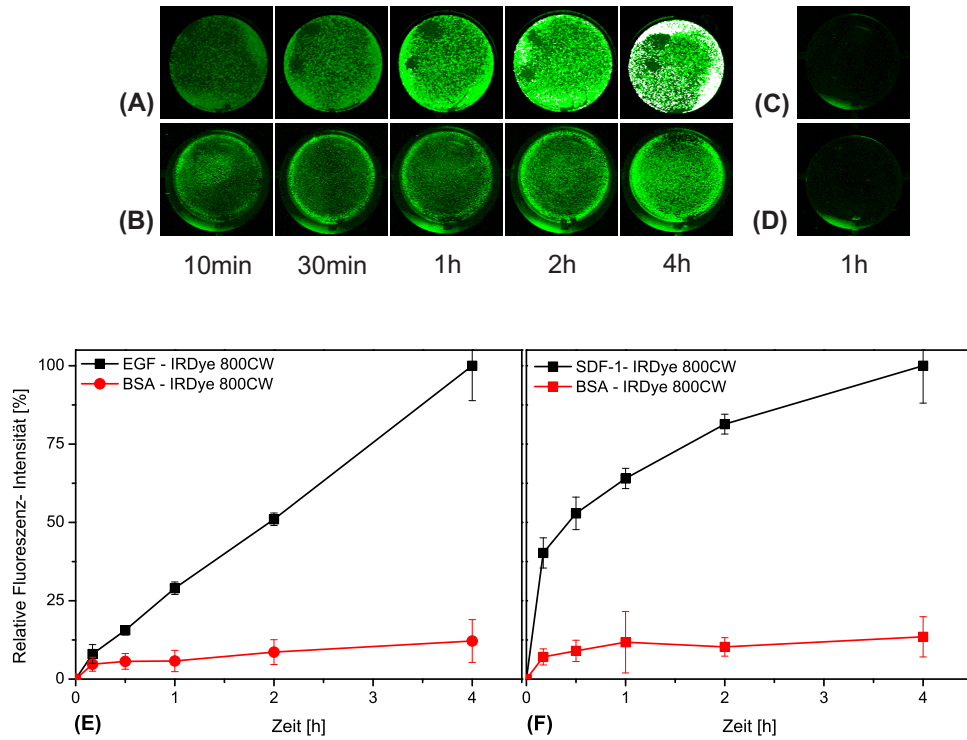


Abbildung 4.21: Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

In (A) und (B) sind jeweils die fluoreszenzmarkierten Gliomazellen (A 764) nach einer einstündigen Inkubation mit (A) EGF-IRDye 800 und (B) SDF-1-IRDye 800 in der Odyssey-Kammer gezeigt ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$). In (C) sind die Zellen nach Versetzen mit BSA-IRDye 800 (Kontrolle), in (D) unbehandelte Gliomazellen abgebildet. Es wurden jeweils 30.000 A 764-Zellen pro Well ausgesät und mit den entsprechenden Konjugaten nach den angegebenen Zeitintervallen inkubiert. Nach Quantifizierung der Messergebnisse sind die erhaltenden relativen Fluoreszenzintensitäten über steigende Inkubationszeiten aufgetragen ((E) EGF-IRDye 800, (F) SDF-1-IRDye 800). Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen ($n = 3$). Der Messwert mit der maximalen relativen Fluoreszenzintensität aus jeder Messreihe entsprach 100% und die weiteren Messdaten wurden dazu in Bezug gesetzt.

4.2.11 Spezifische Bindung und kompetitive Hemmung der Fluoreszenzkonjugate

Eine spezifische Bindung der Fluoreszenzkonjugate kann u.a. darüber nachgewiesen werden, indem die Zellen mit einem Liganden gleichzeitig inkubiert werden, der um die gleiche Rezeptorstelle konkurriert. Durch die Verwendung steigender Konzentrationen des Liganden sinkt die Wahrscheinlichkeit der Konjugatbindung an den entsprechenden Rezeptor, was über eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität (gemessen in der Odyssey - Kammer) verfolgt werden kann.

Für die Überprüfung der spezifischen Bindung der beiden Konjugate EGF-IRDye und SDF-1-IRDye wurden jeweils 30.000 Zellen pro Well ausgesät und 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Zunächst wurden die Zellen mit SDF-1-IRDye in der Konzentration von 0,1 μ M und steigenden SDF-1 - Konzentrationen versetzt. In der oberen Reihe (A) der Abbildung 4.22 sind die Aufnahmen der Odyssey - Kammer wiedergegeben. Das erste Bild zeigt die Zellen nur mit Konjugat ohne Zusatz des Chemokinliganden, die anschließenden drei Bilder die Koinkubation der Zellen mit Zusatz von SDF-1. Deutlich ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität erkennbar. Die quantifizierten Messdaten sind in (G) graphisch dargestellt. Anschließend wurde ein weiteres Chemokin (CXCL16) der gleichen Familie ausgewählt und der Verdrängungsversuch wiederholt. Diesmal wurden SDF-1 Konjugatkonzentration von 30 nM verwendet. Die Ergebnisse sind an U 118 (B) und an HUVE - Zellen (C) gezeigt. Die erste Aufnahme dieser Reihe gibt unbehandelte Zellen wieder, die zweite Aufnahme zeigt fluoreszenzmarkierte Zellen mit SDF-1-IRDye (30 nM). Die folgenden Aufnahmen zeigen die gleichzeitig inkubierten Zellen mit SDF-1-IRDye und steigenden Konzentrationen an CXCL16. Eine Abnahme des Fluoreszenzsignals war nicht zu beobachten. Der Grund dafür könnte sein, dass CXCL16 und SDF-1 nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Ein Indiz hierfür wäre die konstante Markierungsintensität der Zellen durch das Konjugat unabhängig von der CXCL16-Konzentration.

Die spezifische Bindung des SDF-1 - Konjugats wurde weiter durch das gleichzeitige Versetzen der Zellen mit Laktalbumin (Konzentration 1 μ M) an U 118 - (D) und HUVE - Zellen (E) überprüft. Besteht eine Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle beider Konjugate, so resultiert dies in einer verminderten Fluoreszenzintensität. Trotz des über 30-fachen Überschusses an Laktalbumin konnte anhand der unverminderten Fluoreszenzmarkierung der Zellen durch 30 nM SDF-1-IRDye 800 eine spezifische Bindung an den alternativen SDF-1 Chemokinrezeptor CXCR7 nachgewiesen werden.

Analog dazu wurde die spezifische Bindung von EGF-IRDye 800 an A 764 - Zellen untersucht. Die Aufnahmen in der Odyssey - Kammer sind nicht gezeigt, die quantifizierten Ergebnisse in Abbildung 4.22 (F) dargestellt. Auch hier zeigte sich eine Abnahme der

relativen Fluoreszenzintensitäten durch steigende Konzentrationen des Wachstumsfaktors EGF, wodurch auch für das EGF-Konjugat eine spezifische Bindung anzunehmen ist. Durch den Zusatz von Laktalbumin (Konzentration 1 μM) ließ sich das Fluoreszenzsignal und damit die Markierung der Gliomazellen mit EGF-IRDye (Konzentration 0,1 μM) nicht vermindern. Dies deutet ebenfalls auf eine spezifische Bindung des EGF-Konjugats hin.

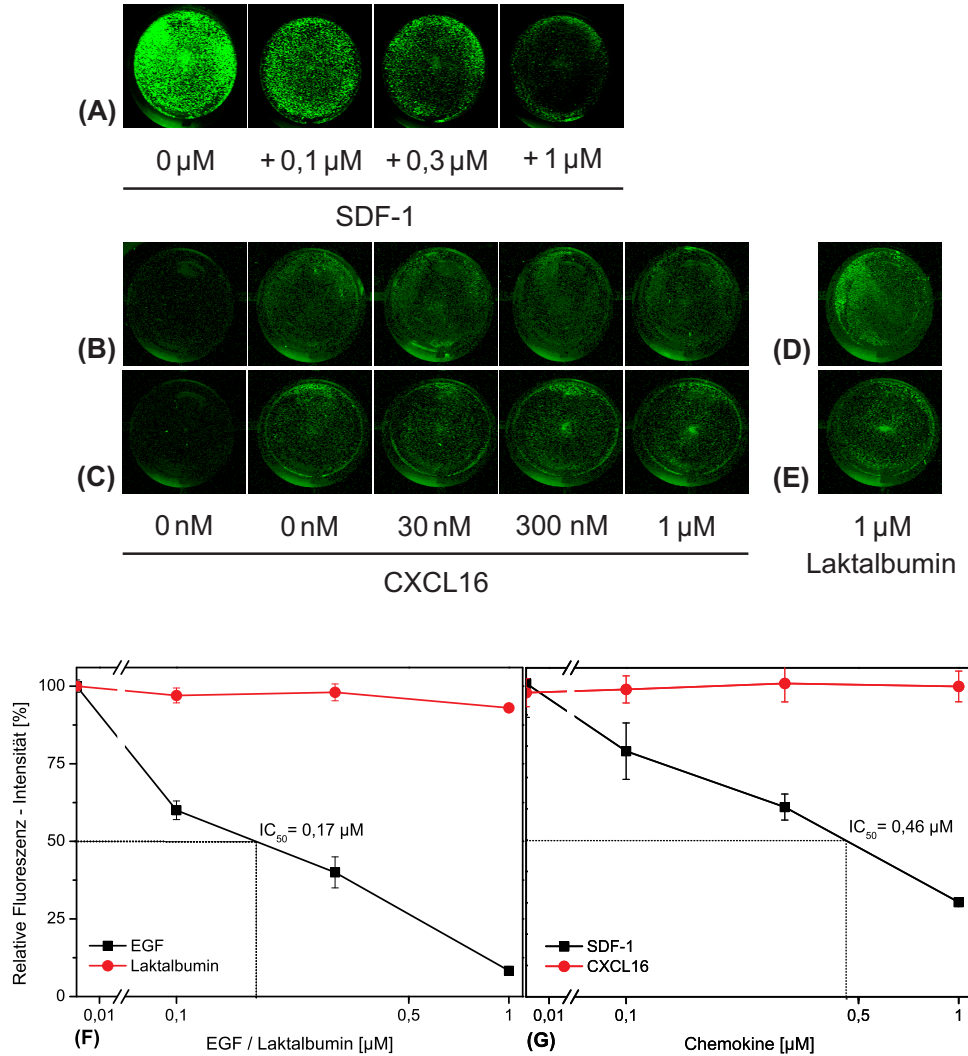


Abbildung 4.22: Kompetitive Verdrängung der Konjugate.

(A) Kompetitive Hemmung der SDF-1-IRDye (0,1 μM) vermittelten Markierung von A764-Gliomazellen (30.000 Zellen pro Well) durch Koinkubation mit steigenden SDF-1-Konzentrationen. Die Verdrängung von SDF-1-IRDye 800 (30 nM) durch ein anderes Chemokin (CXCL16) ist in (B) an U118 und in (C) an HUVE-Zellen gezeigt. Die durch anschließende Quantifizierung der Messdaten erhaltenen Ergebnisse sind für EGF-IRDye 800 (0,1 μM ; Verdrängungsversuch mit EGF sowie Laktalbumin) in (F) und für SDF-1-IRDye in (G) graphisch veranschaulicht. Aufnahmen der Odyssey-Kammer des Verdrängungsversuches von EGF-IRDye 800 durch EGF sind nicht gezeigt. $\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}} (\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$.

4.2.12 Einfluss der Konjugate auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie A 764

Um im Hinblick auf eine spätere diagnostische Anwendung den Einfluss der hergestellten Fluoreszenzkonjugate auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen zu untersuchen, fand analog zum Proliferationstest der Liposomen (siehe Unterpunkt 4.1.4) der CyQuant-Test Anwendung.

Für diesen Versuch wurden die A 764-Gliomazellen über 24 Stunden in serumfreiem Stimulationsmedium mit 1 % BSA unter Zugabe der entsprechenden Fluoreszenzkonjugate kultiviert. Als Positivkontrolle wurde den Zellen Insulin (Endkonzentration: 10 ng/ml) zugegeben. Der Kontrollansatz blieb unbehandelt. Als Negativkontrolle diente der Zusatz des Zellgifts DMSO (4 % und 8 %).

Die Abbildung 4.23 stellt die Messergebnisse des Proliferationstests dar. Es zeigte sich durch die Inkubation mit den Liganden bzw. Antikörpern SDF-1, α Endoglin und EGF

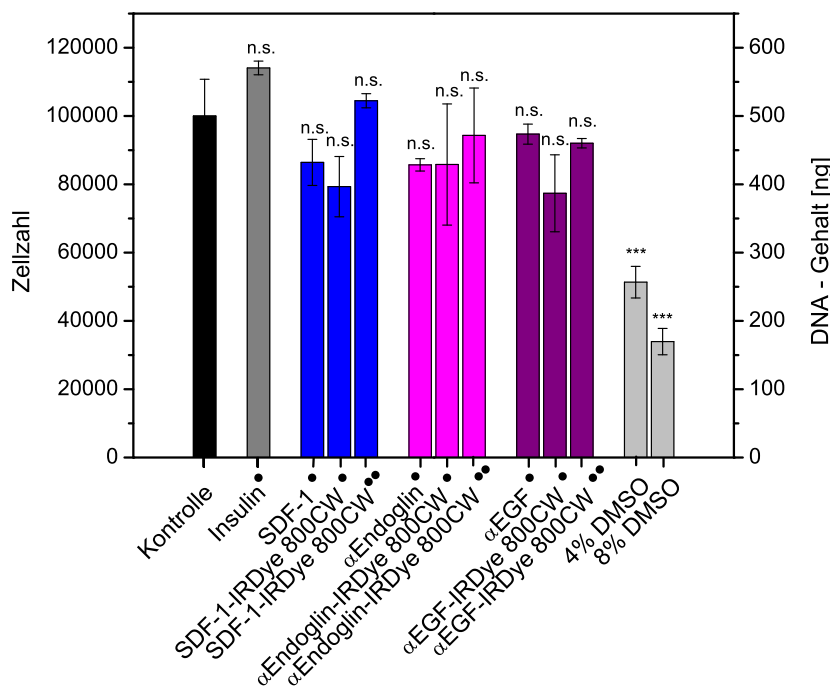


Abbildung 4.23: Einfluss der Konjugate auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie A 764.

Dargestellt ist auf der linken Y-Achse die Zellzahl (unbehandelte Kontrolle = 100.000 Zellen) und auf der rechten Y-Achse der DNA-Gehalt [ng], bestimmt mit Hilfe des CyQuant-Tests. Als Positivkontrolle diente Insulin, als Negativkontrolle DMSO. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden in serumfreiem Stimulationsmedium, die Konzentration der Stimuli betrug *10 ng/ml bzw. **100 ng/ml (n = 3). Ein DNA-Gehalt von 50 ng entspricht 10.000 Zellen. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; n.s. = nicht signifikant bei p > 0,05 jeweils gegenüber der Kontrolle.

nur ein geringfügiger, nicht signifikanter Einfluss auf die Proliferation der Gliomazellen gegenüber der Kontrolle, der bei Inkubation mit dem Wachstumsfaktor EGF am geringsten ausfiel. Die Abnahme der Zellzahl betrug bei SDF-1 und α Endoglin etwa 14 %, bei EGF etwa 5 % in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Durch Inkubation mit dem Konjugat SDF-1 -IRDye 800 nahm die Zellzahl bei der verwendeten Konzentration von 10 ng/ml um 21 % ab, bei der zehnfach höheren Konzentration war dagegen eher ein proliferationsfördernder Effekt zu beobachten (Zunahme der Zellzahl um 4 %). Das Versetzen der Zellen mit dem Konjugat α Endoglin -IRDye 800 (10 ng/ml) sowie mit dem Antikörper selbst führte zu einer Abnahme der Zellzahl um 14 %. Bei der Verwendung der Konjugat-Konzentration von 100 ng/ml zeigte sich eine Abnahme der Zellzahl auf 94 % der Kontrolle. Ein stärkerer, aber nicht signifikanter Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen ließ sich durch die Zugabe von 10 ng/ml EGF -IRDye 800 beobachten. So nahm die Zellzahl um 23 % in Bezug auf unbehandelte Zellen ab. Eine zehnfache Erhöhung dieser Konjugat-Konzentration auf 100 ng/ml konnte die Zellzahl wiederum nur um insgesamt 8 % vermindern.

Eine Inkubation der Gliomazellen mit 4 % DMSO zeigte einen signifikanten Rückgang der Zellen auf die Hälfte der ursprünglichen Zellzahl, 8 % DMSO konnte die Zellzahl um weitere 17 % auf 34 % der Kontrolle reduzieren und zeigte den stärksten Einfluss auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen.

4.2.13 Überprüfung selektiver Zellschädigung durch die Fluoreszenzkonjugate

Um eine selektive Zellschädigung durch die hergestellten Fluoreszenzkonjugate zu untersuchen, wurden verschiedene Konjugate und deren Liganden bzw. Antikörper ausgewählt und auf ein mögliches zytotoxisches Potential an der Gliomazelllinie A764 hin überprüft.

Für die Durchführung dieses Versuches wurden zunächst die Gliomazellen in einer 96-Well Platte ausgesät und nach 24-stündiger Kultivierung das Kulturmedium gegen Stimulationsmedium mit 1 % BSA ausgetauscht. Nach mikroskopischer Beurteilung der Zellen nach Wachstum und Morphologie erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Konjugaten bzw. deren Liganden/Antikörpern in den Konzentrationen 10 ng/ml sowie 100 ng/ml über einen Zeitraum von 24 Stunden. Als Positivkontrolle wurden den Zellen DMSO (4 %) zugegeben; zwei Kontrollansätze blieben unbehandelt. Wie unter Unterpunkt 3.2.8 (Seite 55) detailliert beschrieben, wurde am nächsten Tag der LDH-Test zur

Erfassung eines möglichen zytotoxischen Einflusses durchgeführt. Die Messergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung in der Abbildung 4.24 graphisch dargestellt. Die LDH-Freisetzung der stimulierten Proben als ein Maß ihrer Zellschädigung wurden als Prozent der unbehandelten Kontrolle (0 % Zellschädigung, „Low Control“) und vollständig lysierter Zellen (100 % Zellschädigung, „High Control“) ausgedrückt.

Wie aus der Abbildung 4.24 zu erkennen, konnten bereits durch die Inkubation der Zellen mit den Liganden SDF-1 und EGF sowie mit dem Antikörper α Endoglin eine geringe LDH-Freisetzung korrelierend mit einer Zellschädigung festgestellt werden. So betrug der zytotoxische Effekt des Chemokinliganden SDF-1 9 %, des Wachstumsfaktors EGF 7 % und des Endoglin - Antikörpers 5 % in Bezug auf 100 % lysierte Zellen („High Control“). Die Inkubation der Zellen mit dem Konjugat SDF-1 - IRDye 800 (Konzentration 10 ng/ml)

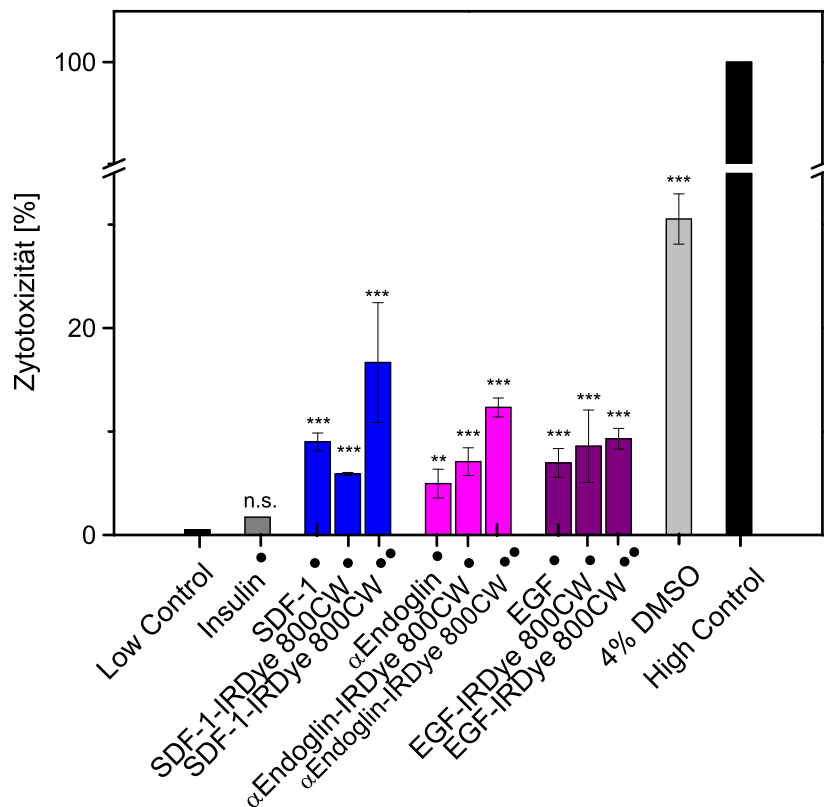


Abbildung 4.24: Überprüfung selektiver Zellschädigung durch Fluoreszenzkonjugate.

Dazu wurde die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium korrelierend mit einer Zellschädigung nach 24-stündiger Inkubation mit den hergestellten Fluoreszenzkonjugaten bestimmt. Dargestellt ist auf der Y - Achse die Zytotoxizität bestimmt mit Hilfe des LDH - Tests. Die unbehandelte Kontrolle („Low Control“) entsprach 0 % Zellschädigung, vollständig lysierte Zellen („High Control“) entsprachen 100 % Zellschädigung. Als Positivkontrolle diente 4% DMSO. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden in serumfreiem Stimulationsmedium, die Konzentration der Stimuli betrug \bullet 10 ng/ml bzw. $\bullet\bullet$ 100 ng/ml (n=3). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; n.s. = nicht signifikant bei p > 0,05 jeweils gegenüber der „Low Control“.

zeigte einen geringeren Einfluss (6 %) auf die Zellen im Vergleich zum Chemokinliganden. Doch führte eine Erhöhung der Konjugatkonzentration auf 100 ng/ml zu einem vermehrten Rückgang gesunder Zellen auf 17 % in Bezug auf die „High Control“.

Nach Inkubation mit 10 ng/ml α Endoglin-IRDye 800 nahm die Schädigung der Zellen um etwa 7 % zu, nach Inkubation mit 100 ng/ml α Endoglin-IRDye 800 um etwa 12 %.

Das Versetzen der Zellen mit 10 ng/ml bzw. mit 100 ng/ml EGF-IRDye 800 ließ einen geringfügigen zytotoxischen Effekt (8,5 % bzw. 9%) feststellen.

Ausschließlich die Inkubation der Zellen mit 4 % DMSO führte zu einer Schädigung von über 50 % der Zellen.

Somit konnte für die untersuchten Fluoreszenzkonjugate anhand des LDH-Tests nur eine verhältnismäßig geringfügige Zellschädigung der A 764-Gliomazellen nachgewiesen werden.

4.2.14 Untersuchungen der durch NIR-Konjugate vermittelten Signaltransduktion

Ferner war es von Interesse zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Fluoreszenzkonjugate eine biologische Aktivität aufzeigen. In der Literatur sind zahlreiche Informationen zu diesem Thema zu finden, wobei bei vielen EGF- bzw. SDF-1-vermittelten Prozessen über die Aktivierung der MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen-Kaskade und die damit verbundene Phosphorylierung des ERK 1/2 (*extracellular regulated kinase*) berichtet wird [84].

