

Molekulare Bildgebung der Angiogenese am Beispiel des VEGFs

Dissertation

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

zu Kiel



vorgelegt von

Thomas Schlorf

Kiel

2008

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2008

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

“Imagination is more important than knowledge. Knowledge is limited.
Imagination encircles the world” (Albert Einstein)

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
BrCN	Bromcyan
FGF	Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomographie
C _T	“threshold cycle”
kDa	kilo-Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DMAE	Dimethylaminoethanol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintrisphosphat
ECL Methode	Enhanced Chemiluminescence Methode
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	“extracellular signal regulated kinase”
et al.	et alii (und andere)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Gd	Gadolinium
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HMEC-1	human microvascular endothelial cell line
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IL	Interleukin
KGW	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
M 310 nm	Microspheres mit einem Durchmesser von 310 nm
M 850 nm	Microspheres mit einem Durchmesser von 850 nm
MAPK	Mitogen aktivierten Protein Kinasen
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
min	Minute(n)
MRT	Magnetresonanztomographie
N20	Nanomag-D-Spio 20
N70	Nanomag-D-Spio 70
N100	Nanomag-D-Spio 100
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PET	Positronenemissionstomographie
PET-Membran	Polyethylenterephthalat-Membran
r ₁	T1 Relaxivität
r ₂	T2 Relaxivität
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

SDS	Natriumdodecylsulfat
SPIO	Superparamagnetische Eisenoxide
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBST	Tris buffered Saline Tween
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UNG	Uracil-UNG-Glykosylase
USPIO	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Angiogenese	1
1.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	3
1.3. Molekulare Bildgebung	7
1.3.1. Positronenemissionstomographie (PET)	8
1.3.1.1. Methodenbeschreibung	8
1.3.1.2. Einsatz von Kontrastmitteln	9
1.3.2. Computertomographie (CT)	9
1.3.2.1. Methodenbeschreibung	9
1.3.2.2. Einsatz von Kontrastmitteln	10
1.3.3. Ultraschall (Sonographie)	11
1.3.3.1. Methodenbeschreibung	11
1.3.3.2. Einsatz von Kontrastmitteln	11
1.3.4. Magnetresonanztomographie (MRT)	12
1.3.4.1. Methodenbeschreibung	12
1.3.4.2. Einsatz von Kontrastmitteln	16
1.3.5. Optische Bildgebung	19
1.3.5.1. Biolumineszenz	19
1.3.5.2. Fluoreszierende Proteine	19
1.3.5.3. Fluoreszenzfarbstoff / Fluoreszierende Nanopartikel	20
1.4. Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Eingesetzte Materialien, Chemikalien und Geräte	24
2.1.1. Allgemeine Materialien	24
2.1.2. Chemikalien	25
2.1.3. Medium	27
2.1.4. Kits und Enzyme	28
2.1.5. Lösungen	28
2.1.6. Geräte	31
2.2. Zellkultur	32

2.2.1. Zelllinien	32
2.2.1.1. HUVEC	32
2.2.1.2. HMEC-1	33
2.2.1.3. U118	33
2.2.1.4. HT-29	34
2.2.1.5. MDA-MB-231	34
2.2.1.6. bEnd3	34
2.2.2. Passagieren von Zellen	35
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl durch die Neubauer Kammer	35
2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
2.3. RNA-Analysen	36
2.3.1. RNA-Isolierung	36
2.3.1.1. RNA-Isolierung aus Zellen	36
2.3.1.2. RNA-Isolierung aus Gewebe	37
2.3.2. Messung der RNA- und DNA-Konzentration	37
2.3.3. Dnase Verdau	37
2.3.4. Reverse Transkription	38
2.3.5. Real-Time-RT-PCR	39
2.4. Proteinbiochemische Analysen	45
2.4.1. Proteinisolierung aus Zellen	45
2.4.2. Proteinbestimmung	45
2.4.3. Western Blot	46
2.4.4. Immunhistochemie	51
2.4.4.1. Einbettung der Gewebeproben in Paraffin	51
2.4.4.2. Immunhistochemischer Nachweis nach der ABC-Methode	51
2.5. Toxizität-Analysen	54
2.5.1. Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) Aktivität	54
2.5.2. CyQuant Proliferationstest	55
2.6. Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIO)	56
2.7. Eisendetektion	57
2.7.1. Photometrische Bestimmung des Eisengehaltes	57
2.7.1.1. Herstellung des Eisenstandards	57
2.7.1.2. Herstellung der Zellprobe	58

2.7.1.3. Messung des Eisenstandards bzw. der Zellprobe	58
2.7.2. Eisenfärbung	58
2.7.3. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	59
2.7.3.1. Aufbau des TEM	59
2.7.3.2. Einbettung in Araldit für die Elektronenmikroskopie	60
2.8. Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	61
2.9. Eisenoxidnanopartikelkonjugation	62
2.9.1. Kopplung von Eisenoxidnanopartikeln über Bromcyan (BrCN)	62
2.9.2. „Dot-Spot-Test“ zur Überprüfung der Eisenoxidnanopartikel-Kopplung	64
2.9.3. Ultrafiltration	64
2.10. In-vitro Nachweis der Eisenoxidnanopartikelkonjugate im MRT	65
2.10.1. über Einbettung der Zellen in Polyacrylamid	65
2.10.2. über PET-Membran	66
2.11. In-vivo Nachweis des N100-VEGF-Konjugates	66
2.12. Farbstoffe	69
2.12.1. Cy-Farbstoffe (Cy5 und Cy7)	69
2.12.2. IRDye 800CW NHS-Ester	72
2.12.3. Kopplung eines Farbstoffes mit einer Succinimidylestergruppe (Cy5, Cy7 und IRDye 800CW NHS)	73
2.12.4. Quantum Dots (Jonamac Red)	74
2.12.4.1. Eigenschaften der Quantum Dots	74
2.12.4.2. Kopplung von Quantum Dots	76
2.12.4.3. MicroSpin G-25 Säulen	79
2.12.4.4. Bestimmung der SH-Gruppen durch die Ellman Reagenz	80
2.12.4.5. Abtrennung des ungekoppelten Peptides nach Konjugation mit Quantum Dots	81
3. Ergebnisse	82
3.1. Aufnahmeverhalten der Eisenoxidnanopartikel	82

3.1.1. Abhängigkeit vom Zelltyp	82
3.1.2. Konzentrationsabhängigkeit	83
3.1.3. Zeitabhängigkeit	84
3.2. Verweildauer der Eisenoxidnanopartikel in den Zellen	85
3.3. Toxizität	86
3.3.1. Freisetzung des zytologischen Enzyms LDH	86
3.3.2. Einfluss auf die Zellproliferation	87
3.4. Lokalisation der aufgenommenen Eisenoxidnanopartikel	88
3.4.1. Lokalisation durch Eisenfärbung	89
3.4.2. Lokalisation durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	90
3.5. Eigenschaft der Eisenoxidnanopartikel im MRT	92
3.5.1. Bestimmung der T2-Relaxivität (r_2)	92
3.5.2. Eisenoxid-beladene Zellen	93
3.6. Zielstruktur für die molekulare Bildgebung	94
3.6.1. Identifizierung von Zielen in-vitro	94
3.6.2. Bestimmung der Expression des VEGF-Rezeptors in den Lebermetastasen	96
3.7. Eigenschaften der Nanomag-Partikel	99
3.7.1. Überprüfung des Partikeldurchmessers durch die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	99
3.7.2. Transmissionselektronenmikroskopie der Partikel	100
3.8. Konjugation der Nanomag-Partikel	101
3.8.1. Nachweis der Konjugation	101
3.8.2. Nachweis der biologischen Aktivität	102
3.8.3. Untersuchung des Partikeldurchmessers der N100-Konjugate durch den Einsatz der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	103
3.8.4. Kinetik der Bindung von VEGF-Konjugaten an Endothelzellen	104
3.8.5. Vergleich der Aufnahme verschiedener Konjugate in Endothelzellen	105
3.8.6. Lokalisation der adsorbierten Konjugate in Endothelzellen	105

3.8.6.1. Eisenfärbung	106
3.8.6.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	107
3.8.6.3. Detektion der Eisenoxidnanopartikel im MRT	108
3.8.6.3.1. Erstellen einer Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung	108
3.8.6.3.2. Detektion der zellulär aufgenommenen Konjugate im MRT	109
3.8.6.3.3. Detektion von spezifisch markierten Zellen im MRT im Monolayer	110
3.8.7. In-vivo Untersuchung von ungekoppelten Partikeln	111
3.8.8. In-vivo Untersuchung des N100-VEGF Konjugates	113
3.8.8.1. Injektion in gesunde Maus – Kinetik der Aufnahme und Abgabe des N100-VEGF-Konjugates	113
3.8.8.2. Absorption von Plasmaproteinen	117
3.9. Untersuchungen von Fluoreszenzkonjugaten	118
3.9.1. Quantum Dots (Jonamac Red)	118
3.9.1.1. Biologische Aktivität des Quantum Dots-VEGF- Konjugates	118
3.9.1.2. Untersuchung der Bindungsaktivität der Quantum Dots Konjugate	119
3.9.1.2.1. Quantum Dot-VEGF Konjugat	119
3.9.1.2.2. Quantum Dot-Albumin Konjugat	120
3.9.1.2.3. Negativkontrolle (nur Medium)	121
3.9.2. Cy5	121
3.9.2.1. Biologische Aktivität des Cy5-VEGF-Konjugates	122
3.9.2.2. Untersuchung der Bindungsaktivität der Cy5-Konjugate	122
3.9.2.2.1. Cy5-VEGF-Konjugat	123
3.9.2.2.2. Cy5-Albumin-Konjugat	124
3.9.2.2.3. Negativkontrolle (nur Medium)	125
3.9.3. Vergleich der Detektionsmöglichkeiten zwischen der Cy5-VEGF und der Quantum Dot-VEGF Kopplung	125

3.9.4. IRDye 800CW	126
3.9.4.1. Biologische Aktivität des IRDye 800CW-VEGF Konjugates	127
3.9.4.2. Untersuchung der Bindungsaktivität der IRDye 800CW Konjugate	128
3.9.4.2.1. Verschiedene Zellzahl	128
3.9.4.2.2. Verweildauer des IRDye 800CW Konjugates in den Zellen	129
3.9.4.2.3. Verdrängungsversuch	130
4. Diskussion	132
4.1. Eisenoxidnanopartikel	133
4.1.1. Aufnahme in die Zellen	134
4.1.2. Lokalisation der Eisenoxidnanopartikel	139
4.1.3. Nachweis der Eisenoxidnanopartikel im MRT	140
4.1.4. Toxizität	141
4.1.5. Auswahl einer geeigneten Zielstruktur	143
4.1.6. Eigenschaften der Nanomag-Eisenoxidnanopartikel	144
4.1.7. Eisenoxidnanopartikelkonjugat	145
4.1.8. Erprobung der Eisenoxidnanopartikelkonjugate in-vivo	150
4.1.8.1. In-vivo Untersuchung von Resovist, N20 und N70	150
4.1.8.2. HT-29-Tumormodell	152
4.1.8.3. Expression des VEGFR-1 und -2 in Lebermetastasen	153
4.1.8.4. In-vivo Untersuchung des N100-VEGF-Konjugates	154
4.2. Fluoreszenzkonjugate	161
4.2.1. Vergleich zwischen Quantum Dot Konjugat und Cy5 Konjugat	162
4.2.2. Vergleich zwischen IRDye 800CW Konjugat und Cy7 Konjugat	167

5. Zusammenfassung	170
Summary	173
6. Literaturverzeichnis	175
7. Abbildungsverzeichnis	209
8. Tabellenverzeichnis	214

1. Einleitung

1.1. Angiogenese

Zwei unterschiedliche Mechanismen sind an der Gefäßneubildung beteiligt: die Vaskulogenese und die Angiogenese. Die Vaskulogenese ist definiert als eine Gefäßneubildung aus sich differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen. Als Angiogenese bezeichnet man dagegen das Wachstum von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren), überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Solide Tumoren sind abhängig von einem mitwachsenden Kapillarnetz (Tumor – induzierte Angiogenese), das den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt (Pawletz et al. 1989).

Bei der Angiogenese handelt sich um einen sehr komplexen Prozess, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen durch den Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und andere Faktoren aktiviert werden (Ortega et al. 1997).

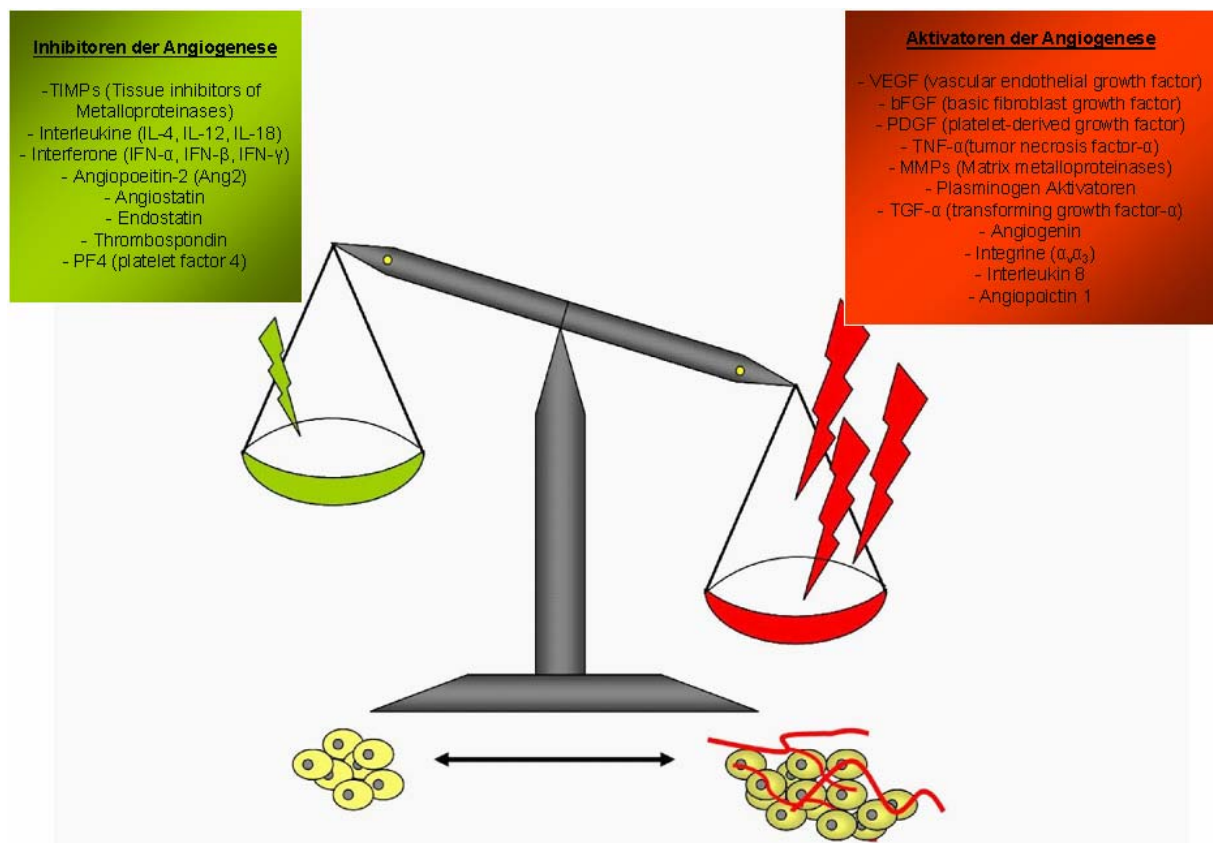


Abbildung 1.1.: Einflussfaktoren auf die Angiogenese (Yue et al. 2007)

Bei der Entstehung der ersten Tumorzellen setzen bereits umfangreiche Umstrukturierungen ein. Das Expressionsmuster der Inhibitoren bzw. Aktivatoren der Angiogenese spielt eine entscheidende Rolle (Abbildung 1.1.).

Die Neubildung von Blutgefäßen hat verschiedenste molekulare Grundlagen. Die Expression und Lokalisation von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen, Integrinen und Inhibitoren sind von großer Bedeutung (Moschos et al. 2007, Deindl et al. 2005, Medinger et al. 2005).

Das Wachstum, sowie die Metastasierung aller soliden Tumoren sind von einer guten Durchblutung abhängig. Hat der Tumor eine Größe von 1-2 mm erreicht, kann er seine Versorgung nicht mehr durch reine Diffusion aufrechterhalten (Gevertz et al. 2006). Durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, beispielsweise VEGF und PDGF (platelet derived growth factor), die zu den benachbarten Endothelzellen diffundieren, setzt eine Veränderung des Zytoskeletts sowie eine proteolytische Zerstörung der Basalmembran ein. So wird durch die Sezernierung von Metalloproteasen, wie MMP-1 (Roebuck et al. 2005) und MMP-2 (Beliveau et al. 1999) aber auch von Plasminogen-Aktivatoren (Hesse et al. 2000) sowie durch die Modulation der Expression und Aktivierung von Integrinen (Heissig et al. 2003), eine Wanderung kleiner Zellausläufer in das Gewebe ermöglicht.

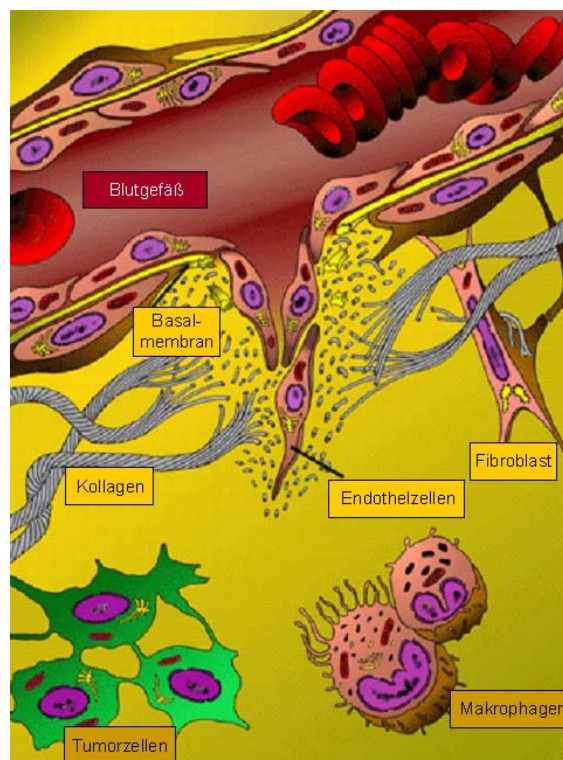


Abbildung 1.2.: Zellulärer Verlauf der Angiogenese (Homepage der Universität von Turin)

Durch austretende chemotaktische Stoffe, wie beispielsweise Chemokine werden T-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen angelockt (Kerrebijn et al. 1994, Monaco et al. 2004, Lin et al. 2004). Daraufhin setzt eine Proliferation und Migration von Endothelzellen in Richtung des Tumors ein (Abbildung 1.2.). Nach der Stabilisierung der Kapillarstruktur durch Perizyten und der Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten wie Elastin, Kollagen und Fibrillin werden die Kapillaren in größere Gefäße umgewandelt und erhalten Anschluss an das bestehende Gefäßnetz (Kroll 2000). Um dies zu gewährleisten, müssen zum Einen proangiogenetische Faktoren, beispielsweise VEGF und FGF (fibroblast growth factor) ausgeschüttet und zum Anderen antiangiogenetische Faktoren, wie zum Beispiel Angiostatin und Endostatin, unterdrückt werden (Abbildung 1.1.). Dies führt zum Wechsel vom avaskulären zum neovaskulären Zustand („angiogenic switch“) (Harris 1997, Locopo 1998). Dieser Vorgang wird vor allem durch eine Hypoxie und eine Hypoglykämie ausgelöst (Fiedler 2001).

Neue Kapillaren können ausschließlich durch Migration (Wanderung) von bestehenden Endothelzellen gebildet werden, allerdings kommt es auch regelmäßig zu einer Vermehrung von Endothelzellen (Proliferation). Die spätere Umwandlung der Kapillaren in Arterien und Venen wird durch die Aktivierung bestimmter Gene festgelegt. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass das Blutgefäßnetzwerk während des angiogenetischen Wachstums, die Proliferation von Endothelzellen und die Differenzierung von Arterien durch Mitglieder der Notch-Familie reguliert wird (Roca et al. 2007). Dagegen induziert der COUP-TFII Rezeptor die Differenzierung von Venen durch das Unterdrücken des Notch Signalweges und somit der Arteriogenese (Hirashima et al. 2006). Die anschließende Wandausbildung wird in beiden Fällen durch den Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Angiopoietin-1 reguliert (Distler et al. 2003) (Dunn et al. 2000).

Die Vaskularisierung fördert nicht nur ein Wachstum, sondern ermöglicht auch eine Metastasierung des Tumors. Die Basalmembranen der neu gebildeten Gefäße sind durchlässig, so dass eine Abwanderung von Tumorzellen erleichtert wird.

1.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist ein Heparin-bindendes, dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34 bis 43 kDa (Abbildung 1.3.). Das VEGF Gen ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert und enthält acht Exons. Durch alternatives Spleißing des primären

Transkriptes entstehen fünf VEGF-Isoformen mit unterschiedlicher Aminosäurenlänge (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, VEGF206) (Abbildung 1.3.). Die Spleißvarianten sind aus unterschiedlichen Exons aufgebaut (Neufeld et al. 1996). Dabei werden die Exons 1 bis 5 für den N-terminalen Bereich und Exon 8 für den C-terminalen Bereich exprimiert. Zu einer effektiven Sekretion kommt es nur bei den kürzeren Proteinen. Die 189 und 206 Aminosäuren langen Spleißvarianten werden an Heparansulfaten der Zelloberfläche oder an der extrazellulären Matrix gebunden. Dies resultiert aus dem alternativen Spleißen der Exons 6 und 7, welche für die Zellassoziaton und Heparinbindung verantwortlich sind (Houck et al. 1992) (Abbildung 1.4.A und B).

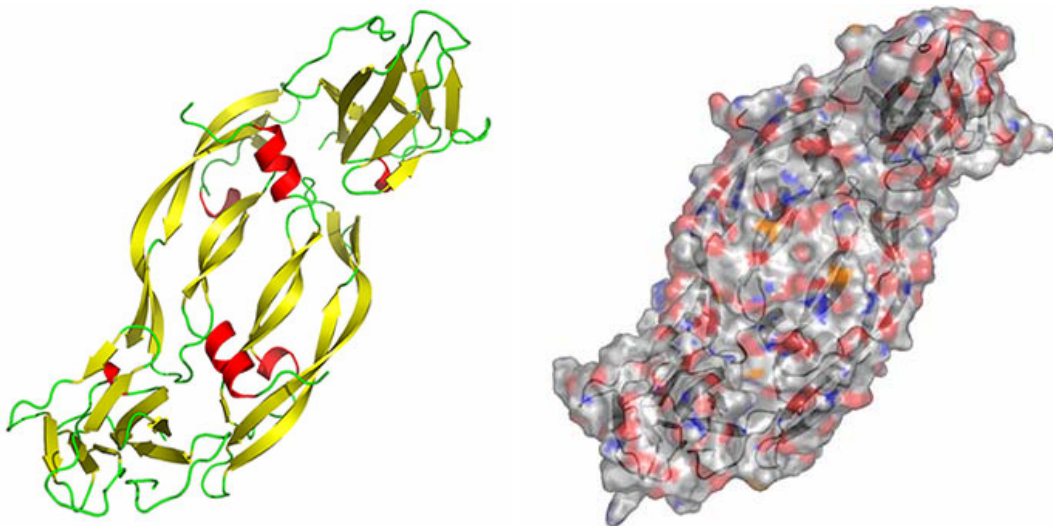


Abbildung 1.3.: Tertiärstruktur des VEGF-A (RSCB Protein Data Bank; Berman et al. 2000)

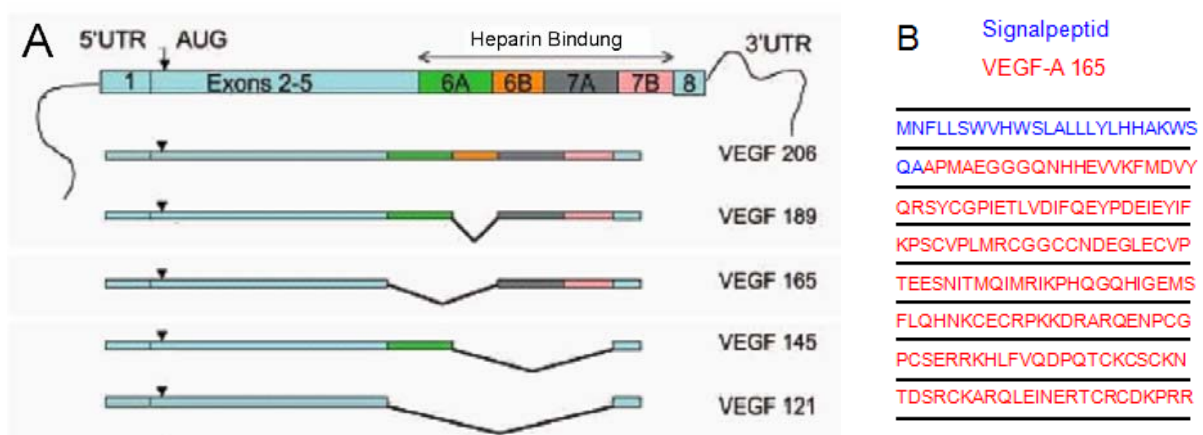


Abbildung 1.4.A: Alternatives Spleißen des primären Transkriptes von VEGF (Fergelot et al. 2005) B: Primärsequenz von VEGF-A₁₆₅ (NCBI Datenbank)

VEGF-A (im Folgenden kurz VEGF genannt) ist die am besten charakterisierte Form der VEGF Familie. Die VEGF – Familie besteht insgesamt aus sieben verschiedenen Proteinen, VEGF-A bis VEGF-F und PIGF (Placental Growth Factor), die alle eine gemeinsame VEGF homologe Domäne aufweisen und über unterschiedliche Affinitäten zu den drei VEGF Rezeptoren verfügen (Abbildung 1.5.). VEGF-B, das stark im Herzen exprimiert wird, ist in der Lage mit dem VEGF-A Heterodimere zu bilden (Olofsson et al. 1996). VEGF-C sowie VEGF-D, gebildet hauptsächlich in Herz und Lunge, verfügen im Vergleich zu VEGF-A über zusätzliche Eigenschaften. Sie werden erst im Laufe einer proteolytischen Umwandlung aktiv und beeinflussen die Bildung des lymphatischen Endothels (Achen et al. 1998, Joukov et al. 1997, Leu et al. 2000). Das VEGF-C findet sich vor allem im Blutserum (Houck et al. 1991). VEGF-E, ein Faktor der von Orf-Viren produziert wird, ist ebenfalls in der Lage die Proliferation von Endothelzellen und die Gefäßpermeabilität zu beeinflussen. VEGF-E ist Bestandteil des Schlangengiftes Vammin und PIGF bewirkt eine Migration proangiogener Monozyten sowie eine Expression von Gewebsthromboplastin (Tissue Factor). Das VEGF-A/PIGF Heterodimer ist auch in der Lage die Angiogenese direkt zu stimulieren.

Die verschiedenen Mitglieder der VEGF-Familie binden hochaffin an drei spezifische Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Bates et al 2002): VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR1; Flt-1) (Shibuya et al. 1989), VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2; KDR) (Terman et al. 1991) und VEGF-Rezeptor-3 (VEGFR-3; Flt-4) (Pajusola et al. 1992). Die Rezeptoren bestehen aus mehreren Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranen Domäne und einer Tyrosinkinase-Domäne, die durch ein Insert von ungefähr 100 Aminosäuren unterbrochen ist. Das Molekulargewicht beträgt ca. 220 kDa. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind Enzyme, die eine Proteinphosphorylierung von intrazellulären Funktionsproteinen bewirken und damit eine Signalkaskade innerhalb der Zelle auslösen (Kroll und Waltenberger 2000) (Abbildung 1.5.).

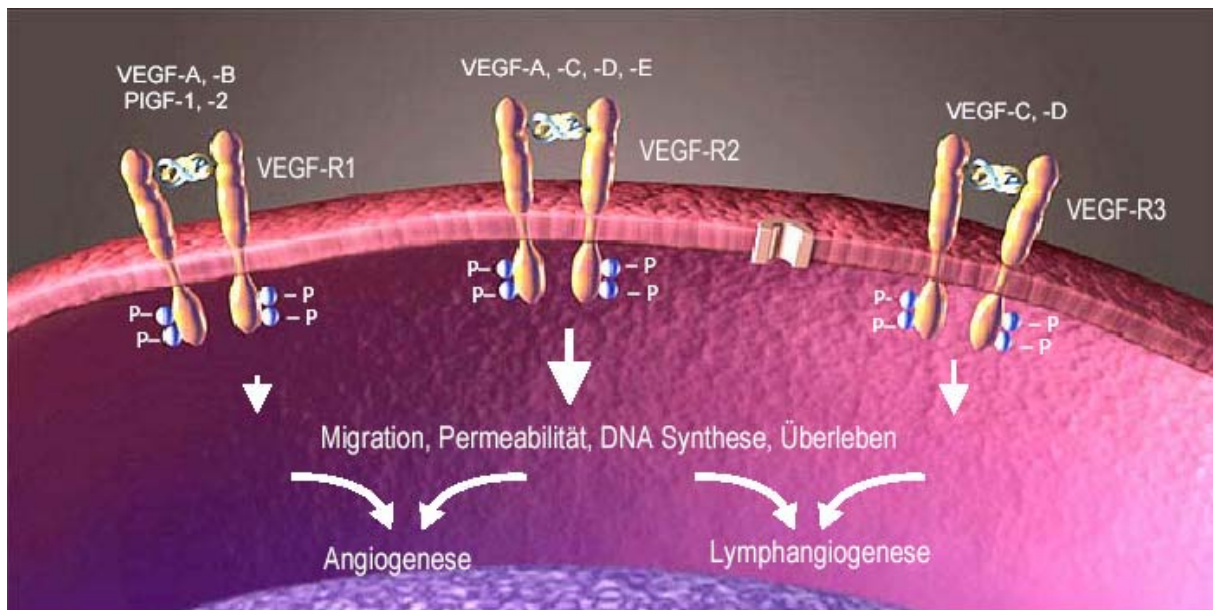


Abbildung 1.5.: Das VEGF/VEGF-Rezeptor Schema (Ferrara et al. 2003)

Die VEGF-Rezeptoren-1 und -2 konnten in Endothelzellen, Trophoblastzellen der Plazenta (Bogic et al. 2000), in Monozyten, Mesangiumzellen der Niere, hämatopoetischen Stammzellen und in Megakaryozyten nachgewiesen werden (Barleon et al. 1996, Charnock-Jones et al. 1994).

Alle Rezeptoren, an die VEGF mit einer hohen Affinität bindet, werden ausschließlich von Endothelzellen gebildet (Ferrara et al. 1991). Der VEGF-Rezeptor-1 besitzt eine entscheidende Rolle bei der endothelialen Organisation während der Gefäßentwicklung (Winther et al. 1999). Der VEGF-Rezeptor-2 ist für die Bildung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen während der Vaskulogenese notwendig (Shalaby et al. 1995) und der VEGF-Rezeptor-3 ist an der Lymphangiogenese beteiligt (Wissmann et al. 2002).

Da sich die Endothelzellen unter physiologischen Umständen beim Erwachsenen kaum noch teilen, verändert sich dieses dichte Netz aus Gefäßen nur sehr wenig. Ausnahmen sind die Neubildung von Kapillaren während der Wundheilung, der Schwangerschaft, des Menstruationszykluses, der Karzinogenese und nach Infarkten.

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der 1989 isoliert und charakterisiert wurde (Tischer et al. 1989), ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Angiogenese, sondern er stellt auch einen endothelzellspezifischen Wachstums- und Permeabilitätsfaktor dar (Folkman und Shing 1992; Heits et. al. 1998; Ferrara und Davis-Smyth 1997; Zheng et. al. 2006). Weiterhin wirkt VEGF chemotaktisch auf

Makrophagen und Endothelzellen (Cursiefen et al. 2004, Yoshida et al. 1996). Durch die Fähigkeit des Lösens von Zell-Zell-Kontakten nach Rezeptorbindung erhöht er auch die Gefäßdurchlässigkeit.

Eine Antitumorthherapie mit VEGF-neutralisierenden Antikörpern wird gerade klinisch erprobt, beispielsweise Bevacizumab (Ramaswamy et al 2006).

In der Embryonalperiode ist VEGF lebensnotwendig zur Entwicklung des kardio-vaskulären Systems (Carmeliet et al. 1996, Ferrara et al. 1996). VEGF bewirkt eine Induktion der Gefäßbildung, eine Proliferation von Endothelzellen sowie eine Migration und eine Inhibierung der Apoptose. Außerdem führt VEGF auch zu einer Vasodilatation, beispielsweise durch die Stimulierung der NO-Synthase in Endothelzellen (Yang et al. 1996).

VEGF spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Angiogenese. Deswegen wird seine Expression durch sehr viele verschiedene externe Faktoren beeinflusst. Eine Induktion der Genexpression erfolgt unter anderem durch Hypoxie (Kaur et al. 2006), Hypoglykämie, unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TGF- β (Transforming Growth Factor), FGF-2 (fibroblast growth factor 2) (Esch et al 1985, Gospodarowicz et al. 1987) FGF-4 (fibroblast growth factor 4) (Deroanne et al. 1997), PDGF (platelet derived growth factor) (Finkenzeller et al. 1997) und TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) (Ryuto et al. 1996) sowie durch Ang II (Angiotensin II) (Chua et al. 1998) und Hormone wie beispielsweise Östrogen und Testosteron (Shweiki et al. 1993, Ruohola et al. 1999). Hypoxie und Hypoglykämie sind die stärksten Stimulatoren der VEGF-Expression (Shweiki et al. 1992). Die Hypoxie-induzierte Transkription der VEGF-mRNA ist dabei abhängig von der Bindung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (hypoxia-inducible-factors-1) an eine HIF-1 Bindungsstelle auf dem VEGF-Promotor (Liu et al. 1995). Außerdem wurde beobachtet, dass nicht nur Sauerstoffmangel, sondern auch Onkogene, beispielsweise v-src, die Expression von HIF-1 induzieren können (Jiang et al. 1997). Die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen, wie beispielsweise dem p53 (Van Meir et al. 1994) oder dem Hippel-Lindau (vHL)-Gen (Maher et al. 1997), sind weitere Mechanismen, die zu einer Überexpression von VEGF führen.

1.3. Molekulare Bildgebung

Das Ziel der Molekularen Bildgebung ist es, Krankheiten auf molekularer Ebene zu detektieren und für die medizinische Diagnose zu nutzen. Außer der Früherkennung

von Krankheiten ermöglicht es die Molekulare Bildgebung auch, die Wirksamkeit eines Medikamentes über molekulare Marker der Krankheit praktisch in Echtzeit nachzuweisen.

Das Prinzip beruht darauf, dass ein signalgebendes Molekül mit einem Transportmolekül verbunden wird. Letzteres können bestimmte Liganden, wie beispielsweise Antikörper oder deren Fragmente, Aptamere, einfache Peptidsequenzen oder Oligonukleotide sein. Diese Liganden sind spezifisch für molekulare Marker bestimmter Krankheiten. Eine hohe Selektivität bewirkt eine Anreicherung der an sie gebundenen signalgebenden Moleküle, die anschließend mittels bildgebender Verfahren lokalisiert werden können.

Pathogen veränderte Zellen weisen bereits im Frühstadium ihrer Entwicklung eine Reihe von pathologischen Merkmalen auf, beispielsweise einen veränderten Metabolismus, eine veränderte Genexpression und veränderte Oberflächenstrukturen (Gieldon et al. 2007, Hanigan et al. 1999, Talantov et al. 2006, Burnworth et al. 2006, Lonardo et al. 1999). Dieses nutzt die Molekulare Bildgebung zur Detektion von pathologisch alterierten Strukturen. Dazu werden verschiedene Signalmoleküle an ein anderes Molekül („Erkennungsmolekül“) gekoppelt, das dann hochspezifisch die pathogen veränderte Zellstruktur (zum Beispiel Rezeptorexpression) erkennt. Das Erkennungsmolekül kann ein Ligand für einen bestimmten Rezeptor sein, ein Antikörper, der gegen den Rezeptor oder gegen eine andere Zelloberflächenstruktur gerichtet ist oder aber auch das Substrat eines bestimmten Enzyms sein (Garanger et al. 2007).

Kontrastmittel verbessern die Darstellung von Strukturen und Funktionen des Körpers in bildgebenden Verfahren. Die Wirkung von Kontrastmitteln besteht darin, dass sie das Signal, das in der jeweiligen Untersuchung registriert wird, modifizieren, wodurch Zusatzinformationen gewonnen werden.

Das Konzept der Molekularen Bildgebung wird für eine Vielzahl von Diagnoseverfahren entwickelt. Zu ihnen zählen die Magnetresonanztomographie (MRT), die Sonographie (Ultraschall), die Computertomographie (CT), die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), sowie die optische Bildgebung.

1.3.1. Positronenemissionstomographie (PET)

1.3.1.1. Methodenbeschreibung

Das bildgebende Verfahren der Nuklearmedizin detektiert schwach radioaktiv markierte Substanzen (Radiopharmakon oder Tracer) im lebenden Organismus. Die Radiopharmakons emittieren Positronen (β^+ -Strahler), die mit Elektronen im Körper wechselwirken, so dass Photonen ausgesandt werden. Das PET-Gerät enthält viele ringförmige, um den Patienten angeordnete Detektoren für die Photonen, wodurch auf die räumliche Verteilung des Radionukleotides im Körperinneren geschlossen werden kann.

1.3.1.2. Einsatz von Kontrastmitteln

Am weitesten fortgeschritten ist die Molekulare Bildgebung mit Radionukleotiden. Es handelt sich hierbei um radioaktive Substanzen (Tracer), welche sich in bestimmten Organen anreichern oder verstoffwechselt werden und somit eine Aussage über die Funktion eines Organs erlauben.

Das meist verwendete Radionuklid ist das radioaktive Isotop des Fluor (^{18}F). Mit der PET lassen sich funktionelle Prozesse über radioaktive Metabolite, Liganden oder Pharmaka darstellen. Beispielsweise nehmen Tumorzellen Glukose viel schneller auf als gesunde Zellen. ^{18}F -Desoxyglukose (FDG) wird von stoffwechselaktiven Zellen, wie Tumorzellen, verstärkt über Glukosetransporter aufgenommen und verbleibt in den Zellen. Somit kann Gewebe mit einem besonders starken Stoffwechsel (beispielsweise Tumorgewebe) vom gesunden Gewebe abgegrenzt werden. Technetium-99 ist ein weiteres Radionukleotid, das häufig für diagnostische Problemstellungen verwendet wird. Verabreichte Technetium-Phosphonate reichern sich beispielsweise in Knochenbereichen an, die eine erhöhte Zellaktivität aufweisen, wie sie bei Entzündungen, Tumoren und Frakturen auftreten.

1.3.2. Computertomographie (CT)

1.3.2.1. Methodenbeschreibung

Die Computertomographie besteht aus rotierenden Röntgenröhren. Die unterschiedlich dichten Gewebe des menschlichen Körpers absorbieren die Röntgenstrahlen unterschiedlich stark. Die hervorgerufenen Schwächungen der Röntgenstrahlung werden aus verschiedenen Richtungen durch einen Computer ausgewertet, um eine 3D – Rekonstruktion aus Einzelschnitten zu erreichen. Die CT

wird für die Darstellung von Knochen, inneren Organen, Weichteilen, der Muskulatur und der Gefäße, nach Injektion eines entsprechenden Kontrastmittels, eingesetzt. Der Nachteil der CT ist die Strahlenbelastung, die um bis zu 1000 mal höher ist als bei einer normalen Röntgenaufnahme.

1.3.2.2. Einsatz von Kontrastmitteln

Röntgenkontrastmittel erhöhen den Kontrast von Organen und Organsystemen. Ziel ist eine Differenzierung zwischen Geweben mit ähnlicher Röntgendichte. Die Kontrasterhöhung kann durch Substanzen sehr geringer oder fehlender Absorption geschehen, sog. „negative Kontrastmittel“, oder durch Substanzen sehr hoher Absorption, sog. „positive Kontrastmittel“. Negative Kontrastmittel, wie Luft oder Kohlendioxid, absorbieren Röntgenstrahlen nicht, wodurch sie die Röntgendichte herabsetzen, was zu einer erhöhten Strahlendurchlässigkeit führt. Als positive Kontrastmittel bieten sich Substanzen mit hoher Ordnungszahl an. Zum Einsatz kommen Jod und Barium. Barium liegt in Form einer wässrigen Suspension von Bariumsulfat vor. Jodhaltige Kontrastmittel sind Derivate der Benzoesäure, an die drei Jodatome gebunden sind (Abbildung 1.6.).

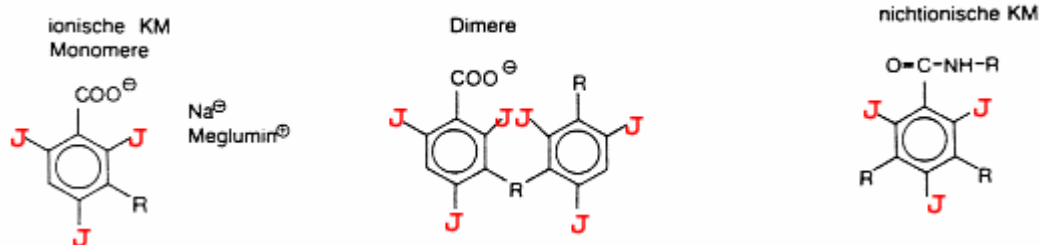


Abbildung 1.6.: Verschiedene Strukturen von Jodhaltigen-Kontrastmitteln in der Röntgendiagnostik

Dabei bestimmen die chemischen Eigenschaften der am Benzolring gebundenen Seitenketten nicht nur das physikalisch-chemische Verhalten der Substanz, wie die Wasserlöslichkeit oder das Fließverhalten der Lösung, sondern auch das biologische Verhalten (Hita Rosino et al. 1999).

