

**Charakterisierung der Leukozytensubpopulationen
nach magnetischer Tumorzeldepletion**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Bianca Müller

geboren am 16.10.1984 in Leinefelde

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus, Jena
2. Dr. rer. nat. Tim Liebert, Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Werner Weitschies, Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.05.2012

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity = antikörperabhängige, zelluläre Zytotoxizität
APC	antigen presenting cell = antigenpräsentierende Zelle
APC-Gen	Adenomatosis polyposis coli-Gen
BRCA 1/2	Breast Cancer 1/2 Gen
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
CMCu	Carboxymethyl-Curdlan
CMD	Carboxymethyl-Dextran
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal calf serum = fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	forward angle light scatter
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
IFN	Interferon
IgA/E/G/M	Immunglobulin A/E/G/M
IL	Interleukin
L	Ligand
LSC	Laser Scanning Cytometry
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7 (Brustkrebszelllinie)
mg	Milligramm (1×10^{-3} g)
MHC I/II	major histocompatibility complex I/II

µl	Mikroliter (1 x 10 ⁻⁶ l)
µm	Mikrometer (1 x 10 ⁻⁶ m)
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
ml	Milliliter (1 x 10 ⁻³ l)
MR-	Magnetresonanz-
MRT	Magnetresonanztomographie
NF	Negativfraktion
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer (1 x 10 ⁻⁹ m)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-Puffer)
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Puffer	Phosphate Buffered Saline + 2mmol EDTA
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PF	Positivfraktion
PI	Propidiumiodid
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s.	siehe
SSC	side angle lighth scatter
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TH1/2	T-Helferzelle 1/2
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen/Minute
U/ml	Unit/Milliliter
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Prinzip der magnetbasierten Tumorzelldepletion	13
Abb. 2	Modell eines magnetischen Nanopartikels mit CMD-Hülle	26
Abb. 3	Strukturformel des α -(1,6)-glycosidisch verknüpften Dextrans	28
Abb. 4	Strukturformel der β -(1,4)-glycosidisch verknüpften Cellulose	28
Abb. 5	Strukturformel des β -(1,3)-glycosidisch verknüpften Curdlans	29
Abb. 6	MACS-System	33
Abb. 7	Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS)	34
Abb. 8	Aufbau eines einfachen Durchflusszytometers	38
Abb. 9	FACS-analytische Darstellung der Leukozytensubpopulationen in Form eines Dot Plots	39
Abb. 10	FACS-analytische Darstellung der Lymphozytensubpopulationen in Form eines Dot Plots	40
Abb. 11	FACS-analytisches Ergebnis eines Apoptoseassays in Form eines Dot Plots (schematisierte Darstellung)	41
Abb. 12	Transmissions-Elektronenmikroskopie von MCF-7-Zellen nach Inkubation mit CMD-Nanopartikeln	44
Abb. 13	Transmissions-Elektronenmikroskopie uranyl-markierter magnetischer Nanopartikel mit CMD-Hülle	46
Abb. 14	Kinetik der Partikelaufnahme für Leukozyten im Zeitverlauf	47
Abb. 15	Absolute Zellzahlen in den Fraktionen nach der MACS-Separation	48
Abb. 16	Darstellung der Leukozytensubpopulationen in Negativ- und Positivfraktion aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten	50/51
Abb. 17	Kinetik der Partikelaufnahme aufgeschlüsselt nach Leukozytensubpopulationen im Zeitverlauf	52
Abb. 18	Darstellung der Leukozytensubpopulationen im Zeitverlauf	52
Abb. 19	Kinetik der Lymphozytensubpopulationen im Zeitverlauf aufgeschlüsselt nach Fraktionen	56
Abb. 20	Kinetik der Aufnahme magnetischer Nanopartikel mit unterschiedlichen Polysaccharidhüllen in Leukozyten	58

Abb. 21	Absolute Zellzahl in den Fraktionen nach der MACS-Separation aufgeschlüsselt nach der Art der Partikelhülle	59
Abb. 22	Leukozytensubpopulationen nach Inkubation mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln aufgeschlüsselt nach Fraktionen	62
Abb. 23	Lymphozytensubklassen nach Inkubation mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln aufgeschlüsselt nach Fraktionen	66
Abb. 24	Lymphozytensubklassen nach Inkubation mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln: Vergleichende Darstellung der absoluten Zellzahlen	67
Abb. 25	Kinetik der Partikelaufnahme durch Leukozyten von Tumorpatientinnen im Zeitverlauf	70
Abb. 26	Absolute Zellzahlen in den Fraktionen nach der MACS-Separation (Ergebnisse für Patientenproben)	71
Abb. 27	Ergebnisse der MACS-Separation – Vergleich zwischen gesunden Probanden und Mammakarzinompatientinnen	71
Abb. 28	Darstellung der Leukozytensubpopulationen in Negativ- und Positivfraktion aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten (Patientenproben)	73
Abb. 29	Kinetik der Partikelaufnahme aufgeschlüsselt nach Leukozytensubpopulationen im Zeitverlauf (Patientenproben)	74
Abb. 30	Ergebnisse der FACS-Analyse – Vergleich zwischen gesunden Probanden und Mammakarzinompatientinnen	76
Abb. 31	Kinetik der Lymphozytensubpopulationen im Zeitverlauf aufgeschlüsselt nach Fraktionen (Patientenproben)	79
Abb. 32	Kinetik der Nanopartikelaufnahme durch die Lymphozytensubpopulationen – Vergleich der Ergebnisse von gesunden Spendern und Tumorpatienten	80
Abb. 33	Lymphozytenkultur - Ergebnisse der durchflusszytometrischen Apoptosetests	83
Abb. 34	Lymphozytenkultivierung (Kultur A) – Fotografische Verlaufsdocumentation	84
Abb. 35	Lymphozytenkultivierung (Kultur B) – Fotografische Verlaufsdocumentation	85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Materialien zur Umhüllung von Nanopartikeln	27
Tab. 2	Verwendete Chemikalien, Puffer und Nährmedien	29/30
Tab. 3	Verwendete Antikörper	30
Tab. 4	Verwendete Laborgeräte und Hilfsmittel	30
Tab. 5	Verwendete PC-Programme	31
Tab. 6	Absorptions- und Emissionsmaxima gebräuchlicher Fluorochrome	37
Tab. 7	Kultur A: Zellzahl im Zeitverlauf	83
Tab. 8	Kultur B: Zellzahl im Zeitverlauf	83

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
1.1. Tumorentstehung und Metastasenbildung	4
<i>1.1.1. Tumorigenese</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. Metastasierung</i>	<i>4</i>
1.2. Zirkulierende Tumorzellen	5
1.3. Nanotechnologie	7
<i>1.3.1. Nanomaterialien</i>	<i>7</i>
<i>1.3.2. Anwendungsbereiche in der Biomedizin</i>	<i>9</i>
<i>1.3.3. Interaktion von Nanoteilchen mit zellulären Strukturen</i>	<i>10</i>
1.4. Zellseparationsverfahren und Detektion zirkulierender Tumorzellen	11
<i>1.4.1. Ausblick: Zukünftige Krebstherapie mittels magnetischer Tumorzelledepletion</i>	<i>12</i>
1.5. Leukozyten	13
1.5.1. Granulozyten	14
1.5.1.1. Neutrophile Granulozyten	14
1.5.1.2. Eosinophile Granulozyten	14
1.5.1.3. Basophile Granulozyten	15
1.5.2. Monozyten	15
1.5.3. Lymphozyten	16
1.5.3.1. T-Lymphozyten	17
<i>CD4-positive Zellen/T-Helferzellen</i>	<i>18</i>
<i>Zytotoxische T-Zellen</i>	<i>19</i>
<i>Regulatorische T-Zellen/T-Suppressorzellen</i>	<i>19</i>
<i>Gedächtniszellen</i>	<i>20</i>
1.5.3.2. B-Lymphozyten	20
1.5.3.3. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	21
1.6. Immunsystem und Tumorabwehr	22

1.6.1. Überblick über den Aufbau des menschlichen Immunsystems	22
1.6.2. Immunologische Vorgänge bei der Abwehr von Tumoren	23
1.7. Zielstellung der Arbeit	25
2. MATERIALIEN	26
2.1. Leukozyten	26
2.2. Nanopartikel und Hüllstoffe	26
2.2.1. Struktur und Eigenschaften der Nanopartikel	26
2.2.2. Hüllstoffe	27
2.2.2.1. Dextran	27
2.2.2.2. Cellulose	28
2.2.2.3. Curdlan	29
2.3. Chemikalien, Puffer und Nährmedien	29
2.4. Antikörper	30
2.5. Laborgeräte und Hilfsmittel	30
2.6. PC-Programme	31
3. METHODEN	31
3.1. Reumhüllung von magnetischen Nanopartikeln	31
3.2. Leukozytenisolierung aus Vollblut	32
3.3. Zellzahlbestimmung mittels Coulter® Z2	32
3.4. Magnetische Zellseparation (MACS)	32
3.4.1. Magnetische Markierung und Separation der Leukozyten - Aufnahme einer Kinetik	35
3.4.2. Isolierung der T-Zellen zur Lymphozytenkultivierung mittels MACS	36
3.5. Durchflusszytometrie (FACS)	37
3.5.1. Analyse der Leukozytensubpopulationen mittels FACS	38
3.5.2. Analyse der Lymphozytensubpopulationen mittels FACS	39
3.5.3. Apoptoseassay mittels FACS	40
3.6. Lymphozytenkultivierung	42
3.7. Statistische Methoden	43
4. ERGEBNISSE	44
4.1. Charakterisierung der Leukozytensubpopulationen nach Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-umhüllten Nanopartikeln	46
4.1.1. Fraktionen nach der MACS-Separation	46

4.1.2. <i>Ergebnisse der FACS-Analyse – Darstellung der Leukozytensubpopulationen.</i>	50
4.2. Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen nach Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-umhüllten Nanopartikeln	55
4.3. Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-, CMC- und CMCu-umhüllten Nanopartikeln – Vergleich der Verteilung der Leukozytensubpopulationen in den Fraktionen	57
4.3.1. <i>Fraktionen nach der MACS-Separation</i>	58
4.3.2. <i>Ergebnisse der FACS-Analyse – Darstellung der Leukozytensubpopulationen.</i>	61
4.4. Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-, CMC- und CMCu-umhüllten Nanopartikeln – Vergleich der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen in den Fraktionen	65
4.5. Charakterisierung der Leukozytensubpopulationen nach Inkubation der Leukozyten von Mammakarzinompatientinnen unter Herceptin-Therapie mit CMD-umhüllten Nanopartikeln	69
4.5.1. <i>Fraktionen nach der MACS-Separation</i>	69
4.5.2. <i>Ergebnisse der FACS-Analyse – Darstellung der Leukozytensubpopulationen.</i>	72
4.5.3. <i>Vergleich der FACS-Ergebnisse von gesunden Probanden mit den Patientendaten</i>	75
4.6. Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen nach Inkubation der Leukozyten von Mammakarzinompatientinnen unter Herceptin-Therapie mit CMD-umhüllten Nanopartikeln	78
4.6.1. <i>Vergleich der Ergebnisse von gesunden Probanden mit den Patientendaten</i>	80
4.7. Kultivierung der Lymphozyten der Negativfraktion nach Inkubation mit CMD-umhüllten Nanopartikeln und magnetischer Zellseparation	81
5. DISKUSSION	87
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	98

LITERATURVERZEICHNIS**ANHANG**

Zusammenfassung

Vom Primum in die Zirkulation entlassene disseminierte Tumorzellen werden als eine der Hauptursachen für die hämatogene Metastasierung von Malignomen angesehen. Ausgehend von der Prämisse, dass eine Reduktion der Anzahl zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut von Krebspatienten mit einer Abnahme des Metastasenrisikos verbunden ist, erscheint es erstrebenswert, Verfahren zur Depletion dieser Zellpopulation zu entwickeln. Insbesondere die magnetbasierte Zellseparation unter Verwendung polysaccharidumhüllter eisenhaltiger Nanopartikel hat sich für diese Zwecke als geeignet erwiesen. Es ist bekannt, dass Partikel mit einer Größe im Nanometerbereich von Zellen über endozytotische Vorgänge inkorporiert werden können. Dabei führt die Umhüllung der Nanoteilchen mit Dextran-Derivaten zu einer zelltypspezifischen Interaktion. So zeigen Tumorzellen in der Regel eine rasche Aufnahmekinetik für derartige Partikel, während Leukozyten durch eine vergleichsweise langsame Interaktion mit denselben charakterisiert sind, wodurch eine magnetbasierte Separation der beiden Zellpopulationen möglich wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die nach der Magnetseparation von Tumorzellen „gereinigten“ Leukozyten, die zusammen mit den Malignomzellen abgereicherten Leukozyten und den Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und der sich anschließenden Separationsprozedur auf die weißen Blutzellen näher zu analysieren, da eine größtmögliche Schonung der immunkompetenten Zellen eine der grundlegenden Voraussetzungen für die Anwendbarkeit eines solchen Verfahrens am Patienten darstellt. Die Untersuchungen erfolgten an mittels Erythrozytenlyse isolierten Leukozyten aus dem Vollblut gesunder Spender sowie an Leukozyten aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen.

Um die Kinetik der Partikelaufnahme durch die weißen Zellen und diesbezüglich bestehende Unterschiede zwischen den verschiedenen Subklassen näher zu charakterisieren und um zu überprüfen, ob die Verteilung der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen durch Inkubation und Separation verändert wird, wurden zunächst Inkubationsversuche mit CMD-umhüllten Nanopartikeln an Leukozyten gesunder Spender vorgenommen. Die Zellen wurden dazu über definierte Zeiträume mit den Partikeln inkubiert und anschließend mittels MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) separiert. In der FACS-Analyse wurden die erhaltenen Negativ- (unmarkierte Zellen) und Positivfraktionen (mit Partikeln beladene Leukozyten) hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten untersucht. Es zeigte sich, dass die Verteilung der Leuko- und Lymphozytensubpopulationen in der Negativfraktion durch die Separationsprozedur nicht wesentlich verändert wird, womit

man der Möglichkeit einer Retransfusion dieser von Tumorzellen „gereinigten“ Leukozyten an den Patienten ohne schwerwiegende Beeinflussung des Immunstatus deutlich näher käme. Der Abgleich dieser Daten mit unter Verwendung von Leukozyten aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen gewonnenen Ergebnissen zeigte ein sehr ähnliches Bild für den Zeitverlauf von Negativfraktion, Positivfraktion und Verlustrate bei der MACS-Separation. Die FACS-Analyse wies dann jedoch mehrere, wahrscheinlich durch Krankheit oder Therapie bedingte, Unterschiede in der Verteilung der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen zwischen beiden Gruppen nach. Daher erscheint es ratsam, Daten, welche ausschließlich unter Verwendung peripheren Blutes gesunder Probanden gewonnen wurden, weiterhin anhand von Patientenstichproben zu verifizieren.

Da bekannt ist, dass die Art und die Struktur der Polysaccharidhülle das Interaktionspotential zwischen magnetischen Nanopartikeln und Tumorzellen bzw. Leukozyten mitbestimmen, sollte des Weiteren untersucht werden, ob verschiedene Hüllstrukturen auch innerhalb der Leukozytenpopulation zu Unterschieden bezüglich der Beladung der Zellen mit den Partikeln führen oder die Verteilung der Leukozytensubpopulationen nach der magnetischen Zellseparation beeinflussen. Dabei kamen die Polysaccharide Carboxymethyl-Dextran (CMD), Carboxymethyl-Cellulose (CMC) und Carboxymethyl-Curdlan (CMCu) als Hüllstoffe zum Einsatz. Die Ergebnisse der im Anschluss an die MACS-Separation durchgeführten FACS-Analyse wiesen deutliche Unterschiede bezüglich der Beladungsraten der Leukozyten zwischen den jeweiligen Partikelarten auf. Die im Vergleich mit CMD höheren (CMC) oder deutlich niedrigeren (CMCu) Aufnahmeraten fanden sich dann jedoch für alle Leukozytensubpopulationen bei Inkubation mit der jeweiligen Partikelart wieder. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Arbeiten unterstreicht auch die vorliegende Dissertation die Favorisierung von Carboxymethyl-Dextran als Hüllstoff für zur magnetischen Tumorzelldepletion verwendete Nanopartikel.

Eine Anwendung der magnetischen Tumorzelldepletion *in vivo* müsste die zelluläre Integrität der Leukozyten in der Negativfraktion und deren biologische Aktivität nach der Separation gewährleisten. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals versucht werden, die T-Lymphozyten der Negativfraktion nach Inkubation und Separation unter Einsatz des Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expanders weiterzukultivieren, was bedingt gelang. Die erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Leukozyten nach der Separation vital und funktionstüchtig sind. Um diesbezüglich eine definitive Aussage treffen zu können, müssen jedoch noch umfassendere Untersuchungen erfolgen.

1. Einleitung

In den letzten Jahren werden die Mitglieder der Ärzteschaft zunehmend häufiger mit der schwierigen Aufgabe konfrontiert, einem Patienten mitteilen zu müssen, dass dieser an einem malignen Tumorleiden erkrankt ist. So erhielten allein im Jahr 2006 insgesamt 426800 Menschen in Deutschland (Husmann et al. 2010) die Diagnose „Krebs“. Bei den Betroffenen und ihren Angehörigen weckt diese Nachricht neben Ängsten vor eingreifenden therapeutischen Maßnahmen und deren Nebenwirkungen auch Befürchtungen um das eigene Leben oder das eines geliebten Menschen. Tatsächlich nehmen die malignen Erkrankungen den zweiten Platz der Todesursachenstatistik hinter Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems ein. So erlagen laut statistischem Bundesamt im Jahr 2008 insgesamt 221920 Patienten ihrem Tumorleiden, was 26,3% aller Todesfälle desselben Jahres ausmacht. Weiterhin ist die Inzidenz der Neuerkrankungen in den letzten 25 Jahren drastisch angestiegen (seit 1980 bei Frauen um 35%, bei Männern sogar um 80%) (Bertz et al. 2010). Diese Zahlen verdeutlichen, dass maligne Tumoren eines der größten medizinischen Probleme in der westlichen Welt darstellen. Neben der besonderen Heimtücke der Erkrankung mit ihrem oft symptomarmen Beginn, welcher dazu führt, dass am Diagnosezeitpunkt häufig schon der gesamte Organismus angegriffen und mit Metastasen besiedelt ist, wird die Problematik durch das Fehlen „DER Therapie gegen Krebsleiden“ verkompliziert. So stehen heute zwar zahlreiche etablierte und wirksame Strategien zur Bekämpfung von Tumoren zur Verfügung (neben operativem Vorgehen, Radiotherapie und Chemotherapie mit Zytostatika auch neuere Substanzen, wie z.B. monoklonale Antikörper oder Tyrosinkinaseinhibitoren) und vielen Patienten kann dadurch geholfen werden, es gibt jedoch keine standardisierte Therapie, die eine Heilung garantiert. Ein besonderes Problem stellen dabei die Tochtergeschwülste der malignen Tumore dar, welche auch noch Jahre nach erfolgreicher Behandlung der Primärerkrankung zu Rezidiven und damit häufig auch zum Tod der Betroffenen führen können. Angesichts dieser Fakten wird verständlich, warum die Aufklärung von Mechanismen der Tumorentstehung und Metastasierung, die Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten und nicht zuletzt die Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen und Strategien bei malignen Erkrankungen weiterhin Gegenstand intensiver Forschung sind.

1.1. Tumorentstehung und Metastasenbildung

1.1.1. Tumorigenese

Die Tumorigenese ist ein äußerst komplexes und multifaktorielles Geschehen (Weinberg 1989, Sugimura 1992). Maligne Neoplasien entstehen durch klonale Teilung aus einer einzigen entarteten Zelle. Die Vermehrung von Tumorzellen ist durch eine Störung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen normaler Zellteilung, daraus resultierendem Wachstum und dem programmierten Zelltod, der Apoptose, gekennzeichnet. Außerdem entziehen sich bösartige Tumore jeglicher Steuerung durch Kontroll- und Regulationsmechanismen des physiologischen Wachstums, wie z.B. der Kontakthemmung (Fölsch et al. 2000). Die Ursachen, welche die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Krebszelle bedingen können, sind vielfältig. Neben diversen chemischen Verbindungen (z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Nitrosamine), physikalischen Noxen (v.a. ionisierende Strahlen und UV-Strahlen) und biologischen Kanzerogenen (v.a. onkogene Viren), kann auch eine ererbte Disposition (z.B. das APC-Gen oder die Gene BRCA1 und BRCA2 betreffend) bedeutsam sein. Letztendlich wird die maligne Transformation einer Zelle durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen, aufgrund der Einwirkung der zuvor genannten Faktoren, bei gleichzeitigem Versagen der physiologischen DNA-Reparaturmechanismen ausgelöst. Während dieses oft Jahre oder auch Jahrzehnte dauernden Vorgangs können Onkogene aktiviert werden oder es kommt zum Ausfall von Tumorsuppressorgenen. Diesen in der Evolution hoch konservierten Genen werden wichtige Funktionen als Rezeptoren, Signalmoleküle oder Zellzyklus-Kontrollproteine bei der Regulation des physiologischen Wachstums und der normalen Entwicklung zugeschrieben (Croce 2008). Deshalb führen Veränderungen im Bereich dieser Gene zu anomaler Gewebedifferenzierung und anomaler Zellproliferation (Riede et al. 2004). Die typischen Kennzeichen der Malignome sind daher schnelles, unkontrolliertes und destruierendes Wachstum mit Infiltration des umgebenden Gewebes und Invasion in entfernte Regionen des Organismus (Metastasierung), Immortalisierung der Zellen, Ausbildung entdifferenzierter Gewebemuster, Vorhandensein vieler Mitosen, Aneuploidie und eine zu Gunsten des Nukleus verschobene Kern-Plasma-Relation.

1.1.2. Metastasierung

Der größte Teil der Krebspatienten (ca. 90%) verstirbt nicht am Primärtumor, sondern an dessen Metastasen (Fidler 2002, Gupta und Massaguè 2006). Diese entstehen im Verlauf eines komplexen kaskadenartigen Prozesses, der bis heute noch nicht in allen Einzelheiten

verstanden ist (Chambers et al. 2002, Vlems et al. 2003, Wittekind und Neid 2005). Die Absiedlung maligner Zellen aus dem Primärtumor und Verschleppung derselben über Blut- oder Lymphbahnen in andere Regionen des Körpers führen bei Auffinden einer Nische mit geeignetem Mikromilieu zum Anwachsen der disseminierten Tumorzellen (Fidler et al. 2007, Fidler und Poste 2008, Geiger und Peeper 2009). Durch klonale Proliferation der abgesiedelten Zellen kommt es über die Zwischenstufe der nur histologisch nachweisbaren Mikrometastase zur Ausbildung manifester Makrometastasen fern vom Ort der primären Neoplasie. Insgesamt ist der Prozess der Metastasierung jedoch hochgradig ineffizient. Weniger als 0,01% der millionenfach in die Zirkulation entlassenen Tumorzellen sind in der Lage, alle Schritte der Metastasenkaskade erfolgreich zu durchlaufen, dabei der Abwehr durch das menschliche Immunsystem zu entgehen und schließlich neoplastische Absiedlungen in anderen Körperregionen zu bilden (Liotta und Stetler-Stevenson 1991, Castells und Rustgi 1995). Während dieses Vorganges kommt es infolge des hohen Selektionsdruckes zur Akkumulation weiterer Veränderungen im Genom der malignen Zellen, sodass sich die entstehenden Tochtergeschwülste in ihrer Differenzierung und Aggressivität deutlich vom Primärtumor unterscheiden können, was häufig auch ihre Resistenz gegenüber primär angewandten Therapiestrategien bedingt.

1.2. Zirkulierende Tumorzellen

Disseminierte vom Primum in die Zirkulation entlassene Tumorzellen werden heute als eine Hauptursache der Metastasenbildung angesehen (Liotta et al. 1974, Vlems et al. 2003, Gupta und Massaguè 2006). Dabei handelt es sich um Zellen epithelialer Herkunft, welche nicht im Blut von gesunden Probanden nachweisbar sind (Pachmann et al. 2005). Im Blut von Krebspatienten finden sie sich zwischen den normalen hämatogenen Zellen in einer Häufigkeit von 10^{-3} bis 10^{-7} (Pachmann et al. 2001). Sobald das Tumorgewebe Anschluss an die Blut- oder Lymphbahnen des Wirtsorganismus gefunden hat, können maligne Zellen in die Zirkulation gelangen und dort längerfristig verweilen oder sich in anderen Regionen des Körpers absiedeln. Im Tierversuch konnten Butler und Gullino bereits 1975 nachweisen, dass selbst kleine Neoplasien (1-2 cm im Durchmesser) pro Tag mehrere Millionen Zellen in die Blutbahn abgeben (Butler und Gullino 1975). Die Zahl der disseminierten Tumorzellen steigt mit der Zunahme des Tumorgewichtes kontinuierlich an (Liotta et al. 1974). Auch erhöht sich die Menge maligner Zellen in der Zirkulation nach Manipulationen am Tumor, wie z.B. operativen Eingriffen (Camara et al. 2006). Bereits der Nachweis einer einzigen neoplastischen Zelle pro Kubikmillimeter Blut entspricht etwa fünf Millionen Tumorzellen im

Gesamtblut des Patienten (Weiss et al. 1982). Ein Großteil der epithelialen Zellen geht im Blutstrom rasch zu Grunde. Einige haben jedoch stammzellähnliche Eigenschaften, die sie befähigen, auch nach vollständiger Entfernung des Primärtumors über längere Zeiträume (unter Umständen über Jahre) in einer Art Ruhezustand in der Zirkulation zu verweilen (Meng et al. 2004, Pachmann 2005). Diese Zellpopulation dürfte somit eine Ursache für Erkrankungsrezidive nach erfolgreicher Therapie des Primums und jahrelanger Tumorfreiheit darstellen. Ein Hinweis darauf ist ein Wiederanstieg der disseminierten epithelialen Zellen im peripheren Blut der Patienten (Lobodasch et al. 2007, Pachmann et al. 2008a, Pachmann et al. 2008b). Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Venenblut ist heute über verschiedene Verfahren relativ einfach realisierbar. Dazu gehören zytometrische Methoden, wie Laser Scanning Cytometry (LSC) (Compucyte Corporation), CellSearch (Veridex™) oder EPISPOT. Auch die Analyse von Alterationen der DNA mittels RT-PCR ist möglich. Oft ist zuvor eine Anreicherung der Tumorzellen über eine magnetische Zellseparation (MACS) (Miltenyi Biotec GmbH) oder mittels einer Dichtegradientenzentrifugation von Nöten (Mostert et al. 2009). Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Malignompatienten sowie regelmäßige Kontrollen derselben im Therapieverlauf wichtige diagnostische und prognostische Hinweise geben können. So ist beispielsweise ein Wiederanstieg der disseminierten epithelialen Zellen zum Ende einer adjuvanten Chemotherapie als Zeichen für eine schlechte Prognose des Patienten, verbunden mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für ein frühes Rezidiv, zu werten (Lobodasch et al. 2007, Pachmann et al. 2008a, Pachmann et al. 2008b). Für zahlreiche Tumoren, darunter das Mamma- und das Kolonkarzinom, ist ein negativer Zusammenhang zwischen einer hohen bzw. im Therapieverlauf nicht rückläufigen Zahl an zirkulierenden Tumorzellen und einer verminderten Überlebensrate belegt (Diel et al. 1996, Braun und Pantel 2000, Cohen et al. 2008, Molnar et al. 2008). Cristofanilli et al. definieren die Anzahl der im Blut zirkulierenden Tumorzellen vor Behandlungsbeginn sogar als unabhängigen prognostischen Faktor bezüglich der Länge der krankheitsfreien Zeit und der absoluten Überlebenszeit bei Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs (Cristofanilli et al. 2004). Auch ist das regelmäßige Monitoring der epithelialen Zellen im peripheren Blut geeignet, um frühzeitig Therapieversager zu erkennen, entsprechend zu reagieren und damit möglicherweise das Outcome für die betreffenden Patienten zu verbessern. Da nach dem aktuellen Stand der Forschung die Reduktion der Menge an zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Krebskranken mit einer Abnahme des Metastasenrisikos einhergehen sollte,

erscheint es sinnvoll, Verfahren zu entwickeln, die in der Lage sind, die disseminierten Zellen aus der Zirkulation herauszufiltern.

1.3. Nanotechnologie

Teilchen und Strukturen mit einer Größe im Nanometerbereich, ihre Herstellung, die Analyse und Nutzung ihrer spezifischen Eigenschaften sowie ihre Weiterbearbeitung und Anwendung sind in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der wissenschaftlichen Arbeit und Forschung unterschiedlichster Fachgebiete gerückt. Dabei stehen die einzigartigen Eigenschaften der Nanomaterialien im Mittelpunkt des Interesses. So sind bestimmte optische Besonderheiten, der Superparamagnetismus oder auch das besonders hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnis und die daraus resultierende hohe chemische Reaktivität nur bei nanoskaligen Partikeln anzutreffen (Mailänder und Landfester 2009). Der Begriff des Nanopartikels findet sich in der Literatur etwa seit den 1970er Jahren. Bis heute ist allerdings nicht klar definiert, bis zu welcher Größe man von einem Nanopartikel sprechen sollte. So bezeichnen einige Autoren lediglich Teilchen im Bereich von 1 bis 10 nm als Nanopartikel, andere schließen Teilchen bis zu einer Größe von 1000 nm in diese Definition mit ein (Huber 2005). Am häufigsten wird der Begriff jedoch für Partikel mit einem Durchmesser zwischen 1 und 200 nm verwendet. Damit liegen die meisten Nanomaterialien größenmäßig in Dimensionen, die mit denen biologischer Strukturen, wie z.B. Zellen (10-100 μm), Viren (20-450 nm), Proteinen (5-50 nm) oder Genen (2-100 nm), vergleichbar sind (Pankhurst et al. 2003). Vielfältige Anwendungsmöglichkeiten erhofft man sich zukünftig auf den Gebieten der Elektronik, der Biotechnologie und Pharmakologie sowie in der Medizin (Salata 2004, Lu et al. 2007).

1.3.1. Nanomaterialien

Unterschiedlichste Arten von Materialien mit einer Größe im Nanometerbereich müssen voneinander differenziert werden. Zunächst kann man die Teilchen hinsichtlich ihrer geometrischen Formgebung unterscheiden. Neben Nanopartikeln in Kugelform finden sich Nanokristalle, Nanoprismen und zylindrische Nanotubes. Des Weiteren kann man die Materialien auf Basis ihrer chemischen Grundstruktur verschiedenen Gruppen zuordnen. Weit verbreitet sind Nanopartikel aus Metallen, wie Gold, Silber und Eisen, ebenso Teilchen aus Metall- oder Halbmetalloxiden, wozu z.B. Aluminiumoxide, Eisenoxide, Zinkoxide, Siliciumdioxid und Titandioxid gehören. Goldhaltige Nanomaterialien zeichnen sich durch eine hohe Stabilität sowie einzigartige optoelektrische Eigenschaften aus und werden beispielsweise zur Analyse von Vorgängen an der Zelloberfläche auf molekularer Ebene

eingesetzt (Liu et al. 2007, Sperling et al. 2008, Wilson 2008). Magnetische Nanopartikel aus Eisenoxidverbindungen sind vor allem im Bereich der Biomedizin weit verbreitet. Klinische Anwendung finden sie als Kontrastmittel für Magnet-Resonanz-Tomografie-Untersuchungen (Anzai et al. 1994, Bonnemain 1998, Vigor et al. 2009) und im Rahmen magnetbasierter Zellseparationsverfahren (Liberti et al. 2001, Jing et al. 2006, Schwalbe et al. 2006b). Andere Nanomaterialien bestehen aus Halbleiterverbindungen, wie Cadmiumtellurid und -selenid oder Silicium. Sie besitzen die spezielle Eigenschaft, in Abhängigkeit von ihrer Größe, Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge zu emittieren, weshalb sie häufig zur Detektion von Proteinen, Nukleinsäuren oder Bakterien im Rahmen von Immunoassays eingesetzt werden (Nirmal und Brus 1999, Hu et al. 2001). Kohlenstoffhaltige Nanopartikel lassen sich in kugelförmige Strukturen, die Fullerene, und zylindrische Nanotubes unterteilen. Letztere besitzen durch ihren röhrenförmigen Aufbau die Fähigkeit, andere Moleküle einzuschließen und sind damit für eine Anwendung zum Transport verschiedener Wirkstoffe prädestiniert (Katz und Willner 2004, Lu et al. 2009). Eine weitere Gruppe bilden Nanopartikel aus Polymeren, wie z.B. Polyglykolsäure. Auch sie werden häufig zum Transport von Wirkstoffen eingesetzt, da sie Eigenschaften wie Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und die Möglichkeit der Funktionalisierung auf sich vereinen. Der Einschluss von Wirkstoffen in Trägermoleküle bietet die Vorteile der besseren Erreichbarkeit eines Wirkortes und der gezielten sowie verzögerten Freisetzung der gespeicherten Substanzen (Schnabelrauch und Clement 2007). Eine gemeinsame und in vielen Anwendungsgebieten genutzte Eigenschaft aller Nanomaterialien ist ihr besonders hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Dieses bedingt jedoch auch die intrinsische Instabilität vieler Partikel über einen längeren Zeitraum, da diese bestrebt sind, die hohe Oberflächenspannung durch das Ausbilden von Agglomeraten zu reduzieren (Lu et al. 2007). Ein weiteres Problem ist die hohe Reaktivität metallischer Nanopartikel. Durch Oxidation verlieren die Teilchen ihre magnetischen Eigenschaften und ihre Dispersibilität (Huber 2005, Lu et al. 2007). Beiden Phänomenen wird über eine Umhüllung der Nanopartikel mit verschiedensten Stoffen begegnet. Modifizierte Oberflächen aus Polysacchariden oder anderen polymeren Strukturen dienen neben der Stabilisierung von Nanopartikeln auch ihrer Funktionalisierung mittels Kopplung an Liganden oder funktionelle Gruppen (Labhasetwar und Leslie-Pelecky 2007).

1.3.2. Anwendungsbereiche in der Biomedizin

Vor allem magnetische Nanopartikel haben sich in den letzten Jahren in der biomedizinischen Anwendung etabliert. Wichtige Voraussetzungen für einen Einsatz der Nanoteilchen im medizinischen Bereich sind Nontoxizität, Biokompatibilität und Injizierbarkeit des verwendeten Materials sowie eine genügende Anreicherung der Partikel im Zielgewebe oder -organ (Ito et al. 2005). Im klinischen Alltag finden magnetische Nanoteilchen als Kontrastmittel im Rahmen der Magnet-Resonanz-Tomografie Anwendung (Hadjipanayis 2008). Beim Bio-Imaging bestehen die genutzten MR-Kontrastmittel aus eisenoxidhaltigen Nanopartikeln, welche mit Liganden für bestimmte Rezeptoren auf der Zelloberfläche gekoppelt sind, was die genaue Markierung molekularer Strukturen ermöglicht und somit die Möglichkeit einer frühzeitigen Diagnose von pathologischen Veränderungen (z.B. Tumoren) bietet (Glöckl und Weitschies 2007). Ein ähnliches Prinzip kommt im Rahmen des sogenannten Tumor-Cell-Targeting zum Tragen. Mit den Nanoteilchen gekoppelte Antikörper binden an spezifische Strukturen der Zellmembran maligner Zellen, wodurch diese lokalisiert und von gesundem Gewebe differenziert werden können (Fortina et al. 2007). Einen Ansatz zur Therapie maligner Tumoren bietet die Magnetic-Fluid-Hyperthermia. Schon lange ist bekannt, dass Tumorzellen durch Applikation von Temperaturen über 42°C direkt geschädigt werden können (Nielsen et al. 2001). Außerdem erhöht die Wärmeeinwirkung die Sensibilität maligner Zellen gegenüber Radio- und Chemotherapie (Jordan et al. 2007). Das nanomaterialbasierte Konzept beinhaltet das Einbringen magnetischer Flüssigkeiten in die Geschwulst und die anschließende Induktion der Hyperthermie durch Einwirkung eines magnetischen Wechselfeldes (Jordan et al. 1999, Johansen et al. 2005). Mittels dieser Methode wird es möglich, ausschließlich das Tumorgewebe zu erwärmen und gesunde nicht mit Partikeln infiltrierte und damit durch das magnetische Wechselfeld unbeeinflusste Strukturen zu schonen (Gupta und Gupta 2005). Eine weitere Möglichkeit für den Einsatz der Nanotechnologie im therapeutischen Bereich (u. a. zur Behandlung von Malignomen) stellt das Magnetic-Drug-Targeting dar. Dabei werden die Nanopartikel als Carrier für Arzneimittel eingesetzt, die an die Partikeloberfläche gekoppelt oder innerhalb der Nanoteilchen eingeschlossen sind (Gupta und Gupta 2005). Die Wirkstoffe können so gezielt und in hohen Dosen an den gewünschten Wirkort transportiert werden. Dazu erfolgt die intravenöse Injektion des Materials, das nun, gesteuert durch Einwirkung eines externen Magnetfeldes, im Zielgewebe angereichert werden kann. So wird eine effiziente und nebenwirkungsarme lokale Therapie von Tumoren mit Zytostatika möglich (Goodwin et al. 1998, Plank et al. 2007). Außerdem bietet das Einbringen der Arzneimittel in die Partikel Schutz gegen einen

vorzeitigen Abbau im Organismus und ermöglicht die konstante Abgabe von Wirkstoffen über einen längeren Zeitraum. Auch die Anwendbarkeit von Nanomaterialien im Zusammenhang mit Tissue-Engineering ist Gegenstand der Arbeit verschiedener Forschungsgruppen. Dabei wird beispielsweise die Tatsache genutzt, dass mit eisenoxidhaltigen Partikeln markierte Zellen in Kultur über magnetische Kräfte beeinflussbar sind (Ito et al. 2004, Ito et al. 2005). Die Separation unterschiedlicher Zelltypen stellt ein weiteres großes Einsatzgebiet für magnetische Nanopartikel dar. Dabei hat sich die magnetische Zellseparation als hochempfindliches Verfahren zur Detektion und Abtrennung kleiner Zellpopulationen aus einem großen Zellpool, wie z.B. im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen, erwiesen (Molday und Mackenzie 1982, Martin et al. 1998, Liberti et al. 2001, Clement et al. 2006, Schwalbe et al. 2006b). Um eine Trennung der Zellen im Magnetfeld zu erzielen, müssen die Zielzellen zunächst mit eisenoxidhaltigen Nanopartikeln markiert werden. Das kann über eine antikörpervermittelte Bindung der Nanoteilchen an die Zelloberfläche geschehen oder mittels endozytotischer Aufnahme derselben in die Zielzellpopulation. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden magnetische Nanopartikel, bestehend aus einem Eisenoxidkern und einer Polysaccharidhülle, zur Depletion von Tumorzellen aus peripherem Blut eingesetzt.

1.3.3. Interaktion von Nanoteilchen mit zellulären Strukturen

Um eine gezielte Separation von Zellpopulationen oder die Markierung bestimmter Zellen mit magnetischen Nanopartikeln für andere Zwecke zu realisieren, ist eine spezifische Bindung der Partikel an die Zielzellen unabdingbar. Verschiedene erwünschte und unerwünschte Arten der Interaktion von Nanopartikeln und biologischen Strukturen sind in der Literatur beschrieben und werden hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit und Optimierung weiter untersucht. So ist bekannt, dass Nanoteilchen mit einem Durchmesser zwischen 50 und 200 nm von verschiedensten Zelltypen aufgenommen werden können (Rejman et al. 2004, Mailänder und Landfester 2009). Fast alle Nutzungskonzepte für Nanopartikel im medizinischen Bereich basieren auf Einbringung derselben in die Zirkulation. Dazu muss das Material injizierbar, steril, frei von Agglomerationen und vor allem biokompatibel sein (Alexiou et al. 2006). Bei einer Größe zwischen 5 und 20 nm wären derart applizierte Teilchen in der Lage, die Blutbahn über Diffusion durch die Interzellularspalten der Gefäßwände zu verlassen (Gref et al. 1994, Moghimi et al. 2001). Größere Partikel verbleiben zunächst in der Zirkulation und werden innerhalb kurzer Zeit von Plasmaproteinen, u. a. Komplementfaktor C3, Vitronektin und Fibronektin, umhüllt (Moore et al. 1997). Dieser als Opsonisierung bezeichnete Vorgang

führt zur raschen Elimination der Partikel durch die Zellen des retikuloendothelialen Systems (= gewebsständige Makrophagen in Leber, Milz und Lymphknoten) (Davis 1997). Über eine Modifikation der Partikeloberfläche wird versucht, diesen Prozess zu unterdrücken. Hydrophile Hüllen wie Dextrane und ihre Derivate, Polyethylenglykol oder Polyethylenoxid sind geeignet, die Oponisierung zu verhindern und ermöglichen so die Zirkulation der Nanopartikel im Blutstrom über längere Zeiträume (Shen et al. 1996, Portet et al. 2001, Brigger et al. 2002). Die Spezifität der Interaktion von Nanopartikeln und Zellen der Zielpopulation kann über zwei Wege realisiert werden. Meist erfolgt eine Kopplung der Nanoteilchen an Moleküle (z.B. Antikörper), die bestimmte Strukturen auf der Oberfläche der Zielzellen erkennen und an diese binden können (Miltenyi et al. 1990, Hancock und Kemshead 1993, Martin et al. 1998). Ein Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass spezifische Oberflächenmarker in der Regel auf den meisten, nie jedoch auf allen Zellen der Zielpopulation vorhanden sind (Clement et al. 2006). Somit ist es zwar möglich, hochreine Fraktionen aus einem Zellgemisch abzutrennen, aber es werden nicht alle Zielzellen erreicht (Owen und Sykes 1984), was insbesondere im Rahmen der Tumorzelldepletion problematisch erscheint. Auch mittels Modifikation der Hüllstrukturen können gezielte Wechselwirkungen zwischen Partikeln und Zellen realisiert werden (Gupta und Gupta 2005, Clement et al. 2006, Schwalbe et al. 2006a, Schwalbe et al. 2006b). Diese Methode ermöglicht die Abtrennung von Zellen der Zielpopulation in größerer Quantität, was insbesondere bei der Depletion von im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen von Vorteil ist. Die Interaktion von Nanopartikeln mit Zellen ist nicht auf eine Bindung an die Zelloberfläche beschränkt. Über endozytotische Mechanismen (Phagozytose, rezeptorvermittelte Endozytose und Pinozytose) ist auch die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere möglich, wo sie dann in endosomalen Strukturen im Zytoplasma vorliegen (Jordan et al 1996, Schoepf et al. 1998, Berry et al. 2003, Berry et al. 2004).

1.4. Zellseparationsverfahren und Detektion zirkulierender Tumorzellen

Ausgehend von der Prämisse, dass eine Reduktion der Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen eine Abnahme des Metastasenrisikos bedeutet, erscheint es erstrebenswert, Verfahren zur Detektion und Depletion von disseminierten Tumorzellen zu entwickeln. Es existieren viele verschiedene Methoden der Zellseparation (Safarik und Safariková 1999, Pappas und Wang 2007), jedoch sind nicht alle zur Abreicherung von Tumorzellen aus peripherem Blut geeignet. Neben immunzytologischen Verfahren und PCR-basierten Technologien haben sich insbesondere zytometrische Methoden, wie FACS (siehe

3.5.) und MACS (siehe 3.4.), zur Detektion und Selektion maligner Zellen bewährt (Wong et al. 1995, Berois et al. 1997, Mapara et al. 1997, Martin et al. 1998). Die Durchflusszytometrie (FACS) als ein bedeutendes Verfahren zur Separation von Zellen ist durch vergleichsweise geringe Sortierraten (10^3 bis 10^4 Zellen/Sekunde) limitiert (Nakamura et al. 2001) und deshalb für eine effiziente Abreicherung zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut ungeeignet. Dagegen stellt die magnetbasierte Separation von Zellen einen vielversprechenden Ansatz für dieses Vorhaben dar und wird häufig auf experimenteller Ebene in verschiedenen Ausführungen (Racila et al. 1998, Safarik und Safariková 1999, Schwalbe et al. 2006b, Naoe et al. 2007) und auch im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion und Depletion von Tumorzellen angewandt.

1.4.1. Ausblick: Zukünftige Krebstherapie mittels magnetischer Tumorzelldepletion

Im Hinblick auf die vorangestellten Ausführungen wäre das zukünftige Ziel die Entwicklung eines *in vivo* anwendbaren Verfahrens zur Depletion disseminierter maligner Zellen aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten. Visionäre Therapieansätze gehen dabei von einer Art Dialyse mit umhüllten magnetischen Nanopartikeln basierend auf der Methode der magnetischen Zellseparation aus. Das periphere Blut des behandelten Patienten würde dazu zunächst einer Leukapherese unterzogen werden. Die angereicherten weißen Blutzellen und die in dieser Fraktion enthaltenen Tumorzellen würden dann über einen definierten Zeitraum mit den magnetischen Nanopartikeln inkubiert und anschließend einer magnetischen Separation zugeführt werden. Da bekannt ist, dass Tumorzellen die Partikel schneller und in höherem Maße als Leukozyten aufnehmen (Schwalbe et al. 2006a, Schwalbe et al. 2006b, Clement et al. 2006), sollte so eine Abreicherung der malignen Zellen möglich sein. Die nach der Separation erhaltene PF (Positivfraktion), welche die angereicherten Tumorzellen beinhalten sollte, würde entfernt, während die NF (Negativfraktion), welche die Leukozyten enthalten und frei von Tumorzellen sein sollte, zum Patienten zurückgeführt werden würde (**Abb. 1**). Deshalb ist es von größter Bedeutung, dass insbesondere die Leukozyten der NF nach der Prozedur intakt und in ihrer biologischen Funktion unbeeinträchtigt sind. Man weiß, dass die magnetischen Nanopartikel immer auch mit den Leukozyten interagieren, was zur Folge hat, dass diese im Rahmen der „Dialyse“ zusammen mit den Tumorzellen abgereichert und verworfen werden würden. Das wiederum würde sich ungünstig auf das ohnehin durch Krankheit und Therapie geschwächte Immunsystem des Patienten auswirken. Daher ist es notwendig, die Polysaccharidhüllen der Partikel und die Inkubationsbedingungen so zu

modifizieren, dass bei einer möglichst hohen Tumorzellausbeute möglichst wenig Leukozyten verloren gehen.