Für diese Untersuchungen wurden A 764-Gliomazellen 10, 20 und 40 Minuten mit den Liganden EGF (als Positivkontrolle) und SDF-1 sowie mit den Fluoreszenzkonjugaten EGF-IRDye und SDF-1-IRDye (alle 10 ng/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und der Proteingehalt in den Proben nach der Bradford-Methode bestimmt (siehe Unterkapitel 3.3.2.2). Anschließend wurden die Proteine über SDS-Page aufgetrennt und mittels *Western Blot* unter Verwendung eines anti-pERK-Primärantikörpers analysiert. Abbildung 4.25 stellt das Resultat dar.

Wie aus der Abbildung 4.25 ersichtlich, sind bei der Behandlung der Zellen sowohl für EGF (Positivkontrolle) als auch für das Konjugat EGF-IRDye 800 verstärkte Proteinbanden im Vergleich zu den Kontrollbanden erkennbar, was auf eine Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung des ERK-Proteins hindeutet. Die Intensität dieser Banden sind über den gesamten Zeitraum von 40 Minuten vergleichbar stark ausgeprägt. In den mit SDF-1 behandelten Ansätzen konnte ein vergleichbarer Effekt nach Inkubation

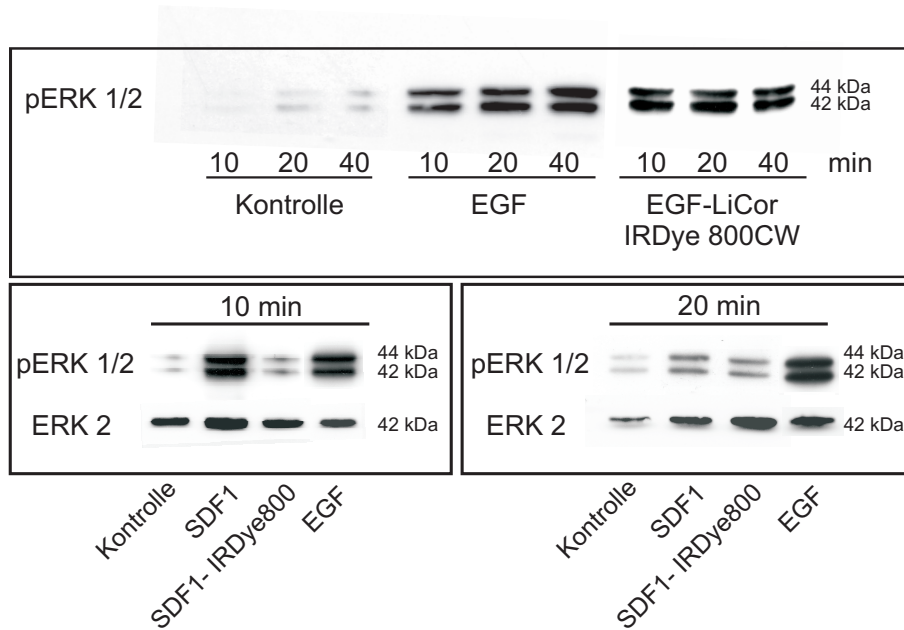


Abbildung 4.25: Phosphorylierung von Kinasen in A 764 - Gliomazellen nach Behandlung mit Fluoreszenzkonjugaten.

Die Detektion des phosphorylierten ERK - Proteins erfolgte mit Hilfe der *Western Blot* Analyse. Die mit EGF behandelten Proben stellten eine Positivkontrolle dar. Die Konzentration der Stimuli betrug 10 ng/ml. Als Kontrollansätze wurden unstimulierte Zellen mitgeführt. Ein anschließender *Reblot* diente als Auftragskontrolle.

von 10 Minuten festgestellt werden, aber nicht mehr nach 20-minütiger Inkubation. Das verwendete Fluoreszenzkonjugat SDF-1 zeigte über den gesamten Zeitraum von 40 Minuten keine biologische Aktivität, was gerade in Hinblick auf eine mögliche diagnostische Therapie von Vorteil sein kann. Ein anschließender *Reblot* diente als Auftragskontrolle, um ein gleichmäßiges Auftragen der Proteinmengen auf die Gele nachzuweisen.

In einem weiteren Versuch wurde vor Stimulation der Zellen die Liganden SDF-1 und EGF mit der Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) umgesetzt. Das Enzym spaltet vom N-terminalen Ende eines Oligo- oder Polypeptids Dipeptide ab, wenn sich an zweiter Position des Aminoterminus bevorzugt Prolin-Reste befinden. Reste mit anderen Aminosäuren wie Alanin, Glycin oder Serin werden mit geringerer Aktivität umgesetzt. Nach Literaturangaben wird vom Chemokin SDF-1 wird das N-terminale Dipeptid abgespalten. Dabei wird es nicht nur inaktiviert, sondern auch in einen Rezeptorantagonisten überführt, der an seine beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 sowie CXCR7 mit hoher Affinität bindet, diesen blockiert und nicht mehr aktiviert [80,83]. EGF spaltet die DPP IV dagegen nicht.

Zu Beginn wurde die Aktivität der DPP IV überprüft. Als Substrat diente eine 100 mM Glycin-Prolin-4-nitranilid-Lösung in DMSO, dessen Umsetzung durch die Serinpeptidase in der Abbildung 4.26 als linearer Anstieg dargestellt ist. Gemessen wurde die Ex-

Initial 0.007A Final 0.577A Slope 0.1165 A/min Linearity (r²) 99.9%
Result 0.1165

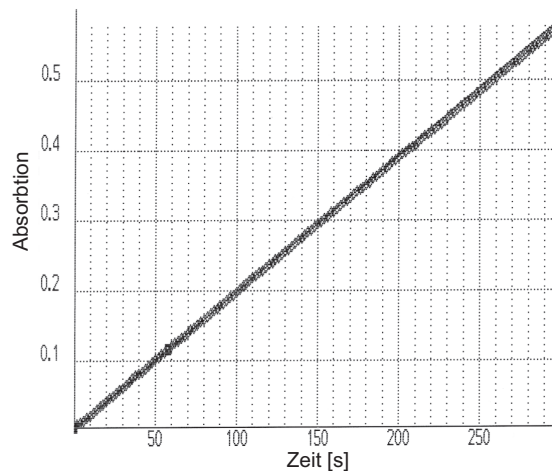


Abbildung 4.26: Aktivitätsbestimmung der Dipeptidylpeptidase IV.

Als Substrat diente eine 100 mM Glycin - Prolin - 4 - nitranylid - Lösung in DMSO, dessen Umsetzung durch die Serinpeptidase im Photometer über einen Zeitraum von fünf Minuten verfolgt wurde ($\lambda = 390 \text{ nm}$).

tinktionsänderung über einen Zeitraum von fünf Minuten im Photometer ($\lambda = 390 \text{ nm}$). Anschließend wurde die Peptide mit DPP IV inkubiert und deren biologische Aktivität über *Western Blot* Analysen analog zu der bereits beschriebenen Vorgehensweise in Unterpunkt 4.2.14, S. 141, untersucht.

In der Abbildung 4.27 sind die Ergebnisse der *Western Blot* Analysen für EGF (A) und SDF-1 (B) nach zehnminütiger Stimulation von A 764 - Zellen zusammenfassend dargestellt.

Während nicht behandeltes SDF-1 die MAP - Kinasen ERK 1/2 phosphorylierte, verlor SDF-1 nach DPP IV Inkubation seine Aktivität (siehe Abbildung 4.27). DPP IV - verkürztes SDF-1 wäre als Konjugat deshalb auch ein Antagonist. Dies wurde allerdings nicht weiter verfolgt, da bereits das SDF-1 - IRDye - Konjugat biologisch inaktiv war. Da EGF nicht von DPP IV gespalten wird, veränderte sich auch nicht dessen biologische Aktivität in diesem Test. Um eine spezifische Bindung des mit DPP IV umgesetzten SDF-1 nachzuweisen, wurde nach der Stimulation mit trunkiertem SDF-1 intaktes Chemokin dem Ansatz hinzugegeben. Es zeigte sich weiterhin keine biologische Aktivität. Dies bedeutet, dass mit DPP IV umgesetztes SDF-1 weiterhin eine hohe Affinität zum alternativen SDF-1 - Rezeptor CXCR7 besitzt, ohne jedoch biologisch aktiv zu sein. Intaktes Chemokin konnte nicht an seinen Rezeptor binden und eine Aktivierung der MAP - Kinase hervorrufen.

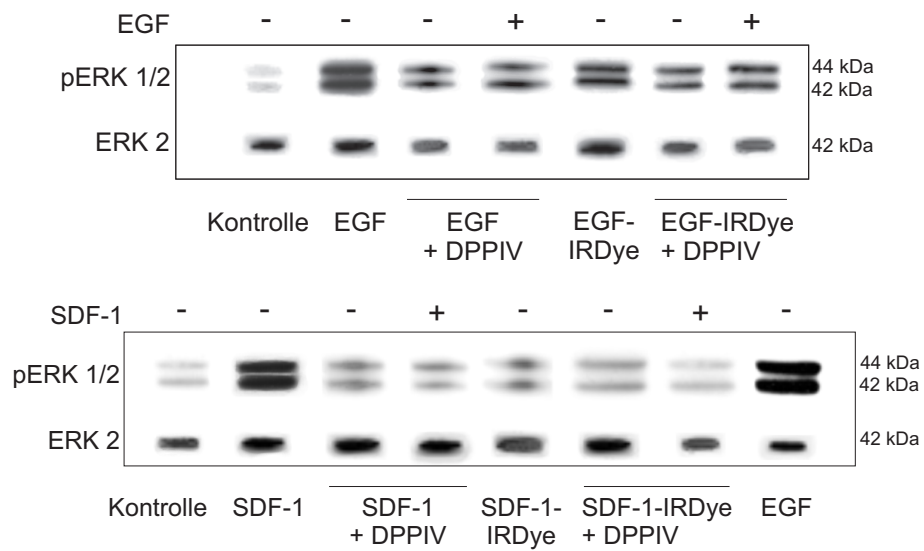


Abbildung 4.27: Einfluss der Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) auf die biologische Aktivität (Phosphorylierung von ERK 1/2 (siehe 4.25)) des EGF und SDF-1 sowie deren Konjugate. Während die DPP IV SDF-1 inaktiviert, bleibt EGF aktiv.

4.3 In - vivo - Versuchsreihe

Anhand dieser In - vivo - Versuchsreihe wurde die Effektivität des Kontrastmittels SDF-1 - IRDye 800 zur frühzeitigen Detektion von Tumoren im Mausmodell (FoxN1 - Mäuse) untersucht. Als Vergleichsmöglichkeit wurde zusätzlich das Kontrastmittel RGD - IRDye 680 injiziert und mitgemessen. Abbildung 4.28 gibt einen Überblick über das Verlaufsschema dieser Tierexperimente.

Die Narkose der Mäuse wurde über peritoneale Injektion von Midazolam (5 mg/kg KG), Fentanyl (0,5 mg/kg KG) und Medetomidin (0,5 mg/kg KG) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Applikation der Tumorzellen über subkutane Injektion von 1 Million Zellen (A764 und MCF7) in die Flanke der Maus (Tag 0). Nach sieben Tagen konnten die Tiere für die folgenden Experimente herangezogen werden. Den Mäusen wurden die Kontrastmittel (SDF-1 - IRDye 800 (0,1 nmol) und RGD - IRDye 680 (2 nmol), jeweils 100 μ l) intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden sie für anschließende bildgebende Untersuchungen in der Fluoreszenzkammer (Pearl Near Infrared System; LiCor Biosciences; Zweidiolenlaser: λ Anregung = 685 nm und 785 nm) erneut in Narkose gelegt.

Um eine Beeinflussung der Fluoreszenzdetektion der Tumorzellen durch eine mögliche Autofluoreszenz, die durch fluoreszierende Bestandteile des Tierfutters (Pheophorbide)

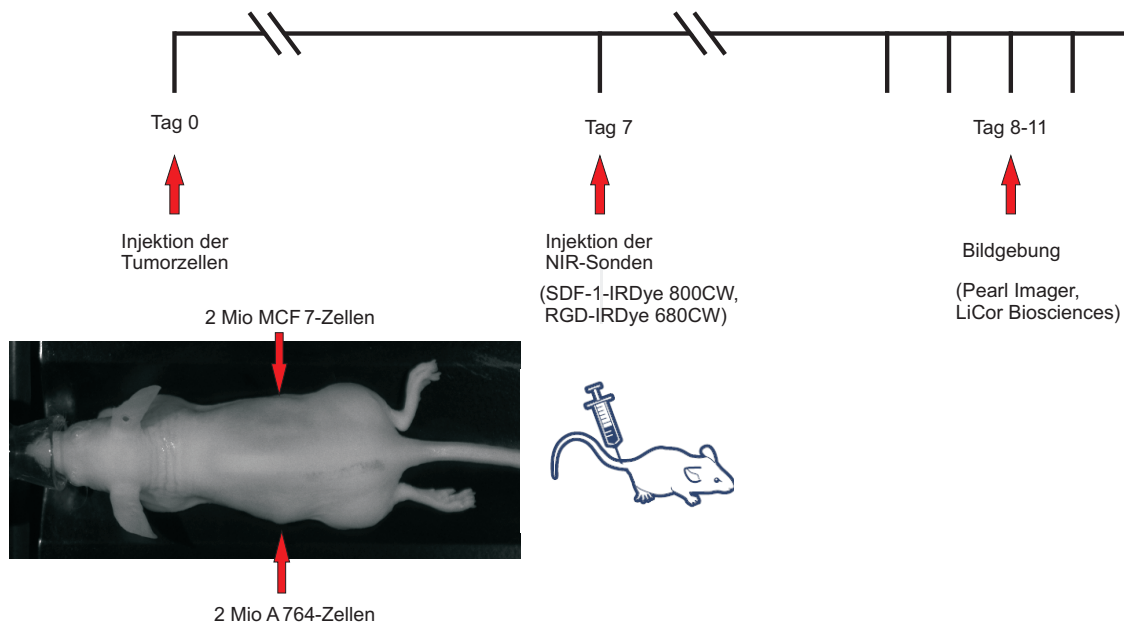


Abbildung 4.28: Verlaufsschema der In - vivo - Versuchsreihen am murinen Tumormodell.

hervorgerufen werden kann, zu untersuchen, wurden einige Pellets der verwendeten Futterart in der Fluoreszenzkammer auf Fluoreszenzerscheinung hin überprüft.

In der Abbildung 4.29 sind die Ergebnisse der Untersuchung auf Autofluoreszenz des Futters dargestellt. Rechts sind die Pellets gezeigt, die bis zum Zeitpunkt dieser Überprüfung gefüttert worden sind und sich durch die relativ hohe Autofluoreszenz als ungeeignet für die optische Bildgebung erwiesen. Links in der Abbildung sind die Pellets gezeigt, die sich durch einen geringen Gehalt an fluoreszierenden Bestandteilen (Pheophorbide) auszeichneten und daher optimal für die Fluoreszenzmessung geeignet waren. Das Futter wurde daher auf niedrig-Pheophorbid-Futter umgestellt. Die Mäuse zeigten vor dem Verabreichen der Kontrastmittel eine relativ hohe Fluoreszenz im Bereich des Gastrointestinaltraktes, was u.a. auf das Pheophorbid-haltige Futter der Tiere zurückzuführen war.

In einem vorangegangenen Tierversuchvorhaben² wurde unkonjugierter IRDye 800 (1 nmol) einer Versuchsmaus über die Schwanzvene injiziert (20 µl) und die Ausscheidung (*clearance*) über einen Zeitraum von 24 Stunden optisch verfolgt (Pearl Imager, LiCor Biosciences). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.30 dargestellt.

Erwartungsgemäß zeigte sich vor der Injektion von IRDye 800 keinerlei Fluoreszenz. Drei Stunden nach Kontrastmittelgabe hatte sich der Fluoreszenzfarbstoff in dem gesamten Tier gut verteilt. Nach 24 Stunden konnte nur noch eine leichte Restfluoreszenz in der Harnblase des Tieres ausgemacht werden. Damit hatte sich eine nahezu vollständige *clearance* des IRDye 800 innerhalb von 24 Stunden gezeigt.

²In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Kalthoff, Molekulare Onkologie, UK-SH

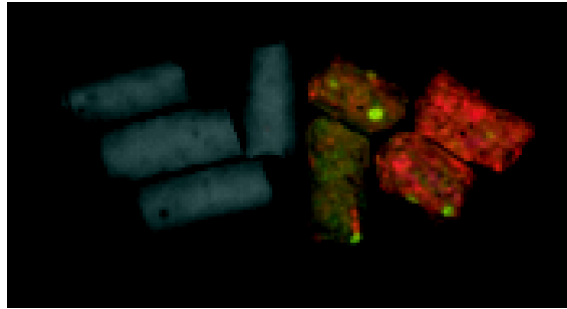
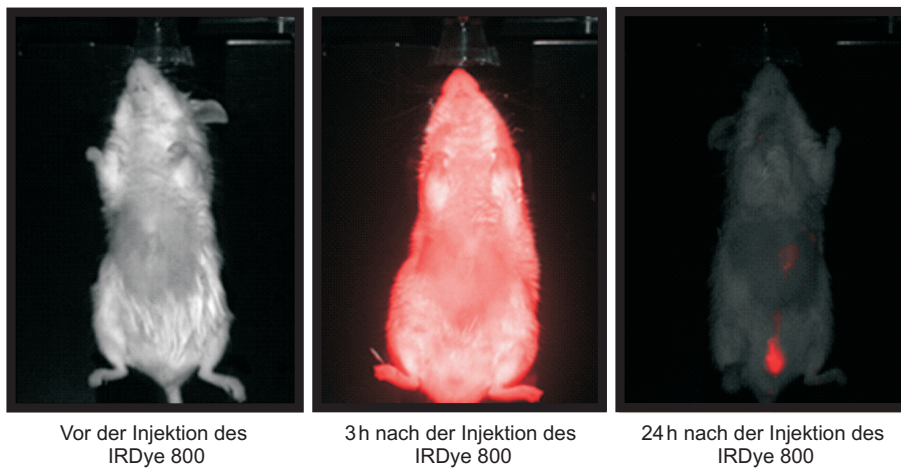


Abbildung 4.29: Pellets der verwendeten Futterarten.

Links mit geringem Anteil, rechts mit einem hohen Gehalt fluoreszierender Bestandteile (*Pheophorbiden*); λ Anregung = 685 nm und 785 nm.



Vor der Injektion des
IRDye 800

3h nach der Injektion des
IRDye 800

24h nach der Injektion des
IRDye 800

Abbildung 4.30: Ausscheidung (*clearance*) von IRDye 800.

Unkonjugierter IRDye 800 (1 nmol) wurde einer gesunden Versuchsmouse injiziert (20 μ l) und über einen Zeitraum von 24 Stunden optisch verfolgt (Pearl Imager, LiCor Biosciences). λ Anregung = 685 nm und 785 nm; λ Emission (IRDye 800) = 789 nm.

4.3.1 In-vivo - Detektion von Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Eintreten der Anästhesie wurde jeweils eine Maus auf eine Detektion der Tumorzellen hin untersucht. Die Untersuchungen wurden nach 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Kontrastmittel-Injektion (SDF-1-IRDye 800; 0,1 nmol; Tag 7) durchgeführt, um eine Markierung der Tumorzellen durch die Konjugate festzustellen und zusätzlich eine eventuelle Entwicklung des Kontrastmittels (Signalstärke) über die Zeit zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.31 dargestellt.

Ein initiales Fluoreszenzsignal der MCF7-Zellen ist bereits nach 24 Stunden nach SDF-1-IRDye 800-Injektion (0,1 nmol) von dorsal (siehe Pfeil-Markierung), jedoch nicht von ventral zu erkennen. Die Gliomazellen konnten dagegen nur von ventral über ein Fluoreszenzsignal ausgemacht werden. Nach 48 Stunden nach Kontrastmittelgabe (9 Tage nach Tumorzellinjektion) konnte ebenfalls eine Markierung der A764-Zellen (dorsal) festgestellt werden, wobei die Fluoreszenzstärke der Gliomazellen die der MCF7-Zellen übertraf. In Rückenlage der Maus konnten ebenfalls sowohl die MCF7- als auch die A764-Zellen detektiert werden. Ab Tag 10 waren weder die MCF7- noch die A764-Zellen der Maus (dorsal) auffindig zu machen. Dagegen jedoch zeigte sich in ventraler Lage der Maus ein deutliches Fluoreszenzsignal für die MCF7-Zellen, dass auch einen Tag später (96 Stunden nach Kontrastmittelinjektion) noch sicher detektiert werden konnte.

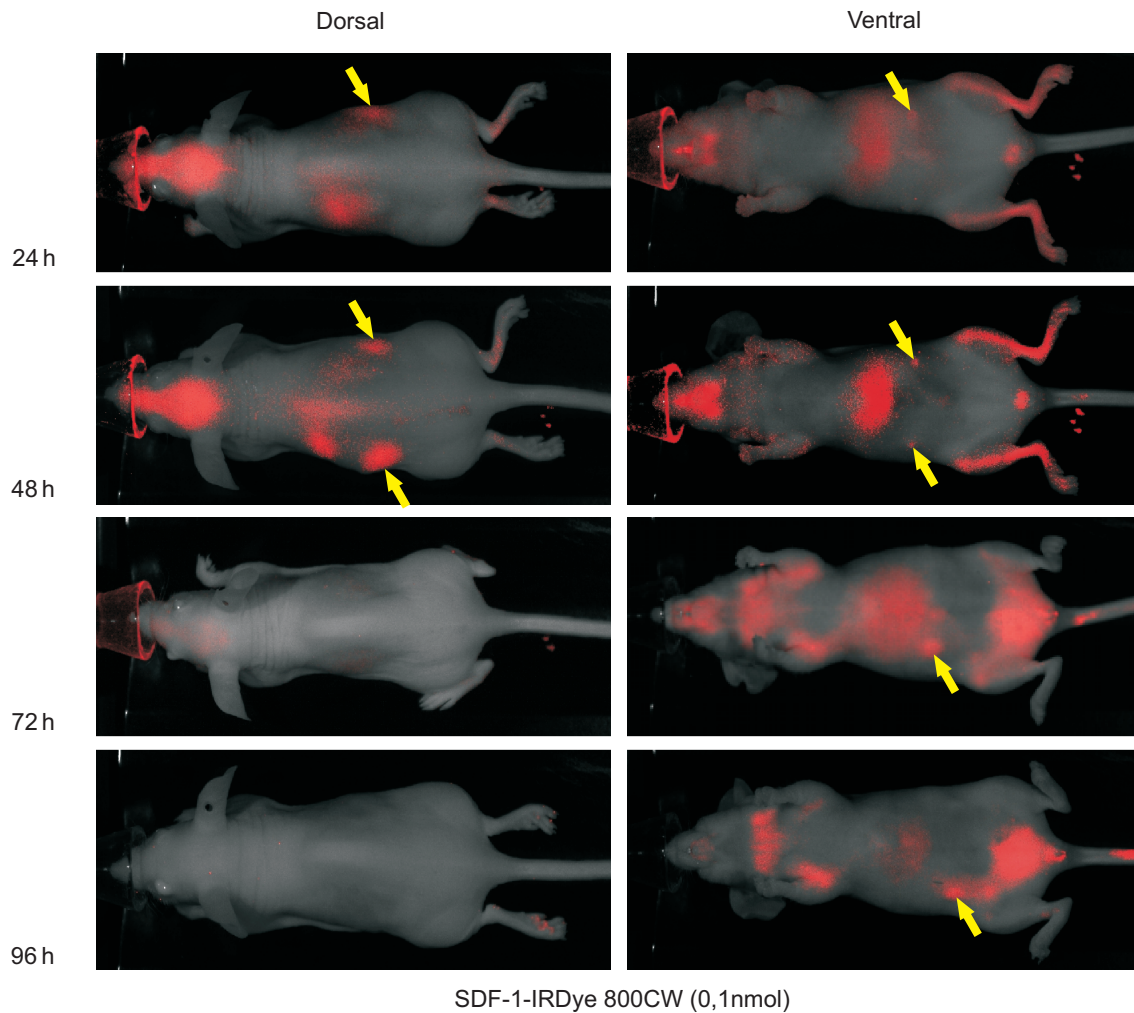


Abbildung 4.31: In-vivo-Detektion von Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zeit.