Durch die Injektion werfen die Gefäße Röntgenschatten und werden so sichtbar (Angiografie) (Widmark 2007). Als Kontraindikation für eine Anwendung gelten außer einer Jodallergie auch eine höhergradig eingeschränkte Nierenfunktion (Diekmann et al. 2003), sowie eine Schilddrüsenüberfunktion (Schröder 2005, del Cerro Marin et al. 2000).

1.3.3. Ultraschall (Sonographie)

1.3.3.1. Methodenbeschreibung

In der Sonographie wird ein Schallkopf eingesetzt, der Ultraschallwellen aussendet, die abhängig von der Gewebearart absorbiert oder reflektiert werden. Der Schallkopf dient sowohl als Schallsender als auch als Schallempfänger. Die Sonographie ist ein Standardverfahren zur Darstellung verschiedener Weichteilstrukturen und deren Erkrankungen. Dabei sind die Schallwellen im Gegensatz zu den Röntgenstrahlen ungefährlich. Allerdings weist das Verfahren eine geringere Raum- und Kontrastauflösung auf, als die MRT. Außerdem ist der Kontrast zwischen gesunden und kranken Gewebe generell sehr schwach, so dass eine spezifische Anlagerung von Kontrastmitteln notwendig wird (Hughes et al. 2003).

1.3.3.2. Einsatz von Kontrastmitteln

Die Aufnahme von Ultraschallbildsequenzen, insbesondere in Verbindung mit Kontrastmitteln, erlaubt die Beurteilung der Perfusion verschiedener Organe, wie zum Beispiel Leber und Gehirn durch die Verlaufs-Visualisierung des Kontrastmittelniveaus im Blutkreislauf (Albrecht et al. 2004).

Verwendet werden gasgefüllte Mikrobläschen-Kontrastmittel (Microbubbles). Sie dienen vor allem zur verbesserten Detektion und Charakterisierung von Lebertumoren (Ferrara et al. 2007), können aber auch für den Plasmidtransfer in Zellen eingesetzt werden (Suzuki et al. 2007) (Abbildung 1.7.A). Zusätzlich erlauben tumor-gerichtete Microbubbles eine Darstellung von spezifischen biologischen Prozessen (Quaia 2007). Durch eine Bindung an den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin konnte die Tumorangiogenese in Ratten nachgewiesen werden (Ellegala et al. 2003). Dabei wurde Echistatin, ein RGD Peptid aus Schlangengift, das eine hohe Affinität gegenüber dem Integrin aufweist, an die Oberfläche der Microbubbles konjugiert.

Microbubbles unterscheiden sich untereinander im Wesentlichen hinsichtlich ihrer Hülle und ihrem Gasinhalt. Die Größe beträgt zwischen 1 und 4 μm (Abbildung 1.7.B). Im Ultraschallfeld beginnen die Mikrobläschen zu oszillieren.

Microbubbles sind besonders geeignet, um Ziele innerhalb der Blutgefäße sichtbar zu machen. Für eine Markierung außerhalb der Blutgefäße sind Partikel erforderlich, die über einen Durchmesser von weniger als 500 nm verfügen.

Außer den Microbubbles werden in der Sonographie auch perfluorierte Kohlenwasserstoffpartikel, die über eine Lipidhülle verfügen, eingesetzt. Nach einer

Konjugation mit Biotin konnte in Kombination mit einem biotinylierten Antikörper der Nachweis von feinen arteriellen Blutgerinnseln erbracht werden (Dayton et al. 2002)

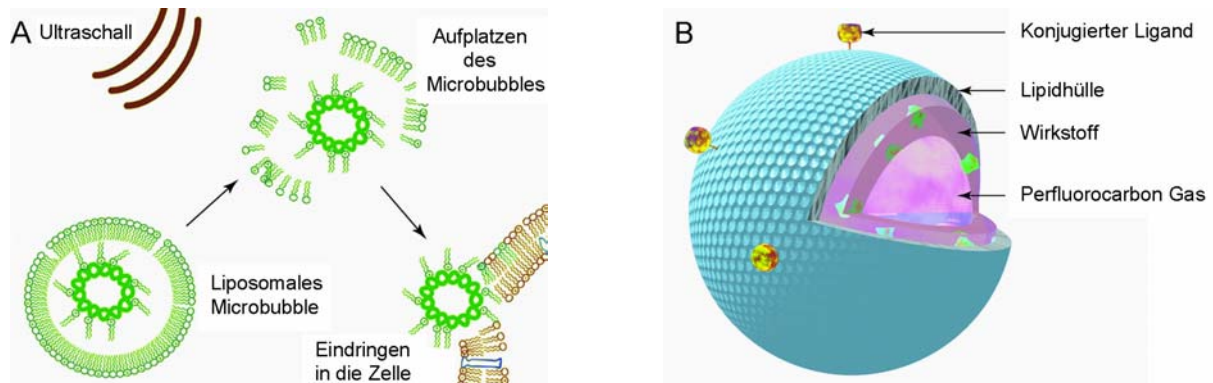


Abbildung 1.7.A: Schema des Gentransfers in Zellen mit Hilfe von Microbubbles B: Struktur eines spezifischen Microbubbles (Blomley et al. 2001)

1.3.4. Magnetresonanztomographie (MRT)

In der vorliegenden Arbeit wurden die MRT sowie die optische Bildgebung, mit dem Schwerpunkt auf der Fluoreszenz, eingesetzt.

1.3.4.1. Methodenbeschreibung

In der MRT werden Schnittbilder des menschlichen Körper erzeugt, die einen Vergleich und eine Orientierung an anatomischen Schnitten derselben Region zulassen und oft eine sehr gute Beurteilung der Organe und vieler Organveränderungen erlauben. Die MRT nutzt magnetische Felder und hochfrequente elektromagnetische Wellen. Grundlage für die Bildgebung ist die unterschiedliche Empfindlichkeit (Suszeptibilität) der untersuchten Gewebe.

Die Untersuchungsmethode beruht auf dem physikalischen Prinzip, dass Atomkerne mit ungerader Protonen- oder Neutronenzahl über einen Eigendrehimpuls, den sog. Spin verfügen. Dadurch werden sie zu winzigen Magneten. Der für die Messung geeignetste Atomkern ist das Wasserstoffatom. Daher liefert das MRT vor allem von wasserhaltigen Geweben sehr genaue und differenzierte Darstellungen, beispielsweise von inneren Organen, Gelenkknorpel, Meniskus, Rückenmark und Gehirn.

Die Ausrichtung der Spins und damit des Magnetfeldes ist im Normalzustand ungeordnet. Durch Anlegen eines starken statischen Magnetfeldes B_0 ist es möglich, die Rotationsachse aller Teilchen parallel bzw. antiparallel auszurichten. Die Atomkerne vollführen eine Kreisbewegung um die Feldlinien des äußeren

Magnetfeldes, die man auch als Präzessionsbewegung bezeichnet (Abbildung 1.8.). Die Frequenz dieser Bewegung wird Larmor – Frequenz genannt.

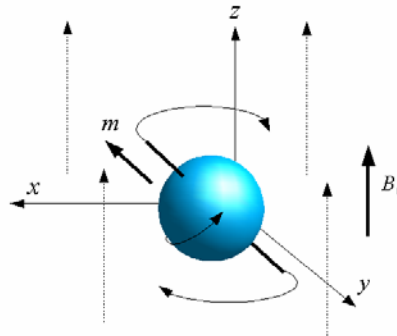


Abbildung 1.8.: Präzessionsbewegung des Atomkerns durch das statische Magnetfeld B_0 .

Die Ausrichtung der Kernspins alleine würde keine Bilddarstellung erzeugen. Wird ein zweites Feld (Transversalfeld) B_T , bestehend aus kurzen Hochfrequenzimpulsen, angelegt, welches sich senkrecht zur Richtung des ersten Magnetfeldes B_0 befindet, werden die nach dem äußeren Magnetfeld ausgerichteten Kernspins um 90° gekippt. Eine weitere Folge des Impulses ist, dass die Kreisbewegungen (Präzession) aller Atome kurzzeitig synchronisiert (sog. Phasenkohärenz) werden. Dadurch entsteht eine senkrecht zu den Feldlinien des äußeren Magnetfeldes verlaufende Transversalmagnetisierung. Die Frequenz des Impulses (Resonanzfrequenz) entspricht dabei der Larmor-Frequenz. Sie hängt von der Stärke des eingepprägten Magnetfeldes und vom Aufbau des Kerns ab. Durch die Wahl der Stärke des ersten (statischen) Feldes B_0 und die Wahl der Frequenz der Transversalfeldes B_T kann sehr genau bestimmt werden, welche Kerne in Resonanz geraten sollen.

Wird das transversale Wechselfeld, welches das magnetische Moment m eines Kerns um 90° gekippt hat, abgeschaltet, so rotiert der Kern weiter in der xy -Ebene. Bringt man nun eine Spule in die Nähe des rotierenden magnetischen Moments, so wird in dieser eine Spannung induziert. Da die Messspulen gewöhnlich normal auf der xy -Ebene stehen, ist die gemessene Spannung proportional zur Quermagnetisierung m_T des magnetischen Moments m (Abbildung 1.9.). Die Quermagnetisierung ist vom Ort und vom Gewebetyp abhängig.

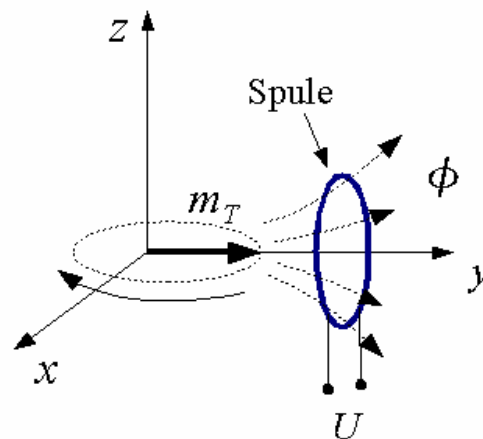


Abbildung 1.9.: Induktion einer Spannung durch die Quermagnetisierung m_T .

Die Erzeugung von Schichtbildern kann durch die Messung der T1-Relaxation (r_1) sowie durch die Messung der T2-Relaxation (r_2) erreicht werden.

Nach Abschalten des Transversalfeldes B_T richten sich die Kernspins, die zuvor in der xy-Ebene präzedierten, während die z-Komponente der Magnetisierung den Wert Null angenommen hatte, wieder entlang des ersten (statischen) Magnetfeldes B_0 aus. Dabei geben sie Energie in Form von Wärme an die Umgebung ab. Die Ausrichtung erfolgt exponentiell: $M_z(t) = M_0 \times (1 - ce^{-t/T_1})$

wobei M_0 die Stärke der Magnetisierung in Richtung von B_0 im Gleichgewichtszustand ist. Die Konstante c gibt an, in welchem Zustand außerhalb des Gleichgewichtes sich das System zu Beginn des Relaxationsprozesses befindet (beispielsweise $c = 1$; Sättigung, $c = 2$; Inversion). Die Zeit bis die z-Komponente ungefähr 64% ihres Ausgangswertes wieder erreicht hat, nennt man Spin-Gitter-Relaxationszeit oder T1-Zeit. Sie hängt wesentlich von der Wärmeleitfähigkeit des Gewebes ab. Gewebe mit schnellem Wärmetransfer (zum Beispiel Fettgewebe) stellen sich in T1-gewichteten Bildern hell dar, während Gewebe mit langsamem Wärmetransfer (beispielsweise Liquor) dunkel erscheinen.

Während der Messung der T2-Relaxation wird ein anderer Aspekt gemessen. Mit dem Ausschalten des Transversalfeldes B_T verlieren die Atomkerne auch ihre phasensynchronen Kreisbewegungen. Die Zeit, nach dem 63% des Signales zerfallen ist, nennt man T2-Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxation). Die Zeit hängt von der chemischen Bindung des Wasserstoffs ab, was für jede Gewebsart unterschiedlich ist. Der Zerfall lässt sich wieder durch eine Exponentialfunktion

darstellen: $M_T(t) = M_T(0) \times e^{-t/T_2}$. Gewebe, die eine Transversalmagnetisierung relativ lange aufrechterhalten können, stellen sich in T2-gewichteten Bildern hell dar (beispielsweise Wasser). T1-gewichtete Messsequenzen erlauben wegen des stärkeren Signals eine bessere Ortsauflösung, aber einen geringeren Gewebekontrast, als T2-gewichtete Bilder. Für Eisenoxidnanopartikel überwiegt der Einfluss auf die T2-Zeit (Taupitz et al. 2003). Entsprechend der Konzentration der Eisenoxidnanopartikel und der gewählten Pulssequenzen kann es bis zur kompletten Signalauslöschung kommen. Üblicherweise werden die Relaxationszeit verkürzenden Eigenschaften der MR-Kontrastmittel durch die Relaxivität ausgedrückt. Die T2*-Relaxationszeit repräsentiert eine kleine jedoch wichtige Veränderung im Vergleich zur T2-Relaxationszeit. Die T2*-gewichteten Sequenzen sind sensitiv gegenüber magnetischen Inhomogenitäten, so dass eine empfindliche Detektion von Eisen, das eine Störung des Magnetfeldes verursacht, möglich ist.

Um die Signale den einzelnen Volumenelementen (Voxeln) zuordnen zu können, wird mit abgestuften Magnetfeldern (Gradientenfeldern) eine Ortskodierung erzeugt. Der erste Gradient liegt bei der Anregung an und stellt sicher, dass nur eine einzelne Schicht des Körpers die passende Larmorfrequenz besitzt, also nur die Spins dieser Schicht ausgelenkt werden (Schichtselektionsgradient). Ein zweiter Gradient quer zum Ersten wird nach der Anregung kurz eingeschaltet und bewirkt eine kontrollierte Dephasierung des Spins, so dass in jeder Bildzeile die Präzession der Spins eine andere Phasenlage erhält (Phasenkodiergradient). Der dritte Gradient wird während der Messung rechtwinklig zu den beiden anderen geschaltet. Dadurch besitzen die Spins jeder Bildspalte eine andere Präzessionsgeschwindigkeit, also eine andere Larmorfrequenz (Auslesegradient, Frequenzkodiergradient). Alle drei Gradienten zusammen bewirken eine Kodierung des Signals in drei Raumebenen. Das empfangene Signal gehört zu einer bestimmten Schicht des Körpers und enthält eine Kombination aus Frequenz- und Phasenkodierung, die der Computer mit einer Fourier-Transformation auflösen kann.

Maßgeblich für die Auflösung eines MRT ist die angelegte magnetische Flussdichte B in Tesla (Reichenbach et al. 2000). Ein Tesla entspricht ungefähr der 20.000 fachen Stärke des Erdmagnetfeldes. Die Signalstärke der Voxel wird in Grauwerten kodiert abgebildet. Da sie von zahlreichen Parametern abhängt, etwa der Magnetfeldstärke, gibt es keine Normwerte für das Signal bestimmter Gewebe und keine definierte Einheit. Die Bildinterpretation stützt sich stattdessen auf den

Gesamtkontrast, die jeweilige Gewichtung der Messequenz und die Signalunterschiede zwischen bekannten und unbekanntem Geweben.

1.3.4.2. Einsatz von Kontrastmitteln

Eine Limitierung der MRT ergibt sich dadurch, dass die relative Dichte an Wasserstoffkernen in verschiedenen Geweben sehr ähnlich ist. Aus diesem Grund werden während der Aufnahme von MRT-Bildern Kontrastmittel eingesetzt, die sich in bestimmten Geweben anreichern. Sie verändern den Energietransfer zwischen Wasserstoffkernen und Molekülen in ihrer Umgebung und beeinflussen damit das MRT-Signal.

Zurzeit gibt es folgende verschiedene Kontrastmittel für die MRT:

1. Gadoliniumhaltige Kontrastmittel, die sich ebenso wie jodhaltige Kontrastmittel in den zwischengeweblichen Räumen des Körpers verteilen.
2. Gadoliniumhaltige Kontrastmittel, die ähnlich wie jodhaltige Kontrastmittel sind, aber stärker an Bluteiweiße binden und somit mehr innerhalb der Blutgefäße verbleiben. Hierdurch werden diese besser dargestellt und zeigen deutlicher eine Leckage auf.
3. Gadoliniumhaltige Kontrastmittel zum Trinken, die den Magen-Darm-Trakt hell zeigen.
4. Eisenhaltige Kontrastmittel zum Trinken, die den Magen-Darm-Trakt dunkel zeigen.
5. Große Eisenpartikel-enthaltende Kontrastmittel, die von Leberzellen aufgenommen werden und dazu führen, dass diese im Bild „schwarz“ erscheinen. Pathogen veränderte Zellenansammlungen, beispielsweise Lebertumore, fallen als helle Areale auf.
6. Kleine Eisenpartikel-enthaltende Kontrastmittel, die länger in Blutgefäßen verbleiben und eine bessere Gefäßdarstellung ermöglichen.
7. Manganverbindungen als Leberkontrastmittel (gesundes Parenchym erscheint signalreich d.h. hell; Tumoren / Metastasen signalarm d.h. dunkel)
8. Wasser als natürliches Kontrastmittel (Luminisation) wird teilweise für Untersuchungen des Magen-Darm-Traktes verwendet.
9. Hyperpolarisiertes $^{129}\text{Xenon}$ oder $^3\text{Helium}$ als Kontrastmittel

Gadolinium ist ein Metall aus der Gruppe der Lanthaniden. Aufgrund der hohen Toxizität von freien Gadolinium-Ionen werden Komplexierungsmittel, wie beispielsweise das Chelat DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure), verwendet. Der Gadolinium-Chelat-Komplex ermöglicht es durch dessen Paramagnetismus den umgebenden Protonen (im wesentlichen Wasser) schneller zu relaxieren. Insbesondere die T1-Zeit wird verkürzt. Bereiche, in denen sich das Kontrastmittel anreichert, werden daher in T1-gewichteten Bildern heller dargestellt, wodurch die Qualität einer MRT-Aufnahme erhöht wird. In pathologischen Geweben kommt es zu einer vermehrten Anreicherung, was bei der Bildgebung ausgenutzt wird (Tweedle 2007). Das Gadolinium reichert sich größtenteils in Läsionen an, die erst kürzlich entstanden sind. Allerdings nehmen zweidrittel aller Läsionen vier bis sechs Wochen nach ihrer Entstehung kein Gadolinium mehr auf. Auch für Untersuchungen von Störungen der Blut-Hirn-Schranke werden Gadolinium-Verbindungen eingesetzt.

Ein weiterer Ansatz beinhaltet die Verwendung von Perfluorocarbon-Nanopartikel, die von einer Lipidschicht umgeben sind. In der Lipidschicht können Antikörper bzw. Peptide eingelagert werden. Zusätzlich werden ungefähr 50.000 Gadolinium-Chelatkomplexe als bildgebende Komponente an die Nanopartikel geheftet. In diesem Zusammenhang wurde Fibrin mit den Partikeln für die Diagnose von arteriosklerotischen Plaques verwendet (Winter et al. 2003).

Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIO) können mit verschiedenen Partikelgrößen und Oberflächenbeschichtungen hergestellt werden. Superparamagnetismus beschreibt die Eigenschaft von sehr kleinen Eisenoxidnanopartikel sich im Magnetfeld ähnlich wie ein Ferromagnet (zum Beispiel Stabmagnet) stark magnetisieren zu lassen, im Gegensatz zum Ferromagnet jedoch nach Abschalten des Magnetfeldes keine Restmagnetisierung aufzuweisen. Häufig werden sie, wie SHU-555A (Resovist), in der MRT zur Kontrastierung der Leber und Milz eingesetzt (Savranoglu et al. 2006). Weiterhin liegen die Schwerpunkte auf der Lymphknotendiagnostik sowie auf morphologischen und funktionellen MRT Untersuchung des Knochenmarks. Eine entsprechende Modifikation der Partikelhülle ermöglicht Ansätze, wie eine Rezeptor-gerichtete Bildgebung oder Markierung von Zellen zur in-vivo Bildgebung der Zellmigration. In der Tumorthherapie können die SPIO auch als Vermittler für die Hyperthermie eingesetzt werden (Taupitz et al. 2003). Durch die direkte Injektion von Eisenoxidnanopartikeln wird durch ein magnetisches Wechselfeld eine Erwärmung des Tumorgewebes auf eine Temperatur

von über 45°C erreicht (Moroz et al. 2002). Durch die Erwärmung wird die Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber zellzerstörenden Medikamenten und Strahlung stark erhöht. Allerdings verfügen die Partikel noch über keine Zielfindungsmoleküle, so dass die Injektion in das Tumorgewebe erfolgen muss. Somit ist die Behandlung von metastasierenden oder multifokal ausgedehnten Krebserkrankungen nicht möglich.

Weiterhin können die SPIO für eine in-vivo Darstellung der Zellmigration verwendet werden. Nach der Inkubation mit den Partikeln und anschließender Implantation der Zellen in das Zielgewebe kann durch die MRT der Verbleib dieser Zellen verfolgt werden. Insbesondere für die Stammzellentherapie wird mit dieser Methode die Verteilung der implantierten Zellen untersucht. Um eine starke Aufnahme durch die Zellen zu erreichen, wurden die Nanopartikel beispielsweise in ein Gerüst von Dendrimeren eingelagert. Durch die Markierung zeigten die Zellen weder Wachstumsstörungen noch ein verändertes Verhalten in der Differenzierung (Bulte et al. 2001). Magnetisch markierte neurale Progenitorzellen konnten in-vivo bis zu sechs Wochen nach Implantation nachgewiesen werden (Bulte et al. 2002). In ähnlichen Ansätzen wurden auch Entzündungszellen, wie beispielsweise T-Zellen und Neutrophile Granulozyten, ex-vivo mit Eisenoxidnanopartikeln markiert. Nach der Injektion reicherten sich die Zellen an Entzündungsherden an (Krieg et al. 1995).

Zusätzlich sind zur Diagnostik von Lebermetastasen Manganverbindungen als paramagnetisches Kontrastmittel entwickelt worden. Mangan ist ein Übergangsmetall mit fünf ungepaarten Elektronen. Das Kontrastmittel bewirkt eine Verringerung der Schwellengröße erkennbarer Metastasen und gute Kontrastierung von sowohl Leberparenchym als auch hepatogenen Tumoren oder Hyperplasien (Hamm et al. 1992).

Außerdem kann anstelle der Wasserstoffkerne hoch polarisiertes Heliumgas als Signalquelle verwendet werden. Anhand des Resonanzsignals kann man den Diffusionsweg eines Heliums – 3 – Atoms durch die Lunge verfolgen und normales, engmaschiges Bläschengewebe von krankhaft aufgeblähtem unterscheiden (Cai et al. 2007). Nebenwirkungen müssen nicht befürchtet werden, da das Gas nicht giftig ist und es nach dem Einatmen so gut wie nicht ins Blut aufgenommen wird. Ebenfalls können durch die Inhalation von hyperpolarisiertem Xenon gute MRT Aufnahmen der menschlichen Lunge erzeugt werden (Patz et al. 2007).

1.3.5. Optische Bildgebung

Die optische Bildgebung basiert auf der Detektion von Licht, das von vitalen Zellen oder Gewebe emittiert wird. Zurzeit gibt es drei Hauptgruppen. Die Biolumineszenz, fluoreszierende Proteine, fluoreszierende Farbstoffe bzw. fluoreszierende Nanopartikel. Die Biolumineszenz und die fluoreszierenden Proteine benötigen eine entsprechende Zelllinie oder transgene Tiere, die das notwendige Gen tragen. Die Fluoreszenzfarbstoffe unterliegen nicht dieser Einschränkung, wodurch sie für einen klinischen Einsatz in Frage kommen. Allerdings können optische Methoden aufgrund der geringen Eindringtiefe von sichtbarem und infrarotem Licht nur für die Untersuchung von oberflächennahem bzw. endoskopierbarem Gewebe angewendet werden.

1.3.5.1. Biolumineszenz

Als Biolumineszenz bezeichnet man die Fähigkeit von Lebewesen Licht zu erzeugen. Die Biolumineszenz ist eine spezielle Art der Lumineszenz und wird unter anderem in der Molekularbiologie als Markierungsmethode eingesetzt. Sie basiert auf den Übergang eines Elektrons aus einem angeregten Zustand in einen energetisch tieferliegenden Zustand, das zu einer Emission von Licht führt. Anders als bei der Fluoreszenz wird der angeregte Zustand jedoch durch eine chemische Reaktion erreicht (Chemolumineszenz). Durch eine exergone Oxidation von Luciferinen mit Sauerstoff wird Energie in Form von Licht abgegeben. Während der Luciferase katalysierten Reaktion wird meist eine Teilgruppe des Luciferin abgespalten. Mit Hilfe von Luciferase-transfizierten Tumorzellen kann beispielsweise das Metastasierungsverhalten verfolgt werden (Wetterwald et al. 2002).

1.3.5.2. Fluoreszierende Proteine

Fluoreszierende Proteine stammen unter anderem aus Quallen, wie die *Aequorea victoria* (GFP = grün fluoreszierende Protein) und Korallen (Anthozoa), wie die *Discosoma* (DsRed = rot fluoreszierende Protein drFP583) (Verkhusha et al. 2004). Fluoreszierende Proteine können auf DNA-Ebene mit anderen beliebigen Proteinen fusioniert und anschließend in Zellen transfiziert werden. Die zeitliche und räumliche Lokalisation des Fusionsproteins kann dann durch die Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden (Chalfie et al. 1994). Die Fluoreszenz der Proteine basiert nicht auf einen Umbau durch ein externes Enzym oder auf nachträglich integrierte

Substanzen, womit sie von zellspezifischen Prozessierungssystemen vollständig unabhängig ist.

1.3.5.3. Fluoreszenzfarbstoff / Fluoreszierende Nanopartikel

Fluoreszenz als auch Phosphoreszenz sind Formen der Lumineszenz. Allerdings kommt es bei der Phosphoreszenz zu einem Nachleuchten, das Sekunden bis sogar Stunden anhalten kann. Das Verhalten der Absorption von kurzwelligem Licht und Emission von längerwelligem Licht wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Typische Fluorophore, physikalische Systeme bei denen Fluoreszenz auftritt, sind Atome, Moleküle, Ionen und Halbleiternanopartikel.

Fluorophore zeigen ganz bestimmte Absorptionsspektren, die vom Aufbau der Fluoreszenzmoleküle und manchmal auch von ihrer Umgebung abhängen. Auch wird nicht jedes Photon absorbiert, sondern nur ein Teil des bestrahlten Lichtes. Die eingefangenen Photonen werden auch nicht alle wieder abgestrahlt. Gute Fluoreszenzmarker besitzen eine hohe „Quantenausbeute“, womit man das Verhältnis der abgestrahlten zu den eingefangenen Photonen beschreibt.

Bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren hierbei die Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Die Elektronen können sich allerdings nicht auf diesem Energieniveau halten und fallen deshalb praktisch unmittelbar danach auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dadurch wird die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenzlicht wieder abgegeben. Die Differenz zwischen den beiden Lichtarten, meistens 20 bis 50 nm, wird als Stokes-Differenz bezeichnet (Abbildung 1.10.). Damit ist es durch Auswahl des entsprechenden Filters möglich, kurzwelligeres Anregungslicht und schwächeres langwelligeres Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Mikroskops zu trennen. Es gelangt nur noch das Fluoreszenzlicht zur Bildentstehung.

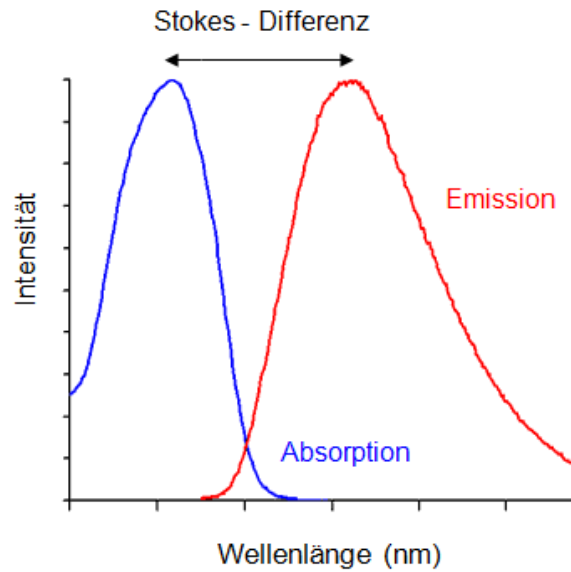


Abbildung 1.10.: Stokes-Differenz

Besonders entscheidend für die optische Bildgebung ist die Maximierung der Eindringtiefe, die durch die Absorption und Streuung des Lichtes limitiert ist (Sevick-Muraca et al. 2002). Das Licht wird durch Hämoglobin, Melanin, Lipide und andere Verbindungen im Gewebe absorbiert (Licha et al. 2002). Aufgrund der Absorption und der Streuung des Lichtes ist die Detektion unterhalb von 700 nm schwierig (Frangioni 2003). Im NIR (near infrared) – Bereich (700 bis 900 nm) ist der Absorptionskoeffizient des Gewebes am niedrigsten, wodurch die Eindringtiefe in das Gewebe einige Zentimeter betragen kann (Hawrysz et al. 2000) (Abbildung 1.11.A). Oberhalb von 900 nm bewirkt die Absorption des Wassers Störungen (Abbildung 1.11.B).

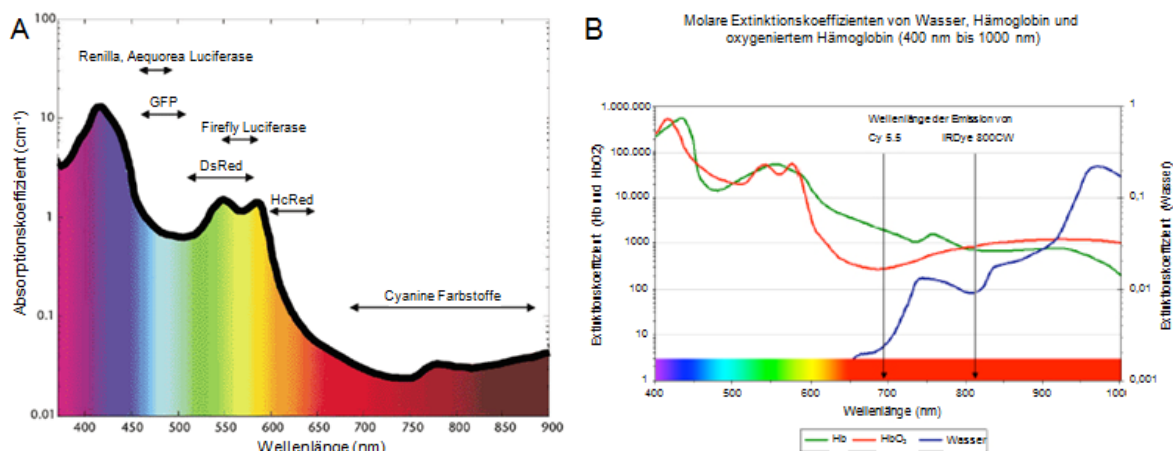


Abbildung 1.11.A: Absorptionseigenschaften von verschiedenen gebräuchlichen Farbstoffen im Bereich zwischen 350 und 900 nm und Absorption des Lichtes im

Gewebe (Weissleder et al. 2003). B: Molare Extinktionskoeffizienten von Hämoglobin, oxygeniertem Hämoglobin und Wasser im Bereich zwischen 400 und 1000 nm (Osterman et al. 2007).

Durch Kopplung von Fluorochromen an Affinitätsliganden, beispielsweise Peptide oder Antikörper, ist es möglich Target-spezifische optische Kontrastmittel herzustellen. Eine Vielzahl von NIR-Farbstoffen wurde bereits für die optische Bildgebung eingesetzt, einschließlich der Cyanin-Farbstoffe (GE Healthcare, Piscataway, NJ), wie Cy5 oder Cy7, der Alexa Fluor Farbstoffe (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) wie Alexa Fluor 680 oder 750 und der IRDyes (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) beispielsweise IRDye 680 oder IRDye 800 CW.

In der Vergangenheit wurde das Cy5.5 häufig mangels Alternativen verwendet, beispielsweise das Cy5.5-EGF-Konjugat für die Detektion von Mammakarzinomzellen (Ke et al. 2003) und das Cy5.5-Annexin V-Konjugat für die Lokalisierung von Apoptose (Petrovsky et al. 2003). Das Extinktion/Emission Maximum mit 675/694 nm ist allerdings noch im Bereich der Autofluoreszenz des Gewebes, was ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis nach sich zieht. Der IRDye 800CW Farbstoff hat dagegen ein Extinktion/Emission Maximum von 778/794 nm, wodurch sich ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis ergibt. Sowohl die Konjugation des IRDye 800CW mit dem zyklischen RGD Peptid, zur Visualisierung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins (Houston et al. 2005), als auch die Bindung mit dem EGF (Kovar et al. 2007) verursachten ein sehr geringes Hintergrundsignal.

Aber nicht nur kleinere Moleküle können als Fluorophore eingesetzt werden, sondern auch Halbleiternanopartikel besitzen diese Eigenschaft. Die Partikel sind aus mehreren Schichten aufgebaut und werden als Quantum Dots bezeichnet. Sie können eine intensive, stabile, lang anhaltende Fluoreszenz mit einem engen Emissionsspektrum vorweisen. Zusätzlich ist eine Konjugation mit Peptiden oder Antikörpern durch die an der Oberfläche liegenden Amino- bzw. Carboxygruppen möglich. Unter anderem wurden Quantum Dots für die in-vitro Markierung von Pankreastumorzellen nach Konjugation mit einem Antikörper gegen Claudin-4 (Qian et al. 2007) sowie für das „Cell Tracking“ von fluoreszierenden dendritischen Zellen eingesetzt (Cambi et al. 2007).

1.4. Fragestellung

In der Onkologie hofft man durch den Einsatz von zielgerichteten Molekülen über die Detektion von Proteinen, die zum Beispiel während der Angiogenese solider Tumoren eine wichtige Rolle spielen, eine genauere und frühzeitige Diagnose stellen zu können (Sales et al. 2007). Pathogen veränderte Zellen weisen unter anderem eine veränderte Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren auf. Die molekulare Veränderung des Gefäßendothels bildet die Grundlage für die Entwicklung der in der vorliegenden Arbeit hergestellten Kontrastmittel. Das Ziel dabei war die Visualisierung der Angiogenese zur Verfolgung des Tumorwachstums durch den VEGF-Rezeptor als Zielstruktur zu erreichen.

Es sollten spezifische Konjugate mit Eisenoxidnanopartikel für die MRT hergestellt werden, um eine Tumorentstehung bzw. -ausbreitung frühzeitig diagnostizieren zu können. Zu Beginn wurden Eisenoxidnanopartikel, die sich in Größe und Hüllenzusammensetzung unterscheiden, hinsichtlich Aufnahme- und Abgabeverhalten, Toxizität, sowie MRT-Eigenschaften untersucht. Eisenoxidnanopartikel, die über eine sehr geringe unspezifische Aufnahme verfügen, sollten anschließend mit dem VEGF-Rezeptor-2 Antikörper, dem Liganden VEGF und den entsprechenden Kontrollen (IgG und Albumin) gekoppelt und in-vitro hinsichtlich spezifischer Aufnahme, Zelllokalisierung und Nachweis mittels MRT analysiert werden, um schließlich das in-vivo Verhalten in einem Lebermetastasenmodell zu untersuchen.

Außer den Eisenoxidnanopartikeln sollten auch Fluoreszenzfarbstoffe (Cy5, Cy7 und IRDye 800CW) bzw. Halbleiternanopartikel (Quantum Dots) an VEGF gekoppelt und anschließend deren Sensitivität und Spezifität in-vitro analysiert werden. Als Kontrolle wurde auch in diesen Versuchen das Albumin verwendet.

2. Material und Methoden

2.1. Eingesetzte Materialien, Chemikalien und Geräte

2.1.1. Allgemeine Materialien

Blottingpapier, Protean	Biorad
Deckgläser, 22 x 22 mm	Menzel Gläser
Einmalspitzen	Braun
Hybond-P; PVDF Membran	GE Healthcare
Hyperfilm ECL; 18 x 24 cm (High performance chemiluminescence film)	GE Healthcare
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt
Kryo – Röhrchen + Deckeleinsätze	Roth
Nitrocellulose Membran (Kodak BioMax MS-1 Film 18 x 24 cm)	Kodak
Objektträger Superfrost, 76 x 26 mm	Roth
Pipetten, Serologische (5 ml)	Sarstedt
Pipetten, Serologische (10 ml)	Sarstedt
Pipetten, Serologische (25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen, kristall 0,5-10 µl	Biozym
Pipettenspitzen, gelb 5-100 µl	Roth
Pipettenspitzen, blau 100-1000 µl	Roth
Real Time PCR Platten (96 Well)	Sarstedt
Rotiprotect Latex Handschuhe	Roth
Rotiprotect Nitril Handschuhe	Roth
Ultrafiltrationsmembran (NMWL: 100.000)	Amicon Millipore
Skalpell, Einmalskalpell	neoLab
Ständer	Eppendorf
Sterilfilter Filtropur 0,20 µm	Sarstedt
Zellschaber	TPP
Zellkulturflaschen 25 cm ² Vented Cap	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75 cm ² Vented Cap	Sarstedt
Zellkulturplatten (6 Well)	TPP
Zellkulturplatten (12 Well)	TPP
Zellkulturplatten (24 Well)	Costar Corporation

Zellkulturplatten (96 Well)	TPP
Zentrifugationröhrchen 10 ml	Sarstedt
Zentrifugationröhrchen 50 ml	Sarstedt

2.1.2. Chemikalien

Aceton	Roth
Acetonitril	Roth
Acrylamid-Bis (29:1) Lösung	Serva
Agarose NEEO Ultra	Roth
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Merck
Aquatex	Merck
Bromphenol Blau	Merck
BSA (Bovine Serum Albumin)	Biomol
Chloroform	Merck
Citronensäure Monohydrat	Roth
CsCl	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roth
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck
Eisessig	Merck
Ellman Reagenz	Serva
Ethanol	Merck
Ethanol (99,8%)	Roth
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
FKS (fetales Kälberserum)	Biochrom
GBX Entwickler	Kodak
GBX Fixierer	Kodak
Glucose	Roth
Gentamycin	Biochrom
L-Glutamin Solution	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
HEPES	Biomol
ImmuMount	Thermo Elektron Corporation

Isopropanol	Merck
Kaliumhexacyanoferrat	Merck
Magermilchpulver	Heirler
Methanol	Roth
MgCl ₂	Roth
NaOH Plätzchen	Merck
Natronlauge (1 N)	Roth
Natriumchlorid	Merck
Page Ruler Prestained Protein Ladder (SM0671)	Fermentas
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin Lösung	Gibco BRL Invitrogen
Ponceau S	Serva
Saccharose	Roth
Salzsäure (1 N)	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Sephadex G-25 Superfine	Amersham Biosciences
Sephadex S-300	Amersham Biosciences
Superdex200	Pharmacia Biotech
Temed	Biorad
Titrisol	Merck
Traut's Reagenz (2-Iminothiolan)	Pierce
Trifluoressigsäure ≥ 99,5%	Fluka
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich
Triton X 100	Merck
Trizol Reagenz	Qiagen
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Tween	Calbiochem
rhVEGF ₁₆₅	ImmunoTool
Wasserstoffperoxid (30%)	Roth
Xylol	Roth

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.
Anti-hVEGFR-2 (Ziege, polyclonal)	R & D	AF357
Anti-mVEGFR-1 (Ziege, polyclonal)	R & D	MAR443
Anti-mVEGFR-2 (Ratte, polyclonal)	R & D	AF471
IgG _{Ziege}	Sigma-Aldrich	I5256
IgG _{Kaninchen}	Sigma-Aldrich	I5006
IgG _{Ratte}	Sigma-Aldrich	I4131
Kaninchen-anti-Maus-IgG-HRP	Dako	P0260
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP	Santa Cruz Biotech	sc-2004
Anti-pERK1/2 (Kaninchen)	Cell Signaling Technology	9101S
Anti-ERK2 (Maus)	Santa Cruz Biotech	sc-1647
Kaninchen-Anti-Ziege-IgG, biotinyliert	Vector	BA-5000
Kaninchen-Anti-Ratte-IgG, biotinyliert	Vector	BA-4000

Tabelle 2.1.: Übersicht über verwendete Antikörper

Fluoreszenzmarker	Hersteller	Katalog-Nr.
Cy5 NHS-Ester	GE Healthcare	PA15101
Cy7 NHS-Ester	GE Healthcare	PA17101
IRDye 800CW NHS-Ester	LICOR	929-70020
Quantum Dot „Jonamac Red“	evident Technologies	E2-I61-AM2-0680

Tabelle 2.2.: Übersicht über verwendete Fluoreszenzmarker

2.1.3. Medium

Astrozytenmedium: DMEM

Gibco BRL Invitrogen

Endothelzellmedium

PromoCell

(Endothelial Cell Basal Medium)

Penicillin/Streptomycin Lösung

Gibco BRL Invitrogen

Supplement Mix (für Endothelzellmedium)

PromoCell

(10 ml FKS; 2 ml Heparin;

0,05 µg hEGF; 0,5 µg hbFGF)

	20 g NaOH Plätzchen pH auf 8 einstellen und mit dest. Wasser auf einen Liter auffüllen
Elektrodenpuffer (pH 8,2 bis 8,3)	15,2 g Tris (pH 8,2 bis 8,3) 72 g Glycin 5 g SDS auffüllen auf 5 Liter mit dest. Wasser
Gelpuffer I (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl mit 0,4% SDS
Gelpuffer II (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl mit 0,4% SDS
Lauffrontanzeiger	gesättigte Bromphenolblaulösung
NaOH Lysispuffer	2 ml 10 N NaOH Stammlösung 10 ml SDS Stammlösung auf 100 ml mit dest. Wasser auffüllen
Paraformaldehyd (4%)	4 g Paraformaldehyd-Pulver in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer erhitzen bis 70°C und vorsichtige Zugabe von NaOH bis die Lösung klar wird (pH 7,4)
PBS	0,2 g KCl 8 g NaCl 0,24 g KH_2PO_4 1,44 g Na_2HPO_4 in 1 Liter dest. Wasser lösen autoklavieren und bei 4°C aufbewahren
Probenpuffer (SDS Ladepuffer)	0,23 g SDS 1,25 ml Gelpuffer II 1 ml Glycerin 0,5 ml 2-Mercapto-Ethanol

	7,25 ml dest. Wasser
Probenpuffer für geringe Proteinkonzentrationen (SDS Ladepuffer)	1 g SDS 6,3 ml Gelpuffer II 5 ml Glycerin 2,5 ml 2-Mercapto-Ethanol
Strept ABComplex/HRP	
	Reagenz A: Streptavidin aus Streptomyces in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 0,15 mol/l NaCl und 15 mmol/l NaN ₃ , pH Wert 7,2
	Reagenz B: biotinylierte Meerrettichperoxidase in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 0,15 mol/l NaCl und 15 mmol/l NaN ₃ , pH Wert 7,2
„Strip“ Puffer (pH 2,5)	0,1 M Glycin
„Strip“ Waschpuffer (pH 7,5)	0,1 M Tris
TAE Stammlösung	48,4 g Tris 20 ml 0,5 M EDTA 11,4 ml Eisessig pH auf 8 einstellen und mit dest. Wasser auf einen Liter auffüllen
Transferpuffer (pH 9)	25 mM Tris 192 mM Glycin 10% (v/v) Methanol
TBST (pH 7,5)	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1% (v/v) Tween

Tris/HCl Stammlösungen (1 M) (pH 6,8 bzw. 7,6)	121,1 g Tris 800 ml dest. Wasser pH auf 6,8 bzw. 7,6 einstellen auf einen Liter mit dest. Wasser auffüllen
Trypsin EDTA Lösung	24 ml PBS 1 ml 2,5% Trypsin 37 mg EDTA steril filtrieren und bei -20°C lagern

2.1.6. Geräte

ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Analysenwaage L610	Sartorius Laboratory
Brutschrank	Heraeus
Elektronenmikroskop EM 900 (TEM)	Zeiss
Elektrophoresekammer GNA-100 (AGE)	Pharmacia Biotech
Elektrophorese Power Supply EPS 1001	Amersham Biosciences
Filmkassette Hypercassette 18 x 24 cm	GE Healthcare
Fluoreszenzspektrophotometer F-2000	Hitachi
Fraktion Kollektor FRAC-100	Pharmacia Biotech
Gradient Programmer GP-250	Pharmacia Biotech
Heißluft Sterilisator UT 5050 EK	Heraeus
Heizblock	Eppendorf
Hochdruckdampf Sterilisator	Schütt
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Magnetrührer MR 2000	Heidolph
MicroSpin G-25 Columns	GE Healthcare
Mikroprozessor pH Meter 762	Knick
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Mikrowellengerät	Panasonic
MRT 1,5 Tesla	Siemens
MRT Humanscanner 3 Tesla Achieva	Philips
Odyssey Infrared Imager	Licor
Schüttler	Gerhardt

Sterile Werkbank	Heraeus
Thermocycler T-Gradient PCR	Biometra
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
UV Illuminator	Herolab
UV/VIS Spektrometer U-2000	Hitachi
Vortex Mixer VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad	Memmert

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zelllinien

Da sich ein Organ stets aus mehreren Grundgeweben zusammensetzt, ist es von Vorteil, bestimmte Fragestellungen auch an kultivierten Zellen einer bestimmten Zellpopulation durchzuführen. Die Isolierung bringt allerdings den Nachteil mit sich, dass die Zellen altern (Seneszenz). Die aus dem Gewebeverband gelösten Zellen stellen nach einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen ihr Wachstum ein und sterben ab. Es gibt jedoch Zellen, die durch eine oder mehrere Mutationen in Bezug auf ihre Vermehrungseigenschaften dem Alterungsprozess entkommen. Aus solchen Zellen generiert man Zelllinien, mit denen oftmals unbegrenzt gearbeitet werden kann. Eine weitere Möglichkeit, eine Zellpopulation lebensfähig zu halten, besteht darin, sie mit einem viralen Vektor unsterblich (immortal) zu machen.