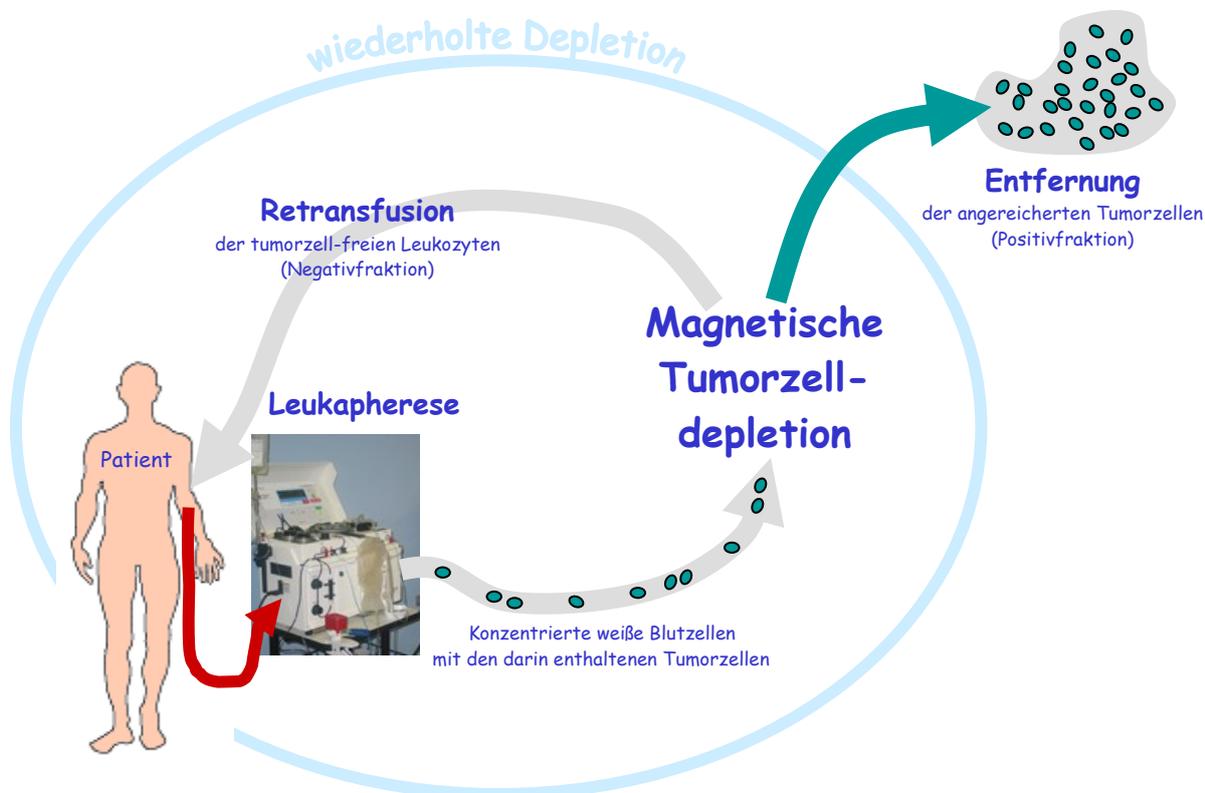


Abb. 1: Prinzip der magnetbasierten Tumorzelldepletion. (aus: Schwalbe M, Pachmann K, Clement J. 2006. Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood does not affect lymphocytes [Vortrag]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Klinik für Innere Medizin II.)

1.5. Leukozyten

Die Leukozyten (= weiße Blutkörperchen) stellen eine von drei Zellpopulationen im Blut. Neben den Erythrozyten (4,5 bis 5 Mio/ μ l Blut, 93 bis 96% aller Blutzellen) und den Thrombozyten (200.000 bis 300.000/ μ l Blut, 4 bis 7% aller Blutzellen) sind sie die kleinste (4000 bis 8000/ μ l Blut, 0,1 bis 0,2% aller Blutzellen) und gleichzeitig heterogenste Gruppe. Die Tatsache, dass sich die Leukozyten als gewebsständige Zellen nur vorübergehend in der Zirkulation aufhalten, erklärt ihren geringen Anteil im peripheren Blut. So befinden sich zu einem gegebenen Zeitpunkt nur etwa 5% der im menschlichen Organismus vorhandenen Leukozyten im Blut, während 95% auf die Gewebe (v. a. Knochenmark und lymphatische Organe) verteilt sind (Lippert 2003). Als zelluläre Bestandteile des menschlichen Immunsystems sind sie die Träger der unspezifischen und spezifischen Abwehrvorgänge. Ihre mannigfaltigen Funktionen im Rahmen von Entzündungsreaktionen und Immunabwehr umfassen die Phagozytose von Erregern, die Produktion unspezifischer Kampfstoffe (z.B. Sauerstoffradikale, antivirale und zytotoxische Substanzen) sowie die Synthese von

Antikörpern. Die verschiedenen Aufgabenbereiche werden von unterschiedlich spezialisierten Leukozytensubpopulationen wahrgenommen. Hier unterscheidet man die Granulozyten, die Monozyten und die Lymphozyten.

1.5.1. Granulozyten

Die Granulozyten sind mit 35-80% die zahlenmäßig größte Subpopulation der weißen Blutzellen. Es handelt sich hierbei um Zellen myeloischer Herkunft, die wegen ihres gelappten Zellkerns auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet werden. Das Zytoplasma der Granulozyten ist reich an spezifischen und Azurgranula (=Lysosomen), woraus sich auch ihr Name ableitet. Weiterhin lässt insbesondere der Reichtum an lysosomalen Strukturen Rückschlüsse auf eine der Hauptaufgaben dieser Zellpopulation, die Phagozytose, zu. Man unterscheidet anhand der spezifischen Granula zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. In ihrer Funktion als Immunzellen stehen die Granulozyten an „vorderster Abwehrfront“ gegen eindringende Keime (Hof und Dörries 2005).

1.5.1.1. Neutrophile Granulozyten

Die Neutrophilen stellen 30-80% aller im Blut zirkulierenden Leukozyten und damit auch den Hauptteil der Granulozyten. Der Durchmesser dieser polymorphkernigen Zellen liegt im Bereich zwischen 9 und 12 µm. Ihre Lebensdauer beträgt in der Regel nur wenige Tage. Die Hauptaufgabe der Neutrophilen ist das Phagozytieren und Abtöten von bakteriellen Krankheitserregern, weshalb sie auch als Mikrophagen bezeichnet werden (Lippert 2003). Zu diesem Zweck enthält ihr Zytoplasma hauptsächlich die mit hydrolytischen und antibakteriellen Enzymen angefüllten Azurgranula, neben denen die spezifischen neutrophilen Granula in den Hintergrund treten.

1.5.1.2. Eosinophile Granulozyten

Die Eosinophilen sind eine eher kleine Zellpopulation (0-7% der Leukozyten im peripheren Blut). Die Zellen mit einem Durchmesser zwischen 11 und 14 µm haben eine mittlere Lebensdauer von ein bis zwei Wochen. Im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten enthält ihr Zytoplasma wesentlich mehr spezifische eosinophile, mit hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Lipidmediatoren und kationischen Proteinen gefüllte Granula und die Lysosomen treten demgegenüber in den Hintergrund. Die eosinophilen Granulozyten sind in der Lage, ihre Inhaltsstoffe durch Degranulation nach außen abzugeben (Renz-Polster et al. 2004), was

sie dazu befähigt, auch größere extrazellulär gelegene Organismen wie z.B. Parasiten abzutöten. Außerdem zählt die Phagozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen zu den Aufgaben dieser Zellpopulation, welcher auch eine entscheidende Rolle im Rahmen von allergischen Immunantworten zukommt.

1.5.1.3. Basophile Granulozyten

Basophile sind die seltenste Leukozytensubklasse im peripheren Blut (0-2% der Leukozyten) und haben einen Durchmesser von 8 bis 9 μm . Ihr Zytoplasma ist reich an spezifischen basophilen Granula, welche Histamin, Heparin, andere gefäßwirksame Substanzen und verschiedene Zytokine enthalten. Lysosomale Strukturen finden sich nur vereinzelt, was darauf schließen lässt, dass die basophilen Granulozyten zwar zur Phagozytose befähigt sind, diese jedoch nicht zu ihren wesentlichen Aufgaben gehört. Ihre Rolle im Immungeschehen stützt sich viel mehr auf ihre Fähigkeit zur Abgabe granulaassoziierter Mediatoren nach außen (Renz-Polster et al. 2004). Basophile weisen starke Ähnlichkeiten mit den gewebsständigen Mastzellen auf, obwohl sie von unterschiedlichen Zelllinien abstammen. Beiden Zellarten kommt eine zentrale Aufgabe im Rahmen der IgE-vermittelten allergischen Sofortreaktion und eine komplementäre Rolle bei der Abwehr von Parasiten zu.

1.5.2. Monozyten

Die Monozyten sind die zahlenmäßig kleinste der drei Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut (2-12% aller Leukozyten). Die mononukleären Zellen myeloischer Herkunft, deren Kern in der Regel eingedellt oder hufeisenförmig ist, haben einen mittleren Durchmesser von 12 bis 20 μm und sind damit die größten der weißen Blutkörperchen. Ihre Lebensdauer kann sich unter Umständen über mehrere Monate oder Jahre ausdehnen. Auch die Monozyten besitzen ein lysosomenreiches Zytoplasma, was sie als phagozytierende Zellen ausweist. Zu ihren Hauptaufgaben im Rahmen der Immunantwort zählen neben der Phagozytose von Krankheitserregern auch ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APC's) sowie die Produktion und Freisetzung antiviraler und zytotoxischer Substanzen. Sie zerstören infizierte, gealterte oder entartete Zellen und helfen beim Wiederaufbau des geschädigten Gewebes im Rahmen der Wundheilung (Renz-Polster et al. 2004). Im peripheren Blut halten sich die Monozyten in der Regel nur kurzzeitig auf. Sie nutzen es als Transportmedium auf ihrem Weg ins Gewebe, wo sie zu sessilen Makrophagen (z.B. Alveolarmakrophagen in der Lunge, Mikrogliazellen im ZNS oder Kupffer-Zellen in der Leber) ausreifen. In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen stellen die Monozyten

bzw. Makrophagen als Element der unspezifischen Abwehr ein wesentliches Bindeglied zur spezifischen über die Lymphozyten vermittelten Immunantwort dar (siehe 1.6.1.).

1.5.3. Lymphozyten

Die Lymphozyten stellen 14-47% der Leukozyten im peripheren Blut. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Subpopulationen der Granulozyten und Monozyten leiten sich diese mononukleären Zellen von einer eigenen lymphatischen Stammzelllinie ab (Vogler und Pearl 1978). Mit einem Durchmesser im Bereich von 6 bis 9 μm sind die Lymphozyten die kleinsten unter den weißen Blutzellen. Es finden sich jedoch auch sogenannte „große“ aktivierte Lymphozyten mit einem Durchmesser von 9 bis 15 μm . Sie besitzen einen runden dichten Zellkern, welcher von einem schmalen Zytoplasmasaum mit vereinzelt Azurgranula umgeben ist. Der überwiegende Teil dieser Zellpopulation (etwa 98%) hält sich nicht im Blut, sondern im Knochenmark und in den lymphatischen Organen auf (Lippert 2003). Dabei unterliegen die Lymphozyten jedoch einer ständigen Rezirkulation mit dem Blutstrom, ohne die sie ihre Funktionen im Rahmen von Abwehrvorgängen nicht wahrnehmen könnten. Ihre Lebensdauer umfasst je nach Funktion der einzelnen Zelle eine Spanne von wenigen Tagen bis hin zu einem Zeitraum von mehreren Jahren (betrifft die sogenannten Gedächtniszellen). Die Lymphozyten sind die zentralen Träger der spezifischen Abwehr (siehe 1.6.1.). Sie sind in der Lage, Antigenstrukturen spezifisch zu erkennen und anschließend zu eliminieren. Zu diesem Zweck besitzen die Lymphozyten höchst individuelle Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Man unterscheidet bei den Lymphozyten zwischen drei Hauptgruppen mit unterschiedlichen Aufgaben, die wiederum in diverse Subklassen unterteilt werden können. Die Untergruppen können anhand von spezifischen Oberflächenmolekülen (= CD- [cluster of differentiation] Marker) klassifiziert werden. Die CD3-positiven T-Zellen (ca. 80% aller Lymphozyten) bewirken zusammen mit den Makrophagen die zelluläre Immunantwort am Ort des Antigenreizes. Die B-Zellen (ca. 15% der Lymphozyten) dienen nach Stimulation durch die T-Lymphozyten und durch Antigenreize der Produktion von Antikörpern und realisieren so die humorale Immunantwort. Sie tragen CD19- und CD20-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Die kleinste Gruppe unter den Lymphozyten sind mit etwa 5% die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie besitzen im Gegensatz zu T- und B-Zellen keine antigenspezifischen Rezeptoren und haben das Abtöten von virusbefallenen Zellen und Tumorzellen zur Aufgabe. CD16- und CD56-Oberflächenmoleküle sind für diese Zellpopulation spezifisch.

1.5.3.1. T-Lymphozyten

Die T-Zellen stellen mit 80% aller Lymphozyten deren größte Untergruppe (entspricht etwa 7 bis 24% der Leukozyten im peripheren Blut). Sie tragen CD3-Moleküle als kennzeichnende Marker auf ihrer Zelloberfläche. Die T-Lymphozyten sind Träger der zellvermittelten erworbenen Immunität und leiten sich von den lymphatischen Stammzellen des fetalen Knochenmarks ab. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation und Steuerung aller Immunprozesse im menschlichen Organismus und üben daneben auch direkte Abwehrfunktionen aus (Hickling 1998). Die Reifung und Differenzierung der T-Lymphozyten erfolgt in Knochenmark und Thymus. Die T-Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein und reifen dort zur naiven T-Zelle. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es durch die zufällige molekulare Anordnung verschiedener Gensegmente zur Ausbildung von Milliarden verschiedener Rezeptorstrukturen, welche anschließend durch positive und negative Selektion so ausgelesen werden, dass einerseits keine autoreaktiven Zellen vorliegen, andererseits jedoch ein T-Zell-Rezeptor für praktisch jedes denkbare Antigen vorhanden ist (Renz-Polster et al. 2004). Die naiven T-Zellen halten sich vorwiegend in den lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und Knochenmark) auf und unterliegen einer ständigen Rezirkulation mit dem Blutstrom, ohne die eine adäquate Ausübung ihrer Funktion unmöglich wäre. Die membranständigen T-Zell-Rezeptoren sind im Gegensatz zu den spezifischen Antigenrezeptoren der B-Lymphozyten nicht in der Lage, lösliche unprozessierte Antigene zu binden. Sie erkennen nur an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle gebundene antigene Peptide, die ihnen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen oder dendritische Zellen) dargeboten werden. Zur vollständigen Aktivierung einer T-Zelle bedarf es weiterer kostimulatorischer Signale neben der Erkennung des MHC/Peptid-Komplexes über den T-Zell-Rezeptor, welche ebenfalls durch Interaktion des Lymphozyten mit der antigenpräsentierenden Zelle realisiert werden. Dazu exprimieren die T-Zellen nach Bindung des MHC/Peptid-Komplexes verstärkt CD28-Moleküle auf ihrer Oberfläche, die mit den B7-Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen interagieren, was zu Proliferation und klonaler Expansion der stimulierten T-Zelle führt (June et al. 1990, Jenkins und Johnson 1993). Ein weiteres kostimulatorisches Signal wird über die Interaktion von CD40-Molekülen mit den entsprechenden Liganden (CD40L) realisiert. Auf diesem Wege aktivierte T-Zellen produzieren vermehrt Interleukin 2 (IL2), welches als autokriner Wachstumsfaktor fungiert und die Differenzierung zur jeweiligen Effektor-T-Zelle vorantreibt. Hinsichtlich der Effektorfunktion und anderer Eigenschaften lassen sich diverse Subklassen von T-Lymphozyten unterscheiden. So unterteilt man sie anhand der Expression

weiterer Oberflächenmarker in eine CD4-positive (etwa 66% aller T-Lymphozyten) und eine CD8-positive (etwa 33% aller T-Lymphozyten) Population. Nur etwa 5% der T-Zellen, die sogenannten „Null-Zellen“, exprimieren weder CD4 noch CD8 auf ihrer Zellmembran (Renz-Polster 2004). Außerdem kann man die T-Lymphozyten nach der Struktur ihres T-Zell-Rezeptors zur Erkennung der MHC/Peptidkomplexe klassifizieren. Dieser besteht immer aus zwei Aminosäureketten (sog. Dimer), dem CD3-Komplex und einem Kalziumkanalprotein. Das Dimer setzt sich bei 90% der T-Zellen aus einer α - und einer β -Kette zusammen (α/β -TZR), 10% besitzen eine γ/δ -Konfiguration. Letztere sind nicht von der Antigenpräsentation über die MHC-Moleküle abhängig und scheinen breit gegen diverse Antigene wirken zu können. Des Weiteren wird ihnen eine Rolle im Rahmen der angeborenen Immunität sowie bei der Entstehung von Autoimmunität und Graft-versus-host-Reaktionen zugeschrieben. Die Einteilung der T-Lymphozyten nach funktionellen Gesichtspunkten unterscheidet zwischen den CD4-positiven T-Helferzellen, den meist CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, den regulatorischen T-Zellen (auch: T-Suppressorzellen) und den Gedächtniszellen. Im Rahmen der Tumorabwehr spielen vor allem die zytotoxischen T-Lymphozyten, unterstützt von den T-Helferzellen, eine zentrale Rolle.

CD4-positive Zellen/T-Helferzellen

Die Hauptaufgabe dieser T-Zell-Subklasse ist die Verstärkung der Immunantwort der B-Zellen und der zytotoxischen T-Lymphozyten. Ihre Effektorfunktionen realisieren sie mittels Sekretion von Zytokinen und über eine direkte Interaktion des TZR/MHC/Peptid-Komplexes mit Molekülen auf der Oberfläche anderer Zellen (z.B. B-Zellen, Makrophagen und CD8⁺-Zellen). Sie erkennen nur antigene Peptide, welche ihnen gekoppelt an die ausschließlich auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen vorhandenen MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Anhand der unterschiedlichen Muster der von ihnen sezernierten Zytokine unterscheidet man zwischen TH1- und TH2-Zellen mit differenter Funktion (Abbas et al. 1996, Woodland und Dutton 2003). TH1-Lymphozyten produzieren vorwiegend IFN- γ , TNF- β und Interleukin 2. Sie sind die zentralen Regulatorzellen bei Entzündungsreaktionen. Im Rahmen der Immunabwehr stimulieren und verstärken sie sowohl die phagozytotische und antibakterielle Aktivität von Makrophagen, als auch die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen. Außerdem unterstützen sie die B-Lymphozyten bei deren Differenzierung und Ausreifung zu antikörperbildenden Plasmazellen und induzieren die Bildung von Immunglobulin G (IgG). Daneben wird ihnen eine Rolle bei der Entstehung von Hypersensitivitätsreaktionen des verzögerten Typs und Autoimmunerkrankungen zugeschrieben. TH2-Zellen sezernieren

hauptsächlich die Interleukine 4, 5, 9 und 13. Ihre Hauptaufgabe im Rahmen immunologischer Prozesse ist die Unterstützung der B-Lymphozyten bei deren Ausreifung und Differenzierung. IL-4 induziert den Isotypenwechsel von IgM zu IgG1 und IgE, während IL-5 die IgA-Synthese steigert. Daneben unterstützen die TH2-Zellen auch die Abwehr parasitärer Krankheitserreger und vermitteln die allergische Sofortreaktion.

Zytotoxische T-Zellen

Diese in der Regel CD8-positiven T-Lymphozyten richten ihre zytotoxische Effektorfunktion vor allem gegen extra- und intrazelluläre Bakterien und virusbefallene Zellen sowie gegen Fremdgewebe und entartete Körperzellen. Sie sind das entscheidende Werkzeug der adaptiven Immunität zur Zerstörung von Zellen, in deren Zytoplasma sich Krankheitserreger vermehren (Hof und Dörries 2005). Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, erkennen die zytotoxischen T-Lymphozyten nur antigene Peptide, welche von den auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhandenen MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Nach Ausbildung des TZR/MHC/Peptid-Komplexes kann die T-Zelle über verschiedene Mechanismen die Apoptose der attackierten Zielzelle einleiten. Dazu gehört die Ausschüttung von Granula mit zytotoxischem Inhalt (Perforine und Granzyme), welche nach Perforation der Zielzellmembran und Eindringen in deren Zytosol die Signalkaskade der Apoptose auslösen. Des Weiteren sind die zytotoxischen T-Lymphozyten auch zur Induktion der rezeptorvermittelten Apoptose über den von ihnen exprimierten Fas-Liganden befähigt. Daneben besitzen diese Lymphozyten mit der Produktion und Sekretion von IFN- γ , TNF und Lymphotoxin auch direkte zytotoxische Wirkmechanismen (Meuer und Dienes 1989). Neuere wissenschaftliche Publikationen postulieren, dass auch die zytotoxischen T-Zellen anhand der Sekretion unterschiedlicher Zytokinmuster, ähnlich den T-Helferzellen, nochmals in Subgruppen eingeteilt werden können (Mosmann et al. 1997, Woodland und Dutton 2003).

Regulatorische T-Zellen/T-Suppressorzellen

Diese CD4-positive Subklasse der T-Lymphozyten (etwa 10% aller CD4⁺-Zellen) übt vorwiegend eine die Immunantwort dämpfende Funktion aus, was unter anderem der Verhinderung von Autoimmunreaktionen und dem Beenden des Abwehrvorganges nach erfolgreicher Elimination des Antigens dient. Neben den CD4-Molekülen tragen diese Zellen auf ihrer Oberfläche CD25 und CD62L (Renz-Polster et al. 2004).

Gedächtniszellen

Diese T-Zell-Population zeichnet sich durch ihre Langlebigkeit über einen Zeitraum von mehreren Jahren aus. Sie entstehen im Zuge der Differenzierung und klonalen Expansion einer naiven T-Zelle nach Kontakt mit ihrem Antigen und sind in der Regel durch CD45RO-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche gekennzeichnet. Bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen erfolgt die Immunantwort dann, getriggert durch die Gedächtniszellen, schneller und in stärkerem Ausmaß (Dutton et al. 1998).

1.5.3.2. B-Lymphozyten

Die B-Zellen stellen 15% der gesamten Lymphozytenpopulation (entspricht etwa 1 bis 7% der Leukozyten im peripheren Blut). Kennzeichnend sind ihre spezifischen Oberflächenmarker, die CD19- und CD20-Moleküle. Sie sind die Träger der humoralen durch Antikörper vermittelten Immunität und leiten sich, ebenso wie die T-Zellen, von den lymphatischen Stammzellen des fetalen Knochenmarks ab. Die Reifung und Differenzierung der B-Lymphozyten findet in der fetalen Leber und postnatal im Knochenmark statt. Anschließend wandern sie in die peripheren lymphatischen Organe (dazu gehören die Milz, die Lymphknoten und das schleimhautassoziierte Lymphgewebe) ein. Hier erfolgt dann die finale Ausreifung zu naiven B-Lymphozyten, deren Hauptaufenthaltsorte Knochenmark, Milz, Lymphknoten und die lymphatischen Plaques der Darmmukosa sind. Die ständige Rezirkulation der B-Zellen zwischen den lymphatischen Organen und dem Blutkreislauf ist jedoch für die Ausübung ihrer immunologischen Funktionen unerlässlich. Die Produktion spezifischer Antikörper ist die Hauptaufgabe der B-Lymphozyten. Daneben fungieren sie als antigenpräsentierende Zellen. Zur Erkennung von Antigenstrukturen tragen die B-Zellen membranständige Immunglobuline (= B-Zell-Rezeptor) auf ihrer Oberfläche. Diese sind im Gegensatz zu den Rezeptoren der T-Zellen in der Lage, lösliche unprozessierte Antigene, also auch komplette Viruspartikel oder eine Bakterienzelle, zu binden. Außerdem besitzen die B-Lymphozyten Oberflächenrezeptoren für Zytokine und Strukturen zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, über die sie hemmende oder fördernde Einflüsse von Seiten des T-Zell-Systems erfahren. Bindet ein passendes Antigen an den B-Zell-Rezeptor, so kommt es zur Aktivierung des Lymphozyten. Der Komplex aus Rezeptor und Antigen wird von der Zelle internalisiert und hydrolysiert. Die dabei entstehenden Peptidstrukturen können nun, gebunden an MHC-II-Moleküle, an der Oberfläche des B-Lymphozyten präsentiert und dort von aktivierten T-Helferzellen ($CD4^+$) erkannt werden. Die kostimulatorischen Signale, welche die B-Zelle über die Interaktion mit dem T-Lymphozyten erfährt, ermöglichen ihr die

finale Differenzierung und klonale Expansion zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Im Rahmen dieses Vorganges entsteht neben den Plasmazellen auch eine kleine Population von B-Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen schnell aktiviert werden können und damit zu einer deutlich beschleunigten und stärkeren Immunantwort führen. Die Gedächtniszellen zeichnen sich durch ihre Langlebigkeit über einen Zeitraum von mehreren Jahren aus. Die von den Plasmazellen produzierten Antikörper sind spezifisch gegen das zu Beginn erkannte Antigen gerichtet. Die Bindung der Immunglobuline an die Antigenstrukturen setzt eine Reihe von Reaktionen in Gang, die zur Elimination des Antigens führen. Neben Inaktivierung des Antigens und Neutralisierung durch Ausbildung unlöslicher Immunkomplexe kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems. Des Weiteren werden die mit Antikörpern beladenen Antigenstrukturen (z.B. Bakterien) besser von den Phagozyten aufgenommen (= Opsonierung) und mit Antikörpern markierte antigene Zielzellen werden leichter von zytotoxischen T-Lymphozyten oder NK-Zellen erkannt und vernichtet (= ADCC [antibody dependent cellular cytotoxicity]) (Renz-Polster et al. 2004).

1.5.3.3. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Die NK-Zellen sind mit 5% die kleinste unter den Lymphozytensubpopulationen. Ihre spezifischen Oberflächenmarker sind die CD16- und CD56-Moleküle. Morphologisch stellen sich die NK-Zellen als große lymphoide Zellen mit zahlreichen zytokingefüllten Granula im Zytoplasmasaum dar. Sie leiten sich ebenfalls von der lymphatischen Stammzelllinie des fetalen Knochenmarks ab. Die NK-Zellen gehören, wie auch die T-Zellen, zum zellulären Abwehrsystem, tragen aber im Gegensatz zu anderen Lymphozyten keine antigenspezifischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, weshalb sie auch als „Grenzgänger“ zwischen dem spezifischen und dem unspezifischen Immunsystem angesehen werden (Hof und Dörries 2005). Ihre Hauptaufgabe als zytotoxische Zellpopulation ist das Erkennen und Eliminieren virusinfizierter oder entarteter Zellen. Diese lytische Aktivität ist „natürlich“, das heißt sie wird nicht über die Erkennung eines spezifischen Antigens induziert und ist somit eher der angeborenen unspezifischen, als der erworbenen spezifischen Immunität zuzurechnen (Wallrapp 2001). Die NK-Zellen erkennen im Gegensatz zu den T- und B-Zellen keine körperfremden Antigene, sondern Auffälligkeiten körpereigener Zellen hinsichtlich des Expressionsmusters der MHC-Moleküle (Waldhauer und Steinle 2008). So werden diese Lymphozyten aktiviert, wenn sie auf eine Zelle mit MHC-I-Molekülen in zu geringer Anzahl („missing-self-recognition“) oder veränderter Struktur („altered-self-recognition“) treffen. Dazu benötigen sie keine Unterstützung durch antigenpräsentierende Zellen, was eine

schnelle Aktivierung des NK-Zellsystems binnen Minuten ermöglicht. Aktive NK-Zellen sezernieren zytotoxische (u.a. Perforin, Granzyme und TNF- β) und diverse regulatorische (u.a. IFN- γ , IL1, IL5, IL8, IL10 und GM-CSF) Zytokine, die eine Zerstörung der maligne entarteten oder virusinfizierten Zielzelle einleiten. Des Weiteren sind die NK-Zellen wichtige Träger der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (= ADCC), welche die natürliche Zytotoxizität in ihrer Wirksamkeit um den Faktor 10 bis 20 übertreffen kann (Wallrapp 2001, Lippert 2003). Bei der immunologischen Bekämpfung von Tumorzellen spielen die NK-Zellen eine zentrale Rolle (Chiorean und Miller 2001, Waldhauer und Steinle 2008). Eine Sonderform der natürlichen Killerzellen sind die natural-killer-T-Zellen (NKT-Zellen), welche sowohl T-Zell-Rezeptoren als auch die für die NK-Zellen typischen Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen. Ihnen kommt wahrscheinlich eine Funktion bei der Regulation von Autoimmunität und Immunantworten gegen Mikroben und Tumoren zu (Renz-Polster et al. 2004).

1.6. Immunsystem und Tumorabwehr

1.6.1. Überblick über den Aufbau des menschlichen Immunsystems

Das Immunsystem wird traditionell in zwei Arme unterteilt, die sich im Rahmen der Abwehrvorgänge gegenseitig unterstützen und ergänzen. Man unterscheidet die angeborene nicht antigenspezifische Immunität und die erworbene antigenspezifische Immunität. Beide Systeme entfalten ihre Wirkung über humorale und zelluläre Komponenten, welche sich wechselseitig regulieren. Die zellulären Träger beider Abwehrsysteme sind die Leukozyten. Aufgabe des Immunsystems ist das Erkennen und Zerstören einer Vielzahl körperfremder, pathogener Substanzen und Organismen, bei gleichzeitiger Wahrung der Toleranz gegenüber körpereigenen Bausteinen. Die unspezifische Immunität ist die phylogenetisch ältere „erste Linie“ der Abwehr (Renz-Polster et al. 2004). Dieses System ist schnell aktivierbar, unterscheidet aber lediglich zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen, ohne den Erreger spezifisch zu identifizieren, weshalb sich anders als bei der erworbenen Immunität auch kein erregerspezifisches Gedächtnis entwickelt. Zu den humoralen Faktoren der angeborenen Abwehr gehören das Komplementsystem, verschiedene Zytokine, Lysozym und Akute-Phase-Proteine. Zelluläre Komponenten sind die natürlichen Killerzellen, die Mastzellen und die Phagozyten. Letztere unterteilt man in Mikrophagen (Granulozyten) und Makrophagen (Monozyten und Gewebsmakrophagen). Die Makrophagen stellen in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen ein zentrales Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität dar. Die spezifische Abwehr ist phylogenetisch jünger und

agiert als „zweite Linie“ im Kampf gegen pathogene Strukturen. Da die Erreger hier vor Wirksamwerden der Effektorfunktionen erst spezifisch identifiziert werden müssen, verläuft die Induktion der Immunantwort langsamer als im angeborenen System. Das spezifische Erkennen eines Antigens mittels der entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Lymphozyten führt zur Differenzierung der immunologischen Effektorzellen der erworbenen Immunität. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zur Ausbildung von Gedächtniszellen. Diese ermöglichen bei erneutem Kontakt mit dem gleichen oder einem ähnlichen Antigen eine beschleunigte und verstärkte Rekrutierung spezifischer Immunzellen und bilden die Basis für eine zum Teil lebenslange Immunität. Zu den humoralen Faktoren der erworbenen Abwehr gehören die von den B-Zellen sezernierten Antikörper und diverse Zytokine. Die Lymphozyten mit all ihren Untergruppen und Subklassen (siehe 1.5.3.) stellen die zellulären Komponenten des spezifischen Immunsystems. Obwohl humorale und zelluläre Effektoren stets gemeinsam aktiv werden, sind bestimmte Aktionsschwerpunkte erkennbar. Bei viralen, mykobakteriellen und mykotischen Infektionen stehen die zellulären Komponenten im Vordergrund, während bei der Bekämpfung bakterieller Erreger die humoralen Faktoren überwiegen.

1.6.2. Immunologische Vorgänge bei der Abwehr von Tumoren

Die Hypothese, dass das Immunsystem in der Lage ist, maligne entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren, wurde bereits 1967 von F. M. Burnet aufgestellt (Burnet 1967). Verschiedene Tatsachen, die in späteren Studien erforscht und bestätigt wurden, stützen diese Vermutung. So ist bekannt, dass Individuen mit angeborenen Immundefekten häufiger maligne Tumoren entwickeln als immunkompetente Menschen (McClain 1997, Dunn et al. 2004). Das Gleiche trifft auf Patienten zu, die sich über lange Zeiträume einer intensiven immunsuppressiven Therapie, z. B. nach Organtransplantationen, unterziehen mussten (Hiesse et al. 1997, Dunn et al. 2004). Ebenso weiß man, dass die Aktivität des Immunsystems im höheren Lebensalter abnimmt, einer Lebensphase mit hoher Malignomprävalenz. Des Weiteren konnten unterschiedliche durch Tumoren induzierte Reaktionen des Immunsystems nachgewiesen werden. An der Bekämpfung maligner Zellen sind immer beide Arme, der unspezifische und der spezifische, des Immunsystems mit ihren humoralen und zellulären Komponenten beteiligt (Diefenbach und Raullet 2002, Dunn et al. 2004, Whiteside 2010). Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die NK-Zellen, die zytotoxischen T-Lymphozyten und die Zytokinmediatoren IFN- γ und TNF. Die Aktivierung des Immunsystems erfolgt, wie auch bei durch Viren oder Bakterien

hervorgerufenen Abwehrvorgängen, über die Erkennung antigener Strukturen, welche in diesem Fall auf der Oberfläche der Tumorzelle exprimiert werden. Makrophagen und NK-Zellen werden über die von den Tumorzellen produzierten proinflammatorischen Zytokine und die durch das invasive Tumorwachstum bedingte lokale Gewebszerstörung alarmiert. NK-Zellen können die als fremd erkannten malignen Zellen mittels ihrer lytischen Aktivität in den apoptotischen Zelltod zwingen (Diefenbach und Raulet 2002, Waldauer und Steinle 2008). Daneben produzieren sie IFN- γ , ein Zytokin, das über seine antiproliferative, proapoptische und angiostatische Wirkung ebenfalls der Etablierung und dem Wachstum von Tumoren entgegen wirkt. Eine Antwort des spezifischen Immunsystems wird über die auf der Oberfläche der entarteten Zellen exprimierten Tumorzellantigene induziert. Antigen-spezifische T-Helferzellen erleichtern die Entwicklung und Proliferation tumorspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten. Diese wandern ins Tumorgewebe ein und tragen über direkte und indirekte Mechanismen der Induktion des Zelltodes zur Elimination der malignen Zellen bei. Das Ausmaß der Infiltration eines Tumors mit Lymphozyten stellt einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Outcome eines Patienten dar (Whiteside 1993, Pages et al. 2005). All diese Strategien zur Tumorabwehr scheinen nicht effektiv genug zu sein, da es regelmäßig zur Entwicklung von Malignomen kommt. Das liegt einerseits daran, dass maligne Tumore diverse Mechanismen entwickelt haben, um die Abwehr durch das Immunsystem ihres Wirtes zu umgehen. So maskieren einige Malignome ihre tumorspezifischen Antigene mittels neuraminsäurehaltiger Glykoproteine, die vom menschlichen Immunsystem nicht als fremd erkannt werden (Fölsch et al. 2000). Des Weiteren haften die Antigene mitunter schlecht auf der Oberfläche der Tumorzellen. Abgelöste Antigene können dann gegen sie gerichtete Antikörper binden und so deren Wirkung auf die malignen Zielzellen blockieren. Ein anderer Mechanismus zur Umgehung der Immunabwehr ist das sogenannte „Shedding“. Hierbei werden die Antigen-Antikörper-Komplexe aktiv von den Tumorzellen abgestoßen, um eine Zellyse über die durch NK-Zellen vermittelte ADCC zu verhindern. Andererseits kann auch das Immunsystem selbst paradoxe das Tumorwachstum fördernde Wirkungen auf unterschiedlichsten Ebenen entfalten (Restifo et al. 2002, de Visser et al. 2006). Unter anderem führt die Elimination immunogener Tumorzellen im Frühstadium der Malignomentwicklung zur selektiven Vermehrung von nicht-immunogenen Tumorzellen, die dann, unbeeinflusst von Abwehrprozessen, in der Lage sind, eine maligne Geschwulst auszubilden.

1.7. Zielstellung der Arbeit

Zirkulierende Tumorzellen können über ein in unserem Labor entwickeltes Verfahren aus dem peripheren Blut entfernt werden. Die Methode basiert auf der zellulären Aufnahme magnetischer polysaccharidumhüllter Nanopartikel und der anschließenden Separation markierter und unmarkierter Zellen mittels MACS. Dabei zeigen Tumorzellen in der Regel eine schnellere Partikelaufnahme als Leukozyten. Für die klinische Anwendbarkeit des Verfahrens ist es von größter Bedeutung, dass möglichst viele Malignomzellen mit den Nanoteilchen interagieren bei gleichzeitig möglichst geringer Aufnahme der Partikel durch die weißen Blutzellen. Dies würde eine effektive Elimination der zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut der Patienten ohne eine weitere Schwächung des ohnehin durch Krankheit und Therapie angegriffenen Immunsystems ermöglichen. Alle bisher durchgeführten Untersuchungen konnten bestätigen, dass die verwendeten Nanopartikel von den Tumorzellen in höherem Ausmaß und mit größerer Geschwindigkeit aufgenommen werden als von den Leukozyten. Von Letzteren wird jedoch immer auch ein Teil magnetisch markiert und damit bei der Separation abgereichert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen daher die von Tumorzellen „gereinigten“ Leukozyten der NF, die abgereicherten Leukozyten der PF sowie der Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und der anschließenden Separationsprozedur auf die weißen Blutzellen näher charakterisiert werden. Dabei gilt es die nachfolgenden Fragestellungen zu klären:

- Wird die Verteilung der Leukozytensubpopulationen durch die Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und die anschließende Separation verändert?
- Welche Unterschiede gibt es zwischen den einzelnen Populationen der weißen Blutzellen und zwischen den Lymphozytensubpopulationen?
- Gibt es Unterschiede im Verteilungsmuster der Leukozyten- bzw. Lymphozytensubpopulationen bei Verwendung von Partikeln mit verschiedenen Hüllen?
- Bestehen Unterschiede im Verteilungsmuster der Leukozyten- bzw. Lymphozytensubpopulationen zwischen Proben gesunder Probanden und Patientenproben? Gibt es patientenspezifische Besonderheiten?
- Sind die Leukozyten der NF nach der Separation intakt und lassen sich diese weiterkultivieren?
- Welche Zukunftsaussichten bestehen für die Anwendbarkeit des Verfahrens *in vivo* bzw. welche Hürden gilt es bis dahin noch zu überwinden?

2. Materialien

Die verwendeten Materialien wurden von verschiedenen Firmen bezogen. Eine vollständige Auflistung der verwendeten Chemikalien, Laborgeräte und Hilfsmittel findet sich im Anhang.

2.1. Leukozyten

Die für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Leukozyten wurden aus mit Heparin antikoagulierte Vollblut gesunder Spender sowie aus mit EDTA antikoagulierte Vollblut von Mammakarzinompatientinnen kurz vor Durchführung der jeweiligen Versuche isoliert. Die Population der gesunden Probanden (n=25) setzte sich aus 21 weiblichen und 4 männlichen Individuen zusammen, deren Lebensalter zwischen 22 und 80 Jahren (Mittelwert: 30,8 Jahre, Median: 25 Jahre) lag. Die Patientenproben stammten aus der Universitätsfrauenklinik Jena. Diese Gruppe (n=10) rekrutierte sich aus weiblichen Mammakarzinompatientinnen unter Herceptintherapie, deren Lebensalter 51 bis 82 Jahre (Mittelwert: 67,1 Jahre, Median: 66,5 Jahre) betrug.

2.2. Nanopartikel und Hüllstoffe

2.2.1. Struktur und Eigenschaften der Nanopartikel

Die verwendeten Nanopartikel bestehen jeweils aus einem superparamagnetischen Eisenoxidkern (Magnetit (Fe_3O_4)/Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Durchmesser zwischen 3 und 15 nm) und einer spezifischen Polysaccharidhülle (**Abb. 2**).

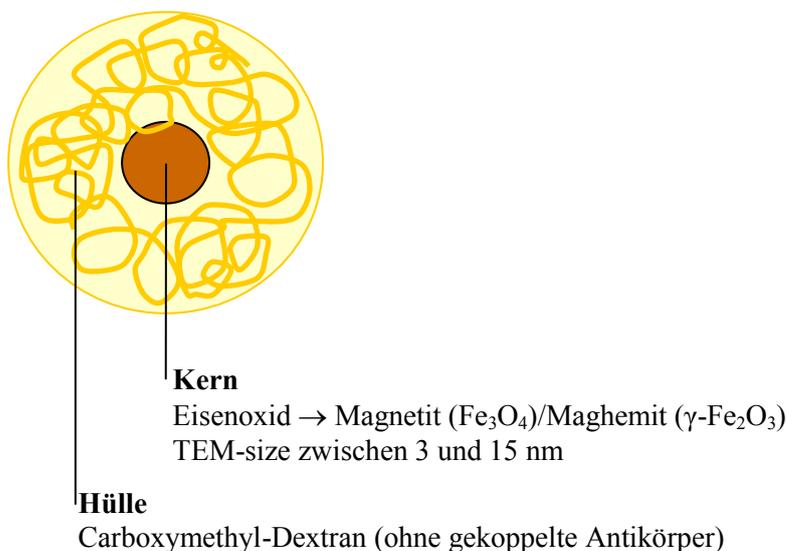


Abb. 2: Modell eines magnetischen Nanopartikels mit CMD-Hülle.

(aus: Schwalbe et al. 2006. Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood does not affect lymphocytes [Vortrag]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Klinik für Innere Medizin II.)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sie zur Depletion von im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen mittels magnetischer Zellseparation eingesetzt. Dextran und Dextranderivate haben sich für diesen Zweck als gut geeignete biokompatible Hüllstrukturen erwiesen (Lacava et al. 2001), weshalb mit Carboxymethyl-Dextran (CMD) umhüllte Nanopartikel für die meisten Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit als Standard genutzt wurden.

2.2.2. Hüllstoffe

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanopartikel besitzen eine Umhüllung ihres Eisenoxidkerns mit spezifischen Glucosederivaten. Die in **Tab. 1** aufgelisteten Polysaccharide kamen dabei als Hüllstoffe zum Einsatz.

Tab. 1 Verwendete Materialien zur Umhüllung von Nanopartikeln

Polysaccharid/Hüllstoff	Hersteller
Carboxymethyl-Dextran	Innovent e. V.
Carboxymethyl-Cellulose	Innovent e. V.
Carboxymethyl-Curdlan	Innovent e. V.

2.2.2.1. Dextran

Dextrane sind hochmolekulare, verzweigt-kettige, wasserlösliche Polysaccharide. Als Homoglykane bestehen sie ausschließlich aus D-Glucose-Molekülen, welche über α -(1,6)-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (**Abb. 3**). Die Molekülmasse der natürlichen Dextrane liegt im Bereich zwischen 10.000 und 50.000.000 Dalton. Sie werden von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* und *L. dextranicum*) extrazellulär aus Saccharose hergestellt. Verwendung finden Dextrane in der Medizin, unter anderem als Plasmaersatzmittel, sowie in der chemischen und kosmetischen Industrie. Im Zusammenhang mit der Nanotechnologie scheint Dextran bis dato das bestgeeignete Polysaccharid für die Umhüllung magnetischer Eisenoxidpartikel und deren Interaktion mit menschlichen Zellen zu sein (Schwalbe et al. 2006a). Durch Derivatisierung der einfachen Dextranmoleküle mit Carboxylgruppen (-COOH) und Methylgruppen (-CH₃) entsteht der hier genutzte Abkömmling Carboxymethyl-Dextran (CMD).

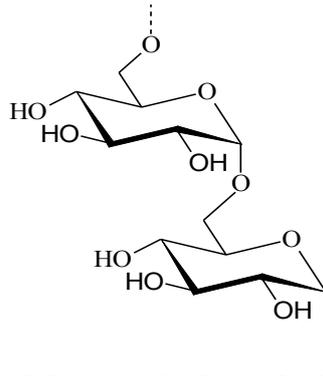


Abb. 3: Strukturformel des α -(1,6)-glycosidisch verknüpften Dextrans.
(aus: Wotschadlo et al. 2009. Specific interaction of polysaccharide-coated nanoparticles with human cells [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung.)

2.2.2.2. Cellulose

Bei der Cellulose handelt es sich um ein unverzweigtes nicht im Wasser lösliches Polysaccharid, welches aus mehreren hundert bis zehntausend β -(1,4)-glycosidisch verknüpften D-Glucose-Molekülen aufgebaut ist (**Abb. 4**). Die miteinander verbundenen Glucoseeinheiten sind bei diesem Homoglycan zueinander um jeweils 180° verdreht, sodass das Polymer eine lineare Struktur erhält. Die langen Ketten lagern sich mittels Quervernetzungen über Wasserstoffbrückenbindungen zu sehr reißfesten Faserstrukturen zusammen. Cellulose als häufigste organische Verbindung ist der Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände. Neben ihrer Bedeutung als Ballast- und Zusatzstoff in der Lebensmittelindustrie, ist Cellulose der wichtigste Rohstoff für die Papierherstellung. Unterschiedlichste Verwendung finden auch diverse Abkömmlinge des Polysaccharids in Bau-, Textil- und chemischer Industrie. Im Bereich der Nanotechnologie zeichnet sich die in Form von Nanokristallen verwendete Cellulose durch ihre Biokompatibilität aus (Jean et al. 2008). Außerdem ist das Polysaccharid gut zur Herstellung definierter Mikro- und Nanostrukturen geeignet (Hornig und Heinze 2008). Das im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kommende Derivat Carboxymethyl-Cellulose (CMC) entsteht ebenfalls durch Substituierung der einfachen Cellulosemoleküle mit Carboxylgruppen (-COOH) sowie Methylgruppen (-CH₃).

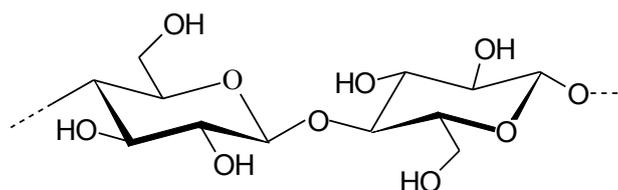


Abb. 4: Strukturformel der β -(1,4)-glycosidisch verknüpften Cellulose.
(aus: Wotschadlo et al. 2009. Specific interaction of polysaccharide-coated nanoparticles with human cells [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung.)