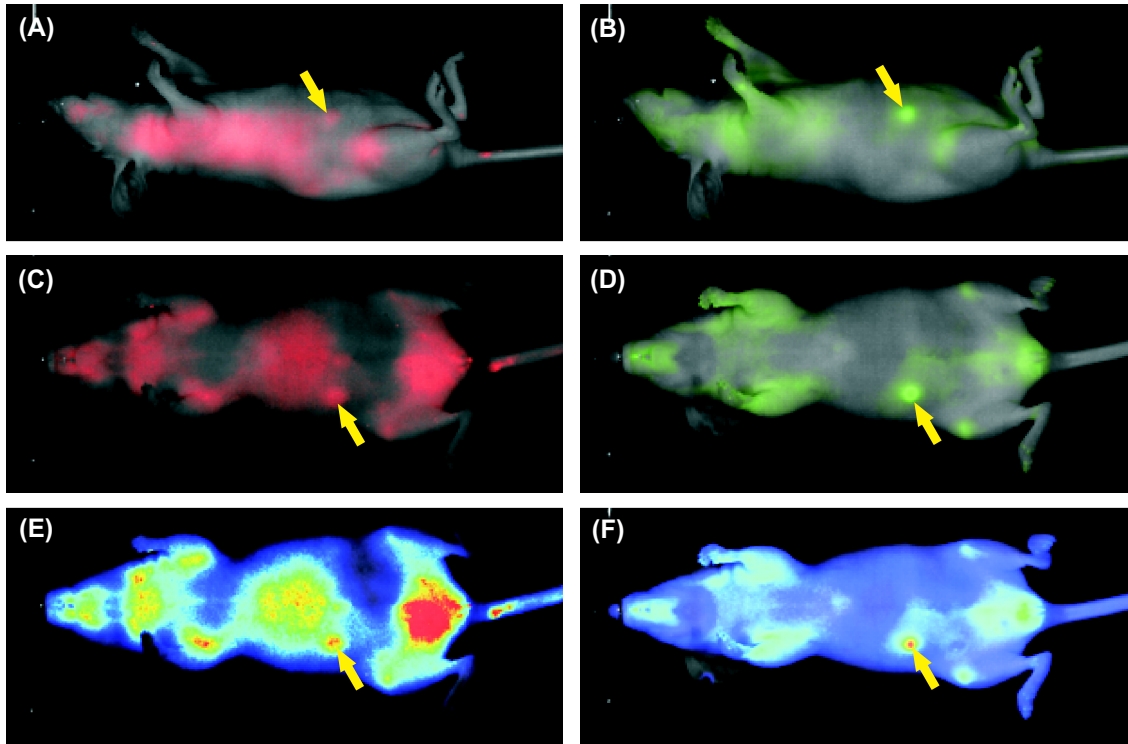
Die MCF7 (rechte Flanke) - und A 764 (linke Flanke) - tragenden FoxN1 - Mäuse wurden nach 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Kontrastmittel - Injektion (SDF-1 - IRDye 800 (0,1 nmol), Tag 7) in Bauch (dorsal) - und Rückenlage (ventral) bildgebend untersucht ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; $\lambda_{\text{Emission}} (\text{IRDye 800}) = 789 \text{ nm}$). Der SDF-1 - markierte Tumor ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

4.3.2 In-vivo - Detektion von Tumorzellen (MCF 7) durch SDF-1 - IRDye 800 im Vergleich zu RGD - IRDye 680

Um anschließend die Sensitivität und Spezifität der Markierung durch NIR-Sonden in vivo zu untersuchen, wurde das Chemokinkonjugat SDF-1 - IRDye 800 mit einem RGD - IRDye 680 - Konjugat an einer MCF 7 - tumortragenden Maus verglichen. Dabei bindet das RGD - Peptid spezifisch an die Integrinrezeptoren der Tumervaskulatur (Endothelzellen). Aufgrund unterschiedlicher Emissionswellenlängen konnten die beiden Cyaninfarbstoffe (IRDye 800 ($\lambda_{\text{Emission}} = 789 \text{ nm}$) und IRDye 680 ($\lambda_{\text{Emission}} = 702 \text{ nm}$)) in vivo unterschieden werden.

Die Fluoreszenzaufnahmen der MCF 7 - Zellen, markiert durch SDF-1 - IRDye 800 ((A) von der Seite; (C) von ventral) und RGD - IRDye 680 ((B) von der Seite; (D) von ventral), sind in der Abbildung 4.32 vergleichend dargestellt (48 Stunden nach Kontrastmittelgabe). (E) und (F) zeigen die entsprechenden Detektionsaufnahmen in Falschfarbendarstellung.

Deutlich ist eine erfolgreiche Markierung der MCF 7 - Tumorzellen sowohl für das Chemokin - als auch für das integrinbindende RGD - Konjugat zu erkennen. Beide konnten an die MCF - Zellen spezifisch binden und eine erfolgreiche Detektion dieser Zellen in der Fluoreszenzkammer ermöglichen. Bei einem Vergleich der Fluoreszenzsignalstärke zeigte sich die durch RGD - vermittelte Markierung aufgrund der 20 - fach höheren Konzentration intensiver. Daher ist bei fortsetzenden In - vivo - Untersuchungen eine entsprechend höhere SDF-1 - Konjugatkonzentration zu wählen und die Markierungsintensität erneut zu messen und zu vergleichen. In der Falschfarbendarstellung war ebenfalls eine sichere Detektion der MCF 7 - Zellen auszumachen. A 764 - Gliomazellen konnten in dieser Maus nicht detektiert werden.



SDF-1-IRDye 800CW (0,1nmol)

RGD-IRDye 680CW (2nmol)

Abbildung 4.32: In-vivo-Detektion von Mammakarzinomzellen (MCF7) durch SDF-1-IRDye 800 im Vergleich zu RGD-IRDye 680 am murinen Tumormodell.

Die MCF7 (rechte Flanke)- und A764 (linke Flanke)-tragenden FoxN1-Mäuse wurden zwei Tage nach der Kontrastmittel-Injektion (SDF-1-IRDye 800 (0,1 nmol); RGD-IRDye 680 (2 nmol); Tag 9) bildgebend untersucht ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; für IRDye 800 (Rot): $\lambda_{\text{Emission}} = 789 \text{ nm}$; für IRDye 680 (Grün): $\lambda_{\text{Emission}} = 702 \text{ nm}$). Die MCF7-Zellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet, A764-Tumor war in dieser Maus nicht zu detektieren.

4.3.3 In-vivo - Detektion von Tumorzellen (MCF 7 und A 764) durch SDF-1 - IRDye 800 im Vergleich zu RGD - IRDye 680

In der Abbildung 4.33 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen von A 764- und MCF7-Zellen in vivo gezeigt, die durch die beiden Kontrastmittel SDF-1-IRDye 800 (rot) und RGD-IRDye 680 (grün) erhalten wurden. Es sind jeweils die vergleichenden Aufnahmen ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm , $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye } 680) = 702 \text{ nm}$) sowie die entsprechenden Aufnahmen in Falschfarbendarstellung dargestellt (48 Stunden nach Kontrastmittelgabe).

Deutlich war eine Fluoreszenzmarkierung sowohl der MCF7- als auch der A 764-Gliomazellen durch das Chemokinkonjugat zu erkennen (A). Dagegen zeigte sich eine Markierung durch das RGD-Konjugat nur bei den vaskularisierten MCF7-Zellen (B). In der Falschfarbendarstellung (C, D) konnten geringe Farbunterschiede besser dargestellt und damit eindeutiger visualisiert werden. Auch hier konnte eine deutliche Markierung beider Tumorzelllinien durch das SDF-1-Konjugat nachgewiesen werden, für das Integrin-Konjugat nur eine Markierung der MCF7-Zellen. Das Ausmaß der Fluoreszenzsignalstärke ist bei RGD-markierten MCF7-Zellen stärker als bei SDF-1-markierten Mammakarzinomzellen, wobei dieses auf die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen zurückzuführen ist (SDF-1-IRDye: 0,1 nmol; RGD-IRDye: 2 nmol). (E) zeigt eine Überlagerung der Aufnahmen von SDF-1-IRDye 800 und RGD-IRDye 680 ($\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye } 800) = 789 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}}(\text{IRDye } 680) = 702 \text{ nm}$). Anhand dieses Versuches konnte eine Markierung sowohl von A 764- als auch von MCF7-Zellen durch das Chemokin-konjugat SDF-1-IRDye 800 nachgewiesen werden. Dagegen war die Detektion durch das RGD-IRDye 680-Konjugat auf die vaskularisierten MCF7-Zellen limitiert. Durch einen Vergleich beider Konjugate zeigten SDF-1-markierte Zellen aufgrund der niedrigeren Konzentration das schwächere Fluoreszenzsignal. Daher ist es sinnvoll, in fortsetzenden In-vivo-Untersuchungen höhere SDF-1-Konzentrationen vergleichend zu verwenden.

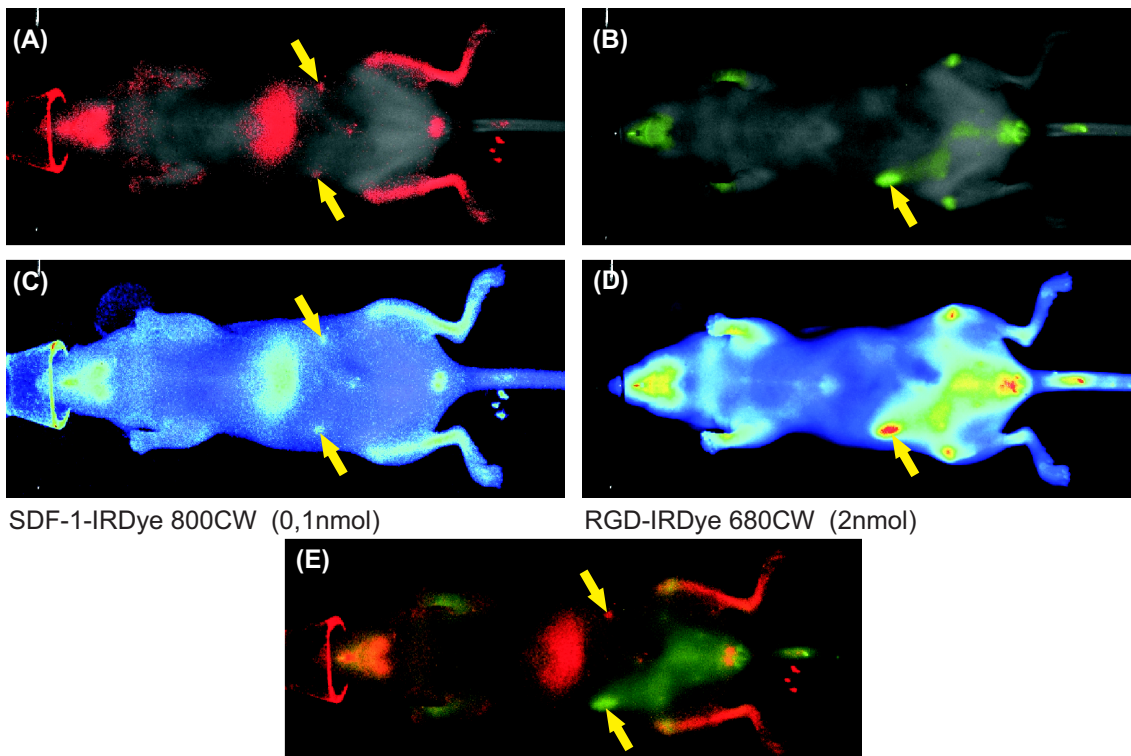


Abbildung 4.33: In-vivo-Detektion von Tumorzellen durch SDF-1-IRDye 800 im Vergleich zu RGD-IRDye 680.

Die MCF7 (rechte Flanke)- und A764 (linke Flanke)-tragenden FoxN1-Mäuse wurden zwei Tage nach der Kontrastmittel-Injektion (SDF-1-IRDye 800 (0,1 nmol); RGD-IRDye 680 (2 nmol); Tag 9) bildgebend untersucht ($\lambda_{\text{Anregung}} = 685 \text{ nm}$ und 785 nm ; für IRDye 800 (Rot): $\lambda_{\text{Emission}} = 789 \text{ nm}$; für IRDye 680 (Grün): $\lambda_{\text{Emission}} = 702 \text{ nm}$). Die MCF7- sowie A764-Zellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

5 Diskussion

Da nach vaskulären Erkrankungen Tumore die zweithäufigste Todesursache aktuell in Deutschland darstellen, werden vermehrt nichtinvasive Bildgebungsverfahren für eine frühzeitige Tumordiagnostik und somit für eine effizientere Behandlung dieser Erkrankung benötigt. Mit Hilfe der molekularen Bildgebung erhofft man sich eine frühere Detektion selbst sehr kleiner Tumore anhand ihrer molekularen Veränderungen, die Ausgangspunkt für eine gezielte Krebstherapie sein können. So könnte eine in vivo detektierbare Überexpression des EGF-Rezeptors Ansatzpunkt für eine maßgeschneiderte Therapie mit entsprechenden Pharmaka sein. Nicht nur die Darstellung erster zellulärer Veränderungen, sondern auch die sensitive Detektion residueller maligner Zellen nach Tumorektomie könnte mit Hilfe des *molecular imaging* möglich sein. Die diffuse Infiltration von verstreuten Tumorzellen in die Tumorumgebung stellt aktuell ein wesentliches Problem bei der chirurgischen Behandlung dieser Tumore dar und ist zugleich der Hauptgrund dafür, dass Tumore nicht vollständig chirurgisch entfernt werden können. Nach radikaler Tumorektomie geht das neue Tumorwachstum von den verbliebenen Tumorzellen aus und führt zu einem erneuten Auftreten der Erkrankung.

Diese Problematik wurde anhand eines In-vivo-Versuches nachgestellt (Abbildung 1.1, Seite 2). Es war nicht möglich, visuell die mit einem Expressionsvektor für DsRed transfizierten Tumorzellen in vivo vollständig zu entfernen. Anhand des erhaltenen Fluoreszenzsignals der residuellen Tumorzellen waren anschließend diese zu identifizieren. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, potente Kontrastmittel/NIR-Sonden zu entwickeln, um Tumorzellen in vitro als auch in vivo zu markieren und aufzufinden.

Die Magnetresonanztomographie sowie fluoreszenzoptische Methoden wurden als geeignete bildgebende Verfahren gewählt und Kontrastmittel für ein unspezifisches (passives) *Drug Targeting* (über MRT) sowie Fluoreszenzsonden im NIR-Bereich für ein spezifisches (aktives) *Targeting* von Tumorzellen entwickelt.

5.1 Passives Drug Targeting mit Eisenoxid-beladenen Liposomen über Magnetresonanz (in vitro)

Eine Möglichkeit des *passiven Targeting* ergibt sich bei der Entwicklung neuer Ansätze in der Tumorthherapie durch die morphologischen Besonderheiten einiger solider Tumore und wird unter dem Begriff „EPR-Effekt“ (*enhanced permeability and retention*-Effekt) zusammengefasst.

In normalem Gewebe sind die Endothelzellen durch intrazelluläre *tight junctions* miteinander verbunden [85]. Während für Makromoleküle/Liposomen daher ein Eindringen in das Gewebe unmöglich ist, können kleine Moleküle wie z.B. Zucker, Botenstoffe oder Ionen die lückenlose Zellschicht durch Diffusion, aktiven oder passiven Transport passieren und in das Gewebe gelangen [86].

Im Vergleich zu normalen Blutgefäßen liegen in der Tumorvaskulatur aufgrund ihres schnelleren Wachstums lückenhafte, unvollkommene Endothelzellschichten vor, so dass Makromoleküle und Liposomen bis zu einer Größe von 400-600 nm über diese Endothellücken in das Tumorgewebe gelangen können [87]. Da dort kein funktionierendes Lymphsystem für den Abtransport eingedrungener Substanzen zur Verfügung steht, erfolgt eine Akkumulation im Tumorgewebe [88]. Dieser Effekt der bevorzugten Anreicherung und erhöhten Verweildauer im Tumorgewebe wird in der Literatur als *EPR-Effekt* beschrieben [89–91] und ist in der Abbildung 5.1 (S. 157) schematisch wiedergegeben.

Durch den Einsatz von Liposomen als Trägersysteme z.B. von antitumoral wirkenden Substanzen (*Caelyx*[®], *Doxil*[®]) macht man sich diesen Effekt in der Tumorthherapie bereits zur selektiven Anreicherung von Wirkstoffen zu Nutze (*passives Targeting*).

Aufgrund der hohen Beladungsmöglichkeit von Liposomen mit Wirkstoffen war die Überlegung, Eisenoxid-Nanopartikel liposomal zu umhüllen und als Kontrastmittel für die kernspintomographische Detektion von Tumorzellen zu verwenden. Im Vergleich zu unverkapseltem Eisenoxid sollte diese Methode in einer höheren intrazellulären Eisenkonzentration resultieren, um damit ein höheres Kontrastverhältnis in den MRT-Aufnahmen zwischen gesundem und malignem Gewebe zu erreichen.

Bei der Kernspintomographie werden als klassische Kontrastmittel Eisenoxid - als auch Gadoliniumverbindungen verwendet. Unspezifische Gadoliniumverbindungen eignen sich gut für die Darstellung von Gefäßstrukturen [16], Ansätze für eine spezifische Kontrastierung bestimmter Kompartimente oder Gewebe sind mit diesen Substanzen jedoch nicht möglich. Daher wurde bereits frühzeitig versucht, auf der Basis von nanopartikulären Eisenoxiden gewebe- oder sogar krankheitsspezifische MR-Kontrastmittel zu ent-

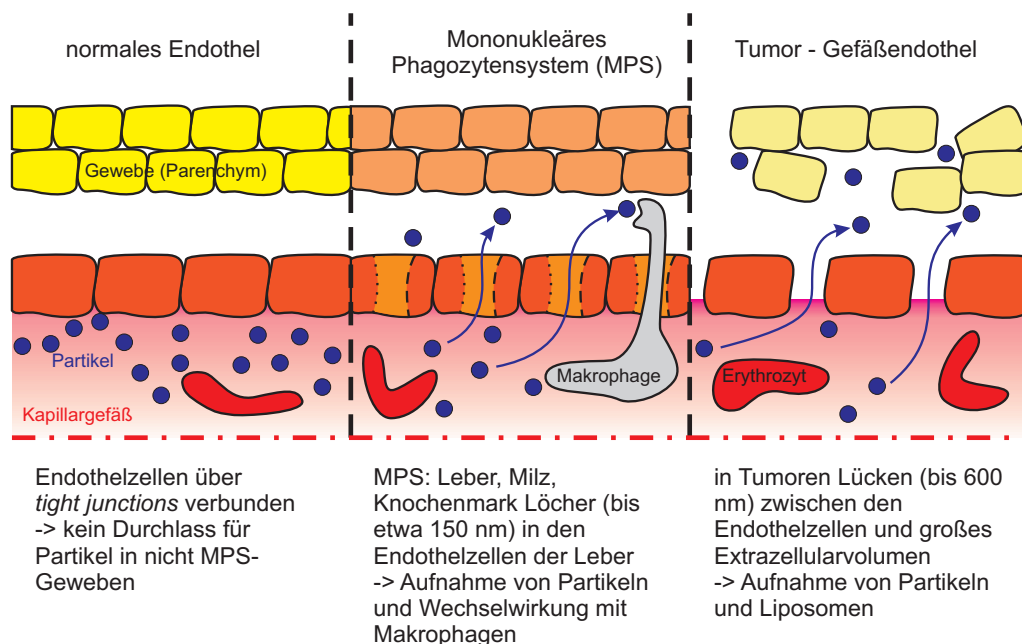


Abbildung 5.1: EPR - Effekt (*enhanced permeability and retention* - Effekt) [92].

wickeln [93–95]. Eisenoxid - Nanopartikel besitzen eine wesentlich stärkere magnetische Wirkung als Gadoliniumverbindungen und lassen sich daher mit Hilfe der MR - Tomographie schon in sehr geringen Konzentrationen nachweisen. Für spezifische Anwendungen, die zumeist mit einer intrazellulären Aufnahme des entsprechenden Kontrastmittels einhergehen [96], bieten Eisenoxid -basierte Substanzen gegenüber gadoliniumhaltigen Verbindungen bezüglich toxikologischer Aspekte den Vorteil, dass das Eisen nach Abbau der Partikel letztendlich in den körpereigenen Eisenpool überführt wird und somit zu keinen toxischen oder funktionellen Beeinträchtigungen führt [97,98]. Dem gegenüber ist eine Freisetzung des giftigen Schwermetalls Gadolinium aus dem Komplex nach möglicher intrazellulärer Aufnahme nicht tolerierbar [16].

Trotz dieser seit langem bekannten Vorteile nanopartikulärer Eisenoxide hinsichtlich spezifischer Anwendungen als Kontrastmittel in der MR - Tomographie konnte sich als klinische Anwendung bislang nur die MR - Diagnostik der Leber durchsetzen. Hierbei werden die Partikel ohne weitere Markierung von Zellen des MPS aufgenommen und führen zur Abgrenzung von intrahepatischem Fremdgewebe ohne phagozytierende Zellen. Für die Erschließung spezifischer Anwendungen für Eisenoxid - Nanopartikel über die Leber hinaus ist es notwendig, das MPS möglichst effizient zu umgehen. Dies wird über eine Reduktion der Größe und/oder Modifizierung der Oberflächenbeschaffenheit der Partikel erreicht [99].

Im Hinblick auf eine Markierung von Tumorzellen muss daher die Größe der Liposomen

so gering wie möglich sein. Andererseits ist aber eine möglichst hohe Beladungsdichte der Liposomen mit Eisenoxid-Nanopartikeln notwendig und erfordert einen Kompromiss zwischen Beladungskapazität und Liposomdurchmesser. Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen wurden mit einem Durchmesser von 100 nm hergestellt und ihre Größe mit Hilfe der Photonenkorrelationspektroskopie bestimmt. Nagayasu et al. [37] untersuchten ebenfalls die Liposomengröße in Hinblick auf ein effektives *Targeting* von Tumoren und auf ihre Beladungsdichte und bestätigten die optimale Größe der Liposomen von 100 nm.

Für die hergestellten und mit Eisenoxid-beladenen Liposomen ergab sich nach Extrusion (Porendurchmesser der Membranen: 200 nm und 100 nm) eine enge Größenverteilung um 101 nm (*Z-Average*) (siehe Abbildung 4.1, S. 106).