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C in 5% (v/v) CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Als Kulturgefäße dienten meist TC-75CN Gewebekulturflaschen (Sarstedt).

2.2.1.1. HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)

Die aus der Nabelschnurvene stammenden adherenten humanen Zellen wurden in endothelialen Basalmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit den Zusätzen von 5% FCS, 0,1 ng/ml EGF, 0,4% Heparin, 1% Penicilin/Streptomycin, 3% L-Glutamin und 1 ng/ml hbFGF unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) kultiviert. Die Zellen erreichten eine Dichte von 80% und wurden jeweils nach 3 Tagen gesplittet, wobei nach 12 Subkultivierungen keine gesicherte Identifikation aufgrund des Auftretens eines veränderten Expressionsmusters und Wachstumsverhaltens mehr möglich war (Forster-Horvath et al. 2004). Die HUVEC's werden weit verbreitet

für humane endotheliale Funktionsuntersuchungen verwendet. Die Primärkultur wächst als Monolayer und besitzt eine endotheliale Morphologie und Charakteristik (Forster-Horvath et al. 2004).

2.2.1.2. HMEC-1 (human microvascular endothelial cell line)

Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) wurden mit einem PBR-322-basierenden Plasmid, das eine kodierende Region für den Affenvirus 40 A bildet, transfiziert und somit erfolgreich immortalisiert (Ades et al. 1992). Selbst nach der 95sten Subkultivierung zeigten die Zellen kein Anzeichen von Seneszenz. Die als Monolayer wachsende Kultur schüttet den von-Willebrand-Faktor aus und nimmt acetylierte low-density Lipoproteine auf. Die Dichte des HMEC-1 Wachstums ist drei bis siebenfach höher als bei mikrovaskulären Endothelzellen. Die Zellen erfordern außerdem ein viel weniger striktes Wachstumsmedium. Die HMEC-1 Zellen bilden mehrere typische Zelloberflächenmoleküle von Endothelzellen, einschließlich CD31, CD36, EN4 und PAL-E und auch Adhesionsmoleküle, wie ICAM-1 und CD44.

Die humane dermale mikrovaskuläre Endothelzelllinie wird häufig für Untersuchungen des Cholesterol-Metabolismus verwendet. Die HMEC-1 Zelllinie war die erste immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie, die die Morphologie, Phenotyp und funktionale Charakteristik von normalen humanen mikrovaskulären Endothelzellen aufwies.

Die Zellen wurden in endothelialen Basalmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit den Zusätzen von 5% FCS, 0,1 ng/ml EGF, 0,4% Heparin, 1% Penicilin/Streptomycin, 3% L-Glutamin und 1 ng/ml hbFGF unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) kultiviert. Sie erreichten eine Dichte von 80% und wurden jeweils nach zwei bzw. drei Tagen gesplittet.

2.2.1.3. U118

Die Quelle für die U118 Gliomazelllinie war ein maligner Gehirntumor von einem 50 jährigen weißen Mann. Die Bezeichnung Gliomas stammt von Gliazellen ab, die das umliegende und unterstützende Gewebe für die Neurone des Zentralnervensystems bilden.

Die humane Gliomazelllinie U118 (erhalten von dem Deutschen Krebsforschungsinstitut, Heidelberg, Deutschland) wurde in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% FCS, 3% L-Glutamin und 1%

Penicillin/Streptomycin kultiviert und jeden zweiten oder dritten Tag subkultiviert.

2.2.1.4. HT-29

Die HT-29 Zelllinie ist eine humane kolorektale Karzinomzelllinie, die 1964 von J. Fogh aus einem gut differenzierten Kolonadenokarzinom (Primärtumor Grad 1) einer 44-jährigen Patienten isoliert und immunhistologisch untersucht wurde (von Kleist et al., 1975). Die Tumore gehören zu den epithelialen Tumoren. Sie tragen auf ihrer Oberfläche u.a. Rezeptoren für die Urokinase und das Vitamin D. Weiterhin produziert die Zelllinie ein Kolon spezifisches Mucin und CEA (Carcinoembryonales Antigen) (Jones et al., 1982). Die humanen, adhärenenten Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% FCS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert und jeden zweiten oder dritten Tag subkultiviert. Die Verdopplungszeit liegt zwischen 40 und 60 Stunden.

2.2.1.5. MDA-MB-231

Die MDA-MB-231 Zelllinie ist eine Mammakarzinomzelllinie, die aus einem Adenokarzinom der Brustdrüse einer 51jährigen Frau, mit kaukasischer Abstammung, gewonnen wurde (Cailleau et al. 1974). Die Zellen sind aus einer pleuralen Blutung isoliert worden. Die epithelialen, adhärenenten Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% FCS, 3% L – Glutamin und 1% Penicilin/Streptomycin kultiviert und jeden dritten Tag gesplittet.

2.2.1.6. bEnd3

Die adherente endotheliale bEnd3 Zelllinie stammt aus dem mikrovaskulären Gehirndothel / cerebrale Cortex der Maus. Die Zellen wurden durch die Infektion mit dem NTKmT Retrovirus Vektor, der das polyomaVirus middle T Antigen expremiert, transformiert (Montesano et al., 1990). Sie besitzen eine hohe Proliferationsrate und ihr endothelialer Charakter wird unter anderem durch die Expression des von-Willibrand-Faktors und der Aufnahme von fluoreszenz markierten low-density Lipoproteinen (LDL) bestätigt. Weiterhin zeigt sich eine Antigen Expression von ICAM-1, VCAM-1 und MAdCAM-1. Die Induktion durch den Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α), Interleukin 1 (IL-1) oder Lipopolysaccharide (LPS) ist konzentrations- und zeitabhängig (Sikorski et al., 1993). Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% FCS, 3% L-Glutamin und

1% Penicillin/Streptomycin kultiviert und jeden zweiten oder dritten Tag gesplittet.

2.2.2. Passagieren von Zellen

Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden die Zellen in Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit alle zwei bis drei Tage subkultiviert. Vor dem Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden ist zunächst das Kulturmedium verworfen und die Zellen mit PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) (pH 7,4) gespült worden. Anschließend wurde den Zellen eine 0,1%ige Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) - Lösung zugeführt, für etwa 15 Sekunden einwirken gelassen, wieder abgesaugt und danach die Kulturflaschen für fünf Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Die Zellen können dann leicht in das entsprechende Medium aufgenommen werden. Nach fünf Minuten Zentrifugieren bei 1000 U/min wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Medium aufgelöst und anschließend auf neue, vorher beschriftete Kulturflaschen verteilt.

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl durch die Neubauer-Kammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau gemischt. Der Farbstoff diffundiert nur durch die Zellmembran der toten Zellen und färbt diese im Zytoplasma blau an (Trypanblauausschlussmethode). Dadurch konnte während der Zählung der Zellen unter dem Mikroskop der Anteil toter Zellen mitbestimmt werden. 10 µl der zu bestimmenden Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen der 0,3% Trypanblau Lösung gemischt und anschließend zwischen Deckglas und Neubauer-Kammer pipettiert. Unter dem Mikroskop konnten die Zellen der vier Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet werden. Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu ermitteln, wurde dieser Wert mit dem Verdünnungsfaktor und 10.000 multipliziert, wobei die durch Trypanblau angefärbten toten Zellen während der Zählung unberücksichtigt blieben.

2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren mussten die Zellen zunächst in Suspension gebracht werden (siehe Passagieren der Zellen (Abschnitt 2.2.2.) und anschließend durch Zentrifugation (fünf Minuten bei 1000 U/min) pelletiert. Das Zellpellet wurde in dem Einfriermedium (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)) zur Vermeidung von Eiskristallen, resuspendiert. Die Zellsuspension, in spezielle Cryo-

Röhrchen (Größe: 2 ml) gefüllt, wurde zunächst für einen Tag bei -80°C gelagert und danach in Lagertanks in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die gefrorenen Zellaliquots in einem 37°C Wasserbad erwärmt. Ein schnelles Auftauen ist erforderlich, um das cytotoxisch wirkende Dimethylsulfoxid möglichst schnell von den Zellen zu entfernen. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml Medium vermischt. Durch Zentrifugation (fünf Minuten bei 1000 U/min) bildete sich ein Zellpellet. Anschließend wurden die Zellen erneut in Medium aufgenommen und in neue Kulturflaschen ausgesät. Um letzte DMSO-Reste zu entfernen, musste das Medium nach 24 Stunden gewechselt werden.

2.3. RNA-Analysen

2.3.1. RNA-Isolierung

2.3.1.1. RNA-Isolierung aus Zellen

Die Zellen wurden in 1 ml Trizol (Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion) aufgenommen und wenn nötig bei -20°C eingefroren. Trizol eignet sich hervorragend für kleine und große Gewebemengen aber auch für Zellkulturen. Beim Homogenisieren / Lysieren der Proben ermöglicht Trizol die Erhaltung der Integrität der RNA. Zu Beginn erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C , um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Zugabe von 200 μl Chloroform musste die Lösung solange geschüttelt werden bis sich eine milchig rosa Färbung einstellte (ungefähr 15 Sekunden). Anschließend wurde die Lösung zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Eine folgende Zentrifugation über 15 Minuten bei 12.000 g und 4°C verursachte eine Phasentrennung, wobei sich hochmolekulare DNA gemeinsam mit enthaltenen Proteinen in der unteren Phenol/Chloroform Schicht ansammelte. Die stabilere RNA befand sich in der oberen wässrigen Phase, aus der sie mit Hilfe von Isopropanol gefällt werden konnte. Die obere wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein Rnase-freies Reaktionsgefäß überführt. Während dieses Arbeitsschrittes darf von der weißen Zwischenschicht nichts mitgeführt werden, da sie Proteine enthält. Nun wurden 500 μl Isopropanol zugegeben, gevortext und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C von 10 Minuten wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das resultierende Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nach dem Vortexen erfolgte

eine Zentrifugation bei 7500 g und 4°C über fünf Minuten. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in Rnase-freien Wasser über 10 Minuten bei 55 – 60°C gelöst.

2.3.1.2. RNA-Isolierung aus Gewebe

50 bis 100 mg Gewebe wurde in 1 ml Trizol aufgenommen, anschließend zerkleinert und mit dem Ultra Turrax (Polytron PT 3000) homogenisiert. Nachdem die Gewebetrümmer durch eine 10minütigen Zentrifugation entfernt werden konnten, wurde der Überstand entnommen, fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 200 µl Chloroform pro Milliliter Trizol hinzugefügt. Der weitere Ablauf entspricht der RNA-Isolierung aus Zellen (siehe Abschnitt 2.3.1.1.).

2.3.2. Messung der RNA- bzw. DNA-Konzentration

Die 1:49 verdünnte RNA-Lösung - 495 µl Wasser und 5 µl RNA-Lösung - wurde in ein Eppendorfgesäß pipettiert. Mit Hilfe eines Photometers konnte die Absorption der Probe bei 260 nm (A_{260}) ermittelt werden. Zuvor wurde durch den Einsatz des Leerwertes (500 µl Wasser) eine Basislinie hergestellt. Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des Quotienten aus A_{280} und A_{260} festgestellt. Dabei sollte der Quotient über 1,7 liegen. Der Absorptionswert A_{260} wurde mit vier für RNA bzw. mit fünf für DNA multipliziert. Die resultierende Konzentration wurde in µg/µl angegeben.

2.3.3. DNase Verdau

Nach der RNA-Isolierung und anschließender RNA-Konzentrationsbestimmung wurde 1 µg der extrahierten RNA mit einer DNase behandelt, um kontaminierende DNA aus den Proben zu entfernen. Die Desoxyribonuklease zerlegt die DNA in ihre Einzelbausteine.

	Volumen
RQ1 DNase 10x Reaktionspuffer	1 μ l
RQ1 – RNase – freie DNase (1 U/ μ l)	1 μ l
RNA – Lösung aus der Isolierung (1 μ g)	x μ l
Nuklease – freies Wasser	8 – x μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

Tabelle 2.3.: Zusammensetzung des DNase Verdaus

	Konzentration
Tris-HCl (pH 8,0)	400 mM
MgSO₄	100 mM
CaCl₂	10 mM

Tabelle 2.4.: Zusammensetzung des RQ1 DNase 10 x Reaktionspuffer

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 15 Minuten inkubiert, anschließend 1 μ l der Dnase-Stop-Solution (20 mM EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N-Tetraessigsäure) (pH 8,0)) zugefügt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert, um die Reaktion zu unterbrechen. Nachdem die Proben auf Eis gestellt wurden, schloss sich die Reverse Transkription an.

2.3.4. Reverse Transkription

Nach dem DNA-Verdau wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase die RNA in cDNA umgeschrieben.

	Volumen
Reaktionsansatz des DNase Verdaus	11 µl
Random Hexamer Primer (0,2 µg)	2 µl
Fünf Minuten bei 70°C; anschließend auf Eis	
Reaktionspuffer (5 x)	4 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
Fünf Minuten bei 25°C	
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl
10 Minuten bei 25°C	
60 Minuten bei 42°C	
10 Minuten bei 70°C	
Ansatz auf Eis stellen	

Tabelle 2.5.: Verlauf der Reversen Transkription

Die Reverse Transkriptase ist in der Lage einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA zu überführen. Zu diesem Zweck synthetisiert das Enzym einen RNA-DNA-Hybridstrang mittels einer RNA-abhängigen-DNA-Polymerase-Aktivität. Der sich anschließende Abbau des RNA-Anteils wird durch den Rnase-H-Anteil des Enzyms ermöglicht. Für die Vervollständigung des einzelsträngigen zu einem doppelsträngigen DNA-Stranges ist die DNA-abhängige-DNA-Polymeraseaktivität zuständig.

2.3.5. Real-Time-RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine in-vitro Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann (Mullis und Faloona 1987, Daiki et al. 1985). Durch eine hitzestabile Polymerase können mehrere Zyklen aus Aufschmelzen (Denaturierung) des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung (Annealing) sequenzspezifischer Oligonukleotide mit einem freien 3'-OH Ende (Primer) an die Ausgangs-DNA (Template, Matrix) und Synthese des komplementären Strangs (Elongation) nacheinander ablaufen. Damit wird das Ausgangsprodukt theoretisch exponentiell vervielfältigt. Geringe DNA-Mengen können so amplifiziert werden, dass sie anschließend entweder durch die

Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht oder zur weiteren Verwendung, zum Beispiel für die Klonierung, eingesetzt werden können.

Der Begriff „Real-Time PCR“ bedeutet, dass unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotiden (Sonden) im PCR-Ansatz und dem Einsatz spezieller PCR-Geräte kein post-PCR Detektionssystem mehr erforderlich ist. Anhand der Veränderung der Fluoreszenzen können akkumulierende PCR-Produkte während der PCR detektiert und sofort Aussagen getroffen werden.

Mit Hilfe des Real-Time PCR-Gerätes wird die Fluoreszenz in jedem Zyklus gemessen und aufgezeichnet. Zur statistischen Absicherung müssen die Messungen mindestens drei Mal wiederholt werden. Generell können mit Hilfe der Real Time RT PCR zwei verschiedene Quantifizierungsstrategien verfolgt werden. 1. Die *absolute Quantifizierung* wird anhand einer vorgegebenen Kalibrierungskurve durchgeführt und basiert auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten, Plasmid DNA, in vitro transkribierter RNA, synthetisierter DNA oder RNA Oligomeren. 2. Die *relative Quantifizierung*, bei der die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ bezogen wird. Das „Housekeeping Gen“ verwendet man als interne Kontrolle, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dies wird als Normierung bezeichnet. Die ideale interne Kontrolle ist leicht zu detektieren und deren Expression sollte nicht während des Zellzyklus, zwischen den Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung variieren. In der vorliegenden Arbeit kommt ausschließlich die relative Quantifizierung zum Einsatz. Als „Housekeeping Gen“ standen β -Aktin, die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), die 18S-rRNA und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zur Verfügung.

Die GAPDH zeigte dabei entsprechend den Kriterien die höchste Konstanz in den Versuchen. Das Enzym ist Bestandteil der Glykolyse, wobei es die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert und die Expression des Enzyms wird in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nur unwesentlich verändert.

Bei der Real-Time PCR wird heute nicht mehr primär in DNA Produktmenge oder Produktkonzentration berechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden sog. Ct (cycle of threshold) oder CP (Crossing Point) Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen die nötig sind, um ein

konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am Ct Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. PCR-Ansätze mit einer hohen Kopienzahl als Ausgangsmaterial besitzen einen niedrigen Ct-Wert. Die Quantifizierung in der Real Time RT PCR wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt und unterscheidet sich damit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden (zum Beispiel kompetitive PCR). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von interkalierenden DNA-Farbstoffen, wie zum Beispiel Ethidiumbromid oder SYBR Green. Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein (interkalieren) bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Eine andere Möglichkeit ist, den Fluoreszenz (bzw. Förster)-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) über den Einsatz von Hybridisierungssonden auszunutzen. Die sequenzspezifischen Sonden tragen ein Donor-Fluorochrom, das durch eine Lichtquelle angeregt wird, oder ein Akzeptor – Fluorochrom, welches bei einer ausreichenden Nähe zum Donor – Fluorochrom dessen Energie aufnimmt und diese in Form von langwelligerem Licht wieder abgibt, was dann detektiert werden kann. Diese Methode ist zwar treuer, bietet aber den Vorteil einer hohen Spezifität. Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des FRET zur Quantifizierung von Nukleinsäuren besteht in der Verwendung von LightCycler-Sonden. Eine weitere, in der vorliegenden Arbeit genutzte Methode, liegt in der Anwendung einer Sonde, die an ihrem einen Ende mit einem Quencher, an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. TAMRA und FAM) markiert wird (TaqMan-Sonde). Regt man den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff durch Licht der entsprechenden Wellenlänge an, gibt dieser seine Energie mittels FRET an den Quencher weiter, so dass kein Signal detektiert werden kann. Wenn die Taq Polymerase, die zusätzlich eine Exonukleaseaktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden (Abbildung 2.1.). Dabei steigt die Fluoreszenz proportional zur gebildeten Amplifikationsmenge an.

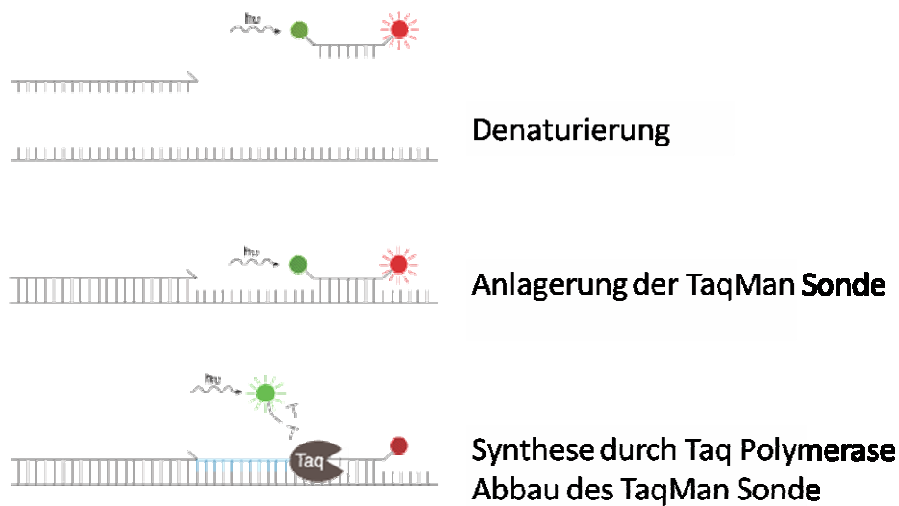


Abbildung 2.1.: Anwendung der TaqMan Sonde

Im PCR-Ansatz sind dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) als Bestandteile für die neuen DNA-Stränge enthalten. Ferner beinhaltet der Ansatz Magnesiumchlorid, das Einfluss auf die Stabilität der Primer/Template-Bindung hat, sowie den für die Polymerase spezifischen Puffer. Das PCR-Programm ist von verschiedenen Parametern abhängig. Beim Auftreten von Nebenprodukten wird die Annealing-Temperatur erhöht. Der $MgCl_2$ -Gehalt wird erhöht, sollte zunächst kein Produkt erzeugt werden können oder erniedrigt, wenn unspezifische oder verschmierte Banden auftreten.

Durchführung der quantitativen RT PCR

Die PCR erfolgte in einem Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection System im 96 Well Plate Format nach dem Ansatz der Tabelle 2.6.

	Volumen
20 x Primer - Mix	1 μ l
Bidest. Wasser	7 μ l
cDNA Lösung (5 ng/ μ l)	2 μ l
2 x TaqMan Universal PCR Master Mix	10 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Tabelle 2.6.: Ansatz für die quantitative RT-PCR

Der TaqMan Universal PCR Master Mix enthielt nicht nur die AmpliTaq Gold DNA Polymerase, den entsprechenden Puffer, dNTP's mit dUTP's, sondern auch den

Farbstoff ROX, der als passive Referenz diente, sowie die Uracil-DNA-Glykosylase (UNG). Das Enzym hydrolysiert Uracil-glykosidische Bindungen. Die daraus resultierenden abasischen Stellen können dann durch Alkali Behandlung, spezifischen Endonukleasen oder, wie in diesem Fall, durch hohe Temperaturen gespalten werden. Die UNG wurde in Verbindung mit dUTP eingesetzt, um in der PCR Kontaminationen durch vorausgegangenen Amplifikationen zu eliminieren (Kwok et al. 1989). Dazu musste dTTP durch dUTP im Reaktionsansatz ausgetauscht werden, so dass die entstehenden Produkte gegen die UNG empfindlich wurden. Natürliche DNA enthält kein Uracil, so dass die eigentliche Probe vollständig intakt blieb.

Da genomische DNA während der Real-Time-RT-PCR stört, wurde sie zu Beginn durch den DNase Verdau abgebaut. Allerdings erfolgt der Abbau meist nicht zu 100%, so dass für eine zusätzliche Diskriminierung zwischen cDNA und genomischer DNA gesorgt wurde, indem einer der beiden Primer an eine Exon-Exon-Grenze bindet. Auf der genomischen DNA befinden sich an diesen Stellen Introns, weshalb ein solcher Primer dort nicht binden kann.

Für die RT-PCR wurden folgende Primer eingesetzt:

TaqMan Gen Expression Assay	Sonden Sequenz (5' zu 3')	Reporter / Quencher	Exon Begrenzung
Hs00176573_m1 hVEGFR-1	ACTTAAACTGGGCAAATCACTTGGA	FAM / NFQ	16 - 17
Hs00176676_m1 hVEGFR-2	AATAGAAGGTGCCCAGGAAAAGACG	FAM / NFQ	15 - 16
Hs00169777_m1 hPECAM-1	GAAAGCTGTCCCTGATGCCGTGGAA	FAM / NFQ	-
Hs00164438_m1 Endoglin	TCCCAACGGGCCCGTCACAGCTGGA	FAM / NFQ	2 - 3
Hs99999905_m1 hGAPDH	GCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTT	FAM / NFQ	3 - 3
Mm00438980_m1 mVEGFR-1	TCACCGTGCAAGGAACCTCAGACAA	FAM / NFQ	15 - 16
Mm00440099_m1 mVEGFR-2	AATAGAAGGTGCCCAGGAAAAGACC	FAM / NFQ	15 - 16
Mm99999915_g1 mGAPDH	TGAACGGATTTGGCCGTATTGGGCG	FAM / NFQ	1 - 1

Tabelle 2.7.: TaqMan Gen Expression Assays für die quantitative RT-PCR. Hs = Homo sapiens; Mm = Mus musculus

Nachdem der Ansatz vorbereitet wurde, sind folgende PCR-Parameter für die Reaktion angewendet worden.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeitraum (min)	Bemerkung
1	50	2:00	UNG Verdau
2	95	10:00	Taq Polymerase Aktivierung, UNG Inaktivierung
3	95	0:15	Denaturierung
4	60	1:00	Synthese
40 Zyklen von Schritt 3 bis 4			

Tabelle 2.8. Programm der quantitativen RT-PCR

Die Ausbeute einer PCR Reaktion ergibt sich aus der Formel (Livak et al. 2001):

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

n = Anzahl der PCR Zyklen

X_n = Anzahl der Kopien im Zyklus n

X_0 = Ausgangskopienanzahl

E_x = Amplifikationseffizienz

Somit ist für eine 100%ige Amplifikationseffizienz ($E_x = 1$) eine 10fache höhere Kopienanzahl nach 3,33 Zyklen erreicht.

2.4. Proteinbiochemische Analysen

2.4.1. Proteinisolierung aus Zellen

Die Zellen wurden mit Hilfe einer Lösung aus 50 mM der Puffersubstanz Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), 100 mM NaCl, 5 mM des Komplexbildners EDTA (Ethylendiamintetraacetat) und 1% Triton (pH 7,0) lysiert, wobei 200 µl für eine kleine Kulturflasche verwendet wurde. Das nichtionische Tensid Triton, aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate, findet in der Biochemie auch deshalb als Detergens Anwendung, weil es im Gegensatz zu SDS Proteine nicht denaturiert. Je nach Zielstellung wurden auch zusätzlich 2 mM Vanadat oder 5 mM Glycerophosphat als Phosphataseinhibitoren eingesetzt. Vor der Proteinbestimmung wurden die Proben kurz gevortext.

2.4.2. Proteinbestimmung

Die Bradford-Methode ist eine der gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Der Test beruht auf einer Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung. Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die kommerziell erhältliche, fertige Stammlösung, bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure wird 1:4 mit Wasser verdünnt. Dazu wurden 795 µl destilliertes Wasser mit 200 µl des Bradford Reagenz versetzt, anschließend 5 µl der isolierten Proteinlösung hinzugefügt und die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm bestimmt. Als Leerwert dienen 5 µl der Lysatlösung und als Standard 10 µl einer 1 mg/ml BSA Lösung und zusätzliche 5 µl

der Lysatlösung.

Die Proteinbestimmung wurde nach folgendem Schema durchgeführt.

	Leerwert	Standard	Probe
Lysatlösung	5 µl	5 µl	-
Probenlösung	-	-	5 µl
1 mg/ml BSA	-	10 µl	-
Biorad-Reagenz	200 µl	200 µl	200 µl
Wasser	795 µl	785 µl	795 µl

Tabelle 2.9.: Pipettierschema der Proteinbestimmung

Für die SDS-Elektrophorese wurden 25 µg Protein auf 100 µl mit dem SDS Probenpuffer, der zusätzlich 50 mM DTT (Dithiothreitol) enthielt, aufgefüllt und für fünf Minuten bei 95°C gekocht. DTT kann die Faltung von Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, durch deren Reduktion zerstören. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration ist wichtig, um später zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen auf jede Spur im Gel geladen werden.

Bestandteile des Probenpuffers	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,23 g in 7,25 ml Wasser gelöst
Gelpuffer II (siehe Abschnitt 2.4.3.)	1,25 ml
Glycerin	1 ml
1M Dithiothreitol (DTT)	0,5 ml

Tabelle 2.10.: Zusammensetzung des Probenpuffers

2.4.3. Western Blot

Immunologischer Nachweis filtergebundener Proteine

Zuerst werden die Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Natrium Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das proportional zum Molekulargewicht an denaturierte Proteine bindet (unabhängig von deren Sequenz). Dadurch wird im elektrischen Feld eine Auftrennung der SDS-Polypeptide im Acrylamidgel entsprechend zum Molekulargewicht erreicht. Die Gele enthalten Ammoniumpersulfat (APS), das die freien Radikale liefert, die zur Polymerisation

benötigt werden. Weiterhin ist Tetramethylethyldiamin (TEMED) im Gel enthalten, das den Polymerisationsvorgang durch die Katalyse der Radikalbildung aus Ammoniumpersulfat unterstützt. Die Acrylamidkonzentration bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten und die Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad. Beide zusammen legen die Eigenschaften des Gels fest, insbesondere die Porengröße, Elastizität und Dichte. Je nach Größe der zu trennenden Moleküle verwendet man Gele unterschiedlicher Porosität: 2,5% Gele erlauben es, Moleküle mit einem Molekulargewicht im Bereich von 10^6 Dalton zu trennen, während dagegen 30% Gele für ein Molekulargewicht von 10^3 Dalton geeignet sind.

In den vorliegenden Versuchen wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 10% verwendet. Dadurch ist es möglich, eine Auftrennung von Proteinen zu erreichen, deren Molekulargewicht zwischen 10 und 60 kDa liegt.

	Trenngel	Sammelgel
Gelpuffer I	2,6 ml	-
Gelpuffer II	-	2,6 ml
30% (w/v) Acrylamid Bis	3,33 ml	1,67 ml
Wasser	4,03 ml	5,79 ml
10% (w/v) APS	60 μ l	60 μ l
TEMED	30 μ l	30 μ l

Tabelle 2.11.: Bestandteile eines 10%igen Polyacrylamidgeles

Das verwendete diskontinuierliche Lämmli-System mit dem Tris-Glycin-Puffer hat den Vorteil einer höheren Trennschärfe und einer besseren Nachweisempfindlichkeit. Es beruht auf der Diskontinuität der Gelstruktur und der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung im Sammel- und im Trenngel. Im Sammelgel wird die Probe konzentriert, da es großporig ist und somit der Siebeffekt nicht zum Tragen kommt. Dagegen ist das Trenngel engporig, wodurch der Siebeffekt eintritt und die Komponenten der Probe der Größe nach aufgetrennt werden. Der Mechanismus der Konzentrierung beruht darauf, dass beim Anlegen der Spannung die Chloridionen im Gel mit hoher Mobilität zur Anode wandern, während die in das Sammelgel eindringenden Glycinionen aufgrund des neutralen pH-Wertes überwiegend als Zwitterionen vorliegen und deshalb nur sehr langsam wandern. Zwischen Glycin und Chloridionen entsteht eine an Ionen verarmte Zone. Die Proteine in der Probe sind

negativ geladen und werden sich naturgemäß ihrer elektrophoretischen Mobilitäten zwischen den schnell wandernden Chloridionen und den langsam wandernden Glycinionen anordnen. Es entsteht eine Konzentrierung der Proteine, da sich zwischen den Leit- und Folgeionen ein Spannungsgradient aufbaut, der zur Beschleunigung der negativ geladenen Proteine führt, bis sie in Form von direkt aufeinanderfolgenden Stapeln zu den Chloridionen aufgeschlossen haben. Wenn die Ionenfront das Trenngel erreicht hat, wird Glycin aufgrund des veränderten pH-Wertes vollständig dissoziiert, die Proteine überholen und sind nun im engporigen Sammelgel dem Siebeffekt ausgesetzt und können deshalb nach Größe aufgetrennt werden.

Zusammensetzung der Gelpuffer:

Gelpuffer I: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 mit 0,4% SDS

Gelpuffer II: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 mit 0,4% SDS

Bestandteile des Elektrodenpuffers	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	12,16 g
Glycin	57,6 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4 g
	gelöst in 4 Liter Wasser (pH 8,2-8,3)

Tabelle 2.12.: Zusammensetzung des Elektrodenpuffers

5 µg der Proteine, wie auch 7 µl des Markers (Page Ruler, Fermentas) wurden auf das Gel aufgetragen. Nach dem Einführen des Geles in die Kammer und dem Füllen der Kammer mit dem Elektrodenpuffer, wurden zusätzlich 2 µl einer gesättigten Bromphenol-blau (Tetrabromophenolsulfonphthalein) Lösung hinzugefügt. Sie dient aufgrund ihrer Wandereigenschaften im elektrischen Feld als Verlaufskontrolle für die Polyacrylamidgelelektrophorese.

Zum Starten wurden 400 Volt (340 mA, 25 W) angelegt. Während der Elektrophorese wanderte der SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zum Pluspol (Anode). Nach 30 bis 35 Minuten war eine ausreichende Auftrennung der Proteine erreicht. 20 Minuten vor Programmende wurden eine Nitrocellulose-Membran und Filterpapiere zugeschnitten, im Transferpuffer geschwenkt und schließlich zusammen mit dem Polyacrylamidgel in der Blotting Apparatur entsprechend der Abbildung 2.2.

angeordnet.

Bestandteile des Transferpuffers	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	7,5 g
Glycin	36,03 g
Methanol	250 ml
	auffüllen auf 2,5 Liter mit dest. H ₂ O

Tabelle 2.13.: Zusammensetzung des Transferpuffers

Nach Beendigung des Gellaufes wird das Blotten wie folgt vorbereitet:

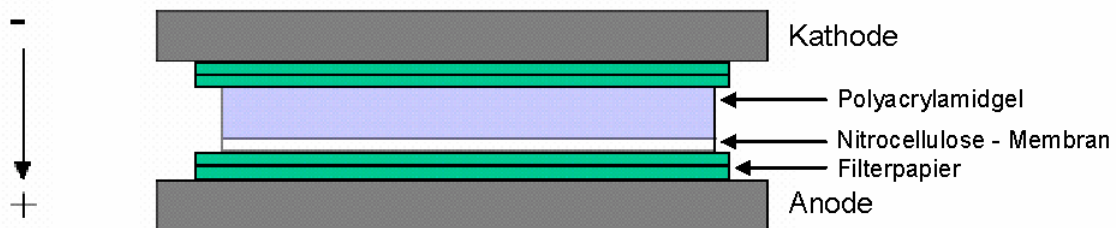


Abbildung 2.2.: Positionierung der Nitrocellulose während des Blottens

Programmparameter	
Spannung	25 Volt
Stromstärke	340 mA
Widerstand	3 W
Zeit	45 Minuten

Tabelle 2.14.: Programm des Western Blottes

Die Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Selbst Peptide mit nur 20 Aminosäuren haften noch auf der Nitrocellulose, die über eine hohe Proteinbindungskapazität verfügt. Nach Transfer der Proteine in die Membran wird die Apparatur abgebaut.

Zu Beginn der Antikörperreaktion wurde die Membran mit 5% Milchpulver für eine Stunde geblockt und danach mit Primärantikörper (in Blockierungslösung verdünnt; für pERK1/2 in BSA sonst Milchpulver) über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die Detektion von pERK1/2 musste die Membran noch dreimal mit TBST gewaschen werden bevor der Primärantikörper eingesetzt werden konnte, da sonst das

Milchpulver die spezifische Bindung des Primärantiköpers an die Phosphatgruppe verhindert hätte. Am nächsten Tag wurde dreimal für 15 Minuten mit TBST gespült, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde mit dem Sekundärantikörper, der in Milchpulver verdünnt wurde, inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST (3 x 10 Minuten) erfolgte die Detektion mit Hilfe des Zwei-Komponenten-Chemilumineszenz-Verstärkersystems. Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die am Sekundärantikörper haftende Meerrettich-Peroxidase oxidiert das zyklische Diacylhydrazid (Luminol) unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und regt es dadurch an. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Energieniveau wird Licht emittiert (Abbildung 2.3.).

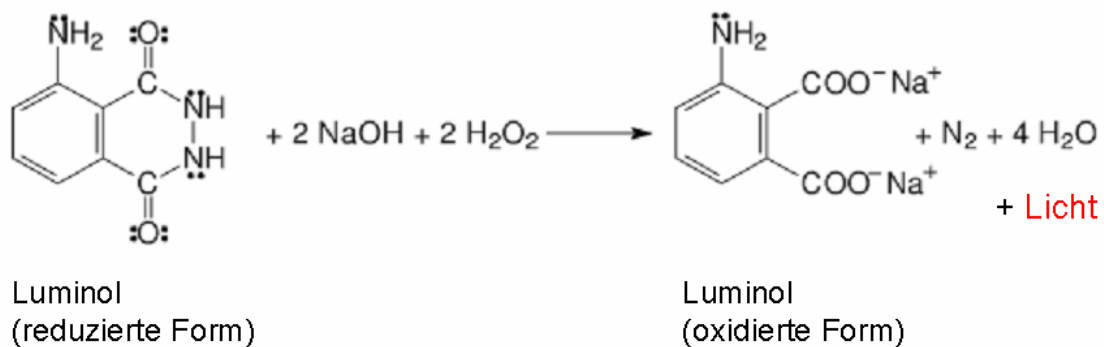


Abbildung 2.3.: Reaktion des zyklischen Diacylhydrazid (Luminol)

Phenole verstärken die Reaktion um das 1000-fache und verlängern die Emission noch darüber hinaus. Anschließend wurde der Blot zum Schutz des Films vor Feuchtigkeit zwischen zwei Folienlagen gelegt. Die Chemilumineszenz auf dem Blot konnte in der Dunkelkammer durch das Auflegen eines speziellen hochempfindlichen Films (Hyperfilm ECL) lokalisiert werden. Die Dauer des Auflegens variiert je nach Menge des zu detektierenden Proteins bzw. der Qualität der Antikörpersysteme zwischen 1 und 40 Minuten.

Durch Strippen war es möglich die Membran mehrfach zu verwenden. Hierzu wurde sie zuerst in 0,1 M Glycin (pH 2,5) dreimal für fünf Minuten und anschließend dreimal 15 Minuten in 0,1 M Tris (pH 7,5) gewaschen. Nach dem Strippen wurde die Membran wieder eine Stunde mit 5% Milchpulver geblockt und dann wieder mit einem Primärantikörper inkubiert.

		Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper	pERK1/2-Antikörper (Kaninchen)	1 : 500	Cell Signaling Technology
	ERK2-Antikörper (Maus)	1 : 500	Santa Cruz Biotech
Sekundärantikörper	Ziege-anti-Kaninchen- IgG-HRP	1 : 20.000	Santa Cruz Biotech
	Kaninchen-anti-Maus- IgG-HRP	1 : 30.000	Dako

Tabelle 2.15.: Eingesetzte Antikörper während Western Blot

2.4.4. Immunhistochemie

2.4.4.1. Einbettung der Gewebeproben in Paraffin

Die Paraffin-Einbettung erfordert eine aufwendigere Bearbeitung der Organe als die Kryostat-Histologie, wobei jedoch die Strukturhaltung deutlich besser ist.