2.2.2.3. Curdlan

Curdlan ist ein unverzweigtes nicht wasserlösliches Polysaccharid mit hohem Molekulargewicht. Auch dieses Homoglykan besteht aus D-Glucoseeinheiten, die über β -(1,3)-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (**Abb. 5**). Das im alkalischen Milieu lösliche und 1966 von Professor Harada entdeckte Polymer wird von Bakterien der Gattung *Agrobacterium* (*Agrobacterium* sp. *Alcaligenes faecalis*) produziert. Curdlan ist nicht toxisch und nicht kanzerogen. Wird eine wässrige Lösung des Polysaccharids erhitzt, kommt es zur Bildung eines elastischen Gels, welches sich auch bei erneutem Erhitzen nicht wieder verflüssigt (Harada et al. 1968). Dabei lagern sich mehrere Ketten aus Curdlanmolekülen zu Mikrofibrillen zusammen. Neben den für die β -Glucane typischen immunstimulatorischen Effekten, werden Curdlan auch Anti-Tumor-Eigenschaften zugeschrieben (Nono et al. 1989, Bădulescu et al. 2009). Anwendung findet das Polysaccharid derzeit vor allem als Zusatzstoff in der Lebensmittelindustrie. Durch Derivatisierung mit Carboxylgruppen (-COOH) und Methylgruppen (-CH₃) entsteht der hier angewendete Abkömmling Carboxymethyl-Curdlan (CMCu).

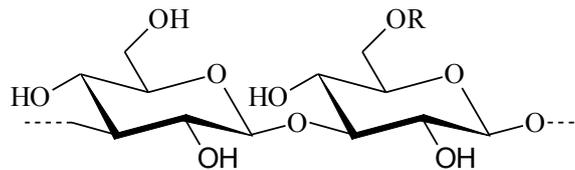


Abb. 5: Struktur des β -(1,3)-glycosidisch verknüpften Curdlans. (aus: Wotschadlo et al. 2009. Specific interaction of polysaccharide-coated nanoparticles with human cells [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung.)

2.3. Chemikalien, Puffer und Nährmedien

Tab. 2 Verwendete Chemikalien, Puffer und Nährmedien

Bezeichnung	Bemerkungen	Hersteller
Annexin V-FITC	aus Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	Becton Dickinson
Annexin V Binding Buffer	aus Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	Becton Dickinson
Aqua dest.		
BD FACS Clean Solution		Becton Dickinson
BD FACS Flow TM		Becton Dickinson
BD FACS Rinse TM		Becton Dickinson
BSA		Sigma®
CD4 MultiSort Microbeads human	aus CD4 MultiSort Kit human	Miltenyi Biotec
Coulter® Isoton® II Diluent		Beckman Coulter
Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expander		Invitrogen Dynal
EDTA		Sigma®

Bezeichnung	Bemerkungen	Hersteller
Erythrozytenlyse(EL)-Puffer		Qiagen
FCS		Biochrom AG
Interleukin-2 (IL2) human		Fluka
PBS		Gibco® (Invitrogen)
Penicillin-Streptomycin		Gibco® (Invitrogen)
PE-Puffer	PBS plus 2 mmol EDTA	Gibco® (Invitrogen), Sigma®
Propidiumiodid (PI)	aus Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	Becton Dickinson
Puffer für Lymphozytenkultivierung	PBS plus 0,1% BSA, pH 7,4	Gibco® (Invitrogen), Sigma®
RPMI 1640 (Zellkulturmedium)		Gibco® (Invitrogen)

2.4. Antikörper

Tab. 3 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
TriTest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP	Becton Dickinson

2.5. Laborgeräte und Hilfsmittel

Tab. 4 Verwendete Laborgeräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Einweg-Pipetten	Einweg-Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner-Bio-One
FACS-Röhrchen		Becton Dickinson
Falconröhrchen	Falcon (50ml)	Greiner-Bio-One
Inkubator	Thermoschrank TS 20/27	Heraeus Instruments
	HERACell 240i	Heraeus Instruments
Kamera	AxioCamHRc	Zeiss
Magnet, groß		Universitätsklinikum Jena
Magnet für Tubes		Dynal
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Monovetten (EDTA)	S-Monovette 9ml K3E	Sarstedt
Monovetten (Heparin)	S-Monovette 9ml AH	Sarstedt
Pasteurpipette	Pasteurplastpipette	Ratiolab®
Pipette Easypet		Eppendorf
Pipetten		Eppendorf
Pipettenspitzen		Plastibrand®
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf
Sterilwerkbank	HERAsafe® HS 12/2	Heraeus Instruments
Thermomixer	Thermomixer 5437	Eppendorf
Ultraschallsonde	Bandelin Sonoplus HD 2200	Bandelin Electronic
Vortex	Vortexer VF2	IKA® Labortechnik
Zellkulturplatten (12-Well)		Greiner-Bio-One
Zellseparationsgerät	SuperMACS™ II Separator	Miltenyi Biotec
Zellseparationssäulen	MACS® Separation Column MS	Miltenyi Biotec
	MACS® Separation Column LS	Miltenyi Biotec
Zellzählgerät	Coulter Z2 Particle Count & Size Analyser	Beckman Coulter
Zentrifugen	Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5315R	Eppendorf

Gerät/Hilfsmittel	Bezeichnung	Hersteller
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	Eppendorf

2.6. PC-Programme

Folgende Software (**Tab. 5**) wurde zur Erhebung, Analyse und Auswertung der Daten im Rahmen der vorliegenden Dissertation genutzt.

Tab. 5 Verwendete PC-Programme

Bezeichnung	Anwendungsgebiet
AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss)	Software zur Aufnahme und Auswertung von Fotografien im Rahmen der Zellkultivierung
BD CellQuest Pro	Software zur Aufnahme und Analyse von Daten im Rahmen der Durchflusszytometrie
Microsoft Excel 2003	Tabellenkalkulation und Erstellen von Diagrammen
SPSS 16.0 für Windows	Statistische Auswertung der Daten

3. Methoden

3.1. Reumhüllung von magnetischen Nanopartikeln

Nichtumhüllte Eisenoxidpartikel sowie „gealterte“ Nanopartikel, deren Polysaccharidhülle im Laufe der Zeit degeneriert (siehe 4.), zeigen keinerlei Zellspezifität bezüglich der Aufnahmegeschwindigkeit in Tumorzellen und Leukozyten, was eine gezielte magnetische Separation dieser beiden Zelltypen unmöglich macht (Schwalbe et al. 2006a). Deshalb ist eine Neuumhüllung der Partikel von Zeit zu Zeit unumgänglich. Dazu wurden 50 mg des jeweiligen Polysaccharids (im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen CMD und CMC zum Einsatz) vollständig in 300 µl Leitungswasser gelöst und mit 1 ml der „gealterten“ Nanopartikel versetzt. Das entstandene Gemisch wurde anschließend bei 37°C für 2 h auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Leitungswasser und kräftiger Durchmischung wurde das Reaktionsgefäß auf einem starken Magneten platziert und die Sedimentation der Partikel auf dem Gefäßboden abgewartet. Dann wurde der Überstand abgenommen und der Waschschrift noch einmal wiederholt. Durch Zugabe von Leitungswasser wurden die nun neu umhüllten Partikel auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Mittels Ultraschall für 3 bis 5 Sekunden bei 30 bis 40 Watt ohne Intervall auf Eis erfolgte eine Reduktion möglicher Partikelaggregationen.

3.2. Leukozytenisolierung aus Vollblut

Venöses Vollblut von gesunden Spendern und Mammakarzinompatientinnen wurde mittels Punktion einer peripheren (meist cubitalen) Vene gewonnen. Das Blut musste möglichst noch am Abnahmetag, spätestens jedoch am Folgetag, aufgearbeitet werden, da die Leukozyten als relativ empfindliche Zellpopulation bei zu langer Lagerung des Materials Schaden nehmen. Durch Lysierung der Erythrozyten konnten die in der Probe enthaltenen Leukozyten isoliert werden. Dazu wurden 8 ml Vollblut aus der Monovette entnommen, in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit 40 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt und verschlossen liegend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 U/min. Der entstehende Überstand wurde verworfen, das zurückbleibende Zellpellet in 15 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die nach der ersten Lyse noch intakten Erythrozyten zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 U/min und Verwerfen des Überstandes wurde das Leukozytenpellet in 2 ml PE-Puffer aufgenommen. Abschließend erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl nach dem in 3.3. beschriebenen Verfahren. Daran anschließend wurden die isolierten Leukozyten zügig weiterverarbeitet.

3.3. Zellzahlbestimmung mittels Coulter[®] Z2

Um Berechnungen bezüglich der Anteile der markierten und nichtmarkierten Zellen nach einer MACS-Separation zu ermöglichen, ist der Einsatz einer definierten Anzahl an Zellen unabdingbar. Auch zur Durchführung eines Apoptoseassays mittels Durchflusszytometrie muss die Zellzahl ermittelt werden. Diese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einem Coulter[®] Z2 bestimmt. Das Gerät misst die Zellzahl anhand der Änderung des elektrischen Widerstandes durch Zellen. Einschlusskriterium ist hierbei eine Größe der Zellen zwischen 7 und 14 µm. Zur Messung wurden 50 µl der Zellsuspension mit 20 ml Isoton II (Verdünnungsfaktor 1:400) in einem Coultergefäß gemischt und in das Zellszählgerät eingesetzt. Der Coulter[®] Z2 errechnet die Zellzahl pro Milliliter als Mittelwert aus zwei Einzelmessungen.

3.4. Magnetische Zellseparation (MACS)

Magnetic Activated Cell Sorting (=MACS) ist eine gebräuchliche Methode zur Sortierung, Separation und Depletion von Zellen. Das Ende der 1980er Jahre von Miltenyi et al. (Miltenyi et al. 1990) entwickelte Verfahren beruht in seiner ursprünglichen Form auf drei Bausteinen – dem MACS-Separator (**Abb. 6**), den MACS-MicroBeads und den MACS-Säulen (**Abb. 6**).

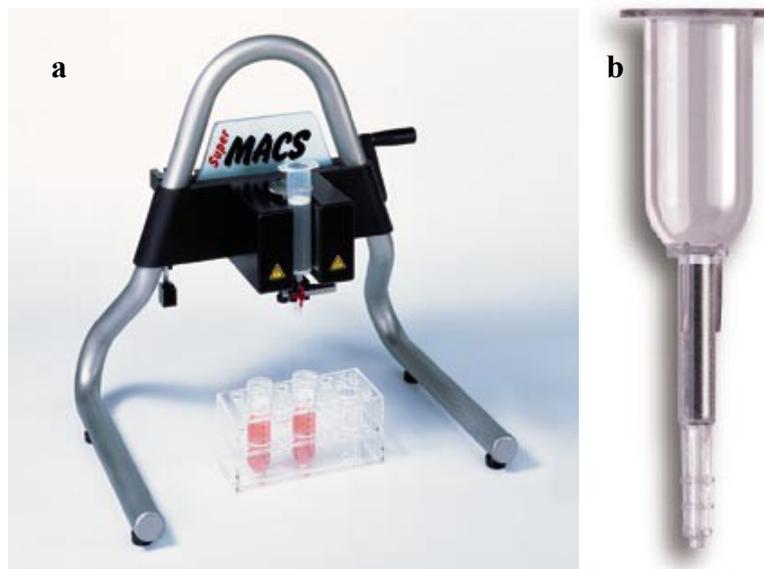


Abb. 6: MACS-System. (a) SuperMACS™ II Separator (b) MACS-Säule (Typ MS)
(aus: Column_Decision_Flyer.pdf, www.miltenyibiotec.com, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)

Der MACS-Separator besteht aus einem starken Magneten, welcher mit dem innerhalb der MACS-Säulen erzeugten Hochgradienten-Magnetfeld als sensibler Filter für markierte Zellen mit geringem magnetischem Moment fungiert. Die MACS-Säulen enthalten dicht gepackte ferromagnetische Kügelchen mit einem zellfreundlichen Plastiküberzug. Eingbracht in das permanente Magnetfeld des MACS-Separators, kommt es zur Magnetisierung des Materials und entsprechend markierte Zellen werden in der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen diese ungehindert passieren. Wird die Säule aus dem Magnetfeld des Separators herausbewegt, verlieren die Kügelchen ihre Magnetisierung wieder. Bei den MACS-MicroBeads handelt es sich um submikroskopisch kleine (Durchmesser ca. 50 nm) superparamagnetische Partikel, bestehend aus einem Eisenoxidkern und einer Polysaccharidhülle, welche an gegen unterschiedliche Zelloberflächenmoleküle gerichtete Antikörper gebunden sind. Mittels Auswahl eines geeigneten Antikörpers kann so die gewünschte Zellpopulation magnetisch markiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen jedoch durch die endozytotische Aufnahme magnetischer Nanopartikel, ebenfalls aus einem Eisenoxidkern und einer Polysaccharidhülle bestehend, markiert, sodass auf den Einsatz von an die Partikel gekoppelten Antikörpern verzichtet werden konnte. Weder die MACS-MicroBeads noch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanopartikel haben einen Einfluss auf den Struktur-, Funktions- oder Aktivitätszustand der magnetisch markierten Zellen und sind somit biokompatibel sowie ohne negativen Effekt auf

nachfolgende Untersuchungen, wie z.B. eine FACS-Analyse (Miltenyi et al. 1990, Clement et al. 2006). Unmarkierte Zellen, welche die ins Magnetfeld eingebrachte Säule ungehindert passieren können, werden im Folgenden als Negativfraktion (NF) bezeichnet. Jene Zellen, die magnetisch markiert sind und damit zunächst in der Säule zurückgehalten werden, können nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld als eigene Fraktion eluiert werden. Diese wird im Folgenden als Positivfraktion (PF) bezeichnet (**Abb. 7**). Somit ermöglicht die MACS-Technologie eine präzise Auftrennung eines Zellgemisches unter Erhalt der unmarkierten und markierten Population, sodass beide Fraktionen für sich anschließende Analysen zur Verfügung stehen. Weiterhin können mit der MACS-Technologie unterschiedliche Separationsstrategien verfolgt werden. Man unterscheidet zunächst zwischen der Positivselektion und der Depletion oder Negativselektion. Auch eine Kombination beider Methoden oder mehrschrittige Verfahren sind möglich. Bei der Positivselektion sind die gewünschten Zielzellen die magnetisch markierten, welche sich nach der Separation in der PF befinden. Dies ist auch die bei unserem Verfahren zur Tumorzelldepletion verfolgte Strategie, da diese besonders zur Anreicherung seltener Zellen geeignet ist. Im Rahmen der Negativselektion werden dagegen jene Zellen markiert, die nicht der Zielpopulation angehören. Die gewünschten Zellen finden sich hierbei in der NF.

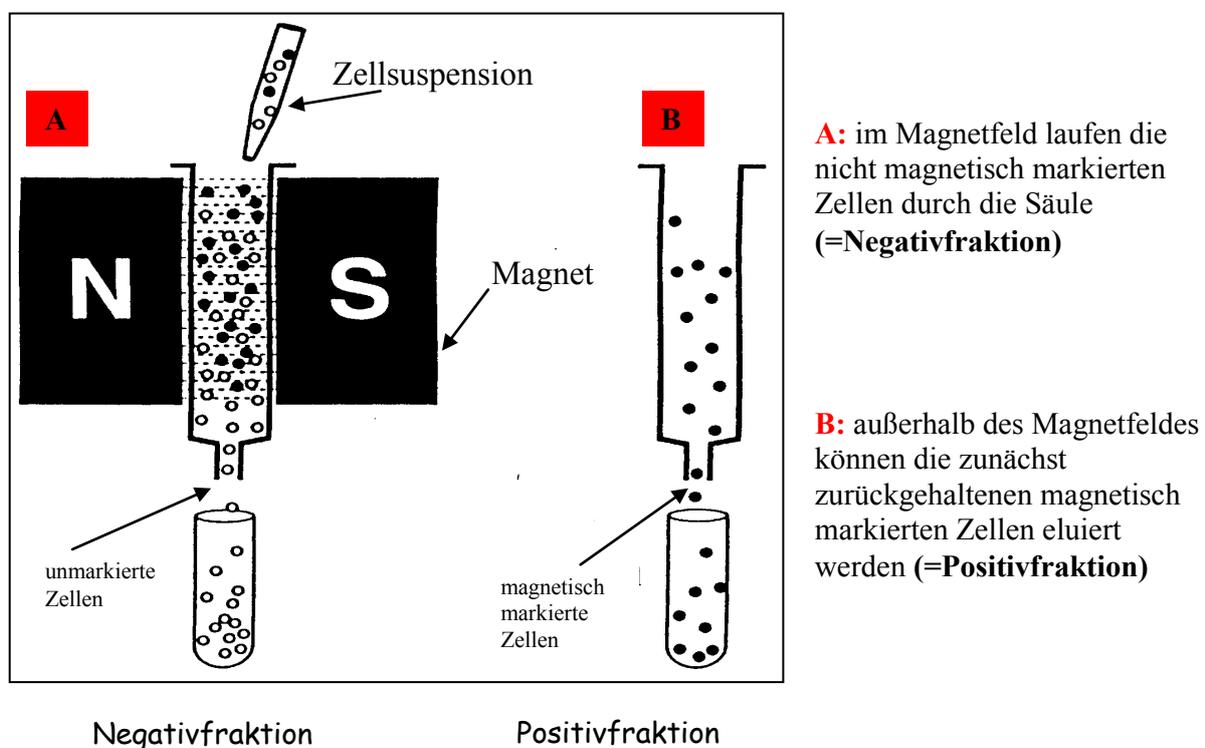


Abb. 7: Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS).

(modifiziert aus: Schwalbe et al. 2006. Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood does not affect lymphocytes [Vortrag]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Klinik für Innere Medizin II.)

3.4.1. Magnetische Markierung & Separation der Leukozyten - Aufnahme einer Kinetik

Die verwendeten Leukozyten wurden mittels des unter 3.2. beschriebenen Verfahrens aus venösem Vollblut von gesunden Spendern und Mammakarzinompatientinnen isoliert. Um im Anschluss an die Durchführung der Versuche eine rechnerische Auswertung vorzunehmen, war der Einsatz einer definierten Zellzahl pro Versuchsansatz notwendig. Daher erfolgte nach der Isolierung der weißen Blutzellen zunächst die Bestimmung der Zellzahl in der Probe am Coulter[®] Z2 (siehe 3.3.). Pro Reaktion wurde ein einer Anzahl von $2,5 \times 10^6$ Leukozyten entsprechendes Aliquot in ein Eppendorf-Tube überführt und mit PE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l aufgefüllt. Die Lagerung der Proben erfolgte im Wärmeblock bei 37°C. In die Deckel der Tubes wurden nun 5 μ l der Nanopartikelsuspension pipettiert, selbige wurden anschließend geschlossen. Im nächsten Schritt musste das MACS-System vorbereitet werden. Dazu wurde die MACS-Säule (Typ MS, empfohlen für bis zu 10^7 markierte Zellen bei einer Gesamtzellzahl von maximal 2×10^8) mit 500 μ l PE-Puffer äquilibriert, nachfolgend zusammen mit einem Röhrchen zum Auffangen der Negativfraktion in den MACS-Separator (Typ SuperMACS[™] II Separator) eingespannt und in dessen Magnetfeld hinein bewegt. Dann konnte die Inkubation der Zellen mit den magnetischen Nanopartikeln durch gleichzeitiges Schütteln der Tubes gestartet werden. Simultan dazu wurde mit der Zeitmessung begonnen. Nach Ablauf eines definierten Inkubationszeitraumes (4, 8, 12, 16, 20 und 30 Minuten) wurde nun eine Probe aus dem Wärmeblock entnommen und mit einer Pipette auf die vorbereitete Säule im Magnetfeld aufgetragen. Zellen, die zu diesem Zeitpunkt keine Nanopartikel aufgenommen hatten, konnten ungehindert passieren und erschienen als NF im Eluat. Magnetisch markierte Zellen wurden in der Säule zurückgehalten. Nachdem die aufgetragene Probe durchgelaufen war, wurde die Säule mit 500 μ l PE-Puffer gewaschen, um im Säulenmaterial verbliebene unmarkierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die MACS-Säule aus dem Magnetfeld des Separators heraus bewegt und ein neues Röhrchen zum Auffangen der magnetisch markierten Zellen eingespannt. Zur Gewinnung der PF wurden jetzt 1000 μ l PE-Puffer aufgetragen und die Säule mittels des im Lieferumfang enthaltenen Stempels eluiert. Nach vollendeter MACS-Separation wurden die Volumina der beiden Fraktionen auf je 1 ml abgeglichen und die Zellzahlen der gewonnenen Proben als Voraussetzung für die rechnerische Auswertung des Versuchs (Beispiel im Anhang) nach dem in 3.3. beschriebenen Verfahren bestimmt.

3.4.2. Isolierung der T-Zellen zur Lymphozytenkultivierung mittels MACS

Um zu überprüfen, ob die Zellen der NF nach der Separation intakt sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die Lymphozyten als wichtige Akteure der angeborenen und erworbenen Immunität des Menschen nach der Auftrennung mittels MACS weiterzukultivieren. Der Erhalt der biologischen und funktionellen Integrität der Immunzellen in der NF ist von größter Bedeutung, da diese bei einer zukünftigen Umsetzung des Verfahrens in der Praxis jene Zellpopulation darstellen würden, die an den Patienten zurückgeführt wird (siehe 1.4.1.). Exemplarisch wurden hierzu T-Zellen aus der NF mittels Dynabeads[®] CD3/CD28 T Cell Expander in Kultur gebracht (siehe 3.6.). Da das genannte Verfahren vorsieht, dass nur mononukleäre Zellen oder reine T-Zellen eingesetzt werden, musste zunächst eine geeignete Population mittels MACS aus den in der NF enthaltenen weißen Blutzellen isoliert werden. Dazu wurden die Leukozyten aus 2 Monovetten mit je 9 ml Vollblut nach der in 3.2. beschriebenen Methode extrahiert. Abweichend vom dort genannten Vorgehen wurde das Pellet am Ende der Prozedur jedoch nur in 1000 µl PE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die Probe bei 37°C im Wärmeblock gelagert und mit 30 µl der CMD-Partikel versetzt. Nach 8-minütiger Inkubationszeit erfolgte das Auftragen der Zellsuspension auf eine MACS-Säule (Typ LS, empfohlen für bis zu 10⁸ markierte Zellen bei einer Gesamtzellzahl von maximal 2 x 10⁹), die sich nach entsprechender Äquilibrierung mit 1000 µl PE-Puffer bereits im Magnetfeld des MACS-Separators befand. Nach Durchlauf der Probe wurde die Säule einmal mit weiteren 1000 µl PE-Puffer gewaschen. Das erhaltene Eluat enthielt nun die unmarkierten Leukozyten. Die markierten Zellen wurden nach dem Herausbewegen der Säule aus dem Magnetfeld und dem Auftragen von 2000 µl PE-Puffer mittels des im Lieferumfang enthaltenen Stempels ebenfalls eluiert. Die NF musste nun einer zweiten Zellseparation zugeführt werden, um die darin enthaltenen T-Zellen zu isolieren. Dazu wurde die Probe zunächst für 5 Minuten bei 1200U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl PE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl CD4 MultiSort MicroBeads zur Leukozytensuspension hinzu pipettiert und das Gemisch für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Probe mit 400 µl PE-Puffer versetzt und auf eine bereits äquilibrierte und in den MACS-Separator eingespannte Säule (Typ MS) aufgetragen. Diese zweite Separation erfolgte nach dem in 3.4.1. beschriebenen Prinzip mit den dort genannten Volumina. Die jetzt erhaltene PF beinhaltete nun die mittels magnetischen Zellseparationsverfahren aufgereinigten T-Zellen.

3.5. Durchflusszytometrie (FACS)

Fluorescence Activated Cell Sorting (=FACS) oder Durchflusszytometrie beschreibt ein Verfahren, welches primär der Analyse von Zelleigenschaften, wie Größe, Granularität oder Eigenfluoreszenz der Zellen dient (Jaroszeski et al. 1999, Delude 2005). Außerdem können Zellgemische hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mit Hilfe von an fluoreszierende Moleküle gekoppelten Antikörpern, welche definierte Oberflächenmarker der einzelnen Zellpopulationen erkennen, untersucht werden. Sekundär besteht bei den meisten Geräten auch die Möglichkeit der Zellsortierung nach Analyse der genannten Parameter. Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie ist die Emission und Detektion von Streulicht und Fluoreszenzimpulsen (**Abb. 8**). Die in einer Suspension enthaltenen Zellen werden dazu mittels einer Kapillare angesaugt und passieren im Sensormodul des FACS-Gerätes einzeln einen Argon- Laserstrahl (Standardwellenlänge: 488 nm). Dabei entsteht Streulicht, welches mittels Detektoren, die in Richtung des Laserstrahls (forward angle light scatter [FSC]) und in einem Winkel von 90° zu selbigem (side angle light scatter [SSC]) angebracht sind, eingefangen und analysiert wird. Das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht (FSC) ist hier ein Indikator für die Zellgröße, während das rechtwinklig gestreute Licht (SSC) Aufschluss über die Granularität einer Zelle gibt. Werden fluoreszierende Antikörper eingesetzt, so kommt es bei der Passage des Laserstrahls zur Anregung der Fluorochrome (**Tab. 6**). Die emittierten Fluoreszenzimpulse werden dann mittels spezifischer Filter und Detektoren, die wiederum im rechten Winkel zum Strahl des Argon-Lasers angebracht sind, eingefangen und analysiert.

Tab. 6 Absorptions- und Emissionsmaxima gebräuchlicher Fluorochrome

Name	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe
FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	490 nm	530 nm	grün
PE (Phycoerythrin)	480 nm	578 nm	orange
PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein)	470 nm	680 nm	rot
PI (Propidiumiodid)	500 nm	650 nm	orange

Die detektierten Lichtimpulse werden nun im FACS-Gerät zunächst in ein elektronisches Signal und schließlich in digitale für den angeschlossenen Computer auswertbare Daten umgewandelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie genutzt, um die bei der magnetischen Separation erhaltenen Fraktionen hinsichtlich der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen näher zu charakterisieren. Alle Messungen wurden mit einem „FACSCalibur“ der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte in Form von Punktdiagrammen (Dot Plots) (s. **Abb. 9b**) mit Hilfe des Programms

„CellQuest Pro“, welches auch die Möglichkeit bietet, einzelne Zellpopulationen durch Setzen von Gates voneinander abzugrenzen und damit spätere Analysen nur noch auf bestimmte Untergruppen zu beziehen.

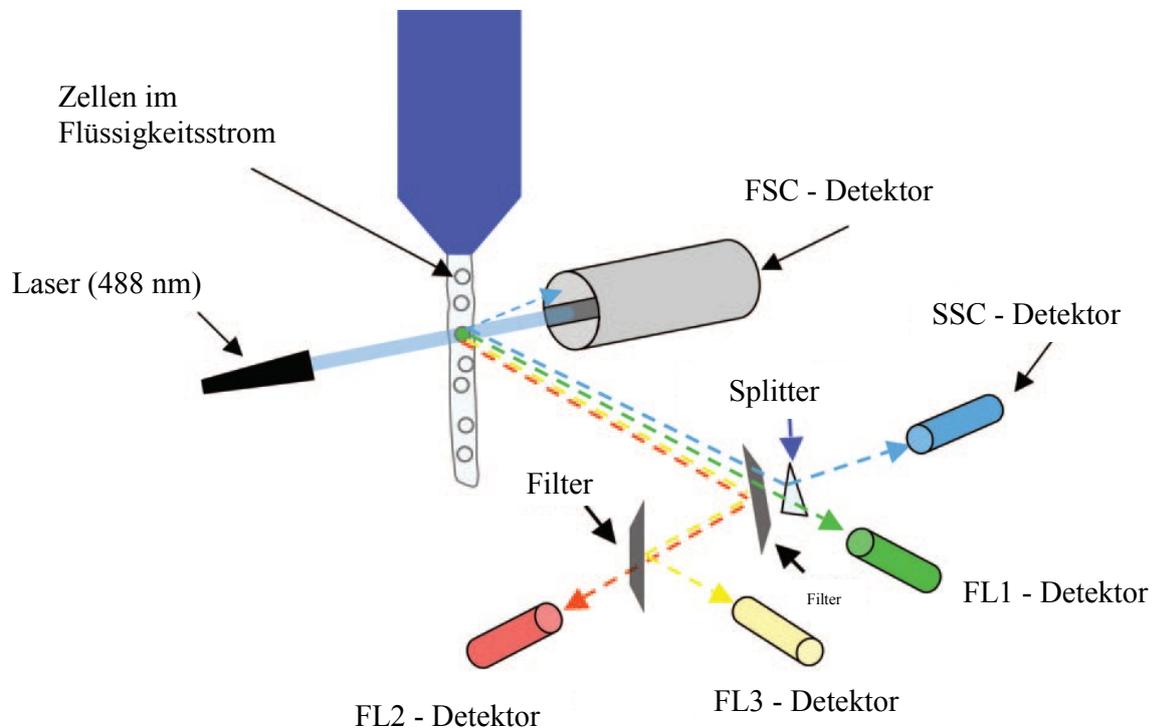


Abb. 8: Aufbau eines einfachen Durchflusszytometers. Mit dem Flüssigkeitsstrom werden die Zellen einzeln am Laser vorbeigeleitet. In Richtung des Laserstrahls gestreutes Licht wird im FSC-Kanal detektiert. Alle anderen Detektoren sind im 90° Winkel zum Laserstrahl angebracht. Hier werden im SSC-Kanal das seitwärts gestreute Licht und die Fluoreszenzimpulse (FL1 = grün, FL2 = rot, FL3 = gelb) detektiert. Das digitalisierte Signal der Detektoren wird dann mittels des angeschlossenen Computers analysiert. (modifiziert aus: Delude RL. 2005. Flow cytometry. Crit Care Med, 33(12): 426-428.)

3.5.1. Analyse der Leukozytensubpopulationen mittels FACS

Die Gesamtpopulation der weißen Blutzellen setzt sich aus drei großen Gruppen, den Granulozyten, den Monozyten und den Lymphozyten, zusammen (siehe 1.5.). Diese drei Zellarten weisen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Größe und Granularität auf und lassen sich deshalb leicht mittels Analyse der Signale im FSC- und SSC-Kanal des FACS-Gerätes voneinander abgrenzen, ohne dass der Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen erforderlich ist (**Abb. 9**). Diese Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Anteile der Leukozytensubpopulationen und die Menge der durch die vorangegangenen Prozeduren geschädigten Zellen in den einzelnen Fraktionen nach der MACS-Separation zu ermitteln. Dazu wurde zunächst eine Probe unseparierter Leukozyten in ein FACS-Röhrchen überführt, mit PBS-Puffer verdünnt und im FACS-Gerät gemessen, um die Bereiche im FSC-

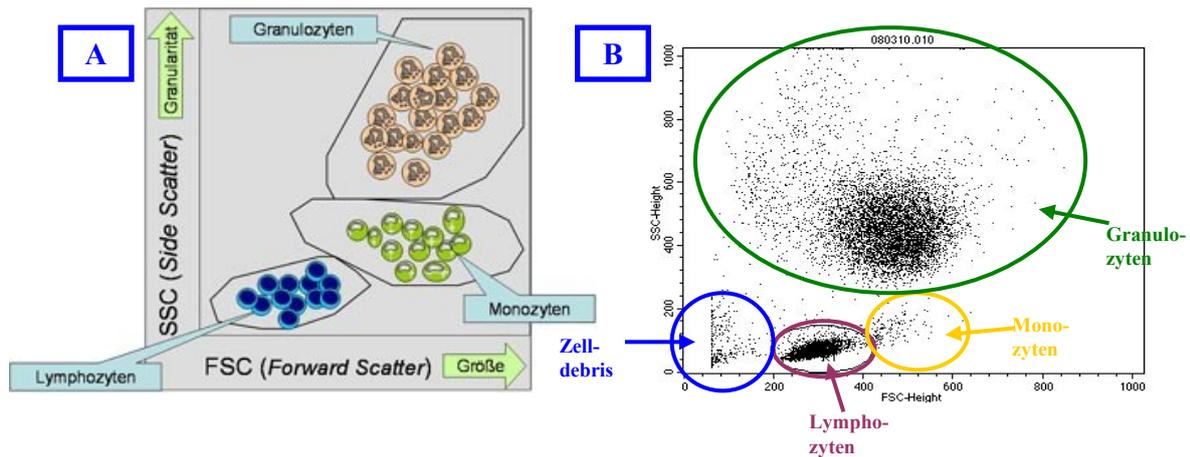


Abb. 9: FACS-analytische Darstellung der Leukozytensubpopulationen in Form eines Dot Plots. (A) Schematisierte Darstellung. Große Zellen befinden sich rechts in der Abbildung, granulierte Zellen im oberen Teil des Bildes. Kleine, wenig granulierte Zellen befinden sich demnach links unten (Lymphozyten), große, granulierte Zellen rechts oben (Granulozyten). **(B) Reale Darstellung.** (Abb. B: eigene Abbildung. Abb. A aus: Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau. http://www.antikoerper-online.de/images/news/resources_FACS_1_de.jpg)

und SSC-Kanal zu ermitteln, in denen die Zellen auftraten und die Geräteeinstellungen entsprechend zu optimieren. Anschließend erfolgte die Messung der mittels MACS gewonnenen NF und PF. Hierbei wurden 10.00 Events pro analysierter Probe aufgenommen. Das Ergebnis der einzelnen Messungen wurde als Punktdiagramm (Dot Plot) (s. **Abb. 9b**) dargestellt. Mit Hilfe der Auswertungssoftware konnten nun die vier Zellpopulationen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Zelldebris) durch Setzen von Gates voneinander abgegrenzt und deren Anteile an der Gesamtzahl gemessener Events errechnet werden.

3.5.2. Analyse der Lymphozytensubpopulationen mittels FACS

Die Population der Lymphozyten, welche einen zentralen und wichtigen Teil des menschlichen Immunsystems darstellt, setzt sich aus mehreren Untergruppen zusammen, die sich anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (CD- [= cluster of differentiation] Marker) voneinander unterscheiden lassen (siehe 1.5.3.). So stellt z.B. CD3 einen typischen T-Zell-Marker dar, während CD19 für B-Zellen charakteristisch ist. Mittels an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelter Antikörper, die diese CD-Moleküle erkennen und sich an sie binden, ist eine Unterscheidung der Lymphozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie relativ einfach möglich. Diese Methode wurde genutzt, um die Anteile der T- und B-Lymphozyten in den einzelnen Fraktionen näher zu charakterisieren. Dazu mussten die Zellen zunächst mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden. Hierfür wurde aus jeder nach der magnetischen Zellseparation erhaltenen Probe ein Aliquot von 100

µl entnommen, in ein neues Röhrchen überführt, mit 15 µl der Antikörpersuspension (TriTest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP) versetzt und für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Zusätzlich wurden eine mit Antikörpern gefärbte und eine ungefärbte Kontrolle aus unseparierten Leukozyten angelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit PBS-Puffer verdünnt und dann nacheinander im FACS analysiert. Zunächst mussten die geeigneten Parametereinstellungen des Gerätes anhand der mitgeführten Kontrollen ermittelt werden. Durch das Setzen eines Gates um die Population der Lymphozyten war es möglich die anderen Leukozytengruppen von den nachfolgenden Untersuchungen auszuschließen, sodass im nun erstellten Dot Plot, in welchem die Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen wurden, nur noch die T- und B-Zellen als Events erschienen (**Abb. 10**). Bei den Einzelmessungen dieser Versuchsreihe wurden jeweils 10.000 sich im Lymphozytengate befindende Events aufgenommen. Die Ergebnisse wurden wiederum in Form von Punktdiagrammen dargestellt. Mittels Einteilung derselben in Quadranten konnten die beiden Lymphozytenpopulationen voneinander abgrenzt und ihre Anteile an der Gesamtzahl der aufgenommenen Events errechnet werden.

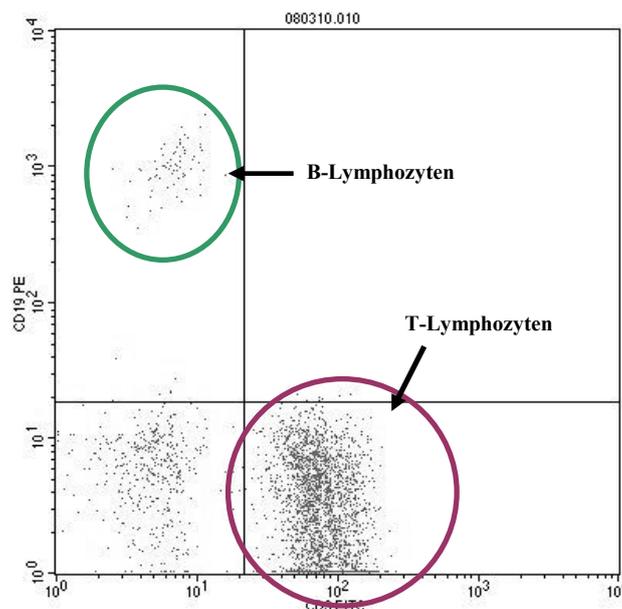


Abb. 10: FACS-analytische Darstellung der Lymphozytensubpopulationen in Form eines Dot Plots. (eigene Abbildung)

3.5.3. Apoptoseassay mittels FACS

Unter Apoptose versteht man eine physiologische Form des Zellunterganges, welche auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird (van Engeland et al. 1998). Bei diesem Vorgang kommt es zu Strukturveränderungen in der Plasmamembran von betroffenen Zellen. Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das normalerweise nur auf der Innenseite der

Zellmembran lokalisiert ist, wird auf die Außenseite der Membran transloziert und kann somit von Antikörpern, die gegen dieses Molekül gerichtet sind, erkannt und gebunden werden. Eine andere Form des Zelltodes ist die Nekrose. Dabei kommt es zum vollständigen Verlust der Membranintegrität, sodass Stoffe ins Zellinnere permeieren können, für die eine intakte Plasmamembran eine unüberwindliche Barriere darstellen würde. Diese Tatsachen macht sich ein durchflusszytometrisches Verfahren zur Überprüfung der Zellvitalität zu Nutze. Annexin V, ein kalziumabhängiges phospholipidbindendes Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin, wird dabei, gekoppelt an das Fluorochrom FITC, als Apoptosemarker verwendet. Als Nekrosemarker dient Propidiumiodid, ein DNA-Farbstoff, der nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen überwinden kann. Durch Auftragen der beiden Fluoreszenzen in einem Dot Plot kann man in der FACS-Analyse dann drei Zellpopulationen voneinander abgrenzen – lebende, apoptotische und nekrotische Zellen (**Abb. 11**).

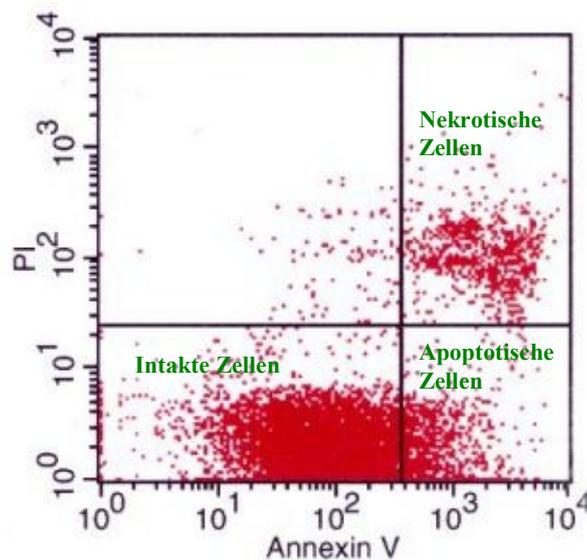


Abb. 11: FACS-analytisches Ergebnis eines Apoptoseassays in Form eines Dot Plots (schematisierte Darstellung). (modifiziert aus: Koza B. 2004. Apoptosedetektion mittels Annexin V-Markierung. <http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/piposanneg.gif>)

Im Rahmen dieser Arbeit kam der Apoptoseassay bei der Vitalitätsprüfung der kultivierten Lymphozyten (siehe 3.6.) zur Anwendung. Dazu wurde zunächst ein einer Anzahl von 2×10^5 Zellen entsprechendes Aliquot in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen, um Reste von PE-Puffer oder Kulturmedium zu entfernen. Nach der zweiten Zentrifugation (5 Minuten bei 1000U/min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 μ l Färbelösung, bestehend aus 199 μ l Annexin V Binding Buffer, 0,5 μ l Propidiumiodid und 0,25 μ l Annexin V-FITC, aufgenommen. Dieser Versuchsansatz wurde für 15 Minuten im Dunkeln und bei

Raumtemperatur inkubiert, mit 400 µl Annexin V Binding Buffer aufgefüllt und dann innerhalb einer Stunde mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Auch bei diesen Messungen wurde ein Gate um die Lymphozytenpopulation gezogen, um Zelltrümmer und die zur Kultivierung erforderlichen Dynabeads (siehe 3.6.) von der weiteren Untersuchung auszuschließen. Nach der Auszählung von 10.000 sich innerhalb des Gates befindenden Events wurden die Ergebnisse auch hier wieder als Punktdiagramme (Dot Plots) dargestellt. Mittels Unterteilung derselben in Quadranten war es nun möglich, die Anteile an lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen in der analysierten Probe abzuschätzen.

3.6. Lymphozytenkultivierung

Um die Depletion von im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen mittels magnetischer Zellseparation erfolgreich am Patienten durchführen zu können, ist es von größter Bedeutung, dass die in der NF verbleibenden Leukozyten nach der Prozedur intakt sind und ihre physiologischen Funktionen beibehalten. Deshalb war eins der Ziele der vorliegenden Arbeit, diesen Sachverhalt zu prüfen. Versuchsweise sollten dazu die Zellen der NF nach der MACS-Separation in Kultur gebracht und deren Wachstumsverhalten analysiert werden. Da eine gleichzeitige Kultivierung aller Leukozytensubpopulationen experimentell nur schwer zu realisieren ist, wurden hier exemplarisch die T-Lymphozyten, als einer der wichtigsten Bestandteile des menschlichen Immunsystems, untersucht. Ein etabliertes im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung gekommenes Verfahren ist die Vermehrung von T-Zellen unter Einsatz des Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expanders (Garlie et al. 1999, Lum et al. 2001, Trickett und Kwan 2003) (Protokoll siehe Anhang). Dabei handelt es sich um Polystyren-Partikel, welche mit monoklonalen Antikörpern überzogen sind. Die Antikörper sind gegen die CD3- und CD28-Moleküle auf der T-Zelloberfläche gerichtet. Über eine Interaktion mit den genannten Molekülen wird das physiologische Zusammenspiel von T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen (APC's), welches letztlich zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen führt (siehe 1.5.3.1.), imitiert. Unter Zusatz von Interleukin 2, einem wichtigen Wachstumsfaktor für Lymphozyten (siehe 1.5.3.1.), kann somit eine Aktivierung und Vermehrung der Zellen erreicht werden. Da das genannte Verfahren vorsieht, dass nur mononukleäre Zellen oder reine T-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml Medium in Kultur gebracht werden, musste zunächst eine geeignete Population mittels des unter 3.4.2. beschriebenen Prinzips aus den Leukozyten der NF isoliert und die Zellzahl in der erhaltenen Probe bestimmt (siehe 3.3.) werden. Um den PE-Puffer zu entfernen, wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die

T-Lymphozyten wurden nun unter sterilen Arbeitsbedingungen in Kulturmedium (RPMI 1640 plus 10% FCS und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin) aufgenommen, dann in einer 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät und mit den, entsprechend der Herstellerempfehlungen (Protokoll siehe Anhang), zuvor gewaschenen Dynabeads[®] im Verhältnis von 3 Beads pro T-Zelle versetzt. Anschließend wurden die Lymphozyten im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Zwei Tage nach dem Aussäen der Zellen erfolgte die Zugabe von Interleukin 2 in einer Konzentration von 100 U/ml Medium. Im Verlauf wurden die Zellkulturen im Abstand von etwa 48 h im Mikroskop beurteilt und deren Wachstumsverhalten und Morphologie fotografisch dokumentiert. Je nach Dichte des Zellrasens wurden die kultivierten Lymphozyten dann am Tag 4 bis 6 nach Bestimmung der Zellzahl unter Zugabe von Kulturmedium (RPMI 1640 plus 10% FCS und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin) und Interleukin 2 (100 U/ml Medium) so gesplittet, dass anschließend wieder eine Konzentration von 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen/ml Medium vorlag. Des Weiteren wurde die Vitalität der Zellen bei Ansetzen der Kulturen und im Verlauf mittels eines durchflusszytometrischen Apoptosetests (siehe 3.5.3.) überprüft.

3.7. Statistische Methoden

Die Mehrzahl der Versuche wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mindestens fünfmal durchgeführt. Die gewonnenen Daten der jeweiligen Wiederholungen wurden unter Ermittlung ihres Mittelwertes und der zugehörigen Standardabweichung zusammengefasst und mit Hilfe des Programms Microsoft Office Excel in graphischer Form dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse sowie der Vergleich verschiedener Datenreihen unter statistischen Gesichtspunkten erfolgten unter Zuhilfenahme von SPSS 16.0 für Windows. Dabei kamen die einfaktorielle Varianzanalyse (ONEWAY ANOVA) mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur, der nichtparametrische Wilcoxon-Test und der Mann-Whitney-Test zur Anwendung. Wie allgemein üblich, wurde das Signifikanzniveau für alle durchgeführten Tests auf 0,05 festgelegt.

4. Ergebnisse

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits nachweisen, dass Nanopartikel mit einer Hülle aus CMD in der Lage sind, mit lebenden Zellen zu interagieren (Trickett et al. 1991, Hancock und Kemshead 1993, Haukanes und Kvam 1993, Berry et al. 2004). Die Partikel binden dabei zunächst an die Oberfläche der zu markierenden Zellen und werden dann über endozytotische Vorgänge ins Zellinnere transportiert, wo sie in membranumschlossenen Vesikeln vorliegen (Wagner et al. 2004) (**Abb. 12**).

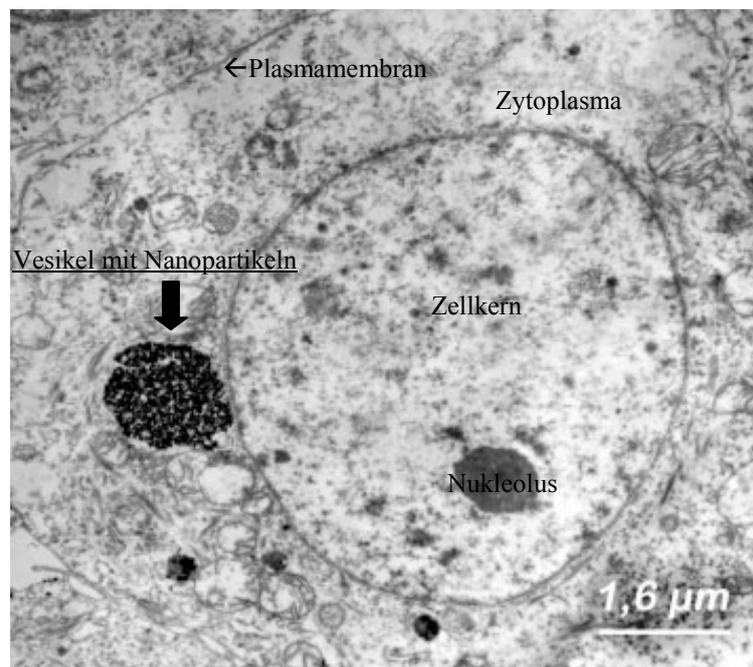


Abb. 12: Transmissions-Elektronenmikroskopie von MCF-7-Zellen nach Inkubation mit CMD-Nanopartikeln. Links vom Zellkern erkennt man ein mit magnetischen Nanopartikeln beladenes membranumhülltes Vesikel. (aus: Wagner et al. 2004. Synthesis of oligonucleotide-functionalized magnetic nanoparticles and study on their in vitro cell uptake. *Appl. Organometal. Chem.*, 18: 514-519.)