Um zusätzlich eine mögliche Aggregation der Liposomen über einen längeren Zeitraum aufzuzeigen und damit eine Aussage über ihre Langzeitstabilität zu treffen, wurde der *Z-Average* über einen Zeitraum von zwei Wochen bestimmt. Auch hier zeigte sich eine enge Größenverteilung von $105 \pm 3,5$ nm über diesen Zeitraum. Damit erwies sich das gewählte Herstellungsverfahren (Extrusion) für die weiteren Versuche als eine sichere Methode für die Synthese von Liposomen einer festgelegten Größe.

Die rasche Erkennung und damit die schnelle Entfernung von Liposomen aus dem Blutkreislauf durch die Zellen des MPS [100], vornehmlich durch Gewebsmakrophagen der Leber (Kupfferzellen) und Milz [101,102], stellt ein großes Problem für deren Anwendung als *Drug-Carrier-Systeme* dar. Die aus diesen physiologischen (Abwehr-) Reaktionen resultierenden kurzen Bluthalbwertszeiten erlauben kein Erreichen ausreichender Wirkstoffspiegel am Zielort.

1987 erzielten Allen und Mitarbeiter durch den Einbau von Gangliosiden in die Liposomenmembran einen zirkulationsverlängernden Effekt [103]. Verantwortlich dafür war das große Volumen, die Hydrophilie und Flexibilität der Zuckerkopfgruppe. Den gleichen Effekt konnten Blume und Clevc [104] durch die Verwendung von PEG-Kopfgruppen beobachten. Konsequenterweise wurde daher die kommerzielle Bezeichnung „*Stealth-*“ Liposomen eingeführt. Die Länge der PEG-Kette hat einen entscheidenden Einfluss auf die Halbwertszeit *in vivo*. Maruyama und Mitarbeiter [105] ermittelten, dass sich für DSPC/Chol-Liposomen, die mit 6 mol% DSPE-PEG modifiziert waren (Molekularmasse der PEG-Kette zwischen 1 und 12 kDa), eine maximale Zirkulationszeit einstellen ließ. Heute haben sich PEG-Lipide mit einer Molekularmasse von 1-5 kDa durchgesetzt [106, 107], wobei die eingesetzte Menge an PEG-Lipid von der Kettenlänge des PEG-Restes abhängt und für die am häufigsten verwendeten Derivate mit einer PEG-

Kettenlänge von 2 kDa (entsprechend 45 Ethylenoxid-Einheiten) mit 5 mol% angegeben wird. Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von PEG-Derivaten gesättigter Phosphatidylethanolamine wie MPEG-DSPE und MPEG-DPPE. Die Derivate bestehen aus einem hydrophilen PEG-Anteil, der für die Entstehung einer flexiblen, hydrophilen Hülle um das Liposom verantwortlich ist. Die Fettsäurereste der Moleküle verankern diese in der Lipidmembran. *Doxil*[®] ist das erste zugelassene Präparat, in dem MPEG-DSPE eingesetzt wird und auch Anwendung für die in dieser Arbeit hergestellten Liposomen fand. Der genaue Mechanismus, der hinter dem Effekt der MPS-Vermeidung steckt, ist nicht eindeutig geklärt [108]. Es wird in der Literatur im Allgemeinen davon ausgegangen, dass die Formation des hoch hydratisierten PEG-Polymerschildds um das Liposom, welches sowohl elektrostatische als auch hydrophobe Interaktionen sterisch unterbindet, für eine Vermeidung der Anlagerung von Plasmakomponenten verantwortlich ist [100, 106, 109, 110]. Daher werden PEG-modifizierte Liposomen auch als sterisch stabilisierte Liposomen bezeichnet.

Weiterhin wird die Stabilität der Liposomen während der Lagerung nach Needham et al. [111] durch den Einsatz von pegylierten Lipiden günstig beeinflusst. Die sterische Abschirmung der liposomalen Oberfläche trägt entscheidend zur Reduktion von Aggregation und Fusion bei und steigert die Stabilität der Vesikel gegenüber chemischen und enzymatischen Abbauprozessen.

Aufgrund dieser Vorteile von pegylierten Liposomen wurden diese neben konventionellen Liposomen hergestellt und miteinander verglichen (Unterkapitel 4.1.1 bis 4.1.4, S. 105-110).

Für konventionelle Liposomen ohne PEG-Zusatz konnte eine enge Größenverteilung ($105 \pm 3,5$ nm) über einen Zeitraum von 12 Tagen nachgewiesen werden. Der in der Literatur beschriebene Effekt, dass Liposomen mit PEG-Zusatz einen geringfügig kleineren Durchmesser aufgrund der sterischen Liposomenhülle und der damit verminderten Aggregation der Liposomen aufweisen [112], konnte nicht bestätigt werden. Die Liposomen mit einem PEG-Zusatz zeigten ebenfalls eine enge Größenverteilung ($104 \pm 2,6$ nm) nach deren Herstellung, die unabhängig vom PEG-Gehalt war. Aufgrund der ermittelten Durchmesser zeigten die konventionellen Liposomen ebenso wie die Liposomen mit PEG-Zusatz keine Agglomeration über einen Zeitraum von zwölf Tagen und erwiesen sich damit als physikalisch-chemisch stabil.

5.2 Zelluläre Aufnahme von Eisenoxid-beladenen Liposomen

Früheren Auffassungen zufolge gelangen Liposomen durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle. Fusogene Eigenschaften kationischer Lipide stützten diese Theorie [40,41]. Neuere Untersuchungen mit modernen mikroskopischen Techniken haben jedoch gezeigt, dass die Hauptaufnahme über Endozytose erfolgt [42–45]. Endozytotisch aufgenommene Partikel wie z.B. Liposomen gelangen ins Endosom und enden oft in Lysosomen [48], in denen sie schließlich enzymatisch abgebaut werden [49].

Die Aufgabe war es, Tumorzellen nach zellulärer Aufnahme von Eisenoxid-beladenen Liposomen im MRT sichtbar zu machen. Dabei sollte über Phagozytose der Liposomen ein höherer intrazellulärer Eisengehalt im Vergleich zu unverkapseltem Eisenoxid erreicht werden, um einen stärkeren Signalkontrast bei MR-Untersuchungen zu erzielen. Dies konnte in den durchgeführten Aufnahmeuntersuchungen auch bestätigt werden. So zeigte sich bereits nach zweistündiger Inkubation die höchste intrazelluläre Eisenkonzentration durch Liposomenaufnahme im Vergleich zur Referenzsubstanz Resovist und unverkapseltem (nativen) Eisenoxid. Durch den Zusatz von Protaminsulfat (Transfektionsreagenz) zu nicht-liposomalen Eisenoxid-Nanopartikeln konnte zwar der Eisengehalt in den Zellen gesteigert werden, erreichte aber über die Inkubationsdauer von zwei Stunden hinaus nicht annähernd das Niveau der Eisenkonzentration, die durch liposomale Inkubation erreicht wurde. Durch fortbestehende Inkubation der Tumorzellen mit den Liposomen konnte die Eisenaufnahme weiter gesteigert werden und selbst nach 24 Stunden war noch keine Sättigung der Zellen zu erkennen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine anhaltende Inkubation der Zellen mit Eisenoxid-beladenen Liposomen zu einer weiteren zellulären Eisenaufnahme führen könnte. Somit kann auch davon ausgegangen werden, dass die Zellen, die mit Liposomen versetzt wurden, aufgrund ihres höheren Eisengehalts auch einen höheren Signalverlust (= Kontrastgewinn) im MRT zeigen.

Um den Effekt der Pegylierung von Liposomen auf Zellen nachzuweisen (= verminderte Aufnahme), wurden mit Eisenoxid-Nanopartikel gefüllte Liposomen mit einem unterschiedlichen PEG-Gehalt (5-15 %) hergestellt und der Eisengehalt nach Inkubation von U 343-Gliomazellen in den Zellen quantitativ bestimmt. Dieser konnte signifikant um mehr als 86 % verringert werden. Somit reduzieren PEG-Zusätze nachweislich die Liposomenaufnahme. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturangaben überein. Als Konsequenz der verminderten zellulären Aufnahme dieser sterisch stabilisierten Liposomen ergibt sich eine höhere Zirkulationsdauer in vivo. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit,

dass sich die Liposomen über Endothelzelllücken im Tumorgewebe anreichern [113]. Eine Erhöhung der PEG-Konzentration auf bis zu 15 % hatte keine weitere verminderte Internalisierung der Liposomen zur Folge. Somit erscheint die Verwendung von Liposomen mit einem höheren PEG-Anteil als 5 % nicht notwendig.

5.3 Physiologische Verträglichkeit von Liposomen

Liposomen sind in der Regel weder toxisch noch immunogen, da deren Hauptkomponenten (Phospholipide und Cholesterol) natürliche Bestandteile biologischer Membranen sind. Anhand von Untersuchungen an Zellkulturen konnte die Auswirkung der Liposomen auf eine mögliche Toxizität und Proliferation der Zellen mit und ohne Einschluss von Eisenoxid-Nanopartikel festgestellt und mit Referenzsubstanzen verglichen werden.

Während Martina et al. keine Einflüsse von Eisenoxid-gefüllten Liposomen auf die Proliferation von Tumorzellen nachweist [114], zeigte sich hier eine geringfügige Abnahme (etwa 10 %) durch unbeladene Liposomen. Mit Eisenoxid-befüllte Liposomen zeigten sogar eine stärkere Beeinflussung des Zellwachstums, die mit nativem Eisenoxid einherging (Zellabnahme etwa 29 % in Bezug auf unbehandelte Zellen) und damit nicht auf die Membranbestandteile der Liposomen zurückzuführen war. Darüber hinaus stellte sich dieser Effekt als unabhängig von der verwendeten Konzentration an Eisenoxid-Liposomen heraus.

Zellschädigende Eigenschaften durch Eisenoxid-beladene Liposomen ($\approx 10\%$) konnten nicht signifikant nachgewiesen werden.

Anhand dieser Ergebnisse konnte eine physiologische Verträglichkeit der unbeladenen Liposomen auf die Tumorzellen nachgewiesen werden, die sich mit bisherigen Beobachtungen in der Literatur weitestgehend deckt. Da sich allerdings ein moderater Einfluss der Eisenoxid-Liposomen auf die Zellproliferation (Abnahme um 29 %) herausstellte, wäre dieses Ergebnis mit weiteren Methoden zu überprüfen. Geeignet hierfür wäre u.a. der etablierte MTT¹-Test, der auf der Messung der Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen beruht.

¹3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

5.4 Detektion von Tumorzellen über Magnetresonanz

Die bislang erfolgreichste Strategie, einen zellulären Kontrast in der Magnetresonanztomographie zu erreichen, liegt in der Markierung von Zellen mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln [115]. Die MRT ermöglicht sowohl im Menschen als auch im Kleintiermodell eine hohe Ortsauflösung (isotrope Auflösung: 0,95 mm bei 3 Tesla), erfordert jedoch eine effiziente magnetische Markierung, um eine ausreichende Spezifität für eine zelluläre bzw. molekulare Bildgebung zu gewährleisten.

Gegenüber der Zelleinbettung in Polyacrylatgel (Darstellung als Zellhaufen) war die effektivste Methode, die Zellen als Monolayer auf Kunststoffmembranen zu kultivieren und mit Eisenoxid-Liposomen zu inkubieren. Neben dieser einfachen Handhabung erzeugten die bereits in Kapitel 3.11.2 (S. 90) beschriebenen Kunststoffmembranen selbst keinen signalvermindernden Effekt und waren damit „unsichtbar“ in den MRT-Aufnahmen.

Als MR-Kontrastmittel verkürzen Eisenoxid-basierte partikuläre Substanzen die T_2 - und T_2^* -Relaxationszeit ihres umgebenden Mediums und sind als „negative“ MR-Kontrastmittel entdeckt und für die MR-Tomographie entwickelt worden. Dieser „Signalverlust“ ist an einer „Schwärzung“ (= Kontraststeigerung) in der MR-Aufnahme zu erkennen.

Nach Kultivierung und Inkubation von steigenden U343-Gliomazellzahlen konnte ein Signalverlust sowohl bei den mit Resovist als auch bei den mit Eisenoxid-beladenen Liposomen versetzten Tumorzellen festgestellt werden. Der Signalverlust war dabei miteinander vergleichbar. Da dieser signalvermindernde Effekt bereits ab einer Zellzahl von 50.000 sicher zu detektieren war, ist eine Markierung geringerer Zellzahlen in weiteren In-vitro-Versuchen zu überprüfen.

Native Fe_3O_4 -Nanopartikel sind für die Markierung von Zellen auf den Membranen ungeeignet. Sie zeigten trotz Abwesenheit von Zellen einen starken Kontrast während der MRT-Untersuchungen (siehe Abbildung 4.7, S. 113). Der Grund dafür ist das Anheften des kolloidalen Eisens an der Membran. In Zellkulturversuchen wäre daher die Visualisierung nicht nur auf intrazelluläres Eisenoxid beschränkt. Liposomales Eisenoxid ergab dagegen keinen Kontrast in Abwesenheit von Zellen und ist damit für MRT-Experimente in vitro geeignet.

In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Detektion der Tumorzellen vom Zelltyp unabhängig war und neben der Gliomazelllinie weitere etablierte Zelllinien wie die Endothelzelllinie HUVEC ebenfalls sicher mittels Eisenoxid-basierten Liposomen markiert werden konnten.

5.5 Optische Bildgebung

Bildgebende Verfahren auf der Basis nicht-ionisierender Strahlung finden zunehmendes wissenschaftliches Interesse. So wurden optische Mammographien mit Wellenlängen im Nahinfrarot-Bereich von Zeiss und Siemens für die klinische Anwendung entwickelt [116,117]. Dabei ist die NIR-Bildgebung ein vielversprechendes Verfahren, das insbesondere für die In-vivo-Diagnostik von oberflächennahen Tumoren in Frage kommt. Durch die Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge können exogene Fluoreszenzmoleküle angeregt und die Energie in Form von Fluoreszenzlicht wieder abgeben werden. Mit Hilfe empfindlicher Kameras und geeigneter optischer Filter kann ein Fluoreszenzbild erzeugt und das maligne Gewebe anhand erhöhter Fluoreszenzintensität detektiert werden [118].

Für die NIR-Bildgebung wird Licht des nahinfraroten Spektralbereichs (700-1000 nm) zur Gewebedifferenzierung verwendet. Während der Spektralbereich des sichtbaren Lichtes (380-780 nm) [6] zur Untersuchung von Gewebeoberflächen (z.B. in der Endoskopie) eingesetzt wird, hat Licht im NIR-Bereich eine größere Eindringtiefe. In diesem Spektralbereich sind die Absorption und die Streuung durch biologisches Gewebe deutlich geringer als im Bereich des sichtbaren Lichtes. Dieses Gebiet der größten optischen Gewebetransparenz wird daher auch als diagnostisches oder optisches Fenster bezeichnet (siehe Abbildung 1.4, Seite 6) und nur ein sehr kleiner Anteil wird als Gewebeeigenfluoreszenz abgestrahlt [119].

Eine deutliche Gewebedifferenzierung und damit eine verbesserte diagnostische Aussagekraft kann bei den bildgebenden Verfahren mit Kontrastmitteln erreicht werden (molekulare Bildgebung), wenn man sich die Eigenschaften der Kontrastmittel, z.B. das Absorptionsvermögen und die anschließende Lichtemission von NIR-Sonden, zu nutze macht. Um einen möglichst hohen Kontrast zu erzielen, ist eine selektive Anreicherung des Farbstoffes im zu untersuchenden Gewebe erforderlich. Erste Anwendungen fand die Fluoreszenzdiagnostik bereits in der Urologie [120]. Inzwischen liegt hier eine klinische Studie zum Nachweis von Harnblasenkarzinomen vor, in der gezeigt wurde, dass mit Hilfe der Fluoreszenzdiagnostik eine höhere Sensitivität als mit konventioneller Weißlicht-Endoskopie erreicht werden kann [121]. Auch beim Nachweis von Karzinomen im Mund- und Rachenraum [122, 123], im Magen-Darm-Trakt [124, 125] sowie von Lungendysplasien und -tumoren [126] kann eine höhere Sensitivität im Vergleich mit bisherigen Diagnostikverfahren erreicht werden. In der Dermatologie ist die Fluoreszenzdiagnostik eine Bereicherung als intraoperative Methode zur Abgrenzung des Tumors von umliegendem

gesunden Gewebe [127, 128]. So erfolgt im Rahmen der photodynamischen Therapie (PDT) eine spezifische Anreicherung von Photosensibilisatoren (u.a. δ -Aminolävulin-säure) im Tumorgewebe, dass anschließend selektiv mit entsprechender Wellenlänge bestrahlt und operativ entfernt wird.

Ein weiteres, vielversprechendes Anwendungsgebiet der NIR-Bildgebung ist die Diagnostik vom Mammakarzinomen. Erste Studien zur Abgrenzung maligner von benignen Tumoren wurden 1993 von Buttner hierzu durchgeführt. Diese Methode bleibt jedoch für den klinischen Alltag zu optimieren [129]. Verbesserte Kontrastunterschiede zwischen gesundem und pathologisch verändertem Gewebe können durch die Anwendung zielgerichteter fluoreszenzmarkierter Sonden erreicht werden. 1997 konnten Riefke und Licha [130] mit dem Einsatz des Cyaninfarbstoffes Indocyaningrün (ICG) ein Signal-Rausch-Verhältnis zwischen Tumor und Normalgewebe von 2,5 erzielen. Dieses Verhältnis konnte durch Modifizierung eines dem ICG ähnlichen Farbstoffs auf 6:1 gesteigert werden. Somit wird die Kontrastmittel-verstärkte Fluoreszenzdiagnostik als ein Verfahren geschätzt, das kleinste Tumore sicher darstellen kann [9, 131]. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind hierfür so gewählt, dass sie ihr Absorptions- sowie Emissionsmaximum im optischen Fenster besitzen. Aufgrund sehr günstiger photophysikalischer Eigenschaften sind die Cyaninfarbstoffe als Kontrastmittel für diagnostische optische Verfahren sehr gut geeignet. Im Gegensatz zu anderen Farbstoffen absorbieren und emittieren sie Licht im optischen Fenster und haben einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten sowie moderate Fluoreszenzquantenausbeuten im NIR-Bereich. Die Fluoreszenzfarbstoffe eignen sich auch deswegen, weil sie über nahezu keine photosensibilisierende Wirkung auf den Organismus verfügen [9]. Ein weiterer Ansatz zur verbesserten Signalgebung für die Erkennung von Tumoren ist die Entwicklung spezifisch bindender Farbstoff-Peptid-Konjugate. Der Vorteil liegt in der hohen Selektivität und Affinität des Peptids zu bestimmten Rezeptoren des Tumors, wobei die Farbstoffe als Signalmoleküle die Detektion der markierten Tumorzellen ermöglichen. Daraus wird eine Anwendung von niedrigeren Kontrastmittel-Dosen und daraus folgend ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis möglich. Es wurden bereits einige Studien zu spezifisch gebundenen Farbstoffen durchgeführt. So gibt es Untersuchungen zu antikörpergebundenen Cyaninen, proteaseaktivierten Farbstoffen und solchen, die über Kopplung an spezifische Analoga an Somatostatin-Rezeptoren binden [130, 132, 133]. Neben der Anwendung zur Tumordetektion werden sich durch die Entwicklung von weiteren spezifischen Farbstoffen erheblich mehr Einsatzmöglichkeiten ergeben. So ist zum Beispiel in der Gelenkdiagnostik an Farbstoffe zu denken, die an spezifische Entzündungszellen koppeln.

In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, geeignete NIR-Fluoreszenzfarbstoffe auszuwählen und an ausgewählte tumorspezifische Liganden bzw. Antikörper zu koppeln, um in vitro als auch in vivo Tumorzellen selektiv detektieren zu können.

Dazu wurden die zur Auswahl stehenden Fluoreszenzfarbstoffe Cy7 und IRDye 800 in Hinblick auf ihre Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit verschiedener Parameter wie der Farbstoffkonzentration und der Zeit untersucht. Zusätzlich wurden beide Cyaninfarbstoffe hinsichtlich ihrer Stabilität und relativen Fluoreszenzintensität miteinander verglichen, wodurch eine Auswahl des besseren Farbstoffes für die weiteren Versuche getroffen werden konnte.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Cyaninfarbstoffen. Der IRDye 800 überzeugte bereits in geringsten Farbstoffkonzentrationen (1 nM) durch eine deutliche Fluoreszenzgebung, die gegenüber dem Cy7 um 35 % erhöht war. Der Cy7 dagegen war in diesem Konzentrationsbereich nicht detektierbar. Erst ab einer Konzentration von 1 μ M zeigte auch der Cy7 ein Fluoreszenzsignal. Steigende IRDye-Konzentrationen bis 50 nM ließen die Fluoreszenzintensitäten bis auf ein Maximum (= 100 %) ansteigen. Eine weitere Erhöhung der IRDye-Konzentrationen führte zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals bis auf Anfangsniveau, das durch die Erscheinung des *self quenching* erklärt werden kann. Trotz steigender Cy7-Konzentrationen erreichte dieser Farbstoff nicht annähernd die Fluoreszenzintensität des IRDye-Farbstoffes (maximal etwa 14 % des IRDye-Maximums). Aufgrund der höheren physiko-chemischen Stabilität und der optimaleren Detektion bei geringeren Farbstoffkonzentrationen wurde der IRDye 800 für die weiteren In-vitro-Versuche ausgewählt.

Schnelles Ausbleichen von fluoreszenzmarkierten Zellen erschwert eine qualitative und quantitative Beurteilung der Markierung. Daher war es sinnvoll, das Zeitfenster zu bestimmen, in dem eine optimale Detektion der markierten Zellen möglich ist.

Analysen der Konzentrationsreihen der Cyaninfarbstoffe zeigten eine linear-fallende Abhängigkeit (18,6 % pro Tag). Danach ist die Fluoreszenzintensität nach fünf Tagen vernachlässigbar klein (etwa 3 % der maximalen Fluoreszenzintensität). Eine Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes innerhalb von drei Tagen ist möglich, da innerhalb dieses Zeitraumes der IRDye eine ausreichende Fluoreszenzintensität aufweist. Eine Anwendung über diesen Zeitpunkt hinaus wurde aufgrund der zeitlichen Instabilität vermieden.

Die anschließende Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten der Cyaninfarbstoffe Cy7 und IRDye in A764-Gliomazellen machte es möglich, diese Farbstoffe auch in vitro miteinander in Bezug auf ihre Markierungseffizienz zu vergleichen. Hier zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Farbstoffen. So war der IRDye

800 dem Cy7 hinsichtlich der intrazellulären Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration überlegen. Bereits bei einer initialen IRDye-Konzentration von 1 nM konnte ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, das bei 0,1 μ M sein Maximum erreichte. Höhere Konzentrationen brachten keine weitere Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität, da die Zellen gesättigt waren.

Die mit Cy7-inkubierten Zellen zeigten erst ab einer Cy7-Konzentration von 0,1 μ M ein erstes Fluoreszenzsignal. Selbst Cy7-Konzentrationen bis 3 μ M erreichten nicht annähernd das Niveau der mit IRDye-inkubierten A764-Zellen.

Bei einem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des Fluoreszenzfarbstoffes IRDye per se oder des Konjugats EGF-IRDye 800 in Zellen zeigte sich bei gleicher Konzentration (0,1 μ M) eine um > 95 % stärkere Fluoreszenz bei Inkubation mit dem Konjugat. Damit konnte für den Fluoreszenzfarbstoff IRDye eine geringe, unspezifische Aufnahme in A764-Zellen nachgewiesen werden, die mit den Herstellerangaben übereinstimmt [134]. Verglichen mit der unspezifischen Cy7-Aufnahme war die des IRDye größer.