Die Gewebeproben wurden über Nacht in frisch angesetzten 4%igen Paraformaldehyd, das in 0,1 M Phosphatpuffer gelöst war, fixiert und anschließend mit 0,1 M Phosphatpuffer über 24 Stunden gewaschen, wobei in Abständen von drei bis acht Stunden ein Auswechseln des Puffers erfolgte. Zum Paraffinieren musste den Gewebeproben das Wasser entzogen werden, wozu eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100%) eingesetzt wurde. Die einzelnen Schritte dauerten jeweils zwei Stunden und wurden, ebenso wie der Waschschrift zuvor, auf einem Schüttler durchgeführt. Zum Schluss wurden die Gewebeproben über Nacht in Methylbenzoat gelagert. Bei dem in der Zwischenzeit im Vakuumschrank bei 63°C erhitztem Paraffin bewirkte das Vakuum ein Entweichen sämtlicher Luftblasen aus dem Paraffin. Anschließend wurde das heiße Paraffin in Blöckchen gegossen und die Gewebeprobe in die Mitte des Blöckchenbodens positioniert. Zum Erkalten lagerten die Blöckchen zuerst für einige Stunden bei Raumtemperatur und dann über Nacht im Kühlschrank.

2.4.4.2. Immunhistochemischer Nachweis nach der ABC-Methode

Zur Darstellung der Verteilung zellulärer Proteine in Geweben wurde die Immunhistochemie durchgeführt. Dabei wurden Antikörper eingesetzt, die spezifisch

gegen das gesuchte Antigen gerichtet waren und dadurch an diese Strukturen im Schnitt hafteten.

Am ersten Tag wurden aus dem Paraffinblock Schnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm herausgeschnitten, in einem Wasserbad ausgebreitet, um ein Strecken der Schnitte zu ermöglichen, und schließlich auf einen Objektträger gebracht. Der Objektträger wurde mit Datum, Typ des Gewebes und der Antikörperverdünnung mit Hilfe eines geeigneten Bleistifts beschriftet. Nachdem unter dem Mikroskop festgestellt werden konnte, dass die Struktur des Gewebeschnittes erhalten geblieben war, lag der Objektträger für ungefähr eine Stunde auf eine 40°C warme Heizplatte und zur vollständigen Trocknung anschließend im Wärmeschrank (37°C) über den Zeitraum von zwei Tagen, um das Herauslösen des Paraffins am nächsten Tag zu erleichtern.

Am diesem Tag wurde das Paraffin, in das die Gewebeschnitte eingebettet waren, durch Xylol (zweimal jeweils fünf Minuten) herausgelöst und über eine absteigende Alkoholreihe (zweimal 100%iges, zweimal 90%iges und jeweils einmal 70%iges und 50%iges vergälltes Ethanol) bis hin zum 0,1 M Phosphatpuffer gebracht, womit den Gewebeschnitten allmählich Wasser zugeführt wurde. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität mussten die Schnitte in 3%iger Wasserstoffperoxid Lösung, die in Methanol verdünnt wurde, für 10 Minuten getaucht und nach Ablauf der Zeit die Schnitte dreimal in PBS gespült werden.

Zur Detektion einiger Antigene muss der Paraffinschnitt durch Mikrowellenbehandlung, Autoklavieren, Trypsinierung oder mittels Dampfdruckkochtopf vorbehandelt werden. Es wird vermutet, dass durch diese Behandlung demaskierte, also in ihrer räumlichen Struktur durch die Fixierung veränderte Proteine im Schnitt wieder „renaturiert“ werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebeschnitte in 10 mM Citratpuffer (pH 6) mit einem Dampfdruckkochtopf für fünf Minuten gekocht. Am Ende der Prozedur verblieben die Objektträger im heißen Citratpuffer für weitere 10 Minuten. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in PBS dreimal gewaschen. Zur Verminderung einer übermäßig starken, unspezifischen Hintergrundfärbung erfolgte eine einstündige Inkubation mit Normalserum bei Raumtemperatur. Das Normalserum entsprach dem Wirtstier des Sekundärantikörpers und wurde vor dem Einsatz 1:100 in PBS verdünnt. Das Normalserum wurde nur abgeklopft und anschließend die Gewebeschnitte mit dem in PBS verdünnten Primärantikörper über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag konnte der Primärantikörper durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt werden. Anschließend wurden die Schnitte mit dem zuvor 1:300 in 1%igen Normalserum verdünnten biotinylierten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Sekundärantikörpers durch das Waschen mit PBS, wurde auf die Gewebeschnitte eine Strept ABComplex/HRP Lösung, die 45 Minuten vor Gebrauch hergestellt werden musste, getropft. Es handelt sich um einen löslichen Komplex, der aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase besteht. Nach 30 Minuten erfolgte erneut ein Waschschritt mit PBS. Die Enzymaktivität der Peroxidase wurde dazu genutzt, ein geeignetes Substrat in einen Farbstoff zu überführen. In der vorliegenden Arbeit ist 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet worden. AEC bildet unter Oxidation ein rotes Endprodukt, das alkohollöslich ist. Mit AEC gefärbte Proben dürfen daher nicht mit alkoholhaltigen Lösungen in Berührung kommen. Außerdem ist AEC empfindlich gegenüber fortschreitender Oxidation und starker Lichteinwirkung; es bleicht mit der Zeit aus (Nachlassen der Färbeintensität). Deshalb erfolgte die Lagerung der Schnitte im Dunkeln. Die Färbezeit richtete sich nach der Intensität der rötlichen Färbung, die beim Gewebeschnitt auftritt. Sie schwankte zwischen einer halben Minute und fünf Minuten. Nachdem eine rötliche Färbung sichtbar wurde, musste der Objektträger auf einer gesonderten Ablage abgetropft und in Wasser mehrmals gespült werden. Nun wurden die Schnitte zur Anfärbung der Zellkerne drei Minuten mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt und anschließend wieder mit Wasser gespült. Entsprechend dem Resultat wurde zusätzlich ein „Nachbläuen“ durch den Einsatz von Leitungswasser für wenige Minuten durchgeführt. Zum Schluss wurden die gefärbten Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt.

		Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper	Anti-mVEGFR-1 Ziege	1 : 100	R & D
	Anti-mVEGFR-2 Ratte	1 : 100	R & D
Sekundärantikörper	Kaninchen Anti Ziege; biotinyliert	1 : 300	Vector
	Kaninchen Anti Ratte; biotinyliert	1 : 300	Vector

Tabelle 2.16.: Eingesetzte Antikörper in der Immunhistochemie

2.5. Toxizität-Analysen

2.5.1. Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) - Aktivität

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur photometrischen Bestimmung von freigesetzter Laktatdehydrogenase (LDH) in Zellkulturen. Durch Lysis der Zellen kann ebenfalls die Gesamt-LDH Menge bestimmt werden. LDH wird freigesetzt, wenn Chemikalien oder Extrakte in letalen Dosen auf die Zellen einwirken und die Zellen absterben. Es ist somit möglich, die Zytotoxizität von Chemikalien zu überprüfen.

LDH ist eine Oxidoreduktase, die die Übertragung von Wasserstoff katalysiert. Der vom dem Substrat (Laktat) abgelöste Wasserstoff wird von der LDH stereospezifisch und stereoselektiv auf das Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) übertragen. Nach C. Legrand et al. (1992) ist bekannt, dass die LDH-Aktivität im Medium proportional zur Anzahl der toten Zellen in eukaryotischen Zellen steigt. Das Verhältnis der LDH, die während der Inkubation bestimmter Stimulanzen freigesetzt wird, zur Gesamt-LDH zeigt somit den Toxizitätsgrad der Stimulanzen auf die jeweilige Zellkultur an. Für die Bestimmung des Gesamt-LDH mussten die Zellen jeweils mit einer LDH-Lysis-Assay-Lösung behandelt werden (1/10 des Mediumvolumens). Nach einer Inkubation von 45 Minuten im Brutschrank wurden die Zelltrümmer durch fünf minütiges Zentrifugieren bei 1000 U/min abgetrennt. Das entnommene Medium der jeweiligen Proben wurde ebenfalls zentrifugiert.

Die in dem Medium enthaltenen Eisenpartikel müssen vor der Messung entfernt werden, da sie die photometrische Bestimmung beeinträchtigen. Hierfür erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 8000 U/min für 10 Minuten. 120 µl der Probelösungen wurden auf eine 96 Well Platte pipettiert und jeweils 20 µl Substrat (Laktat), Färbelösung (p-Iodnitrotetrazolium violett = INT) und Co-Faktor (NAD⁺ (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) und Diaphorase-FAD) hinzugefügt. Die anschließende Reaktion erfolgte im Dunkeln für 25 Minuten. Die Reaktion wurde mit 20 µl 1N HCL abgestoppt.

Laktat wird durch NAD⁺ in Gegenwart von LDH zu Pyruvat oxidiert. Das durch Reduktion von NAD⁺ gebildete NADH reduziert Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), das an Diaphorase gekoppelt ist, zu FADH₂. Hierbei werden die Elektronen auf die Farbreagenz p-Iodnitrotetrazolium violett (INT) übertragen, wobei ein violetter Farbkomplex (Formazan) gebildet wird, der bei 490 nm photometrisch gemessen werden kann. Das gebildete Formazan ist proportional zur LDH – Aktivität (Decker und Lohmann-Matthes 1988, Ishiyama et al. 1995).

2.5.2. CyQuant Proliferationstest

Der CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (C-7026 von Molecular Probes, Eugene, OR, USA) stellt eine schnelle, sensitive und reproduzierbare Methode zur Zellzahlbestimmung dar. Der Assay basiert auf einem grün fluoreszierenden Farbstoff (CyQuant GR), der nach einer Zelllyse durch die Bindung an die zellulären Nucleinsäuren eine große Fluoreszenzverstärkung bewirkt (Extinktion/Emission Max.: 480/520).

Nachdem die Zellen entsprechend dem jeweiligen Protokoll inkubiert wurden, mussten sie in PBS gewaschen und anschließend bei -20°C eingefroren werden, wodurch sie aufbrachen. Nachdem am folgenden Tag die Zellen aufgetaut waren, ist 250 μl des 1:19 mit bidestillierten Wasser verdünnten Lysis-Puffers hinzugefügt worden. Zu jedem Ansatz wurde zusätzlich 5 μl RNase hinzugemischt. Die RNase (Sigma R-6513; 10 mg) wurde zuvor in 1 ml Wasser gelöst (0,8 U/ μl) und vor Gebrauch nochmals 1:9 verdünnt.

Der Ansatz inkubierte eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Lysate wurden in Aliquots aufgeteilt, so dass jeweils eine Zellzahl von 5000 bis 100.000 gegeben war. Die Reste wurden für eine mögliche Nachbestimmung im Kühlschrank aufbewahrt.

Für eine Zellzahlbestimmung wurde ein DNA-Standard verwendet und dafür 2 μl der Bakterienphage λ -DNA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit 198 μl des verdünnten Lysis Puffers gemischt. Die verschiedenen Proben, sowie Leerwert und Standard, sind nach dem folgenden Schema durchgeführt worden.

	Leerwert	Standard	Probe
Lysat	-	-	50 μl
DNA Standard	-	50 μl	-
Verdünnter Lysis Puffer	250 μl	200 μl	200 μl
2 x Reagenz Ansatz von CyQuant GR	250 μl	250 μl	250 μl

Tabelle 2.17.: Pipettierschema für den CyQuant Proliferationstest

Die Ansätze wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei einer Extinktion von 480 nm und bei einer Emission von 520 nm gemessen. Dabei entspricht ein DNA Gehalt von 50 ng ungefähr 10.000 Zellen.

2.6. Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIO)

Die Eisenoxidnanopartikel werden aufgrund ihrer Größe in zwei Untergruppen eingeteilt. Die Untergruppe mit dem vergleichsweise größerem Durchmesser (30 bis 150 nm oder größer) werden, historisch bedingt, als SPIO bezeichnet, während die Partikel mit einem kleinerem Durchmesser als 20 nm als Ultrakleine Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (USPIO) bezeichnet werden

Die Partikel basieren auf dem Prinzip der sterischen Stabilisierung mit einer ausreichend dicken Polymerhülle, die im Sinne eines Abstandshalters eine Aggregation der Eisenoxid-Kristalle im physiologischen pH Bereich verhindern. Diese sterische Stabilisierung hat ihre Grenze bezüglich der minimal erreichbaren Größe der Partikel, die ungefähr im Bereich von 15 bis 20 nm liegt.

Als Hüllenmaterial werden Polymere wie Dextran (Prince et al. 2003), Carboxydextran (Lawaczeck et al. 1997), Albumin (Widder et al. 1987), Stärke (Kreft et al. 1994), Polyethylenglycol (Saeed et al. 1998) oder eine liposomale Umhüllung (Päuser et al. 1997) verwendet.

Der Eisenkern der Eisenoxidnanopartikel besteht aus Magnetit und/oder Maghemit. Magnetit ist das stabilste Oxid des Eisens mit einer hohen Beständigkeit gegen Säuren und Laugen. Es ist ein im kubischen Kristallsystem kristallisierendes Oxidmineral mit der chemischen Summenformel Fe_3O_4 . Eines der Eisenionen ist dabei zweiwertig, die beiden anderen dreiwertig (Eisen(II,III)oxid). Maghemit (Maghämmit) ist ebenfalls eine Mineralklasse der Oxide mit einem kubischen Kristallsystem, das mikrokristalline Aggregate entwickelt. Das Maghemit leitet sich von der Struktur des Magnetits ab, mit dem Unterschied, dass nur dreiwertiges Eisen existiert. Die chemische Zusammensetzung ist somit Fe_2O_3 .

Es wurden verschiedenste Eisenpartikel untersucht, die sich nicht nur in ihren Durchmesser stark unterscheiden, sondern auch in ihrer Hüllenbeschaffenheit.

Partikel	Eisenkern	Hülle	Partikel- durchmesser	Hersteller
Resovist	Maghemit/ Magnetit	Carboxyldextran	60 nm	Schering Berlin
B102	Maghemit/ Magnetit	Carboxylmethyl- dextran	60 nm	Dr. Norbert Buske Berlin
kolloidales Fe ₃ O ₄	Magnetit	keine	10 nm	Dr. Norbert Buske Berlin
Microspheres (M 310 nm)	30 – 60% Eisen	Polystyren	310 nm	Merck Darmstadt
Microspheres (M 850 nm)	55 – 65% Eisen	Polystyren	850 nm	Merck Darmstadt
Nanomag20 (N20)	Magnetit	Dextran	20 nm	Micromod Rostock
Nanomag70 (N70)	Maghemit	Dextran	70 nm	Micromod Rostock
Nanomag100 (N100)	Maghemit	Dextran	100 nm	Micromod Rostock

Tabelle 2.18.: Eigenschaften und Hersteller der verwendeten Eisenoxidnanopartikel

Das kolloidale Fe₃O₄ wird im Gegensatz zu den anderen untersuchten Partikeln nicht sterisch, sondern elektrostatisch stabilisiert. Die starke Oberflächenladung führt zu einer elektrostatisch bedingten Abstoßung der Partikel untereinander, wodurch eine Aggregation verhindert wird.

2.7. Eisendetektion

2.7.1. Photometrische Bestimmung des Eisengehaltes

2.7.1.1. Herstellung des Eisenstandards

Durch das Mischen von 60 µl des Eisenstandard Titrisol (1 mg Fe/ml) mit 60 µl einer 36 %igen HCl-Lösung entstand eine Lösung, die zunächst in einen Heizblock bei 70°C 10 Minuten lang erhitzt wurde. Nach einer Abkühlung von weiteren 10 Minuten bei Raumtemperatur sind 100 µl der Lösung mit 4,9 ml 0,68 M Citrat 0,64 M Phosphatpuffer (pH 3) aufgefüllt worden, um anschließend verschiedene Verdünnungen herzustellen und eine Eichgerade darstellen zu können.

2.7.1.2. Herstellung der Zellprobe

Die Zellen in den Kulturschalen mussten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend trocken eingefroren werden. Danach wurden die Zellen mit 1 ml 36%igen HCl abgekratzt. Für einen Aufschluss der Proben musste die Lösung für 10 Minuten bei 70°C erhitzt werden. Nach einem Abkühlen von 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Verdünnung von 100 µl der Probenlösung mit 3,9 ml des 0,68 M Citrat 0,64 M Phosphatpuffers.

2.7.1.3. Messung des Eisenstandards bzw. der Zellprobe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete photometrische Methode zur Bestimmung von Fe^{2+} (und Fe^{3+} nach Reduktion) wurde mit Hilfe des empfindlichen Ferrospektral $\text{Na}_2[3-(2\text{-Pyridyl})-5,6\text{-bis}(4\text{-phenylsulfonsäure})-1,2,4\text{-triazin}]$ durchgeführt. Die Reduktion zu Eisen(II) erfolgte nach Zugabe von Thioglycolsäure-Puffer, der ebenfalls in dem Eisen-Test-Kit (Fe-AN; Spectroquant) enthalten ist.

Nach der Verdünnung wurden die Proben zusammen mit den Eisenstandard auf einer 96 Well Platte gemessen. Dazu mussten 100 µl des 0,68 M Citrat 0,64 M Phosphatpuffers zu Beginn vorgelegt und anschließend 100 µl der Zellprobe bzw. des Eisenstandards hinzugefügt werden. Um eine Farbreaktion zu initialisieren waren 15 µl des Eisen-Test-Kits (Fe-AN; Spectroquant) für die Komplexierung des Eisen(II) notwendig. Die Platte wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschüttelt und bei einer Wellenlänge von 550 nm detektiert.

2.7.2. Eisenfärbung

Berliner Blau ist ein lichtehtes, tiefblaues, mineralisches Pigment und gilt als der erste moderne synthetische Farbstoff.

Ungefähr 100.000 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und einen Tag kultiviert, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Zu Beginn musste mit PBS gespült und die Zellen mit eiskaltem Aceton 10 Minuten lang fixiert werden. Nach erneutem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit einer 2%igen Kaliumhexacyanoferrat (II) Lösung (in destilliertem Wasser gelöst), die 1:1 für 10 Minuten mit 1 N Salzsäure gemischt wurde, bei 37°C inkubiert. Die Lösung musste immer frisch angesetzt, vor Gebrauch steril filtriert und anschließend warm gestellt werden.

Mit $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{II})(\text{CN})_6]$ entstand der tiefblau gefärbte Komplex $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, das Berliner

Blau, das seit 1704 bekannt ist. Die intensive Färbung beruht auf der Elektronenübertragung zwischen Fe(II) und Fe(III). Nach dem Spülen mit PBS wurden die Zellkerne mit vorher filtrierten Kernechtrot eine Minute lang gefärbt, mit destilliertem Wasser gespült und schließlich mit Aquatex eingebettet.

2.7.3. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

2.7.3.1. Aufbau des TEM

Es gibt zwei Grundtypen von Elektronenmikroskopen, das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und das Rasterelektronenmikroskop (REM). Während man beim TEM ein Durchlichtelektronenbild erhält, wird im REM ein dreidimensionales und plastisches Bild von Oberflächen erzeugt.

Da schnelle Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als das sichtbare Licht besitzen und die Auflösung eines Mikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (derzeit ungefähr 0,1 nm) erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop (ungefähr 200 nm).

Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht eine direkte Abbildung der Probe. Die Elektronen durchstrahlen das Probenmaterial, das zu diesem Zweck entsprechend dünn sein muss. Je nach Ordnungszahl der Atome, aus denen die Probe besteht, der Höhe der Beschleunigungsspannung und der gewünschten Auflösung kann die sinnvolle Probendicke von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern reichen. Je höher die Ordnungszahl und je niedriger die Beschleunigungsspannung ist, desto dünner muss die Probe sein.

Der Elektronenstrahl wird durch eine Haarnadelkathode, bestehend aus Wolfram, erzeugt und in Richtung Anode auf eine sehr hohe Geschwindigkeit beschleunigt. Da die Anwesenheit von reaktiven Gasen (Luftsauerstoff) zu einer Wechselwirkung mit dem aufgeheizten Elektronenemitter führt und der Wolframfaden infolgedessen durchbrennen würde, wird für die Elektronenmikroskopie ein Vakuum angelegt. Der entstehende Elektronenstrahl wird dabei durch inhomogene magnetische Felder (Linsen) gelenkt und gebündelt (Abbildung 2.4.).

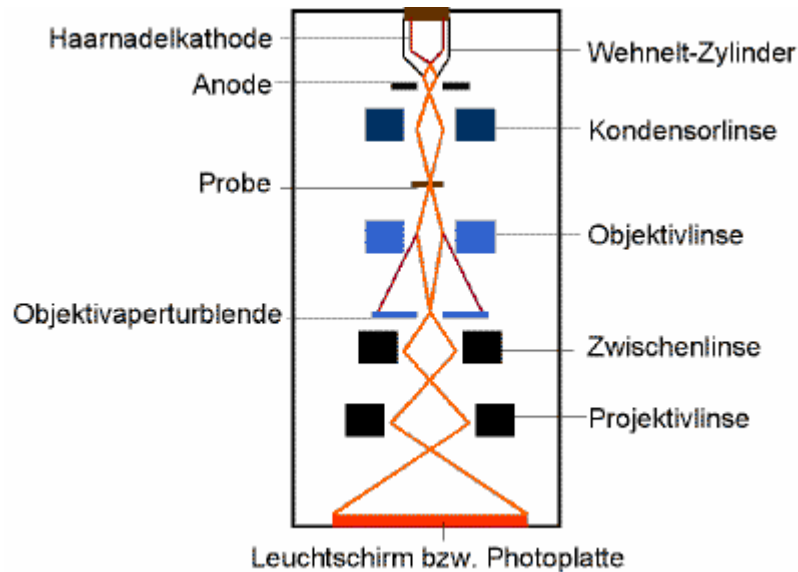


Abbildung 2.4.: Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops

Der Aufbau des Transmissionselektronenmikroskops ist einem Lichtmikroskop nachempfunden, das heißt es besteht aus hintereinander geschalteten vergrößernden Linsen. Das Elektronenbild erreicht dabei eine bis zu 500.000 fache Vergrößerung und ein Auflösungsvermögen von ungefähr 0,1 nm. Die TEM Bilder entstehen durch Phasenkontrast. Beim Durchgang durch die Probe, die auf einem Metallgitterplättchen aufbracht ist, werden die Elektronen in unterschiedliche Richtungen gebeugt, wodurch Phasenunterschiede entstehen.

Besonders die Transmissionselektronenmikroskopie spielt eine entscheidende Rolle, wenn es darum geht, die Teilchengrößenverteilung und Mikrostruktur von Nanopartikel zu charakterisieren.

2.7.3.2. Einbettung in Araldit für die Elektronenmikroskopie

Die Zellen wurden auf kleine Kulturschälchen ausgesät und mit Hilfe von 3% Glutaraldehyd (in PBS verdünnt; pH 7,2 bis 7,4) fixiert. Durch die chemische Fixierung mit Glutaraldehyd konnten durch die Vernetzung von Zellproteinen alle Vorgänge in den Zellen in einer akzeptablen Zeit angehalten werden, um somit den Erhalt und die Stabilisierung der Zellstrukturen zu gewährleisten und Färbungen leicht zu ermöglichen.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS sechs Mal innerhalb von zwei Stunden gewaschen. Die Kontrastverstärkung mit 2% Osmiumtetroxid erfolgte über 30 Minuten. Das Osmiumtetroxid war in destilliertem Wasser gelöst. Nach der Zugabe reagierte es mit Ethylengruppen von ungesättigten Lipiden, wobei reduziertes

Osmium entstand, das beim Ausfällen zu der Kontrastgebung führte. Es wurden zyklische Monoester gebildet. Reagieren Monoester mit Glykolgruppen, entstehen beständige Diester, die eine stabile Vernetzung mit Lipiden ermöglichen. Araldit, ein in der Elektronenmikroskopie häufig benutztes Kunstharz, ist besonders hart und erlaubt sehr dünne Schnitte. Zwar ermöglicht es einen guten Kontrast, jedoch ist es relativ giftig und erfordert eine komplette Entwässerung der Präparate. Dafür wurde eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet (jeweils zweimal fünf Minuten 50%, 70%, 80%, 90% und 95% Ethanol sowie zweimal 10 Minuten 100% Ethanol (Merck)).

Im Anschluss wurde Araldit mit 3 % DMAE (Dimethylaminoethanol) Beschleuniger und 100% Ethanol in einen Verhältnis von 1:1 unter vorsichtigem Rühren gemischt. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bildeten. Das Gemisch konnte nun auf die Kulturschälchen gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Das Aralditgemisch wurde entfernt und die Kulturschälchen mit Araldit, das jetzt 2% DMAE Beschleuniger enthielt, bis ungefähr auf die Hälfte gefüllt. Dabei musste ebenfalls darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen bildeten. Zum Schluss härtete das Araldit vier Tage bei 37°C und anschließend einen Tag bei 65°C aus.

2.8. Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die PCS ist ein optisches Messverfahren zur Bestimmung der Größenverteilung von Partikeln in Flüssigkeiten. Die Methode nutzt die Streuung von Laserlicht durch die Partikel aus. Der Messbereich reicht von einigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern. Das Messprinzip beruht auf der Brownschen Molekularbewegung der Teilchen. Bei gleicher Temperatur bewegen sich die kleinen Moleküle schneller als die großen. Das Licht eines Lasers durchstrahlt die zu untersuchende Probe. Dabei streuen die darin befindlichen Teilchen das Licht in verschiedene Richtungen. Unter einem bestimmten Winkel befindet sich ein Photomultiplier, der das gestreute Licht detektiert. Jedes einzelne Teilchen kann innerhalb kurzer Zeit einige Photonen zum Detektor streuen. Dies geschieht laufend innerhalb sehr kurzer Zeit. Wenn größere Teilchen vorhanden sind, bleibt die gemessene Lichtintensität (Streurate) für eine längere Zeit konstant. Verändert sich die Lichtintensität innerhalb kürzester Zeit, so handelt es sich um kleine Teilchen. Die zeitliche Verteilung der Detektionsereignisse erlaubt dann, auf die Größe der streuenden Teilchen und somit auf die Partikelgrößenverteilung der Probe zu schließen.

2.9. Eisenoxidnanopartikelkonjugation

Die Konjugation der superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel erfolgte über ihre Partikelhülle. Die Dextranhülle ermöglicht nach einer Aktivierung mit Bromcyan eine Bindung an Aminogruppen, beispielsweise von Antikörpern oder Peptiden. Der Gesamtdurchmesser der Eisenoxidnanopartikel blieb auch nach Konjugation klein genug, um eine Zirkulation durch die feinsten Kapillaren zu ermöglichen. Zusätzlich können Eisenoxidnanopartikel durch ihre starke signalbeeinflussende Wirkung noch in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

2.9.1. Kopplung von Eisenoxidnanopartikeln über Bromcyan (BrCN)

Zu Beginn wurde eine Bromcyan-Lösung hergestellt, indem 1 g Bromcyan unter dem Abzug abgewogen und in 1 ml Acetonitril gelöst wurde. In einem gut schließenden Plastikgefäß unter Feuchtigkeitsausschluss ist die Lösung einige Monate haltbar. Mit dem Bromcyan musste besonders vorsichtig gearbeitet werden, da bei Kontakt eine Cyanose eintreten kann. Das Verschlucken, Einatmen oder Aufnehmen durch die Haut kann tödliche Folgen haben. Daher wurde das Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (30%) zur Reinigung eingesetzt. Materialien mussten gut abgewischt und benutzte Spitzen, die mit dem Bromcyan in Kontakt gekommen waren, in eine H_2O_2 Lösung gelegt werden. Für die Äquilibrierung des Antikörpers (20 μg) bzw. des Proteins (5 μg ; VEGF, Ligand) mit 0,1 M NaHCO_3 wurde eine chromatographische Säule (10 x 1 cm), die mit Sephadex G-25 Superfine gefüllt war, verwendet.

Eine Eisenpartikelsuspension, die 500 μg Eisen enthielt, wurde mit 50 μl 0,1 M NaHCO_3 (pH 8,3) vermischt und unter dem Abzug anschließend 20 μl der 1 g/ml Bromcyan Lösung hinzugegeben. Das BrCN führte zur Aktivierung der Dextranhülle der Eisenoxidpartikel durch die Einführung von Imidogruppen. Nachdem die Lösung mit der Pipette gemischt wurde, ließ man den Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur reagieren. Danach wurde das überschüssige Bromcyan abgetrennt, indem das Reaktionsgemisch vorsichtig auf die gelchromatographische Säule aufgetragen und mit 0,1 M NaHCO_3 (pH 8,3) eluiert wurde. Die braune Front-Zone (ungefähr 1 ml) auffangen und die Säule anschließend mit Wasserstoffperoxid spülen und reinigen waren die nächsten Schritte.

Die aktivierten Eisenpartikel (ungefähr 1 ml) wurden mit der Ligandenlösung bzw.

Antikörperlösung (ungefähr 0,5 ml) vereinigt. Die Kopplung erfolgte unter leichtem Schütteln entweder über zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum.

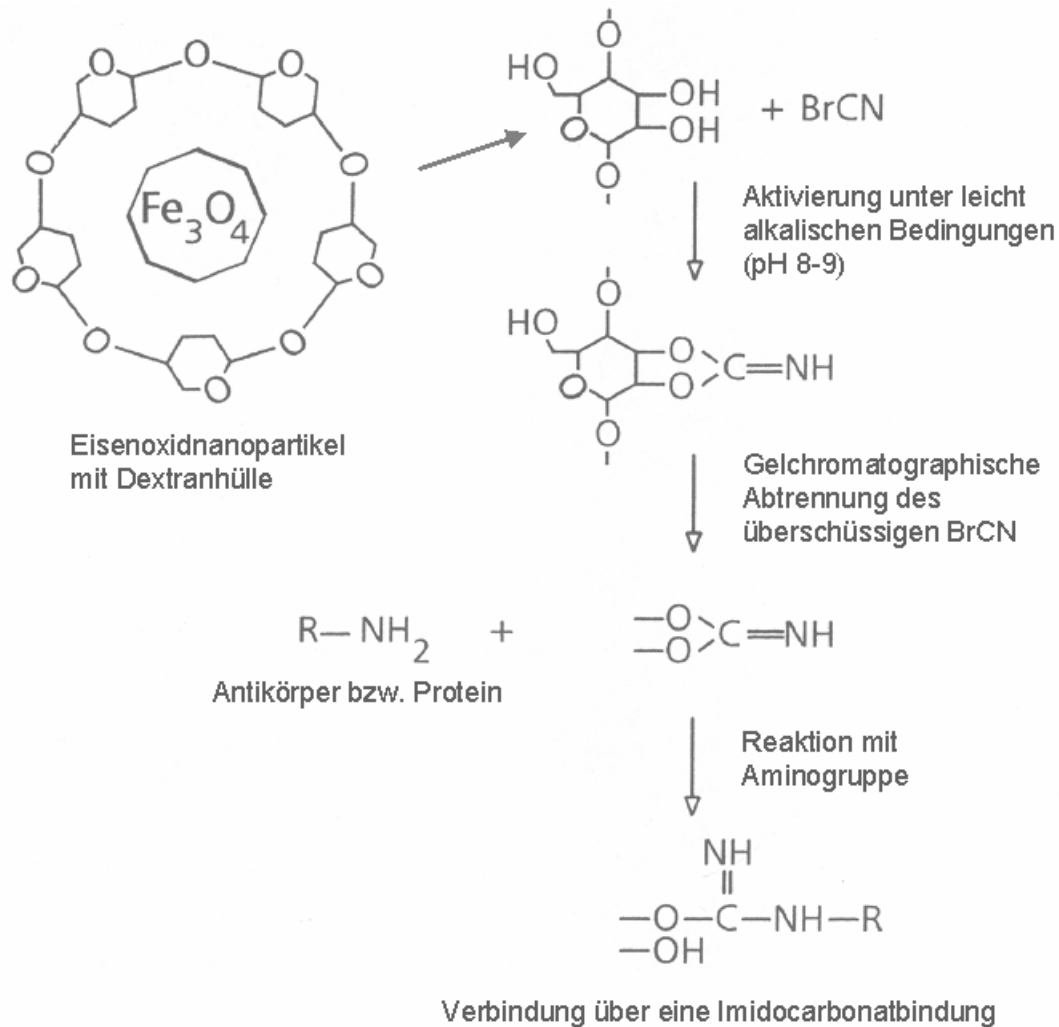


Abbildung 2.5.: Schema der Kopplung von Eisenoxidnanopartikeln mit Dextranhülle durch den Einsatz von Bromcyan.

Um die restlichen Bindungen des Eisenpartikels abzusättigen, wurden anschließend 60 µl von einem 0,2 M Tris-Puffer (pH 8,5) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der ungebundene Ligand (ungefähr 40 kDa) bzw. Antikörper (ungefähr 180 kDa) konnte dann chromatographisch durch eine Sephadex S-300 Säule (ca. 90 x 1,6 cm), die als Puffer eine 0,14 M NaCl und 20 mM Hepes (pH 7,4) Lösung beinhaltet, von den konjugierten Eisenoxidpartikeln (ungefähr 1100 kDa) abgetrennt werden. Die Säule ist für Proteine im Bereich zwischen 1×10^4 bis $1,5 \times 10^6$ Da ausgelegt. Mit Hilfe des Fraktionssammlers wurden

die einzelnen Fraktionen (jeweils 2 ml) der braunen Zone gesammelt.

Um die erfolgreiche Kopplung zu überprüfen, ist anschließend ein Dot Spot der gesammelten Fraktionen durchgeführt worden (siehe Abschnitt 2.9.2.). Die positiv auf Ligand bzw. Antikörper getesteten Fraktionen wurden gesammelt (ungefähr 10 ml) und durch eine Ultrafiltration (Membran: YM100 Millipore; Cut-Off 100kDa) (siehe Abschnitt 2.9.3.) auf 1,5 ml eingengt. Die Eisenkonzentration der Partikelkonjugatlösung wurde mit Eisentest (siehe Abschnitt 2.7.1.) bestimmt.

2.9.2. „Dot-Spot-Test“ zur Überprüfung der Eisenoxidnanopartikel-Kopplung

Von den während der Gelchromatographie gesammelten Fraktionen (2 ml) wurden jeweils 20 µl auf eine Nitrocellulose-Membran punktförmig getropft. Zusätzlich wurden eine Negativkontrolle, bestehend aus dem verwendeten Puffer, und eine Positivkontrolle, bestehend aus dem eingesetzten Protein bzw. Antikörper hinzugefügt. Nachdem die Proben eingetrocknet waren, wurde die Membran in 5% Milchpulver für eine Stunde geblockt. Für einen Dot Spot einer Antikörperkopplung konnte nun der entsprechende Sekundärantikörper mit konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) für 90 Minuten in der Blockinglösung inkubiert werden. Für einen Dot-Spot der VEGF-Kopplung wurde eine Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper gegen VEGF eingeschoben. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBST für 10 Minuten gewaschen. Der Nachweis erfolgte über die „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) Methode, entsprechend des Western Blots Verfahren (siehe Abschnitt 2.4.3.).

2.9.3. Ultrafiltration

Durch die Ultrafiltration wurden die nach dem Dot Spot vereinigten Fraktionen aufkonzentriert. Die Ausschlussgrenze ergibt sich durch die verwendete Membran und wird häufig in Form des NMWC (Nominal Molecular Weight Cut-Off) mit Dalton als Einheit angegeben. Es ist definiert als die minimale Molekülmasse eines globulären Moleküls, das durch die Membran zurückgehalten wird. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Membran mit einem NMWC Wert von 100.000 ausgewählt. Durch den aufgebauten Druck von 1 bar, gelangt die Pufferlösung durch die Membran. Allerdings sind die Eisenoxidnanopartikelkonjugate zu groß und verbleiben somit im Gefäß, wodurch eine Konzentrierung eintritt. Die Lösung der

konjugierten Eisenoxidnanopartikel wurde von 10 ml auf 1,5 eingengt. Die Membranen sind wieder verwendbar und lagern in 20% Ethanol im Kühlschrank.

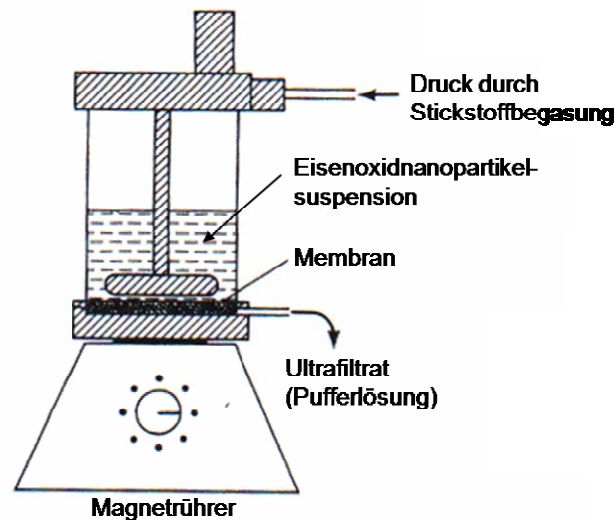


Abbildung 2.6.: Schematische Darstellung der Ultrafiltration-Apparatur

(http://web.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/protein_methods.htm)

2.10. In-vitro Nachweis der Eisenoxidnanopartikelkonjugate im MRT

2.10.1. über Einbettung der Zellen in Polyacrylamid

Für die in-vitro Untersuchungen im MRT wurden der anti-VEGF-Rezeptor-2, das VEGF und die entsprechenden Kontrollen mit den Eisenoxidnanopartikeln N100 gekoppelt (Abschnitt 2.9.1.). Die entsprechenden Eisenoxidnanopartikelkonjugate mit einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml wurden in einen Volumenverhältnis von 1:1 mit dem entsprechenden Medium eingesetzt. Die Negativkontrolle enthielt nur Medium und die Positivkontrolle die entsprechende Eisenkonzentration des Resovists. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln über einen Zeitraum von 60 Minuten. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um die nichtgebundenen Eisenoxidnanopartikel zu entfernen. Die Zellen wurden in 10%iger Polyacrylamid-Lösung eingebettet und im MRT untersucht.

2.10.2. über PET-Membran

Um eine in-vitro Visualisierung als Monolayer erreichen zu können, wurden PET (Polyethylenterephthalat)-Membranen verwendet, die während der MRT Messung keinen Kontrast verursachen. Polyethylenterephthalat ist ein durch Polykondensation hergestellter thermoplastischer Kunststoff aus der Familie der Polyester. Die Monomere sind Terephthalsäure (1,4-Benzoldicarbonsäure) und Ethylenglykol. Außer der Herstellung von Kunststoffflaschen und Textilfaser wird PET auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt.

Die PET Membranen wurden in speziellen Halterungen eingebaut (siehe Abbildung 2.7.). Zellen in einer Anzahl von 50.000 bis ungefähr 200.000, abhängig von der jeweiligen Zelllinie, sind darauf kultivierbar. Da HUVEC's in-vivo als Monolayer wachsen, wurden diese Bedingungen in-vitro durch die PET Membraneinsätze nachgestellt.

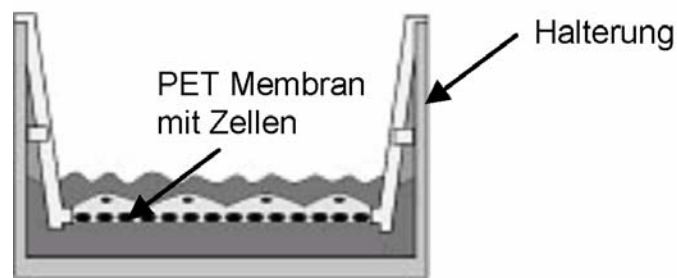


Abbildung 2.7.: Darstellung des PET-Membran-Halterungssystems. Der Membraneinsatz lag auf einer Halterung, so dass die Membran den Boden, der im MRT einen Kontrast hervorruft, nicht berührte. Somit wurden Störungen während der Messung erheblich reduziert.

2.11. In-vivo Versuch des N100-VEGF-Konjugates

Da in-vitro nur jeweils einzelne Parameter getestet werden konnten, mussten in-vivo Versuche an Mäusen herangezogen werden, um die Verteilung und Sensitivität des Verfahrens zu klären.

Für die Tierversuche wurden SCID-Mäuse (C.B-17/lcrHsd-scid-bg) verwendet, da Abstoßungsreaktionen der injizierten humanen Tumorzellen für diesen Mausstamm nicht zu erwarten waren. Die Mäuse tragen in sich die SCID-Mutation, die zu einer schweren kombinierten Immunkrankheit („severe combined immune deficiency“) führt. Durch die Krankheit ist die Differenzierung der T- und B-Zellen stark gestört, so

dass kaum Lymphozyten vorhanden sind (Bosma et al. 1983). Lymphknoten und Thymus haben ungefähr 10% der normalen Größe, die Milz kann verkleinert sein (Custer et al. 19985). Zusätzlich tragen die verwendeten Mäuse die beige-Mutation, die eine Dysfunktion während der Bildung von Lysosomen bewirkt. Dadurch wird unter anderem die Freisetzung von proteolytischen Enzymen der Natürlichen Killer (NK) Zellen unterbunden (Spicer et al. 1981).

Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen im Tierhaus des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug konstante 20°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 55%. Ein Zeitschaltssystem gewährleistete einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden. Das Futter und das Wasser wurden vorher autoklaviert. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde regelmäßig adspektorisch und durch Gewichtskontrollen überwacht.

Die schnell wachsende und sehr gut charakterisierte humane HT-29 Kolonkarzinomzelllinie wurde in die Milz der Mäuse injiziert. Das Metastasierungsverhalten der HT-29 Zellen zeigt den Pfortadertyp, hämatogene Metastasen treten dabei in der Leber auf. Der Grund dafür ist, dass der venöse Abfluss und damit die Tumorzellverschleppung primär über die Pfortader in die Leber erfolgt.

Zur Etablierung wurden die HT-29 Zellen aus einer subkonfluenten Flasche trypsiniert (siehe Abschnitt 2.2.2.), in 10 ml Medium aufgefangen, und anschließend bei 1000 U/min und Raumtemperatur pelletiert. Um Reste des immunogen wirkenden fetales Kälberserum (FKS) zu entfernen, mussten die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und erneut pelletiert werden. Nach dem Resuspendieren und dem Zählen (siehe Abschnitt 2.2.3.) wurde die gewünschte Anzahl von 1×10^6 Zellen in ein neues Gefäß überführt und dieses auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in das Injektionsmedium (50 U/ml Penizillin und 50 µg/ml Streptomycin in DMEM) von 30 µl aufgenommen.