Dieser Prozess erfolgt sehr rasch und ermöglicht schon nach kurzer Inkubationszeit die magnetbasierte Separation markierter und unmarkierter Zellen. Die zeitbezogenen Aufnahmezeiten sind dabei vom Zelltyp abhängig. Tumorzellen zeigen eine schnellere Aufnahme der Partikel als humane Leukozyten (Schwalbe et al. 2005, Clement et al. 2006), was die Depletion von Tumorzellen aus einer Leukozytensuspension mit dem Ziel einer hohen Tumorzellausbeute bei gleichzeitig geringem Verlust an weißen Blutzellen möglich macht. Die Varianz bezüglich der Aufnahmezeiten erklärt man sich zum einen durch unterschiedliche Plasmamembran-Turnover-Raten der verschiedenen Zellarten (Clement et al. 2006, Schwalbe et al. 2006b). Außerdem nimmt man an, dass differente

Oberflächenstrukturen der Tumorzellen und Leukozyten, welche auch die Ladungseigenschaften der Membranen beeinflussen, zu den Unterschieden in der Aufnahmekinetik beitragen. So konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen keine Bindungszentren für Dextran besitzen (Moore et al. 1997). Des Weiteren gehen Schwalbe et al. davon aus, dass Tumorzellen im Vergleich zu Leukozyten einen höheren Nährstoffbedarf aufweisen (Schwalbe et al. 2006b). Bei Aufnahme der Nährstoffe aus der Umgebung könnten dann die Nanopartikel mit ins Zellinnere transportiert werden (Clement et al. 2006). Bekannt ist weiterhin, dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche Endozytoseraten aufweisen (Wilhelm et al. 2002, Pamme und Wilhelm 2006), was zur Varianz der Aufnahmekinetik beitragen dürfte. So zeigen beispielsweise Erythrozyten keine, Lymphozyten eine geringe, Tumorzellen und Makrophagen dagegen eine hohe endozytotische Kapazität (Pamme und Wilhelm 2006). Da die Interaktion der Nanoteilchen mit den Zellen hier nur über die Polysaccharidhülle und nicht über daran gekoppelte Antikörper vermittelt wird (siehe 1.3.3.), ist für die spezifische Markierung der Zellen vor allem auch die Intaktheit der Partikelhülle von größter Bedeutung. Nackte Partikel ohne Dextran-Überzug werden von Tumorzellen und Leukozyten gleichschnell und in hohem Maße aufgenommen (Schwalbe et al. 2006a). Durch Verwendung von CMD als Hüllstruktur erreicht man die zellspezifische Markierung und eine Erweiterung des Zeitfensters, in dem deutlich mehr Tumorzellen als Leukozyten mit Nanopartikeln beladen sind (Schwalbe et al. 2006a, Schwalbe et al. 2006b). Die differente Interaktion der magnetischen Nanoteilchen mit den verschiedenen Zelltypen hängt neben Struktur und Material der Partikel und ihrer Hüllen auch von den Inkubationsbedingungen, wie pH-Wert, Osmolalität oder Zusatz humanen Plasmas, ab (Chouly et al. 1996, Wilhelm et al. 2003, Schwalbe et al. 2005, Clement et al. 2006, Wotschadlo et al. 2009). Mit CMD umhüllte Partikel verlieren nach und nach die Fähigkeit zur zelltypspezifischen Interaktion und weisen dann ähnlich hohe zeitbezogene Aufnahmeraten in Tumorzellen und Leukozyten auf. Sie verhalten sich also analog zu nackten nichtumhüllten Eisenoxid-Partikeln. Schwalbe et al. bezeichnen dieses vermutlich auf eine Degeneration der Hüllstruktur zurückzuführende Phänomen als „Alterung“ der Partikel (Schwalbe et al. 2006a). Mittels Neuumhüllung der Partikel mit dem gewünschten Polysaccharid (siehe 3.1.) können die ursprünglichen Separationseigenschaften wiederhergestellt werden. Dabei ist jedoch davon auszugehen, dass nicht jeder einzelne Eisenoxidkern eine eigene Dextranhülle erhält (wie in **Abb. 2** modellhaft dargestellt). Aufgrund der spezifischen Eigenschaften des Dextrans ist es wahrscheinlicher, dass sich hochmolekulare dreidimensionale Strukturen ausbilden, in die dann ein einzelner oder mehrere Nanopartikel zusammen eingeschlossen sind (**Abb. 13**).

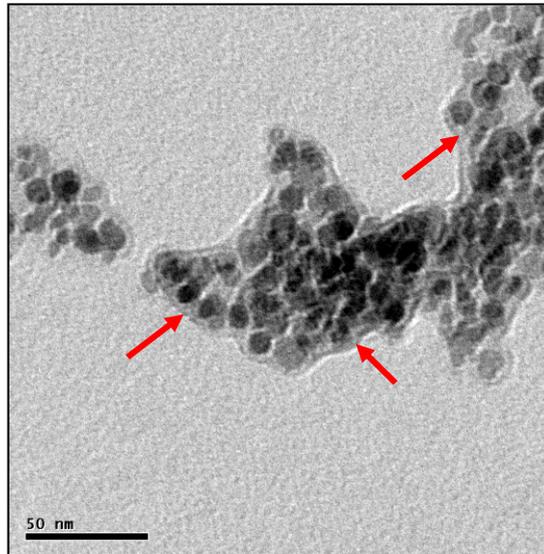


Abb. 13: Transmissions-Elektronenmikroskopie uranyl-markierter magnetischer Nanopartikel mit CMD-Hülle. Die Pfeilspitzen zeigen auf die CMD-Hülle. Man erkennt deutlich, dass mehrere Partikel einen gemeinsamen Mantel aus Polysacchariden besitzen. (aus: Müller et al. 2010. Short-term application of magnetic core-shell nanoparticles – Effect on immune cells [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Klinik für Innere Medizin II.)

4.1. Charakterisierung der Leukozytensubpopulationen nach Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-umhüllten Nanopartikeln

Um die Kinetik der Aufnahme magnetischer Nanopartikel durch die Subgruppen der weißen Blutzellen darzustellen und zu analysieren, wurden zunächst Inkubationsversuche mit CMD-umhüllten Partikeln an zuvor aus dem Vollblut gesunder Spender isolierten Leukozyten durchgeführt. Dazu wurde eine definierte Menge der weißen Blutzellen ($2,5 \times 10^6$ Zellen) mit 5 μ l der Nanopartikelsuspension versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 4, 8, 12, 16, 20 oder 30 Minuten erfolgte die magnetische Zellseparation. Mittels Zellzählung am Coulter[®] Z2 wurden die Anteile der Leukozyten in NF und PF bestimmt und die Verlustrate errechnet. Durch die sich anschließende durchflusszytometrische Analyse konnte die Verteilung der Leukozytensubpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) in den einzelnen Fraktionen näher charakterisiert werden.

4.1.1. Fraktionen nach der MACS-Separation

Nach der Inkubation von Leukozyten mit CMD-umhüllten Nanopartikeln über definierte Zeiträume und magnetischer Zellseparation befinden sich die unmarkierten Zellen, welche keine Nanopartikel aufgenommen haben, in der NF. Die mit Nanoteilchen beladenen Zellen werden als PF aus der MACS-Säule eluiert. Pro Inkubationszeitpunkt (4, 8, 12, 16, 20 und 30 Minuten) wurden die Experimente vierfach oder öfter durchgeführt. Aus den Ergebnissen der

einzelnen Separationen in Form von Zellzahl in NF und PF und daraus errechneter Verlustrate wurde jeweils der Mittelwert bestimmt und die zugehörige Standardabweichung errechnet.

Abb. 14 zeigt die prozentualen Anteile der ursprünglich in die Reaktion eingesetzten Leukozyten in NF und PF zusammen mit der separationsbedingten Verlustrate im Zeitverlauf als Mittelwert der Ergebnisse aus den Einzelseparationen.

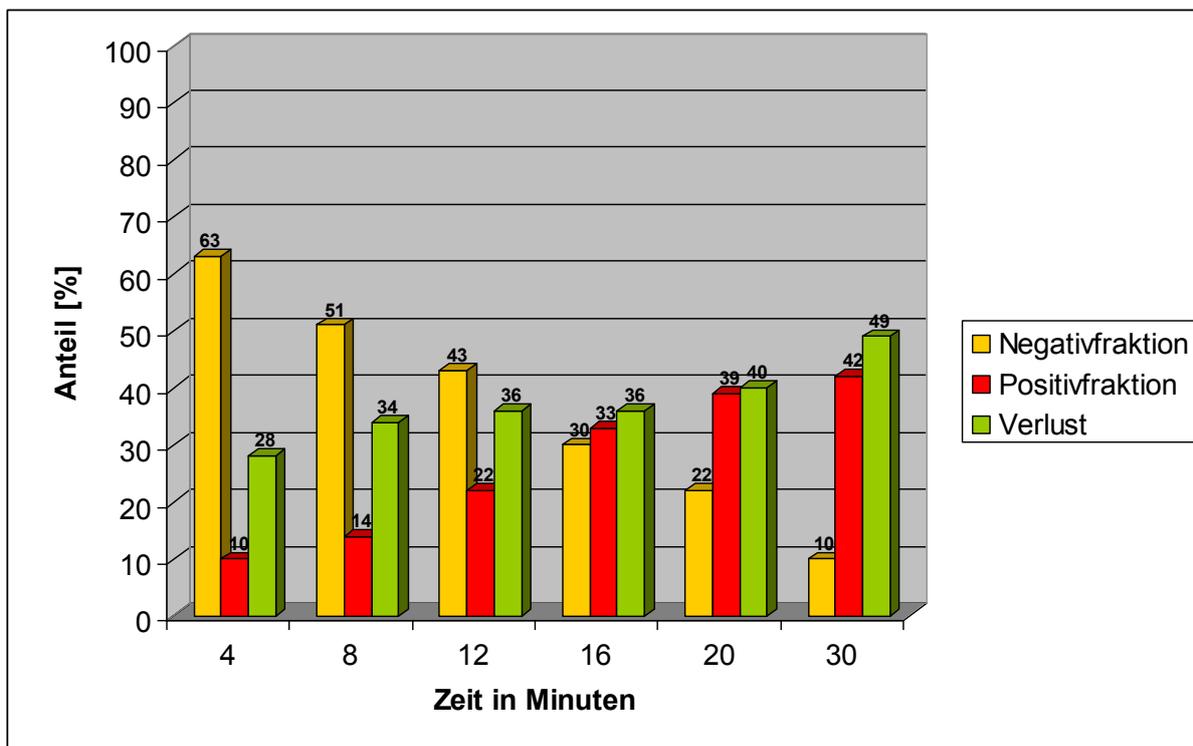


Abb. 14: Kinetik der Partikelaufnahme für Leukozyten im Zeitverlauf. Das Diagramm zeigt die prozentualen Leukozytenanteile in NF und PF sowie die Verlustrate bezogen auf die Gesamtsumme der ursprünglich eingesetzten Leukozyten ($= 2,5 \times 10^6$) im Zeitverlauf als Mittelwerte aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen.

In **Abb. 15** sind die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen in NF und PF sowie der Zahl der während der Separationsprozedur verloren gegangenen Leukozyten bezogen auf die einzelnen Inkubationszeitpunkte dargestellt.

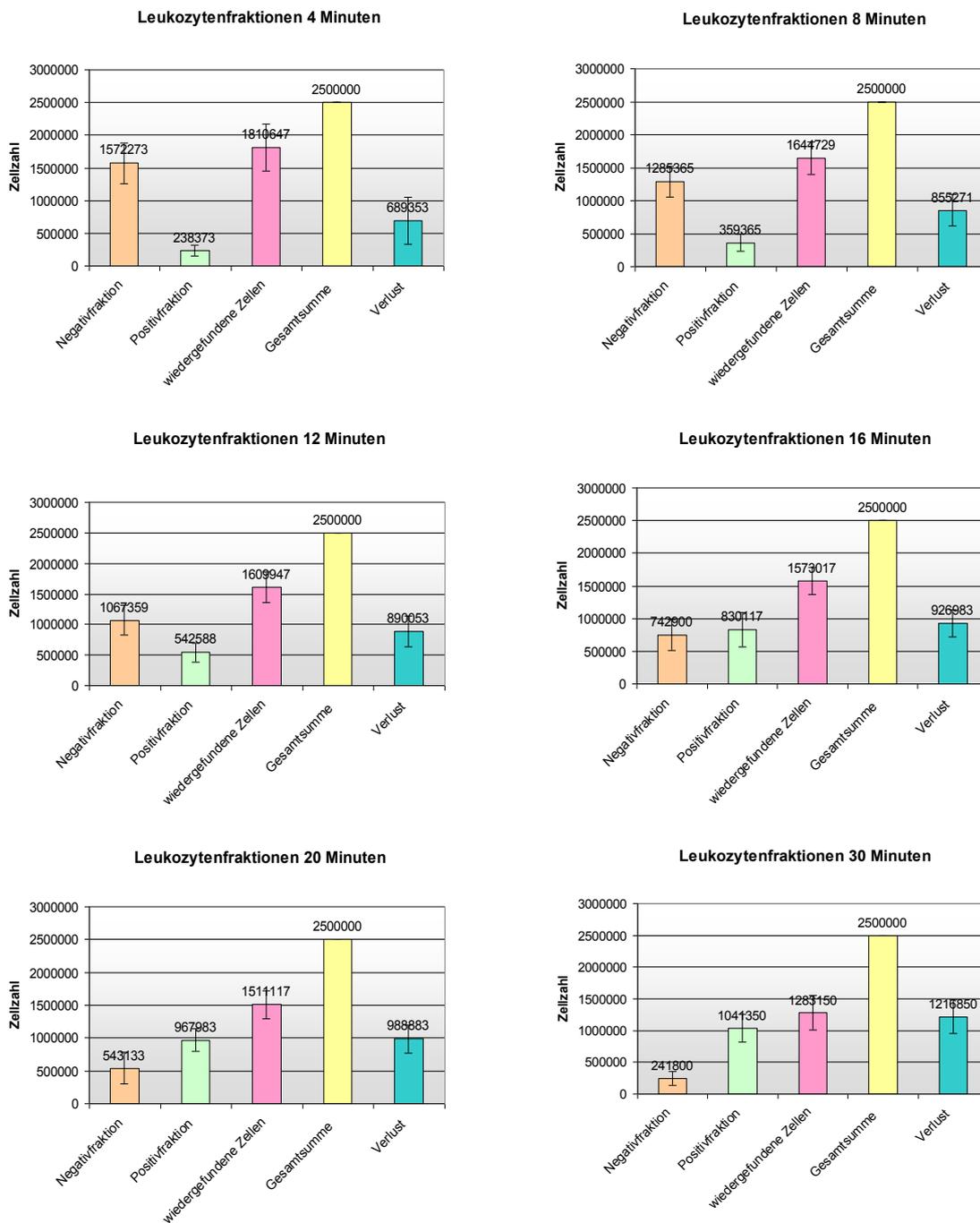


Abb. 15: Absolute Zellzahlen in den Fraktionen nach der MACS-Separation. Die Diagramme zeigen die Anzahl der Leukozyten in NF und PF zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt. Daneben ist der Zellverlust im Vergleich zur Anzahl der nach der Separation wiedergefundenen Zellen (als Summe aus den Zellzahlen in NF und PF) und im Vergleich zur ursprünglich eingesetzten Anzahl an Leukozyten (= Gesamtsumme) dargestellt.

Humane Leukozyten zeigen im Zeitverlauf bis 30 Minuten eine langsame und kontinuierliche Aufnahme der mit CMD umhüllten Nanopartikel, was sich in einer kontinuierlichen Zunahme der Zellzahl in der PF widerspiegelt. Parallel dazu nimmt die Zellzahl in der NF über die Zeit

ab (s. **Abb. 15**). Bis zur maximalen im Rahmen dieser Arbeit ausgetesteten Inkubationszeit von 30 Minuten wird kein Plateauzustand hinsichtlich der Aufnahme magnetischer Nanopartikel durch die weißen Blutzellen erreicht. Zu diesem Zeitpunkt finden sich im Mittel 42% (33-52%) der zu Anfang des Separationsvorganges eingesetzten Leukozyten in der PF wieder und es ist davon auszugehen, dass sich ihr Anteil bei längerer Inkubationszeit noch vergrößern würde. Nach 4 Minuten sind lediglich 10% der in die Reaktion eingesetzten Leukozyten mit Partikeln beladen, während sich 63% in der NF befinden. Nach 8-minütiger Inkubationszeit verbleiben noch 51% der Leukozyten in der NF und 14% finden sich in der PF wieder (s. **Abb. 14**). Dies entspricht einer Abnahme des Zellanteils der NF um 12% und einer Zunahme des Zellanteils der PF um 4% im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Minuten. Vergleicht man dagegen die Inkubationszeitpunkte 8 Minuten und 12 Minuten bzw. 12 Minuten und 16 Minuten miteinander, so steigt der Anteil der mit Partikeln beladenen Leukozyten bezogen auf den vorangehenden Zeitpunkt stärker an (um 8% zwischen 8 und 12 Minuten bzw. um 11% zwischen 12 und 16 Minuten). Zwischen 16 und 20 Minuten (6%) sowie 20 und 30 Minuten (3%) verringert sich dieser Anstieg wieder. Bis zu einer Inkubationszeit von 12 Minuten übersteigt der Anteil der in der NF enthaltenen Leukozyten den Anteil der weißen Blutzellen in der PF noch deutlich. Nach 16 Minuten kehrt sich dieses Verhältnis um. Addiert man die Anteile der Leukozyten in NF und PF, so erhält man Werte unter 100%. Die Differenz entspricht der separationsbedingten Verlustrate zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt. Diese beträgt nach 4 Minuten im Mittel 28% und steigt nach 30-minütiger Inkubationszeit auf 49% an. Die statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Test bestätigt die gefundenen Unterschiede bezüglich der Zellzahl in NF und PF über den Zeitverlauf als signifikant ($p < 0,05$). Lediglich nach 30-minütiger Inkubation sind weder die Abnahme der Leukozytenzahl in der NF, noch deren Zunahme in der PF signifikant ($p > 0,05$) verschieden zum Inkubationszeitpunkt 20 Minuten, was die sättigungsbedingte langsamere Aufnahme der Partikel durch die Leukozyten zu diesem Zeitpunkt nochmals verdeutlicht. Ziel der Untersuchungen ist es, einen Inkubationszeitpunkt zu finden, an dem möglichst viele Leukozyten in der NF verbleiben, das heißt keine Nanopartikel aufnehmen. Gleichzeitig sollte die Verlustrate zu diesem Zeitpunkt gering sein und der Anteil der mit Partikeln beladenen Tumorzellen möglichst groß. Unter Einbeziehung anderer Versuchsdaten der Arbeitsgruppe (Clement et al. 2006, Kühn 2010) und der hier dargestellten Ergebnisse erscheint eine Inkubationszeit zwischen 4 und 8 Minuten ideal, da hier die genannten Kriterien am besten erfüllt sind.

4.1.2. Ergebnisse der FACS-Analyse – Darstellung der Leukozytensubpopulationen

Die nach der magnetischen Zellseparation erhaltenen NF und PF wurden anschließend im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Zelldebris analysiert, um so den Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln auf die jeweilige Leukozytensubpopulation näher zu charakterisieren. Pro FACS-Analyse wurden 10.000 Zellen der jeweiligen Probe ausgezählt. Prozentuale Angaben beziehen sich im Folgenden auf diesen Wert. Die Experimente wurden für jeden Inkubationszeitpunkt vierfach oder öfter durchgeführt und aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen Mittelwerte und Standardabweichung errechnet. In **Abb. 16** sind die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen für Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Zelldebris in den Fraktionen aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten dargestellt.

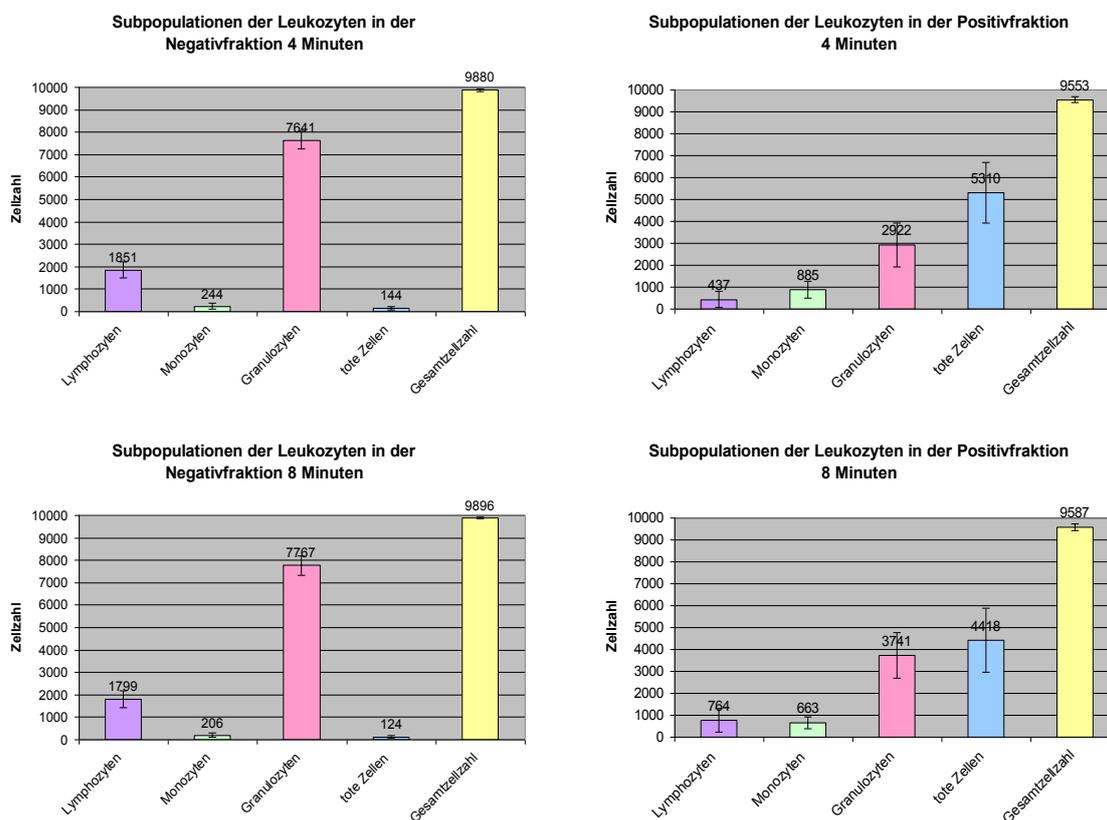


Abb. 16(1): Darstellung der Leukozytensubpopulationen in Negativ- und Positivfraktion aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen für Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Zelldebris (= tote Zellen) in den einzelnen Fraktionen aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten.

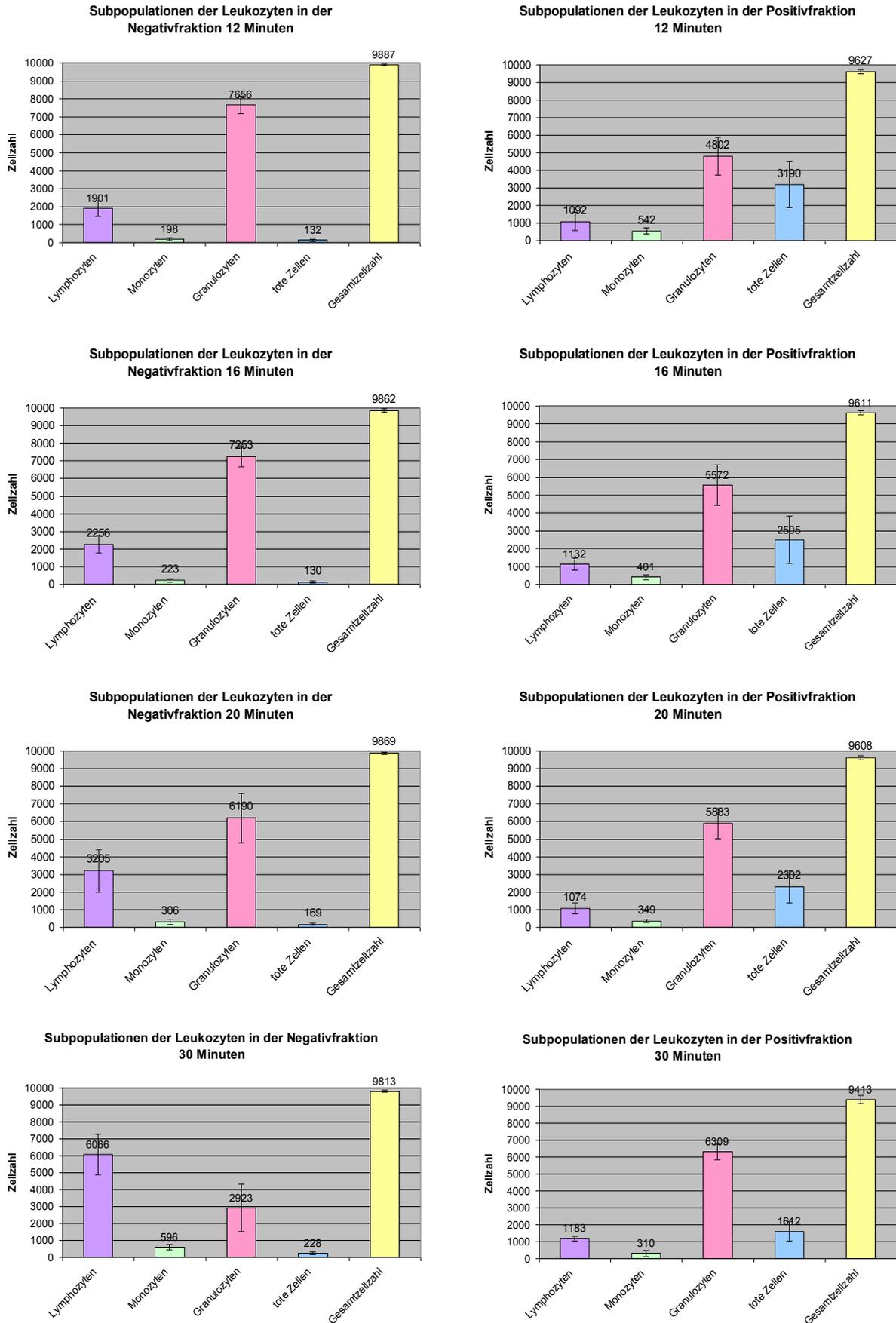


Abb. 16(2): Darstellung der Leukozytensubpopulationen in Negativ- und Positivfraktion aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen für Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Zelldebris (= tote Zellen) in den einzelnen Fraktionen aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten.

Abb. 17 zeigt die prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen und des Zelldebris in der NF und PF zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt bezogen auf eine Gesamtzahl von 10.000 (= 100%) im Durchflusszytometer analysierten Events als Mittelwerte der einzelnen Separationen.

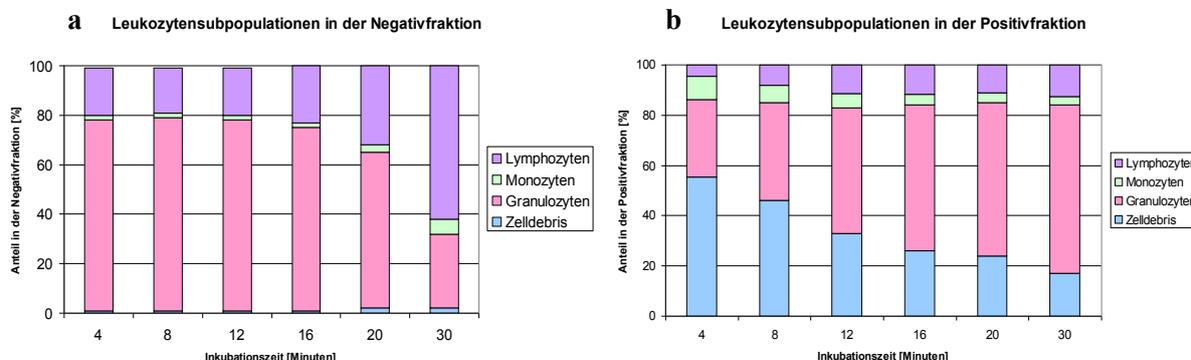


Abb. 17: Kinetik der Partikelaufnahme aufgeschlüsselt nach Leukozytensubpopulationen im Zeitverlauf. Das Diagramm zeigt die prozentualen Anteile der Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und des Zelldebris in NF (a) und PF (b) bezogen auf 10.000 Events in der FACS-Analyse im Zeitverlauf als Mittelwerte aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen.

In **Abb. 18** sind die prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen in NF und PF im Zeitverlauf noch einmal einzeln für Lymphozyten (a), Monozyten (b), Granulozyten (c) und tote Zellen (d) dargestellt.

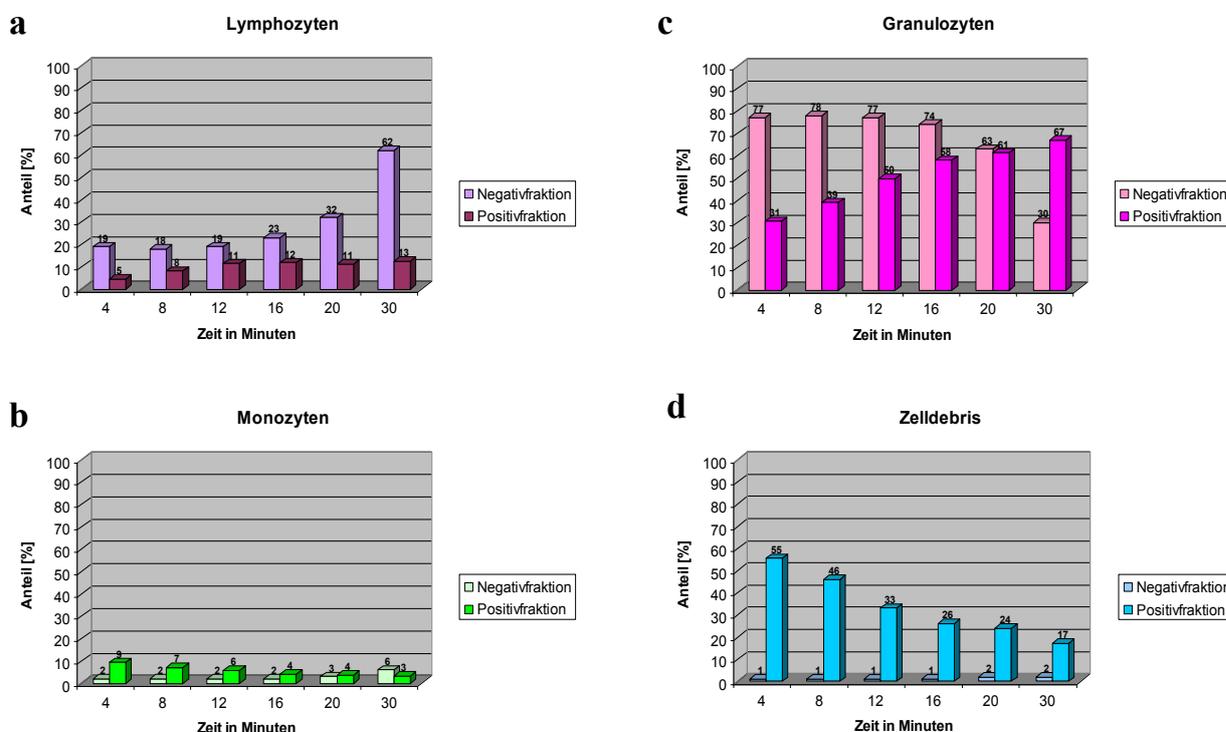


Abb. 18: Darstellung der Leukozytensubpopulationen im Zeitverlauf. Die Abbildungen zeigen die prozentualen Anteile an Negativ- und Positivfraktion im Zeitverlauf aufgeschlüsselt nach Subpopulationen (Lymphozyten [a], Monozyten [b], Granulozyten [c] und Zelldebris [d]) als Mittelwerte der Ergebnisse einzelner Separationen.

Die durchflusszytometrische Analyse der NF und PF nach Inkubation von Leukozyten mit magnetischen CMD-umhüllten Nanopartikeln über definierte Zeiträume und anschließender Zellseparation zeigt, dass alle drei Subklassen der weißen Blutkörperchen mit den Partikeln interagieren und diese aufnehmen. Dabei bestehen jedoch wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit und des Ausmaßes der Aufnahme der Nanopartikel durch Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Die Granulozyten sind die größte Subpopulation der Leukozyten (35-80% der weißen Zellen im peripheren Blut), weshalb sie, mit Ausnahme der NF nach 30-minütiger Inkubationszeit (s. **Abb. 17**), jeweils den höchsten Anteil der Leukozyten in beiden Fraktionen stellen. Ihre Anzahl in bzw. ihr Anteil an der PF steigt im Zeitverlauf kontinuierlich von im Mittel 31% nach 4 Minuten auf im Mittel 67% nach 30-minütiger Inkubation an (s. **Abb. 18**). Dieser Unterschied erweist sich in der statistischen Auswertung der Daten als signifikant ($p < 0,05$). Ihr Anteil in der NF liegt über einen Zeitraum von 16 Minuten relativ konstant zwischen 74 % und 78%. Erst nach 20-minütiger Inkubationszeit ist eine merkliche Abnahme der Anzahl und damit auch des Anteils der Granulozyten in der NF zu verzeichnen. Dieses Phänomen ist wohl der zahlenmäßigen Größe der Subpopulation geschuldet. Da in der FACS-Analyse jeweils nur 10.000 weiße Blutzellen einer Probe analysiert wurden, befanden sich trotz kontinuierlicher Aufnahme von Nanopartikeln und damit verbundenem Übergang der Zellen in die PF noch genügend Granulozyten in der NF, um die entstandene Lücke aufzufüllen. Auch in der statistischen Auswertung spiegelt sich die späte Abnahme der Granulozytenzahl wider. Beim Vergleich der einzelnen Inkubationszeitpunkte zeigt sich erst zwischen 16 und 20 Minuten sowie zwischen 20 und 30 Minuten ein signifikanter Rückgang der Granulozyten in der NF ($p < 0,05$). Die Monozyten als kleinste Leukozytensubpopulation (2-12% der weißen Zellen im peripheren Blut) interagieren ebenfalls mit CMD-umhüllten Nanopartikeln und weisen dabei die höchste Aufnahmegeschwindigkeit für die Nanoteilchen auf, was mit ihrer Funktion als professionelle Phagozyten gut vereinbar ist. In der NF liegt ihr Anteil bis zu einer Inkubationszeit von 20 Minuten konstant um 2-3%. Zum Zeitpunkt 30 Minuten beträgt ihr Anteil an der NF 6% (s. **Abb. 18**). Dieser Anstieg ist als relativ zu werten und erklärt sich durch die deutliche Abnahme der Granulozyten bei einer weitgehend konstant bleibenden Anzahl an Monozyten in der Probe. Betrachtet man die Monozyten in der PF im Zeitverlauf, so zeigt sich sowohl bei Betrachtung der absoluten Zellzahl (s. **Abb. 16**) als auch ihres prozentualen Anteils (s. **Abb. 17** und **Abb. 18**) eine Abnahme über die Zeit. Auch diese ist als relativ zu werten und bestätigt die schnelle Aufnahmegeschwindigkeit für Nanopartikel in die Monozyten. Da die Monozyten sehr schnell mit den Nanoteilchen interagieren, ist der

Großteil dieser Population schon nach 4 Minuten mit Partikeln beladen und damit in der PF zu finden. Im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt 30 Minuten wechseln dann nur noch wenige Monozyten von der NF in die PF. Da im FACS jedoch nur 10.000 Events pro Probe ausgezählt wurden, wird die zahlenmäßige Konstanz der Monozyten im Zeitverlauf durch die Zunahme der anderen Leukozytensubpopulationen, insbesondere der Granulozyten, überlagert, was sich in den graphischen Darstellungen als scheinbare Abnahme widerspiegelt. Die Lymphozyten (ca. 14-47% der weißen Zellen im peripheren Blut) nehmen die CMD-umhüllten Nanopartikel ebenfalls auf, allerdings langsamer und in geringerem Ausmaß als die Monozyten und Granulozyten. Ihr Anteil an der PF steigt im Verlauf der Inkubation von im Mittel 5% nach 4 Minuten auf im Mittel 13% nach 30 Minuten an (s. **Abb. 18**). Dieser Unterschied erweist sich in der statistischen Auswertung als signifikant ($p < 0,05$). Ab einer Inkubationszeit von 12 Minuten zeigt sich ein Plateauverhalten, das heißt die Aufnahme der Nanopartikel in die Lymphozyten stagniert und der Anteil der Lymphozyten in der PF liegt bis zum Separationszeitpunkt 30 Minuten relativ konstant im Bereich zwischen 11% und 13%. Der Anteil der unmarkierten Lymphozyten in der NF steigt im Zeitverlauf kontinuierlich von im Mittel 19% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 62% nach 30-minütiger Inkubationszeit. Auch dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$). Somit bilden die Lymphozyten nach 30 Minuten den Hauptanteil der in der NF verbleibenden Zellpopulation. Die langsame und im Ausmaß geringe Aufnahme der magnetischen Partikel durch die Lymphozyten ist im Hinblick auf die Abtrennung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut als sehr positiv zu werten, da die in hohem Maße in der NF verbleibenden Lymphozyten dem Patienten als wichtige Zellen der Tumor- und Infektabwehr erhalten bleiben würden. Die Hauptlast der toten oder durch die Separationsprozedur geschädigten Zellen (= Zelldebris) befindet sich über den gesamten Zeitverlauf innerhalb der PF. Der Anteil des Zelldebris in der NF mit konstant 1-2% ist vernachlässigbar klein. Die Ursache hierfür dürfte der größere Druckgradient beim Eluieren der PF im Vergleich zum Eluieren der NF durch die Anwendung des Stempels sein. Die geschädigten Zellen bilden sowohl untereinander, als auch gemeinsam mit den Nanopartikeln Konglomerate, die beim langsamen Durchlauf des Eluats der NF im Säulenmaterial hängen bleiben, dann aber durch den höheren Druck beim Eluieren mit den Zellen der PF aus der Säule herausgespült werden. Der relative Anteil der toten Zellen innerhalb der PF nimmt im Zeitverlauf von im Mittel 55% nach 4 Minuten auf einen mittleren Anteil von 17% nach 30-minütiger Inkubation ab, erklärbar durch die Zunahme der drei Leukozytensubklassen in der PF über die Zeit. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die absolute Zahl der durch die Separationsprozedur

geschädigten oder toten Zellen im Zeitverlauf relativ konstant bleibt. Betrachtet man nun die prozentuale Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen in der NF (s. **Abb. 17**) und vergleicht sie mit der natürlichen Verteilung der Subklassen der weißen Zellen im peripheren Blut des Menschen, so wird deutlich, dass die Inkubation der Leukozyten mit den magnetischen CMD-umhüllten Nanopartikeln und die anschließende Separation mittels MACS bis zu einer Inkubationszeit von 16 Minuten kaum zu Veränderungen bezüglich der Verteilung der Leukozytensubpopulationen führt (s. **Abb. 17**). Lediglich die Monozyten sind mit einem Anteil von im Mittel 2% etwas unterrepräsentiert. Erst nach 20-minütiger Inkubation der weißen Blutzellen mit den Partikeln kommt es durch den verstärkten Übergang der Granulozyten in die PF zu Verschiebungen in der Verteilung der Leukozytensubpopulationen der NF, welche besonders deutlich nach 30 Minuten hervortreten. Zu diesem Zeitpunkt sind die Lymphozyten mit einem mittleren Anteil von 62% in der NF überrepräsentiert, während die Granulozyten mit im Mittel 30% einen wesentlich zu geringen Anteil der Gesamtpopulation stellen.

4.2. Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen nach Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-umhüllten Nanopartikeln

Da die Lymphozyten als zentrale Träger der spezifischen Abwehrvorgänge (s. 1.5.3.) von größter Bedeutung für das menschliche Immunsystem sind, ist der Erhalt dieser Leukozytenpopulation insbesondere für den durch Krankheit und Therapie ohnehin abwehrgeschwächten Tumorpatienten lebensnotwendig. Daher wurde noch einmal ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss der Inkubation mit magnetischen CMD-umhüllten Nanopartikeln und der sich anschließenden Zellseparation mittels MACS auf diese spezifische Population mit ihren beiden Subklassen, den T- und B-Zellen, gelegt. Auch hierfür wurden die Leukozyten aus Vollblut gesunder Spender über eine Erythrozytenlyse isoliert, anschließend für 4, 8, 12 oder 16 Minuten mit 5 µl der CMD-Partikelsuspension inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit mittels MACS separiert. Aus den erhaltenen Fraktionen wurde jeweils ein Aliquot von 100 µl entnommen und mit gegen Oberflächenmoleküle der T- (CD3) und B-Zellen (CD19) gerichteten Antikörpern inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Proben. Alle Experimente wurden sechsfach oder öfter durchgeführt. Aus den Ergebnissen der jeweiligen Einzelmessungen wurden Mittelwerte und zugehörige Standardabweichungen errechnet. Die Darstellung der Ergebnisse dieser Versuchsreihe erfolgt ausschließlich in Form von Prozentangaben, da die absoluten in der FACS-Analyse ermittelten Zellzahlen durch Grenzen

in der Methodik verfälscht wurden. Ziel war es, mit der Durchflusszytometrie aus jeder Probe 10.000 lymphozytäre Events zu erfassen und auszuwerten. Aufgrund der geringen Größe der Lymphozytenpopulation in einigen Fraktionen war dies jedoch nicht immer möglich und die Messungen mussten nach Aufbrauchen der Probe abgebrochen werden. **Abb. 19** zeigt die Lymphozytensubpopulationen nach der magnetischen Zellseparation im Zeitverlauf aufgeschlüsselt in NF (a) und PF (b).

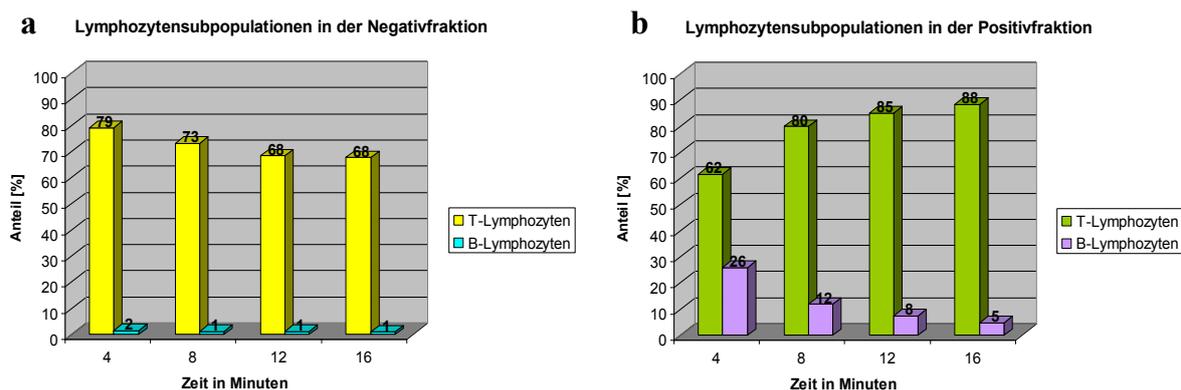


Abb. 19: Kinetik der Lymphozytensubpopulationen im Zeitverlauf aufgeschlüsselt nach Fraktionen. Das Diagramm zeigt die prozentualen Anteile der T- und B-Lymphozyten in Negativ- (a) und Positivfraktion (b) im Zeitverlauf bezogen auf die Gesamtzahl der im FACS analysierten Events als Mittelwerte der einzelnen Separationen.

Die durchflusszytometrische Analyse der NF und PF nach Inkubation der Leukozyten mit magnetischen CMD-umhüllten Nanopartikeln über definierte Zeiträume, anschließender Zellseparation und Markierung der T- und B-Zellen mittels Antikörpern zeigt, dass beide Untergruppen der Lymphozytenpopulation Nanoteilchen aufnehmen. Dabei bestehen jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich des Interaktionspotentials mit den CMD-Partikeln zwischen T- und B-Lymphozyten. Die T-Zellen, als die Größere der beiden Lymphozytenpopulationen (ca. 80% aller Lymphozyten), nehmen Nanopartikel langsam und kontinuierlich auf. Ihr Anteil in der PF wächst von im Mittel 62% nach 4 Minuten auf einen mittleren Wert von 88% nach 16-minütiger Inkubationszeit an. Jedoch zeigt sich nur zwischen 4 und 8 Minuten eine als statistisch signifikant ($p < 0,05$) zu wertende Zunahme. Parallel dazu nimmt ihr Anteil in der NF von im Mittel 79% auf im Mittel 68% ab (s. **Abb. 19**), wobei sich ihr prozentualer Anteil beim Vergleich der einzelnen Inkubationszeitpunkte nicht statistisch signifikant unterscheidet ($p > 0,05$). Die B-Zellen sind eine vergleichsweise kleine Population (15-20% aller Lymphozyten), weshalb naturgemäß die T-Lymphozyten zu jedem Zeitpunkt den größeren Anteil der Zellen in beiden Fraktionen stellen. Die Geschwindigkeit und das

Ausmaß der Aufnahme der Nanopartikel durch die B-Lymphozyten unterscheiden sich deutlich vom Verhalten der T-Zellen. Schon nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten stellen die B-Zellen einen Anteil von 26% in der PF, was mit einer sehr raschen und starken Nanopartikelaufnahme durch diese Population gleichzusetzen ist. Vergleicht man nun die natürliche Verteilung der T- und B-Lymphozyten mit der Zusammensetzung der Fraktionen nach der Magnetseparation, so fällt auf, dass die B-Zellen im gesamten Zeitverlauf in der NF mit einem Anteil zwischen 1-2% unterrepräsentiert sind, begründbar durch die rasche Aufnahme der Partikel und den damit verbundenen Übergang der Zellen in die PF. In der PF übersteigt der Anteil der B-Lymphozyten mit einem Mittelwert von 26% bereits nach 4-minütiger Inkubation ihr Maximum in der natürlichen Verteilung (15-20% aller Lymphozyten). Im weiteren Verlauf nimmt der Anteil der B-Zellen in der PF kontinuierlich ab, da vermehrt T-Zellen Nanopartikel aufnehmen und somit von der NF in die PF wechseln, während die Anzahl der B-Lymphozyten relativ konstant bleibt. In der statistischen Auswertung erweist sich jedoch nur der diesbezügliche Unterschied zwischen 4 und 8 Minuten als signifikant ($p < 0,05$).