5.6 Aktives Targeting über NIR-Sonden

Für die Entwicklung von neuen optischen Kontrastmitteln stehen eine Reihe von verschiedenen Methoden zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist die Kopplung von Farbstoffen an spezifisch-bindende Biomoleküle (z.B. Antikörper oder Peptide), um Tumorzellen über ein rezeptorvermitteltes *Targeting* zu erreichen und zu detektieren. Nicht nur eine Verlängerung der Blutzirkulationszeit allein ist ausschlaggebend für eine optimale Detektion, sondern auch die Interaktion zwischen Kontrastmittel und den Zellen. So wurden bereits einige Studien zu spezifisch gebundenen Farbstoffen durchgeführt. In der Literatur sind Untersuchungen beschrieben zu Antikörper-gebundenen Cyaninen, Protease-aktivierten Farbstoffen und solchen Farbstoffen, die über Kopplung an spezifische Analoga an Somatostatin-Rezeptoren binden [130, 132, 133]. Veiseh et al. [135] konnten 2007 eindrucksvoll sowohl in vitro als auch in vivo die Detektion von kleinen Tumorarealen über ein Chlorotoxin-Cy5.5-Konjugat nachweisen.

Die Verwendung von Peptiden als Liganden weist verschiedene Vorteile gegenüber der von Antikörpern auf [136, 137]. Zu den verschiedenen Limitationen der molekularen Tumor-Bildgebung mit Hilfe von Antikörpern zählen Immunreaktionen des Körpers und zu lange Plasmahalbwertszeiten der Antikörper, die zu einer geringeren Abgrenzung des Tumors vom gesunden Gewebe führen [138]. Desweiteren wird von Transportbarrieren in soliden Tumoren beim Einsatz von Antikörpern berichtet [139]. Die Verwendung und

Konjugation von Fluorophoren an Antikörperfragmente [140] bzw. an kleine Peptide, die als Rezeptorliganden fungieren, ist im Vergleich zu Antikörpern weniger stark eingeschränkt [141] und führt zu optimaleren Ergebnissen. Zu den Vorteilen von Peptiden gehören außerdem deren einfache und meist preiswertere Synthese, deren chemische Modifizierung, die einfache Kopplung an Kontrastmittel, die hohe Affinität in der Rezeptorbindung sowie deren schnellere *clearance* [142, 143]. In eigenen Versuchen konnte die Überlegenheit des Peptid-Konjugats gegenüber dem Antikörper-Konjugat belegt werden. So zeigten die mit dem Peptid-Konjugat versetzten Zellen eine stärkere Fluoreszenzintensität und konnten *in vitro* besser detektiert werden als die mit dem Antikörper-Konjugat inkubierten Gliomazellen. Daher wurden für weitere Versuche ausschließlich Peptide für die Entwicklung von Fluoreszenzkonjugaten verwendet.

Eine der Voraussetzungen für die Verwendung der Cyaninfarbstoffe für die zielgerichtete Detektion der Tumorzellen mit Peptiden ist das Vorhandensein einer funktionellen Gruppe für die Kopplung an das Peptid. Die reaktive Gruppe der verwendeten Cyaninfarbstoffe ist ein N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester). Dieser reagiert mit den primären Aminogruppen von Lysinresten unter Bildung einer Peptidbindung und ist als Methode bereits etabliert [135, 144].

Aber nicht nur die Herstellung der Peptid-Konjugate, sondern vor allem die Aufreinigung konnte durch diese Arbeit weiter optimiert werden. So war die Abtrennung des nicht-gebundenen Farbstoffs zwar über die Micro Spin Säulen im Prinzip möglich (Unterkapitel 4.2.5), aber nur bedingt kontrollierbar. Dagegen stellte die Aufreinigung über die HPLC-Anlage die elegantere Methode dar, über die nicht nur die Konjugation anhand von Chromatogrammen verfolgt und kontrolliert werden konnte, sondern darüber hinaus auch die aufgereinigten Konjugate durch einen angeschlossenen Fraktionssammler aufgefangen wurden. Zusätzlich wurden die einzelnen Fraktionen auf ein Fluoreszenzsignal hin überprüft, wodurch eine weitere Kontrolle der Konjugation gegeben war.

Nach der Optimierung der Herstellungsmethode ist eine weitere Voraussetzung für ein zielgerichtetes *Targeting* die Überexpression von Tumor-spezifischen Rezeptoren [142], anhand derer überhaupt die Wahl der entsprechenden Liganden getroffen werden kann. Tumorzellen exprimieren im Vergleich zu normalen Zellen ein anderes Repertoire an Proteinen und stellen aufgrund ihrer mehr oder weniger klaren Restriktion auf den Tumor einen selektiven Angriffspunkt für eine Detektion bzw. Therapie dar. So kommt es häufig zu einer Überexpression von Onkogenen (z.B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren) in vielen verschiedenen Tumoren, die zu einer autokrinen Wachstumsstimulation des Tumors führen können.

Um ein allgemeines Bild über das Vorkommen tumorspezifischer Rezeptoren und deren Liganden in unterschiedlichen humanen Tumoren zu bekommen, wurden zur Verfügung stehende humane Zelllinien auf die mRNA-Expression ausgewählter Liganden und entsprechenden Rezeptoren hin untersucht. Die aus den folgenden Experimenten erhaltenen Informationen waren nicht nur für die Auswahl der Rezeptoren als mögliche Zielstrukturen der weiteren In-vitro-Versuche notwendig, sondern auch für die Wahl eines geeigneten In-vivo-Modells bedeutsam.

Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors wird in einem Großteil verschiedener solider Tumore überexprimiert. Hendler und Mitarbeiter [145] zeigten bereits 1984 mittels radioaktiv markierter, monoklonaler Antikörper, dass der EGF-Rezeptor in Lungentumoren in hohem Maße exprimiert ist. Es finden sich weitere Überexpressionen in Prostata-, Brust-, Magen-, kolorektalen oder ovarialen Tumoren sowie bei über 90 % der Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich [145]. Der EGF-Rezeptor spielt eine bedeutende Rolle bei Wachstum und Überleben von Tumoren, und nicht selten korrelieren hohe Rezeptordichten mit einem aggressiven klinischen Verlauf der Erkrankung [146, 147]. Zudem finden sich bei diversen hochaggressiven Tumoren durch Mutation veränderte, konstitutiv aktive Formen des EGF-Rezeptors, der auch ohne Ligandenbindung aktiv ist [148, 149].

Es zeigte sich in fast allen untersuchten Zelllinien eine hohe Expression des EGF-Rezeptors, die mit den Literaturangaben übereinstimmt [150–152].

Weiterhin wurde auch die Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren auf mRNA-Ebene untersucht. Die Beobachtung, dass Tumorzellen Chemokinrezeptoren differentiell exprimieren und Chemokine in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen sezerniert werden, legt die Vermutung nahe, dass Chemokinrezeptoren auch eine Rolle für die Migration von Tumorzellen bzw. der Metastasierung zukommt. So bringen Raman et al. [153] das Chemokin SDF-1 über Aktivierung des CXCR4-Rezeptors in Zusammenhang mit Metastasierungsvorgängen und Involvierung in Migrationsabläufe. Neben dem CXCR4 vermittelt SDF-1 auch über den 2005 entdeckten Alternativ-Rezeptor CXCR7 Effekte, der auf Endothelzellen und einigen Tumorzellen exprimiert wird und proliferativ auf das Größenwachstum von Tumoren wirkt [31]. Damit sind die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren und Chemokine direkt in das Tumorwachstum, in angiogenetische Prozesse, Migrations- sowie Invasionsabläufe und in Metastasierungsvorgänge involviert [154] und bilden daher herausragende Angriffspunkte für die optische Bildgebung.

In eigenen Expressionsuntersuchungen konnte für den SDF-1 Rezeptor CXCR4 erwartungsgemäß eine hohe Expression in den Endothelzellen sowie in den Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden. Die Gliomazellen zeigten keine CXCR4-Expression. Eine hohe Expression des alternativen SDF-1 -Rezeptors CXCR7 konnte dagegen in allen drei Gliomazelllinien nachgewiesen werden. Dabei zeigten die U 343 - und A 764 - Zellen die stärkste Expression mit einem ΔC_t -Wert von $< 2,5$. Die HUVE-Zellen exprimierten ebenfalls CXCR7-mRNA. In den Brusttumorzellen sowie in den HT 29-Zellen lag der CXCR7-Rezeptor nach 40 Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion unterhalb der Nachweisgrenze und war nicht detektierbar.

Für weitere bildgebende Versuche wurde die Gliomazelllinie A 764 ausgewählt, da sie sowohl den EGF-Rezeptor als auch den Chemokinrezeptor CXCR7 hoch exprimieren. Damit ergeben sich für ein zielgerichtetes *Targeting* duale Möglichkeiten: Zum einen die Markierung und Detektion der Tumorzellen per se über die auf den Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 und zusätzlich über CXCR7-positive Endothelzellen.

5.7 Markierungsintensität in Abhängigkeit verschiedener Parameter

Ein Qualitätsmerkmal der in dieser Arbeit hergestellten Fluoreszenzkonjugate ist u.a. ihre Selektivität und Sensitivität, Zellen zunächst in vitro zu markieren. Im Vergleich zum kommerziell erworbenen EGF-IRDye 800 bzw. zum EGF-Cy7-Konjugat zeigte sich das selbst hergestellte EGF-IRDye 800 für die Markierung der Zellen am besten geeignet. Erwartungsgemäß nahm die relative Fluoreszenzintensität mit steigender Zellzahl zu. Mit dem Kontrollkonjugat IRDye-Albumin inkubierte Zellen zeigten selbst bei der höchsten Zellzahl keine Fluoreszenz und damit auch keine unspezifische Bindung. Auch bei dem Chemokin-Konjugat SDF-1-IRDye korrelierte die relative Fluoreszenzintensität mit der Zellzahl und ein sicheres Fluoreszenzsignal war in vitro bereits ab einer Zellzahl von 500 sicher auszumachen. Neben der Zellzahl wurde auch der Einfluss der Konjugat-Konzentration auf die Markierungsintensität evaluiert. So konnte eine initiale Detektion der inkubierten Zellen ab einer Konzentration von 10 nM für das Chemokin- und 30 nM für das EGF-Konjugat nachgewiesen werden. Für das Kontroll-Konjugat BSA-IRDye konnte unabhängig von seiner Konzentration (1 nM bis 1 μ M) keine Bindung und Markierung der Zellen festgestellt werden.

Da für eine sichere Detektion der Zellen eine Konzentration von 0,1 μ M ausreichend war,

wurde diese Konzentration in weiterführenden In-vitro-Versuchen eingesetzt.

In Literaturangaben werden ähnliche Konjugatkonzentrationen verwendet [155,156]. So konnten Kovar und Mitarbeiter [134] schon ab EGF-IRDye-Konzentrationen von 1 nM signifikante Fluoreszenzsignale beobachten, die mit steigender Konzentration, vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit, zunahm. Dennoch sind deren Ergebnisse nur mit Vorbehalt mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten zu vergleichen, da die Zellzahl bei Kovar nicht angegeben wurde. Ein aussagekräftiger Vergleich ist aber nur unter identischen Versuchsbedingungen sinnvoll. Auch war eine Sättigung der Zellen bei Kovar et al. nicht zu erkennen, da dort die maximale verwendete Konzentration 100 nM betrug. Nach eigenen Ergebnissen konnte eine Sättigung der Zellen erst ab einer Konzentrationen von 1 μ M erreicht werden.

Um zu entscheiden, wie lange Zellen mit der ermittelten Konjugatkonzentration von 0,1 μ M inkubiert werden müssen, um eine optimale Markierung der Zellen zu erhalten, wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit unterschiedlicher Inkubationszeiten näher untersucht. Eine Fluoreszenzmarkierung der Zellen war bereits sowohl mit EGF- als auch mit SDF-1-IRDye ab einer Inkubationsdauer von zehn Minuten deutlich auszumachen. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm die relative Fluoreszenzintensität der Zellen für beide Konjugate zu. Dabei ließ sich für mit EGF-IRDye inkubierte Zellen ein linearer Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachten, welches nach einer vierstündigen Inkubation die obere Nachweisgrenze der Odyssey-Kammer nahezu überstieg. Die Fluoreszenzintensität für SDF-1-IRDye inkubierte Zellen nahm exponentiell zu. Obwohl anhand dieser Ergebnisse eine Fluoreszenzmarkierung der Zellen schon nach einer Inkubationsdauer von zehn Minuten nachgewiesen werden konnte, wurde eine optimale Inkubationszeit von einer Stunde für die In-vitro-Versuche ausgewählt. Kovar et al. [119] wählten für ihre Versuche eine Inkubationszeit von zwei Minuten aus, wodurch die Effektivität der Markierung durch das Konjugat unterstrichen wird.

Um die spezifische Bindung der Fluoreszenzkonjugate zu überprüfen, wurden die Tumorzellen gleichzeitig mit dem Konjugat sowie einem unkonjugierten Liganden inkubiert. Da beide um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, kommt es durch steigende Konzentrationen an ungelabelten Liganden zu einer kompetitiven Verdrängung und Abnahme der Konjugatbindung an den Rezeptor, was über eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensitäten verfolgt werden kann. Eine spezifische Bindung konnte sowohl für das Chemokinkonjugat als auch für das EGF-Konjugat bestätigt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kovar et al [119]. Nach Bestimmung und Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten konnte die Konzentration an freiem Ligand bestimmt

werden, die benötigt wurde, um 50 % des Konjugats aus der Bindung zu verdrängen (IC_{50} -Wert). So waren für die Verdrängung von 50 % SDF-1-IRDye aus der Rezeptorbindung ($IC_{50} = 0,46 \mu\text{M}$) 2,7-fache Konzentrationen an freiem Liganden im Vergleich zum EGF-IRDye-Konjugat ($IC_{50} = 0,17 \mu\text{M}$) erforderlich.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit SDF-1-IRDye und einem anderen unkonjugierten Chemokin derselben Subfamilie (CXCL16) inkubiert. Hier konnte keine Fluoreszenzabnahme festgestellt werden, sondern eine konstant bleibende Markierungsintensität der Zellen, die unabhängig von der CXCL16-Konzentration war. Offensichtlich konkurrieren CXCL16 und SDF-1 nicht um die gleiche Bindungsstelle bzw. um den gleichen Rezeptortyp (CXCR7), so dass eine Bindung des Konjugats an diesen Chemokinrezeptor weiterhin erfolgen konnte.

Anhand dieser durchgeführten In-vitro-Versuche konnte die hohe Selektivität und Spezifität der verwendeten Konjugate nachgewiesen werden, wobei das Chemokinkonjugat gegenüber dem EGF-Konjugat in Bezug auf die Markierungseffizienz von Tumorzellen deutlich überlegen war. So konnte das SDF-1-IRDye-Konjugat weniger Zellen detektieren (500 statt 5000 Zellen) und benötigte dazu außerdem geringere Konzentrationen (10 nM statt 30 nM). In Hinblick auf die Inkubationszeit, die benötigt wird, um Tumorzellen sicher markieren zu können, waren beide Fluoreszenzkonjugate gleich gut. Ebenso konnte für beide Konjugate eine spezifische Bindung an den entsprechenden Rezeptor gezeigt werden, die durch das gleichzeitige Inkubieren der Zellen mit entsprechenden unmarkierten Liganden konzentrationsabhängig vermindert bzw. verhindert werden konnte.

Eine effiziente Markierung der Zellen durch SDF-1-sowie EGF-Cy3-Konjugate konnte auch über immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Dabei gaben diese Färbungen Aufschluss über das Fluoreszenzsignal jeder einzelnen Zelle per se sowie darüber, dass auch jede einzelne Zelle im Zellverband markiert werden konnte.

5.8 Biokompatibilität der NIR-Fluoreszenzsonden

Neben möglichst optimalen Eigenschaften in Bezug auf Spezifität, (Photo-) Stabilität, hohe Gewebepenetration und Quantenausbeute sollten sich optische NIR-Sonden gerade im Hinblick auf eine mögliche diagnostische Anwendung durch eine gute biologische Verträglichkeit auszeichnen. Die Überprüfung auf Zytotoxizität und Einfluss auf das Proliferationsverhalten der optischen Kontrastmittel wurden daher am Zellkulturmodell überprüft.

Es zeigte sich durch die Inkubation mit den ungelabelten Liganden SDF-1 und EGF eine geringe Abnahme der Proliferation der Gliomazellen. Der proliferationsfördernde Effekt, der von dem SDF-1 ausgehen soll [25, 31], konnte nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass über die Aktivierung des CXCR4 das Tumorstadium angeregt wird. Da aber in den Gliomazellen A764 keine CXCR4-mRNA amplifiziert werden konnte (Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, Unterkapitel 4.2.6, S. 124), sondern die Konjugat-Bindung ausschließlich über den alternativen SDF-1-Rezeptor CXCR7 erfolgte, kann dies der Grund für das Ausbleiben der Zellproliferation sein. Die Aktivierung und Effekte von CXCR7 sind in der Literatur wenig beschrieben.

Durch Inkubation mit dem Chemokinkonjugat konnte eine Abnahme des Zellwachstums (10 ng/ml) beobachtet werden. Bei der zehnfachen SDF-1-IRDye-Konzentration ließ sich ein vernachlässigbarer Anstieg der Proliferation nachweisen (Zunahme der Zellzahl um 4 %). EGF-IRDye 800 bewirkte eine stärkere Abnahme des Zellwachstums (23 % bei 10 ng/ml). Eine zehnfache Konzentrationserhöhung verminderte diesen Effekt, ohne ihn aufheben zu können. Auch die Überprüfung der NIR-Sonden auf ein mögliches zytotoxisches Potential ergab nur eine geringe Beeinflussung der Vitalität der Zellen. Ausschließlich die Inkubation der Zellen mit 4 % DMSO (Zellgift) führte zu einer erwarteten Schädigung von über 50 % der Zellen.

Zusammenfassend konnten geringe toxische Effekte für beide Fluoreszenzkonjugate innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden festgestellt werden. Auch die Beeinflussung der Zellproliferation durch die hergestellten NIR-Konjugate war gering. Eine Überprüfung über diesen Zeitraum hinaus sollte dennoch in weiterführenden Versuchen erfolgen.

5.9 Untersuchungen der durch NIR-Konjugate vermittelten Signaltransduktion

Ferner war es von Interesse zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Fluoreszenzkonjugate eine biologische Aktivität in CXCR7-exprimierenden Zellen aufzeigen. In der Literatur findet man zahlreiche Informationen zu diesem Thema, wobei bei vielen EGF bzw. SDF-1-vermittelten Prozessen über die Aktivierung der MAPK-Kaskade und die damit verbundene Phosphorylierung des ERK 1/2 berichtet wird [84]. Obwohl das Experiment nicht das bildgebende Wirkungspotential der beiden Fluoreszenzkonjugate untersucht, zeigt das Ergebnis, dass die synthetisierten NIR-Sonden in der Lage sind, an den spezifischen Rezeptor zu binden und eine Zellantwort hervorzurufen.

Die Ergebnisse zeigten für natives SDF-1 eine Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR7 und damit seine biologische Aktivität, dass anhand einer Phosphorylierung des ERK 1/2 nach zehnmütiger Stimulation festgestellt werden konnte. Nach einer Stimulation über 20 Minuten war dagegen keine Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade zu beobachten. Interessanterweise zeigte das Chemokin-Konjugat weder nach zehn noch nach 20 Minuten eine Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges in den Gliomazellen und war damit biologisch inaktiv.

Sowohl natives EGF als auch die entsprechenden EGF-IRDye-Konjugate wiesen dagegen über den gesamten untersuchten Zeitraum von 40 Minuten eine Aktivierung des Signaltransduktionsweges auf.

Um von den Peptiden ausgehende chemotaktische Effekte nach erfolgreicher Bindung an die entsprechenden Rezeptoren zu verhindern, wurden die Peptide vor der Konjugation mit dem Cyaninfarbstoff mit der Serinpeptidase DPP IV/CD26 umgesetzt. Nach Mentlein et al. [80] dienen regulatorische Peptide mit bestimmten Strukturmerkmalen bzw. Sequenzvoraussetzungen als Substrate für die DPP IV, wodurch SDF-1 nicht nur inaktiviert, sondern darüber hinaus in einen Rezeptorantagonisten überführt wird, der zwar an seinen Rezeptor weiterhin bindet, aber ihn nicht mehr aktivieren kann [83]. So zeigte nach enzymatischer Umsetzung trunkiertes SDF-1 ebenso wie auch dessen IRDye-Konjugat keine biologische Aktivität, dass gerade in Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung von Vorteil ist. Mit DPP IV umgesetztes EGF war (auch als Konjugat) weiterhin unverändert biologisch aktiv. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Fehlen der potentiellen Schnittstelle für DPP IV.

5.10 In-vivo-Detektion von subkutanen Tumoren über NIR-Sonden am murinen Modell

Nachdem die in dieser Arbeit hergestellten NIR-Sonden in Bezug auf Spezifität, Sensitivität, zytotoxisches Potential und biologische Aktivität anhand von In-vitro-Versuchen näher charakterisiert worden waren und sich besonders das Chemokinkonjugat SDF-1-IRDye 800 als vielversprechend erwiesen hatte, wurde anschließend ein geeignetes Tiermodell ausgewählt und das In-vivo-Verhalten des optischen Kontrastmittels untersucht².

Eine Voraussetzung für die Erzielung einer hohen Nachweisempfindlichkeit nach intravenöser Gabe von Fluoreszenzkonjugaten ist eine möglichst untergrundfreie Messung der Kontrastmittelfluoreszenz. Diese kann durch eine schnelle *clearance* oder über vorherige Abtrennung des ungelabelten Fluoreszenzfarbstoffes nach erfolgter Konjugation erreicht werden. Prinzipiell besitzt auch Gewebe eine Eigenfluoreszenz, die im Spektralbereich des Nahinfrarotlichtes jedoch vergleichsweise gering ist. Um den Fluoreszenzuntergrund im NIR-Spektralbereich noch weiter zu senken, wurde zusätzlich die Fluoreszenz des Tierfutters untersucht. Dabei ergab sich aufgrund fluoreszierender Bestandteile im Futter (Pheophorbide) eine relativ hohe Eigenfluoreszenz, die für die optische Bildgebung ungeeignet ist. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde auf niedrig-Pheophorbid-Futter umgestellt.

In einem vorangegangenen Tierversuchsvorhaben wurde die *clearance* des ungelabelten Fluoreszenzfarbstoffes (1 nmol) an einer gesunden Versuchsmaus untersucht und bestimmt. So zeigte sich vor der Injektion erwartungsgemäß keinerlei Fluoreszenz und drei Stunden post injectionem hatte sich der IRDye 800 in dem gesamten Tier gut verteilt. Nach 24 Stunden konnte nur noch eine leichte Restfluoreszenz in der Harnblase des Tieres ausgemacht werden. Damit hatte sich eine nahezu vollständige *clearance* des IRDye 800 innerhalb von 24 Stunden gezeigt.