Für die Injektion sollten die Tiere mittels intraperitoneal applizierter, gewichtsangepasster Narkose (Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht (KGW) / Midazolam (5 mg/kg KGW) / Fentanyl (0,05 mg/kg KGW) anästhesiert sein. An den Tieren musste zunächst eine mediane Laparotomie durchgeführt werden. Nach der Verlagerung des Magens und der Fixierung der Milz erfolgte die Injektion der Tumorzellsuspension im mittleren Organdrittel unter die Kapsel der Milz. Nach der Repositionierung der Organe wurde die Bauchdecke schichtweise verschlossen. Die

Operationszeit betrug ungefähr 10 Minuten und die Narkosedauer ca. 45 Minuten. Das Vorgehen ist seit Jahren in der Arbeitsgruppe der Molekularen Onkologie erprobt und konnte komplikationslos durchgeführt werden. Aufgrund des postoperativen Wundschmerzes sollte eine analgetische Behandlung mit Buprenorphin (0,05 – 0,1 mg/kg KGW) vorgenommen werden. Zur Überwachung wurde eine regelmäßige Gewichtskontrolle und tägliche Kontrolle der Vitalität durchgeführt. Bei eventuell auftretenden Komplikationen wie Kachexie, Gewichtsverlust größer als 25%, Ikterus oder Vitalitätsverlust, hätte die sofortige Tötung erfolgt. Nach vier Wochen Tumorwachstum wurde für Voruntersuchungen die Leber von einigen Mäusen entnommen, um eine Bestimmung der Expression der VEGF-Rezeptoren-1 und -2 mittels Real-Time-RT-PCR und Immunhistochemie durchführen zu können.

Für Kontrollmessungen dienten gesunde Mäuse. Nach der Narkose erfolgte die Injektion der konjugierten Eisenoxidnanopartikel, für jede Maus 50 µg Eisen in einer 100 µl 0,9% Kochsalzlösung. Für die Kopplung wurde ein Teilchenverhältnis zwischen VEGF und dem N100 Partikel von 30 zu 1 gewählt. Die N100 Partikelanzahl wird vom Hersteller Micromod mit $1,4 \times 10^{13}$ Teilchen pro ml angegeben. Mit Hilfe der Molekularmasse von VEGF (38 kDa) und der Avogadro – Konstante (Teilchenzahl pro Stoffmenge = 6×10^{23}) wurde die entsprechend notwendige Menge an VEGF festgestellt.

Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene. Während der Injektion wurde der Kontrast in der Leber sowie in der Aorta verfolgt. Der Kontrast in der Aorta gab die Zirkulationsdauer der Eisenoxidnanopartikel im Blut an. Dagegen konnte durch den Kontrast in der Leber die Aufnahme der Partikel bestimmt werden. Weiterhin wurde die Leber in Abständen von drei Tagen im MRT untersucht.

Stamm	C.B-17/lcrHsd-scid-bg
Alter	ungefähr 12 Wochen
Geschlecht	männlich
injizierte Eisenmenge	10 bis 50 µg
Narkose	Medetomidin (0,5 mg/kg KGW) Midazolam (5 mg/kg KGW) Fentanyl (0,05 mg/kg KGW)

Tabelle 2.19.: Übersicht über die verwendeten Mäuse

Am Ende der MRT-Messungen wurden die Mäuse mittels cervikaler Dislokation getötet.

2.12. Farbstoffe

Grundvoraussetzung für die Farbstoffauswahl ist zunächst, dass der Farbstoff in einer reaktiven Form vorliegt, damit er an die zu untersuchenden Biomoleküle gekoppelt werden kann. Zusätzlich dazu ist eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute in wässriger Umgebung wichtig sowie eine ausreichende Photostabilität.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoff Cy5, Cy7 und IRDye 800CW NHS, sowie Quantum Dots (Jonamac Red; Amine T2-MP EviTag) verwendet.

2.12.1. Cy-Farbstoffe (Cy5 und Cy7)

Die Cy-Farbstoffe (GE Healthcare, Piscataway, NJ) zeichnen sich im Gegensatz zu den klassischen Farbstoffen Fluoreszein und TexasRed durch einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten aus (Wessendorf et al. 1992). Im Vergleich zu den klassischen Fluoreszenzfarbstoffen, wie zum Beispiel dem Tetramethylrhodamin, besitzen die Carbocyanine eine extreme Leuchtintensität, Photostabilität und Wasserlöslichkeit (Wessendorf et al. 1992). Daher werden sie häufig bei der Erforschung von biologischen Komponenten eingesetzt (Mujumdar et al. 1993, Gruber et al. 2000). Cyanine ist eine Sammelbezeichnung für synthetische, organische Farbstoffe, die als Elektronenakzeptor eine quartäre Ammoniumgruppe und als Elektronendonator ein tertiäres Amin besitzen. Die Cyanine haben die allgemeine Struktur: $R_2N^+=CH[CH=CH]_n-NR_2$

Beide Gruppen verfügen über eine relativ starke bathochrome Wirkung, weshalb die Cyaninfarbstoffe auch mit einem sehr kleinem π – Elektronensystem bereits Licht im sichtbaren Bereich absorbieren.

Zum Erhalt der Reaktivität wurde Cy5, wie auch Cy7, in DMSO gelöst. Die Farbstoffe werden bei 649 nm bzw. 747 nm maximal angeregt und zeigen bei 670 nm bzw. 776 das Emissionsmaximum. Durch die Anregung der Carbocyaninfarbstoffe mit rotem Licht ist die resultierende Autofluoreszenz in biologischen Proben niedrig. Weiterhin bleibt die Intensität der Färbung in geeignetem organischem Eindeckmedium bei 4°C oft über Jahre erhalten. Die Carbocyanine besitzen eine N-hydroxysuccinimidylester (NHS-Ester) Gruppe, die eine Kopplung an Komponenten mit freien Aminogruppen

ermöglicht. Für Peptide erfolgt die Verbindung somit über die ϵ -Aminogruppe des Lysins oder der N-terminalen Aminogruppe (siehe Abschnitt 2.12.3.).

	Cy5	Cy7
Molekulargewicht	791,99 g/mol	818 g/mol
Absorptionsmaximum	649 nm	747 nm
Emissionsmaximum	670 nm	776 nm
Extinktionskoeffizient	250.000 M ⁻¹ cm ⁻¹	200.000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Quantenausbeute	> 0,28	-

Tabelle 2.20.: Zusammenfassung der Eigenschaften der zwei verwendeten Cyaninfarbstoffe

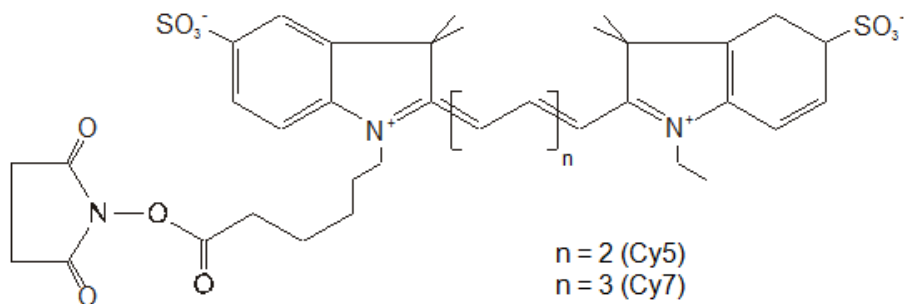


Abbildung 2.8.: Struktur des Cy5 und Cy7

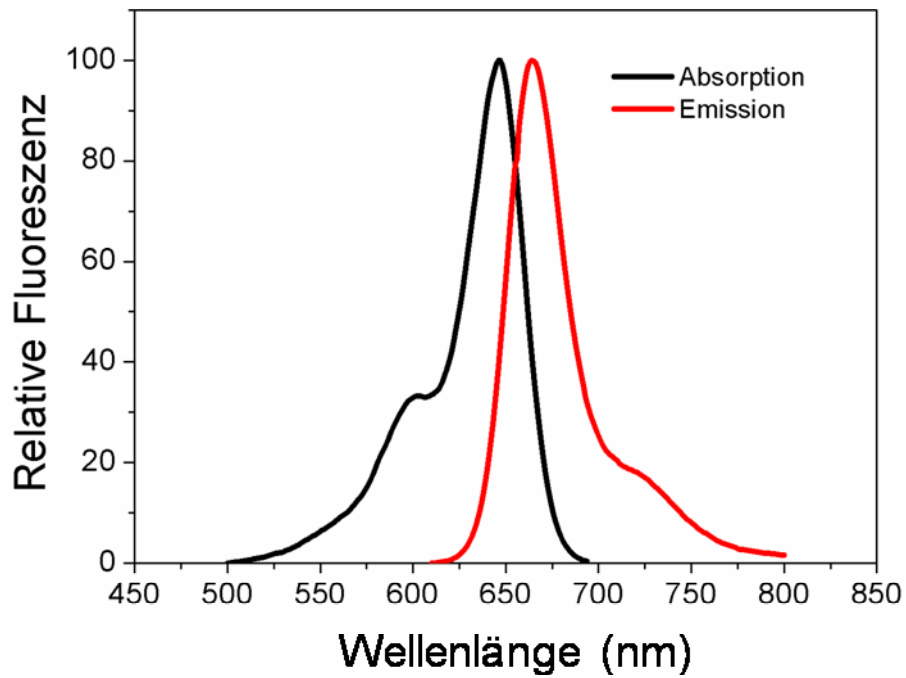


Abbildung 2.9.: Spektrum des Cy5 NHS-Esters (Daten von der Homepage des Herstellers; GE Healthcare)

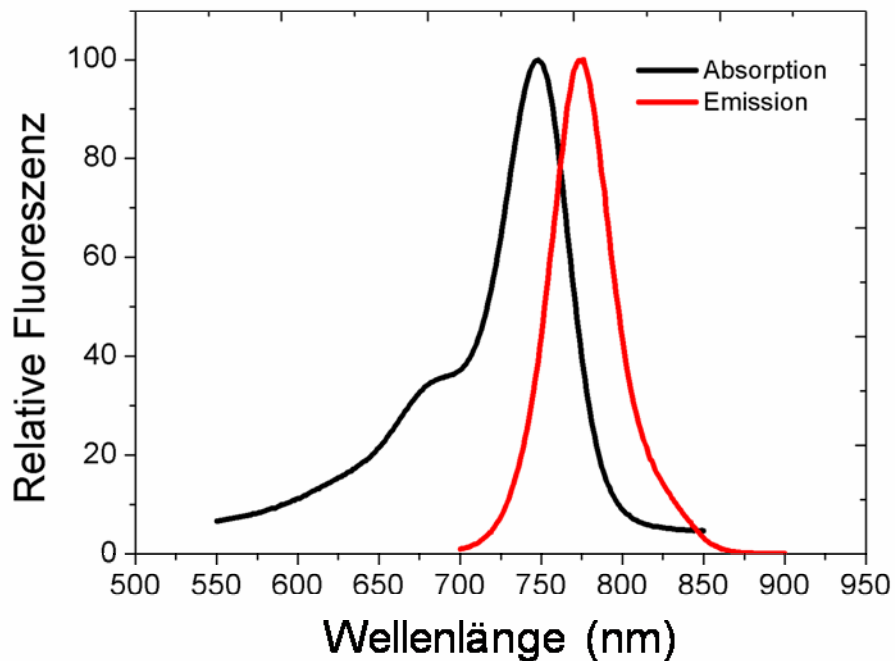


Abbildung 2.10.: Spektrum des Cy7 NHS-Esters (Daten von der Homepage des Herstellers; GE Healthcare)

2.12.2. IRDye 800CW NHS-Ester

Auch der IRDye 800CW von LICOR besitzt, ebenso wie die Cy-Farbstoffe, einen N-hydroxysuccinimid Ester. Entsprechend gleich sind auch die Kopplungsbedingungen der beiden Farbstoffe. Die Extinktion und Emission des IRDye 800CW-Farbstoffes sind allerdings langwelliger als die der Cy-Farbstoffe, womit die Eindringtiefe in organisches Gewebe erhöht und der Hintergrund während der Messung vermindert wird. Somit werden die Farbstoffe für Nahinfrarotuntersuchungen (NIR = near – infrared) in der DNA Sequenzierung, Proteinforschung und in der Kleintierbildgebung eingesetzt. Um die Reaktivität des Farbstoffes zu erhalten, wird auch er in DMSO gelöst.

	IRDye 800 CW NHS-Ester
Molekulargewicht	1166 g/mol
Absorptionsmaximum	774 nm
Emissionsmaximum	789 nm
Extinktionskoeffizient	240.000 M ⁻¹ cm ⁻¹

Tabelle 2.21.: Übersicht über die Eigenschaften des IRDye 800CW NHS-Esters

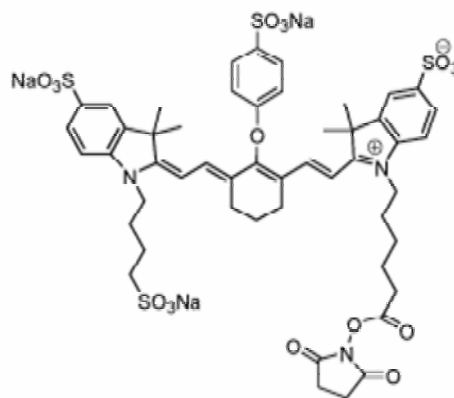


Abbildung 2.11.: Struktur des IRDye 800CW NHS-Esters (Homepage der Firma LICOR)

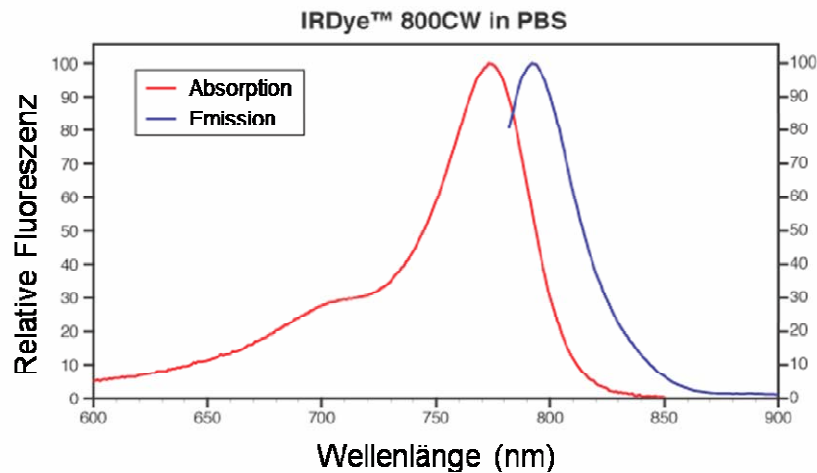


Abbildung 2.12.: Spektrum des IRDye 800CW NHS-Esters (Homepage der Firma LICOR)

2.12.3. Kopplung eines Farbstoffes mit einer Succinimydestergruppe (Cy5, Cy7 und IRDye 800CW NHS)

Die gebräuchlichste funktionale Gruppe für die Markierung von Peptiden ist die primäre Aminogruppe, die durch eine N-terminale Aminogruppe oder einer ϵ -Aminogruppe von der Aminosäure Lysin zu Verfügung gestellt werden kann. Lysin ist eine relativ häufige Aminosäure, wovon die meisten Proteine mindestens eine besitzen. In den meisten Fällen sind eine oder mehr Lysin Reste für eine Kopplung zugänglich.

Die Cyaninfarbstoffe Cy5 und Cy7 sowohl auch IRDye 800CW verfügen zusätzlich zu den fluoreszierenden Eigenschaften über eine monofunktionale N-hydroxysuccinimid Estergruppe (NHS – Ester).

Die Kopplung benötigt einen leicht alkalischen pH-Wert. Ein unprotoniertes Amin bewirkt durch einen nucleophilen Angriff eine Amidbindung. Die Reaktion verläuft schnell und unter milden Reaktionsbedingungen ab. Die Hydrolyse des NHS-Esters ist dabei die konkurrierende Reaktion. Durch das Einstellen des passenden pH-Wertes ist eine Beeinflussung in die eine oder andere Richtung möglich. Für die Peptidkopplung über die Bildung einer Amidbindung sollte ein pH-Wert zwischen 7 und 9,5 gewählt werden. Daher wird häufig, wie auch in dieser Arbeit, ein Carbonatpuffer, beispielsweise 0,1 M NaHCO_3 (pH 9), verwendet. Der Puffer sollte

keine primären oder sekundären Amine besitzen, weshalb Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) Puffer für diese Reaktion nicht geeignet ist. Weiterhin muss das Verhältnis des Farbstoffes zum Antikörper oder Protein, das zwischen 4 und 12 liegt, während der Kopplung eingehalten werden. Ein Überschreiten würde ein „Self – Quenching“ zur Folge haben und ein Unterschreiten die Ausbeute der Kopplung mindern (Southwick et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Verhältnis von 10 zu 1 gewählt. Zur Erhaltung der Reaktivität mussten die Farbstoffe in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst werden.

Für die Kopplung war ein leicht basischer pH-Wert einzustellen. Hierfür wurde ein 0,1 M NaHCO₃ Puffer (pH 9) verwendet. Das molare Verhältnis von Farbstoff und Peptid betrug 10 zu 1. Das Reaktionsvolumen musste möglichst klein gehalten werden, um eine höhere Ausbeute zu erhalten. Es wurde auf 20 µl festgelegt. Anschließend folgte eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur. Das Konjugat wurde mittels MicroSpin G-25 Säule (siehe Abschnitt 2.12.4.3.) von dem ungekoppelten Farbstoff abgetrennt.

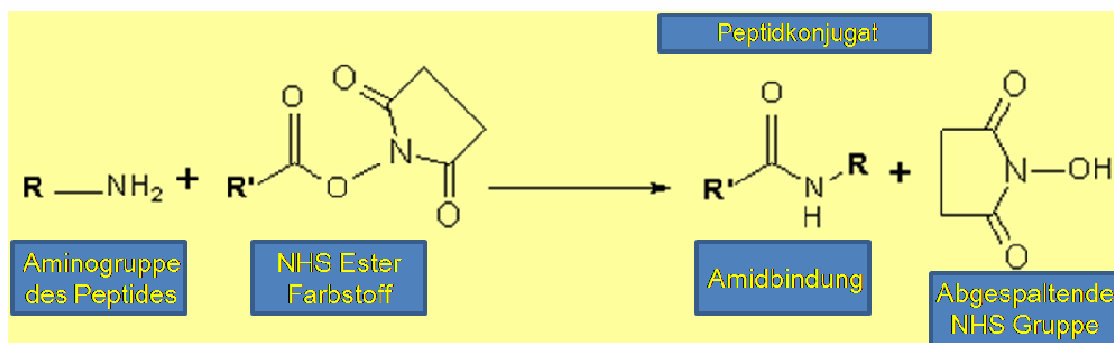


Abbildung 2.13.: Konjugation mittels N-hydroxysuccinimidylester. Unter Abspaltung der NHS Gruppe ist eine Kopplung an eine Aminogruppe ermöglicht.

2.12.4. Quantum Dots (Jonamac Red)

2.12.4.1. Eigenschaften der Quantum Dots

Bei den Quantum Dots (QDs) handelt es sich um wenige Nanometer große fluoreszierende Nanopartikel, deren Kern aus Halbleitermaterialien wie CdSe (Cadmium-Selen), CdTe (Cadmium-Tellur), InP (Indium-Phosphor) besteht, der von einer ZnS (Zink-Sulfid) Hülle umgeben ist. Sie können ihr Fluoreszenzlicht, das auf den Halbleiter-Charakter zurückzuführen ist, über Monate hinweg in den unterschiedlichsten Farben aussenden. Die Emissionswellenlänge der Quantum Dots ist abhängig von der Größe und der Materialzusammensetzung. Mit zunehmender

Größe werden auch die Emissionswellenlängen langwelliger. Schon durch diese Photostabilität besitzen sie einen unschlagbaren Vorteil gegenüber den bisher in-vitro und in-vivo verwendeten Markern, wie beispielsweise synthetische Fluorophore wie „Texas Red“ und „Oregon Green“ sowie fluoreszierende Proteine wie die „Luciferase“ und „EGFP“.

Die Hydrophobizität der Partikel wurde durch die Einkapselung in Mizellen umgangen, wodurch die Partikel wasserlöslich werden. Die Mizellen bestehen aus einer stabilen Mischung der Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Polyethylenglycol-Phosphatidylethanolamin (PEG-PE), die eine regelmäßige Struktur bilden und kaum immunogen oder toxisch wirken. Die Lipidhülle ermöglicht zusätzlich eine längere Blutverweildauer. Somit sind die Quantum Dots nicht nur für „Cell Tracking“ Versuche geeignet, sondern sie können auch, aufgrund ihrer Carboxyl- oder Aminogruppen an der Oberfläche mit Peptiden, Antikörpern oder Oligonukleotide konjugiert und anschließend für eine spezifische Markierung eingesetzt werden.

Im Gegensatz zu vielen anderen Fluoreszenzmolekülen besitzen die Quantum Dots einen breiten Excitationspeak und einen engen, symmetrischen Emissionspeak (siehe Abbildungen 2.14.). Aufgrund der großen Stokes-Differenz und dem scharfen Emissionsspektrum besitzen die Konjugate eine hohe Signalintensität mit einem sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Die verwendeten „Jonamac Red“ Quantum Dots besitzen eine PEG (Polyethylenglycol) Oberfläche mit terminalen Aminogruppen. Der InGaP Kern ist von einer ZnS (Zink – Sulfid) Hülle umgeben und der hydrodynamische Durchmesser beträgt ungefähr 25 nm. Die Partikel wurden in destilliertem Wasser gelöst (11,5 pmol/µl) und verschlossen, geschützt vor Licht und bei 4°C gelagert. Die Haltbarkeitsdauer beträgt ungefähr sechs Monate.

	Quantum Dot (Jonamac Red)
Absorption	< 540 nm
Emission	680 +/- 15 nm
FWHM (Halbwertsbreite)	70 nm
Kern	InGaP/ZnS
Kerndurchmesser	5 nm
Hydrodynamischer Durchmesser	25 nm
Oberfläche	PEG mit terminalen Aminogruppen
Konzentration	11,5 pmol/µl
pH Stabilität	5 – 11
Temperaturtoleranz	4 – 37°C
Molare Extinktionskoeffizient	530.000 bis 670.000

Tabelle 2.22.: Übersicht über die Eigenschaften der Quantum Dots (Jonamac Red)

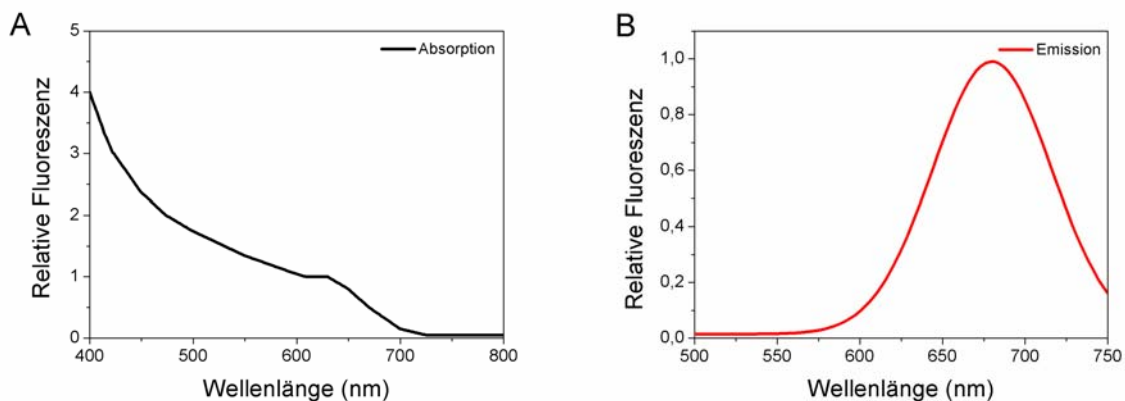


Abbildung 2.14.: Absorptions- (A) und Emissionsspektrum (B) vom „Jonamac Red“ Quantum Dot (Homepage der Firma evident Technologies)

2.12.4.2. Kopplung von Quantum Dots

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kopplung der Quantum Dots an VEGF (bzw. Albumin) in drei Schritten durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden mit Hilfe der Traut Reagenz (2-Iminoethanol) SH-Gruppen an Quantum Dots angefügt. Die Hülle des verwendeten Quantum Dots besitzt primäre Aminogruppen. Durch den Angriff des Stickstoffatoms der Aminogruppe an das Kohlenstoffatom des 2-Iminoethanol, das aufgrund der Iminoverbindung ein Elektronenmangel aufweist, kommt es zu einem Aufbrechen des Ringsystems, wodurch eine Verbindung mit einer Sulfhydrylgruppe entsteht. Somit wurden auf der

Oberfläche der Quantum Dots freie SH-Gruppen eingeführt (Abbildung 2.15.).

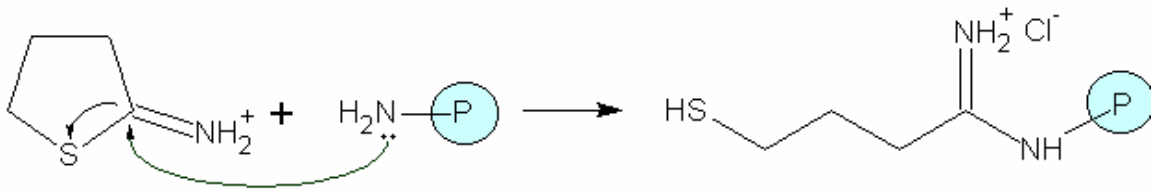


Abbildung 2.15.: Einführung von SH-Gruppen. Reaktion des 2-Iminothiolan (Traut Reagenz) mit primären Aminogruppen.

Das Traut-Reagenz reagiert spontan mit primären Aminen. Der pH-Wert der Reaktion sollte dabei zwischen 7 und 9 liegen (Tarentino et al. 1993). Das Traut-Reagenz wurde in einem 20fachen Überschuss eingesetzt. Die Lösung erhielt außerdem 4 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure). Der Chelatkomplex komplexiert Metallkationen, was dabei hilft, die Oxidation der Sulfhydryl-Gruppen zu verhindern.

Der Reaktionsansatz setzte sich somit zusammen aus:

Bestandteil des Reaktionsansatzes	
Quantum Dots	25 μ l (287,5 pmol)
Traut Reagenz (100 ng/μl)	7,9 μ l (5750 pmol)
0,1M NaHCO₃ (pH 8,3)	36,1 μ l
300 mM EDTA	1 μ l

Tabelle 2.23.: Reaktionsansatz für die Einführung von SH-Gruppen auf die Oberfläche der Quantum Dots.

Der Ansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abtrennung der überschüssigen Traut Reagenz konnte mit Hilfe der MicroSpins erreicht werden (siehe Abschnitt 2.12.4.3.). Von dem Ansatz wurden 2 μ l für eine SH-Gruppen Bestimmung durch die Ellman's Reagenz entnommen (siehe Abschnitt 2.12.5.4.)

Im zweiten Schritt wurde das Peptid, VEGF bzw. Albumin, an Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-Maleinimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) (Abbildung 2.16.) gekoppelt. Sulfo-SMCC erlaubt eine kovalente Konjugation von Amin und Sulfhydryl enthaltenen Molekülen. Der NHS-Ester des Sulfo-SMCC reagiert mit primären Aminen bei einem pH-Wert von 7 bis 9 und die Maleimid-Gruppe mit Sulfhydryl Gruppen bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,5. Die Maleimid-Gruppe ist

stabiler als die NHS-Ester Gruppe, allerdings hydrolysiert sie über einen pH Wert von 7,5, wodurch sie die Reaktionsspezifität für die Sulfhydryl Gruppen verliert. Aus diesem Grund werden die Konjugationsexperimente in einem pH Wert Bereich zwischen 7,2 und 7,5 durchgeführt.

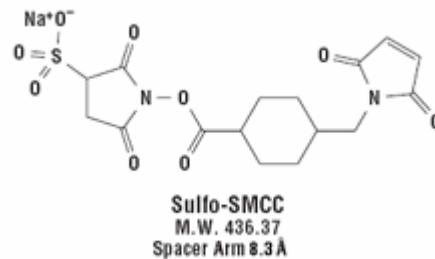


Abbildung 2.16.: Struktur von Sulfo-SMCC (Homepage der Firma Pierce)

Der Cyclohexanring im Sulfo-SMCC verringert die Rate der Hydrolyse der Maleimid-Gruppe (Ishikawa et al. 1983). Sulfo-SMCC ist wasserlöslich. Es können auch viele andere wässrigen Pufferlösungen eingesetzt werden, wobei jedoch die Löslichkeit mit ansteigender Salzkonzentration sinkt. Als Konjugationspuffer wurde PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,3) eingesetzt. Puffer mit primären Amin oder Sulfhydryl Gruppen sind nicht geeignet, da sie mit der Konjugationsreaktion konkurrieren würden. Die Verknüpfung des Peptides mit dem Sulfo-SMCC wurde mit Hilfe der N-hydroxysuccinimid Gruppe des Sulfo-SMCC erreicht. Der Mechanismus der Reaktion entspricht der Kopplung von Cy5, Cy7 oder IRDye 800CW (siehe Abschnitt 2.12.3.).

Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus:

- 10 µg Peptid (VEGF bzw. Albumin) in 45 µl PBS (pH 7,3)
- 5 µl Sulfo – SMCC (10 mM)

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Sulfo-SMCC mit den MicroSpins abgetrennt. Im dritten und letzten Schritt wurden die beiden Ansätze nach der Aufreinigung durch die MicroSpins vereinigt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Abbildung 2.17. fasst die Kopplung der Quantum Dots mit Peptiden zusammen.

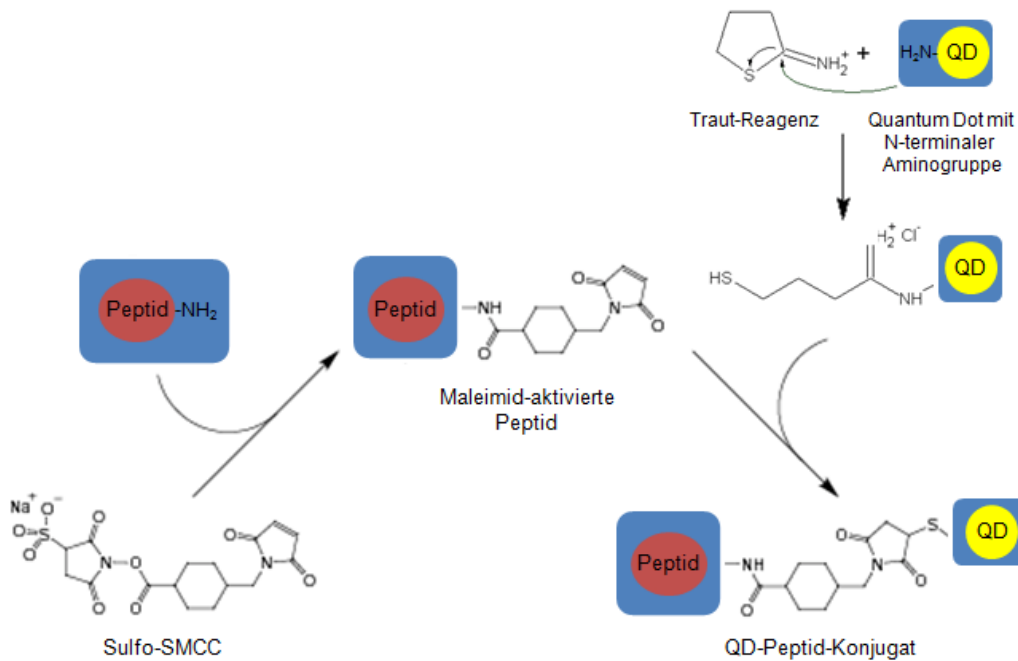


Abbildung 2.17.: Schema der Quantum Dot-Konjugation (Homepage der Firma Pierce)

2.12.4.3. MicroSpin G-25 Säulen

Die MicroSpins G-25 Sephadex Säulen wurden ursprünglich für die schnelle Reinigung von DNA, einschließlich Entsalzung und Pufferaustausch entwickelt. Die Säulen können bei Raumtemperatur gelagert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die MicroSpin-Säulen während der Quantum Dots-Kopplung für die Abtrennung der Traut Reagenz und des ungebundene Sulfo-SMCC als auch während der Farbstoffkopplung für die Entfernung des ungebundenen Farbstoffes verwendet. Aufgrund der Porengröße der MicroSpin Säulen wurden die Substanzen, dessen Molekulargewicht nur 137 g/mol (Traut Reagenz), 436 g/mol (Sulfo-SMCC) und zwischen 792 g/mol (Cy5) und 1166 g/mol (IRDye 800CW) betragen, festgehalten. Das jeweilige Konjugat war dagegen zu groß für die Poren der Säulen, so dass es eluiert wurde.

Zu Beginn der Aufreinigung mussten die MicroSpin-Säulen leicht geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Resuspendierung des Säulenmaterials zu erreichen. Der Verschluss der Säule wurde durch eine Vierteldrehung geöffnet und der untere Verschluss abgetrennt. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Zum Wechsel der Pufferlösung wurde die Säule für eine Minute bei 700 g zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Danach mussten sofort 200 µl der entsprechenden Pufferlösung auf die

Säule gegeben werden, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach einer Zentrifugation von 700 g für einen Zeit von einer Minute, wurde das Filtrat erneut verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Die Lösung der Konjugation sollte ein Volumen nicht weniger als 25 µl und nicht mehr als 150 µl besitzen. Nachdem die Lösung vorsichtig in die Mitte der Säule getropft wurde, erfolgte eine weitere Zentrifugation für 2 Minuten bei 700 g. Das gereinigte Konjugat befand sich im Filtrat.

2.12.4.4. Bestimmung der SH-Gruppen durch die Ellman Reagenz

Freie Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) können mit Hilfe von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB; Ellman – Reagenz) quantitativ bestimmt werden. Das nachzuweisende Thiol reagiert mit dem Reagenz zu einem gemischten Disulfid. Dabei wird eine dem Thiol äquivalente Menge an 5-Thio-2-nitrobenzoesäure freigesetzt (siehe Abbildung 2.18.). Die Verbindung ist intensiv gelb gefärbt und hat ein Absorptionsmaximum bei 412 nm (molare Extinktionskoeffizient: $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Ellman 1959, Riener et al. 2002). Im Unterschied zu anderen SH – spezifischen Reagenzien ist DTNB weder in der Lage Disulfidbrücken zu spalten noch Proteine zu denaturieren.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Lösung von 10 mM DTNB in 0,1 M NaHCO_3 (pH 8,3) angesetzt. Nach Zugabe der mit der Traut Reagenz behandelten Quantum Dots wurde der Reaktionsansatz 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 412 nm gemessen.

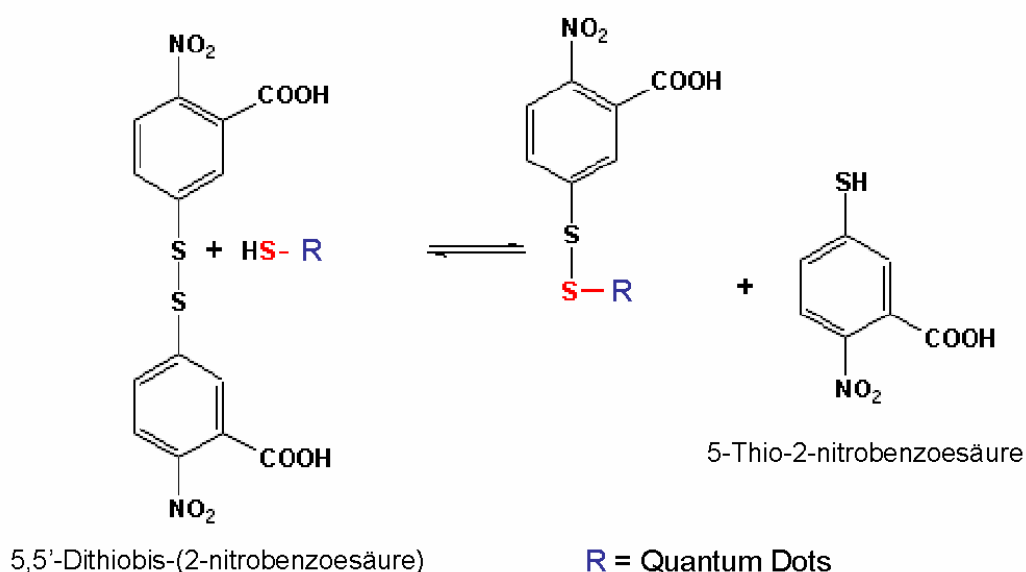


Abbildung 2.18.: Reaktion der Ellman Reagenz mit SH-Gruppen. Freisetzung der intensiv gelb gefärbten 5-Thio-2-nitrobenzoesäure.

2.12.4.5. Abtrennung des ungekoppelten Peptides nach Konjugation mit Quantum Dots

Aufgrund des Unterschiedes im Molekulargewicht konnte das ungekoppelte VEGF (36 kDa) bzw. Albumin (67 kDa) von den Quantum Dots (ungefähr 250 kDa) durch Gelchromatographie abgetrennt werden. Für die Trennung wurde eine Superdex 200 Säule verwendet, die im Bereich von 10 kDa und 600 kDa eine Auftrennung erlaubt. Superdex 200 ist ein Gemisch aus vernetzter Agarose und Dextran. Die Trennungseigenschaften des Materials werden vorwiegend durch die Dextran Komponente bestimmt. Die Gelpartikel mit einem Durchmesser von 34 µm sind mechanisch sehr stabil. Superdex 200 kann zwischen pH 3 und 12 und kurzfristig zwischen pH 1 und 14 eingesetzt werden. Zudem toleriert es 1% (w/v) SDS, chaotrope bzw. denaturierende Verbindungen, beispielsweise 6 M Guanidiniumchlorid oder 8 M Harnstoff, sowie organische Lösungsmittel, wie Formamid, Dimethylsulfoxid, Methanol, Ethanol oder Aceton. Moleküle unterschiedlicher Größe dringen unterschiedlich weit in die Poren ein und wandern daher verschieden schnell durch die Säule. Je größer das Molekül ist, desto schneller wird es durch das Säulenmaterial wandern. Sehr kleine Moleküle können dagegen vollständig in die Gel-Poren eindringen, was einen sehr viel längeren Weg durch das Säulenmaterial bedeutet. Als Laufpuffer wurde PBS (pH 7,3) gewählt.

3. Ergebnisse

3.1. Aufnahmeverhalten der Eisenoxidnanopartikel

Die einzelnen Eisenoxidnanopartikel wurden zu Beginn der Versuche hinsichtlich ihrer Aufnahme und der Retention in Zellen untersucht. Dabei sollten zwei Ziele analysiert werden. Zum Einen die hohe unspezifische Markierung in-vitro zur anschließenden Verfolgung der markierten Zellen in-vivo („Cell Tracking“) und zum Anderen die zielgerichtete, spezifische molekulare Markierung. Für beide Strategien werden sehr unterschiedliche Anforderungen an die Nanopartikel gestellt. Während für das „Cell Tracking“ eine hohe unspezifische Eisenaufnahme und eine lange Verweildauer der Eisenoxidnanopartikel in den Zellen erforderlich ist, dürfen die Partikel, die für eine spezifische Markierung eingesetzt werden sollen, nur eine sehr schwache bis keine unspezifische Partikelaufnahme zeigen. Somit wäre nach der Kopplung mit den entsprechenden Liganden eine deutliche Unterscheidung zwischen unspezifischer und spezifischer Aufnahme möglich.

3.1.1. Abhängigkeit vom Zelltyp

Um die verschiedenen Eisenoxidnanopartikel in die zwei Gruppen einteilen zu können, mussten zu Beginn unterschiedliche Zelllinien, unterschiedliche Eisenkonzentrationen, sowie die Kinetik der Partikelaufnahme untersucht werden. Zwei Zelllinien wurden mit den verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln in einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Eisengehalt quantitativ mit dem photometrischen Eisentest ermittelt.

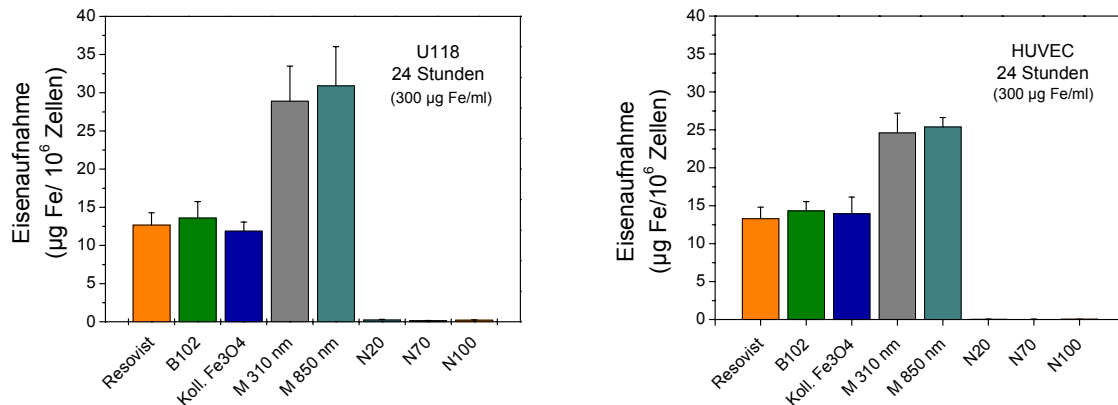


Abbildung 3.1.: Aufnahme von verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln mit identischer Eisenkonzentration in U118 Gliomazellen und humanen Endothelzellen (HUVEC). Die Zellen wurden 24 Stunden mit den Eisenoxidnanopartikel in einer Konzentration von 300 µg/ml inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Eisen quantitativ bestimmt (n = 3).

Beide Zelllinien zeigten für die drei Nanomag Partikel während der Versuche keine messbare Eisenaufnahme und somit auch keine Partikelaufnahme. Dagegen konnte für die anderen Eisenoxidnanopartikel eine deutliche Eisenaufnahme festgestellt werden. Die Microspheres bewirkten einen fast doppelt so hohen Eisengehalt in den Zellen im Vergleich zu dem Resovist, B102 und dem kolloidalen Fe₃O₄. Der Vergleich der beiden Zelllinien ergab keine erheblichen Unterschiede.

3.1.2. Konzentrationsabhängigkeit

Um eine möglichst hohe Eisenaufnahme in den anschließenden Versuchen zu erzielen wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Partikelaufnahme analysiert.