4.3. Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-, CMC- und CMCu-umhüllten Nanopartikeln – Vergleich der Verteilung der Leukozytensubpopulationen in den Fraktionen

Die Art und die Struktur der Polysaccharidhülle haben Auswirkungen auf die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Interaktion von magnetischen Nanopartikeln mit Leukozyten und Tumorzellen (Schwalbe et al. 2006b, Wotschadlo et al. 2009). Damit bietet die Modifikation der Partikelhülle eine Möglichkeit die Separationsbedingungen ergebnisorientiert zu optimieren, mit dem Ziel, möglichst viele Leukozyten in der NF und die Verlusten möglichst gering zu halten und dabei gleichzeitig einen möglichst großen Anteil an Tumorzellen in der PF zu erreichen. Um zu analysieren, inwieweit die Verteilung der Leukozytensubpopulationen durch Verwendung von Partikeln mit unterschiedlichen Hüllstrukturen beeinflusst wird, wurden in dieser Versuchsreihe aus dem Vollblut gesunder Spender isolierte Leukozyten mit unterschiedlich umhüllten magnetischen Nanopartikeln inkubiert. Dabei kamen, neben dem standardmäßig angewendeten Carboxymethyl-Dextran (CMD), Carboxymethyl-Cellulose (CMC) und Carboxymethyl-Curdlan (CMCu) als Hüllsubstanzen zum Einsatz. Eine definierte Menge an gereinigten weißen Blutzellen ($2,5 \times 10^6$ Zellen) wurde dazu mit 5 μ l der jeweiligen Nanopartikelsuspension versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 4, 8 oder 12 Minuten erfolgte die magnetische Zellseparation. Mittels

Zellzählung am Coulter[®] Z2 wurden die Anteile der Leukozyten in NF und PF bestimmt und die Verlustrate errechnet. In der sich anschließenden durchflusszytometrischen Analyse konnte die Verteilung der Leukozytensubpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) in den einzelnen Fraktionen näher charakterisiert werden.

4.3.1. Fraktionen nach der MACS-Separation

Nach Inkubation der Leukozyten mit CMD-, CMC- und CMCu-umhüllten Nanopartikeln über definierte Zeiträume und magnetischer Zellseparation befinden sich die unmarkierten Zellen, welche keine Nanopartikel aufgenommen haben, in der NF. Die mit Nanoteilchen beladenen Zellen werden als PF aus der MACS-Säule eluiert. Pro Inkubationszeitpunkt und Partikelart wurden die Experimente siebenfach durchgeführt. Aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen in Form des prozentualen Anteils der in die Reaktion eingesetzten Leukozyten an NF und PF und daraus errechneter Verlustrate wurde jeweils der Mittelwert bestimmt und die zugehörige Standardabweichung errechnet. **Abb. 20** zeigt die prozentualen Anteile der Leukozyten an NF (a) und PF (b) zu den einzelnen Inkubationszeitpunkten sowie die zugehörigen Verlustraten (c) für die verschiedenen Partikelarten. In **Abb. 21** sind die absoluten Zellzahlen in NF und PF sowie die Anzahl der während der Separationsprozedur verloren gegangenen Zellen im Zeitverlauf einzelnen für die jeweilige Nanopartikelart dargestellt.

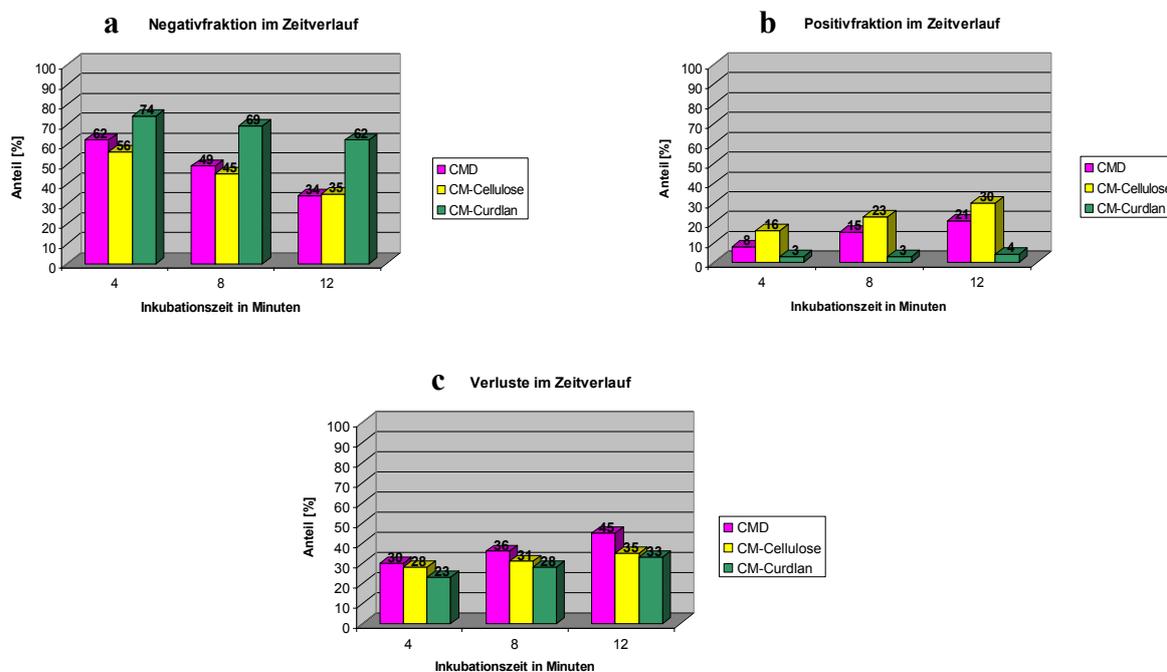


Abb. 20: Kinetik der Aufnahme magnetischer Nanopartikel mit unterschiedlichen Polysaccharidhüllen in Leukozyten. Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile der Leukozyten in Negativ- (a) und Positivfraktion (b) nach Inkubation mit CMD- (pink), CMC- (gelb) oder CMCu-umhüllten (grün) Nanopartikeln und magnetisierter Zellseparation sowie die zugehörigen Verlustraten (c) aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten und Partikelart.

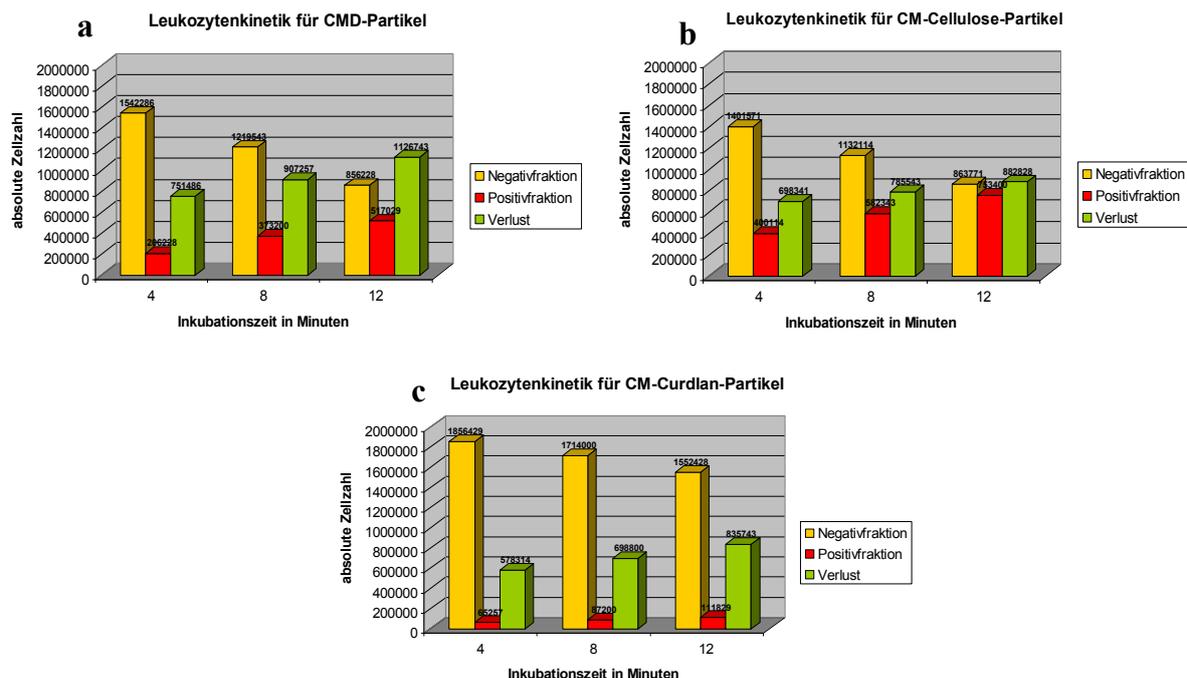


Abb. 21: Absolute Zellzahl in den Fraktionen nach der MACS-Separation aufgeschlüsselt nach der Art der Partikelhülle. In den Diagrammen ist die Aufnahmekinetik der Nanopartikel in die Leukozyten im Zeitverlauf separat für jede der verwendeten Hüllsubstanzen dargestellt. Aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten zeigen die Grafiken die absoluten Zellzahlen in Negativ- und Positivfraktion sowie der Zahl der verloren gegangenen Leukozyten für CMD- (a), CMC- (b) und CMCu-Partikel (c).

Humane Leukozyten zeigen im Zeitverlauf bis 12 Minuten eine kontinuierliche Aufnahme der magnetischen Nanopartikel. Es bestehen dabei jedoch, in Abhängigkeit von der Art der Polysaccharidhülle, deutliche Unterschiede hinsichtlich der Interaktionsgeschwindigkeit und des Ausmaßes der Partikelaufnahme. Für die schon in den vorangehenden Experimenten verwendeten CMD-umhüllten Standardpartikel zeigt sich auch in dieser Versuchsreihe die langsame und kontinuierliche Partikelaufnahme über den Zeitverlauf bis 12 Minuten. Parallel zur Zunahme der Zellzahl in der PF kommt es zur Abnahme der Anzahl der Leukozyten in der NF (s. **Abb. 21**). Auch die Verlustrate steigt mit der Zeit von im Mittel 30% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 45% nach 12 Minuten an (s. **Abb. 20**). Das Muster der Aufnahmekinetik für die CMC-umhüllten Nanopartikel in die Leukozyten gleicht dem für CMD-Partikel. Auch sie werden über den Zeitverlauf kontinuierlich von den weißen Blutzellen inkorporiert, sodass die Zellzahl in der PF über die Zeit ansteigt, während die Zellzahl in der NF parallel dazu zurückgeht (s. **Abb. 21**). Verglichen mit den CMD-Partikeln werden die mit CMC umhüllten Nanoteilchen jedoch schneller von den Leukozyten aufgenommen. So beträgt der Anteil der markierten Zellen nach 4-minütiger Inkubation bei Verwendung von CMC-Partikeln bereits 16%, während sich bei Inkubation der Leukozyten

mit CMD-Partikeln zu diesem Zeitpunkt gerade einmal 8% der eingesetzten Zellen in der PF finden (s. **Abb. 20**). Der gefundene Unterschied, die Leukozyten der PF betreffend, erweist sich in der statistischen Auswertung als signifikant ($p < 0,05$). Das Ausmaß des Anstieges der markierten Leukozyten beim Vergleich der einzelnen Inkubationszeitpunkte unterscheidet sich dagegen nicht. Sowohl für die CMD-umhüllten Partikel, als auch für die Nanoteilchen mit einer Hülle aus CMC beträgt der Zuwachs in der PF zwischen 4 und 8 Minuten bzw. zwischen 8 und 12 Minuten im Mittel 6-7%. Auch bei Verwendung der CMC-Partikel steigt die Verlustrate im Zeitverlauf von im Mittel 28% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 35% nach 12-minütiger Inkubation (s. **Abb. 20**). Der Vergleich mit den bei Verwendung CMD-umhüllter Partikel auftretenden Verlusten zeigt, dass die Verlustrate bei Verwendung der CMC-Partikel zu jedem Zeitpunkt unter den Raten für die CMD-Partikel liegt. Gleichzeitig ist der Anstieg der Verlustrate zwischen den einzelnen Inkubationszeitpunkten für die CMC-Teilchen geringer. Die Aufnahmekinetik der mit CMCu umhüllten Nanopartikel unterscheidet sich wesentlich von dem bei CMD und CMC auftretenden Muster. Bei Betrachtung der prozentualen Anteile (**Abb. 20**) zeigt sich kein nennenswerter Anstieg der Leukozyten in der PF über den Zeitverlauf (von im Mittel 3% nach 4 Minuten auf 4% nach 12 Minuten). Die absoluten Zellzahlen offenbaren jedoch eine kontinuierliche Interaktion der Partikel mit den Leukozyten (s. **Abb. 21**). Die Aufnahme der mit CMCu umhüllten Partikel verläuft jedoch deutlich langsamer als die Aufnahme der zuvor betrachteten Nanopartikelarten und das Ausmaß der Interaktion mit den weißen Blutzellen tendiert im Vergleich zu CMD und CMC gegen null. Dies spiegelt sich auch im wesentlich höheren Anteil der Leukozyten in der NF wieder. Nach 4 Minuten übersteigt dieser bei Verwendung der CMCu-umhüllten Partikel die Anteile bei Verwendung der mit CMD bzw. CMC umhüllten Partikel um 12% bzw. 18%. Nach zwölf Minuten erhöht sich diese Differenz auf im Mittel 28%. Auch in der statistischen Auswertung der Daten erweisen sich die Anteile der Leukozyten in NF und PF bei Verwendung von CMCu-Partikeln als signifikant verschieden von den Anteilen bei Verwendung von CMD- oder CMC-Partikeln ($p < 0,05$). Für die Verlustraten zeigt sich im Zeitverlauf auch bei CMCu-Partikeln ein Anstieg von im Mittel 23% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 33% nach 12-minütiger Inkubationszeit. Damit weist CMCu im Vergleich zu CMC und CMD die geringsten Verluste auf. Die gefundenen Unterschiede zwischen CMCu-Partikeln und den anderen beiden Nanopartikelarten bezüglich der Verlustraten werden jedoch erst nach 12-minütiger Inkubationszeit statistisch signifikant ($p < 0,05$). Der Anstieg der Verlustrate zwischen den einzelnen Inkubationszeitpunkten ist mit der Zunahme der Verluste bei Verwendung der CMC-Partikel vergleichbar (im Mittel

zwischen 4-5%). Ziel der Analyse von verschiedenen umhüllten Nanopartikeln und deren Aufnahme durch die Leukozyten ist es, das Polysaccharid ausfindig zu machen, welches als Hüllstruktur für die Eisenoxidkerne der magnetischen Nanopartikel deren Separationseigenschaften optimal verbessert. Der ideale Partikel sollte dabei möglichst langsam und in möglichst geringem Ausmaß mit den Leukozyten interagieren, d. h. der Anteil der in der NF verbleibenden Zellen sollte möglichst groß sein. Gleichzeitig sollten die Verluste möglichst gering und das Interaktionspotential der Partikel mit den zu eliminierenden zirkulierenden Tumorzellen möglichst groß sein, sodass diese Zellen mit der PF verworfen werden können. Betrachtet man dahingehend die hier untersuchten Polysaccharidhüllen, so erfüllt CMCu die geforderten Eigenschaften im Hinblick auf die Aufnahme durch die Leukozyten und die Höhe der Verluste besser als CMD oder CMC. Jedoch ist bekannt, dass mit CMCu umhüllte Partikel auch für die Interaktion mit epithelialen Tumorzellen nur ein äußerst geringes Potential aufweisen (Wotschadlo et al. 2008), wodurch eine Separation von disseminierten malignen Zellen und Leukozyten unmöglich wird. Da die mit CMC umhüllten Nanopartikel in höherem Ausmaß von den Leukozyten aufgenommen werden als die Nanoteilchen mit einer Hülle aus CMD, erweisen sich Letztere als die bestgeeigneten der hier getesteten Partikel für eine effektive und schonende Separation von Leukozyten und Tumorzellen mittels MACS.

4.3.2. Ergebnisse der FACS-Analyse – Darstellung der Leukozytensubpopulationen

In dieser Versuchsreihe erfolgte nach der magnetischen Zellseparation ebenfalls eine durchflusszytometrische Analyse der erhaltenen NF und PF hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Zelldebris, um so den Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln auf die jeweilige Leukozytensubpopulation und die diesbezüglichen Unterschiede bei Verwendung verschiedener Polysaccharidhüllen näher zu charakterisieren. Pro FACS-Analyse wurden 10.000 Zellen der jeweiligen Probe ausgezählt. Prozentuale Angaben beziehen sich im Folgenden auf diesen Wert. Die Experimente wurden pro Inkubationszeitpunkt und Partikelart siebenfach durchgeführt. Aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen wurden die Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung errechnet. In **Abb. 22** sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile der Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und des Zelldebris getrennt nach NF und PF und aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkt und Partikelart dargestellt.

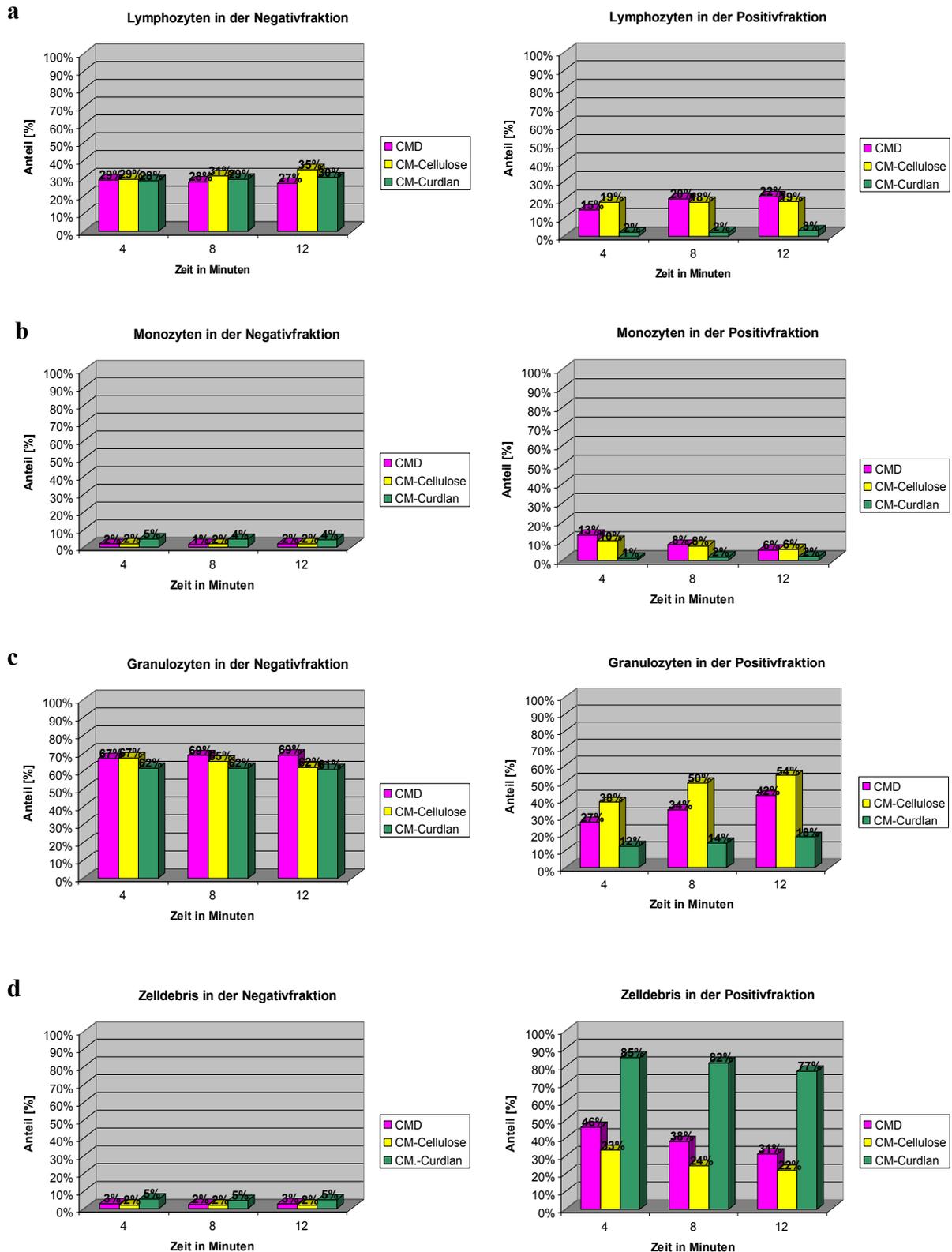


Abb. 22: Leukozytensubpopulationen nach Inkubation mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln aufgeschlüsselt nach Fraktionen. Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile der Lymphozyten (a), Monozyten (b), Granulozyten (c) und des Zelldebris (d) in Negativ- und Positivfraktion im Zeitverlauf nach Inkubation der Leukozyten mit CMD- (pink), CMC- (gelb) und CMCu-umhüllten (grün) Nanopartikeln.

Auch in der FACS-Analyse der Leukozytensubpopulationen zeigt sich ein ähnliches Muster der Aufnahmekinetik für CMD- und CMC-Partikel, während sich die CMCu-Partikel deutlich davon unterscheiden. Bei Verwendung der CMD-umhüllten Nanopartikel stellen sich die Ergebnisse dieser Versuchsreihe analog zu den unter 4.1.2. beschriebenen Daten dar. Die Partikel werden kontinuierlich von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten aufgenommen, wobei die Monozyten am schnellsten mit den Nanoteilchen interagieren, während die Lymphozyten im Vergleich zu den anderen Populationen ein geringeres Interaktionspotential und eine langsamere Aufnahmegeschwindigkeit aufweisen. Der Anteil des Zelldebris ist bei Verwendung der CMD-Partikel in der NF vernachlässigbar klein und der Hauptteil der geschädigten Zellen findet sich auch hier in der PF. Auch die mit CMC umhüllten Nanopartikel werden von allen drei Subklassen der Leukozyten aufgenommen. Die Anteile der Granulozyten an der NF unterscheiden sich im Vergleich zur Verwendung von CMD-Partikeln kaum. In der PF liegt der Anteil der Granulozyten mit einem Mittelwert von 38% nach 4 Minuten und einem Mittelwert von 54% nach 12-minütiger Inkubation zu jedem Zeitpunkt höher als bei Inkubation der Leukozyten mit den CMD-umhüllten Nanoteilchen (Anteil zwischen 27% und 42%) (s. **Abb. 22**), was die höhere Aufnahmegeschwindigkeit für CMC-umhüllte Nanoteilchen durch die Leukozyten bestätigt. Auch die CMC-Partikel werden am schnellsten von den Monozyten inkorporiert. Ihr Anteil in der NF liegt über den gesamten Zeitverlauf bei 2%. In der PF beträgt der Anteil der Monozyten bereits nach 4 Minuten 10%, um dann im Zeitverlauf auf 6% nach 12-minütiger Inkubation abzufallen. Damit liegen die Werte etwa im Bereich der bei Inkubation mit CMD umhüllten Partikeln erzielten Ergebnisse. Die Abnahme des Anteils der Monozyten in der PF dürfte auch hier wieder als relativ zu werten sein (s. 4.1.2.). Die Lymphozyten zeigen auch für die CMC-Partikel das geringste Interaktionspotential unter den Subpopulationen der weißen Blutzellen. Nach 4 Minuten sind mit einem Anteil von 19% zunächst mehr Lymphozyten markiert und damit in der PF anzutreffen, als bei Verwendung der CMD-Partikel (15%). Jedoch bleibt der Anteil der Lymphozyten in der PF bei Inkubation mit CMC umhüllten Nanoteilchen im Zeitverlauf bis 12 Minuten, im Gegensatz zum langsamen aber kontinuierlichen Anstieg desselben bei Verwendung von CMD-Partikeln, konstant zwischen 18% und 19%. Diese Stagnation der Partikelaufnahme durch die Lymphozyten erklärt ihren geringfügig höheren Anteil in der NF nach 8- bzw. 12-minütiger Inkubationszeit im Vergleich zu den Ergebnissen bei Verwendung der CMD-Partikel (s. **Abb. 22**). Analog zu den mit CMD umhüllten Nanoteilchen findet sich der Hauptanteil des Zelldebris auch bei Inkubation mit CMC-Partikeln in der PF, während dessen Anteil in der NF mit einem Mittelwert von 2% über den Zeitverlauf konstant und

damit vernachlässigbar klein ist. Im direkten Vergleich lässt sich jedoch feststellen, dass der Anteil des Zelldebris mit im Mittel 33% nach 4 Minuten und einem Mittelwert von 22% nach 12-minütiger Inkubationszeit in der PF bei Verwendung von CMC als Hüllsubstanz zu jedem Separationszeitpunkt geringer ausfällt, als bei Inkubation der Leukozyten mit den CMD-Partikeln (Anteil zwischen 46% und 31%). Die Ergebnisse der FACS-Analyse der Leukozytensubpopulationen nach Inkubation mit CMCu-umhüllten Nanopartikeln ergeben ein differentes Bild im Vergleich zu den anderen beiden Nanopartikelarten. Weder die Lymphozyten mit einem Anteil von 2-3%, noch die Monozyten mit einem Anteil von 1-2% in der PF, zeigen eine nennenswerte Partikelaufnahme über den Zeitverlauf (s. **Abb. 22**). Lediglich für die Granulozyten lässt sich bei Betrachtung der Prozentwerte ein geringfügiger Anstieg ihres Anteils an der PF von im Mittel 14% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 18% nach 12 Minuten feststellen. Die absoluten Zellzahlen (nicht graphisch dargestellt) offenbaren dann auch für Lympho- und Monozyten einen Anstieg der Zellen in der PF, der jedoch im Vergleich zu den mit anderen Polysacchariden umhüllten Nanopartikeln unbedeutend ist. In der NF bleibt sowohl der Anteil an Lymphozyten, als auch der Anteil an Monozyten und Granulozyten über den gesamten Zeitverlauf relativ konstant, was mit der Nichtaufnahme dieser Partikel durch die Leukozyten vereinbar ist. Der Anteil der unmarkierten Monozyten liegt mit 4-5% höher, als bei Verwendung von CMD oder CMC als Hüllstoff. Der Anteil des Zelldebris stellt mit Werten zwischen 77% und 85% bei Inkubation mit CMCu-Partikeln den Hauptteil der PF. Begründbar ist dies auch hier durch die FACS-analytische Methodik. Da die Leukozyten kaum mit den CMCu-Partikeln interagieren, befinden sich entsprechend wenig intakte Zellen in der PF, sodass der Hauptteil der 10.000 ausgezählten Events aus toten oder geschädigten Zellen besteht, welche separationsbedingt im Eluat der PF enthalten sind (s. 4.1.2.). Die für die Zellen der PF gefundenen Unterschiede zwischen den CMCu-Partikeln und den anderen beiden Arten der Nanoteilchen erweisen sich in der statistischen Auswertung mittels univariater Varianzanalyse als signifikant ($p < 0,05$). In der NF unterscheiden sich dagegen nur die Anteile der Monozyten statistisch signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Beim Vergleich aller drei Partikelarten bestätigt somit auch die durchflusszytometrische Untersuchung, dass die mit CMCu umhüllten Nanoteilchen kaum oder gar nicht mit den Leukozyten interagieren, während sich das Interaktionspotential bei Verwendung der CMD- und der CMC-Partikel nur wenig unterscheidet. Bezüglich der Verteilung der Leukozytensubpopulationen in der NF und deren möglicher Veränderung durch den Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und der anschließenden MACS-Separation lässt sich feststellen, dass die Verteilung der Subklassen bei Verwendung

von CMCu als Partikelhülle zu jedem Zeitpunkt der natürlichen Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut entspricht. Bei Inkubation mit CMD- oder CMC-umhüllten Partikeln sind lediglich die Monozyten mit einem Anteil zwischen 1% und 2%, in der NF unterrepräsentiert, was durch ihren raschen Übertritt in die PF bedingt ist. Die Anteile für Granulozyten und Lymphozyten entsprechen der natürlichen Verteilung. Zusammenfassend lässt sich auch anhand der Ergebnisse der FACS-Analyse feststellen, dass eine Modifikation der Hüllstrukturen zu Veränderungen in der Aufnahmekinetik führt. Aufgrund der geringen Aufnahme der CMCu-Partikel durch alle Leukozytensubpopulationen und dem damit hohen in der NF verbleibenden Anteil an Zellen wären sie ideal. Zur magnetbasierten Separation von Tumorzellen und Leukozyten sind sie dennoch nicht geeignet, da auch die zirkulierenden Malignomzellen nicht nennenswert mit derart umhüllten Nanoteilchen interagieren (Wotschadlo et al. 2008). Da die mit CMC umhüllten Nanopartikel schneller und zumindest von den Granulozyten auch in höherem Ausmaß aufgenommen werden als die Nanoteilchen mit einer Hülle aus CMD, erweisen sich Letztere auch nach Analyse der Leukozytensubpopulationen als die bestgeeigneten der hier getesteten Partikel für eine effektive und schonende Separation von Leukozyten und Tumorzellen mittels MACS.

4.4. Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-, CMC- und CMCu-umhüllten Nanopartikeln – Vergleich der Verteilung der Lymphozytensubpopulationen in den Fraktionen

Auch beim Vergleich der drei unterschiedlich umhüllten Nanopartikel wurde noch einmal ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss von Inkubation und Zellseparation auf die Subpopulation der Lymphozyten mit ihren beiden Subklassen, den T- und B-Zellen, gelegt. Dazu wurden die aus dem Vollblut gesunder Spender isolierten Leukozyten jeweils für 4, 8 oder 12 Minuten mit 5 µl der Partikelsuspension (CMD-, CMC- oder CMCu-umhüllte Eisenoxidpartikel) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die magnetische Zellseparation. Aus den erhaltenen Fraktionen wurde nun jeweils ein Aliquot von 100 µl entnommen und für 20 Minuten mit gegen Oberflächenmoleküle der T- (CD3) und B-Zellen (CD19) gerichteten Antikörpern inkubiert. Danach erfolgte die Analyse der Proben im FACS. Alle Experimente dieser Versuchsreihe wurden mindestens fünfmal durchgeführt. Aus den Daten der jeweiligen Einzelmessungen wurden Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung errechnet. Auch hier erfolgt die Darstellung der Ergebnisse ausschließlich in Form von Prozentangaben, da die absoluten in der FACS-Analyse ermittelten Zellzahlen durch Grenzen in der Methodik verfälscht wurden. Ziel war es, mit der

Durchflusszytometrie aus jeder Probe 10.000 lymphozytäre Events zu erfassen und auszuwerten. Aufgrund der geringen Größe der Lymphozytenpopulation in einigen Fraktionen war dies jedoch nicht möglich und die Messungen mussten nach Aufbrauchen der Probe abgebrochen werden. In **Abb. 23** sind die Mittelwerte für die prozentualen Anteile der T- (a) und B-Lymphozyten (b) getrennt nach NF und PF und aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkt und Partikelart dargestellt. **Abb. 24** zeigt die Mittelwerte für die absoluten Zellzahlen der T- und B-Zellen in NF und PF am Beispiel des Separationszeitpunktes 8 Minuten.

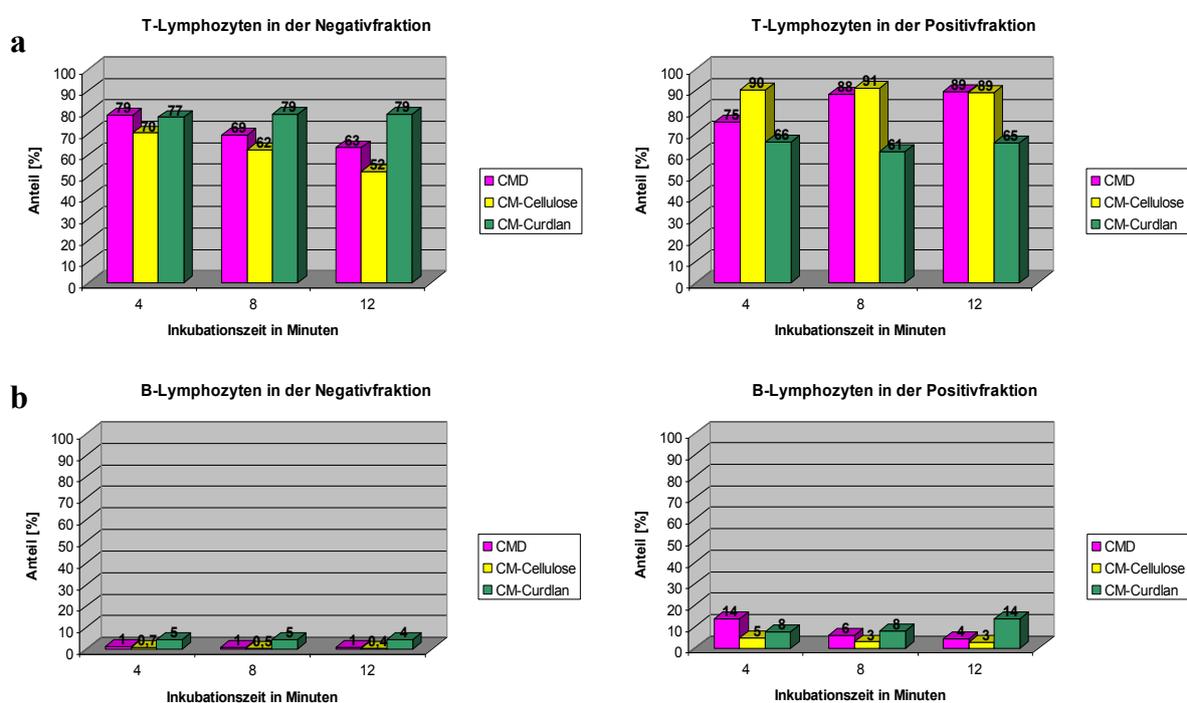


Abb. 23: Lymphozytensubklassen nach Inkubation mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln aufgeschlüsselt nach Fraktionen. Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile der T- (a) und B-Zellen (b) in Negativ- und Positivfraktion über den Zeitverlauf nach Inkubation der Leukozyten mit CMD- (pink), CMC- (gelb) oder CMCu-umhüllten (grün) Nanopartikeln.

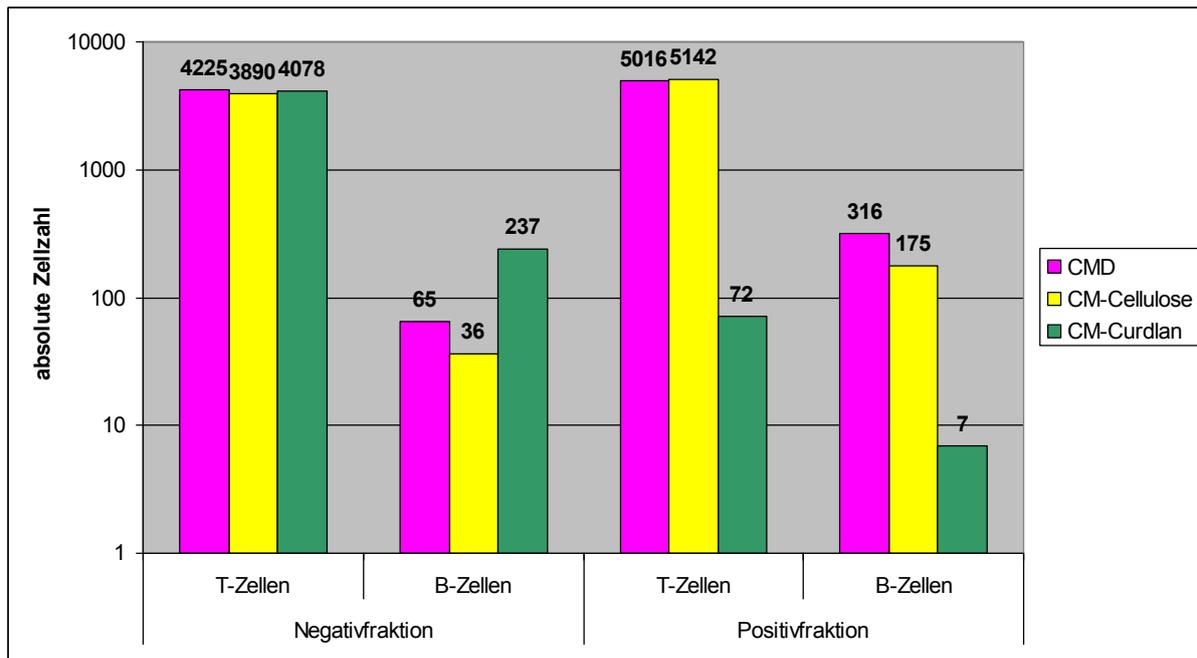


Abb. 24: Lymphozytensubklassen nach Inkubation mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln: Vergleichende Darstellung der absoluten Zellzahlen. Das Diagramm zeigt die absoluten Zellzahlen der T- und B-Lymphozyten in NF und PF nach 8-minütiger Inkubation der Leukozyten mit CMD- (pink), CMC- (gelb) oder CMCu-umhüllten (grün) Nanopartikeln.

Die durchflusszytometrische Analyse der NF und PF nach Inkubation der Leukozyten mit magnetischen CMD-, CMC- oder CMCu-umhüllten Nanopartikeln über definierte Zeiträume, anschließender Zellseparation und Markierung der T- und B-Zellen mittels Antikörpern zeigt, dass beide Untergruppen der Lymphozytenpopulation die Nanoteilchen aufnehmen. Dabei bestehen jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Partikelarten sowie bezüglich des Interaktionspotentials der T-Zellen im Vergleich zu den B-Zellen. Für die mit CMD umhüllten Nanopartikel ergibt sich in dieser Versuchsreihe ein analoges Bild zu den unter 4.2. dargestellten Ergebnissen. Die Partikel werden von den T-Zellen im Zeitverlauf langsam und kontinuierlich aufgenommen, sodass deren Anteil in der PF von im Mittel 75% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 89% nach 12-minütiger Inkubationszeit ansteigt. Parallel dazu verringert sich der Anteil der T-Lymphozyten in der NF von 79% auf 63% (s. **Abb. 23**). Die B-Zellen, welche nur 15-20% aller im peripheren Blut vorhandenen Lymphozyten ausmachen, nehmen die Partikel mit hoher Geschwindigkeit auf. Ihr Anteil in der PF beträgt schon nach 4-minütiger Inkubationszeit 14%. Im Zeitverlauf fällt dieser Anteil auf 4% ab. Dieser Rückgang dürfte jedoch wieder methodenbedingt sein (s. 4.2.1.). Der nur noch geringe Anstieg der B-Zellen in der PF im Zeitverlauf wird von den zunehmend aus der NF in die PF übertretenden T-Zellen überlagert. In der NF beträgt der Anteil der B-Lymphozyten konstant 1-2%. Grundsätzlich zeigt sich bei Inkubation mit CMC-umhüllten Nanopartikeln ein ähnliches Muster für die Lymphozytensubpopulationen. T-Zellen nehmen diese Partikel

jedoch schneller und in höherem Maße auf als die Nanoteilchen mit einer CMD-Hülle. Nach 4 Minuten stellen die T-Lymphozyten hier bereits einen Anteil von 90% in der PF. Im weiteren Verlauf scheint die Partikelaufnahme zu stagnieren, denn weder der prozentuale Anteil der T-Zellen in der PF, noch die absoluten Zellzahlen nehmen wesentlich zu. In der NF zeigt sich für den Anteil der T-Lymphozyten ein Abfall von im Mittel 70% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 52% nach 12-minütiger Inkubationszeit. Der Anteil der B-Lymphozyten in der NF stellt sich auch hier über den Zeitverlauf als relativ konstant dar. Allerdings liegen die prozentualen Anteile mit 0,4-0,7% und auch die absoluten Zellzahlen unterhalb der Werte für die CMD-Partikel. Auch in der PF liegt der prozentuale Anteil der B-Zellen mit 5% nach 4 Minuten und 3% nach 12-minütiger Inkubationszeit unterhalb der Werte für die mit CMD umhüllten Nanoteilchen. Jedoch zeigt sich auch für die CMC-Partikel die relativ schnelle Interaktion derselben mit den B-Lymphozyten, da auch hier ein relativer Abfall ihres prozentualen Anteils in der PF über die Zeit zu verzeichnen ist. Für die CMCu-Partikel ergeben sich im Vergleich mit den anderen beiden Partikelarten wesentliche Unterschiede. Auch in dieser Versuchsreihe bestätigt sich, dass Nanopartikel mit einer Hülle aus CMCu kaum mit den Leukozyten interagieren. Die in der FACS-Analyse ermittelten, absoluten Zellzahlen in der PF (s. **Abb. 24**) unterschreiten die zugehörigen unter Verwendung von CMD oder CMC als Hüllstoff erhaltenen Werte um ein bis zwei Zehnerpotenzen. Betrachtet man die prozentualen Anteile der T- und B-Zellen in den Fraktionen, so fällt auf, dass der prozentuale Anteil der T-Zellen an der NF mit Werten zwischen 77% und 79% im Zeitverlauf relativ konstant bleibt und spätestens nach 8-minütiger Inkubationszeit die Anteile für CMD- und CMC-Partikel übersteigt. Auch der Anteil der B-Zellen in der NF liegt im Vergleich zu den anderen beiden Partikelarten mit Werten zwischen 4% und 5% höher. In der PF zeigt sich im Zeitverlauf kein Anstieg des Anteils der T-Lymphozyten, welcher des Weiteren unterhalb der Werte für CMD- und CMC-Partikel rangiert. Lediglich der Anteil der B-Lymphozyten in der PF nimmt von im Mittel 8% nach 4 Minuten auf 14% nach 12-minütiger Inkubationszeit zu, was eine kontinuierliche Aufnahme der Partikel anzeigt, deren Ausmaß jedoch deutlich geringer ist als bei Verwendung der anderen Hüllsubstanzen. Auch in der statistischen Auswertung bestätigen sich die Unterschiede zwischen CMCu- und CMD- bzw. CMC-Partikeln. So sind sowohl der Anteil der T-Zellen in der PF, als auch der Anteil der B-Zellen in der NF bei Verwendung von CMCu als Hüllsubstanz zu jedem Zeitpunkt signifikant verschieden ($p < 0,05$) zu den anderen beiden Partikelarten. Für die T-Zellen der NF findet sich erst nach 12 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen CMCu und CMC, was mit der natürlichen Größe dieser Population im Zusammenhang stehen dürfte. Für die B-Zellen der

PF findet sich überraschender Weise auch erst nach 12 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen CMCu und CMC, alle anderen statistischen Vergleiche erbrachten hier keine Signifikanzen. Ursache dafür könnte die relativ große Varianz der einzelnen Messwerte bei relativ kleinem Stichprobenumfang (n=5) sein. Die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen in der NF wird im Vergleich zur natürlichen Verteilung der T- und B-Zellen im peripheren Blut durch die Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln, unabhängig von der Art der Polysaccharidhülle, verändert. Bei allen drei Arten von Nanopartikeln sind die B-Lymphozyten in der NF zu jedem Zeitpunkt unterrepräsentiert. Der Anteil der T-Zellen in der NF wird vor allem bei Inkubation mit CMC-Partikeln reduziert. Schon nach 4 Minuten liegt ihr Anteil mit im Mittel 70% etwa 10% unterhalb des Normwertes in der natürlichen Verteilung der Lymphozytensubklassen.

4.5. Charakterisierung der Leukozytensubpopulationen nach Inkubation der Leukozyten von Mammakarzinompatientinnen unter Herceptin-Therapie mit CMD-umhüllten Nanopartikeln

Alle bisher beschriebenen Ergebnisse wurden unter Verwendung von Blutproben gesunder Probanden gewonnen. Um nun die Frage zu beantworten, ob patienten- oder tumorspezifische Besonderheiten hinsichtlich der Aufnahme der Partikel durch die Leukozyten und der Verteilung der Leukozytensubpopulationen nach Inkubation und Separation bestehen, wurden die unter 4.1. beschriebenen Experimente mit Leukozyten aus dem peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen unter Herceptintherapie, in welchem zirkulierende Tumorzellen nachweisbar waren, wiederholt. Analog zum Vorgehen bei der Inkubation von Leukozyten gesunder Spender mit CMD-Partikeln wurden auch hier die weißen Zellen mittels Erythrozytenlyse aus dem Vollblut der Tumorpatientinnen isoliert, für 4, 8, 12 oder 30 Minuten mit 5 µl der CMD-Nanopartikelsuspension inkubiert und mittels MACS separiert. Danach erfolgte die Zellzählung am Coulter[®] Z2, um die Anteile der Leukozyten in NF und PF zu bestimmen und die Verlustrate zu errechnen. Anschließend wurde die Verteilung der Leukozytensubpopulationen im Durchflusszytometer analysiert.

4.5.1. Fraktionen nach der MACS-Separation

Die Versuche wurden pro Inkubationszeitpunkt (4, 8, 12 und 30 Minuten) fünffach durchgeführt. Aus den Daten der einzelnen Separationen in Form von Zellzahl in NF und PF und daraus errechneter Verlustrate wurde jeweils der Mittelwert bestimmt und die zugehörige Standardabweichung errechnet. In **Abb. 25** sind die prozentualen Anteile der ursprünglich in

die Reaktion eingesetzten Leukozyten an NF und PF zusammen mit der separationsbedingten Verlustrate im Zeitverlauf als Mittelwert der Ergebnisse aus den Einzelseparationen dargestellt. **Abb. 26** zeigt die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen in NF und PF sowie der Zahl der während der Separationsprozedur verloren gegangenen Leukozyten bezogen auf die einzelnen Inkubationszeitpunkte.