Für die In-vivo-Versuchsreihe dieser Arbeit wurde ein subkutanes Tumormodell an der Maus ausgewählt. Dieses ermöglicht aufgrund der oberflächennahen Lage des Tumors und der damit geringeren Gewebe-Penetration des Fluoreszenzlichts eine sichere Detektion der markierten Tumorzellen. Desweiteren stellt dieses Modell eine bereits etablierte Methode dar und wird in der Literatur zahlreich verwendet [157–159]. Die Ergebnisse der Expressionstudien dieser Arbeit ergaben eine Überexpression des EGF- sowie des Che-

²In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Kalthoff, Molekulare Onkologie, UK-SH

mokinrezeptors CXCR4 für MCF7-Zellen sowie für A764-Zellen eine Überexpression des EGF- sowie des alternativ SDF-1-Rezeptors CXCR7 auf mRNA-Ebene. Zusätzlich wurden anhand von fluoreszenzmikroskopischen Anfärbungen die CXCR7- sowie EGF-Rezeptoren der MCF7- sowie der A764-Zellen durch die NIR-Konjugate optisch dargestellt, woraufhin diese Zelllinien für das murine Tumormodell ausgewählt worden sind.

Nach subkutaner Injektion von A764-Gliomazellen (1 Mio Zellen; linke Flanke) und der MCF7-Zellen (1 Mio Zellen; rechte Flanke) konnten die Tiere nach sieben Tagen für die weiteren Untersuchungen herangezogen werden. Den Mäusen wurde das SDF-1-IRDye 800-Konjugat (0,1 nmol) intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert und an den Tagen 7 bis 10 für anschließende bildgebende Untersuchungen in der Fluoreszenzkammer (*Pearl Near Infrared System; LiCor Biosciences*) in Narkose gelegt.

Das Chemokinkonjugat SDF-1-IRDye 800 hatte sich nach der Injektion zunächst schnell über den gesamten Körper verteilt und wurde anschließend renal ausgeschieden. Eine ähnliche Verteilung mit schneller renaler *clearance* wurde mit einem radioaktiv markierten SDF-1-Konjugat (⁹⁹Tc) von Misra et al. ermittelt [160]. So wurde nach intravenöser Injektion des Chemokinkonjugats die Halbwertszeit mit fast 26 Minuten angegeben. Nach zwei Stunden post injectionem waren 74 % der initialen Kontrastmitteldosis bereits ausgeschieden, restliche 26 % verblieben im Knochengewebe. SDF-1 zeichnet sich durch eine zusätzliche selektive Bindung an strahlungssensitive Gewebestrukturen mit positiver CXCR4-Expression wie z.B. hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark aus [161]. Auch in den eigenen Fluoreszenzaufnahmen konnte eine intensive Fluoreszenzfärbung in den Hinterbeinen der Tiere beobachtet werden. Vorteil dieser zielgerichteten Markierung des Knochenmarks durch das Fluoreszenzkonjugat SDF-1-IRDye war jedoch im Gegensatz zum radioaktiv markierten SDF-1-Konjugat das Ausbleiben jeglicher Strahlenbelastung für den Organismus.

Bereits eine Stunde nach Kontrastmittelgabe ließen sich spezifisch sowohl die MCF7-Zellen, die A764-Zellen und das Knochenmark der Hinterbeine der tumortragenden Mäuse als auch unspezifisch Leber und Gehirn durch das NIR-Konjugat SDF-1 markieren und detektieren. Nach 24 Stunden hatte sich der Fluoreszenzuntergrund des gesunden Gewebes minimiert und die beiden Tumore waren eindeutig über ein Fluoreszenzsignal zu erkennen.

Kovar et al. [119, 134] untersuchten die Ausscheidungskinetik eines EGF-IRDye 800-Konjugats und ermittelten ebenfalls eine nahezu vollständige Eliminierung ihres Konjugats innerhalb von 24 Stunden.

Das Chemokinkonjugat akkumulierte spezifisch im Tumorareal und war über vier Tage selektiv auszumachen.

Um anschließend die Sensitivität und Spezifität der Markierung durch NIR-Sonden *in vivo* zu untersuchen, wurde das Chemokinkonjugat SDF-1-IRDye 800 mit einem RGD-IRDye 680-Konjugat an einer MCF7-tumortragenden Maus verglichen. Dabei bindet das RGD-Peptid spezifisch an die Integrinrezeptoren der Tumolvaskulatur (Endothelzellen). Aufgrund der zahlreichen Vorteile des IRDye 800³, die sich *in vitro* gezeigt hatten, wurde für das RGD-Konjugat ein Farbstoff der gleichen Familie gewählt (IRDye 680⁴). Aufgrund unterschiedlicher Emissionswellenlängen konnten die beiden Cyaninfarbstoffe *in vivo* unterschieden werden.

In den Versuchsmäusen, denen MCF7-Zellen injiziert worden waren, konnte eine spezifische Markierung dieser Zellen durch beide NIR-Konjugate festgestellt werden. Im Vergleich der Markierungsintensität zeichnete sich das RGD-Konjugat insgesamt durch ein stärkeres Fluoreszenzsignal aus. Der Grund hierfür ist die 20-fach höhere Konzentration des Integrinkonjugats (2 nmol).

Nach 24 Stunden zeigte das RGD-Konjugat den geringeren Fluoreszenzuntergrund in der Leber, einen etwas höheren Untergrund in der Lunge und einigen anderen gut vaskularisierten Arealen im Vergleich zum Chemokinkonjugat.

In den Mäusen, die sowohl mit MCF7- als auch mit A 764-Zellen inokuliert worden sind, konnte eine Markierung der MCF7-Zellen durch beide Fluoreszenzkonjugate nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich aufgrund der höheren Konzentration des RGD-Konjugats eine stärkere Markierung der Mammakarzinomzellen. Dagegen zeigte sich eine zielgerichtete Markierung der A 764-Gliomazellen nur durch das SDF-1-Konjugat. Das Integrinkonjugat konnte an diese Zellen nicht binden resultierend in dem Fehlen einer Fluoreszenzmarkierung. Die Bindung des Chemokinpeptids SDF-1 erfolgte über die überexprimierten Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 der Tumorzellen *per se*, wodurch diese detektierbar wurden.

Resektionen der Tumore ergaben für den MCF7-Tumor eine Größe von nur wenigen Millimetern. Dieser war zu einem kleinen Teil bereits vaskularisiert und damit über Endothelzellen für eine Markierung mittels Integrinkonjugat erreichbar. Der A 764-Tumor war dagegen so klein, dass er durch das Ausbleiben einer Vaskularisierung durch das RGD-Konjugat nicht detektiert werden konnte. Hierbei war das Chemokinkonjugat im Vorteil, da es nicht auf die Ausbildung von Blutgefäßen und damit auf das Vorhandensein von Endothelzellen angewiesen ist.

³IRDye 800CW: $\lambda_{\text{Anregung}} = 774 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}} = 789 \text{ nm}$

⁴IRDye 680CW: $\lambda_{\text{Anregung}} = 682 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}} = 702 \text{ nm}$

Somit konnte anhand dieser In-vivo-Experimente nachgewiesen werden, dass das verwendete RGD-Konjugat, dessen Verwendung in der Literatur bereits mehrfach beschrieben wurde [158, 162, 163], Tumore effizient visualisieren konnte, wobei die Markierungsintensität vom Vaskularisierungsgrad des Tumors abhing. Kleine, nicht-vaskularisierte Tumore bzw. kleine Tumorzellaggregate können nicht vom Integrinkonjugat aufgespürt und detektiert werden, da es auf das Vorkommen von Endothelzellen (Integrin-Rezeptoren) angewiesen ist. Für eine Detektion von unvaskularisierten Tumoren oder sogar einzelnen Tumorzellen ist das Chemokinkonjugat optimal geeignet. Durch die Bindung an die Chemokinrezeptoren auf der Membranoberfläche sind einzelne Tumorzellaggregate gut zu erreichen und damit bildgebend darstellbar. Darüber hinaus ist eine zusätzliche Markierung des Endothels von vaskularisierten Tumoren durch das Chemokinkonjugat möglich. Ein weiterer Vorteil ergibt sich dadurch, dass die Bindung nicht nur auf das Vorkommen des CXCR4 limitiert ist, sondern eine weitere Bindung über den alternativen SDF-1-Rezeptor CXCR7 erfolgen kann.

5.11 Ausblick

In weiterführenden Versuchen wäre die Markierung von orthotopen Tumoren über das SDF-1-Konjugat zu überprüfen. Die Tatsache, dass subkutan implantierte Tumorzellen nicht metastasieren und auch nur selten infiltrativ wachsen, hatten schon Tan et al. [164] beobachtet, als sie das Metastasierungsverhalten humaner Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von ihrem Implantationsort in der Nacktmaus untersuchten. Zum gleichen Ergebnis kamen Cornil et al. [165], die ähnliche Experimente mit einer humanen Melanomzelllinie durchführten. Das orthotope Tumormodell kommt dem In-vivo-Verhalten von Tumoren somit deutlich näher. Darüber hinaus kann an diesem Modell auch eine mögliche Detektion von Metastasen überprüft werden.

Weiter ist die Kombination mit molekularer Fluoreszenztomographie (*fluorescence mediated molecular tomography*, FMT) denkbar. So wird eine volumetrische Messung möglich, bei der die Eindringtiefe ins Gewebe und die Bildauflösung gesteigert ist [118]. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird durch mehrere Aufnahmen aus verschiedenen Projektionswinkeln verbessert. So besteht auch die Möglichkeit der Quantifizierung der Fluoreszenzintensität [166].

Die Anwendung der optischen Fluoreszenzbildgebung mit Chemokinkonjugaten in der Verlaufsbeobachtung der Tumorthapie ist ebenfalls vorstellbar. Kurzfristige Verlaufskontrollen sind hier aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung sinnvoll. Unter Einsatz verschiedener zielgerichteter Kontrastmittel kann so eine Veränderung des Rezeptorstatus detektiert, der sinnvolle Einsatz von Zytostatika laufend überprüft und frühzeitig ein Ansprechen oder auch ein Progress der Erkrankung erkannt werden. So ist neben einer Detektion NIR-markierter Tumorzellen auch die zeitliche und räumliche Auflösung des Tumorwachstums durch bildgebende, nichtinvasive Verfahren möglich und die Weiterentwicklung des Chemokinkonjugats wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Mit Hilfe der *molekularen Bildgebung* ist es möglich, Tumorerkrankungen aufgrund molekularer Veränderungen des Tumors im Vergleich zu bisherigen Standardverfahren viel früher nachzuweisen. Das Auswählen geeigneter Zielstrukturen auf den Tumorzellen, die Entwicklung optimaler Kontrastmittel sowie die Wahl eines bildgebenden Verfahrens sind dabei Voraussetzungen, um Tumorzellen frühzeitig bildgebend darzustellen.

Eine Aufgabe dieser Arbeit war es, Eisenoxid-beladene Liposomen für die unspezifische Aufnahme in Tumorzellen herzustellen, um sie über MRT visualisieren zu können. Dafür wurde zunächst ein geeignetes Herstellungsverfahren der Liposomen etabliert. Größenbestimmungen ergaben einen optimalen Durchmesser von 100 nm über einen Zeitraum von zwölf Tagen, wodurch eine Agglomeration ausgeschlossen und eine Anreicherung der Liposomen im Tumorgewebe über Endotheldefekte gesichert werden konnten. Im Vergleich zu anderen Eisenoxid-Nanopartikeln wurde die höchste intrazelluläre Eisenaufnahme über Eisenoxid-beladene Liposomen erreicht und über histochemische Anfärbungen nachgewiesen. Eine gute Bioverträglichkeit konnte über ein unverändertes Proliferationsverhalten der Gliomazellen in Gegenwart der Liposomen bestätigt werden. Abschließende Magnetresonanzmessungen ergaben die Detektierbarkeit von Eisenoxid-beladenen Tumorzellen und belegen die Eignung von Liposomen für die unspezifische Markierung von Tumorzellen mit Eisenoxid-Nanopartikeln.

Eine weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, Tumorzellen optisch über geeignete NIR-Sonden spezifisch zu markieren. Dazu wurde zunächst ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff (IRDye 800CW) hinsichtlich verschiedener Kriterien ausgewählt. Da die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sowie der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor) auf Tumorzellen überexprimiert sind, wurden diese als mögliche Zielstrukturen ausgewählt und entsprechende Liganden (*stromal cell-derived factor -1*, SDF-1 = CXCL12, und EGF) an den Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Über In-vitro-Untersuchungen konnten Aussagen über die Markierungseffektivität und -effizienz der Fluoreszenzkonjugate in Abhängigkeit verschiedener Parameter getroffen werden. So wurde eine optimale SDF-1-IRDye-Konzentration von 0,1 μ M bestimmt

werden, mit der bereits nach zehnminütiger Inkubation eine spezifische Markierung der Tumorzellen erreicht wurde. In weiteren Versuchen zeigte sich eine selektive Markierung von maximal 500 Zellen mittels SDF-1 - Konjugat. Eine spezifische Bindung bzw. kompetitive Hemmung des Chemokinkonjugats an den CXCR7 konnte in Verdrängungsexperimenten nachgewiesen werden. Die Überprüfung der biologischen Aktivität ergab keine Aktivierung der MAPK - Kaskade, was gerade hinsichtlich fehlender proliferationsfördernder Eigenschaften bei einer Anwendung in der Diagnosestellung und/oder Therapieverfahren von Tumorerkrankungen von Vorteil ist. Einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen in Gegenwart des Chemokinkonjugats bzw. ein zytotoxisches Potential wurde nicht festgestellt. Da das SDF-1 - IRDye 800 - Konjugat in Bezug auf Spezifität und Selektivität gegenüber anderen NIR - Konjugaten in den In - vitro - Versuchen sich überlegen zeigte, wurde es für anschließende In - vivo - Versuche ausgesucht.

Um die Spezifität und Selektivität des SDF-1 - Konjugats in vivo zu untersuchen, wurden MCF7 - Mammakarzinomzellen und A 764 Gliomazellen Versuchsmäusen subkutan injiziert und SDF-1 - IRDye über die Schwanzvene verabreicht. Eine spezifische Markierung der Tumorzellen konnte sowohl bei vaskularisierten als auch bei unvaskularisierten Tumoren nach 24 - 48 Stunden nach Kontrastmittelgabe festgestellt werden. SDF-1 - IRDye 800 stellt somit ein vielversprechendes optisches Kontrastmittel für die Bildgebung kleinster Tumoreale dar.

7 Summary

Molecular Imaging is defined as the visualization, characterization and measurement of biological processes at the molecular and cellular levels in humans and other living systems. The technique commonly utilizes a molecular imaging probe such as an antibody or ligand as tracer to visualize pathologic alterations or a physiologic process. The tracer provides the signal (light, radiation, magnetic resonance contrast agents such as gadolinium or iron oxide, ultrasound microbubble) that enables detection. The various existing imaging technologies differ with respect to detection threshold of the probe and spatial resolution. For example, MRI has a high spatial resolution while radioactive or optical imaging have the advantage of high sensitivity.

The aim of this project was to develop optimal contrast agents for MRI and near infrared optical imaging to detect tumors based on molecular changes. The selection of suitable targets on tumor cells, the development of optimal contrast agents as well as appropriate imaging methods are requirements for early detection of tumor cells.

In the application of MRI, lipid-based nanoparticles are promising multimodal contrast agents since MR detectable and fluorescent amphiphilic molecules could easily be incorporated in lipidic nanoparticles. In this study a liposome cell labeling system was initially developed for a non-target-specific labeling of tumor cells with liposomes filled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. The cytotoxicity and cell viability induced by liposomes was assessed and found to be minimal. Over a period of twelve days the liposomes remained stable in size (100 nm) with no aggregation. In comparison to other iron oxide nanoparticles, the highest uptake into cells was obtained by using liposomes with no saturation within 24 hours. Liposomes are effective contrast agents for MRI. Cells treated with iron oxide-liposomes showed a clear signal (T_2 -relaxivity).

The selection of suitable targets on tumor cells was pursued with optical imaging using near infrared fluorescent conjugates. The chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 as well as the epidermal growth factor (EGF)-receptor are overexpressed on distinct tumor cells/tumor vasculature and served as potential targets for detecting tumors. The ligand

for CXCR4 and CXCR7, namely the 8 kDa peptide stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 = CXCL12) as well as EGF were conjugated to the fluorescent cyanine dye IRDye 800CW and purified. The SDF-1-conjugate detected specifically as low as 500 A764-glioma cells which express CXCR7 at high levels. Binding was time- and concentration-dependent and the label was competitively displaced by the native peptide. The NIR-conjugates showed no cytotoxic properties and no influence on cell growth. To test the feasibility and selectivity in vivo mice bearing subcutaneous tumors of MCF7 breast cancer and A764 glioma cells were injected the SDF-1-conjugate through the tail vein. A specific labeling of these cells could be found of vascularized as well as non-vascularized tumors within 24-48 hours post injection of SDF-1-IRDye. Finally, SDF-1-IRDye showed great promise for detecting tumors in vivo by optical imaging.

Literaturverzeichnis

- [1] SCHULTZ, P. und R. WEISSLEDER: *Mobile Nahinfrarot- Fluoreszenzbildgebung: Ein neues Führungsinstrument zur chirurgischen Geweberesektion*. In: *Siemens Healthcare Magazine*, 2008.
- [2] WEISSLEDER, R.: *Molecular Imaging in Cancer*. *Science*, 312:1168–1171, 2006.
- [3] WEISSLEDER, R. und U. MAHMOOD: *Molecular Imaging*. *Radiology*, 219:316–333, 2001.
- [4] GRIMM, J.: *Molekulare Bildgebung – Neue Horizonte in der Radiologie*. *Medical Solutions*, 1:70–77, 2003.
- [5] MENTLEIN, R.: *Molekulare Bildgebung von Tumoren: Techniken-Konzepte-Perspektiven*. In: *Innovative Medizin- und Biotechnologie in Hamburg*, 2009.
- [6] HAFERKORN, H.: *Optik physikalisch-technische Grundlagen und Anwendungen*. Wiley-VCH, 4. Auflage, 2003.
- [7] BREMER, C., V. NTZIACHRISTOS, U. MAHMOOD, C. H. TUNG und R. WEISSLEDER: *Advances in Optical Imaging*. *Radiologe*, 41:131–137, 2001.
- [8] LIN, Y., R. WEISSLEDER und C.-H. TUNG: *Synthesis and Properties of Sulfhydryl-Reactive Near-Infrared Cyanine Fluorochromes for Fluorescence Imaging*. *Molecular imaging*, 2:87–92, 2003.
- [9] RIEFKE, B., K. LICHA und W. SEMMLER: *Contrast Agents for Optical Mammography*. *Radiologe*, 37:749–755, 1997.
- [10] BOUTELLER, C., G. CLAVE, A. BERNARDIN, B. CHIPON, M. MASSONNEAU, P. Y. RENARD und A. ROMIEU: *Novel Water-Soluble Near-Infrared Cyanine Dyes: Synthesis, Spectral Properties, and use in the Preparation of Internally Quenched Fluorescent Probes*. *Bioconjugate Chemistry*, 18:1303–1317, 2007.
- [11] OGAWA, M., N. KOSAKA, P. L. CHOYKE und H. KOBAYASHI: *In vivo Molecular Imaging of Cancer with a Quenching Near-Infrared Fluorescent Probe Using Conjugates of Monoclonal Antibodies and Indocyanine Green*. *Cancer Research*, 69:1268–1272, 2009.
- [12] MAHMOOD, U. und R. WEISSLEDER: *Near-Infrared Optical Imaging of Proteases in Cancer*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2:489–496, 2003.

- [13] LAARMAN, SVEN, KATHRIN ZELLER, KARIN MITTMANN und CHRISTOPH BLOCK: *Fluorescent nanoparticles*. Patentschrift: EP1787659, 2007.
- [14] KAUFFMANN, MOSER und SAUER: *Radiologie*. Urban & Fischer, 3. Auflage, 2006.
- [15] SCHILD, H.: *Made Easy MRI*. Schering, 2. Auflage, 1997.
- [16] TAUPITZ, M.: *Ein neues Kontrastmittel für die MRT auf der Basis Citrat-stabiler magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel*. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2005.
- [17] MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE: *Standardsequenzen und Kontrastmittelgabe*. Max-Planck-Gesellschaft, 2009.
- [18] HERZOG, H.: *Methods and Applications of Positron-based Medical Imaging*. Radiation Physics and Chemistry, 76:337–342, 2007.
- [19] ELLEGALA, D. B., H. L. POI, J. E. CARPENTER, A. L. KLIBANOV, S. KAUL, M. E. SHAFFREY, J. SKLENAR und J. R. LINDNER: *Imaging Tumor Angiogenesis with Contrast Ultrasound and Microbubbles Targeted to Alpha(v)Beta(3)*. Circulation, 108:336–341, 2003.
- [20] YARDEN, Y.: *The EGFR Family and its Ligands in Human Cancer: Signalling Mechanisms and Therapeutic Opportunities*. European Journal of Cancer, 37:3–8, 2001.
- [21] PRENZEL, N., O. M. FISCHER, S. STREIT, S. HART und A. ULLRICH: *The Epidermal Growth Factor Receptor Family as a Central Element for Cellular Signal Transduction and Diversification*. Endocrine-Related Cancer, 8:11–31, 2001.
- [22] OLAYIOYE, M. A., R. M. NEVE, H. A. LANE und N. E. HYNES: *The ErbB Signaling Network: Receptor Heterodimerization in Development and Cancer*. Embo Journal, 19:3159–3167, 2000.
- [23] WELLS, A.: *EGF Receptor*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 31:637–643, 1999.
- [24] MASSAGUE, J. und A. PANDIELLA: *Membrane-anchored Growth-factors*. Annual Review of Biochemistry, 62:515–541, 1993.
- [25] STRIETER, R. M., P. J. POLVERINI, D. A. ARENBERG und S. L. KUNKEL: *The Role of CXC Chemokines as Regulators of Angiogenesis*. Shock, 4:155–160, 1995.
- [26] ROSSI, D. und A. ZLOTNIK: *The Biology of Chemokines and their Receptors*. Annual Review of Immunology, 18:217–243, 2000.
- [27] TRAN, P. B. und R. J. MILLER: *HIV-1, Chemokines and Neurogenesis*. Neurotoxicity Research, 8:149–158, 2005.