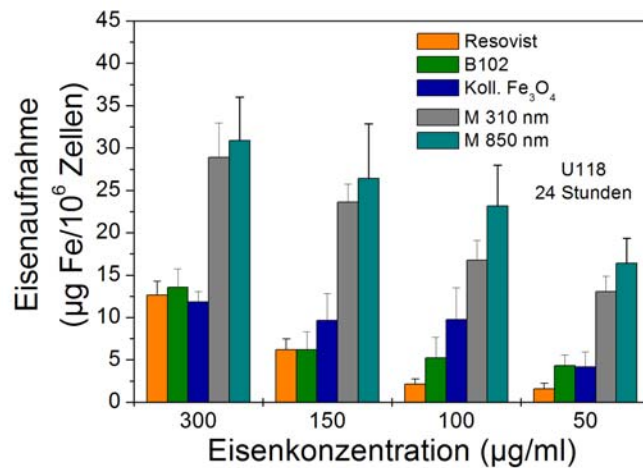


Abbildung 3.2.: Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln in verschiedenen Eisenkonzentrationen in U118 Gliomazellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln in vier verschiedenen Konzentrationen inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend wurde das aufgenommene Eisen photometrisch quantifiziert (n = 3).

Mit steigendem Eisengehalt im Medium stieg auch die aufgenommene Menge an Eisen in den Zellen, jedoch war der Anstieg bzw. die daraus resultierende Abhängigkeit für die einzelnen Nanopartikel teilweise verschieden. Während das kolloidale Fe₃O₄ die geringste Konzentrationsabhängigkeit zeigte, war sie für das Resovist am deutlichsten. Die Microspheres offenbarten die höchste Aufnahme, während die Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im Medium gering war. Für das Nanopartikel B102 ergab sich eine vergleichbare Abhängigkeit.

3.1.3. Zeitabhängigkeit

In der nächsten Versuchsreihe wurde die Kinetik der Partikelaufnahme zwischen 12 und 48 Stunden in U118 Gliomazellen verfolgt.

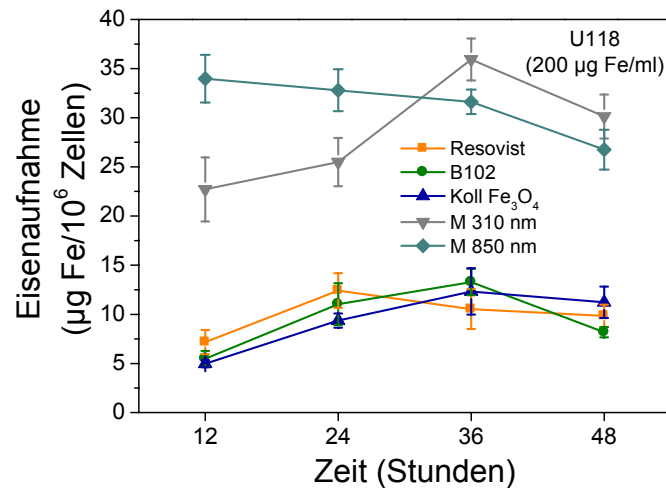


Abbildung 3.3.: Kinetik der Partikelaufnahme in U118 Gliomazellen bei einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml. Nach Ablauf der entsprechenden Zeiten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und aufgenommenes Eisen photometrisch quantifiziert (n = 3).

Für alle Partikel, mit Ausnahme des Microsphere M 850 nm, stieg der Eisengehalt in den Zellen im Zeitraum zwischen 12 und 24 Stunden an. Das M 850 nm bewirkte in den U118 Gliomazellen bereits nach 12 Stunden einen sehr hohen Eisengehalt, der anschließend leicht abfiel. Für die anderen untersuchten Eisenoxidnanopartikel trat zwischen 24 und 36 Stunden ein Sättigungsverhalten ein. Nach 36 Stunden sank für alle Partikel der Eisengehalt in den Zellen.

3.2. Verweildauer der Eisenoxidnanopartikel in den Zellen

Die Verweildauer der Eisenpartikel ist für anschließende „Cell Tracking“ Versuche von großer Bedeutung. Sollten die Eisenpartikel von den Zellen schnell ausgeschieden werden, ist eine Verfolgung der Zellen in-vivo nicht lange möglich. U118 Gliomazellen wurden für 24 Stunden mit den verschiedenen Eisenpartikeln in einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml gefüttert, anschließend mit PBS gewaschen und dann für mehrere Tage weiterkultiviert. An jedem dritten Tag wurde das Medium gewechselt bzw. der Eisengehalt in den Zellen photometrisch bestimmt.

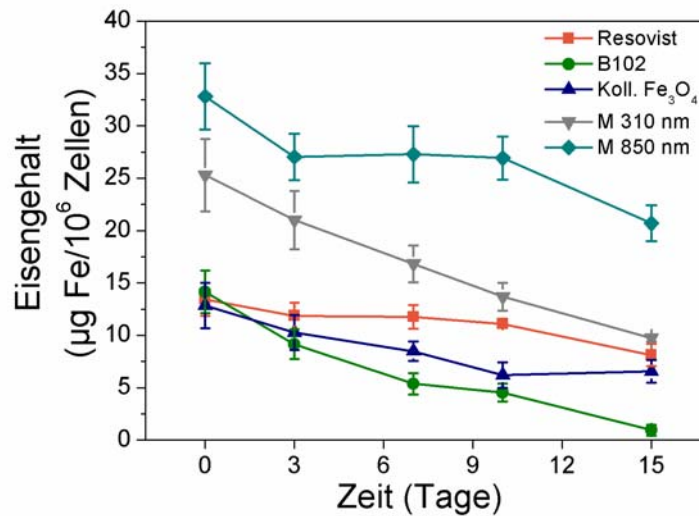


Abbildung 3.4.: Verweildauer der verschiedenen Eisenoxidnanopartikel in U118 Gliomazellen. Die Zellen wurden bei einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml über 24 Stunden inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und 3, 7, 10 bzw. 15 Tage weiterkultiviert. Zu den festgelegten Zeiten wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und der Eisengehalt in den Zellen photometrisch quantifiziert (n =3).

Alle Eisenoxidnanopartikel zeigten eine langsame Abnahme des intrazellulären Eisengehaltes. Im Vergleich zu den anderen Partikeln verblieb das Resovist am längsten in U118 Gliomazellen. Nach 15 Tagen war der Eisengehalt nur auf 61% gefallen. Ähnlich gut wurde das Microsphere M 850 nm in den Zellen zurückgehalten, mit einem entsprechenden Wert von 63%. Dagegen fiel der Eisenwert für das Microsphere M 310 nm auf 42%, für das kolloidale Fe₃O₄ auf 51% und das B102 Partikel war sogar nur noch zu 7% in den Zellen verblieben.

3.3. Toxizität

In den Voruntersuchungen wurden die verschiedenen Eisenoxidnanopartikel auf eine mögliche Toxizität in-vitro untersucht, um Anhaltspunkte für eine spätere Anwendung in-vivo zu gewinnen.

3.3.1. Freisetzung des zytologischen Enzyms LDH

Die zelluläre Toxizität der verschiedenen Nanopartikel wurde durch die Messung des in das Medium abgegebenen Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Das zytologische Enzym gelangt nur nach einer Schädigung der Zellmembran ins

Medium. Dort kann es aufgrund seiner reduktiven Eigenschaften gegenüber NAD^+ leicht nachgewiesen werden. Um relative Zellschädigungen bestimmen zu können, wurden die Zellen in der Positivkontrolle vollständig lysiert und dieser Wert anschließend als 100% festgelegt.

Die Eisenoxidnanopartikel wurden in einer Eisenkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden eingesetzt, anschließend die freigesetzte LDH-Menge bestimmt und mit der totalen Lyse ins Verhältnis gesetzt.

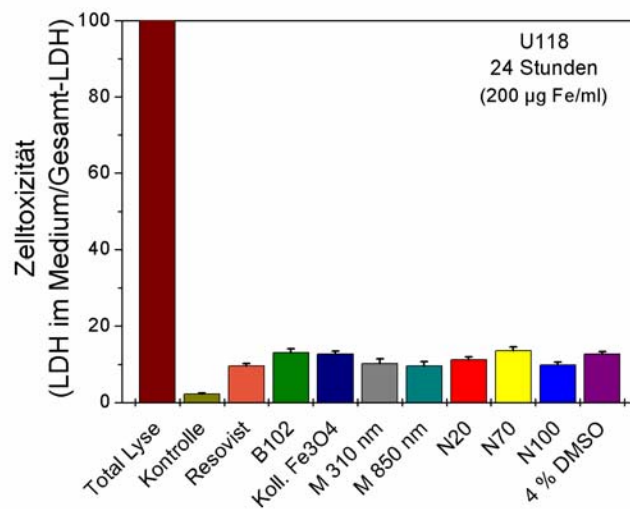


Abbildung 3.5.: Toxizität der Nanopartikel gemessen durch die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) in-vitro an U118 Gliomazellen. Die Eisenoxidnanopartikel wurden, entsprechend den früheren Ergebnissen, in einer Eisenkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ über 24 Stunden eingesetzt. Die „Total Lyse“ entsprach der maximalen LDH-Menge ($n = 3$).

Für alle untersuchten Eisenoxidnanopartikel konnte nur eine geringe Toxizität festgestellt werden. Die ermittelten LDH Freisetzungen schwankten im Bereich von 11 und 17% bezogen auf die totale Lyse. Die Wirkung der Partikel war mit 4% Dimethylsulfoxid (DMSO) vergleichbar.

3.3.2. Einfluss auf die Zellproliferation

Für die Untersuchung auf eine mögliche Toxizität der Nanopartikel wurden außer der direkten Zellschädigung auch der Einfluss auf die Proliferation der Zellen mit Hilfe des CyQuant Testes durchgeführt. Die Methode beruht auf die Bindung eines grün fluoreszierenden Farbstoffes an die DNA nach einer Zelllyse und ist somit ein

Maß für die Zellzahl. Jeweils 300.000 HT-29 Kolonkarzinomzellen wurden 24 Stunden mit den verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln in einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml inkubiert und danach die Zellzahl über die CyQuant Methode ermittelt.

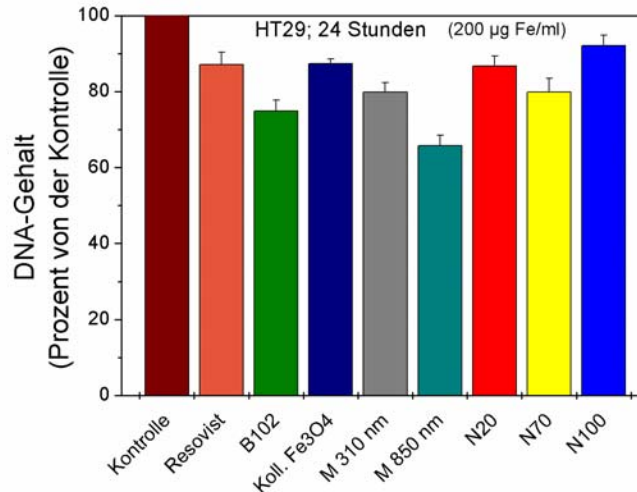


Abbildung 3.6.: Toxizität der Nanopartikel bestimmt durch den Einfluss auf die Proliferation von HT-29 Kolonkarzinomzellen. Die Zellen wurden über 24 Stunden in einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml inkubiert und der DNA-Gehalt in den Zellen gemessen (n = 3).

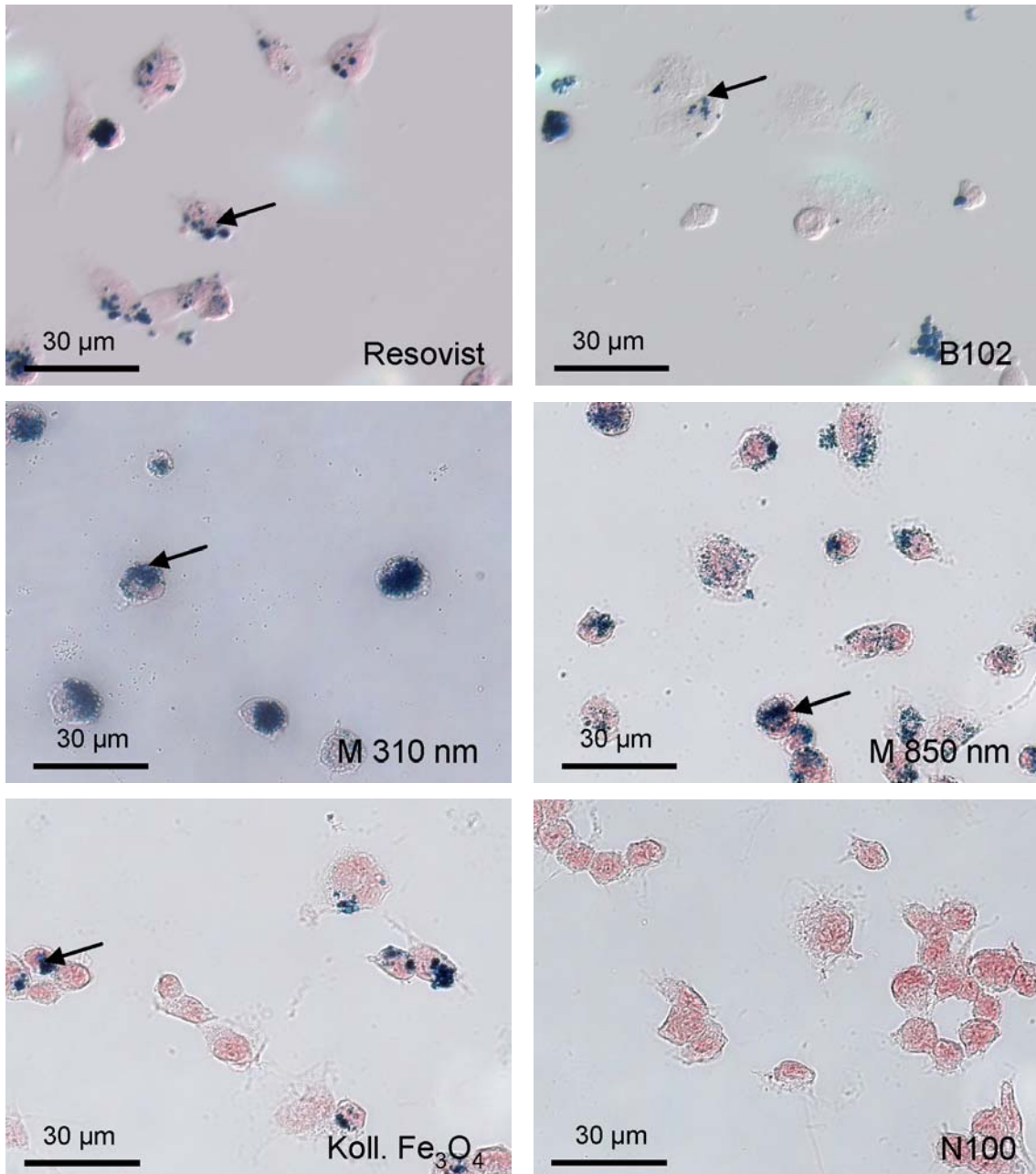
Alle untersuchten Nanopartikel besaßen einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum der HT-29 Zellen, wobei die Proliferation am stärksten durch die Microspheres (M 850 nm) auf ungefähr 65% gegenüber der Kontrolle reduziert wurde. Die geringste toxische Wirkung zeigten dagegen die Nanomag Partikel N20 und N100, das kolloidale Fe₃O₄, sowie das in der Klinik bereits zugelassene Resovist.

3.4. Lokalisation der aufgenommenen Eisenoxidpartikel

Um festzustellen wo die Eisenoxidnanopartikel intrazellulär lokalisiert sind, wurden diese lichtmikroskopisch durch Eisenfärbung und über Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) direkt visualisiert.

3.4.1. Lokalisation durch Eisenfärbung

U118 Gliomazellen wurden mit den Eisenoxidnanopartikeln in einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert und die Partikel durch Berliner Blau Färbungen sichtbar gemacht.



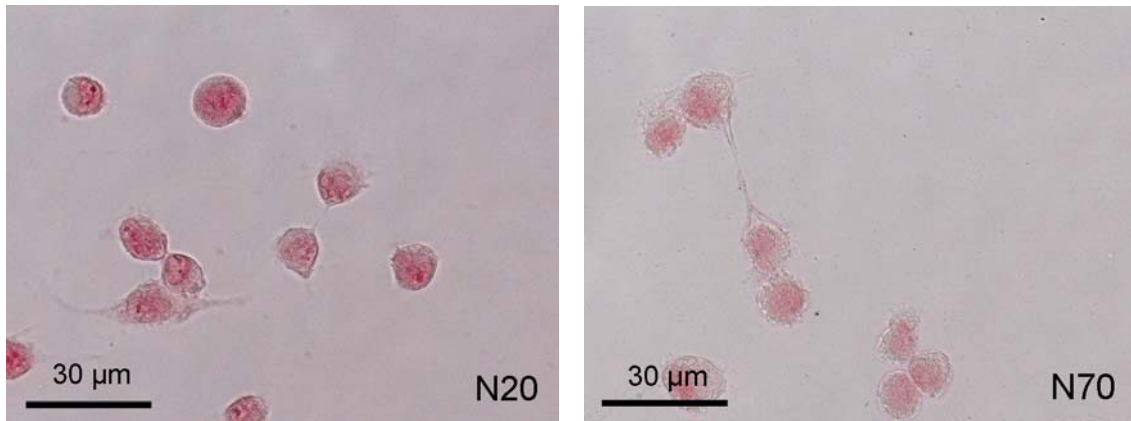


Abbildung 3.7.: Eisenfärbung von U118 Gliomazellen nach einer Inkubation mit Resovist, B102, M 310 nm, M 850 nm, kolloidalen Fe_3O_4 , N100, N20 und N70 in einer Eisenkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ über 24 Stunden, Gegenfärbung durch Kernechtrot.

Die beiden Microspheres zeigten die stärkste Blaufärbung. Für Resovist, B102 bzw. dem kolloidalen Fe_3O_4 sind deutliche Berliner Blau Färbungen innerhalb sowie an den Rändern der Zellen zu erkennen Für die Nanomag Partikel N20, N70 und N100 konnte dagegen keine Blaufärbung detektiert werden.

3.4.2. Lokalisation durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

U118 Gliomazellen wurden 24 Stunden mit den verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln in einer Eisenkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert und nach Einbettung in Araldit mit Hilfe der TEM untersucht.

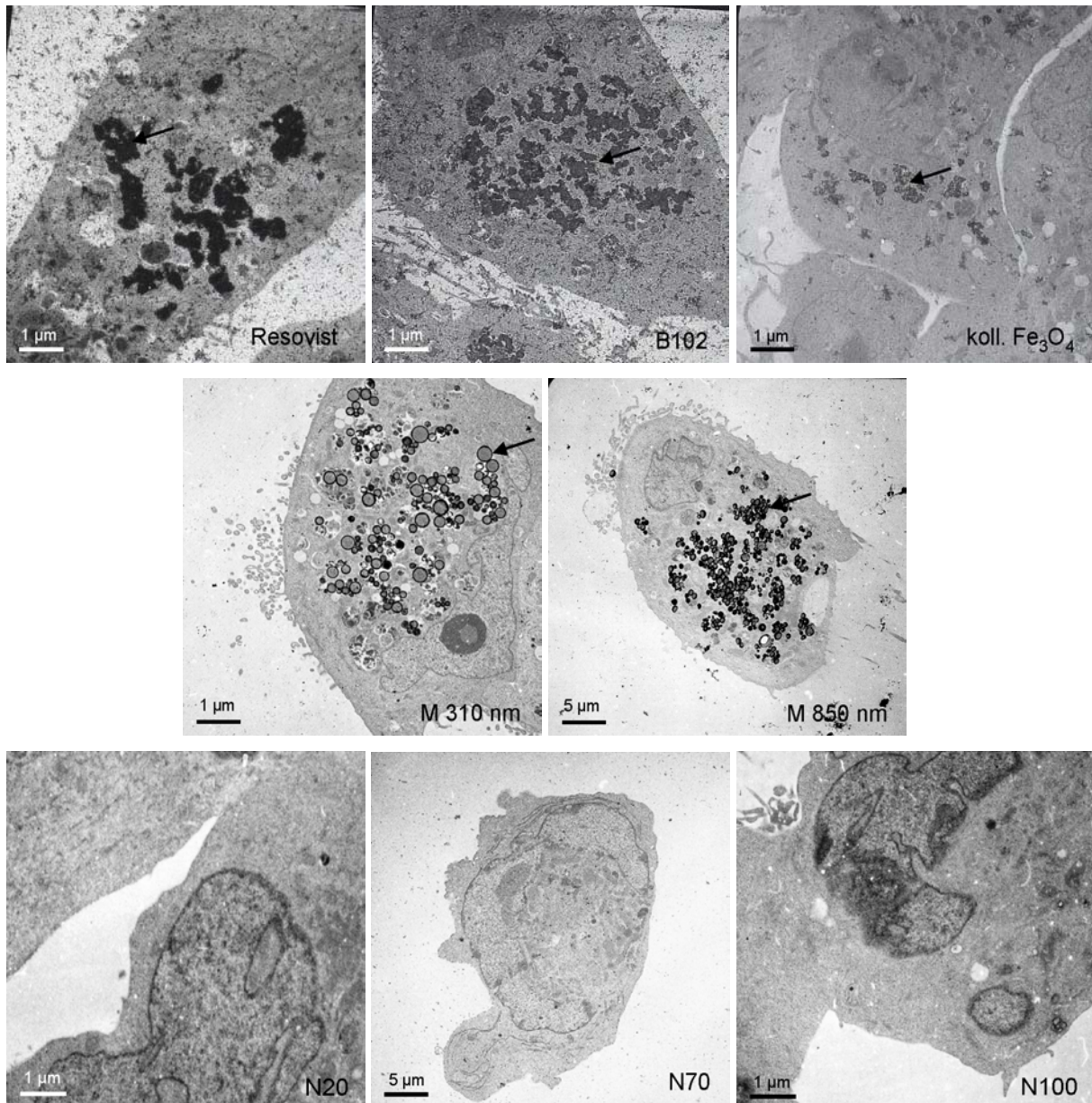


Abbildung 3.8.: U118 Gliomazellen wurden mit Resovist, B102, kolloidalen Fe_3O_4 , M 310 nm, M 850 nm, N20, N70 und N100 in einer Eisenkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ 24 Stunden inkubiert, anschließend in Araldit eingebettet und mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops untersucht.

Die beiden Microspheres wurden von den U118 Gliomazellen am besten aufgenommen. Das Resovist, B102, sowie das kolloidale Fe_3O_4 konnten ebenfalls im Zytoplasma nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu dem Resovist oder dem B102, war die Hülle der Microspheres noch teilweise zu erkennen (siehe Pfeile in den Abbildungen). Die N20, N70 und N100 Partikel wurden von den U118 Gliomazellen nicht aufgenommen.

3.5. Eigenschaft der Eisenoxidnanopartikel im MRT

Die kontrastbildende Eigenschaft der verschiedenen Eisenoxidnanopartikel im MRT wurde allein über die T₂-Relaxivität Bestimmung, sowie anhand von beladenen Zellen untersucht.

3.5.1. Bestimmung der T₂-Relaxivität (r_2)

Um vergleichbare MRT Eigenschaften der verschiedenen Eisenoxidnanopartikel sicherzustellen wurden die Partikel in fünf verschiedenen Eisenkonzentrationen im Bereich zwischen 10 µg Fe/ml und 0,1 µg Fe/ml in 10% Polyacrylamid eingebettet und im MRT vermessen. Der Eisenkonzentrationsbereich wurde aufgrund von Erfahrungen und Veröffentlichungen gewählt (Kalambur et al. 2007, Briley-Saebo et al. 2004). Als Gefäß dienten 10 ml Falcon-Röhrchen. Die anschließend berechneten Relaxivitäten wurden in Tabelle 3.1. zusammengefasst.

Eisenoxidnanopartikel	r_2 Relaxivität (1/mM*s)
Resovist	261
B102	423
Koll. Fe ₃ O ₄	52*
M 310 nm	227
M 850 nm	266
N20	204
N70	239
N100	386

Tabelle 3.1.: r_2 -Relaxivitäten der einzelnen Eisenoxidnanopartikel. * = Berechnung der Relaxivität schwierig aufgrund eingeschränkter linearer Abhängigkeit

Die r_2 -Relaxivität ist ein Maß für die Verkürzung der Relaxationszeiten einer bestimmten Substanz. Je höher der Wert, desto stärker ist der Einfluss der Eisenoxidnanopartikel auf den MRT Kontrast. Die r_2 -Relaxivität für das kolloidale Fe₃O₄ war deutlich geringer als die für die anderen Eisenoxidnanopartikel. Allerdings ist dieser Wert nicht besonders aussagekräftig, da die Daten während der Berechnung nicht ausreichend linear waren. Die r_2 -Relaxivitäten der anderen Eisenoxidnanopartikel besaßen ungefähr die gleiche Größenordnung, wobei das Partikel B102 den höchsten Wert zeigte.

3.5.2. Eisenoxid-beladene Zellen

Um die vorhergehenden in-vitro Daten über die Aufnahme der Eisenoxidnanopartikel im MRT zu überprüfen, wurden U118 Gliomazellen auch auf PET-Membranfilter ausgesät, um ein Wachstum als Monolayer zu gewährleisten.

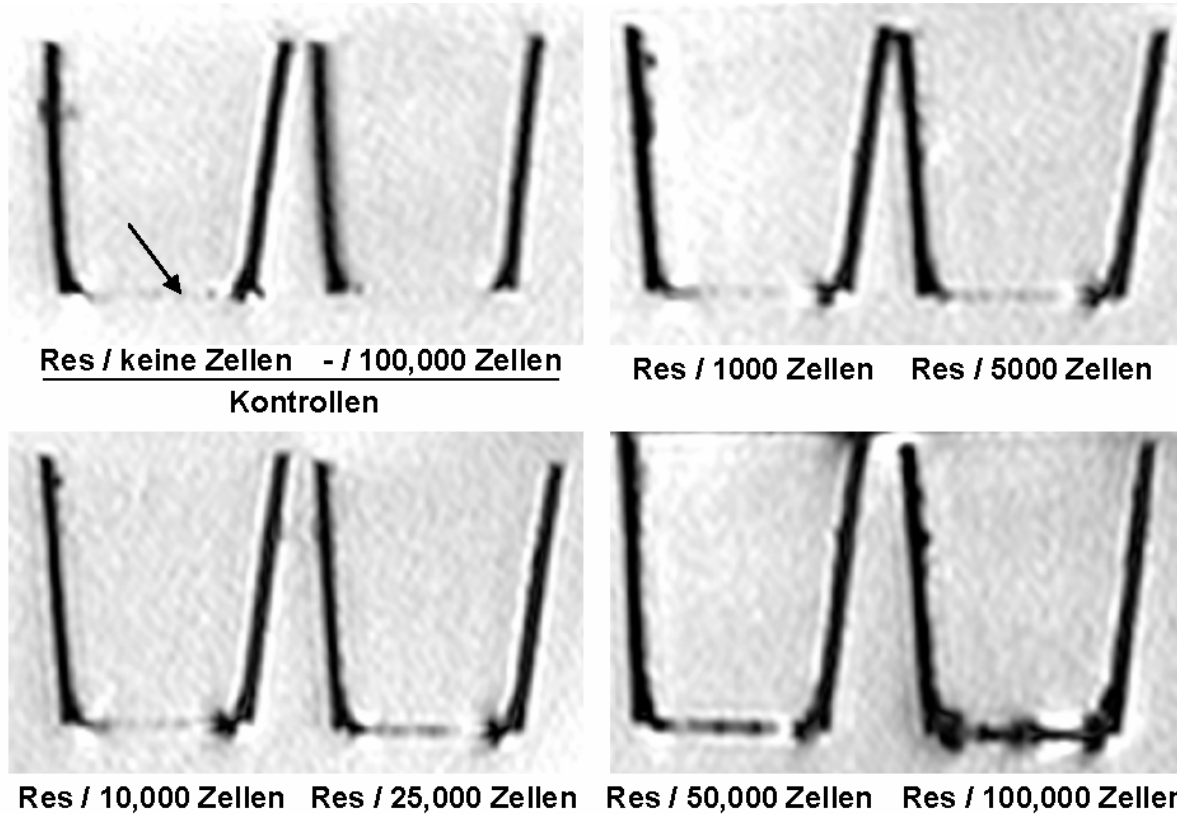


Abbildung 3.9.: Bestimmung der Nachweisgrenze für Resovist auf Monolayers über Polyethylenterephthalat (PET)-Membranen unter Verwendung von U118 Gliomazellen. In den Kontrollen wurde zum Einen nur Zellen ausgesät und zum Anderen die Membran ohne Zellen mit Resovist 24 Stunden inkubiert. Das Resovist wurde in einer Eisenkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Die Zellzahl auf den PET Membranen variierte im Bereich zwischen 1000 und 100.000. Die internalisierten Eisenoxidpartikel wurden mit einer T2*-gewichteten Sequenz durch ein 3 Tesla MRT (Philips, Achieva) dargestellt.

In den Kontrollen verursachten die Membranen nur einen sehr geringen Kontrast im MRT. Dagegen zeigten bereits 5000 Eisenoxid-beladene Zellen einen definierten Unterschied zu den Kontrollen.

Auch mit anderen Partikeln ergaben sich vergleichbare Ergebnisse, die den quantitativen Eisenbestimmungen zur Internalisierung entsprachen.

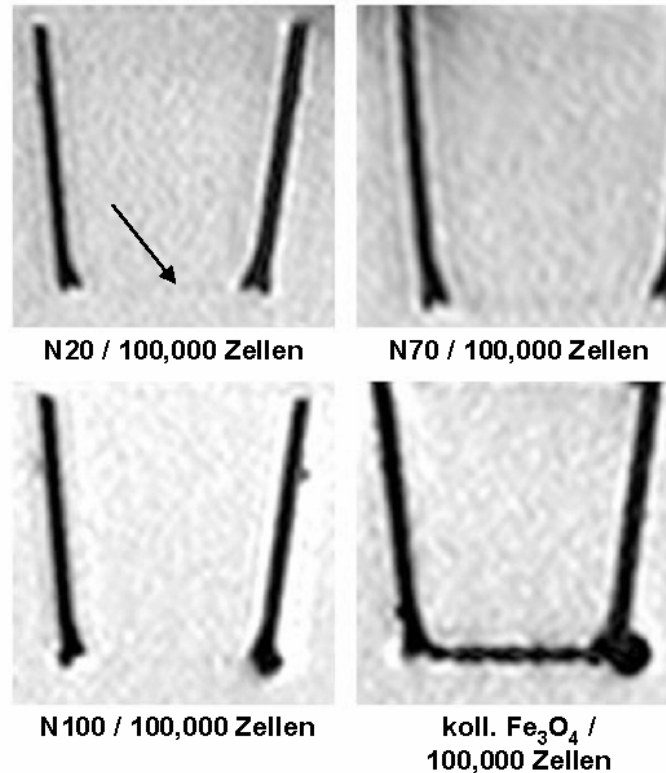


Abbildung 3.10.: Nachweis verschiedener Eisenoxidnanopartikel auf Monolayer mit Hilfe der PET-Membranen. Es wurden jeweils 100.000 U118 Gliomazellen ausgesät und 24 Stunden mit den Partikeln, N20, N70, N100 und dem kolloidalen Fe_3O_4 , in einer Eisenkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert. Für die Messung wurde eine $T2^*$ gewichtete Sequenz verwendet (3 Tesla MRT; Philips, Achieva).

So konnten die Partikel N20, N70 und N100 im Gegensatz zu dem kolloidalen Fe_3O_4 auf den PET Membranen im MRT nicht nachgewiesen werden.

3.6. Zielstruktur für die molekulare Bildgebung

3.6.1. Identifizierung von Zielen in-vitro

Ein geeignetes Ziel für die molekulare Bildgebung sollte in einer hohen Menge an der Zelloberfläche gebildet werden. Deshalb wurde das Expressionsmuster von vier verschiedenen Oberflächenmarkern in insgesamt sechs Zelllinien mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

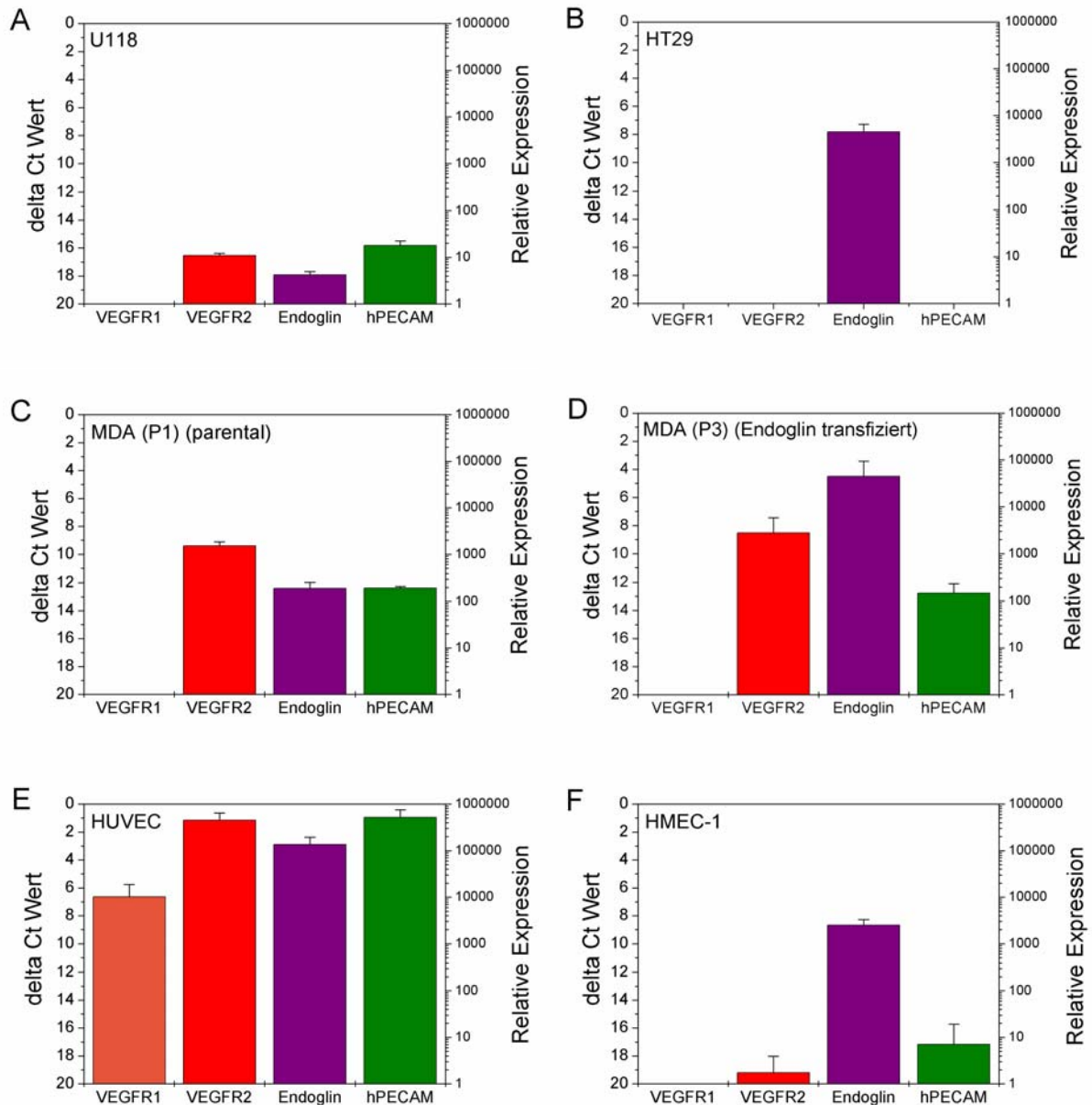


Abbildung 3.11.: Überblick über das Expressionsverhalten von vier verschiedenen Oberflächenmarkern für die Zelllinien: A = U118 Gliomazelllinie, B = HT-29 Kolonkarzinomzelllinie, C = MDA-MB-231 (P1) Mammakarzinomzelllinie (parental), D = MDA-MB-231 (P3) Mammakarzinomzelllinie (transfiziert mit Endoglin), E = HUVEC (humane Endothelzellen aus der Nabelschnur), F = HMEC-1 (humane dermale mikrovaskuläre Endothelzelllinie). Die sechs humanen Zelllinien wurden mit Hilfe der quantitativen Real-Time-RT-PCR untersucht (jeweils n =3). Niedrige delta Ct Werte beweisen eine hohe Expression.

In den HT-29 Kolonkarzinomzellen konnte nur das Endoglin nachgewiesen werden. Die anderen drei untersuchten Oberflächenmarker wurden auch nach 40 Zyklen nicht detektiert (n = 3 - 4).

Eine vergleichbare Expression von Endoglin zeigte auch die humane dermale mikrovaskuläre Endothelzelllinie HMEC-1. Der VEGF-Rezeptor-2 sowie das humane PECAM sind schwach detektierbar im Gegensatz zu dem VEGF-Rezeptor-1, der in dieser, sowie in allen getesteten Zelllinien mit Ausnahme der HUVEC nicht nachgewiesen werden konnte. In den HUVEC's wurden alle untersuchten Oberflächenmarker stark exprimiert, wobei der VEGF-Rezeptor-2 und das humane PECAM die höchste Expression zeigten. Die Expression des Endoglin ist bereits um den Faktor 10 erniedrigt und der VEGF Rezeptor 1 sogar um den Faktor 100. Von der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurden zum Einen die parentale und zum Anderen eine Endoglin transfizierte Zelllinie untersucht. Mit Ausnahme der zu erwartenden hohen Expression von Endoglin in der MDA-MB-231 (P3), wurde keiner der untersuchten Oberflächenmarkern besonders stark gebildet, wobei der VEGF-Rezeptor-2 noch die höchste Expression zeigte. Die Expressionen der Oberflächenmarker waren in den U118 Gliomazellen vergleichsweise sehr gering. Zusätzlich zu den sechs humanen Zelllinien wurde die Mausendothelzelllinie bEnd3 auf die Expression des mVEGF-Rezeptors-2 untersucht. Dabei ergab sich mit einem delta Ct von 5,7 +/- 0,7 ein relativ hoher Expressionswert.

3.6.2. Bestimmung der Expression des VEGF-Rezeptors in den Lebermetastasen

Um zu zeigen, dass VEGF-Rezeptoren auch in-vivo gute Marker eines Tumorendothels sind und sich damit für die Molekulare Bildgebung der Angiogenese sowie des Tumors eignen, wurde ein Leber-metastasiertes Kolonkarzinom Modell verwendet. Hierfür wurden SCID-Mäusen humane HT-29 Kolonkarzinomzellen implantiert und die Metastasen in der Leber nach fünf Wochen auf Expression von VEGF-Rezeptoren durch quantitative RT-PCR und Immunhistochemie untersucht.

Real-Time-RT-PCR

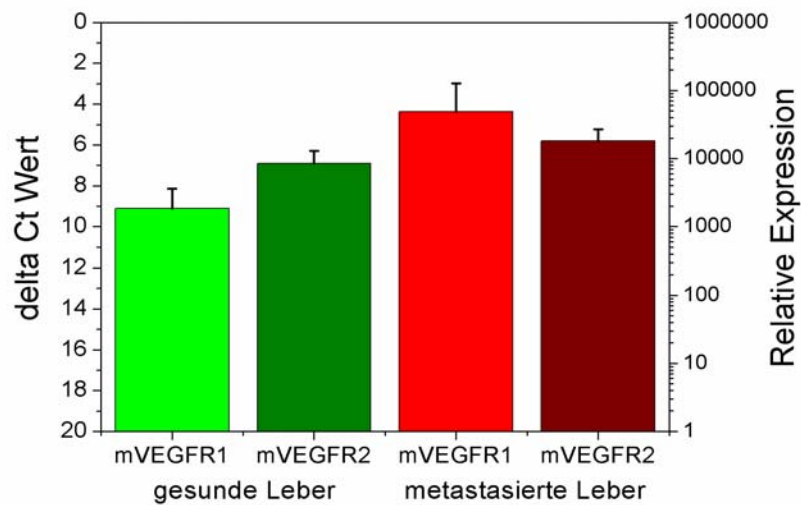


Abbildung 3.12.: Vergleich der Expression von mVEGF-Rezeptor-1 und -2 zwischen gesunder und metastasierter Leber.

Durch quantitative RT-PCR konnte für beide Rezeptoren ein Anstieg der Expression in der metastasierten Leber im Vergleich zur gesunden Leber bestimmt werden. Allerdings erhöhte sich die Expression des mVEGF-Rezeptors-2 nur um den Faktor 3,3 (Unterschied im delta Ct von 1,1). Für den mVEGF-Rezeptor-1 dagegen wurde eine Erhöhung der Expression um den Faktor 14 (Unterschied im delta Ct von 4,75) festgestellt.

Immunhistochemie

Zu Beginn wurde eine HE-Färbung als Übersicht von gesunden Lebern und von Lebern mit Metastasen durchgeführt.

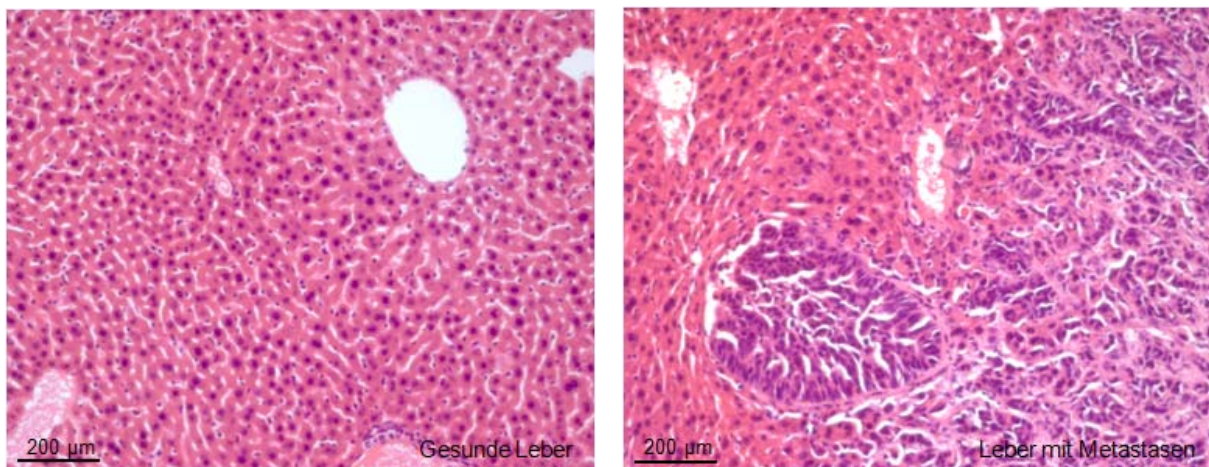


Abbildung 3.13.: HE-Färbungen einer gesunden Leber und einer Leber mit Metastasen

Durch die HE-Färbung konnte das gesunde Gewebe von den Lebermetastasen unterschieden werden.