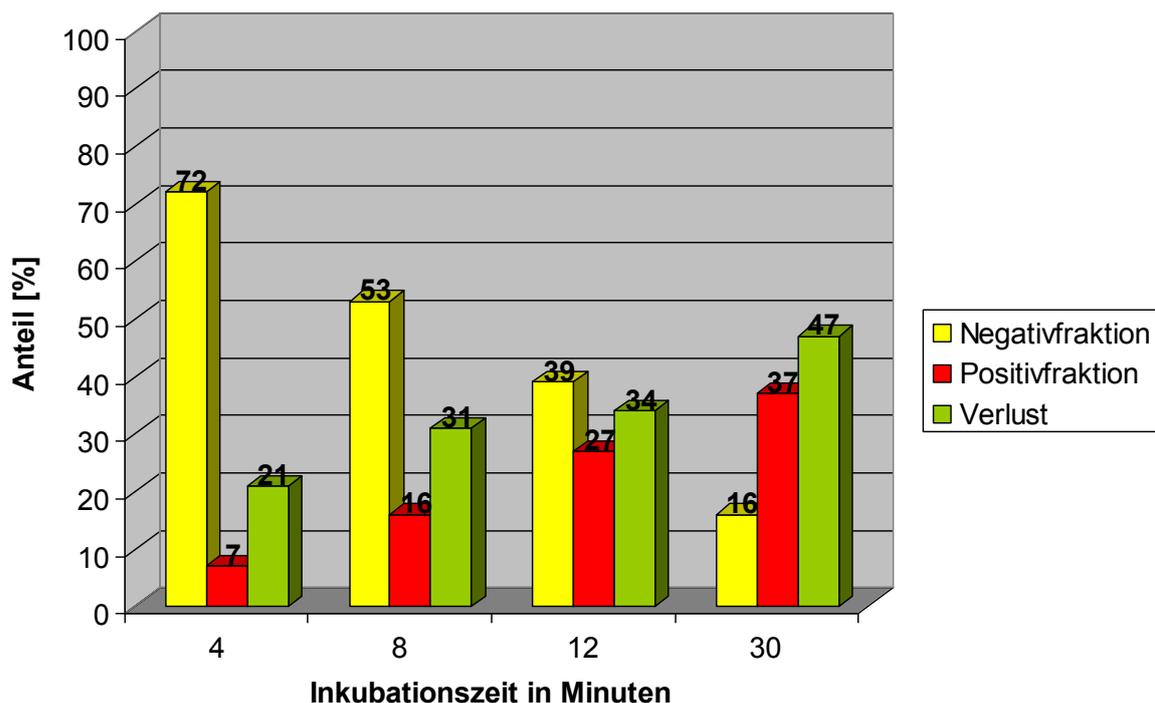


Abb. 25: Kinetik der Partikelaufnahme durch Leukozyten von Tumorpatientinnen im Zeitverlauf. Das Diagramm zeigt die prozentualen Leukozytenanteile in NF und PF sowie die Verlustrate bezogen auf die Gesamtsumme der ursprünglich eingesetzten Leukozyten ($= 2,5 \times 10^6$) im Zeitverlauf als Mittelwerte aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen.

Auch die aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen isolierten Leukozyten zeigen im Zeitverlauf eine kontinuierliche Aufnahme der mit CMD umhüllten Nanopartikel. Der Anteil der Zellen in der NF reduziert sich von im Mittel 72% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 16% nach 30-minütiger Inkubationszeit. Parallel dazu steigt der Anteil der mit Partikeln beladenen Leukozyten in der PF von 21% auf 47% an. Die separationsbedingte Verlustrate zeigt im Zeitverlauf ebenfalls einen Anstieg von im Mittel 21% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 47% nach 30 Minuten. Vergleicht man nun die Ergebnisse der MACS-Separation für Proben von gesunden Probanden und Tumorpatienten, so ergibt sich für beide Gruppen ein ähnliches Bild. **Abb. 27** zeigt den Verlauf von NF und PF (a) sowie der Verlustrate (b) über die Zeit für gesunde Probanden und Patienten im Vergleich.

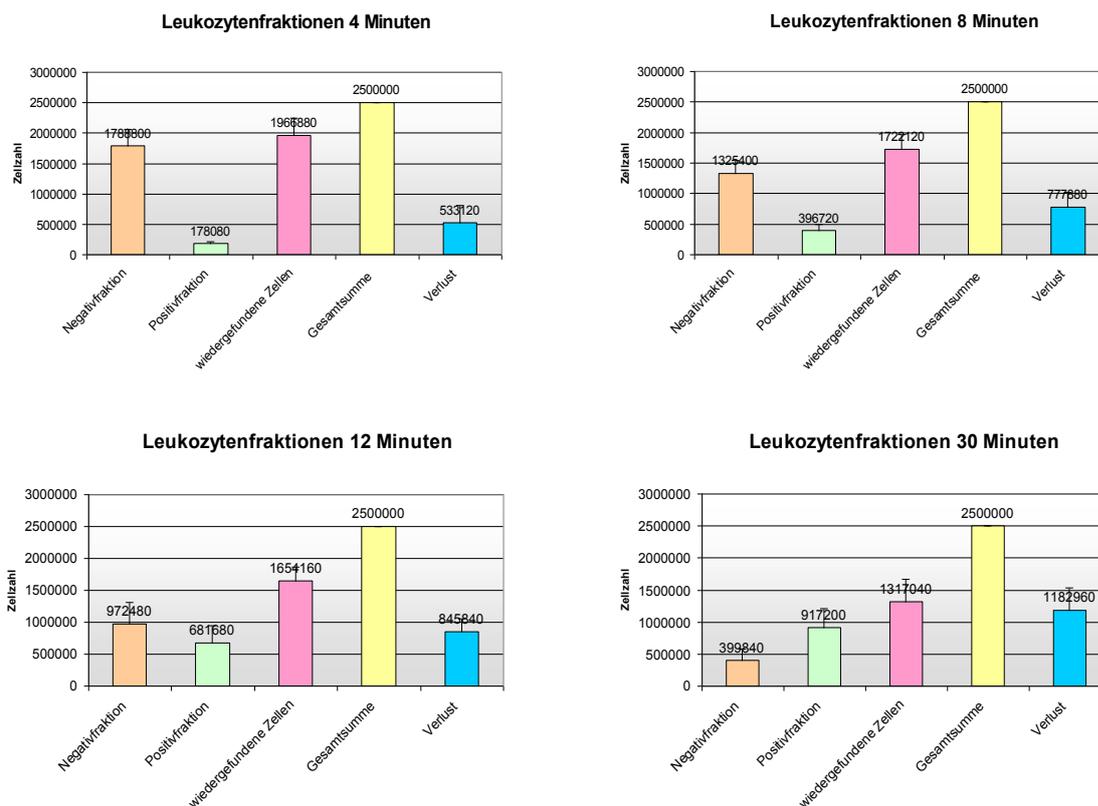


Abb. 26: Absolute Zellzahlen in den Fraktionen nach der MACS-Separation (Ergebnisse für Patientenproben). Die Diagramme zeigen die Anzahl der Leukozyten in Negativ- und Positivfraktion zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt. Daneben ist der Zellverlust im Vergleich zur Anzahl der nach der Separation wiedergefundenen Zellen (als Summe aus den Zellzahlen in NF und PF) und im Vergleich zur ursprünglich eingesetzten Anzahl an Leukozyten (= Gesamtsumme) dargestellt.

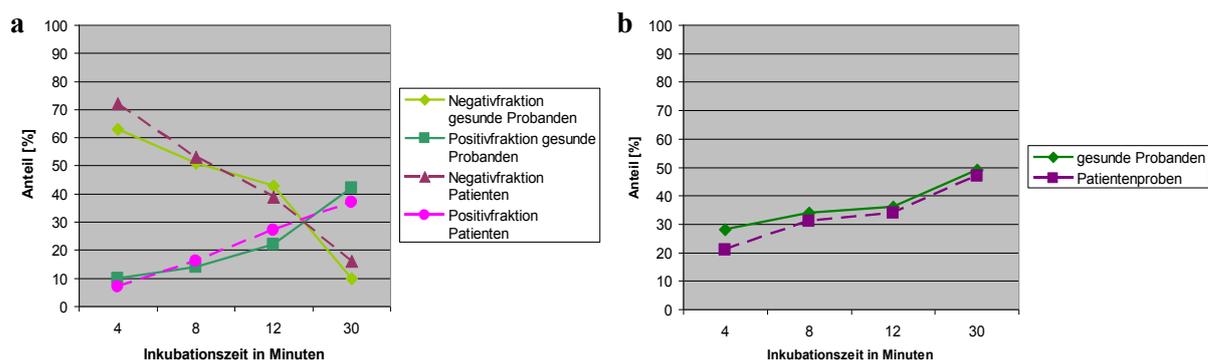


Abb. 27: Ergebnisse der MACS-Separation – Vergleich zwischen gesunden Probanden und Mammakarzinompatientinnen. Die Diagramme zeigen den Verlauf von Negativ- und Positivfraktion (a) und damit die Kinetik der Partikelaufnahme durch die Leukozyten sowie die Veränderung der separationsbedingten Verlustrate (b) über die Zeit im Vergleich zwischen gesunden Probanden (grün) und Tumorpatienten (lila).

Die vergleichende graphische Darstellung der Daten in **Abb. 27** weist sowohl für den Verlauf der Leukozytenzahlen in NF und PF als auch für die Höhe der Verlusten fast deckungsgleiche Kurven auf. Die rein zahlenmäßigen Unterschiede der Ergebnisse für gesunde Probanden und Patienten sind vernachlässigbar klein und dürften im Wesentlichen durch die interindividuell verschiedene Kinetik der Partikelaufnahme in die Leukozyten bedingt sein. Für beiden Gruppen zeigt sich eine langsame und kontinuierliche Aufnahme der CMD-umhüllten Nanopartikel durch die weißen Blutzellen sowie der damit einhergehende Anstieg der PF. Parallel dazu nimmt die Zahl der in der NF verbleibenden Leukozyten im Zeitverlauf ab. Ebenso nehmen die separationsbedingten Verluste in beiden Gruppen mit der Zeit im gleichen Maße zu. Auch die statistische Auswertung der Daten mittels Mann-Whitney-Test findet keinerlei signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen gesunden Probanden und Patienten. Bei isolierter Betrachtung der Ergebnisse der MACS-Separation lassen sich somit also keine tumor- oder patientenspezifischen Besonderheiten hinsichtlich der Kinetik der Nanopartikelaufnahme durch die Leukozyten im Vergleich zu gesunden Probanden feststellen.

4.5.2. Ergebnisse der FACS-Analyse – Darstellung der Leukozytensubpopulationen

Auch bei Analyse der Patientenproben wurde die Verteilung der Leukozytensubpopulationen in den nach der magnetischen Zellseparation erhaltenen NF und PF im Durchflusszytometer untersucht, um so den Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln auf die jeweilige Leukozytensubpopulation näher zu charakterisieren. Pro FACS-Analyse wurden auch hier 10.000 Zellen der jeweiligen Probe ausgezählt. Die prozentualen Angaben beziehen sich im Folgenden auf diesen Wert. Die Experimente wurden für jeden Inkubationszeitpunkt jeweils fünfmal durchgeführt und aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen Mittelwerte und Standardabweichung errechnet. **Abb. 28** zeigt die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen für Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Zelldebris in den Fraktionen aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten. In **Abb. 29** sind die prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen und des Zelldebris in der NF und PF zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt bezogen auf eine Gesamtzahl von 10.000 (= 100%) im Durchflusszytometer analysierten Events als Mittelwerte der einzelnen Separationen dargestellt.

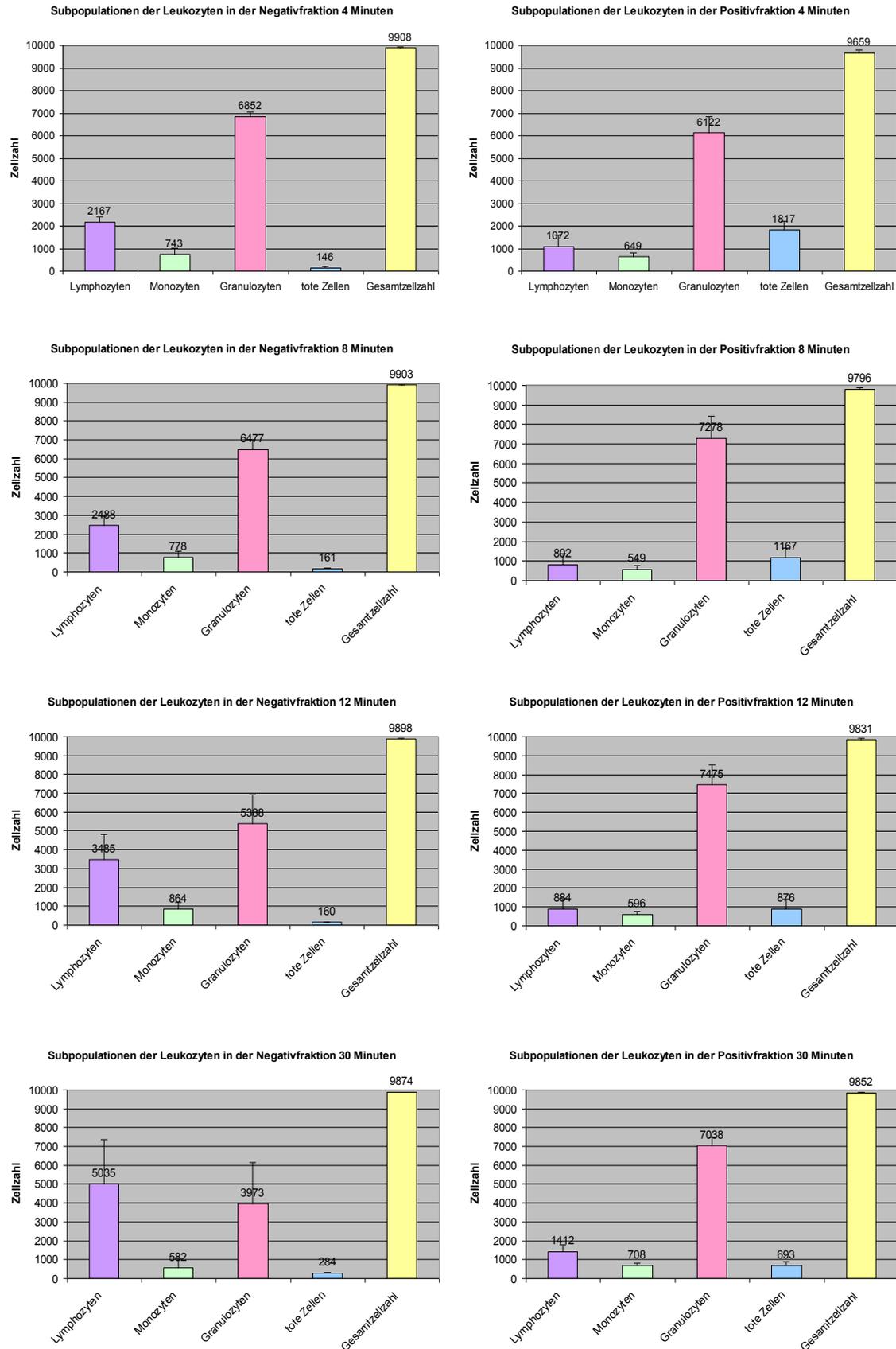


Abb. 28: Darstellung der Leukozytensubpopulationen in Negativ- und Positivfraktion aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten (Patientenproben). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen für Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Zelldebris (= tote Zellen) in den einzelnen Fraktionen aufgeschlüsselt nach Inkubationszeitpunkten.

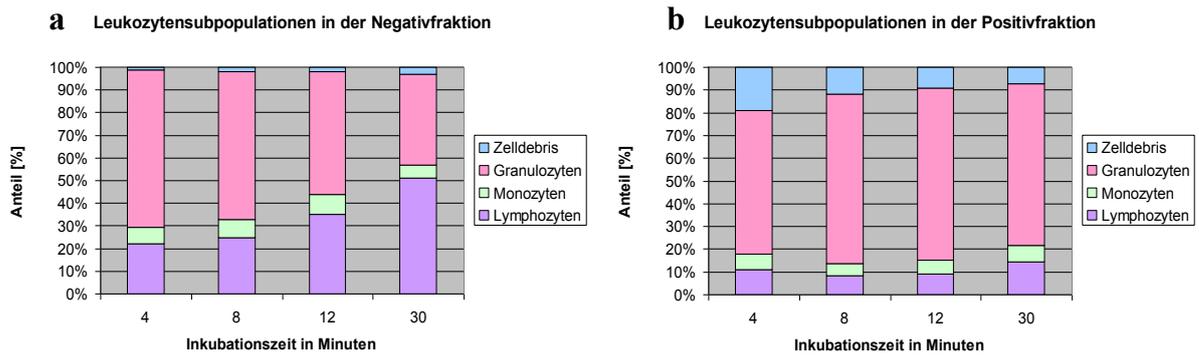


Abb. 29: Kinetik der Partikelaufnahme aufgeschlüsselt nach Leukozytensubpopulationen im Zeitverlauf (Patientenproben). Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile der Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und des Zelldebris in NF (a) und PF (b) bezogen auf 10.000 Events in der FACS-Analyse im Zeitverlauf als Mittelwerte aus den Ergebnissen der einzelnen Separationen.

Die durchflusszytometrische Analyse der NF und PF zeigt auch bei Verwendung der von Tumorpatienten stammenden Leukozyten eine Aufnahme der CMD-umhüllten magnetischen Nanopartikel durch alle drei Subpopulationen. Die Granulozyten als die größte der Leukozytensubklassen stellen, mit Ausnahme der NF nach 30-minütiger Inkubation, zu jedem Zeitpunkt den Hauptanteil der Zellen in beiden Fraktionen. Sie nehmen die Nanopartikel im Zeitverlauf langsam und kontinuierlich auf. Ihr Anteil in der PF steigt von im Mittel 63% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 76% nach 12-minütiger Inkubationszeit an. Nach 30-minütiger Inkubation beträgt der Anteil der Granulozyten in der PF nur noch rund 71% und liegt damit unter dem 12-Minuten-Wert, was ein Hinweis auf ein Stagnieren der Partikelaufnahme und das Erreichen eines diesbezüglichen Plateauzustandes sein könnte. In der NF nimmt der Anteil der Granulozyten von im Mittel 69% nach 4 Minuten auf einen Mittelwert von 40% nach 30 Minuten ab. Die Monozyten nehmen die Partikel, gemäß ihrer Funktion als professionelle Phagozyten, am schnellsten auf. Ihr Anteil in der PF liegt über den gesamten Zeitverlauf zwischen 6% und 7%. Auch bei Verwendung der Leukozyten aus dem Blut von Tumorpatienten ergibt sich das geringste Interaktionspotential für die Lymphozyten. Sie nehmen die Partikel im Vergleich zu den anderen beiden Leukozytensubpopulationen langsamer und in geringerem Ausmaß auf. In der PF zeigt sich für die Lymphozyten kein kontinuierlicher Anstieg. Die Mittelwerte schwanken im Zeitverlauf zwischen 8% und 14%. Ihr Anteil in der NF nimmt von im Mittel 22% nach 4-minütiger Inkubationszeit auf einen Mittelwert von 51% nach 30 Minuten zu. Somit bilden die Lymphozyten nach 30 Minuten den Hauptanteil der in der NF verbleibenden Zellpopulation. Die langsame und im Ausmaß geringe Aufnahme der magnetischen Partikel durch die Lymphozyten ist im Hinblick auf die

Abtrennung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut als sehr positiv zu werten, da die in hohem Maße in der NF verbleibenden Lymphozyten dem Patienten als wichtige Zellen der Tumor- und Infektabwehr erhalten bleiben würden. Der Hauptteil der geschädigten oder toten Zellen (= Zelldebris) befindet sich methodenbedingt (s. 4.1.2.) zu jedem Zeitpunkt in der PF. Der Anteil des Zelldebris in der NF ist mit Werten zwischen 1% und 3% vernachlässigbar klein. In der PF verringert sich sein Anteil von im Mittel 19% nach 4 Minuten auf 7% nach 30-minütiger Inkubation. Erklärbar ist dies durch die Zunahme der drei Leukozytensubklassen in der PF über die Zeit. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die absolute Zahl der durch die Separationsprozedur geschädigten oder toten Zellen im Zeitverlauf relativ konstant bleibt. Der Vergleich der prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen in der NF mit der natürlichen Verteilung der Leukozytensubklassen im peripheren Blut zeigt, dass bis zu einer Inkubationszeit von 12 Minuten keine durch Inkubation oder Separation bedingten Veränderungen diesbezüglich auftreten. Nach 30 Minuten sind die Lymphozyten in der NF mit einem Anteil von 51% im Vergleich zu den Granulozyten mit einem Anteil von nur noch 40% überrepräsentiert.

4.5.3. Vergleich der FACS-Ergebnisse von gesunden Probanden mit den Patientendaten

In **Abb. 30** sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile für Lymphozyten (a), Monozyten (b) und Granulozyten (c) sowie des Zelldebris (d) aufgeschlüsselt nach Fraktionen im Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten dargestellt.

Auch die vergleichende graphische Darstellung der Daten der FACS-Analyse zeigt große Ähnlichkeiten hinsichtlich des Verhaltens der Leukozytensubpopulationen von gesunden Spendern und Tumorpatienten bei Inkubation mit magnetischen CMD-umhüllten Nanopartikeln. Allerdings lassen sich hier, im Gegensatz zu den unter 4.5.1. beschriebenen Ergebnissen, auch einige Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennen. Die Subpopulation der Granulozyten nimmt die Nanopartikel in beiden Gruppen kontinuierlich über die Zeit auf, jedoch ist die Interaktionsgeschwindigkeit bei den aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen isolierten Leukozyten deutlich größer. Hier beträgt der Anteil der Granulozyten in der PF bereits nach 4 Minuten 63%, während dieser bei Verwendung der Leukozyten von gesunden Probanden zum gleichen Zeitpunkt erst einen Wert von im Mittel 31% erreicht. Auch nach 8- und 12-minütiger Inkubation der Zellen mit CMD-umhüllten Nanopartikeln ist diese Differenz noch deutlich ausgeprägt (s. **Abb. 30**). In der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Test ergibt sich für die gefundenen Unterschiede eine deutliche Signifikanz ($p \leq 0,01$). Nach 30 Minuten stellen die Granulozyten bei gesunden

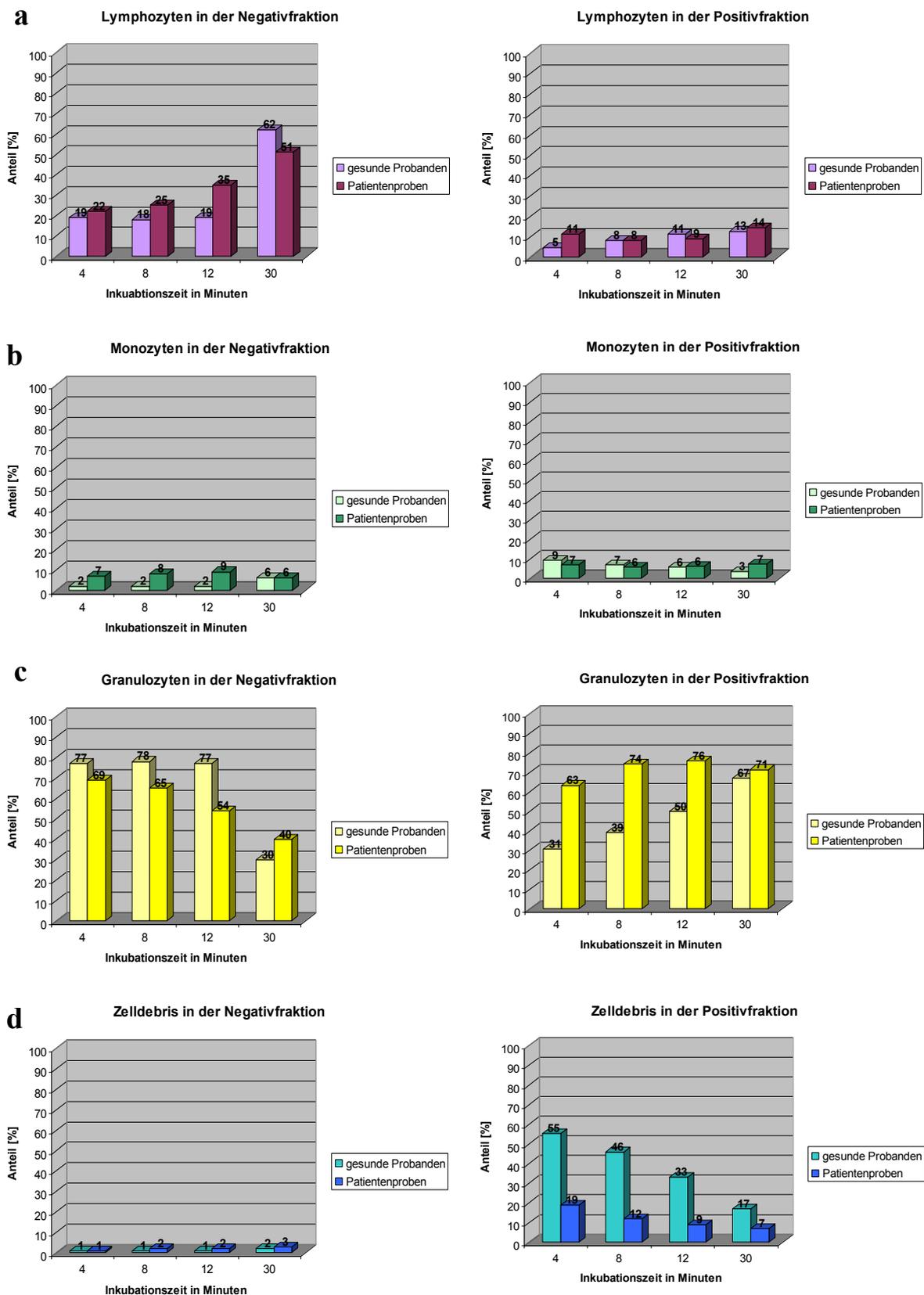


Abb. 30: Ergebnisse der FACS-Analyse – Vergleich zwischen gesunden Probanden und Mammakarzinompatientinnen. Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile der Lymphozyten (a), Monozyten (b), Granulozyten (c) und des Zelldebris (d) in Negativ- und Positivfraktion im Zeitverlauf im Vergleich zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten.

Probanden einen Anteil von 67% in der PF, während ihr Anteil bei den Patienten im Mittel 71% beträgt. Dieser Unterschied erweist sich nicht mehr als statistisch signifikant ($p > 0,05$). In der NF liegt der prozentuale Anteil der Granulozyten im Zeitraum zwischen 4 und 12 Minuten bei Verwendung der Leukozyten von gesunden Spendern um 8-23% über den für Leukozyten aus dem Blut von Tumorpatienten gefundenen Werten, was die schnellere Interaktion letzterer mit den Nanopartikeln bestätigt. Auch diese Unterschiede erweisen sich in der statistischen Auswertung als signifikant ($p < 0,05$). Die Monozyten sind in beiden Gruppen die Leukozytensubpopulation, welche am schnellsten mit den magnetischen Nanopartikeln interagiert. Die rasche Aufnahme der Partikel durch die monozytären Zellen zu Anfang der Inkubation und der methodenbedingt damit verbundene Abfall ihres Anteils an der PF im Zeitverlauf tritt bei den gesunden Probanden deutlicher hervor als bei den Patientenproben, wobei sich die zahlenmäßigen Unterschiede in der statistischen Auswertung jedoch nicht als signifikant erweisen ($p > 0,05$). In der Gruppe der gesunden Spender sind die Monozyten in der NF deshalb nach 4-, 8- und 12-minütiger Inkubation mit einem Anteil von im Mittel 2% im Vergleich zur natürlichen Verteilung der Leukozytensubpopulationen unterrepräsentiert, während ihr Anteil bei den Patientenproben mit 7-9% noch im Normbereich für die natürliche Verteilung liegt. Auch in der statistischen Auswertung ergeben sich bei Vergleich des prozentualen Anteils der Monozyten in der NF signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Partikelaufnahme sind in beiden Gruppen für die Subpopulation der Lymphozyten am geringsten. Der Anteil der Lymphozyten in der NF steigt im Zeitverlauf sowohl bei Verwendung der Leukozyten aus dem Blut gesunder Probanden als auch bei Verwendung der Leukozyten von Tumorpatienten an. In der PF stellen die Lymphozyten bei gesunden Probanden nach 4-minütiger Inkubationszeit einen Anteil von 5%, während ihr Anteil bei Patientenproben zum selben Zeitpunkt schon 11% beträgt, was auf eine höhere Interaktionsgeschwindigkeit der Zellen mit den Nanopartikeln schließen lässt. Dieser Unterschied erweist sich auch in der statistischen Auswertung als signifikant ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf der Inkubation zeigt sich für die Lymphozyten der gesunden Probanden ein Anstieg ihres Anteils in der PF. Bei den Patientenproben scheint die Aufnahme der Partikel durch die Lymphozyten eher zu stagnieren, da deren prozentualer Anteil nach 8 und 12 Minuten nur noch 8-9% beträgt, was auf das Erreichen eines Plateaustandes hindeutet. Der Anteil des Zelldebris in der NF ist mit Werten zwischen 1% und 3% in beiden Gruppen zu jedem Zeitpunkt vernachlässigbar klein. Der Hauptteil der toten oder geschädigten Zellen findet sich sowohl bei den gesunden Probanden als auch bei den Patientenproben in der PF.

Allerdings fallen die gefundenen Werte für die gesunden Probanden deutlich höher aus. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen erweist sich auch in der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Test als signifikant ($p < 0,05$). Insgesamt zeigen sich somit beim Vergleich der Ergebnisse von gesunden Probanden und Tumorpatienten große Ähnlichkeiten, das Interaktionspotential der Leukozytensubpopulationen mit den CMD-umhüllten Nanopartikeln betreffend. Jedoch scheinen sowohl die Granulozyten als auch die Lymphozyten aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen die Partikel schneller aufzunehmen, als die komplementären Zellen aus dem Blut gesunder Probanden. Ursachen dafür könnten in einem krankheits- oder therapiebedingt veränderten Aktivitätszustand des Immunsystems zu suchen sein. Die Verteilung der Leukozytensubpopulationen in der NF bleibt bis zu einer Inkubationszeit von 12 Minuten im Vergleich zu den Normwerten der natürlichen Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut sowohl bei gesunden Probanden als auch bei den Tumorpatienten durch Inkubation und Separation im Wesentlichen unbeeinflusst.

4.6. Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen nach Inkubation der Leukozyten von Mammakarzinompatientinnen unter Herceptin-Therapie mit CMD-umhüllten Nanopartikeln

Auch bei den Experimenten mit Leukozyten aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen wurden die Lymphozyten aufgrund ihrer herausragenden Bedeutung für das menschliche Immunsystem noch einmal gesondert hinsichtlich des Einflusses von Inkubation und Zellseparation auf die T- und B-Zellen untersucht. Dazu wurden die Leukozyten aus dem Vollblut der Patienten mittels Erythrozytenlyse isoliert, anschließend für 4, 8, 12 oder 30 Minuten mit 5 μ l der CMD-Partikelsuspension inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit mittels MACS separiert. Danach wurde jeweils ein Aliquot von 100 μ l aus den Fraktionen entnommen und mit gegen Oberflächenmoleküle der T- (CD3) und B-Zellen (CD19) gerichteten Antikörpern inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Proben. Alle Experimente wurden fünffach wiederholt und anschließend aus den Ergebnissen der jeweiligen Einzelmessungen die Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen errechnet. Die Darstellung der Ergebnisse dieser Versuchsreihe erfolgt wiederum ausschließlich in Form von Prozentangaben, da die absoluten in der FACS-Analyse ermittelten Zellzahlen durch Grenzen in der Methodik verfälscht wurden. Ziel war es, mit der Durchflusszytometrie aus jeder Probe 10.000 lymphozytäre Events zu erfassen und auszuwerten. Aufgrund der geringen Größe der Lymphozytenpopulation in einigen

Fraktionen war dies jedoch nicht möglich und die Messungen mussten nach Aufbrauchen der Probe abgebrochen werden. **Abb. 31** zeigt die Lymphozytensubpopulationen nach der magnetischen Zellseparation im Zeitverlauf aufgeschlüsselt in NF (a) und PF (b).

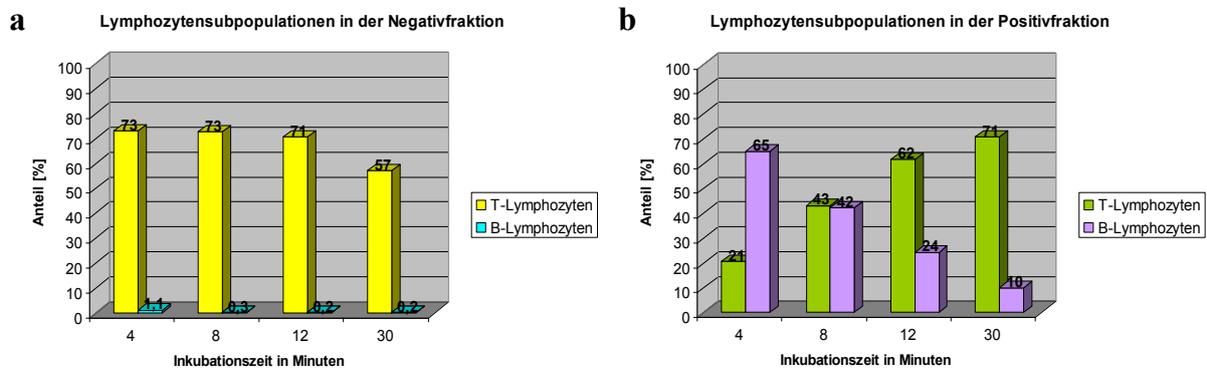


Abb. 31: Kinetik der Lymphozytensubpopulationen im Zeitverlauf aufgeschlüsselt nach Fraktionen (Patientenproben). Das Diagramm zeigt die prozentualen Anteile der T- und B-Lymphozyten in Negativ- (a) und Positivfraktion (b) im Zeitverlauf bezogen auf die Gesamtzahl der im FACS analysierten Events als Mittelwerte der einzelnen Separationen.

Auch hier zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Proben, dass die Nanopartikel sowohl von den T-, als auch von den B-Zellen aufgenommen werden. Zwischen den beiden Lymphozytensubklassen bestehen jedoch wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Aufnahmekinetik. Die T-Zellen zeigen im Zeitverlauf eine langsame und kontinuierliche Aufnahme der magnetischen CMD-umhüllten Nanoteilchen. Ihr Anteil in der PF steigt von im Mittel 21% nach 4-minütiger Inkubation auf einen Mittelwert von 71% nach 30 Minuten (s. **Abb. 31**). Parallel dazu zeigt sich ein Abfall des Anteils der T-Lymphozyten in der NF von 73% nach 4 Minuten auf 57% nach 30-minütiger Inkubation. Dieser tritt jedoch erst verzögert beim Vergleich der Inkubationszeitpunkte 12 und 30 Minuten hervor, was mit der Größe der T-Zell-Population (80% der Lymphozyten im peripheren Blut) im Vergleich zur Population der B-Lymphozyten (15-20% der Lymphozyten im peripheren Blut) in Zusammenhang stehen dürfte. Da in der FACS-Analyse jeweils nur 10.000 lymphozytäre Events aus einer Probe analysiert wurden, befanden sich trotz kontinuierlicher Aufnahme von Nanopartikeln und dem damit verbundenen Übergang der Zellen in die PF noch genügend T-Lymphozyten in der NF, um die entstandene Lücke aufzufüllen. Die B-Zellen scheinen wesentlich schneller und in höherem Ausmaß mit den Nanopartikeln zu interagieren als die T-Lymphozyten. Ihr Anteil in der PF beträgt bereits nach 4 Minuten 65% und übersteigt damit deutlich den Anteil der T-Zellen zum selben Zeitpunkt. Im weiteren Verlauf der Inkubation reduziert sich der

prozentuale Anteil der B-Lymphozyten in der PF kontinuierlich bis auf einen mittleren Wert von 10% nach 30 Minuten. Es dürfte sich hier um eine relative Abnahme ihres Anteil handeln, da die T-Zellen im Zeitverlauf vermehrt Partikel aufnehmen und somit in die PF übertreten, während die Zahl der markierten B-Zellen nicht mehr wesentlich zunimmt. Der Anteil der B-Zellen in der NF beträgt schon nach 4 Minuten nur noch etwa 1%, was die rasche Partikelaufnahme durch diese Zellpopulation untermauert. Damit sind die B-Zellen in der NF über den gesamten Zeitverlauf im Vergleich zur natürlichen Verteilung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut deutlich unterrepräsentiert. Der Anteil der T-Zellen in der NF liegt bis zum Inkubationszeitpunkt 12 Minuten mit Werten um 70% nur geringfügig unterhalb des Normbereiches.

4.6.1. Vergleich der Ergebnisse von gesunden Probanden mit den Patientendaten

Abb. 32 zeigt die Mittelwerte der prozentualen Anteile der T- (a) und B-Zellen (b) aufgeschlüsselt in NF und PF im Vergleich zwischen gesunden Probanden und Mammakarzinompatientinnen.

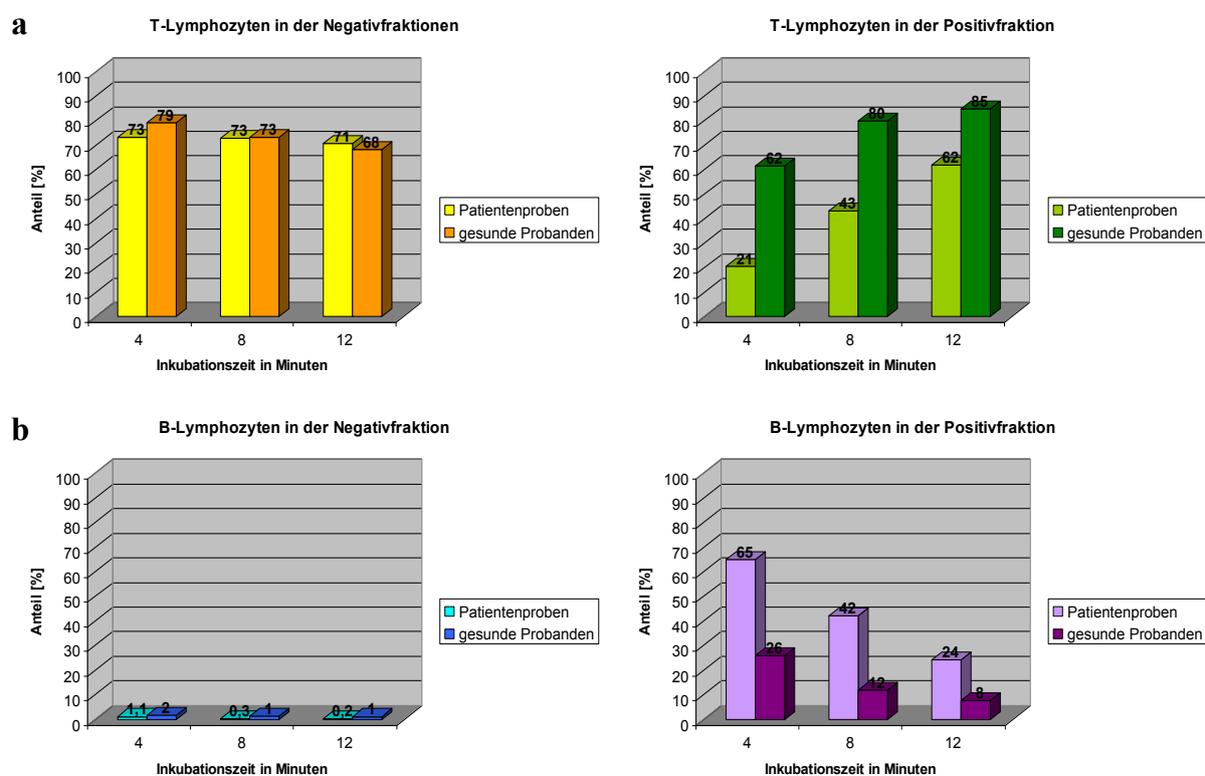


Abb. 32: Kinetik der Nanopartikelaufnahme durch die Lymphozytensubpopulationen – Vergleich der Ergebnisse von gesunden Spendern und Tumorpatienten. Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile der T- (a) und B-Zellen (b) in Negativ- und Positivfraktion jeweils im direkten Vergleich zwischen gesunden Probanden (helle Säulen) und Patienten (dunkle Säulen).

Auch beim Vergleich der Daten dieser Versuchsreihe ergeben sich große Ähnlichkeiten zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten. Hinsichtlich des Musters der Partikelaufnahme durch die Lymphozytensubklassen finden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die T-Zellen zeigen eine langsame und kontinuierliche Aufnahme der Nanoteilchen, während die B-Zellen im Vergleich dazu sehr rasch mit den Partikeln interagieren. Bei Betrachtung der in der FACS-Analyse ermittelten absoluten Zellzahlen (nicht graphisch dargestellt) fällt jedoch auf, dass in beiden Fraktionen die Werte für die Patientenproben deutlich unterhalb derer für die gesunden Probanden liegen. Das lässt darauf schließen, dass insgesamt weniger Lymphozyten im peripheren Blut der Tumorpatienten vorhanden waren oder dass diese durch Inkubation und Separation stärker beeinträchtigt wurden, als dies bei den Lymphozyten aus dem Blut gesunder Probanden der Fall war. Auch die prozentualen Anteile der T- und B-Zellen weisen vorrangig in der PF größere Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten auf. Der Anteil der T-Zellen in der PF liegt für die gesunden Probanden zu jedem Zeitpunkt der Inkubation etwa 20-40% über den Werten für die Mammakarzinompatientinnen. Dieser Unterschied erweist sich auch in der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Test als signifikant ($p < 0,05$). Überraschender Weise zeigt sich bei den B-Zellen ein umgekehrtes Bild. Hier ist der Anteil in der PF bei den Patienten wesentlich höher im Vergleich zu den Werten bei gesunden Probanden. Auch dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die zahlenmäßigen Unterschiede der jeweiligen Anteile in der NF sind im Vergleich dazu eher klein.

4.7. Kultivierung der Lymphozyten der Negativfraktion nach Inkubation mit CMD-umhüllten Nanopartikeln und magnetischer Zellseparation

Die Entwicklung eines dialyseartigen Verfahrens zur Depletion zirkulierender Tumorzellen aus dem peripheren Blut krebskranker Patienten und damit die Verringerung des Risikos der Ausbildung von Fernmetastasen ist das angestrebte Fernziel, zu dessen Erreichen auch alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen beitragen sollen. Dabei ist es nicht nur bedeutsam, dass möglichst viele epitheliale Zellen malignen Ursprungs in der PF erscheinen, während ein möglichst großer Anteil der Leukozyten unmarkiert in der NF zurückgehalten wird. Wichtig ist vor allem auch, dass die zelluläre Integrität und die biologische Aktivität der in der NF verbleibenden Leukozyten durch die Inkubation der Zellen mit den magnetischen Nanopartikeln und der sich anschließenden Separation mittels MACS unbeeinflusst bleiben, da diese Zellpopulation theoretisch nach erfolgter Tumorzelldepletion an den Patienten zurückgeführt werden würde. Die Zellen der NF sollten

also nach der Behandlung möglichst vital und voll funktionstüchtig sein. Um zu klären, inwieweit dies der Fall ist, sollte im Rahmen dieser Dissertation erstmals versucht werden, die Leukozyten der NF nach der Separationsprozedur weiterzukultivieren und ein praktikables Verfahren dafür zu etablieren. Da eine gleichzeitige Kultivierung aller Leukozyten-subpopulationen experimentell nur schwer zu realisieren ist, wurden hier exemplarisch die T-Lymphozyten als einer der wichtigsten Bestandteile des menschlichen Immunsystems ausgewählt und mittels des Dynabeads[®] CD3/CD28 T Cell Expanders kultiviert. Dazu wurden, nach Inkubation der Leukozyten aus dem Vollblut gesunder Spender mit magnetischen CMD-umhüllten Nanopartikeln für 8 Minuten und der sich anschließenden Zellseparation, die CD4-positiven T-Lymphozyten mittels der CD4 MultiSort MicroBeads nach dem unter 3.4.2. beschriebenen Verfahren aus der NF isoliert. Diese wurden anschließend, nach Zentrifugation zur Entfernung des PE-Puffers, in einer Konzentration von 1×10^6 T-Zellen/ml Medium (RPMI 1640 plus 10% FCS und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin) in 12-Well-Platten ausgesät, mit den Dynabeads[®] im Verhältnis von 3 Beads pro T-Zelle versetzt und im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Am zweiten Tag erfolgte die Zugabe des Wachstumsfaktors IL2 (siehe 3.6.). Im Verlauf wurde die Lymphozytenkultur im Abstand von etwa 48 h im Mikroskop beurteilt, deren Wachstumsverhalten und Morphologie fotografisch dokumentiert und bei Bedarf zwischen Tag 4 und 6 gesplittet. Des Weiteren erfolgte die Überprüfung der Zellvitalität bei Ansetzen der Kultur und im Verlauf mittels eines durchflusszytometrischen Apoptosetests. Da eine Weiterkultivierung von leukozytären Zellen aus der NF hier erstmalig versucht wurde, musste zunächst ein dafür geeignetes Verfahren gefunden und nach mehrmaligem Fehlschlagen der Anwendung weiter modifiziert und angepasst werden. Nachdem dies gelungen war, wurden zwei Kulturen, hier mit Kultur A und Kultur B bezeichnet, mit Leukozyten aus dem Vollblut zweier gesunder Spender unter annähernd gleichen Bedingungen für 10 bzw. 13 Tage analog dem unter 3.6. beschriebenen Vorgehen geführt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind. Die Tabellen **Tab. 7** und **Tab. 8** zeigen die mittels Zählung am Coulter[®] Z2 ermittelten Zellzahlen in der Lymphozytenkultur zu verschiedenen Zeitpunkten sowie deren prozentuale Zu- oder Abnahme im Vergleich zur vorangehenden Zählung. In **Abb. 33** sind die Resultate der an Tag 0 bei Ansetzen der Kultur, an Tag 4 (Kultur B) bzw. Tag 6 (Kultur A) und an Tag 9 durchgeführten Apoptosetests dargestellt. Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile der apoptotischen (a), der nekrotischen (b) und der lebenden Zellen (c) bezogen auf 10.000 im FACS analysierte Events im Vergleich zwischen Kultur A (orange) und Kultur B (grün).