- [28] ZLOTNIK, A. und O. YOSHIE: *Chemokines: A New Classification System and their Role in Immunity*. *Immunity*, 12:121–127, 2000.
- [29] ZLOTNIK, A., J. MORALES und J. A. HEDRICK: *Recent Advances in Chemokines and Chemokine Receptors*. *Critical Reviews in Immunology*, 19:1–47, 1999.
- [30] MURPHY, P. M., M. BAGGIOLINI, I. F. CHARO, C. A. HEBERT, R. HORUK, K. MATSUSHIMA, L. H. MILLER, J. J. OPPENHEIM und C. A. POWER: *International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors*. *Pharmacological Reviews*, 52:145–176, 2000.
- [31] BURNS, J. M., B. C. SUMMERS, Y. WANG, A. MELIKIAN, R. BERAHOVICH, Z. H. MIAO, M. E. T. PENFOLD, M. J. SUNSHINE, D. R. LITTMAN, C. J. KUO, K. WEI, B. E. McMASTER, K. WRIGHT, M. C. HOWARD und T. J. SCHALL: *A Novel Chemokine Receptor for SDF-1 and I-TAC Involved in Cell Survival, Cell Adhesion, and Tumor Development*. *Journal of Experimental Medicine*, 203:2201–2213, 2006.
- [32] KOLLMAR, O., K. RUPERTUS, C. SCHEUER, B. JUNKER, B. TILTON, M. K. SCHILLING und M. D. MENDER: *Stromal Cell-derived Factor-1 Promotes Cell Migration and Tumor Growth of Colorectal Metastasis*. *Neoplasia*, 9:862–870, 2007.
- [33] BANGHAM, A. D., M. M. STANDISH und J. C. WATKINS: *Diffusion of Univalent Ions Across Lamellae of Swollen Phospholipids*. *Journal of Molecular Biology*, 13:238–252, 1965.
- [34] GREGORIA, G., E. J. WILLS, C. P. SWAIN und A. S. TAVILL: *Drug-carrier Potential of Liposomes in Cancer Chemotherapy*. *Lancet*, 1:1313–1316, 1974.
- [35] GREGORIADIS, G.: *Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems*. *Trends in Biotechnology*, 13:527–537, 1995.
- [36] MEINCKE, M., T. SCHLORF, E. KOSSEL, O. JANSEN, C. C. GLUEER und R. MENTLEIN: *Iron Oxide-loaded Liposomes for MR Imaging*. *Frontiers of Biosciences*, 13:4002–4008, 2008.
- [37] NAGAYASU, A., K. UCHIYAMA und H. KIWADA: *The Size of Liposomes: A Factor which Affects their Targeting Efficiency to Tumors and Therapeutic Activity of Liposomal Antitumor Drugs*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40:75–87, 1999.
- [38] MASTROBATTISTA, E., G. A. KONING und G. STORM: *Immunoliposomes for the Targeted Delivery of Antitumor Drugs*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40:103–127, 1999.
- [39] GABIZON, A. und D. PAPAHDJOPoulos: *Liposome Formulations with Prolonged Circulation Time in Blood and Enhanced Uptake by Tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85:6949–6953, 1988.

- [40] DUZGUNES, N., J. A. GOLDSTEIN, D. S. FRIEND und P. L. FELGNER: *Fusion of Liposomes Containing A Novel Cationic Lipid, N-[2,3-(Dioleoyloxy)Propyl]-N,N,N-Trimethylammonium – Induction by Multivalent Anions and Asymmetric Fusion with Acidic Phospholipid-Vesicles*. *Biochemistry*, 28:9179–9184, 1989.
- [41] FELGNER, P. L. und G. M. RINGOLD: *Cationic Liposome-Mediated Transfection*. *Nature*, 337:387–388, 1989.
- [42] MATSUI, H., L. G. JOHNSON, S. H. RANDELL und R. C. BOUCHER: *Loss of Binding and Entry of Liposome-DNA Complexes Decreases Transfection Efficiency in Differentiated Airway Epithelial Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 272:1117–1126, 1997.
- [43] SERAFINO, A. L., G. NOVELLI, S. DI SARIO, A. COLOSIMO, P. AMICUCCI, F. SANGIUOLO, G. MOSSA und B. DALLAPICCOLA: *Cellular uptake and delivery monitoring of liposome/DNA complexes during in vitro transfection of CFTR gene*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 47:337–344, 1999.
- [44] ZABNER, J., A. J. FASBENDER, T. MONINGER, K. A. POELLINGER und M. J. WELSH: *Cellular and Molecular Barriers to Gene-transfer by A Cationic Lipid*. *Journal of Biological Chemistry*, 270:18997–19007, 1995.
- [45] ZHOU, X. H. und L. HUANG: *DNA Transfection Mediated by Cationic Liposomes Containing Lipopolylysine – Characterization and Mechanism of Action*. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1189:195–203, 1994.
- [46] RABINOVITCH, M.: *Professional and Nonprofessional Phagocytes – An Introduction*. *Trends in Cell Biology*, 5:85–87, 1995.
- [47] MELLMAN, I.: *Endocytosis and Molecular Sorting*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12:575–625, 1996.
- [48] ALBERTS, B. und L. JAENICKE: *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, 4. Auflage, 2004.
- [49] RUMMENY, E. J., W. BERNING, M. FUEST, U. BICK, B. NIGGEMANN, P. TOURNIER und X. FOUILLET: *New RES-specific contrast agents for CT*. *Academic Radiology*, 9:S185–S190, 2002.
- [50] ROBERTS, W. G., J. DELAAT, M. NAGANE, S. HUANG, W. K. CAVENEE und G. E. PALADE: *Host Microvasculature Influence on Tumor Vascular Morphology and Endothelial Gene Expression*. *American Journal of Pathology*, 153:1239–1248, 1998.
- [51] ROBERTS, M. J., M. D. BENTLEY und J. M. HARRIS: *Chemistry for Peptide and Protein PEGylation*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459–476, 2002.

- [52] WU, N. Z., R. D. BRAUN, M. H. GABER, G. M. LIN, E. T. ONG, S. Q. SHAN, D. PAPAHA-
JOPOULOS und M. W. DEWHIRST: *Simultaneous Measurement of Liposome Extravasation
and Content Release in Tumors*. *Microcirculation-London*, 4:83–101, 1997.
- [53] MASSING, U. und S. FUXIUS: *Liposomal Formulations of Anticancer Drugs: Selectivity
and Effectiveness*. *Drug Resistance Updates*, 3:171–177, 2000.
- [54] SHARRER, TERRY: *“HeLa“ Herself*. *The Scientist*, 20:22–23, 2006.
- [55] KLEIST, S. V., E. CHANY, P. BURTIN, M. KING und J. FOGH: *Immunohistology of Antigenic
Pattern of a Continuous Cell Line from a Human Colon Tumor*. *Journal of the National
Cancer Institute*, 55:555–560, 1975.
- [56] CAILLEAU, R., R. YOUNG, M. OLIVE und W. J. REEVES: *Breast Tumor-cell Lines from
Pleural Effusions*. *Journal of the National Cancer Institute*, 53:661–674, 1974.
- [57] ZHANG, R. D., I. J. FIDLER und J. E. PRICE: *Relative Malignant Potential of Human Breast-
carcinoma Cell-lines Established from Pleural Effusions and a Brain Metastasis*. *Invasion
& Metastasis*, 11:204–215, 1991.
- [58] LOMBAERTS, M., T. VAN WEZEL, K. PHILIPPO, J. W. F. DIERSSEN, R. M. E. ZIMMERMAN,
J. OOSTING, R. VAN EIJK, P. H. EILERS, B. DE WATER, C. J. CORNELISSE und A. M.
CLETON-JANSEN: *E-cadherin Transcriptional Downregulation by Promoter Methylation
but not Mutation is Related to Epithelial-to-mesenchymal Transition in Breast Cancer Cell
Lines*. *British Journal of Cancer*, 94:661–671, 2006.
- [59] SOULE, H. D., J. VAZQUEZ, A. LONG, S. ALBERT und M. BRENNAN: *Human Cell Line from
A Pleural Effusion Derived from A Breast Carcinoma*. *Journal of the National Cancer
Institute*, 51:1409–1416, 1973.
- [60] HORWITZ, K. B., D. T. ZAVA, A. K. THILAGAR, E. M. JENSEN und W. L. MCGUIRE: *Steroid
Receptor Analyses of 9 Human Breast-cancer Cell Lines*. *Cancer Research*, 38:2434–2437,
1978.
- [61] LADAGE, D., K. BRIXIUS, H. HOYER, C. STEINGEN, A. WESSELING, D. MALAN, W. BLOCH
und R. H. G. SCHWINGER: *Mechanisms Underlying Nebivolol-induced Endothelial Nitric
Oxide Synthase Activation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. *Clinical and
Experimental Pharmacology and Physiology*, 33:720–724, 2006.
- [62] PONTEN, J. und B. WESTERMARK: *Properties of Human Malignant Glioma Cells In vitro*.
Medical Biology, 56:184–193, 1978.
- [63] GOLDBRUNNER, R. H., J. J. BERNSTEIN und J. C. TONN: *ECM-mediated Glioma Cell
Invasion*. *Microscopy Research and Technique*, 43:250–257, 1998.

- [64] GOLDBRUNNER, R. H., J. J. BERNSTEIN und J. C. TONN: *Cell-extracellular Matrix Interaction in Glioma Invasion*. Acta Neurochirurgica, 141:295–305, 1999.
- [65] DWORKIN, M., S. FALKOW, E. ROSENBERG, K. H. SCHLEIFER und E. STACKEBRANDT: *The Prokaryotes*. Springer Verlag, 3. Auflage, 2007.
- [66] MANILOFF, J., R. N. MCELHANEY, L. R. FINCH und J. B. BASEMAN: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology, 1992.
- [67] BOVE, J. M.: *Molecular-features of Mollicutes*. Clinical Infectious Diseases, 17:10–31, 1993.
- [68] LIVAK, K. J. und T. D. SCHMITTGEN: *Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-time Quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) Method*. Methods, 25:402–408, 2001.
- [69] FORSTER, T.: *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 2:55–75, 1948.
- [70] BRADFORD, M. M.: *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye Binding*. Analytical Biochemistry, 72:248–254, 1976.
- [71] AMY, G. L., M. R. COLLINS, C. J. KUO und P. H. KING: *Comparing Gel-Permeation Chromatography and Ultrafiltration for the Molecular-Weight Characterization of Aquatic Organic-Matter 1*. Journal American Water Works Association, 79:43–49, 1987.
- [72] AIKEN, G. R.: *Evaluation of Ultrafiltration for Determining Molecular-Weight of Fulvic-Acid*. Environmental Science & Technology, 18:978–981, 1984.
- [73] MAYER, L. D., M. J. HOPE und P. R. CULLIS: *Vesicles of Variable Sizes Produced by a Rapid Extrusion Procedure*. Biochimica et Biophysica Acta, 858:161–168, 1986.
- [74] OLSON, F., C. A. HUNT, F. C. SZOKA, W. J. VAIL und D. PAPAHAJIOPOULOS: *Preparation of Liposomes of Defined Size Distribution by Extrusion Through Polycarbonate Membranes*. Biochimica et Biophysica Acta, 557:9–23, 1979.
- [75] ABRA, R. M. und C. A. HUNT: *Liposome Disposition in vivo. III. Dose and Vesicle-Size Effects*. Biochimica et Biophysica Acta, 666:493–503, 1981.
- [76] RUF, H., Y. GEORGALIS und E. GRELL: *Dynamic Laser-light Scattering to Determine Size Distributions of Vesicles*. Methods in Enzymology, 172:364–390, 1989.
- [77] HALLETT, F. R., J. WATTON und P. KRYGSMAN: *Vesicle Sizing – Number Distributions by Dynamic Light-Scattering*. Biophysical Journal, 59:357–362, 1991.

- [78] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 3. Auflage, 2006.
- [79] ALBANI, J. R.: *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Blackwell, 1. Auflage, 2007.
- [80] MENTLEIN, R.: *Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the Inactivation of Regulatory Peptides*. *Regulatory Peptides*, 85:9–24, 1999.
- [81] DE MEESTER, I., A. M. LAMBEIR, P. PROOST und S. SCHARPE: *Dipeptidyl Peptidase IV Substrates – An Update on in vitro Peptide Hydrolysis by Human DPPiV*. *Dipeptidyl Aminopeptidases in Health and Disease*, 524:3–17, 2003.
- [82] DE MEESTER, I., C. DURINX, G. BAL, P. PROOST, S. STRUYF, F. GOOSSENS, K. AUGUSTYNS und S. SCHARPE: *Natural Substrates of Dipeptidyl Peptidase IV*. *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*, 477:67–87, 2000.
- [83] SHIODA, T., H. KATO, Y. OHNISHI, K. TASHIRO, M. IKEGAWA, E. E. NAKAYAMA, H. L. HU, A. KATO, Y. SAKAI, H. L. LIU, T. HONJO, A. NOMOTO, A. IWAMOTO, C. MORIMOTO und Y. NAGAI: *Anti-HIV-1 and Chemotactic Activities of Human Stromal Cell-derived Factor 1 Alpha (SDF-1 alpha) and SDF-1 Beta are Abolished by CD26/dipeptidyl Peptidase IV-mediated Cleavage*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:6331–6336, 1998.
- [84] PORCILE, C., A. BAJETTO, F. BARBIERI, S. BARBERO, R. BONAVIA, M. BIGLIERI, P. PIRANI, T. FLORIO und G. SCETTINI: *Stromal Cell-derived Factor-1 Alpha (SDF-1 alpha/CXCL12) Stimulates Ovarian Cancer Cell Growth through the EGF Receptor Transactivation*. *Experimental Cell Research*, 308:241–253, 2005.
- [85] LÜLLMANN-RAUCH, R.: *Histologie*. Thieme, 2. Auflage, 2006.
- [86] DRUMMOND, D. C., O. MEYER, K. L. HONG, D. B. KIRPOTIN und D. PAPAHDJOPOULOS: *Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors*. *Pharmacological Reviews*, 51:691–743, 1999.
- [87] YUAN, F., M. DELLIAN, D. FUKUMURA, M. LEUNIG, D. A. BERK, V. P. TORCHILIN und R. K. JAIN: *Vascular-permeability in a Human Tumor Xenograft – Molecular-size Dependence and Cutoff Size*. *Cancer Research*, 55:3752–3756, 1995.
- [88] GERLOWSKI, L. E. und R. K. JAIN: *Microvascular Permeability of Normal and Neoplastic Tissues*. *Microvascular Research*, 31:288–305, 1986.
- [89] MAEDA, H. und Y. MATSUMURA: *Tumoritropic and Lymphotropic Principles of Macromolecular Drugs*. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:193–210, 1989.

- [90] MAEDA, H.: *The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-selective Macromolecular Drug Targeting*. *Advances in Enzyme Regulation*, Vol 41, 41:189–207, 2001.
- [91] JAIN, R. K.: *Delivery of Molecular and Cellular Medicine to Solid Tumors*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 26:71–90, 1997.
- [92] STEFFENS, K. J.: *Vorlesung Pharmazeutische Technologie Flüssige Arzneiformen - Liposomen*. Universität Bonn, 2007.
- [93] REIMER, P., R. WEISSLEDER, A. S. LEE, J. WITTENBERG und T. J. BRADY: *Receptor Imaging – Application to MR Imaging of Liver-Cancer*. *Radiology*, 177:729–734, 1990.
- [94] SAINI, S., D. D. STARK, P. F. HAHN, J. WITTENBERG, T. J. BRADY und J. T. FERRUCCI: *Ferrite Particles – A Superparamagnetic MR Contrast Agent for the Reticuloendothelial System*. *Radiology*, 162:211–216, 1987.
- [95] WEISSLEDER, R.: *Target-Specific Superparamagnetic MR Contrast Agents*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 22:209–212, 1991.
- [96] REIMER, P., R. WEISSLEDER, A. S. LEE, S. BUETTNER, J. WITTENBERG und T. J. BRADY: *Asialoglycoprotein Receptor Function in Benign Liver-disease – Evaluation with MR Imaging*. *Radiology*, 178:769–774, 1991.
- [97] DALDRUP-LINK, H. E., M. RUDELIUS, R. A. J. OOSTENDORP, M. SETTLES, G. PIONTEK, S. METZ, H. ROSENBRUCK, U. KELLER, U. HEINZMANN, E. J. RUMMENY, J. SCHLEGEL und T. M. LINK: *Targeting of Hematopoietic Progenitor Cells with MR Contrast Agents*. *Radiology*, 228:760–767, 2003.
- [98] RUDELIUS, M., H. E. DALDRUP-LINK, U. HEINZMANN, G. PIONTEK, M. SETTLES, T. M. LINK und J. SCHLEGEL: *Highly Efficient Paramagnetic Labelling of Embryonic and Neuronal Stem Cells*. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 30:1038–1044, 2003.
- [99] ANZAI, Y., M. R. PRINCE, T. L. CHENEVERT, J. H. MAKI, F. LONDY, M. LONDON und S. J. McLACHLAN: *MR Angiography with an Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Blood Pool Agent*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 7:209–214, 1997.
- [100] ISHIDA, T., H. HARASHIMA und H. KIWADA: *Liposome Clearance*. *Bioscience Reports*, 22:197–224, 2002.
- [101] SCHERPHOF, G. L., J. DIJKSTRA, H. H. SPANJER, J. T. P. DERKSEN und F. H. ROERDINK: *Uptake and Intracellular Processing of Targeted and Nontargeted Liposomes by Rat Kupffer Cells In vivo and In vitro*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 446:368–384, 1985.

- [102] DERKSEN, J. T. P., H. W. M. MORSELT und G. L. SCHERPHOF: *Uptake and Processing of Immunoglobulin-coated Liposomes by Subpopulations of Rat-liver Macrophages*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 971:127–136, 1988.
- [103] ALLEN, T. M. und A. CHONN: *Large Unilamellar Liposomes with Low Uptake Into the Reticuloendothelial System*. *Febs Letters*, 223:42–46, 1987.
- [104] BLUME, G. und G. CEVC: *Liposomes for the Sustained Drug Release in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1029:91–97, 1990.
- [105] MARUYAMA, K., T. YUDA, A. OKAMOTO, C. ISHIKURA, S. KOJIMA und M. IWATSURU: *Effect of Molecular-weight in Amphipathic Polyethyleneglycol on Prolonging the Circulation Time of Large Unilamellar Liposomes*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 39:1620–1622, 1991.
- [106] WOODLE, M. C. und D. D. LASIC: *Sterically Stabilized Liposomes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1113:171–199, 1992.
- [107] WOODLE, M. C., M. S. NEWMAN und J. A. COHEN: *Sterically Stabilized Liposomes – Physical and Biological Properties*. *Journal of Drug Targeting*, 2:397–403, 1994.
- [108] PRICE, M. E., R. M. CORNELIUS und J. L. BRASH: *Protein Adsorption to Polyethylene Glycol Modified Liposomes from Fibrinogen Solution and from Plasma*. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1512:191–205, 2001.
- [109] LASIC, D. D., F. J. MARTIN, A. GABIZON, S. K. HUANG und D. PAPAHDJOPOULOS: *Sterically Stabilized Liposomes – A Hypothesis on the Molecular-Origin of the Extended Circulation Times*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1070:187–192, 1991.
- [110] TORCHILIN, V. P., V. G. OMELIANENKO, M. I. PAPISOV, A. A. BOGDANOV, V. S. TRUBETSKOY, J. N. HERRON und C. A. GENTRY: *Poly(Ethylene Glycol) on the Liposome Surface – On the Mechanism of Polymer-Coated Liposome Longevity*. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1195:11–20, 1994.
- [111] NEEDHAM, D., T. J. MCINTOSH und D. D. LASIC: *Repulsive Interactions and Mechanical Stability of Polymer-grafted Lipid-membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1108:40–48, 1992.
- [112] HONG, K., W. ZHENG, A. BAKER und D. PAPAHDJOPOULOS: *Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery*. *Febs Letters*, 400:233–237, 1997.
- [113] WU, N. Z., D. DA, T. L. RUDOLL, D. NEEDHAM, A. R. WHORTON und M. W. DEWHIRST: *Increased Microvascular Permeability Contributes to Preferential Accumulation of Stealth Liposomes in Tumor Tissue*. *Cancer Research*, 53:3765–3770, 1993.

- [114] MARTINA, M. S., J. P. FORTIN, C. MENAGER, O. CLEMENT, G. BARRATT, C. GRABIELLE-MADELMONT, F. GAZEAU, V. CABUIL und S. LESIEUR: *Generation of Superparamagnetic Liposomes Revealed as Highly Efficient MRI Contrast Agents for in vivo Imaging*. Journal of the American Chemical Society, 127:10676–10685, 2005.
- [115] RENSHAW, P. F., C. S. OWEN, A. C. MCLAUGHLIN, T. G. FREY und J. S. LEIGH: *Ferromagnetic Contrast Agents – A New Approach*. Magnetic Resonance in Medicine, 3:217–225, 1986.
- [116] KASCHKE, M., H. JESS, G. GAIDA, J. M. KALTENBACH und W. WROBEL: *Transillumination Imaging of Tissue by Phase Modulation Techniques*. Advances in Optical Imaging and Photon Migration, 21:88–92, 1994.
- [117] REISER, M. F.: *Der Radiologe*, Kapitel Kontrastmittel für die optische Mammographie, Seiten 749–755. Springer Verlag, 1997.
- [118] NTZIACHRISTOS, V., C. BREMER und R. WEISSLEDER: *Fluorescence Imaging with Near-infrared Light: New Technological Advances that Enable in vivo Molecular Imaging*. European Radiology, 13:195–208, 2003.
- [119] KOVAR, J. L., W. M. VOLCHECK, J. Y. CHEN und M. A. SIMPSON: *Purification Method Directly Influences Effectiveness of an Epidermal Growth Factor-coupled Targeting Agent for Noninvasive Tumor Detection in Mice*. Analytical Biochemistry, 361:47–54, 2007.
- [120] KRIEGMAIR, M., R. BAUMGARTNER, R. KNUCHEL, A. EHSAN, P. STEINBACH, W. LUMPER, F. HOFSTADTER und A. HOFSTETTER: *Photodynamic Diagnosis of Urothelial Neoplasms Following Intravesical Institution of 5-Aminolevulinic Acid*. Urologe-Ausgabe A, 33:270–275, 1994.
- [121] ZAAK, D., E. HUNGERHUBER, P. SCHNEEDE, H. STEPP, D. FRIMBERGER, S. CORVIN, N. SCHMELLER, M. KRIEGMAIR, A. HOFSTETTER und R. KNOCHEL: *Role of 5-aminolevulinic Acid in the Detection of Urothelial Premalignant Lesions*. Cancer, 95:1234–1238, 2002.
- [122] HARRIES, M. L., S. LAM, C. MACAULAY, J. A. QU und B. PALCIC: *Diagnostic-imaging of the Larynx – Autofluorescence of Laryngeal Tumors Using the Helium Cadmium Laser*. Journal of Laryngology and Otology, 109:108–110, 1995.
- [123] LEUNIG, A., K. RICK, H. STEPP, R. GUTMANN, G. ALWIN, R. BAUMGARTNER und J. FEYH: *Fluorescence Imaging and Spectroscopy of 5-aminolevulinic Acid Induced Protoporphyrin IX for the Detection of Neoplastic Lesions in the Oral Cavity*. American Journal of Surgery, 172:674–677, 1996.