Anschließend wurden gesunde und durch HT-29-Metastasen durchsetzte Lebern mittels Immunhistochemie auf die Expression von mVEGF-Rezeptor-1 und -2 untersucht.

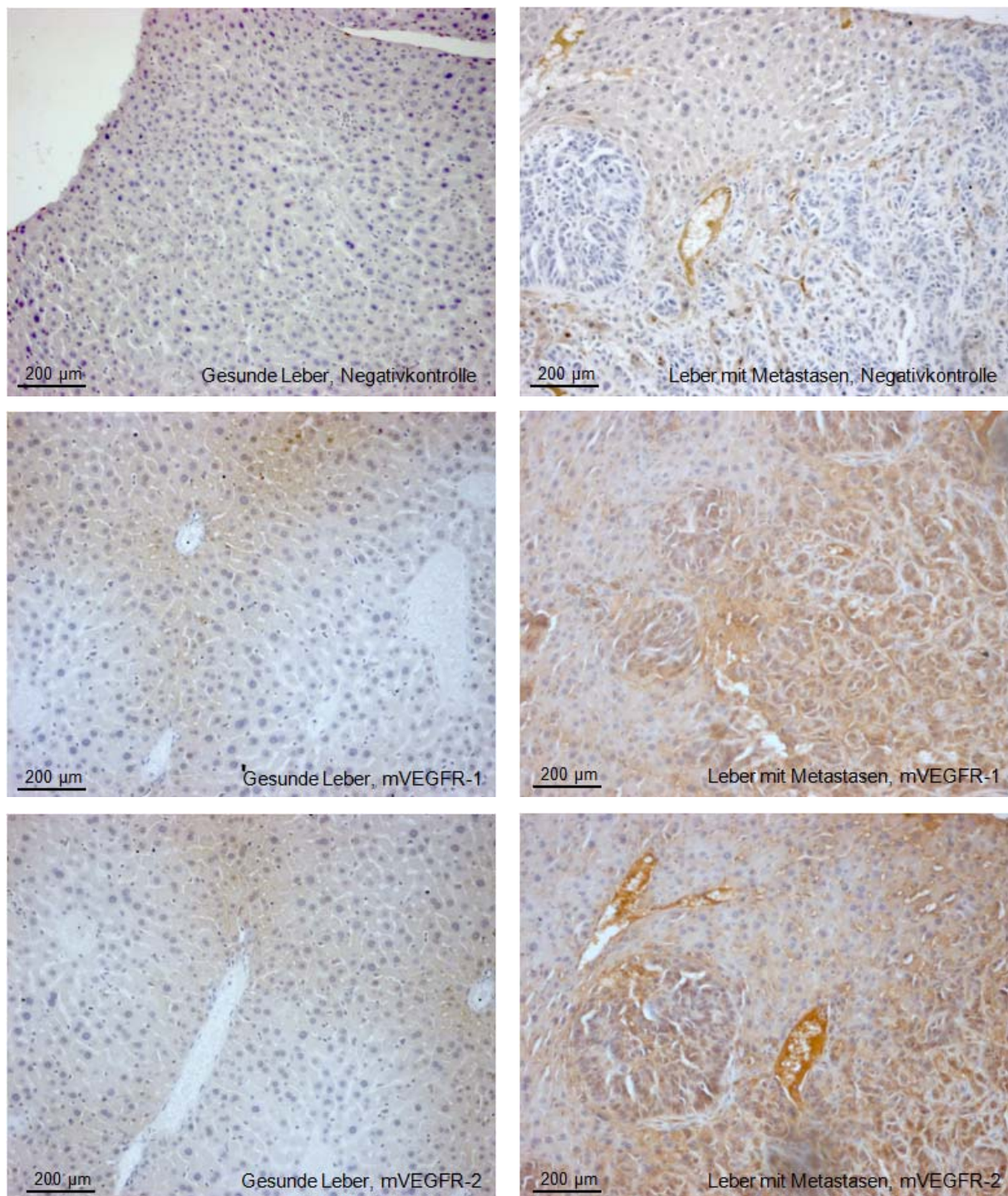


Abbildung 3.14.: Immunhistochemie von gesunden Lebern und Lebern mit Metastasen unter Verwendung der mVEGFR-1 und -2 Antikörper.

Beide VEGF-Rezeptoren zeigten durch die deutlichen Braunverfärbungen der Metastasen eine starke Expression. In der gesunden Leber konnte jeweils eine schwache Färbung lokalisiert werden. Die Negativkontrollen offenbarten eine sehr geringe unspezifische Färbung der Metastasen.

3.7. Eigenschaften der Nanomag-Partikel

Für eine spezifische Konjugation von Eisenoxidnanopartikel waren nur die Nanomag-Partikel aufgrund des Fehlens einer unspezifischen Aufnahme geeignet. Daher wurden die Strukturen der drei Nanomag-Partikel vor einer Konjugation mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und Transmissionmikroskopie (TEM) analysiert.

3.7.1. Überprüfung des Partikeldurchmessers durch die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Mit Hilfe der PCS konnte der Partikeldurchmesser bestimmt werden.

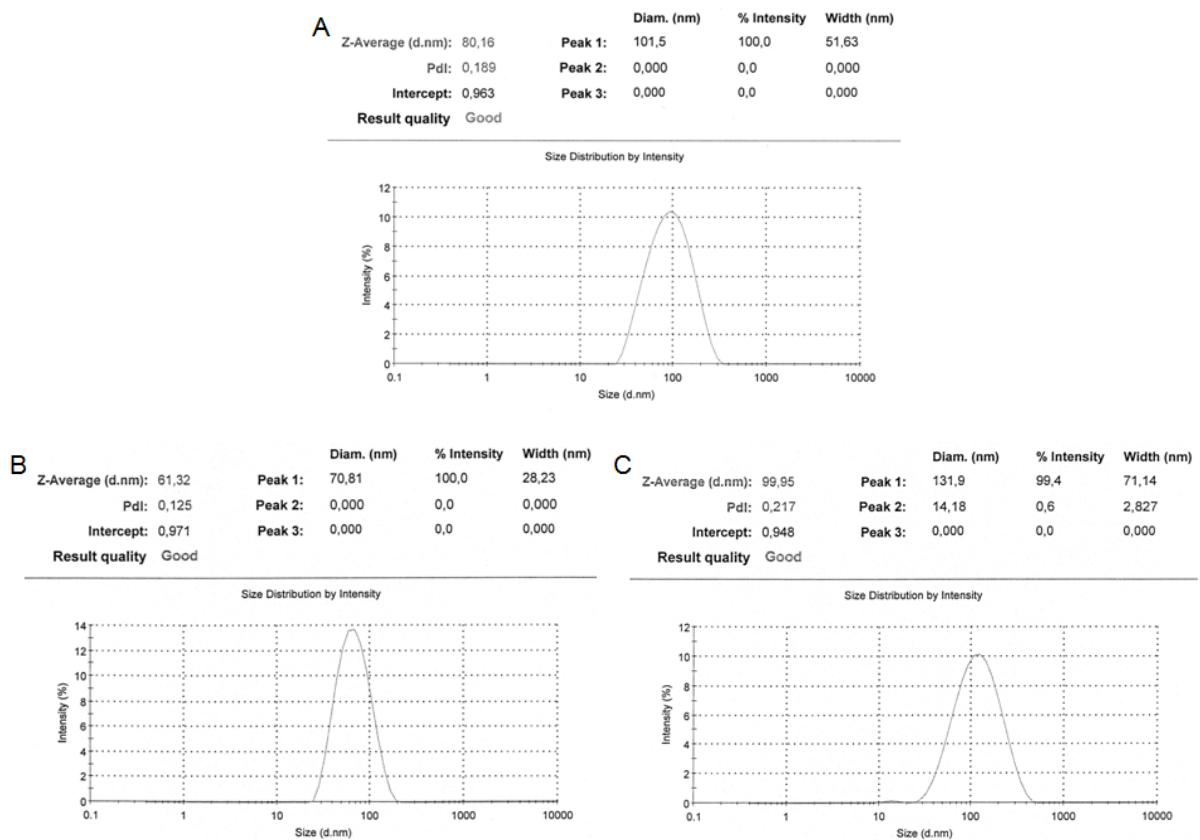


Abbildung 3.15.: PCS-Messung der N100 (A), N70 (B) und N20 (C) Partikel. Die Eisenoxidnanopartikel wurden zuvor in PBS (pH 7,4) verdünnt und in einer Eisenkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

Die PCS zeigte für die Partikel N100 und N70 den zu erwartenden Durchmesser von 100 nm bzw. 70 nm. Für das N20 Partikel wurde ein sehr großer Peak bei ungefähr 130 nm und ein kleiner Peak bei ungefähr 15 nm festgestellt, was auf eine starke Aggregation hindeutet.

3.7.2. Transmissionselektronenmikroskopie der Partikel

Eine mögliche Aggregation der Partikel N20, N70, N100 und Resovist wurde ohne Zellen mittels der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

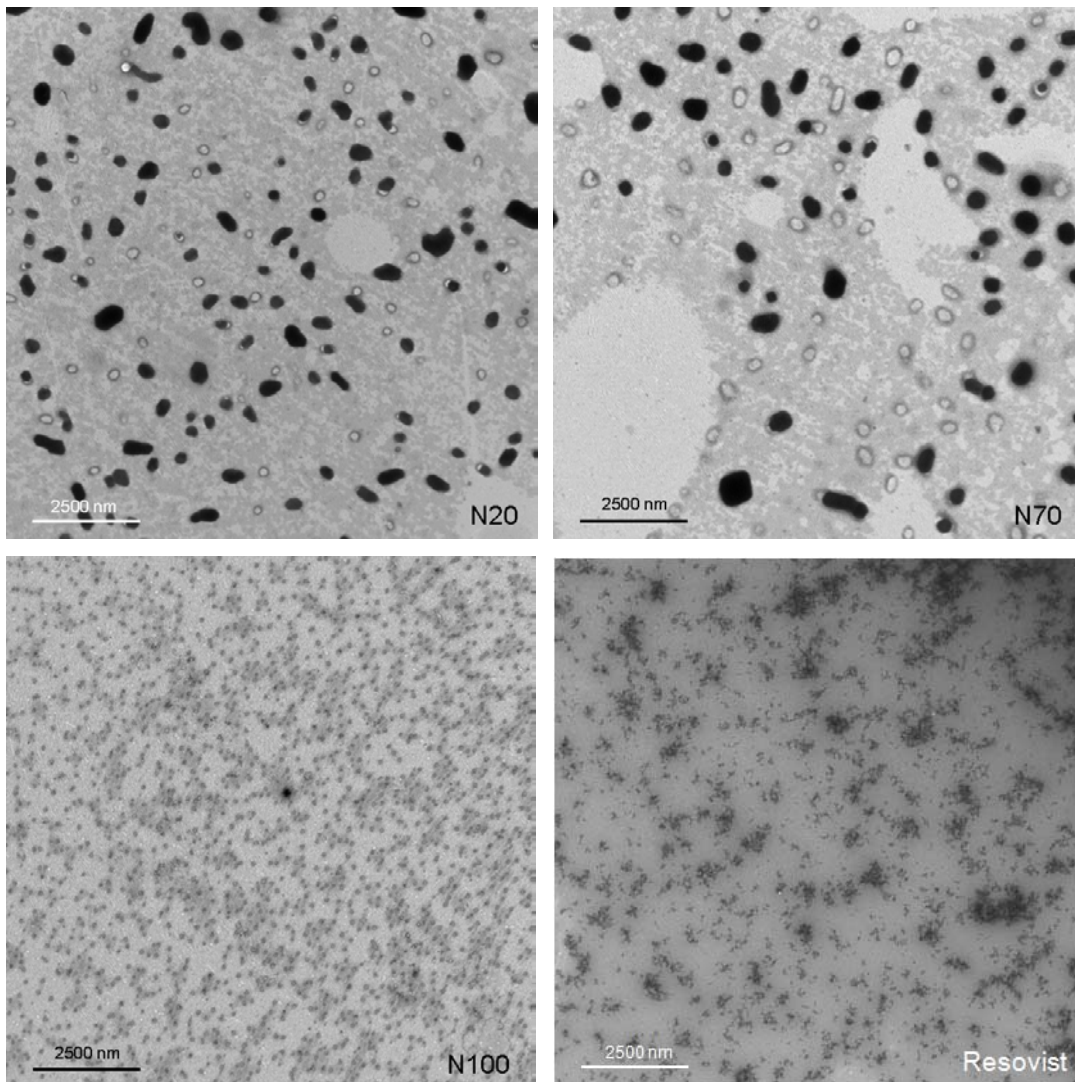


Abbildung 3.16.: Elektronenmikroskopieaufnahmen von Partikeln N20, N70, N100 und Resovist. Die Partikel wurden in einer Eisenkonzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

Die N20 und N70 Partikel zeigten ein vergleichbares Verhalten. Es konnte eine deutliche Aggregationsbildung der Partikel festgestellt werden. Der Durchmesser der

daraus hervorgehenden Partikel befand sich in einen Bereich zwischen 100 und 500 nm. Im Gegensatz zu den N20 und N70 Partikel lagen die N100 Partikel einzeln vor. Es kam zu keiner Zusammenlagerung der Partikel. Daher schwankt der Durchmesser der Partikel deutlich weniger. Die Resovist Partikel zeigten eine geringfügige Verklumpung neben vielen isolierten Partikeln.

3.8. Konjugation der Nanomag-Partikel

Mit Hilfe von Bromcyan (BrCN) wurde die Dextranhülle der Nanomag-Partikel über die Bildung einer reaktiven Imidogruppe mit einer Aminogruppe eines Zielmoleküls (Antikörper oder Rezeptor-Ligand) konjugiert. Als Zielmoleküle dienten VEGF und der VEGFR-2 Antikörper bzw. die entsprechenden Kontrollen Albumin und IgG.

3.8.1. Nachweis der Konjugation

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Kopplung wurden nach der Aufreinigung der Kopplung die gesammelten Fraktionen mittels Dot Spot untersucht.

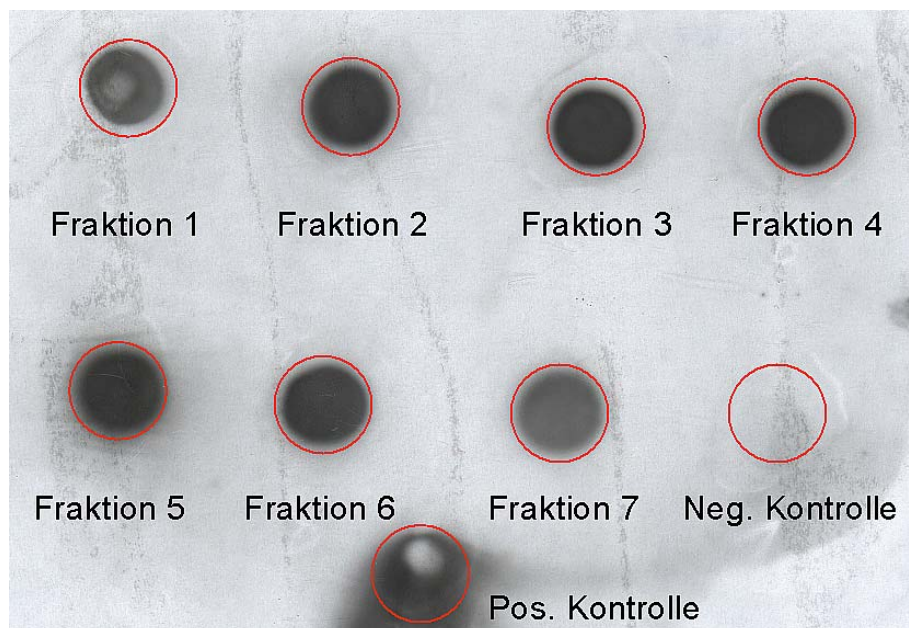


Abbildung 3.17.: „Dot-Spot-Test“ verschiedener Fraktionen einer anti-hVEGF-Rezeptor-2-N100-Kopplung durch Inkubation mit anti-IgG-Peroxidase und anschließender ECL (Enhanced Chemiluminescence) Detektion. Als Negativkontrolle wurde nur der Puffer und als Positivkontrolle der ungekoppelte Antikörper aufgetragen.

Während der gelchromatischen Abtrennung des ungebundenen anti-hVEGFR2-Antikörpers wurde der Durchfluss in Fraktionen aufgefangen und die Eisenenthaltenen Proben auf Anwesenheit des hVEGFR2 Antikörpers untersucht. Für alle eisenhaltigen Proben konnte eine deutliche Schwärzung des Films im Vergleich zur Negativkontrolle, die nur aus dem Laufpuffer bestand, festgestellt werden. Zusätzlich wurde jeweils eine entsprechende Positivkontrolle eingesetzt, die in diesem Fall der anti hVEGFR2 Antikörper war.

3.8.2. Nachweis der biologischen Aktivität

Die biologische Aktivität von VEGF Konjugaten wurde durch die Aktivierung der pERK1/2 MAP Kinase in Endothelzellen im Western Blot nachgewiesen.

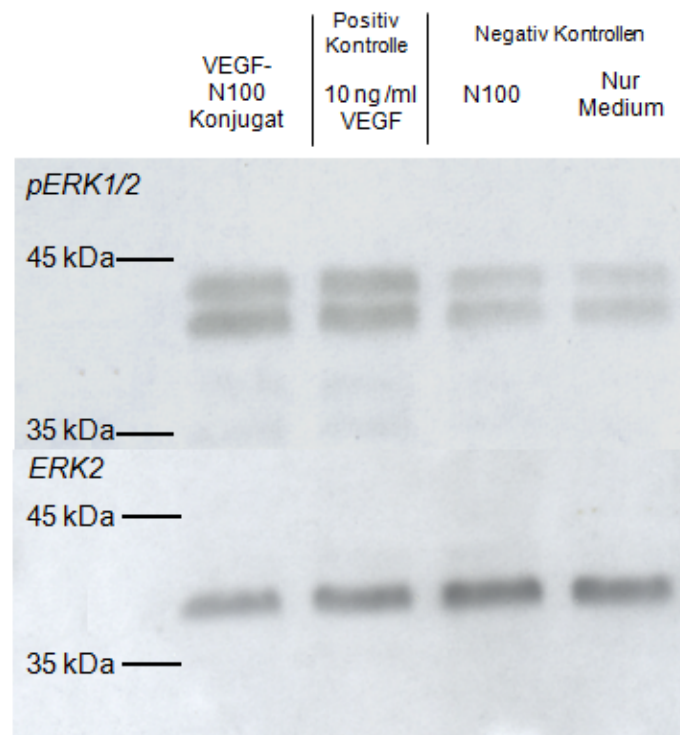


Abbildung 3.18.: Western Blot gegen pERK1/2 und Re-Blot gegen ERK2 von HUVEC's nach einer Stimulierung mit dem VEGF-N100-Konjugat, mit 10 ng/ml VEGF (Positivkontrolle) und mit N100 Partikeln (Negativkontrolle) für 15 Minuten. Eine weitere Negativkontrolle enthielt nur das entsprechende Medium. Die ungekoppelten N100 Partikel sowie das VEGF-N100-Konjugat wurden in einer Eisenkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Da das Kultivierungsmedium der HUVEC Wachstumsfaktoren in geringen Konzentrationen enthielt, wurde es vier Stunden vor dem Versuchsbeginn durch ein wachstumsfaktorfreies Medium ersetzt.

Das VEGF-Konjugat aktivierte, genau wie VEGF selbst, die MAP-Kinase ERK1/2. Die Negativkontrollen zeigten eine deutlich schwächere Aktivierung. Um zu gewährleisten, dass für alle Proben die gleiche Menge an Protein eingesetzt wurde, musste der pERK1/2 Western Blot gestrippt und anschließend auf ERK2 untersucht werden. Dabei zeigte sich für die Negativkontrolle sogar eine leicht höhere Proteinmenge.

3.8.3. Untersuchung des Partikeldurchmessers der N100-Konjugate durch den Einsatz der Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)

Um zu überprüfen, ob die Partikel nach der Konjugation aggregieren, wurde der Partikeldurchmesser durch die PCS bestimmt.

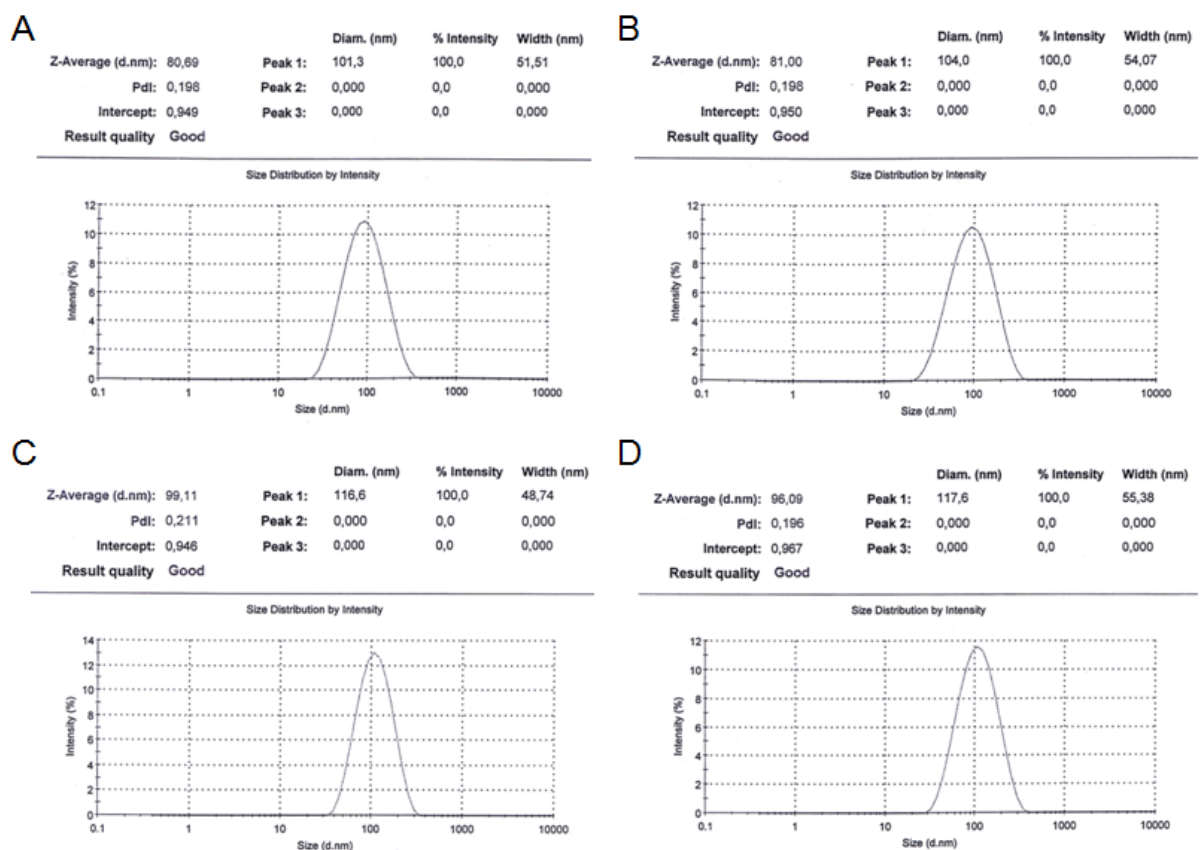


Abbildung 3.19.: PCS-Messungen des VEGF-N100 Konjugates (A), des Albumin-N100 Konjugates (B), des VEGFR-2 Antikörper-N100 Konjugates (C) und des IgG-N100 Konjugates (D). Die Konjugate wurden in PBS (pH 7,4) verdünnt und in einer Eisenkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

Während der PCS-Messungen der verschiedenen N100-Nanomag-Konjugaten zeigten das VEGFR-2-N100 und das IgG-N100 den größten Durchmesser. Die anderen beiden Konjugate hatten jeweils einen etwas kleineren Durchmesser. Für alle Konjugate wurde jeweils nur ein Peak beobachtet.

3.8.4. Kinetik der Bindung von VEGF-Konjugaten an Endothelzellen

Zur Festlegung der optimalen Inkubationszeit wurden die Aufnahmen der Konjugate VEGF-N100 und Albumin-N100 als Kontrolle in HUVEC's quantitativ bestimmt.

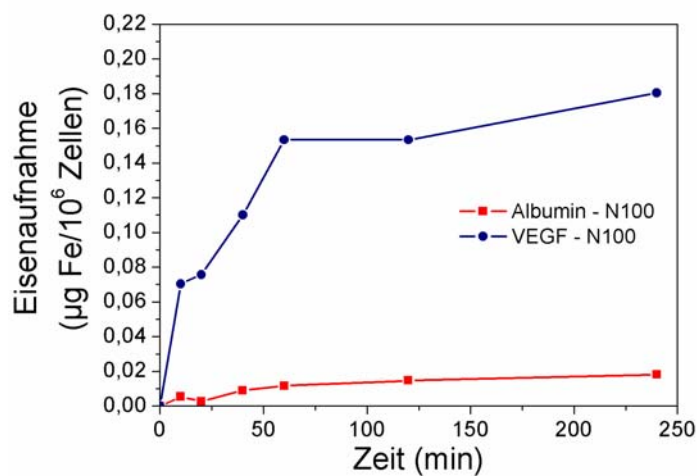


Abbildung 3.20.: Kinetik der Aufnahme von VEGF- und Albumin-N100 Konjugaten in HUVEC's. Die beiden Konjugate wurden jeweils in einer Eisenkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Der Zeitraum der Inkubation variierte zwischen 10 Minuten und 4 Stunden.

Der Unterschied der Eisenaufnahme der beiden Konjugate wurde bereits nach 10 Minuten sehr deutlich. Das Maximum der Partikelaufnahme der Konjugate war nach einer Stunde nahezu erreicht. Längere Inkubationen hatten nur noch sehr geringe Veränderungen zu Folge. Dabei wurde das VEGF-N100 Konjugat mehr als 10fach stärker aufgenommen als das Albumin-N100 Konjugat.

3.8.5. Vergleich der Aufnahme verschiedener Konjugate in Endothelzellen

HUVEC's sowie bEnd3 Zellen wurden mit verschiedenen N100 Konjugaten inkubiert und die Eisenaufnahme pro Zelle nach einer Stunde bestimmt.

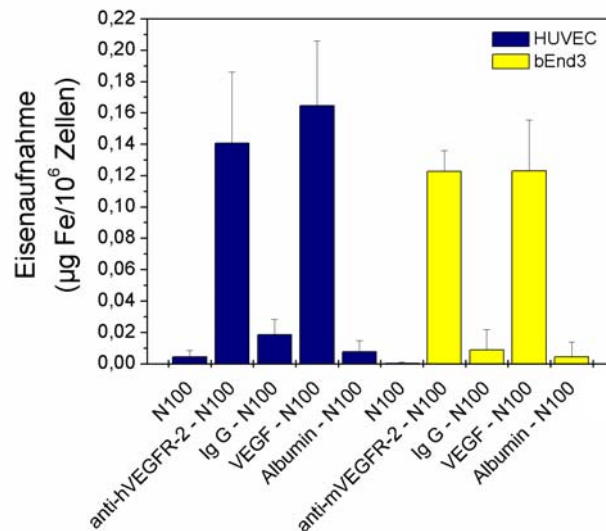


Abbildung 3.21.: Aufnahme unterschiedlicher Nanopartikelkonjugate in HUVEC und bEnd3 Zellen nach einer Stunde (Eisenkonzentration 100 µg/ml; n = 3). VEGF- und anti-VEGFR-2-Konjugate ergaben mindestens eine 10fach höhere Markierung als die Kontrollen Albumin oder IgG.

In beide Zelllinien zeigten die anti-VEGFR-2- bzw. VEGF-Konjugate eine um den Faktor 10 bis 15 höhere Markierung als die entsprechenden Kontrollen. Die VEGF-Konjugate offenbarten eine 10 bis 20%ige Erhöhung der Eisenaufnahme im Vergleich zu den anti VEGFR-2 Konjugaten. Die Messungen zeigten weiterhin, dass die HUVEC's einen 30%igen höheren Eisengehalt gegenüber den bEnd3 Zellen verzeichnen konnten.

3.8.6. Lokalisation der adsorbierten Konjugate in Endothelzellen

Die N100-Konjugate wurden nach Inkubation mit verschiedenen Techniken lokalisiert.

3.8.6.1. Eisenfärbung

Die subzelluläre Lokalisation der Aufnahme einiger Konjugate wurde mittels Eisenfärbung an HUVEC's überprüft.

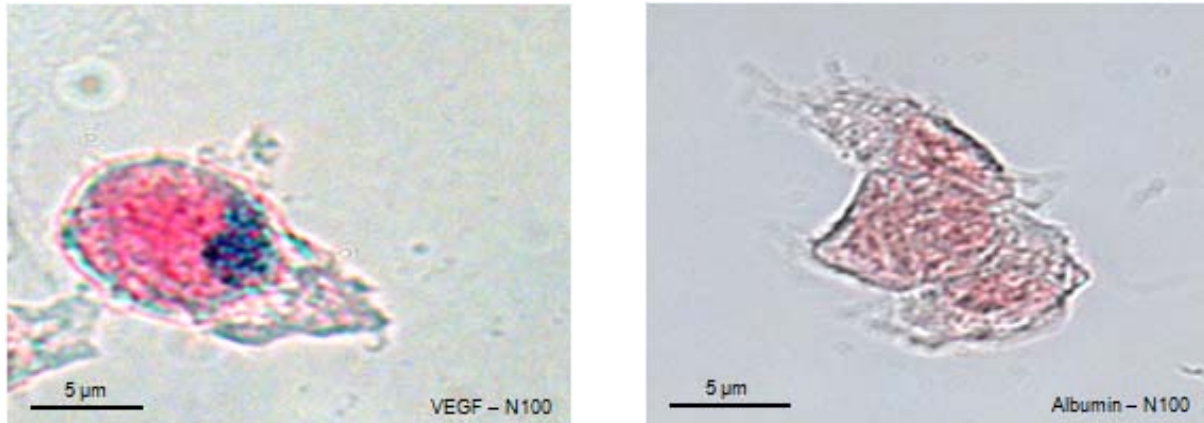


Abbildung 3.22.: Eisenfärbung und anschließende Gegenfärbung mit Kernechtrot von HUVEC's nach einer Stunde Inkubation mit dem VEGF-N100 bzw. dem Albumin-N100 Konjugat in einer Eisenkonzentration von 100 µg/ml.

Während nach der Inkubation mit dem VEGF-N100 Konjugat die Oberfläche und intrazelluläre Vesikel deutlich blau angefärbt wurden, konnte durch die Inkubation mit dem Albumin-N100 Konjugat keine Blaufärbung der Zellen erzielt werden.

3.8.6.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die subzelluläre Lokalisation der Konjugate nach der Inkubation von bEnd3 Zellen, wurde mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops genauer untersucht.

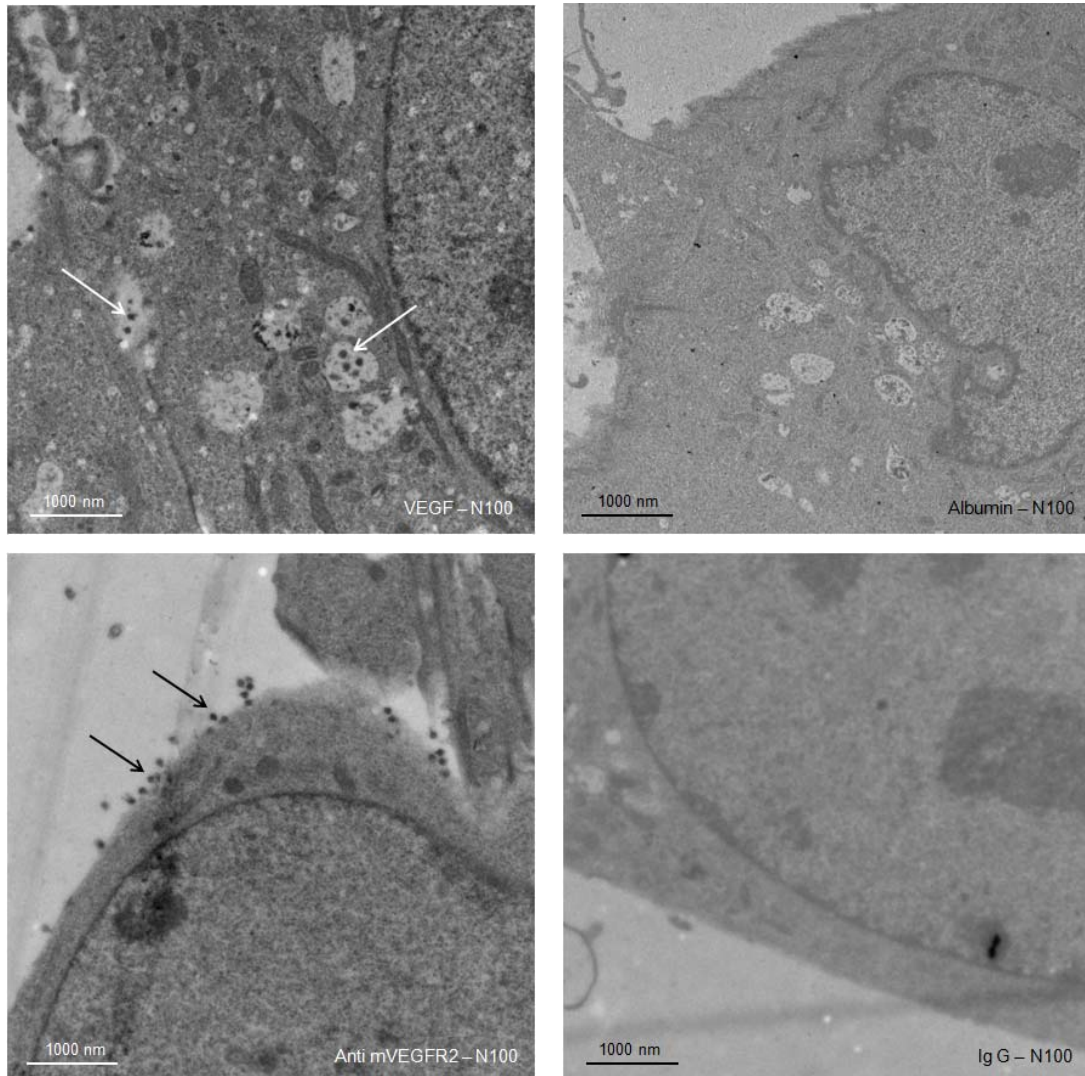


Abbildung 3.23.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von bEnd3 Zellen nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen N100 Konjugaten (Eisenkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Es zeigte sich, dass mVEGFR-2-Antikörperkonjugate zum größten Teil an der Oberfläche der Zelle zu finden waren, während die VEGF-N100-Konjugate in Vesikeln innerhalb der bEnd3 Zellen lokalisiert wurden. Die IgG- und Albumin-N100-Konjugate (Kontrolle für eine unspezifische Aufnahme) konnten weder an der Oberfläche noch innerhalb der bEnd3 Zellen detektiert werden.

3.8.6.3. Detektion der Eisenoxidnanopartikel im MRT

Vor einer in-vivo Anwendung musste zunächst überprüft werden, ob die Aufnahme der hergestellten Eisenoxidnanopartikelkonjugate auch im MRT nachweisbar ist.

3.8.6.3.1. Erstellen einer Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung

Zu Beginn wurde eine Eichgerade von den ungekoppelten N100 Partikeln im MRT erstellt, um in späteren Messungen eine Konzentrationsangabe durchführen zu können. Dazu wurden verschiedene Eisenkonzentration des N100 Partikel in 12%igem Polyacrylamid eingebettet und anschließend die eingesetzte Eisenkonzentration gegen die Delta R2* Werte aufgetragen.

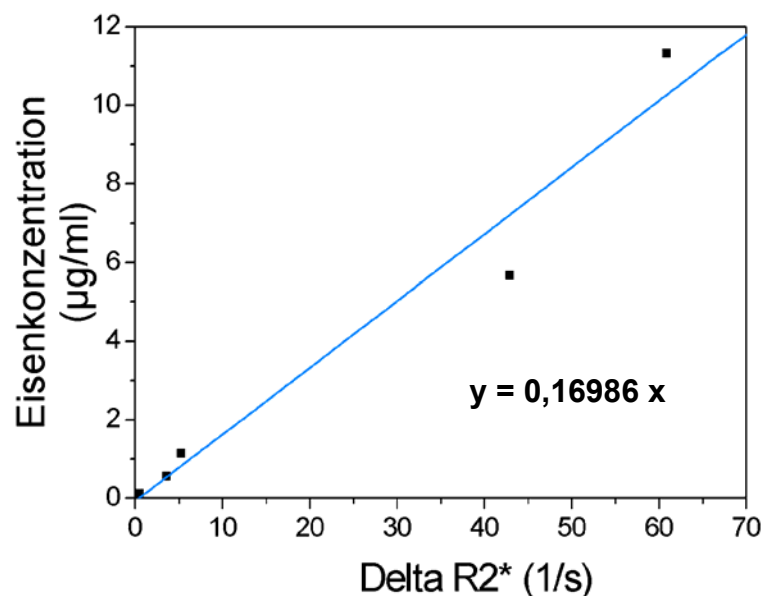


Abbildung 3.24.: Abhängigkeit der Delta R2* Werten der MRT-Messung von den Eisenkonzentrationen der N100 Partikel.

Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Eisenkonzentration der N100 Partikel in dem 12%igen Polyacrylamid und den Delta R2* Werten der MRT Messung.

3.8.6.3.2. Detektion der zellulär aufgenommenen Konjugate im MRT

bEnd3 Zellen wurden nach einer einstündigen Inkubation mit den verschiedenen Konjugaten in 12%igem Polyacrylamid eingebettet. Die im Abschnitt 3.8.6.3.1. beschriebene Eichgerade fand zur quantitativen Bestimmung der von den Zellen aufgenommenen Eisenmenge Verwendung.

	Delta R2*	Fe Konz (µg/ml)	Fe Masse (µg)	Zellzahl	µg Fe in 10 ⁶ Zellen	MW (Eisenmenge)	+/- SD
	1,44	0,245	0,368	3 Mio.	0,123		
anti mVEGFR-2 – N100	1,50	0,255	0,382	3 Mio.	0,127	0,178	0,091
	3,33	0,566	0,849	3 Mio.	0,283		
	0,70	0,118	0,177	3 Mio.	0,059		
Ig G – N100	0,71	0,120	0,180	3 Mio.	0,060	0,050	0,016
	0,37	0,063	0,094	3 Mio.	0,031		
	9,85	1,673	2,509	8 Mio.	0,314		
VEGF – N100	4,09	0,694	1,041	5 Mio.	0,208	0,294	0,077
	7,05	1,197	1,795	5 Mio.	0,359		
	1,13	0,193	0,289	5 Mio.	0,057		
Albumin – N100	0,91	0,155	0,231	5 Mio.	0,046	0,054	0,006
	1,13	0,192	0,288	5 Mio.	0,057		

Tabelle 3.2.: Bestimmung der von den Zellen aufgenommenen Eisenmenge durch die MRT nach Einsatz von verschiedenen N100-Konjugaten. Die Eisenaufnahme wurde auf eine Million bEnd3 Zellen bezogen.

Zwischen den N100-anti-VEGFR-2- bzw. N100-VEGF-Konjugaten und den entsprechenden Kontrollen konnte ein Unterschied in der Eisenaufnahme um den Faktor 4 bis 6 festgestellt werden. Außerdem wurde das VEGF-Konjugat um mehr als 50% stärker aufgenommen als das anti VEGFR-2-Konjugat. Die zwei

verschiedenen Kontrollen bewirkten einen deutlich geringeren Eisengehalt in den Zellen.

3.8.6.3.3. Detektion von spezifisch markierten Zellen im MRT im Monolayer

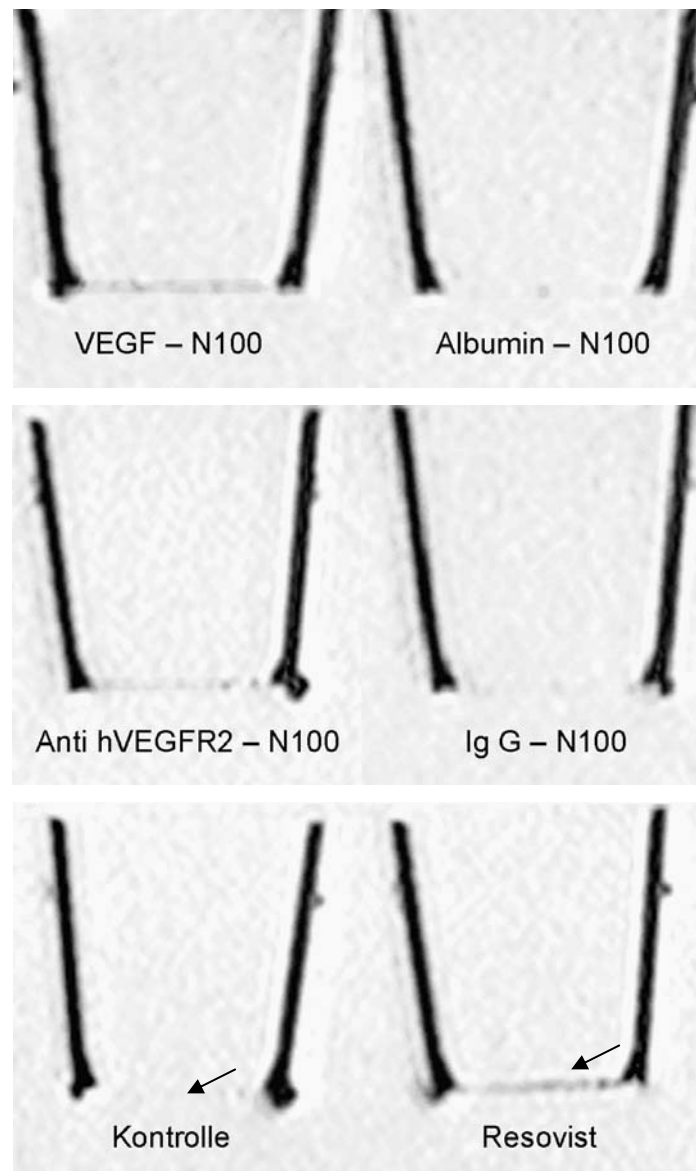


Abbildung 3.25.: 3T-MRT-Aufnahme von 50.000 HUVEC's als Monolayer auf PET-Membranen (Pfeil in der Abbildung), die mit VEGF-, Albumin-, anti-VEGFR-2 Antikörper- bzw. IgG-Konjugaten, sowie Resovist (Eisenkonzentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eine Stunde inkubiert wurden. Die Zellen wurden gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert und im MRT mit Hilfe von T2*-gewichteten Sequenzen gemessen.