Tab. 7 Kultur A: Zellzahl im Zeitverlauf

	Zellzahl	Zunahme [%]	Abnahme [%]	Bemerkungen
Tag 0	2896000			
Tag 6	3296000	14%		Splitten auf 500000 Zellen pro Well
Tag 9	529600	6%		

Tab. 8 Kultur B: Zellzahl im Zeitverlauf

	Zellzahl	Zunahme [%]	Abnahme [%]	Bemerkungen
Tag 0	2847000			
Tag 6	2664000		6%	Splitten auf 500000 Zellen pro Well
Tag 9	516800	3%		

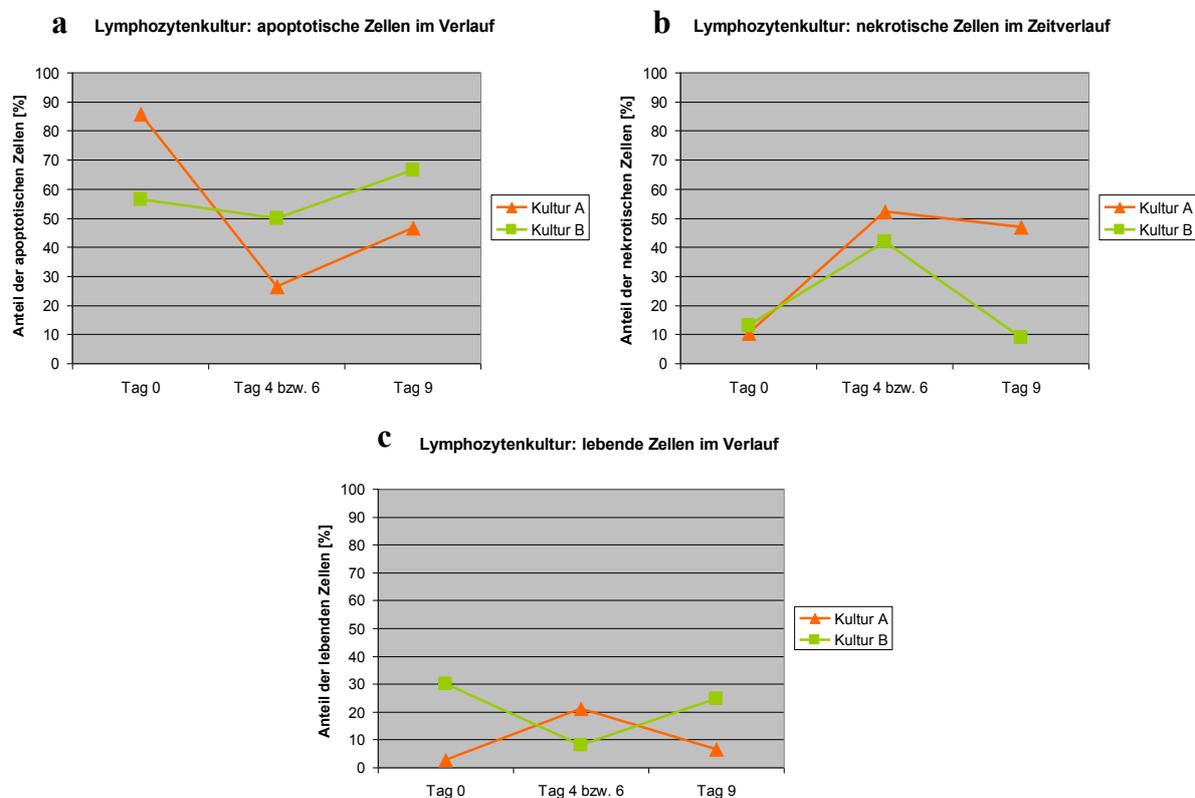


Abb. 33: Lymphozytenkultur - Ergebnisse der durchflusszytometrischen Apoptosetests. Die Diagramme zeigen die prozentualen Anteile an apoptotischen (a), nekrotischen (b) und lebenden Zellen (c) bezogen auf 10.000 im FACS analysierte Events im Zeitverlauf für Kultivierung A (orange) und B (grün) im Vergleich.

Die Abbildungen **Abb. 34** (Kultur A) und **Abb. 35** (Kultur B) zeigen die mikroskopischen Bilder (10x10- bzw. 40x10-fache Vergrößerung) der Lymphozytenkulturen im Zeitverlauf. Die Lymphozyten stellen sich hier in Form rundlicher Zellen und die Beads als im Vergleich dazu kleinere dunkel gefärbte Partikel von ebenfalls runder Form dar. Man erkennt Konglomerate aus Zellhaufen und den Dynabeads[®] als Orte der Lymphozytenaktivierung und -vermehrung.

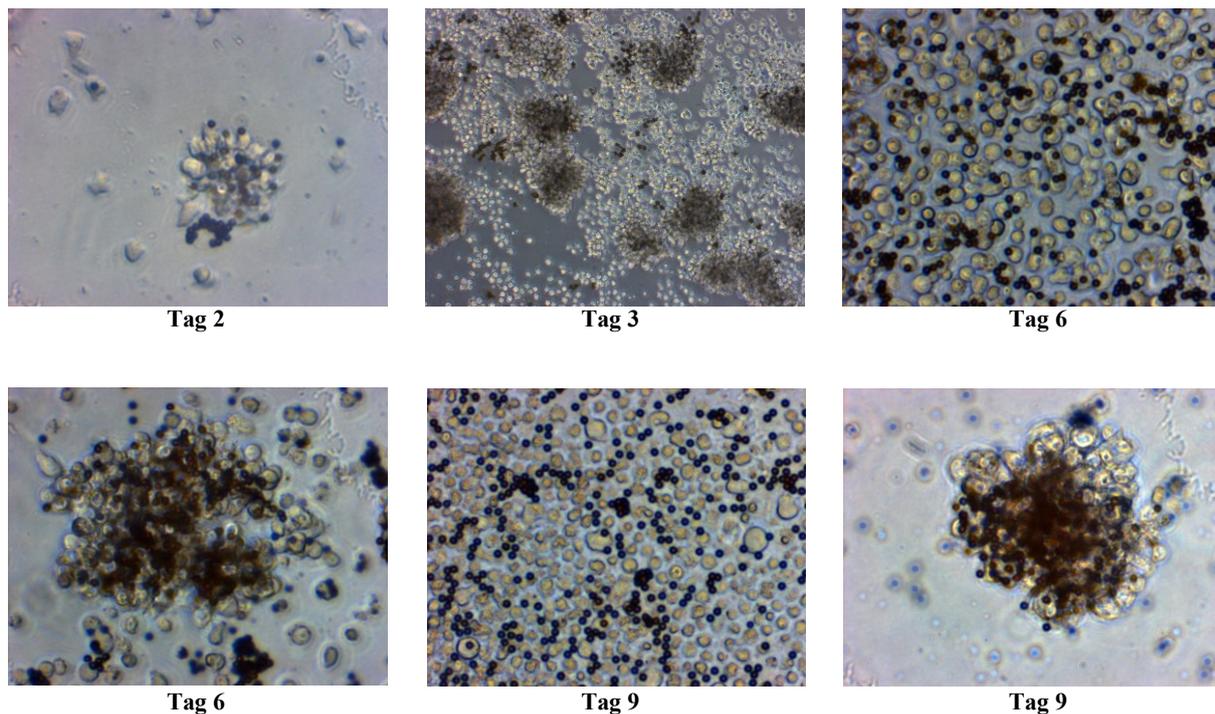


Abb. 34: Lymphozytenkultivierung (Kultur A) – Fotografische Verlaufsdocumentation. Die Abbildungen zeigen die mikroskopischen Bilder (10x10- bzw. 40x10-fache Vergrößerung) der unter Einsatz des Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expanders kultivierten T-Lymphozyten im Zeitverlauf. Man erkennt die Lymphozyten als rundliche zelluläre Elemente und die Beads in Form der kleineren dunkel gefärbten Partikel.

Beim Ansetzen der Kulturen am Tag 0 zeigt sich im durchflusszytometrischen Vitalitätstest der größte Anteil der lymphozytären Zellen sowohl in Kultur A mit 86% als auch in Kultur B mit 56% als, zumindest beginnend, apoptotisch. Weiterhin sind 10% bzw. 13% der Lymphozyten zu diesem Zeitpunkt nekrotisch. In Kultur A finden sich lebende Zellen nur zu 3%, während bei Kultur B noch etwa ein Drittel (30%) der eingesetzten Lymphozyten vital sind (s. **Abb. 33**). Am Tag 1 und 2 finden sich in Kultur B viele rundliche lymphozytäre Zellen von homogener Größe in hoher Dichte. Darin eingestreut sieht man die typischen Konglomerate aus T-Zellen und Beads als Orte der Zellaktivierung und –vermehrung (s. **Abb. 35**). In Kultur A findet sich am Tag 2 eine mäßige Zelldichte mit vielen Konglomeraten aus Lymphozyten und Beads (s. **Abb. 34**). Für beide Kulturansätze erfolgte am Tag 2 protokollgemäß die Zugabe des Wachstumsfaktors Interleukin 2. Am Tag 3 stellt sich Kultur A dann auch schon mit einer höheren Dichte an morphologisch homogenen lymphozytären Zellen dar. Auch die typischen Konglomerate sind weiterhin sichtbar. In Kultur B findet sich am Tag 4 eine sehr hohe Dichte der Kulturzellen. Im Bild mit 40x10-facher Vergrößerung zeigen sich erste Inhomogenitäten hinsichtlich der Zellgröße und –morphologie als Hinweis auf die Existenz von geschädigten Zellen und Zelltrümmern neben intakten T-Zellen.

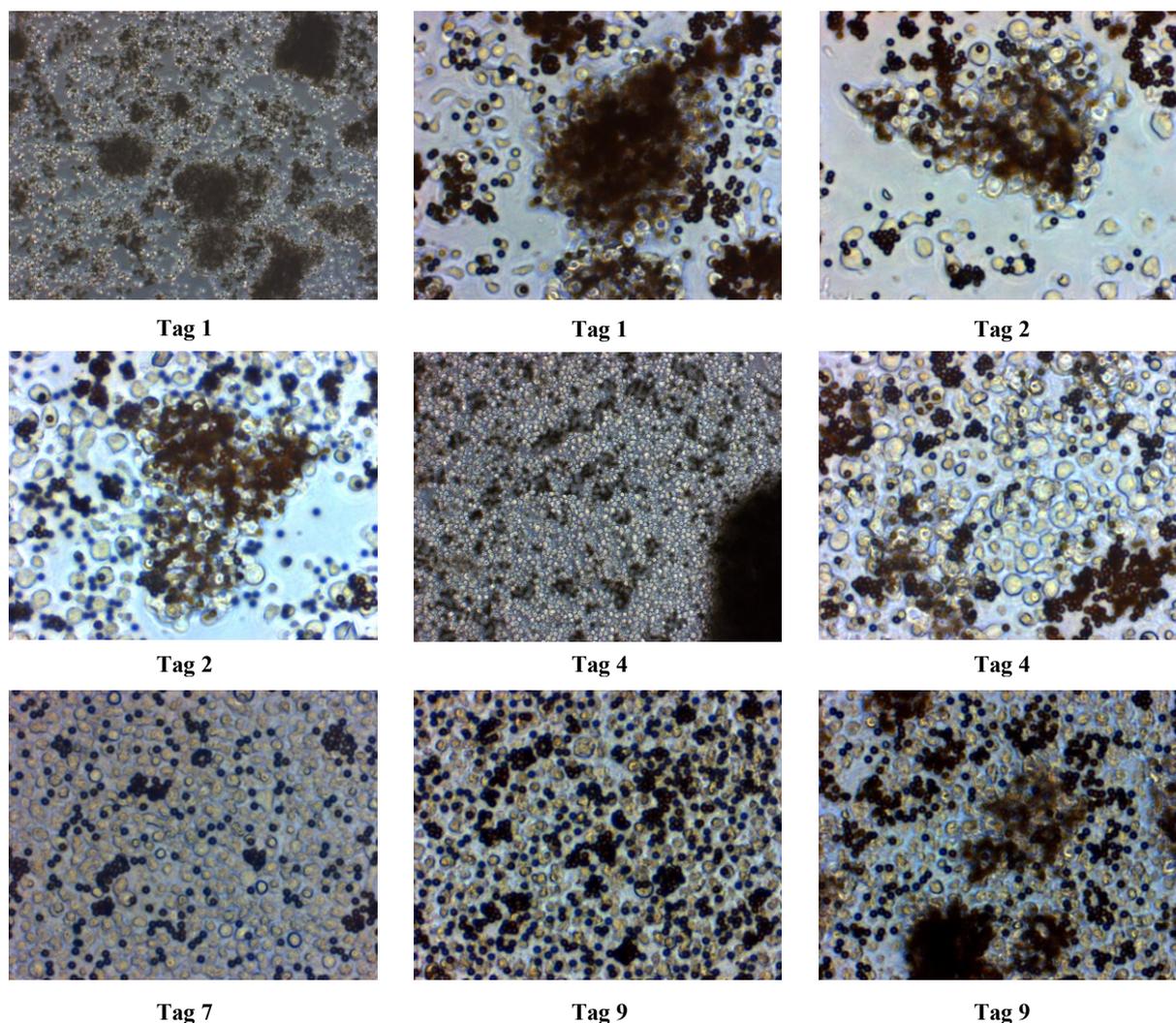


Abb. 35: Lymphozytenkultivierung (Kultur B) – Fotografische Verlaufsdokumentation. Die Abbildungen zeigen die mikroskopischen Bilder (10x10- bzw. 40x10-fache Vergrößerung) der unter Einsatz des Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expanders kultivierten T-Lymphozyten im Zeitverlauf. Man erkennt die Lymphozyten als rundliche zelluläre Elemente und die Beads in Form der kleineren dunkel gefärbten Partikel.

Nach Ermittlung der Zellzahl ergibt sich eine Abnahme derselben um 6% im Vergleich zum Ausgangswert. Da jedoch ein hoher Anteil der eingesetzten Lymphozyten bereits am Tag 0, bedingt durch die Aufarbeitung und die Separationsprozedur, nekrotisch oder apoptotisch war, ist dennoch von einer Vermehrung der vitalen T-Zellen auszugehen. Aufgrund der hohen Zelldichte wurde Kultur B bereits am Tag 4 nach erneuter Durchführung eines Apoptosetests gesplittet. Zu diesem Zeitpunkt stellen sich 50% der Kulturzellen als apoptotisch und 42% als nekrotisch dar. Lediglich 8% der Lymphozyten sind demnach noch vital. In der FACS-Analyse fällt des Weiteren auf, dass die Lymphozytenpopulation durch eine breitere Streuung im DotPlot nicht mehr so klar abgrenzbar ist, wie noch am Tag 0. Für Kultur A wurde der zeitlich vergleichbare Test erst am 6. Kulturtag durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich

die Zelldichte hier im Vergleich zum Tag 3 zwar leicht rückläufig, der größte Teil der Lymphozyten weist jedoch die für sie typische runde Morphologie mit homogener Größenverteilung auf. Daneben finden sich die Konglomerate aus Zellen und Beads und vereinzelt auch entrundete geschädigte T-Zellen und Zelltrümmer im mikroskopischen Bild (s. **Abb. 34**). Bei Ermittlung der Zellzahl ergibt sich ein Anstieg derselben um 14% im Vergleich zum Tag 0. In der FACS-Analyse stellen sich 26% der Kulturzellen als apoptotisch, 52% als nekrotisch und 21% als lebende Zellen dar. Auch hier zeigt sich die breitere Streuung der Lymphozytenpopulation. Am Tag 6 wurde nun auch Kultur A gesplittet. Drei Tage nach Durchführung des letzten Vitalitätstests zeigt sich in der lichtmikroskopischen Beurteilung für Kultur B ein Zellrasen mäßiger Dichte mit verstärkt inhomogener Größenverteilung und Morphologie der T-Zellen als Hinweis auf eine Zunahme des Anteils an geschädigten Zellen und Zelltrümmern (s. **Abb. 35**). Am Tag 9 finden sich in Kultur A ebenfalls vermehrt entrundete lymphozytäre Zellen und Zelltrümmer mit inhomogener Größenverteilung. Auffällig ist die im Vergleich dazu relativ intakte Morphologie der sich in den Konglomeraten aus Beads und Lymphozyten befindlichen T-Zellen. Die Zellzählung zeigt einen Anstieg der Zellzahl um etwa 6% im Vergleich zur Anzahl der beim Splitten der Kultur ausgesäten Lymphozyten. Der Apoptosetest am 9. Kulturtag ergibt erneut eine schlechtere Abgrenzbarkeit der Lymphozytenpopulation im DotPlot, bedingt durch deren breitere Streuung. Jeweils knapp 47% der Lymphozyten sind jetzt apoptotisch oder nekrotisch. Nur 7% der Kulturzellen sind noch vital. Für Kultur B zeigt sich am Tag 9 ein analoges Bild in der Lichtmikroskopie mit Anstieg des Anteils an entrundeten Zellen und Zelltrümmern neben der relativ intakten Morphologie der Lymphozyten innerhalb der Konglomerate. Die Zellzählung ergibt einen Anstieg der Zellzahl um 3% im Vergleich zu Tag 4. 66% der Lymphozyten in Kultur B sind zu diesem Zeitpunkt apoptotisch, 9% nekrotisch. Lebende Zellen finden sich noch zu etwa 25%. Bei Fortführung der Lymphozytenkulturen bis zum Tag 13 (Kultur A) bzw. Tag 10 (Kultur B) zeigen sich im lichtmikroskopischen Bild zunehmend rasch eine Abnahme der Zelldichte und ein Anstieg des Anteils an entrundeten Zellen und Zelltrümmern. Des Weiteren stellen sich die Beads vermehrt als freie nicht mehr an Zellen gebundene Partikel dar. Vereinzelt finden sich jedoch auch zu diesem Zeitpunkt noch die typischen Konglomerate aus T-Zellen und Beads als Orte der T-Zellstimulation und –vermehrung. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es möglich war, die nach der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und der Zellseparation mittels MACS aus der NF isolierten T-Lymphozyten mit Hilfe des Dynabeads[®] CD3/CD28 T Cell Expanders über einen Zeitraum von circa 10 Tagen in Kultur zu halten. Der jeweils relativ hohe Anteil apoptotischer und

nekrotischer Lymphozyten in der FACS-Analyse wird unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren leicht erklärlich: Die Aufarbeitung der Zellen und die Separationsprozedur bedeuten erheblichen Stress für die empfindliche Population der Leukozyten, sodass sehr viele Zellen während dieses Prozesses angegriffen oder geschädigt werden. Eventuell ist ein Teil dieser Zellen unter Kulturbedingungen in der Lage, sich zu erholen. Der Großteil dürfte jedoch dem Zelltod via Apoptose oder Nekrose anheimfallen. Des Weiteren besteht die T-Zell-Population aus verschiedenen Subklassen, deren physiologische Lebenszeiten sich teilweise deutlich voneinander unterscheiden. Deshalb kann man davon ausgehen, dass sich ein Teil der Zellen zum Entnahmezeitpunkt bereits am Ende seiner natürlichen Lebensdauer befindet und somit in der Kultur untergeht. Der noch verbleibende Anteil an lebenden T-Lymphozyten dürfte sich über die Zeit unter den gegebenen Kulturbedingungen vermehrt haben, da am Tag 9 sowohl im lichtmikroskopischen Bild als auch in der FACS-Analyse noch zwischen 7% und 25% der untersuchten Lymphozyten vital waren. Beim Vergleich der Ergebnisse aus Kultur A und Kultur B zeigen sich zum Teil deutliche Unterschiede, die Anteile der apoptotischen, nekrotischen und lebenden Zellen in der FACS-Analyse betreffend (s. **Abb. 33**), deren Ursachen zu diskutieren sein werden.

5. Diskussion

Der größte Teil der an einem Malignom erkrankten Patienten verstirbt nicht am Primärtumor, sondern an dessen Tochtergeschwülsten (Gupta und Massagué 2006, Fidler et al. 2007). Die im peripheren Blut zirkulierenden disseminierten Tumorzellen stehen im Verdacht, eine der Hauptursachen für die Ausbildung dieser Metastasen zu sein (Vlems et al. 2003, Gupta und Massagué 2006). Ausgehend von der Prämisse, dass eine Reduktion der Tumorzelllast im peripheren Blut mit einer Abnahme des Metastasenrisikos verbunden ist (Diel et al. 1996, Braun und Pantel 2000, Cristofanilli et al. 2004), erscheint es erstrebenswert, Verfahren zur Detektion und Depletion von zirkulierenden Tumorzellen zu entwickeln. Die magnetbasierte Zellseparation stellt eine vielversprechende Methode für dieses Vorhaben dar (Wong et al. 1995, Martin et al. 1998). In unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass magnetische Nanopartikel mit einer Hülle aus CMD dazu geeignet sind, die malignen Zellen aus einem Tumorzell-Leukozyten-Gemisch zu entfernen (Schwalbe et al. 2005, Clement et al. 2006). Nach Inkubation mit den Nanoteilchen werden die Zellen dazu mittels MACS separiert. Ziel ist es dabei, einen möglichst großen Anteil der Tumorzellen in der PF anzureichern und gleichzeitig möglichst viele Leukozyten in der NF zurückzuhalten. Da aber bekannt ist, dass die weißen Blutzellen ebenfalls mit den CMD-umhüllten Nanopartikeln

interagieren und somit immer ein Teil dieser Zellen in die PF übergeht, war es Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die von Tumorzellen „gereinigten“ Leukozyten der NF, die abgereicherten Leukozyten der PF und den Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln sowie der anschließenden Separationsprozedur auf die weißen Blutzellen und ihre Verteilung näher zu charakterisieren.

Das Magnetic Activated Cell Sorting (=MACS), welches Ende der 1980er Jahre als schnelles, einfaches und flexibel einsetzbares Verfahren zur effizienten Separation verschiedener Zellpopulationen von Miltenyi et al. entwickelt wurde (Miltenyi et al. 1990), hat sich als Methode zur Detektion, Isolation und Anreicherung von im peripheren Blut zirkulierenden epithelialen Zellen malignen Ursprungs bewährt (Wong et al. 1995, Martin et al. 1998, Bilkenroth et al. 2001, Siewert et al. 2001). Zunächst erfolgte die spezifische Markierung der Tumorzellen über an die magnetischen Beads gekoppelte gegen Oberflächenmoleküle epithelialer Zellen gerichtete Antikörper. Neuere Studien zeigten, dass eine differenzierte Markierung unterschiedlicher Zellpopulationen mittels magnetischer Nanopartikel mit entsprechend modifizierten Hüllstrukturen aus Polysacchariden auch ohne den Einsatz von Antikörpern möglich ist (Wagner et al. 2004, Schwalbe et al. 2005, Schwalbe et al. 2006b). Diese Partikel interagieren zwar sowohl mit Tumorzellen als auch mit intakten weißen Blutzellen, jedoch sind Ausmaß und Geschwindigkeit der Partikelaufnahme durch die malignen Zellen höher. Des Weiteren gelingt es mittels Modifikation verschiedener Inkubationsbedingungen (z.B. Temperatur, Art des Puffers, pH-Wert, Osmolalität, Zugabe von humanem Plasma), den Abstand zwischen der erwünschten Markierung zirkulierender Tumorzellen und der Beladung der Leukozyten mit den magnetischen Nanopartikeln zu vergrößern (Schwalbe et al. 2005, Schwalbe et al. 2006b, Clement et al. 2006). Um die Aufreinigung großer Mengen peripheren Blutes und die vollständige Depletion der darin enthaltenen Tumorzellen zu realisieren, gilt es, neben der möglichst gering zu haltenden Abreicherung von Leukozyten noch weitere Hürden zu überwinden. So ist das Verfahren der MACS-Separation in seiner hier verwendeten Konfiguration noch nicht für den Durchsatz entsprechend großer Zellmengen geeignet. Mit anderen magnetbasierten Zellseparationsystemen, wie z.B. dem zur Gewinnung von Stammzellen eingesetzten CliniMACS[®] von Miltenyi Biotech, ist dies jedoch durchaus realisierbar. Weiterhin stellen die teilweise hohen Verlustraten ein noch ungelöstes Problem der magnetbasierten Zellseparation dar. Im Rahmen der Versuche für die vorliegende Arbeit betrug diese im Mittel 21% (Patienten) bzw. 28% (gesunde Probanden) nach 4 Minuten und stieg nach 30-minütiger Inkubationszeit auf einen Mittelwert von 47% (Patienten) bzw. 49% (gesunde Probanden). Damit sind die

separationsbedingten Verluste an Leukozyten als mäßig (Verluste bis 30%) bis mittel (Verlustrate zwischen 30% und 60%) einzustufen. Verlustraten bis 20% sind dabei auf die zur Separation eingesetzten Säulen zurückzuführen (Bornmann 2008). Größere Konglomerate aus Leukozyten oder aus Zellen und Nanopartikeln können die Säule nicht passieren und bleiben in den Zwischenräumen des dicht gepackten Säulenmaterials liegen. Weiterhin dürfte die unspezifische Adhäsion von Zellen an den Säulenwänden eine Rolle spielen (Molday und Mackenzie 1982). Darüber hinausgehende Verluste sind durch die hohe Empfindlichkeit der eingesetzten Leukozyten bedingt, für welche die Präparation der Zellen, die Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und die Separationsprozedur einen nicht unerheblichen Stressfaktor bedeuten (Bornmann 2008). Ein kleiner Teil der Verluste dürfte verschiedenen Arbeitsschritten, wie z.B. dem Pipettieren der Leukozyten-Partikel-Suspension, anzulasten sein. Ein sorgfältiges Vorgehen des Experimentators sollte diesen Einflussfaktor jedoch minimieren. Erwartungen, die Verlustraten und den auf die zu separierenden Zellen wirkenden Stress durch Verwendung von Beuteln statt Säulen zu verringern, wurden bisher nicht erfüllt (Bornmann 2008). Auch bei diesem Verfahren kam es zu hohen Zellverlusten durch Agglomeration und Anhaften der Leukozyten an der Beutelinenseite. Trotz aller noch zu lösenden Probleme stellt die magnetische Zellseparation nach derzeitigem Kenntnisstand der Wissenschaft eines der aussichtsreichsten Verfahren zur Abtrennung von Tumorzellen aus einem Zellgemisch, wie dem peripheren Blut, dar. Eine Abreicherung epithelialer Zellen malignen Ursprungs aus einem Tumorzell-Leukozyten-Gemisch zu diagnostischen Zwecken gelingt unter Einsatz von an magnetische Beads gekoppelten Antikörpern (Pachmann et al. 2005, Mostert et al. 2009) sowie unter Verwendung der mit CMD umhüllten Nanopartikel (Clement et al. 2006, Kühn 2010, Wotschadlo et al. 2010). Sowohl bei der Aufarbeitung kleiner Blutvolumina im Bereich der Diagnostik, vor allem aber für die Depletion zirkulierender Tumorzellen aus größeren Mengen peripheren Blutes, wie sie bei einer Apherese (siehe 1.4.1.) oder auch zur Gewinnung von autologen Stammzellen für eine Stammzelltransplantation erforderlich wäre, ist eine möglichst große Distanz zwischen den markierten und damit abgereicherten Tumorzellen und den nicht markierten Leukozyten wünschenswert. Da sich die Aufnahmekinetiken dieser beiden Zelltypen deutlich voneinander unterscheiden (Anzai et al. 1994, Clement et al. 2006, Wotschadlo et al. 2009), liegt die Suche eines optimalen Inkubationszeitpunktes nahe, welcher das Kriterium einer möglichst vollständigen Markierung und Abreicherung maligner Zellen bei einer gleichzeitig möglichst geringen Abreicherung von Leukozyten und einer möglichst niedrigen Verlustrate erfüllt. Alle bisher durchgeführten Versuchsreihen zeigen, dass eine Inkubationszeit zwischen 4 und 8

Minuten als diesbezüglich ideal anzusehen ist (Clement et al. 2006, Schwalbe et al. 2006b, Bornmann 2008, Kühn 2010). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen dies. So zeigt sich beispielsweise eine deutlichere Zunahme der Leukozytenzahl in der PF beim Vergleich der Inkubationszeitpunkte 8 und 12 Minuten sowie 12 und 16 Minuten, als zwischen der 4- und 8-minütigen Inkubation (s. 4.1.1.).

Um nun den Einfluss der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und der sich anschließenden Zellseparation auf die Leukozyten und deren Subpopulationen zu studieren, wurden zunächst Experimente mit weißen Blutzellen gesunder Spender durchgeführt, welche unmittelbar zuvor aus frischem oder über einen Zeitraum von maximal 36 h gelagertem mit NH_4 -Heparin antikoaguliertem Vollblut isoliert worden waren. Eine längere Aufbewahrung der Blutproben ist nicht möglich, da die empfindlichen Leukozyten während der Lagerung Schaden nehmen und somit eine Verzerrung der Ergebnisse nicht auszuschließen ist. Des Weiteren wird die Blutprobe bei längerer Lagerung für eine Durchführung der Experimente aufgrund einer zu geringen Anzahl an intakten Leukozyten häufig unbrauchbar. Die Versuchsergebnisse zeigen eine langsame und kontinuierliche Aufnahme der magnetischen mit CMD umhüllten Nanopartikel durch die Leukozyten, welche bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten noch keinen sättigungsbedingten Plateauzustand erreicht, sodass davon auszugehen ist, dass bei längerer Inkubation weitere Zellen von der NF in die PF übergehen. Bis zu einer Inkubationszeit von 8 Minuten findet sich nur ein moderater Anstieg der Zellzahl in der PF im Vergleich zum vorangehenden Separationszeitpunkt. Zwischen 8 und 12 Minuten, wie auch zwischen 12 und 16 Minuten tritt dieser wesentlich stärker hervor, um danach wieder abzufallen, was auf das allmähliche Erreichen eines Plateauzustandes, die Partikelaufnahme betreffend, hindeutet. Nach 16-minütiger Inkubation übersteigt der Anteil der markierten Leukozyten in der PF den der unmarkierten Zellen in der NF, sodass für die effektive Abreicherung maligner Zellen aus einem Gemisch von Tumorzellen und Leukozyten kürzere Inkubationszeiten gewählt werden sollten, um einen möglichst großen Anteil weißer Blutzellen in der NF zurückzuhalten.

Zur näheren Charakterisierung des Verhaltens der Leukozytensubpopulationen erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der bei der Magnetseparation erhaltenen Fraktionen. Hier zeigte sich, dass alle drei Klassen der weißen Zellen mit den Nanopartikeln interagieren und somit im Zeitverlauf vermehrt in die PF übergehen. Dabei bestehen jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit der Partikelaufnahme zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Die Monozyten interagieren gemäß ihrer Funktion als klassische Phagozyten sehr rasch mit den Partikeln und sind deshalb im

Vergleich zur natürlichen Verteilung der Leukozytensubpopulationen mit einem Anteil von 2% in der NF schon nach 4-minütiger Inkubationszeit unterrepräsentiert. Im weiteren Zeitverlauf bleibt ihr Anteil an der NF relativ konstant, während ihr Anteil in der PF abnimmt. Zum einen dürfte dies der kurzen Lebensspanne aktivierter Monozyten geschuldet sein; die Zellen werden durch die endozytotische Inkorporation der Nanopartikel aktiviert, so wie dies physiologisch auch bei der Phagozytose von Krankheitserregern und Antigenstrukturen der Fall ist (Hof und Dörries 2005). Zum anderen dürfte die verzeichnete Abnahme des Anteils der Monozyten in der PF zumindest teilweise relativer Natur, d.h. durch die Methodik der FACS-Analyse bedingt, sein. Da eine Untersuchung großer Zellzahlen mittels Durchflusszytometer enormen zeitlichen und materiellen Aufwand erfordert (Miltenyi et al. 1990), ist es in der Praxis der FACS-Analyse üblich, die Zahl der pro Probe analysierten Events zu begrenzen (Jaroszeski und Radcliff 1999). So wurden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit jeweils nur 10.000 leukozytäre Events einer Probe im FACS gemessen. Dieses Vorgehen kann insbesondere bei der Untersuchung unterschiedlich großer Zellpopulationen, wie es bei den Leukozytensubklassen der Fall ist, zu Überlagerungen führen. Da die Monozyten als die kleinste Population unter den weißen Zellen größtenteils schon nach 4-minütiger Inkubation mit Partikeln beladen und damit in der PF zu finden sind und folglich im weiteren Verlauf der Inkubation nur noch wenige Zellen von der NF in die PF übergehen, wird ihre zahlenmäßige Konstanz in der PF durch die starke Zunahme der Granulozyten, welche die größte der Leukozytensubpopulationen stellen, verdeckt, was sich in den graphischen Darstellungen als scheinbarer Rückgang der Population der Monozyten widerspiegelt. Die Granulozyten, zu deren physiologischen Funktionen ebenfalls die endozytotische Aufnahme von Krankheitserregern und Antigenstrukturen zählt, interagieren langsam und kontinuierlich mit den Nanoteilchen. Ihr Anteil in der NF bleibt bis zu einer Inkubationszeit von 16 Minuten relativ konstant, erst danach zeigt sich eine deutliche Abnahme der Granulozytenzahl, was auf die zahlenmäßige Größe dieser Population zurückzuführen sein dürfte. Die Lymphozyten zeigen eine im Vergleich zu Mono- und Granulozyten geringere und langsamere Aufnahme der magnetischen Partikel. Des Weiteren stagniert ihr Anteil in der PF bereits nach 12 Minuten, während ihr Anteil in der NF zu späteren Zeitpunkten einen relativen Anstieg aufweist. Nach 30-minütiger Inkubation stellen die Lymphozyten damit den größten Anteil der Zellen der NF. Das vergleichsweise geringe Interaktionspotential zwischen Lymphozyten und magnetischen Nanopartikeln ist im Rahmen der Tumorzelldepletion als vorteilhaft zu werten, da die in hohem Maße in der NF verbleibenden Lymphozyten dem Patienten als wichtige Komponenten der Tumor- und

Infektabwehr erhalten bleiben würden. Gleichzeitig bestätigen diese Ergebnisse die Notwendigkeit der Verwendung von Antikörpern oder komplexen Liganden in Verbindung mit magnetischen Partikeln für das Erreichen einer effektiven magnetischen Markierung von Lymphozyten (Moore et al. 2004, Chalmers et al. 2010). Die Analyse der Lymphozyten-subklassen in den bei der Magnetseparation gewonnenen Fraktionen offenbart überraschende Unterschiede zwischen den T- und B-Zellen, die Partikelaufnahme betreffend. Die T-Zellen, welche aufgrund der natürlichen Größe ihrer Population zu jedem Zeitpunkt der Inkubation den weitaus größeren Anteil der Lymphozyten in beiden Fraktionen stellen, zeigen die zuvor beschriebene langsame, kontinuierliche und vergleichsweise geringe Partikelaufnahme. Im Gegensatz dazu sind die B-Lymphozyten mit einem Anteil von 2% in der NF bereits nach 4 Minuten unterrepräsentiert im Vergleich zur natürlichen Verteilung, während ihr Anteil von 26% in der PF nach 4 Minuten deutlich über den physiologischen Werten liegt, was mit einer schnellen und hochgradigen Partikelaufnahme durch die B-Zellen gleichzusetzen ist. Somit wäre bei einer potentiellen Anwendung des Verfahrens am Patienten ein relevanter Verlust an B-Lymphozyten selbst bei kurzer Inkubation der Leukozyten mit CMD-umhüllten Nanopartikeln nicht zu verhindern. Ursachen für diesen Unterschied zwischen den Lymphozytensubklassen sind noch zu klären. Ein Zusammenhang mit der Funktion der B-Zellen als APC (s. 1.5.3.2.) könnte bestehen, da sowohl eine Internalisierung antigener Strukturen als auch die Aufnahme der magnetischen Nanopartikel an endozytotische Vorgänge gekoppelt sind (Gupta und Gupta 2004, Wagner et al. 2004, Hof und Dörries 2005). Betrachtet man die prozentuale Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen in den Fraktionen und vergleicht diese mit ihrer natürlichen Verteilung im peripheren Blut, so wird deutlich, dass die Inkubation der Leukozyten mit magnetischen Nanopartikeln und die anschließende Separation mittels MACS bis zu einer Inkubationszeit von 16 Minuten kaum zu Veränderungen der Verteilung der Populationen in der NF führt. Lediglich die Monozyten und die B-Zellen sind bereits nach 4 Minuten unterrepräsentiert. Diesbezüglich wäre eine weitere Optimierung der Partikel, insbesondere hinsichtlich eines Erhaltes der B-Lymphozyten, erstrebenswert. Insgesamt sind diese Resultate für eine Weiterentwicklung des Verfahrens der magnetischen Tumorzelldepletion jedoch als positiv zu werten, da die Möglichkeit einer Retransfusion aufgearbeiteter Blutmengen ohne schwerwiegende Beeinflussung des Immunstatus somit prinzipiell gegeben wäre. Die Zusammensetzung der PF unterscheidet sich indessen deutlich von der natürlichen Verteilung der Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut. Da jene Fraktion jedoch auch die abgereicherten

Tumorzellen enthalten und somit ohnehin verworfen würde, ist diese Tatsache für die Praxis irrelevant.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Art und die Struktur der Polysaccharidhülle das Interaktionspotential zwischen magnetischen Nanopartikeln und Tumorzellen bzw. Leukozyten beeinflusst (Schwalbe et al. 2006b, Wotschadlo et al. 2009, Kühn 2010). Daraus leitet sich die Suche nach dem bestgeeigneten Hüllstoff ab, mit dem Ziel, dass die mit dieser Substanz ummantelten Nanopartikel möglichst gut von Tumorzellen aufgenommen werden, während gleichzeitig eine möglichst geringe Markierung der weißen Blutzellen mit diesen Nanoteilchen erfolgt und möglichst geringe Verlusten im Zuge der Magnetseparation auftreten. Die bisher diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bewerteten vorrangig den Einfluss der verschiedenen Polysaccharidhüllen auf die unterschiedlichen Markierungsraten für zirkulierende Tumorzellen und Leukozyten. In der vorliegenden Arbeit sollte nun geprüft werden, ob verschiedene Hüllstrukturen auch innerhalb der Leukozytenpopulation zu Unterschieden bezüglich der Beladung der Zellen mit den Partikeln führen oder die Verteilung der Leukozytenpopulationen nach der magnetischen Zellseparation beeinflussen. Dazu wurden in einem weiteren Versuchsteil aus dem Vollblut gesunder Spender isolierte Leukozyten mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln inkubiert. Es kamen, neben dem standardmäßig angewendeten CMD, CMC und CMCu als Hüllsubstanzen zum Einsatz. Die Versuchsergebnisse für CMD- und CMC-Partikel weisen dabei große Ähnlichkeiten auf. Beide Nanopartikel werden von den drei Subklassen der weißen Zellen kontinuierlich aufgenommen. Für CMC-umhüllte Partikel zeigt sich jedoch eine höhere Aufnahmegeschwindigkeit. Überraschender Weise erzielten Wotschadlo et al. unter Verwendung CMC-umhüllter Nanopartikel deutlich geringere Beladungsraten, die Leukozyten betreffend, als unter Einsatz der CMD-Partikel und führten dies auf die Cellulosestruktur und deren Aufbau aus β -(1,4)-glycosidisch verknüpften D-Glucose-Molekülen zurück (Wotschadlo et al. 2009). Julia Kühn konnte dagegen im Rahmen ihrer Promotionsarbeit ebenfalls eine mit der von CMD-Partikeln vergleichbare Aufnahme rate für CMC-Partikel in Tumorzellen und Leukozyten nachweisen (Kühn 2010). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten zum einen durch die Verwendung verschiedener Partikelchargen bedingt sein, wobei die Art der zur Umhüllung verwendeten Cellulosemoleküle und das Alter der Nanopartikel eine Rolle spielen dürften. Die zur Separation verwendeten Leukozyten selbst könnten eine weitere Ursache darstellen. Zum Teil bestehen relativ große interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden und Patienten, was Ausmaß und Geschwindigkeit der Partikel Aufnahme durch die Leukozyten

angeht, welche bei einer vergleichsweise kleinen Anzahl an Experimenten wie in der vorliegenden Arbeit (n=7) verstärkt ins Gewicht fallen dürften. Die unter Einsatz der CMCu-umhüllten Nanopartikel erzielten Separationsergebnisse unterscheiden sich wesentlich von den anderen beiden Partikelarten. Derartig ummantelte Nanoteilchen wurden von den Leukozyten nur sehr langsam und in vergleichsweise sehr geringem Ausmaß aufgenommen, sodass die Anteile der Leukozytensubpopulationen in der PF zu jedem Zeitpunkt deutlich unterhalb der Werte für CMD- und CMC-Partikel lagen. Auch Wotschadlo et al. erzielten mit CMCu als Hüllstoff für die magnetischen Nanopartikel nur eine geringe Beladung von Leukozyten und Tumorzellen (Wotschadlo et al. 2008). Das geringe Interaktionspotential zwischen derartig umhüllten Nanopartikeln und humanen Zellen dürfte durch die komplexe Polymerstruktur des Curdlans sowie dessen Aufbau aus β -(1,3)-glycosidisch verknüpften D-Glucoseeinheiten bedingt sein. Auch die Oberflächenladung und der hydrodynamische Partikeldurchmesser könnten eine Rolle spielen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Einsatz verschiedener Polysaccharide als Hüllstruktur für magnetische Nanopartikel Unterschiede bezüglich der Beladungsraten von Leukozyten mit den jeweiligen Partikeln bedingt. Die vergleichsweise hohen oder niedrigen Aufnahmeraten finden sich dann jedoch für alle Leukozytensubpopulationen bei Inkubation mit dem jeweiligen Partikel wieder. Die Verteilung der Subklassen der weißen Zellen in der NF zeigt sich bei kurzen Inkubationszeiten im Vergleich zur physiologischen Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen weder bei Einsatz der CMD- und CMC-Partikel noch bei Verwendung der mit CMCu umhüllten Nanoteilchen wesentlich verändert. Allerdings sind die Monozyten und B-Zellen in der NF bei Inkubation mit CMD- oder CMC-Partikeln bereits nach 4 Minuten unterrepräsentiert, bedingt durch das größere Interaktionspotential zwischen Leukozyten und diesen beiden Partikelarten. Dagegen entspricht der Anteil der Monozyten in der NF bei Inkubation der Zellen mit CMCu-Partikeln zu jedem Zeitpunkt den physiologischen Werten, während die B-Zellen ebenfalls, aber in geringerem Ausmaß, unterrepräsentiert sind. Damit wäre CMCu aufgrund der geringen Beladungsraten für Leukozyten und dem daraus resultierenden Verbleiben derselben in der NF als Hüllstoff für die magnetischen Nanopartikel unter den hier getesteten Polysacchariden am besten geeignet. Da derart umhüllte Nanoteilchen jedoch auch von Tumorzellen schlecht aufgenommen werden (Wotschadlo et al. 2008), sind sie für eine effiziente Abreicherung maligner Zellen aus einem Tumorzell-Leukozyten-Gemisch ungeeignet. Somit bestätigt auch die vorliegende Arbeit CMD als den bestgeeigneten Hüllstoff für zur Tumorzelldepletion eingesetzte Magnetpartikel.

In einem weiteren Versuchsteil sollten nun die bei Inkubation und Separation von Leukozyten gesunder Spender erzielten Ergebnisse an von Malignompatienten stammenden Leukozyten überprüft werden. Viele Studien bestätigten die Möglichkeit der Abreicherung zirkulierender Tumorzellen mittels magnetischer Zellseparation bisher nur unter Verwendung von Tumorzell-Leukozyten-Gemischen, welche zuvor *in vitro* aus Karzinomzelllinien und Leukozyten gesunder Probanden hergestellt worden waren (Schwalbe et al. 2005, Clement et al. 2006). Julia Kühn konnte im Rahmen ihrer Promotionsarbeit jedoch zeigen, dass das Prinzip der magnetischen Depletion maligner Zellen auch auf ein aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten isoliertes Tumorzell-Leukozyten-Gemisch übertragen werden kann (Kühn 2010). In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl die Tumorerkrankung selbst als auch die verschiedenen Therapien einen erheblichen Einfluss auf das humane Immunsystem und dessen Aktivitätsstatus haben (Solomayer et al. 2003, de Visser et al. 2006, Whiteside 2010), ist eine Beeinflussung der Leukozyten hinsichtlich der Interaktion mit den magnetischen Nanopartikeln nicht per se auszuschließen. Um zu überprüfen, ob diesbezüglich Unterschiede im Verteilungsmuster der Leukozyten- bzw. Lymphozytensubpopulationen oder anderweitige patientenspezifische Besonderheiten bestehen, wurden Inkubationsversuche mit CMD-umhüllten Nanopartikeln an Leukozyten aus mit EDTA antikoaguliertem Vollblut von Mammakarzinompatientinnen unter Herceptintherapie vorgenommen. In allen dabei verwendeten Blutproben waren mittels Laser Scanning Zytometrie (LSC) (Pachmann et al. 2001) disseminierte Tumorzellen nachweisbar. Beim Vergleich der Ergebnisse der MACS-Separation zeigen sich, den Verlauf von NF, PF und Verlustrate betreffend, keinerlei Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden. Die FACS-Analyse der Leukozytensubpopulationen weist ebenfalls große Ähnlichkeiten zwischen den beiden Gruppen auf. Alle drei Subklassen der weißen Zellen interagieren, unabhängig von ihrer Herkunft aus Patientenblut oder Blut gesunder Probanden, mit den CMD-umhüllten Nanopartikeln. Jedoch findet sich für die aus Patientenproben isolierten Granulozyten und Lymphozyten eine höhere Geschwindigkeit der Partikelaufnahme, während die Monozyten der Tumorpatienten eher eine im Vergleich zu gesunden Probanden verringerte Aufnahmegeschwindigkeit zeigen. Die Verteilung der Leukozytensubpopulationen in der NF bleibt, verglichen mit der natürlichen Zusammensetzung der weißen Zellen im peripheren Blut, bis zu einer Inkubationszeit von 12 Minuten in beiden Gruppen im Wesentlichen unverändert. Der zahlenmäßig größte Unterschied zwischen Tumorpatienten und gesunden Probanden betrifft den Anteil des Zelldebris in der PF, welcher bei gesunden Probanden signifikant höher liegt. Die Ursachen hierfür blieben offen, könnten aber mit einer Varianz der

Säulenqualität unterschiedlicher Chargen in Zusammenhang stehen, da die Versuchsreihen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Die Analyse der T- und B-Zellen in NF und PF zeigt für Patienten und gesunde Probanden ein ähnliches Muster der Kinetik. In beiden Gruppen nehmen die T-Lymphozyten die Partikel langsam und kontinuierlich auf, während die B-Zellen sehr rasch mit den Nanoteilchen interagieren. Betrachtet man die absoluten Zellzahlen, so fällt auf, dass in beiden Fraktionen die Werte für die Patientenproben deutlich unterhalb derer für die gesunden Probanden liegen. Das lässt darauf schließen, dass insgesamt weniger Lymphozyten im peripheren Blut der Tumorpatienten vorhanden waren oder dass diese durch Inkubation und Separation stärker beeinträchtigt wurden als dies bei den Lymphozyten aus dem Blut gesunder Probanden der Fall war. Weiterhin weist die PF bezüglich der darin enthaltenen Anteile an T- und B-Zellen deutliche Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten auf. Der Anteil der T-Lymphozyten in der PF bei gesunden Probanden übersteigt deutlich die unter Verwendung von Patientenblut gewonnenen Werte. Überraschender Weise zeigt sich für die B-Lymphozyten ein umgekehrtes Bild. Ihr Anteil in der PF ist bei Patienten wesentlich höher als bei Gesunden. Die gefundenen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen dürften im Wesentlichen krankheits- bzw. therapieassoziiert sein. Das Immunsystem und damit die Leukozyten werden durch die Tumorerkrankung sowie deren Therapie angegriffen und hinsichtlich ihres Aktivitätsstatus und in ihren Reaktionsmustern verändert (Murta et al. 2000, Dunn et al. 2004, Wijayahadi et al. 2007). So könnte z.B. die höhere Interaktionsgeschwindigkeit zwischen den magnetischen Nanopartikeln und den Granulozyten aus Patientenblut durch eine krankheits- oder therapiebedingt vermehrte Phagozytoseaktivität dieser Population hervorgerufen sein. Für die weitere Forschung im Bereich der magnetischen Tumorzellepletion wäre eine geringe Abweichung der unter Verwendung von Patientenblut gewonnenen Ergebnisse von denen der gesunden Probanden wünschenswert, da somit unerheblich wäre, welche Blutproben für weiterführende Experimente verwendet werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass große Ähnlichkeiten hinsichtlich der Aufnahme magnetischer Nanopartikel durch Leukozyten zwischen beiden Gruppen bestehen. Ausschließlich unter Verwendung peripheren Blutes gesunder Probanden gewonnene Daten sollten jedoch möglichst anhand von Patientenstichproben verifiziert werden.