- [124] PANJEHPUR, M., B. F. OVERHOLT, J. L. SCHMIDHAMMER, C. FARRIS, P. F. BUCKLEY und T. VODINH: *Spectroscopic Diagnosis of Esophageal Cancer – New Classification Model, Improved Measurement System*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 41:577–581, 1995.
- [125] COTHREN, R. M., M. V. SIVAK, J. VANDAM, R. E. PETRAS, M. FITZMAURICE, J. M. CRAWFORD, J. WU, J. F. BRENNAN, R. P. RAVA, R. MANOHARAN und M. S. FELD: *Detection of Dysplasia at Colonoscopy using Laser-induced Fluorescence: A Blinded Study*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 44:168–176, 1996.
- [126] LAM, S., C. MACAULAY, J. HUNG, J. LERICHE, A. E. PROFIO und B. PALCIC: *Detection of Dysplasia and Carcinoma Insitu with a Lung Imaging Fluorescence Endoscope Device*. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 105:1035–1040, 1993.
- [127] FRITSCH, C., P. M. BECKERWEGERICH, H. MENKE, T. RUZICKA, G. GOERZ und R. R. OLBRISCH: *Successful Surgery of Multiple Recurrent Basal Cell Carcinomas Guided by Photodynamic Diagnosis*. *Aesthetic Plastic Surgery*, 21:437–439, 1997.
- [128] FRITSCH, C., P. M. BECKER-WEGERICH, K. W. SCHULTE, W. NEUSE, P. LEHMANN, T. RUZICKA und G. GOERZ: *Photodynamic Therapy and Breast-plasty of a Extensive Superficial Trunk Skin Basalioma of the Breast. An Effective Combination Therapy with Photodynamic Diagnosis*. *Hautarzt*, 47:438–442, 1996.
- [129] BUTTNER, A., M. BAUER, R. SCHULZ-WENDTLAND, K. EIBNER, J. WORTMANN und K. KLINGENBECK: *Laser Mammography with NIR Light*. *Gynakol Geburtshilfliche Rundschau*, 33:299–300, 1993.
- [130] LICHA, K., B. RIEFKE, V. NTZIACHRISTOS, A. BECKER, B. CHANCE und W. SEMMLER: *Hydrophilic Cyanine Dyes as Contrast Agents for Near-infrared Tumor Imaging: Synthesis, Photophysical Properties and Spectroscopic in vivo Characterization*. *Photochemistry and Photobiology*, 72:392–398, 2000.
- [131] EBERT, B., U. SUKOWSKI, D. GROSENICK, H. WABNITZ, T. K. MOESTA, K. LICHA, A. BECKER, W. SEMMLER, P. M. SCHLAG und H. RINNEBERG: *Near-infrared Fluorescent Dyes for Enhanced Contrast in Optical Mammography: Phantom Experiments*. *Journal of Biomedical Optics*, 6:134–140, 2001.
- [132] ACHILEFU, S., R. B. DORSHOW, J. E. BUGAJ und R. RAJAGOPALAN: *Novel Receptor-Targeted Fluorescent Contrast Agents for in vivo Tumor Imaging*. *Investigative Radiology*, 35:479–485, 2000.
- [133] BECKER, A., B. RIEFKE, B. EBERT, U. SUKOWSKI, H. RINNEBERG, W. SEMMLER und K. LICHA: *Macromolecular Contrast Agents for Optical Imaging of Tumors: Comparison*

- of Indotricarbocyanine-labeled Human Serum Albumin and Transferrin*. *Photochemistry and Photobiology*, 72:234–241, 2000.
- [134] KOVAR, J. L., M. A. SIMPSON, A. SCHUTZ-GESCHWENDER und D. M. OLIVE: *A Systematic Approach to the Development Agents for Optical Imaging of Mouse of Fluorescent Contrast Cancer Models*. *Analytical Biochemistry*, 367:1–12, 2007.
- [135] VEISEH, M., P. GABIKIAN, S. B. BAHRAMI, O. VEISEH, M. ZHANG, R. C. HACKMAN, A. C. RAVANPAY, M. R. STROUD, Y. KUSUMA, S. J. HANSEN, D. KWOK, N. M. MUNOZ, R. W. SZE, W. M. GRADY, N. M. GREENBERG, R. G. ELLENBOGEN und J. M. OLSON: *Tumor Paint: A Chlorotoxin : Cy5.5 Bioconjugate for Intraoperative Visualization of Cancer Foci*. *Cancer Research*, 67:6882–6888, 2007.
- [136] LIU, S. und D. S. EDWARDS: *Tc-99m-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals*. *Chemical Reviews*, 99:2235–2268, 1999.
- [137] SERAFINI, A. N.: *From Monoclonal-antibodies to Peptides and Molecular Recognition Units – An Overview*. *Journal of Nuclear Medicine*, 34:533–536, 1993.
- [138] GOLDSMITH, S. J.: *Receptor Imaging: Competitive or Complementary to Antibody Imaging?* *Seminars in Nuclear Medicine*, 27:85–93, 1997.
- [139] JAIN, R. K.: *Barriers to Drug-delivery in Solid Tumors*. *Scientific American*, 271:58–65, 1994.
- [140] NERI, D., B. CARNEMOLLA, A. NISSIM, A. LEPRINI, G. QUERZE, E. BALZA, A. PINI, L. TARLI, C. HALIN, P. NERI, L. ZARDI und G. WINTER: *Targeting by Affinity-matured Recombinant Antibody Fragments of an Angiogenesis Associated Fibronectin Isoform*. *Nature Biotechnology*, 15:1271–1275, 1997.
- [141] SEVICK-MURACA, E. M., J. P. HOUSTON und M. GURFINKEL: *Fluorescence-enhanced, Near Infrared Diagnostic Imaging with Contrast Agents*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:642–650, 2002.
- [142] LANGER, M. und A. G. BECK-SICKINGER: *Peptides as Carrier for Tumor Diagnosis and Treatment*. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 1:71–93, 2001.
- [143] REUBI, J. C.: *Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy*. *Endocrine Reviews*, 24:389–427, 2003.
- [144] BALLOU, B., G. W. FISHER, A. S. WAGGONER, D. L. FARKAS, J. M. REILAND, R. JAFFE, R. B. MUJUMDAR, S. R. MUJUMDAR und T. R. HAKALA: *Tumor Labeling In-vivo Using Cyanine-conjugated Monoclonal-antibodies*. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 41:257–263, 1995.

- [145] HENDLER, F. J. und B. W. OZANNE: *Human Squamous-Cell Lung Cancers Express Increased Epidermal Growth-Factor Receptors*. *Journal of Clinical Investigation*, 74:647–651, 1984.
- [146] SALOMON, D. S., R. BRANDT, F. CIARDIELLO und N. NORMANNO: *Epidermal Growth Factor-related Peptides and Their Receptors in Human Malignancies*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 19:183–232, 1995.
- [147] WOODBURN, J. R.: *The Epidermal Growth Factor Receptor and its Inhibition in Cancer Therapy*. *Pharmacology & Therapeutics*, 82:241–250, 1999.
- [148] NISHIKAWA, Y., B. I. CARR, M. WANG, S. KAR, F. FINN, P. DOWD, Z. B. ZHENG, J. KERNS und S. NAGANATHAN: *Growth-Inhibition of Hepatoma-Cells Induced by Vitamin-K and its Analogs*. *Journal of Biological Chemistry*, 270:28304–28310, 1995.
- [149] PEDERSEN, M. W., M. MELTORN, L. DAMSTRUP und H. S. POULSEN: *The Type III Epidermal Growth Factor Receptor Mutation – Biological Significance and Potential Target for Anti-cancer Therapy*. *Annals of Oncology*, 12:745–760, 2001.
- [150] MAMOT, C., D. C. DRUMMOND, U. GREISER, K. HONG, D. B. KIRPOTIN, J. D. MARKS und J. W. PARK: *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeted Immunoliposomes Mediate Specific and Efficient Drug Delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing Tumor Cells*. *Cancer Research*, 63:3154–3161, 2003.
- [151] JUNGBLUTH, A. A., E. STOCKERT, H. J. S. HUANG, V. P. COLLINS, K. COPLAN, K. IVERSEN, D. KOLB, T. J. JOHNS, A. M. SCOTT, W. J. GULLICK, G. RITTER, L. COHEN, M. J. SCANLAN, W. K. CAVANEE und L. J. OLD: *A Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Overexpression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:639–644, 2003.
- [152] KHALIL, M. Y., J. R. GRANDIS und D. M. SHIN: *Targeting Epidermal Growth Factor Receptor: Novel Therapeutics in the Management of Cancer*. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 3:367–380, 2003.
- [153] RAMAN, D., P. J. BAUGHER, Y. M. THU und A. RICHMOND: *Role of Chemokines in Tumor Growth*. *Cancer Letters*, 256:137–165, 2007.
- [154] SCHOTTELIUS, M. und H. J. WESTER: *Molecular imaging targeting peptide receptors*. *Methods*, 1:1–17, 2009.
- [155] BECKER, A., C. HESSENIUS, K. LICHA, B. EBERT, U. SUKOWSKI, W. SEMMLER, B. WIEDENMANN und C. GROTZINGER: *Receptor-targeted Optical Imaging of Tumors with Near-infrared Fluorescent Ligands*. *Nature Biotechnology*, 19:327–331, 2001.

- [156] KE, S., X. X. WEN, M. GURFINKEL, C. CHARNSANGAVEJ, S. WALLACE, E. M. SEVICK-MURACA und C. LI: *Near-infrared Optical Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer Xenografts*. *Cancer Research*, 63:7870–7875, 2003.
- [157] KOVAR, J. L., W. VOLCHECK, E. SEVICK-MURACA, M. A. SIMPSON und D. M. OLIVE: *Characterization and Performance of a Near-infrared 2-deoxyglucose Optical Imaging Agent for Mouse Cancer Models*. *Analytical Biochemistry*, 384:254–262, 2009.
- [158] CHENG, Z., Y. WU, Z. M. XIONG, S. S. GAMBHIR und X. Y. CHEN: *Near-infrared Fluorescent RGD Peptides for Optical Imaging of Integrin $\alpha(v)\beta 3$ Expression in Living Mice*. *Bioconjugate Chemistry*, 16:1433–1441, 2005.
- [159] LI, H., Z. H. ZHANG, D. BLESSINGTON, D. S. NELSON, R. ZHOU, S. LUND-KATZ, B. CHANCE, J. D. GLICKSON und G. ZHENG: *Carbocyanine Labeled LDL for Optical Imaging of Tumors*. *Academic Radiology*, 11:669–677, 2004.
- [160] MISRA, P., D. LEBECHE, H. LY, M. SCHWARZKOPF, G. DIAZ, R. J. HAJJAR, A. D. SCHECTER und J. V. FRANGIONI: *Quantitation of CXCR4 Expression in Myocardial Infarction Using Tc-99m-labeled SDF-1 Alpha*. *Journal of Nuclear Medicine*, 49:963–969, 2008.
- [161] ZOU, Y. R., A. H. KOTTMANN, M. KURODA, I. TANIUCHI und D. R. LITTMAN: *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. *Nature*, 393:595–599, 1998.
- [162] CHEN, X. Y., P. S. CONTI und R. A. MOATS: *In vivo Near-infrared Fluorescence Imaging of Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ in Brain Tumor Xenografts*. *Cancer Research*, 64:8009–8014, 2004.
- [163] YE, Y. P., S. BLOCH, B. G. XU und S. ACHILEFU: *Design, Synthesis, and Evaluation of Near Infrared Fluorescent Multimeric RGD Peptides for Targeting Tumors*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49:2268–2275, 2006.
- [164] TAN, M. H. und T. M. CHU: *Characterization of the Tumorigenic and Metastatic Properties of a Human Pancreatic Tumor-Cell Line (Aspc-1) Implanted Orthotopically Into Nude-Mice*. *Tumour Biology*, 6:89–98, 1985.
- [165] CORNIL, I., S. MAN, B. FERNANDEZ und R. S. KERBEL: *Enhanced Tumorigenicity, Melanogenesis, and Metastases of a Human-malignant Melanoma After Subdermal Implantation in Nude-mice*. *Journal of the National Cancer Institute*, 81:938–944, 1989.
- [166] NTZIACHRISTOS, V., C. BREMER, E. E. GRAVES, J. RIPOLL und R. WEISSLEDER: *In vivo Tomographic Imaging of Near-infrared Fluorescent Probes*. *Molecular imaging*, 1:82–88, 2002.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Residuales Tumorwachstum nach zweifacher Resektion	2
1.2	Übersicht über aktuelle Verfahren in der <i>molekularen Bildgebung</i>	3
1.3	Schematischer Aufbau und Funktion spezifischer Kontrastmittel	4
1.4	Diagnostisches Fenster	6
1.5	Schematische Darstellung eines Magnetresonanztomographen	7
1.6	T ₁ - und T ₂ -gewichtete MRT - Aufnahmen	9
1.7	Mögliche Zielstrukturen der optischen Bildgebung über NIR-Sonden	14
1.8	Signaltransduktion des EGF-Rezeptors	16
1.9	Schematische Darstellung der Proform des epidermalen Wachstumsfaktors EGF	16
1.10	Aminosäuresequenz des löslichen epidermalen Wachstumsfaktors EGF	17
1.11	Übersicht über die Chemokinrezeptoren mit entsprechenden Liganden	18
1.12	Aminosäuresequenz des <i>stromal derived factor-1 α</i> (SDF-1)	19
1.13	Schematischer Querschnitt durch ein Liposom	21
1.14	Schematische Darstellung der Anreicherung von Liposomen im Tumor- und Normalgewebe	23
2.1	Cholesterol	32
2.2	DSPC	32
2.3	DSPE-PEG	32
2.4	Allgemeine Struktur der Cyaninderivate	34
2.5	IRDye 800CW	35
2.6	Spektrum des IRDye 800CW NHS-Esters	35
3.1	Reaktionsschema während des LDH-Tests	55
3.2	Prinzip der PCR (schematischer Verlauf)	61
3.3	Prinzip der <i>Real Time</i> rt-PCR (schematischer Verlauf)	62
3.4	Bestimmung der C _t -Werte einer <i>Real Time</i> rt-PCR	63
3.5	Aufbau und innere Vernetzung des Polyacrylamidgeles	69
3.6	Schematische Darstellung der Elektrophorese.	71

3.7	Schematische Darstellung der Blot-Apparatur	72
3.8	Übersicht über die Kopplungsmethode.	77
3.9	Ultrafiltration	80
3.10	Fließschema der Liposomen-Herstellung	82
3.11	Liposo Fast Extruder	84
3.12	Überblick über die <i>Laser-Photonen-Korrelationsspektroskopie</i> (PCS)	86
3.13	Photometrische Bestimmung der Eisenkonzentration	88
3.14	Polyethylenterephthalat (PET)-Membran	90
3.15	Jablonski Termschema	92
3.16	Reaktionsschema der Fluoreszenzkopplung	94
3.17	Übersicht über die HPLC-SMART-Anlage	97
3.18	Gelchromatographisches Trennprinzip von Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten	98
3.19	Quantifizierung der Fluoreszenzmesswerte	100
3.20	Verlaufsschema der In-vivo-Versuchsreihen	103
3.21	Falschfarbenskala	103
4.1	Bestimmung der Liposomengröße über die Photonen-Korrelations-Spektroskopie	106
4.2	Bestimmung der physikalischen Stabilität von unpegylierten Liposomen über einen Zeitraum von zwei Wochen anhand der PCS	107
4.3	Bestimmung der unspezifischen Aufnahme von unpegylierten Liposomen im Vergleich zu anderen Eisenoxid-Nanopartikeln in U 343-Gliomazellen	108
4.4	Einfluss des Polyethylenglykol (PEG)-Gehalts auf die unspezifische Aufnahme der Liposomen	109
4.5	Einfluss der Liposomen auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie U 343	111
4.6	Visualisierung von Tumorzellen auf Kunststoffmembranen im MRT	112
4.7	Visualisierung von Tumorzellen im MRT	113
4.8	Visualisierung unterschiedlicher Zelllinien mit und ohne Kontrastmittel	115
4.9	Histochemische Anfärbung intrazellulären Eisenoxids	116
4.10	Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von Cy7 gegenüber IRDye 800 mit zunehmender Konzentration	118
4.11	Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800	119
4.12	Fluoreszenzintensitätskurven von Cy7 und IRDye 800 in Abhängigkeit ihrer Konzentration.	120

4.13	Physiko-chemische Stabilität des Cyaninfarbstoffes IRDye 800 in Gegenwart von A764-Gliomazellen	122
4.14	Aufreinigung der Konjugate über die HPLC-Methode	123
4.15	Genexpressionsmuster tumorspezifischer Rezeptoren und deren Liganden in verschiedenen humanen Tumorzelllinien und Endothelzellen	125
4.16	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des EGF-Rezeptors über EGF-Cy3 auf A764 Gliomazellen	127
4.17	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des SDF-1-Rezeptors über SDF-1-Cy3 auf A764 Gliomazellen	128
4.18	Einfluss der Zellzahl auf die Markierungsintensität der Tumorzellen mit EGF-IRDye 800	129
4.19	Abhängigkeit der Markierungsintensität der Tumorzellen mit SDF-1-IRDye 800 von der Zellzahl	131
4.20	Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität mit steigender Konjugatkonzentration	133
4.21	Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.	135
4.22	Kompetitive Verdrängung der Konjugate	137
4.23	Einfluss der Konjugate auf das Proliferationsverhalten der Gliomazelllinie A764	138
4.24	Überprüfung selektiver Zellschädigung durch Fluoreszenzkonjugate	140
4.25	Biologische Aktivität	142
4.26	Aktivitätsbestimmung der Dipeptidylpeptidase IV	143
4.27	Einfluss der DPP IV auf die biologische Aktivität des EGF und SDF-1 sowie deren Konjugate	144
4.28	Verlaufsschema der In-vivo-Versuchsreihen	145
4.29	Pellets der verwendeten Futterarten	147
4.30	Ausscheidung (<i>clearance</i>) von IRDye 800	147
4.31	In-vivo-Detektion von Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zeit	149
4.32	In-vivo-Detektion von Mammakarzinomzellen (MCF7) durch SDF-1-IRDye 800 im Vergleich zu RGD-IRDye 680	151
4.33	In-vivo-Detektion von Tumorzellen durch SDF-1-IRDye 800 im Vergleich zu RGD-IRDye 680	153
5.1	EPR-Effekt	157

Tabellenverzeichnis

1.1	Vergleich von Bildgebungsverfahren	5
2.1	Übersicht über verwendete Chemikalien	27
2.2	Übersicht über verwendete Antikörper	29
2.3	Übersicht über verwendete DNA - und Proteinstandards	30
2.4	Übersicht über verwendete Enzyme	30
2.5	Übersicht über verwendete TaqMan - Primer	30
2.6	Übersicht über verwendete Eisenoxid - Nanopartikel	31
2.7	Übersicht über verwendete Liposomen - Membranbestandteile	32
2.8	Übersicht über verwendete Fluoreszenzmarker	33
2.9	Übersicht über die Cyaninfarbstoffe	34
2.10	Übersicht über IRDye 800CW NHS - Ester	34
2.11	Übersicht über verwendete Testsysteme	35
2.16	Übersicht über die Verbrauchsmaterialien	40
2.17	Übersicht über die verwendeten Geräte	42
3.1	Übersicht über die verwendeten etablierten humanen Zelllinien	45
3.2	Pipettierschema Mykoplasmen - PCR	53
3.3	Pipettierschema Proliferationsassay	58
3.4	Pipettierschema <i>Real Time</i> rt - PCR	64
3.5	Thermocycler - Programm (<i>Real Time</i> rt - PCR)	65
3.6	Pipettierschema Proteinbestimmung nach Bradford	68
3.7	Zusammensetzung von Trenn - und Sammelgel bei der SDS - PAGE	70
3.8	Lipidmembran - Zusammensetzung der verwendeten Liposomen	83
3.10	Übersicht SMART - Anlage	97
3.11	Übersicht über die Superdex Peptide PC 3.2/30 Trennsäule	98
3.12	Messparameter LiCor Odyssey - Infrared Imaging System	100

Publikationen, Vorträge und Poster

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Meincke, M.; T. Schlorf; E. Kossel; O. Jansen; C. C. Glüer und R. Mentlein: *Iron-oxide loaded liposomes for MR imaging*. *Frontiers in Bioscience* 13, 4002-4008 (2008)

Meincke, M.; S. Tiwari; D. Emme; T. Schlorf; R. Mentlein und H. Kalthoff: *Tumor Cell Detection by Near-Infrared Optical Imaging*. Konferenz: Medizinische Akademie Sechenow, Moskau/Russland (1. Preis) (2008)

Meincke, M.; T. Schlorf; E. Kossel; C. C. Glüer und R. Mentlein: *Liposomen für die Molekulare Bildgebung*. Vortrag Kiel (UK-SH) (2007)

Meincke, M.; S. Tiwari; D. Emme; T. Schlorf; R. Mentlein und H. Kalthoff: *Tumor Cell Detection by Near-Infrared Optical Imaging*; Vortrag Hamburg (UKE) (2007)

Schlorf, T.; M. Meincke und R. Mentlein: *Nanopartikel für die Molekulare Bildgebung* Vortrag, Hamburg (UKE) (2007)

Meincke, M.; T. Schlorf; E. Kossel; O. Jansen; C. C. Glüer und R. Mentlein: *Iron Oxide Loaded Liposomes For Magnetic Resonance Imaging*. Poster, Kiel, Workshop: Molekulare Bildgebung (2007)

Meincke, M.; H. Kalthoff; R. Mentlein und S. Tiwari: *Detection of tumor cells by near-infrared (NIR)-fluorescent peptides*. Poster, Dresden, Workshop: Molekulare Bildgebung (2008)

Schlorf, T.; M. Meincke; E. Kossel; C. C. Glüer; O. Jansen und R. Mentlein: *Novel functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for molecular imaging of angiogenesis*. Poster, Kiel, Workshop: Molekulare Bildgebung (2007)

Patentantrag:

Meincke, M.; S. Tiwari; H. Kalthoff und R. Mentlein: *Near-infrared molecular imaging of tumors via chemokine receptors CXCR4 and CXCR7* (2009)

Eingeworbene Drittmittel:

Meincke, M.; S. Tiwari: *Detektion von Tumorzellen durch Nah-Infrarot (NIR)-fluoreszierende Peptid-Konjugate*; Werner und Klara Kreitz-Stiftung (2008)

Danksagung

Zu guter Letzt bleibt, DANKE zu sagen.

Zunächst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. R. Mentlein bedanken. Rolf, Du hast mir nicht nur ein besonderes und vielseitiges Thema vorgeschlagen, sondern vor allem mich durch Deine offene Art in eine wissenschaftliche Welt eingeführt und für drei Jahre begleitet. Für Deinen wissenschaftlichen Beistand möchte ich Dir sehr danken.

Ebenso danke ich Professor Dr. E. Beitz für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein großer Dank gilt auch dem Direktorium des Anatomischen Instituts: Professor Dr. J. Sievers, Professor Dr. R. Lucius und Professor Dr. Dr. M. Schünke für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Anatomie anzufertigen und alle Räumlichkeiten und Geräte nutzen zu dürfen. Professor Dr. H. Kalthoff, Professor Dr. C.C. Glüer und deren Mitarbeiter danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen in Ihren Einrichtungen. Für die finanzielle Unterstützung möchte ich dem Wirtschaftsministerium Schleswig Holstein (MOIN-Projekt) sowie der Klara Kreitz Stiftung danken. Die Durchführung der Versuche wurde dadurch erst ermöglicht.

Ein herzliches Dankeschön geht an Martina, Miri und Ulla. Eure Unterstützung war stets eine wertvolle Hilfe. Ein besonderer Dank geht an meine Bürokollegen Daniel, Thomas, Aljona und Susanne für die vielen lustigen, interessanten und auch fachlichen Diskussionen. Die gemeinsamen Mittagsrunden in der Mensa werde ich vermissen. Auch Dir, Sanjay (Sunshine), vielen Dank für die schöne Zeit in der Onkologie. Mit Dir fahre ich immer wieder gerne nach Dresden.

Ein großes Dankeschön geht an Moni, Jonathan, Michel, Daniel und ganz besonders an Torge für Euer kritisches Korrekturlesen. Ihr habt Euch prima ergänzt! Vielen Dank.

Über alles möchte ich aber Dir, André, danken! Ohne Dich wäre diese Arbeit nie so geworden, wie sie jetzt ist! Von ganzem Herzen DANKE!

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, auf Eure Unterstützung konnte ich mich immer verlassen. Ihr habt wesentlich zum Gelingen meines Studiums und zu dieser Arbeit beigetragen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 10 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema

Molekulare Bildgebung:
Die Detektion von Tumoren über
Nahinfrarot-Sonden sowie magnetische Liposomen

selbständig und, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Manuela Meincke