Eine Anwendung der magnetischen Tumorzellepletion *in vivo* müsste die zelluläre Integrität der Leukozyten in der NF und deren biologische Aktivität nach der Separation gewährleisten. Diesbezüglich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals versucht die in der NF enthaltenen T-Lymphozyten nach der Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und der

sich anschließenden Zellseparation weiterzukultivieren und eine praktikable Methode dafür zu etablieren. Die beiden unter Verwendung des Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expanders geführten Kulturen mit aus dem Blut gesunder Probanden isolierten T-Zellen zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, die Lymphozyten aus der NF nach der Separation über mehrere Tage in Kultur zu halten, was deren Vitalität und Funktionstüchtigkeit voraussetzt. Sowohl die Aufarbeitung der Zellen als auch die Inkubation mit magnetischen Nanopartikeln und vor allem die Separationsprozedur selbst bedeuten erheblichen Stress für die empfindliche Zellpopulation der Leukozyten, sodass die in den Vitalitätstests ermittelten hohen Anteile an apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht überraschen. Eine verminderte Zellvitalität zu Beginn einer T-Zell-Kultivierung mittels Dynabeads®, bedingt durch das Absterben geschädigter oder nicht-lymphozytärer Zellen, ist in der Literatur bereits vorbeschrieben (Trickett und Kwan 2002). Da jedoch auch nach 10-tägiger Kultivierung noch intakte T-Zellen und typische Konglomerate aus Lymphozyten und Beads als Ort der Aktivierung und Vermehrung von Zellen nachweisbar waren (Dynal-Produktinformation 2008), ist davon auszugehen, dass ein Teil der Zellen nach der Separation intakt bleibt bzw. in der Lage ist, sich zu erholen. Beim Vergleich der beiden Kulturen A und B zeigten sich im Zeitverlauf zum Teil größere Unterschiede hinsichtlich des Anteils an vitalen Zellen. Ursachen hierfür blieben ungeklärt, könnten aber, neben den naturgemäß immer vorhandenen individuellen Eigenheiten der Leukozyten verschiedener Probanden, mit einer minimal variierenden Handhabung beider Kulturen in Zusammenhang stehen. So wurde Kultur B beispielsweise zwei Tage früher gesplittet und in ihrer Vitalität überprüft als Kultur A. Zusätzlich könnte die, durch verstärkte Streuung der einzelnen Populationen bedingt, erschwerte Auswertung des durchflusszytometrischen Apoptosetests ein Grund dafür sein.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es sich hier um die ersten Versuche zur Kultivierung von Leukozyten aus der NF handelte. Diese konnten zeigen, dass es möglich ist, leukozytäre Zellen nach der Magnetseparation über einen längeren Zeitraum in Kultur zu halten, was deren Integrität und Funktionalität zur Voraussetzung hat. Das zu diesem Zweck im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Verfahren bedarf jedoch noch weiterer Optimierung. Eventuell sollte die Kontaktzeit zwischen T-Zellen und Beads begrenzt werden, da Garlie et al. nachwies, dass durch verkürzte Exposition der Lymphozyten gegenüber den Beads eine größere Zellausbeute und ein höherer Anteil an vitalen Kulturzellen erreicht werden kann (Garlie et al. 1999). Die Durchführung weiterer Tests zur Prüfung von Funktionstüchtigkeit und Vitalität der kultivierten Zellen ist ebenfalls ratsam. Hier könnten z.B. der Nachweis verschiedener Aktivierungsmarker auf der T-Zelloberfläche (CD25, CD69

oder CD71) mittels Durchflusszytometrie oder ein auf der Aufnahme von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin basierender Lymphoproliferationsassay zum Einsatz kommen (Hickling 1998). Weiterhin sollte auch für die anderen Leukozytensubpopulationen der NF ein Nachweis ihrer Integrität und Aktivität nach der Separationsprozedur erfolgen. Für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten und zukünftige Ergebnisse diesbezüglicher Kulturversuche sollte in Betracht gezogen werden, dass die Voraussetzungen für ein Überleben der Leukozyten nach der Magnetseparation *in vivo*, also im natürlichen Milieu dieser Zellen, vermutlich immer geeigneter sind, als die *in vitro* geschaffenen Bedingungen.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Fernziel der Untersuchungen zur magnetischen Depletion zirkulierender Tumorzellen aus dem peripheren Blut ist die Entwicklung einer *in vivo* anwendbaren Therapiestrategie, welche das Risiko der Entstehung von Metastasen und Spätrezidiven vermindern soll. Visionäre Ansätze gehen dabei von einer Art Dialyse aus, die auf den Prinzipien von Leukapherese und magnetischer Zellseparation mittels polysaccharidumhüllter Nanopartikel basiert (s. 1.4.1). Im Sinne einer Blutaufreinigung ist es dafür von größter Bedeutung, die Tumorzellen maximal im Separationssystem zurückzuhalten und somit aus der Zirkulation zu eliminieren. Gleichzeitig sollten die Leukozyten das Trennsystem möglichst unbeschadet passieren, um eine Rückgabe der immunkompetenten Zellen an den Patienten zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit diente der damit verbundenen Grundlagenforschung und untersuchte in erster Linie den Einfluss der Inkubation mit den magnetischen Nanopartikeln und der Separationsprozedur auf die weißen Blutzellen sowie die Verteilung der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen in den Fraktionen. Die Subklassen der weißen Zellen wiesen dabei zum Teil deutliche Unterschiede hinsichtlich ihres Interaktionspotentials mit den magnetischen Nanopartikeln auf, welche hauptsächlich durch die unterschiedlichen physiologischen Funktionen der Populationen bedingt sein dürften. Es zeigte sich, dass die Verteilung der Leukozytensubpopulationen in der NF bei kurzen Inkubationszeiten durch die magnetische Separation im Vergleich zu ihrer natürlichen Zusammensetzung im peripheren Blut nur wenig verändert wird. Lediglich Monozyten und B-Lymphozyten sind in der NF bereits nach 4 Minuten unterrepräsentiert. Hier besteht somit noch Raum für eine weitere Optimierung der Partikelhülle. In der PF ergab sich dagegen eine deutlich veränderte Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen. Für eine praktische Umsetzung des Verfahrens ist dies jedoch wenig relevant, da die PF mit den darin abgereicherten Tumorzellen ohnehin verworfen und nicht an den Patienten zurückgegeben würde. Auch in

der vorliegenden Arbeit führte die Verwendung von Nanopartikeln mit verschiedenen Polysaccharidhüllen zu unterschiedlichen Beladungs- und Separationsraten der Leukozyten. In Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (Clement et al. 2006, Wotschadlo et al. 2009, Kühn 2010) wird die Favorisierung von CMD als Hüllsubstanz für zur Tumorzelldepletion eingesetzte Nanopartikel hier nochmals unterstrichen. Ebenso konnte die Wahl einer 4- bis 8-minütigen Inkubationszeit als ideal bestätigt werden. Beim Vergleich der Separationsergebnisse für Leukozyten von gesunden Probanden und Tumorpatienten zeigte sich sowohl für NF und PF als auch für die Verlustrate ein ähnlicher Zeitverlauf. In der Analyse der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen ergaben sich jedoch mehrere Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Daher ist es empfehlenswert, Daten, welche ausschließlich unter Verwendung peripheren Blutes gesunder Probanden gewonnen wurden, weiterhin anhand von Patientenstichproben zu verifizieren. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals vorgenommenen Versuche zur Weiterkultivierung von Leukozyten der NF lassen darauf schließen, dass die Zellen nach der Separationsprozedur vital und funktionstüchtig sind. Um diesbezüglich eine definitive Aussage treffen zu können, müssen jedoch noch umfassendere Untersuchungen erfolgen.

Bevor das visionäre auf Leukapherese und magnetischer Zellseparation beruhende Verfahren zur Depletion von zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Krebspatienten eine praktische Umsetzung erfahren kann, bedarf es noch intensiver Forschungen. Anlass für die Notwendigkeit einer weiteren Optimierung der Verfahrenstechnik geben zum einen die relativ hohen Verlustraten bei der Säulenseparation sowie die Gewährleistung einer größtmöglichen Schonung der leukozytären Zellen. Des Weiteren ist die derzeitige Methode aufgrund des geringen Zelldurchsatzes noch nicht für die Aufreinigung größerer Blutmengen geeignet. Auch sind die Langzeiteffekte polysaccharidumhüllter Nanopartikel auf den menschlichen Organismus bis dato nur im Ansatz beleuchtet. Außerdem muss geklärt werden für welche Tumorentitäten eine Abreicherung zirkulierender Malignomzellen realisiert werden kann, da die bisherigen Daten vornehmlich unter Verwendung peripheren Blutes von Mammakarzinompatienten gewonnen wurden (Kühn 2010). Sollte das Verfahren der Tumorzellapherese dann Eingang in die Praxis finden, so ist davon auszugehen, dass eine wiederholte Aufreinigung des Patientenblutes, analog zur höheren Anreicherung CD34-positiver Zellen bei der Gewinnung von Stammzellen (Hester 2000), eine effektivere Abreicherung der Tumorzellen bedeutet.

Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. Review. *Nature*, 383(6603):787-93.
- Alexiou C, Jurgons R, Seliger C, Iro H. 2006. Medical applications of magnetic nanoparticles. Review. *J Nanosci Nanotechnol*, 6(9-10):2762-8.
- Antikoerper-online.de. Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau. Online am 18.01.2011 unter http://www.antikoerper-online.de/images/news/resources_FACS_1_de.jpg
- Anzai Y, Blackwell KE, Hirschowitz SL, Rogers JW, Sato Y, Yuh WT, Runge VM, Morris MR, McLachlan SJ, Lufkin RB. 1994. Initial clinical experience with dextran-coated superparamagnetic iron oxide for detection of lymph node metastases in patients with head and neck cancer. *Radiology*, 192(3):709-15.
- Berois N, Varangot M, Osinaga E, Babino A, Caignault L, Musé I, Roseto A. 1997. Detection of rare human breast cancer cells. Comparison of an immunomagnetic separation method with immunocytochemistry and RT-PCR. *Anticancer Res*, 17(4A):2639-46
- Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis AS. 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25):4551-7.
- Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis AS. 2004. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25(23):5405-13.
- Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth BM, Wolf U. 2010. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin.
- Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D, Rebmann U, Heynemann H, Meye A. 2001. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int J Cancer*, 92(4):577-82.
- Bonnemain B. 1998. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *J Drug Target*, 6(3):167-74.

-
- Bornmann S. 2008. Optimierung und Charakterisierung der Separation humaner Zellen mittels magnetischer Nanopartikel [Diplomarbeit]. Jena: Fachhochschule Jena.
- Braun S, Pantel K. 2000. Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow. Review. *Dtsch Med Wochenschr*, 125(41):1237-9.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Review. *Adv Drug Deliv Rev*, 54(5):631-51.
- Burnet FM. 1967. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet*, 1(7501):1171-4.
- Butler TP, Gullino PM. 1975. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*, 35(3):512-6.
- Bădulescu MM, Apetrei NS, Lupu AR, Cremer L, Szegli G, Moscovici M, Mocanu G, Mihai D, Călugăru A. 2009. Curdlan derivatives able to enhance cytostatic drugs activity on tumor cells. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 68(4):201-6.
- Camara O, Kavallaris A, Nöschel H, Rengsberger M, Jörke C, Pachmann K. 2006. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells. *World J Surg Oncol*, 4:67.
- Castells A, Rustgi AK. 1995. Tumor Invasion and Metastasis. In: Rustgi AK, Hrsg. *Gastrointestinal Cancers: Biology, Diagnosis and Therapy*. Erste Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1-11.
- Chalmers JJ, Xiong Y, Jin X, Shao M, Tong X, Farag S, Zborowski M. 2010. Quantification of non-specific binding of magnetic micro- and nanoparticles using cell tracking velocimetry: Implication for magnetic cell separation and detection. *Biotechnol Bioeng*, 105(6):1078-93.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Review. *Nat Rev Cancer*, 2(8):563-72.
- Chiorean EG, Miller JS. 2001. The biology of natural killer cells and implications for therapy of human disease. Review. *J Hematother Stem Cell Res*, 10(4):451-63.
- Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. 1996. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*, 13(3):245-55.

-
- Clement JH, Schwalbe M, Buske N, Wagner K, Schnabelrauch M, Görnert P, Kliche KO, Pachmann K, Weitschies W, Höffken K. 2006. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132(5):287-92.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. 2008. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26(19):3213-21.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351(8):781-91.
- Croce CM. 2008. Oncogenes and cancer. Review. *N Engl J Med*, 358(5):502-11.
- Davis SS. 1997. Biomedical applications of nanotechnology--implications for drug targeting and gene therapy. Review. *Trends Biotechnol*, 15(6):217-24.
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Review. *Nat Rev Cancer*, 6(1):24-37.
- Delude RL. 2005. Flow cytometry. Review. *Crit Care Med*, 33(12 Suppl):S426-8.
- Diefenbach A, Raulet DH. 2002. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. Review. *Immunol Rev*. 188:9-21.
- Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. 1996. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst*, 88(22):1652-8.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The three Es of cancer immunoediting. Review. *Annu Rev Immunol*, 22:329-60. Review.
- Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. 1998. T cell memory. Review. *Annu Rev Immunol*, 16:201-23. Review.

-
- Dynal-Produktinformation. 2008. Expand your T cell research – Dynabeads® for cell activation and differentiation. Online am 18.01.2011 unter http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/B-079318%20T%20cell%20expansion%20bro_WEB.pdf.
- Fidler IJ, Kim SJ, Langley RR. 2007. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. Review. *J Cell Biochem*, 101(4):927-36.
- Fidler IJ, Poste G. 2008. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol*, 9(8):808.
- Fidler IJ. 2002. Critical determinants of metastasis. Review. *Semin Cancer Biol*, 12(2):89-96.
- Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF. 2000. Pathophysiologie des Menschen. Erste Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Fortina P, Kricka LJ, Graves DJ, Park J, Hyslop T, Tam F, Halas N, Surrey S, Waldman SA. 2007. Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer. Review. *Trends Biotechnol*, 25(4):145-52.
- Garlie NK, LeFever AV, Siebenlist RE, Levine BL, June CH, Lum LG. 1999. T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer. *J Immunother*, 22(4):336-45.
- Geiger TR, Peeper DS. 2009. Metastasis mechanisms. Review. *Biochim Biophys Acta*, 1796(2):293-308.
- Glöckl G, Weitschies W. 2007. Nanopartikelbasierte Kontrastmittel. *Der Onkologe*, 13:931-938.
- Goodwin S, Peterson C, Hoh C, Bittner C. 1998. Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy. *J Magn Magn Mater*, 194(1-3):132-139.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. 1994. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263(5153):1600-3.
- Gupta AK, Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Review. *Biomaterials*, 26(18):3995-4021.

-
- Gupta GP, Massagué J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. Review. *Cell*, 127(4):679-95.
- Hadjipanayis CG, Bonder MJ, Balakrishnan S, Wang X, Mao H, Hadjipanayis GC. 2008. Metallic iron nanoparticles for MRI contrast enhancement and local hyperthermia. *Small*, 4(11):1925-9.
- Hancock JP, Kemshead JT. 1993. A rapid and highly selective approach to cell separations using an immunomagnetic colloid. *J Immunol Methods*, 164(1):51-60.
- Harada T, Misaki A, Saito H. 1968. Curdlan: a bacterial gel-forming beta-1,3-glucan. *Arch Biochem Biophys*, 124(1):292-8.
- Haukanes BI, Kvam C. 1993 Application of magnetic beads in bioassays. Review. *Biotechnology (NY)*, 11(1):60-3.
- Hester J. 2000. Peripheral blood stem cell collection: the interaction of technology, procedure, and biological factors. Review. *Transfus Sci*, 23(2):125-32.
- Hickling JK. 1998. Measuring human T-lymphocyte function. *Expert Rev Mol Med*, 1998: 1-20.
- Hiesse C, Rieu P, Kriaa F, Larue JR, Goupy C, Neyrat N, Charpentier B. 1997. Malignancy after renal transplantation: analysis of incidence and risk factors in 1700 patients followed during a 25-year period. *Transplant Proc*, 29(1-2):831-3.
- Hof H, Dörries R. 2005. *Medizinische Mikrobiologie*. Dritte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- Hornig S, Heinze T. 2008. Efficient approach to design stable water-dispersible nanoparticles of hydrophobic cellulose esters. *Biomacromolecules*, 9(5):1487-92.
- Hu J, Li Ls, Yang W, Manna L, Wang Lw, Alivisatos AP. 2001. Linearly polarized emission from colloidal semiconductor quantum rods. *Science*, 292(5524):2060-3.
- Huber DL. 2005. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. Review. *Small*, 1(5):482-501.

-
- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U. 2010. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin.
- Ito A, Hayashida M, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T. 2004. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*, 10(5-6):873-80.
- Ito A, Hibino E, Kobayashi C, Terasaki H, Kagami H, Ueda M, Kobayashi T, Honda H. 2005. Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*, 11(3-4):489-96.
- Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. 2005. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Review. J Biosci Bioeng*, 100(1):1-11.
- Jaroszeski MJ, Radcliff G. 1999. Fundamentals of flow cytometry. *Review. Mol Biotechnol*. 11(1):37-53.
- Jean B, Dubreuil F, Heux L, Cousin F. 2008. Structural details of cellulose nanocrystals/polyelectrolytes multilayers probed by neutron reflectivity and AFM. *Langmuir*, 24(7):3452-8.
- Jenkins MK, Johnson JG. 1993. Molecules involved in T-cell costimulation. *Review. Curr Opin Immunol*, 5(3):361-7.
- Jing Y, Moore LR, Williams PS, Chalmers JJ, Farag SS, Bolwell B, Zborowski M. 2007. Blood progenitor cell separation from clinical leukapheresis product by magnetic nanoparticle binding and magnetophoresis. *Biotechnol Bioeng*, 96(6):1139-54.
- Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldöfner N, Scholz R, Deger S, Wust P, Loening SA, Jordan A. 2005. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperthermia*, 21(7):637-47.
- Jordan A, Maier-Hauff K, Wust P, Rau B, Johannsen M. 2007. Thermotherapie mit magnetischen Nanopartikeln. *Der Onkologe*, 13:894-902.
- Jordan A, Scholz R, Wust P, Fahling H, Felix R. 1999. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater*, 201:413-419.

- Jordan A, Wust P, Scholz R, Tesche B, Fähling H, Mitrovics T, Vogl T, Cervós-Navarro J, Felix R. 1996. Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *Int J Hyperthermia*, 12(6):705-22.
- June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. 1990. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. Review. *Immunol Today*, 11(6):211-6.
- Katz E, Willner I. 2004. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. Review. *Chemphyschem*, 5(8):1084-104.
- Koza B. 2004. Apoptosedetektion mittels Annexin V-Markierung.
Online am 18.01.2011 unter
<http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/piposanneg.gif>
- Kühn J. 2010. Modulation der Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln durch Tumorzellen und Leukozyten – Einsatz von Zuckerderivaten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Klinik für Innere Medizin II.
- Labhasetwar V, Leslie-Pelecky DL, Hrsg. 2007. *Biomedical Applications of Nanotechnology*. Erste Aufl. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Lacava LM, Lacava ZG, Da Silva MF, Silva O, Chaves SB, Azevedo RB, Pelegri F, Gansau C, Buske N, Sabolovic D, Morais PC. 2001. Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Biophys J*, 80(5):2483-6.
- Liberti PA, Rao CG, Terstappen L. 2001. Optimization of ferrofluids and protocols for enrichment of breast cancer cells in blood. *J Magn Magn Mater*, 225:301-307.
- Liotta LA, Kleinerman J, Sidel GM. 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 34(5):997-1004.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. 1991. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. Review. *Cancer Res*, 51(18 Suppl):5054s-5059s.
- Lippert H. 2003. *Lehrbuch Anatomie*. Sechste Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.

- Liu R, Liew R, Zhou J, Xing B. 2007. A simple and specific assay for real-time colorimetric visualization of beta-lactamase activity by using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(46):8799-803.
- Lobodasch K, Fröhlich F, Rengsberger M, Schubert R, Dengler R, Pachmann U, Pachmann K. 2007. Quantification of circulating tumour cells for the monitoring of adjuvant therapy in breast cancer: an increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse. *Breast*, 16(2):211-8.
- Lu AH, Salabas EL, Schüth F. 2007. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. Review. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(8):1222-44.
- Lu FS, Gu LR, Meziani MJ, Wang X, Luo PG, Veca LM, Cao L, Sun YP. 2009. Advances in bioapplications of carbon nanotubes. *Adv Mater*, 21: 139-152.
- Lum LG, LeFever AV, Treisman JS, Garlie NK, Hanson JP Jr. 2001. Immune modulation in cancer patients after adoptive transfer of anti-CD3/anti-CD28-costimulated T cells-phase I clinical trial. *J Immunother*, 24(5):408-19.
- Mailänder V, Landfester K. 2009. Interaction of nanoparticles with cells. Review. *Biomacromolecules*, 10(9):2379-400.
- Mapara MY, Körner IJ, Hildebrandt M, Bargou R, Krahl D, Reichardt P, Dörken B. 1997. Monitoring of tumor cell purging after highly efficient immunomagnetic selection of CD34 cells from leukapheresis products in breast cancer patients: comparison of immunocytochemical tumor cell staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*, 89(1):337-44.
- Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. 1998. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol*, 26(3):252-64.
- McClain KL. 1997. Immunodeficiency states and related malignancies. Review. *Cancer Treat Res*, 92:39-61.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. 2004. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10(24):8152-62.

-
- Meuer SC, Dienes HP. 1989. Lymphocyte mediated cell lysis. Review. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 57(1):1-9.
- Miltenyi Biotech-Produktinformation. 2006. How to choose the perfect MACS[®] Column for your cell separation. *Column_Decision_Flyer.pdf*. Online am 18.01.2011 unter www.miltenyibiotec.com/en/NN_29_MACS_Cell_Separation_Columns.aspx.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2):231-8.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Review. *Pharmacol Rev*, 53(2):283-318.
- Molday RS, MacKenzie D. 1982. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J Immunol Methods*, 52(3):353-67.
- Molnar B, Floro L, Sipos F, Toth B, Sreter L, Tulassay Z. 2008. Elevation in peripheral blood circulating tumor cell number correlates with macroscopic progression in UICC stage IV colorectal cancer patients. *Dis Markers*, 24(3):141-50.
- Moore A, Weissleder R, Bogdanov A Jr. 1997. Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging*, 7(6):1140-5.
- Moore A, Grimm J, Han B, Santamaria P. 2004. Tracking the recruitment of diabetogenic CD8⁺ T-cells to the pancreas in real time. *Diabetes*, 53(6):1459-66.
- Mosmann TR, Li L, Sad S. 1997. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. Review. *Semin Immunol*, 9(2):87-92.
- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. 2009. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. Review. *Cancer Treat Rev*, 35(5):463-74.
- Müller B, Wotschadlo J, Kühn J, Pachmann K, Buske N, Heinze T, Hochhaus A, Clement JH. 2010. Short-term application of magnetic core-shell nanoparticles - Effect on immune cells [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Klinik für Innere Medizin II.
- Murta EF, de Andrade JM, Falcão RP, Bighetti S. 2000. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori*, 86(5):403-7.

- Nakamura M, Decker K, Chosy J, Comella K, Melnik K, Moore L, Lasky LC, Zborowski M, Chalmers JJ. 2001. Separation of a breast cancer cell line from human blood using a quadrupole magnetic flow sorter. *Biotechnol Prog*, 17(6):1145-55.
- Naoe M, Ogawa Y, Morita J, Omori K, Takeshita K, Shichijyo T, Okumura T, Igarashi A, Yanaihara A, Iwamoto S, Fukagai T, Miyazaki A, Yoshida H. 2007. Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System. *Cancer*, 109(7):1439-45.
- Nielsen OS, Horsman M, Overgaard J. 2001. A future for hyperthermia in cancer treatment? *Eur J Cancer*, 37(13):1587-9.
- Nirmal M, Brus L. 1999. Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals. *Acc Chem Res*, 32:407-414.
- Nono I, Ohno N, Ohsawa M, Oikawa S, Yadomae T. 1989. Modulation of antitumor activity of grifolan by subsequent administration of (1----3)-beta-D-glucanase in vivo. *J Pharmacobiodyn*, 12(10):581-8.
- Owen CS, Sykes NL. 1984. Magnetic labeling and cell sorting. *J Immunol Methods*, 73(1):41-8.
- Pachmann K, Heiss P, Demel U, Tilz G. 2001. Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using laser scanning cytometer (LSC). *Clin Chem Lab Med*, 39(9):811-7.
- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jörke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Höffken K. 2008. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol*, 26(8):1208-15.
- Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Höffken K. 2005. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med*, 43(6):617-27.
- Pachmann K, Dengler R, Lobodasch K, Fröhlich F, Kroll T, Rengsberger M, Schubert R, Pachmann U. 2008. An increase in cell number at completion of therapy may develop as an indicator of early relapse: quantification of circulating epithelial tumor cells (CETC) for monitoring of adjuvant therapy in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134(1):59-65.

-
- Pachmann K. 2005. Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 11(15):5657; author reply 5657-8.
- Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 353(25):2654-66.
- Pamme N, Wilhelm C. 2006. Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. *Lab Chip*, 6(8):974-80.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Review. *J Phys D: Appl Phys*, 36: R167-R181.
- Pappas D, Wang K. 2007. Cellular separations: a review of new challenges in analytical chemistry. Review. *Anal Chim Acta*, 601(1):26-35.
- Plank C, Scherer F, Alexiou C, Trahms L. 2007. Nanomagnetomedizin. *Der Onkologe*, 13:903-916.
- Portet D, Denizot B, Rump E, Lejeune JJ, Jallet P. 2001. Nonpolymeric Coatings of Iron Oxide Colloids for Biological Use as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J Colloid Interface Sci*, 238(1):37-42.
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. 1998. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8):4589-94.
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, 377(Pt 1):159-69.
- Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J, Hrsg. 2004. *Basislehrbuch Innere Medizin: kompakt-greifbar-verständlich*. Dritte Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Restifo NP, Antony PA, Finkelstein SE, Leitner WW, Surman DP, Theoret MR, Touloukian CE. 2002. Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis. Review. *Semin Cancer Biol*, 12(1):81-6.

-
- Riede UN, Schäfer HE, Werner M, Hrsg. 2004. Allgemeine und spezielle Pathologie. Fünfte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- Safarik I, Safariková M. 1999. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. Review. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 722(1-2):33-53.
- Salata O. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*, 2(1):3.
- Schnabelrauch M, Clement JH. 2007. Design von bioaktiven und nanostrukturierten Oberflächen. *Der Onkologe*, 13:917-930.
- Schoepf U, Marecos EM, Melder RJ, Jain RK, Weissleder R. 1998. Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *Biotechniques*, 24(4):642-6, 648-51.
- Schwalbe M, Buske N, Vetterlein M, Höffken K, Pachmann K, Clement JH. 2006a. The carboxymethyl dextran shell is an important modulator of magnetic nanoparticle uptake in human cells. *Z Phys Chem*, 220:125-131.
- Schwalbe M, Jörke C, Buske N, Höffken K, Pachmann K, Clement JH. 2005. Selective reduction of the interaction of magnetic nanoparticles with leukocytes and tumor cells by human plasma. *J Magn Magn Mater*, 293:433-437.
- Schwalbe M, Pachmann K, Clement J. 2006. Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood does not affect lymphocytes [Vortrag]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Klinik für Innere Medizin II.
- Schwalbe M, Pachmann K, Höffken K, Clement JH. 2006b. Improvement of the separation of tumor cells from peripheral blood cells using magnetic nanoparticles. *J Phys Condens Matter*, 18:S2865-S2876.
- Shen TT, Bogdanov A Jr, Bogdanova A, Poss K, Brady TJ, Weissleder R. 1996. Magnetically labeled secretin retains receptor affinity to pancreas acinar cells. *Bioconjug Chem*, 7(3):311-6.
- Siewert C, Herber M, Hunzelmann N, Fodstad O, Miltenyi S, Assenmacher M, Schmitz J. 2001. Rapid enrichment and detection of melanoma cells from peripheral blood mononuclear cells by a new assay combining immunomagnetic cell sorting and immunocytochemical staining. *Recent Results Cancer Res*, 158:51-60.

- Solomayer EF, Feuerer M, Bai L, Umansky V, Beckhove P, Meyberg GC, Bastert G, Schirmacher V, Diel IJ. 2003. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 9(1):174-80.
- Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. 2008. Biological applications of gold nanoparticles. Review. *Chem Soc Rev*, 37(9):1896-908.
- Sugimura T, Terada M, Yokota J, Hirohashi S, Wakabayashi K. 1992. Multiple genetic alterations in human carcinogenesis. Review. *Environ Health Perspect*, 98:5-12.
- Trickett A, Kwan YL. 2003. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods*, 275(1-2):251-5.
- Trickett AE, Ford DJ, Lam-Po-Tang PR, Vowels MR. 1991. Immunomagnetic bone marrow purging of common acute lymphoblastic leukemia cells: suitability of BioMag particles. *Bone Marrow Transplant*, 7(3):199-203.
- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Review. *Cytometry*, 31(1):1-9.
- Vigor KL, Kyrtatos PG, Minogue S, Al-Jamal KT, Kogelberg H, Tolner B, Kostarelos K, Begent RH, Pankhurst QA, Lythgoe MF, Chester KA. 2010. Nanoparticles functionalized with recombinant single chain Fv antibody fragments (scFv) for the magnetic resonance imaging of cancer cells. *Biomaterials*, 31(6):1307-15.
- Vlems FA, Ruers TJ, Punt CJ, Wobbles T, van Muijen GN. 2003. Relevance of disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with solid epithelial tumours in perspective. Review. *Eur J Surg Oncol*, 29(4):289-302.
- Vogler LB, Pearl ER. 1978. T- and B-lymphocytes: current status in man. *South Med J*, 71(5):582-4.
- Wagner K, Kautz A, Röder M, Schwalbe M, Pachmann K, Clement JH, Schnabelrauch M. 2004. Synthesis of oligonucleotide-functionalized magnetic nanoparticles and study on their *in vitro* uptake. *Appl Organometal Chem*, 18:514-519.
- Waldhauer I, Steinle A. 2008. NK cells and cancer immunosurveillance. Review. *Oncogene*, 27(45):5932-43.

-
- Wallraph E. 2001. Die Rolle der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der Abwehr von Tumoren und der Nachweis der NK-Zell-Aktivität zur Früherkennung maligner Tumoren. Innovationsforum, Senftenberg. Online am 18.01.2011 unter www.ns-eugenik.de/labor/nk-zellen.htm.
- Weinberg RA. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Review. *Cancer Res*, 49(14):3713-21.
- Weiss L, Mayhew E, Rapp DG, Holmes JC. 1982. Metastatic inefficiency in mice bearing B16 melanomas. *Br J Cancer*, 45(1):44-53.
- Whiteside TL. 1993. Tumor infiltrating lymphocytes in human malignancies. Austin, Texas: R.G. Landes Co.
- Whiteside TL. 2010. Immune responses to malignancies. Review. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2):S272-83.
- Wijayahadi N, Haron MR, Stanslas J, Yusuf Z. 2007. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *J Chemother*, 19(6):716-23.
- Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 24(6):1001-11.
- Wilhelm C, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Bacri JC. 2002. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: Kinetic analysis of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir*, 18(21):8148-8155.
- Wilson R. 2008. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem Soc Rev*, 37(9):2028-45.
- Wittekind C, Neid M. 2005. Cancer invasion and metastasis. Review. *Oncology*, 69 Suppl 1:14-6.
- Wong LS, Bateman WJ, Morris AG, Fraser IA. 1995. Detection of circulating tumour cells with the magnetic activated cell sorter. *Br J Surg*, 82(10):1333-7.

-
- Wotschadlo J, Liebert T, Heinze T. 2009. Specific interaction of polysaccharide-coated nanoparticles with human cells [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung.
- Wotschadlo J, Liebert T, Heinze T, Wagner K, Schnabelrauch M, Dutz S, Müller R, Steiniger F, Schwalbe M, Kroll TC, Höffken K, Buske N, Clement JH. 2009. Magnetic nanoparticles coated with carboxymethylated polysaccharide shells – Interaction with human cells. *J Magn Magn Mater*, 321:1469-1473.
- Wotschadlo J, Müller B, Kühn J, Nikolajski M, Pachmann K, Buske N, Müller R, Liebert T, Schnabelrauch M, Heinze T, Hochhaus A, Clement JH. 2010. Short-term application of magnetic core-shell nanoparticles – Effect on immune cells. *AIP Conf Proc*, 1311:431-437.
- Wotschadlo J, Wagner K, Dutz S, Schwalbe M, Kühn J, Kroll TC, Clement JH, Müller R, Schnabelrauch M, Liebert T, Heinze T. 2008. Interaction of tumor cells and peripheral blood cells with magnetic nanoparticles coated with tailored polysaccharide-based shells [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung.
- Woodland DL, Dutton RW. 2003. Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. Review. *Curr Opin Immunol*, 15(3):336-42.

Anhang

A: Liste der verwendeten Chemikalien, Laborgeräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Bemerkungen/Bezeichnung	Hersteller
Annexin V-FITC	aus Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	Becton Dickinson
Annexin V Binding Buffer	aus Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	Becton Dickinson
Aqua dest.		
BD FACS Clean Solution		Becton Dickinson
BD FACS Flow™		Becton Dickinson
BD FACS Rinse™		Becton Dickinson
BSA		Sigma®
Carboxymethyl-Cellulose		Innovent e.V.
Carboxymethyl-Curdlan		Innovent e.V.
Carboxymethyl-Dextran		Innovent e.V.
CD4 MultiSort Microbeads human	aus CD4 MultiSort Kit human	Miltenyi Biotec
Coulter® Isoton® II Diluent		Beckman Coulter
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expander		Invitrogen Dynal
Easypet		Eppendorf
EDTA		Sigma®
Einweg-Pipetten	Einweg-Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner-Bio-One
Erythrozytenlyse(EL)-Puffer		Qiagen
FACS-Röhrchen		Becton Dickinson
Falconröhrchen	Falcon (50ml)	Greiner-Bio-One
FCS		Biochrom AG
Inkubator	Thermoschrank TS 20/27 HERACell 240i	Heraeus Instruments Heraeus Instruments
Interleukin-2 (IL2) human		Fluka
Kamera	AxioCamHrc	Zeiss
Magnet, groß		Universitätsklinikum Jena
Magnet für Tubes		Dynal
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Monovetten (EDTA)	S-Monovette 9ml K3E	Sarstedt
Monovetten (Heparin)	S-Monovette 9ml AH	Sarstedt
Pasteurpipette	Pasteurplastpipette	Ratiolab®
PBS		Gibco® (Invitrogen)
Penicillin-Streptomycin		Gibco® (Invitrogen)
PE-Puffer	PBS plus 2 mmol EDTA	Gibco® (Invitrogen), Sigma®
Pipetten		Eppendorf
Pipettenspitzen		Plastibrand®
Propidiumiodid (PI)	aus Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	Becton Dickinson
Puffer für Lymphozytenkultivierung	PBS plus 0,1% BSA, pH 7,4	Gibco® (Invitrogen), Sigma®

Bezeichnung	Bemerkungen/Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf
RPMI 1640 (Zellkulturmedium)		Gibco® (Invitrogen)
Sterilwerkbank	HERAsafe® HS 12/2	Heraeus Instruments
Thermomixer	Thermomixer 5437	Eppendorf
TriTest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP		Becton Dickinson
Ultraschallsonde	Bandelin Sonoplus HD 2200	Bandelin Electronic
Vortex	Vortexer VF2	IKA® Labortechnik
Zellkulturplatten (12-Well)		Greiner-Bio-One
Zellseparationsgerät	SuperMACS™ II Separator	Miltenyi Biotec
Zellseparationssäulen	MACS® Separation Column MS	Miltenyi Biotec
	MACS® Separation Column LS	Miltenyi Biotec
Zellzählgerät	Coulter Z2 Particle Count & Size Analyser	Beckman Coulter
Zentrifugen	Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5315R	Eppendorf
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	Eppendorf

B: Beispiel zur rechnerischen Auswertung einer Einzelkinetik**Ansatz:** 2500000 Leukozyten + 5µl Nanopartikelsuspension**MACS:**

Zeitpunkt	Negativfraktion [Zellen]	Negativfraktion [%]	Positivfraktion [Zellen]	Positivfraktion [%]	wiedergefundene Zellen [Zellen]	Gesamtsumme [Zellen]	Verlust [Zellen]	Verlust [%]
4	1636000	65%	162000	6%	1798000	2500000	702000	28%
8	1539000	62%	399600	16%	1938600	2500000	561400	22%
12	1223000	49%	536000	21%	1759000	2500000	741000	30%
16	934800	37%	769200	31%	1704000	2500000	796000	32%
20	647600	26%	856400	34%	1504000	2500000	996000	40%
30	302800	12%	887600	36%	1190400	2500000	1309600	52%

FACS:

Negativfraktion									
Zeitpunkt	Lymphozyten [Events]	Lymphozyten [%]	Monozyten [Events]	Monozyten [%]	Granulozyten [Events]	Granulozyten [%]	tote Zellen [Events]	tote Zellen [%]	Gesamtzahl [Events]
4	2158	21,87%	410	4,16%	7199	72,96%	100	1,01%	9867
8	2114	21,33%	367	3,70%	7336	74,03%	92	0,93%	9909
12	2383	24,11%	312	3,16%	7077	71,61%	111	1,12%	9883
16	3154	31,97%	368	3,73%	6196	62,81%	147	1,49%	9865
20	4484	45,54%	467	4,74%	4723	47,97%	172	1,75%	9846
30	6341	64,83%	528	5,40%	2623	26,82%	289	2,95%	9781

Positivfraktion									
Zeitpunkt	Lymphozyten [Events]	Lymphozyten [%]	Monozyten [Events]	Monozyten [%]	Granulozyten [Events]	Granulozyten [%]	tote Zellen [Events]	tote Zellen [%]	Gesamtzahl [Events]
4	1158	12,17%	1514	15,91%	2721	28,58%	4126	43,34%	9519
8	1590	16,62%	1208	12,63%	3812	39,85%	2957	30,91%	9567
12	1301	13,52%	907	9,43%	5642	58,63%	1773	18,42%	9623
16	1043	10,74%	738	7,60%	6603	67,97%	1331	13,70%	9715
20	833	8,65%	521	5,41%	6515	67,67%	1758	18,26%	9627
30	1046	10,83%	564	5,84%	6597	68,28%	1455	15,06%	9662

C: Standardprotokoll für die polyklonale Expansion von T-Zellen unter Einsatz des Dynabeads[®] CD3/CD28 T Cell Expanders von Invitrogen[™]:

Für die Expansion von T-Zellen über einen Zeitraum von mehr als drei Tagen wird der Einsatz von drei Beads pro T-Zelle empfohlen.

Der Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander kann zur Expansion mononukleärer Zellen oder reiner T-Lymphozyten angewendet werden.

- Tag 0:**
- 1.) Die mononukleären oder T-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml zum Kulturmedium [X-vivo (oder Äquivalent) mit 2mM L-Glutamin, 5% humanem AB-Serum oder 10% FCS und 100U/ml Penicillin-Streptomycin] geben.
 - 2.) 75 μ l Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander pro 1×10^6 Zellen zugeben.
 - 3.) Kulturansatz im Brutschrank inkubieren.
- Tag 2-3:** Dem Kulturansatz 10-100 U rIL2/ml zufügen.
- Tag 4-5:**
- 1.) Zellen und Beads mittels Pipette resuspendieren und anschließend im Mikroskop zählen.
 - 2.) Zellen durch Zugabe von Medium verdünnen, sodass am Ende eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml vorliegt. Dem Ansatz 10-100 U rIL2/ml zufügen.
- Tag 7-14:** Kulturen bei Bedarf splitten und täglich hinsichtlich Zellgröße und Zellmorphologie im Mikroskop beurteilen. Schrumpfung der Zellen und reduzierte Proliferationsraten sind als Zeichen für die Erschöpfung der Kultur zu werten. Die Zellzahl sollte mindest zweimal in der Woche bestimmt werden. Überschreitet die Zelldichte eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml oder verfärbt sich das Medium gelblich, ist die Kultur zu splitten. Dabei sollte eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt werden sowie der Zusatz von rIL2 in einer Konzentration von 10-100U/ml erfolgen.
- Tag 14:** Nach 14 Tagen ist in der Regel einer erneute Stimulation der Kulturen notwendig.

(aus: Dynabeads[®] CD3/CD28 T Cell Expander von Invitrogen[™]/Dyna[®], 2007)

**D: Standardprotokoll zum Waschen vor Benutzung des Dynabeads®
CD3/CD28 T Cell Expanders von Invitrogen™:**

Es empfiehlt sich, die Dynabeads vor Nutzung zu waschen.

- 1.) Dynabeads in der Phiolen resuspendieren.
- 2.) Das benötigte Volumen an Dynabeads in ein Tube überführen.
- 3.) Dazu in gleicher Menge, wenigstens jedoch einen Milliliter, Puffer 1 [PBS mit 0,1% BSA, pH 7,4] geben und vermischen.
- 4.) Den Tube für eine Minute in einem Magneten platzieren und anschließend den Überstand verwerfen.
- 5.) Den Tube aus dem Magneten entfernen und die gewaschenen Dynabeads in einer dem initial eingesetzten Volumen an Dynabeads entsprechenden Menge Puffer 1 aufnehmen.

(aus: Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expander von Invitrogen™/Dyna™, 2007)

E: Publikationsliste**Originalarbeiten**

Wotschadlo, J., Müller, B., Kühn, J., Nikolajski, M., Pachmann, K., Buske, N., Müller, R., Liebert, T., Schnabelrauch, M., Heinze, T., Hochhaus, A. und Clement, J.H. 2010. Short-term application of magnetic core-shell nanoparticles – Effect on immune cells. AIP Conference Proceedings 1311: 431-437

Buchbeiträge

Müller, B., Wotschadlo, J., Schnabelrauch, M., Heinze, T. und Clement, J.H. 2009. Die Wechselwirkung von magnetischen Kern-Hülle Teilchen mit Blutzellen wird durch Carboxymethylierte Polysaccharide modifiziert. In: Tagungsband 5. Thüringer Grenz- und Oberflächentage & 7. Thüringer Biomaterial-Kolloquium; INNOVENT e.V. (Hrsg.)

Abstrakte

Müller, B., Wotschadlo, J., Pachmann, K., Buske, N., Heinze, Th. und Clement, J.H. 2009. Distribution of leukocyte subpopulations after short-term application of magnetic core-shell nanoparticles. 9. Ferrofluid-Workshop, Benediktbeuern, 22.-25.09.2009

Müller, B., Wotschadlo, J., Pachmann, K., Buske, N., Heinze, Th., Hochhaus, A. und Clement, J.H. 2010. Distribution of leukocyte subpopulations after short-term application of magnetic core-shell nanoparticles. IZKF-Doktoranden Symposium, Dornburg, 24.04.2010

Wotschadlo, J., Müller, B., Kühn, J., Pachmann, K., Buske, N., Heinze, Th., Hochhaus, A. und Clement, J.H. 2010. Short-term application of magnetic core-shell nanoparticles – Effect on immune cells. Poster 226. 8. International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Rostock, 25.-29.05.2010

Vorträge

Müller, B., Wotschadlo, J., Schnabelrauch, M., Heinze, T. und Clement, J.H. 2009. Die Wechselwirkung von magnetischen Kern-Hülle Teilchen mit Blutzellen wird durch Carboxymethylierte Polysaccharide modifiziert. 7. Thüringer Biomaterial-Kolloquium, Friedrichroda, 17.09.2009

F: Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name: Bianca Müller
Anschrift: Talstraße 22
99089 Erfurt
Geburtsdatum: 16.10.1984
Geburtsort: Leinefelde
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1991 bis 1995: Grundschule, Dingelstädt
1995 bis 2003: St. Josef Gymnasium, Dingelstädt
Abitur (Note: 1,0)

Hochschulausbildung:

10/2003 – 03/2010: Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2005: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)
08/2008 – 07/2009: Praktisches Jahr
12/2009: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)
01/2010: Approbation als Ärztin
04/2010 – 01/2011 : Promotionsstudium an der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Promotion:

01/2007 - 01/2011: Doktorandin im Onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II, Prof. Dr. A. Hochhaus, Universitätsklinikum Jena

Berufliche Tätigkeit:

seit 02/2011: Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin im HELIOS Klinikum Erfurt

Erfurt, den

Bianca Müller

G: Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Hochhaus für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten im Onkologischen Forschungslabor Jena.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an meinen Betreuer Dr. J. H. Clement, Leiter des Onkologischen Forschungslabors Jena, der mich während meiner gesamten Promotionszeit stets mit Rat und Tat unterstützte und geduldig all meine Fragen beantwortete.

Ganz herzlich bedanke ich mich weiterhin beim gesamten Team des Onkologischen Forschungslabors, stellvertretend seien hier Conny Jörke und Jana Wotschadlo genannt. Eure wertvolle Unterstützung beim Erlernen der Arbeitstechniken, unzählige Tipps, stetige Hilfsbereitschaft, Ansporn und konstruktive Kritik haben ein Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Ein ebenso großes Dankeschön gilt den vielen freiwilligen Blutspender aus meinem Freundes- und Bekanntenkreis.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums und bei der Arbeit an dieser Promotion immer unterstützt und an mich geglaubt hat sowie meinen Freunden, die mir stets mit aufmunternden Worten halfen Durststrecken zu überwinden.

H: Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. J.H. Clement,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnlichen oder eine andere Arbeit nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den

Bianca Müller