HUVEC wurden als Monolayer auf PET-Membranen kultiviert, mit verschiedenen Konjugaten inkubiert und mittels MRT untersucht. Dabei zeigte sich ein deutlicher Kontrast für die VEGF- und anti-VEGFR-2-N100-Konjugaten, während die Kontrollen (Albumin- und IgG-Konjugate) die Zellen nicht markierten. Der Kontrast der so markierten 50.000 Zellen im Monolayer war allerdings etwas schwächer, als eine unspezifische Aufnahme durch Resovist (Positivkontrolle). In Negativkontrollen (nur Zellen, nur N100-Partikel ohne Zellen) war die PET-Membran nicht zu sehen.

3.8.7. In-vivo Untersuchung von ungekoppelten Partikeln

Für konjugierte Eisenoxidnanopartikel ermöglicht eine lange Zirkulationszeit im Blut bessere Bindungsmöglichkeiten am entsprechenden Ziel. Die Aufnahme der Partikel durch die Kupfferzellen der Leber ist ein wesentlicher Faktor, der die Zirkulationszeit begrenzt. Um die Eignung der Eisenoxidnanopartikel für in-vivo Versuche einschätzen zu können, wurde die Aufnahme in der Leber im MRT untersucht.

Dazu wurden 100 µl einer 100 µg Fe/ml haltigen Lösung von Resovist, N20 bzw. N70 in die Schwanzvene von jeweils zwei Mäusen injiziert. Das Resovist, ein klinisch zugelassenes Kontrastmittel für Leberuntersuchungen, diente als Positivkontrolle. T2*-gewichtete Aufnahmen der Leber wurden vor den Injektionen sowie 30 Minuten, 90 Minuten und 24 Stunden nach den Injektionen aufgenommen. Die Messungen erfolgten in einem 1,5 Tesla MRT.

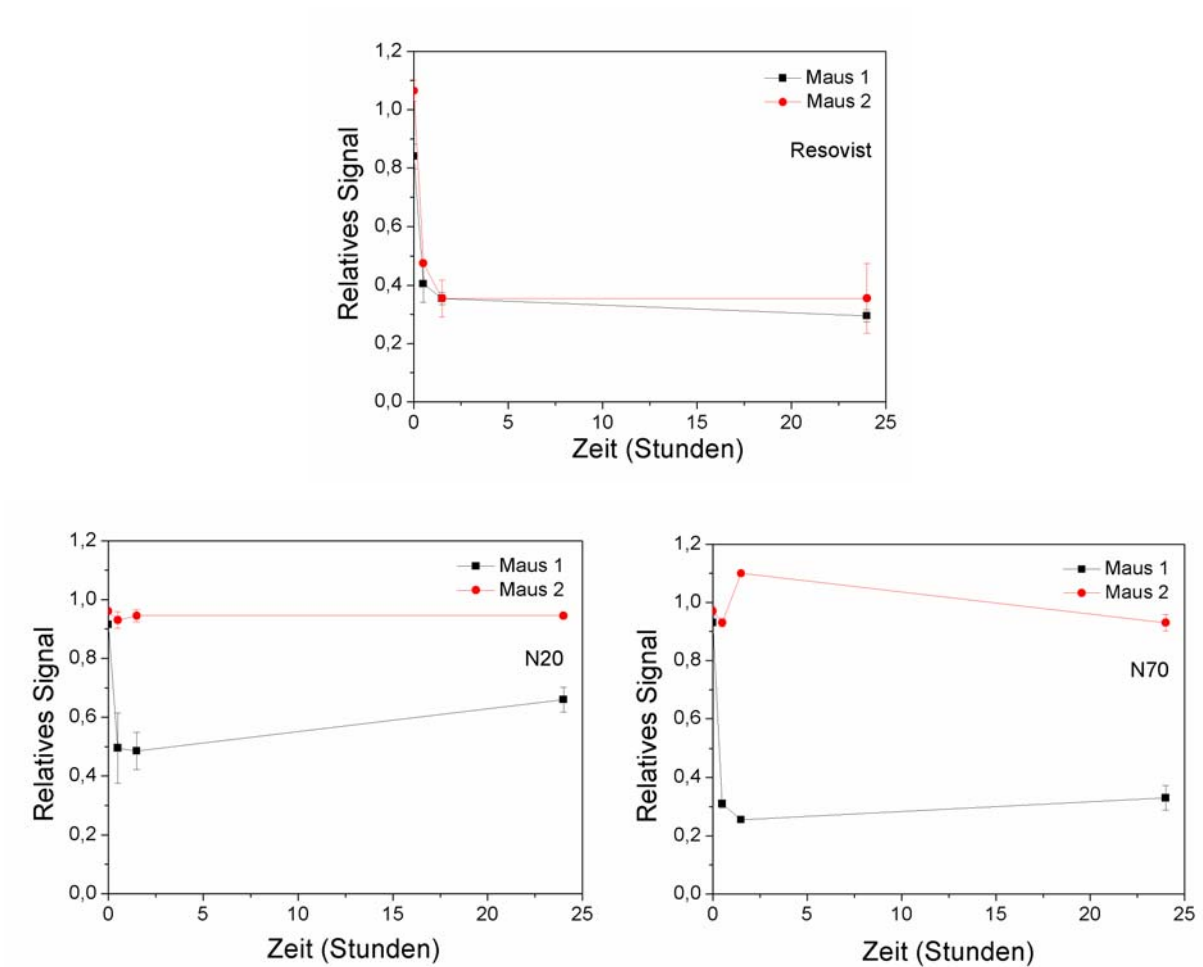


Abbildung 3.26.: Injektion von 10 μg Fe Resovist, N20 bzw. N70 in die Schwanzvene von jeweils zwei Mäusen. T2*-gewichtete MRT-Messungen von der Leber wurden direkt vor Injektion, sowie 30 Minuten, 90 Minuten und 24 Stunden nach Injektion durchgeführt.

Der Fehler der Messwerte liegt durchschnittlich bei 15%. Die Messwerte wurden auf eine externe Referenzprobe bezogen.

Die Messungen zeigten für das Resovist direkt nach der Injektion einen starken Abfall der Relaxivität. Auch nach 24 Stunden war die Schwärzung der Leber annähernd konstant geblieben. Die Schwankungen zwischen den zwei getesteten Mäusen waren nur minimal. Im Gegensatz dazu zeigten die N20 und N70 Partikeln ein sehr unterschiedliches Aufnahmeverhalten. Besonders für das N70 waren die Daten grundverschieden. Während eine Maus keine Leberschwärzung aufwies, kam es bei der anderen Maus zu einer sofortigen extremen Partikelaufnahme in der Leber. Ein ähnliches Verhalten wurde für das N20 aufgezeichnet. Bei den Mäusen, denen N20 und N70 gespritzt worden war, wurden post mortem makroskopische Nekrosen der Leber beobachtet. Dies ist möglicherweise auf das

Aggregationsverhalten der beiden Partikel zurückzuführen, was auch schon in früheren Untersuchungen festgestellt wurde. Dadurch kann keine gesicherte Aussage zum in-vivo Verhalten getroffen werden kann.

3.8.8. In-vivo Untersuchung des N100-VEGF Konjugates

3.8.8.1. Injektion in gesunde Maus - Kinetik der Aufnahme und Abgabe des N100-VEGF-Konjugates

In den ersten in-vivo Experimenten wurde das Verhalten des N100-VEGF Konjugates in drei gesunden Mäusen untersucht. Somit konnte der „Hintergrund“ für den späteren Versuch mit der tumortragenden Maus bestimmt werden.

Während der Injektion der Eisenoxidnanopartikelkonjugate wurde der zeitliche Verlauf des Kontrastes in der Leber als auch in der Aorta bestimmt. Eine Abnahme der Intensität während der MRT Messung bedeutete eine Schwärzung der jeweiligen Region. 100 µl der Eisenoxidnanopartikelkonjugat-Lösung, die 50 µg Eisen enthielt, wurde in die Schwanzvene der Maus injiziert.

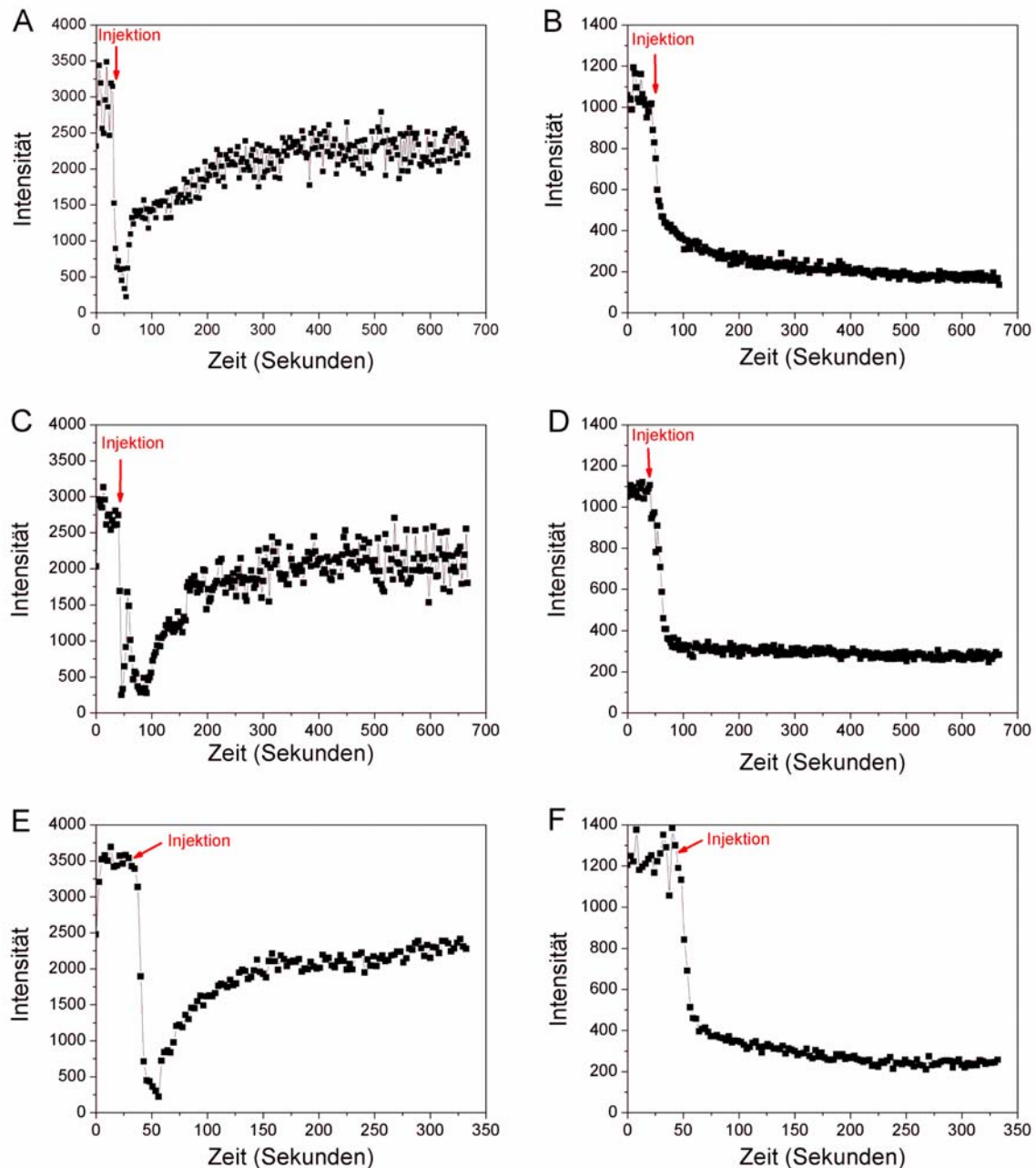


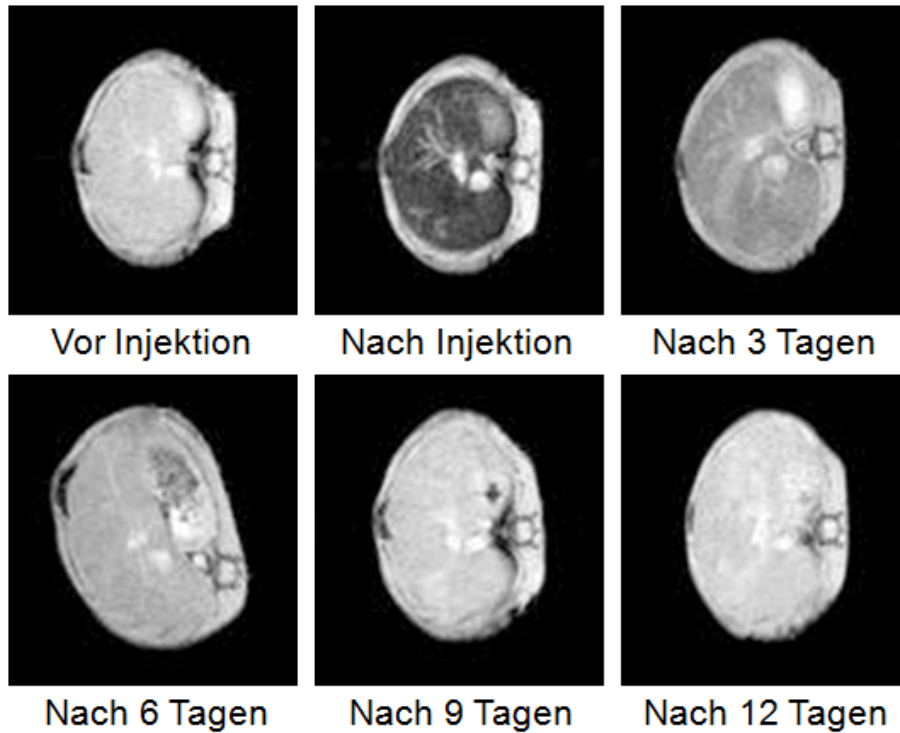
Abbildung 3.27.: Kontrastverlauf in der MRT-Messung während der Injektion der N100-VEGF Konjugate (n = 3). A,C und E: in der Aorta; B,D und F: in der Leber

Die Injektion der Eisenoxidnanopartikelkonjugate bewirkte in der Aorta eine rasche Abnahme der Intensität. Die Schwärzung innerhalb der Aorta war bereits nach 50 Sekunden in allen drei Tieren stark zurückgegangen und nach weiteren 250 Sekunden hatte sich ein steady state eingestellt. Die Leber zeigte nach der Injektion eine schnelle Schwärzung, die sich nach 300 Sekunden ungefähr konstant verhielt. Zwischen den drei verwendeten Mäusen war kein markanter Unterschied während

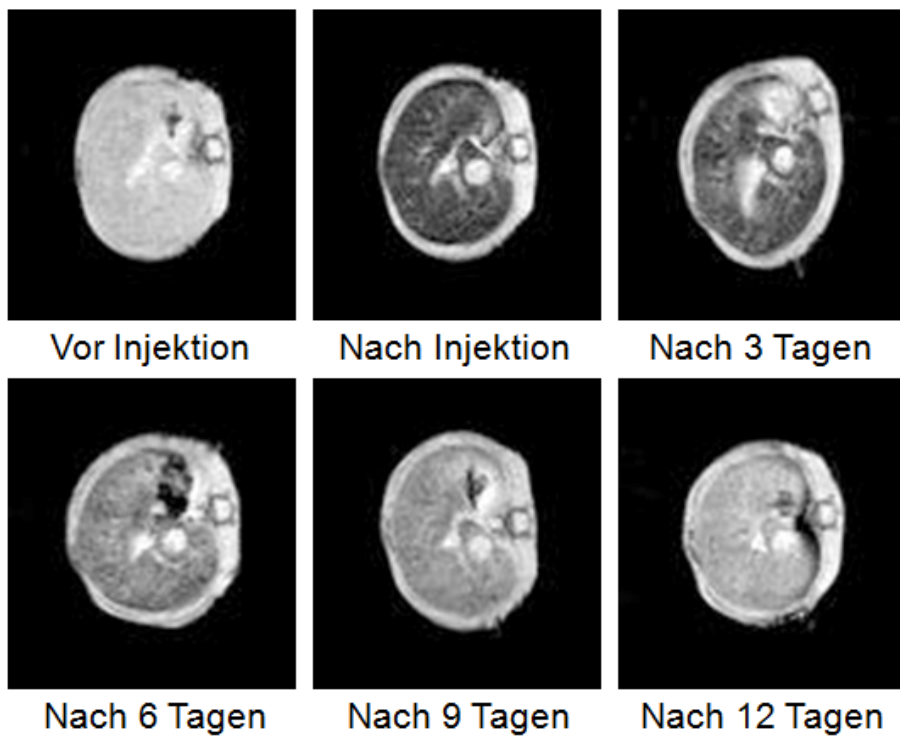
der Injektion festzustellen. Allerdings ist der Startwert der Intensität für Maus 3 etwas höher als für die anderen zwei Mäuse.

Der Verlauf der Kontrastierung in den Lebern der drei Mäuse wurde innerhalb von 12 Tagen weiterverfolgt.

Maus 1



Maus 2



Maus 3

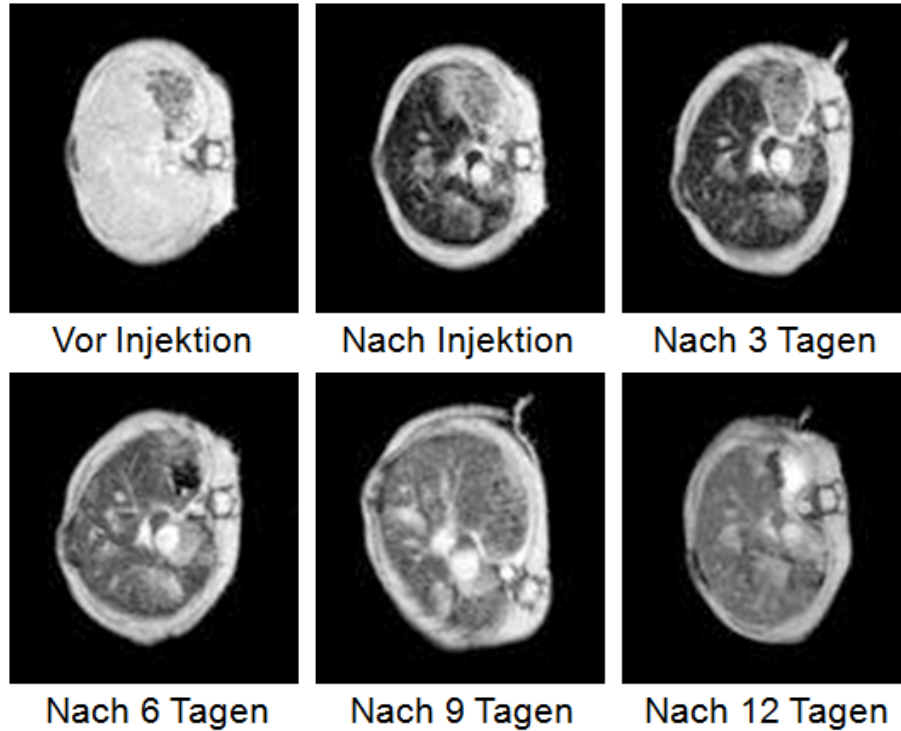


Abbildung 3.28.: Zeitlicher Verlauf der Kontrastierung der Leber nach einer Injektion des N100-VEGF-Konjugates in drei Mäusen.

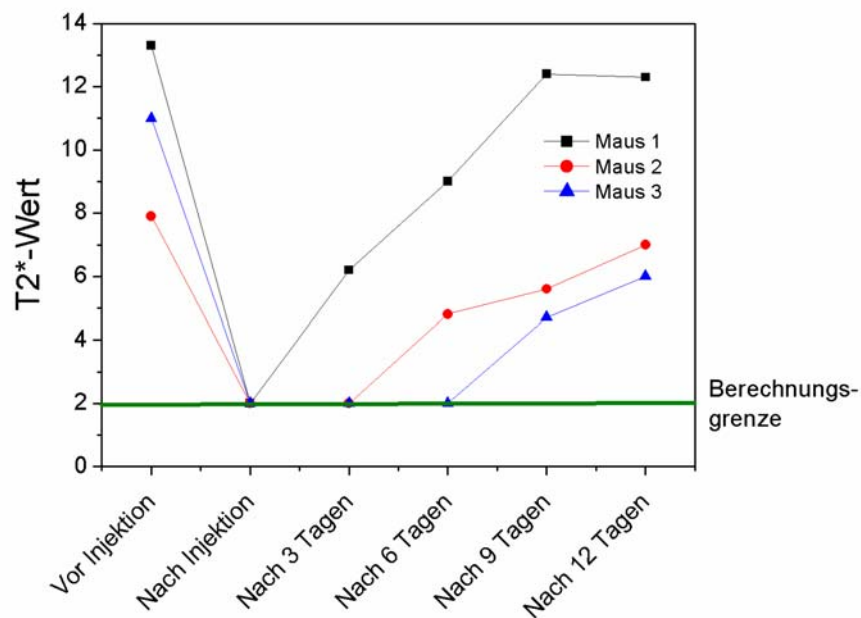


Abbildung 3.29.: Übersicht über die gemessenen T2*-Werte der Leber von drei Mäusen. Eine Abnahme des T2*-Werte bedeutet eine Verkürzung der Relaxivität und somit eine verstärkte Schwärzung der untersuchten Struktur. Die Ausscheidung der

Eisenoxidnanopartikel ist abgeschlossen, wenn der T2*-Wert zum Ausgangswert zurückgekehrt ist. Unterhalb der Berechnungsgrenze konnte aufgrund der sehr starken Schwärzung keine genaue Berechnung durchgeführt werden.

Die Verringerung der Schwärzung der Leber und somit die Abgabe der Eisenpartikel aus der Leber war in den untersuchten Mäusen unterschiedlich. Nach Injektion des N100-VEGF-Konjugates kam es zwar für alle Mäuse zu einer starken Schwärzung der Leber, allerdings benötigten die Mäuse unterschiedlich viel Zeit für die Ausscheidung der Eisenpartikel. Für Maus 1 war dies bereits nach sechs bis neun Tagen erreicht, Maus 2 benötigte schon neun bis zwölf Tage und in der dritten Maus befanden sich sogar nach zwölf Tagen noch Eisenoxidnanopartikel in der Leber. Angesichts der relativ hohen Retention der Konjugate in der Leber, konnte das ursprünglich geplante Leber-Metastasen-Tiermodell nicht eingesetzt werden, und so wurde auf weitere Tierversuche verzichtet.

3.8.8.2. Absorption von Plasmaproteinen

Der Einfluss des Blutplasmas auf die N100-Partikel wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht.

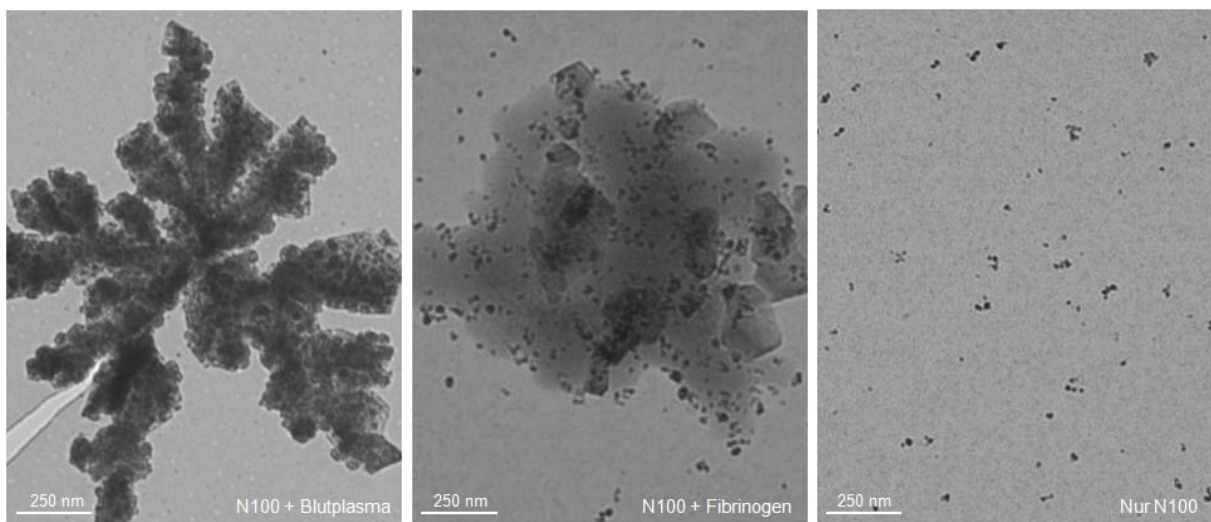


Abbildung 3.30.: Untersuchung der Wirkung von Blutplasma und seinem Bestandteil Fibrinogen (210 µg/ml) auf die N100-Partikel.

Das Blutplasma verursachte eine starke Aggregation der N100-Partikel. Weiterhin bewirkte bereits das Blutplasmaprotein Fibrinogen eine verstärkte

Zusammenlagerung. Als Negativkontrolle wurde das N100-Partikel in 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt.

3.9. Untersuchungen von Fluoreszenzkonjugaten

Drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, sowie ein fluoreszierendes Nanopartikel wurden mit VEGF und Albumin gekoppelt und anschließend untereinander verglichen. Aufgrund der hohen Expressionsrate des VEGF-Rezeptors-2 (siehe Abschnitt 3.6.1.) wurden die HUVEC als Untersuchungszelllinie ausgewählt. Zwei der Fluoreszenzmoleküle, das Quantum Dot und das Cy5, fluoreszieren bei 680 nm bzw. 670 nm, während die beiden anderen Fluoreszenzmoleküle, das IRDye 800CW und das Cy7, über ein Emissionsmaximum bei 789 nm bzw. 776 nm verfügen.

3.9.1. Quantum Dots (Jonamac Red)

Nach der Konjugation mit VEGF bzw. Albumin (siehe Abschnitt 2.12.4.2.) wurden die biologische Aktivität sowie die Bindungsaktivität in-vitro überprüft.

3.9.1.1. Biologische Aktivität des Quantum Dots – VEGF Konjugates

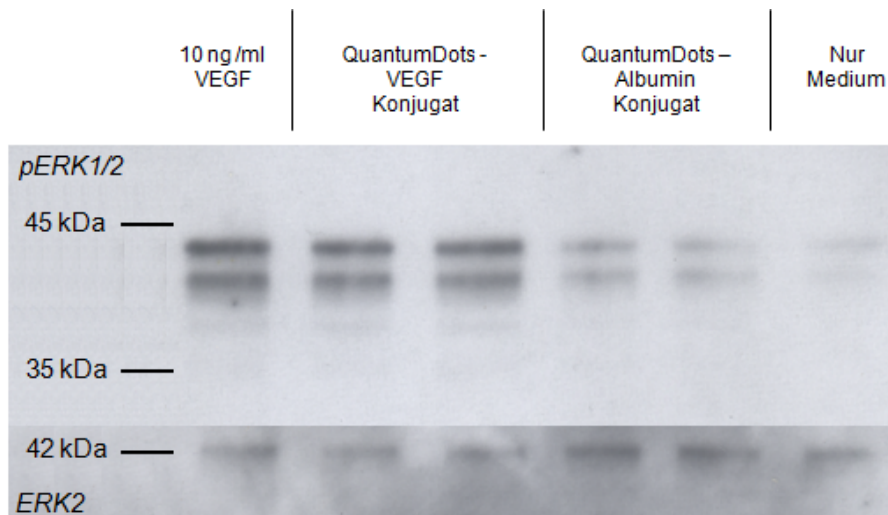


Abbildung 3.31.: Western Blot gegen pERK1/2 von HUVEC's nach einer Stimulierung mit dem Quantum Dot-VEGF-Konjugat und der Positivkontrolle von 10 ng/ml (250 pmol/l) VEGF. Als Kontrollen wurden das Quantum Dots-Albumin-Konjugat bzw. nur das reine Medium eingesetzt.

Von dem Quantum Dots-Albumin-Konjugat sowie von dem Quantum Dots-VEGF-Konjugat wurden 2 nmol/l eingesetzt. Da das Kultivierungsmedium der HUVEC's Wachstumsfaktoren in geringen Konzentrationen enthielt wurde es vier Stunden vor dem Versuchsbeginn durch ein wachstumsfaktorfreies Medium ausgetauscht. Die Stimulierung wurde nach 15 Minuten beendet. Die Banden der Positivkontrolle und des Quantum Dot-VEGF-Konjugat im pERK1/2 Western Blot konnten deutlich stärker detektiert werden als die entsprechenden Kontrollen. Dabei war die Bandenstärke des Quantum Dot-VEGF-Konjugates nur etwas schwächer als die der Positivkontrolle. Der ERK2 Western Re-Blot zeigte auch anschließend eine gleichmäßige Auftragung der einzelnen Proteinlösungen.

3.9.1.2. Untersuchung der Bindungsaktivität der Quantum Dots Konjugate

Um die Bindungsaktivität in-vitro zu überprüfen, wurden HUVEC's mit dem Quantum Dot – VEGF Konjugat und Quantum Dots – Albumin Konjugat für eine Stunde inkubiert. Die Zellen waren dabei einer Quantum Dot Konzentration von 0,4 nmol/ml ausgesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte eine DAPI Färbung, sowie eine Einbettung der Zellen.

3.9.1.2.1. Quantum Dot – VEGF Konjugat

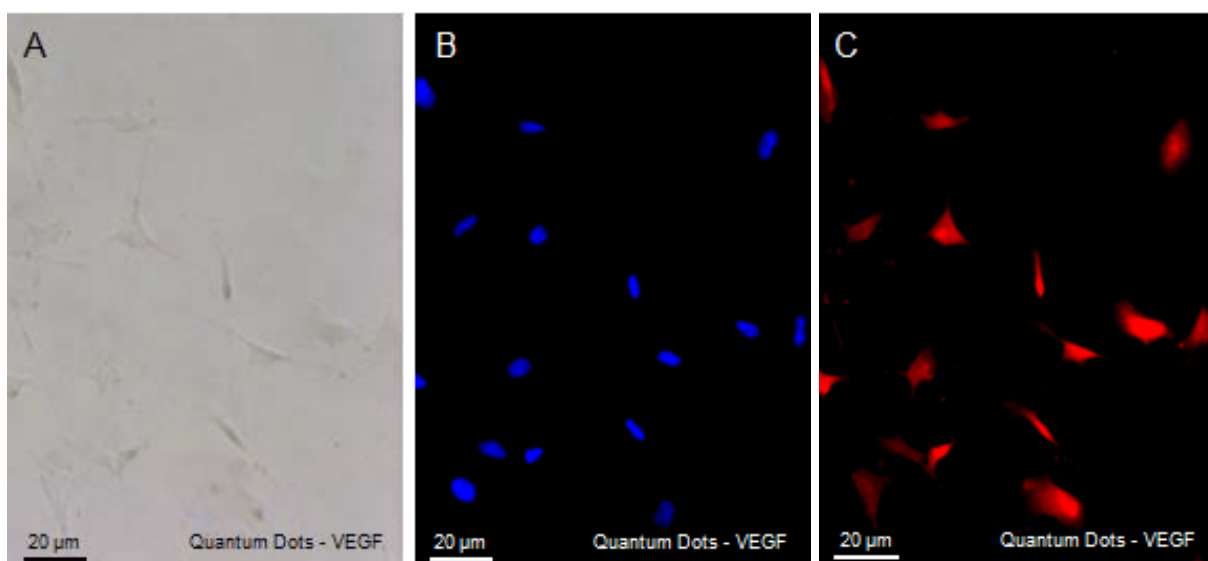


Abbildung 3.32.: Überprüfung der Bindungsaktivität des Quantum Dot-VEGF-Konjugates. Mit 0,4 nmol/ml des Konjugates wurden die HUVEC's eine Stunde

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert, eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt und schließlich mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. A = Lichtmikroskopische Aufnahme, B = DAPI Kernfärbung, C = Quantum Dot-Färbung

Die Abbildung C zeigt eine deutliche Färbung im Wellenbereich der Quantum Dots. Die DAPI Färbung der Abbildung B ist ebenso wie die Abbildung C mit der lichtmikroskopischen Aufnahme deckungsgleich.

3.9.1.2.2. Quantum Dots – Albumin Konjugat

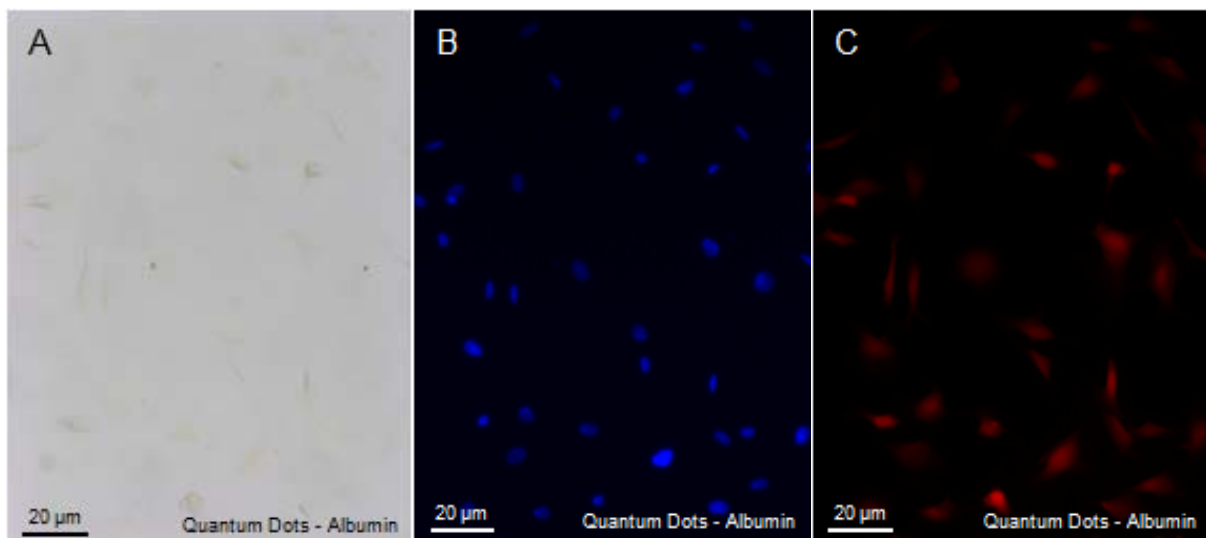


Abbildung 3.33.: Untersuchung auf unspezifischen Bindungen durch das Quantum Dots-Albumin-Konjugat. Die HUVEC's wurden mit 0,4 nmol/ml des Konjugates für eine Stunde inkubiert. Nach der Fixierung, DAPI-Kernfärbung, sowie der Einbettung wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht. A = Lichtmikroskopische Aufnahme, B = DAPI-Kernfärbung, C = Quantum Dot-Färbung

Die dargestellten Messungen wurden mit der identischen Belichtungszeit gemessen wie im Abschnitt 3.9.1.2.1. Dabei ist die resultierende Färbung durch das Quantum Dot-Albumin-Konjugat deutlich schwächer als die des Quantum Dot-VEGF-Konjugates. Die beiden Fluoreszenzmessungen überlappen sich mit der lichtmikroskopischen Aufnahme in Abbildung A.

3.9.1.2.3. Negativkontrolle (nur Medium)

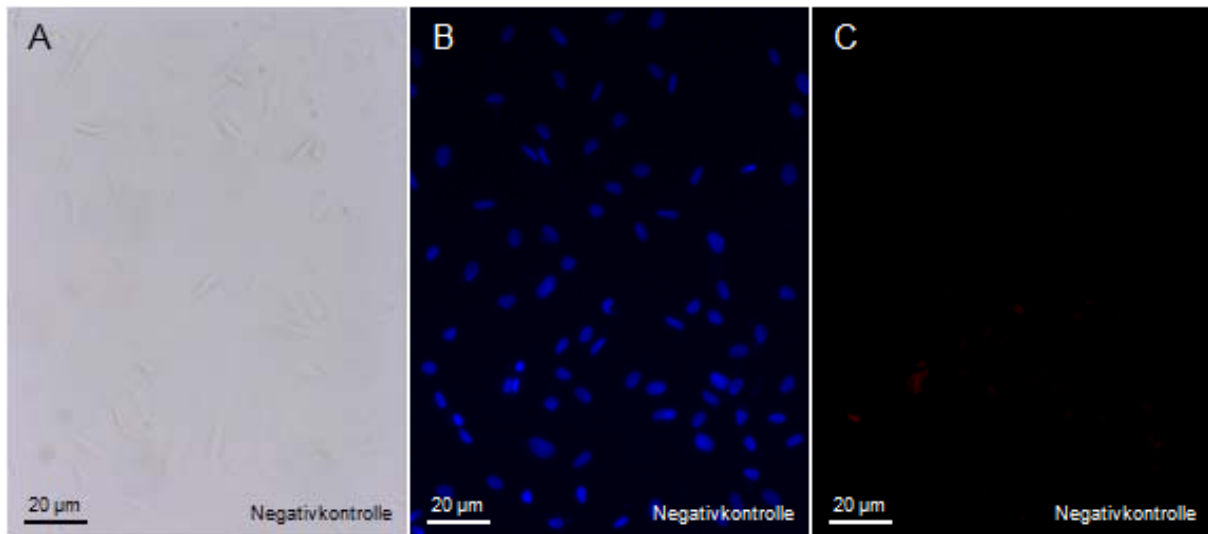


Abbildung 3.34.: Negativkontrolle. Die HUVEC's wurden nur mit dem entsprechenden Medium inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. A = Lichtmikroskopische Aufnahme, B = DAPI-Kernfärbung, C = Quantum Dot-Färbung

Auch die Aufnahmen der Negativkontrolle wurden bezogen auf die jeweiligen Filtern mit der gleicher Belichtungszeit wie in Abschnitt 3.9.1.2.1. und 3.9.1.2.2. aufgenommen. Mit dem Quantum Dot-Filter konnte im Gegensatz zu dem DAPI-Filter keine Zellen detektiert werden.

3.9.2. Cy5

Der Farbstoff Cy5 wurde mit Hilfe seiner N-hydroxysuccinimid Estergruppe mit VEGF bzw. Albumin gekoppelt (siehe Abschnitt 2.12.3.). Anschließend wurde die biologische Aktivität sowie die Bindungsaktivität in-vitro durch den Einsatz von HUVEC's überprüft.

3.9.2.1. Biologische Aktivität des Cy5-VEGF-Konjugates

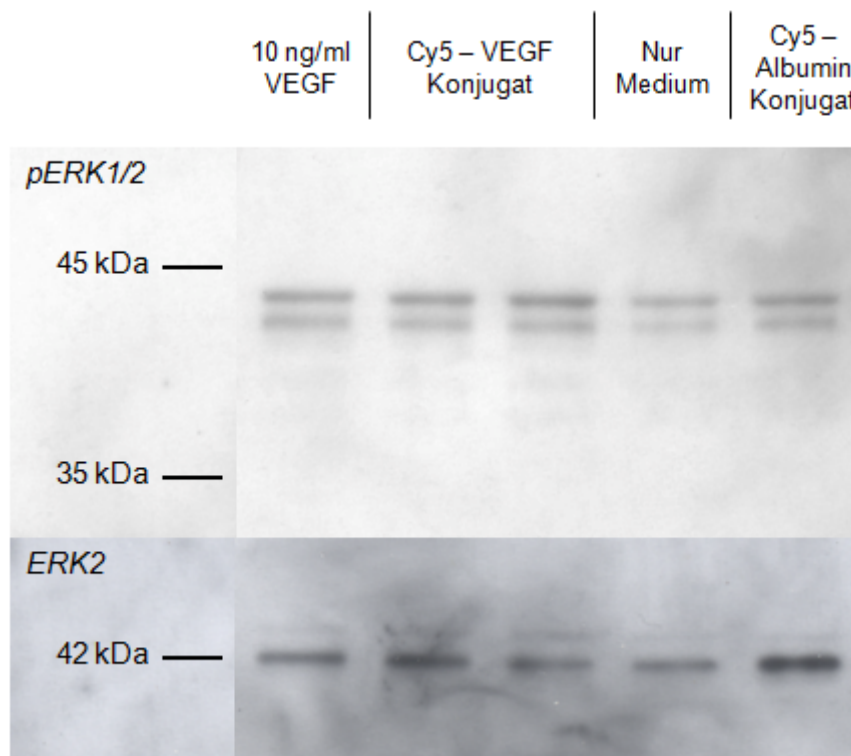


Abbildung 3.35.: Western Blot gegen pERK1/2 von HUVEC's nach der Stimulierung mit dem Cy5-VEGF-Konjugat. Das Cy5-VEGF-Konjugat wurde in einer VEGF Konzentration von 20 ng/ml (500 pmol/l) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 10 ng/ml (250 pmol/l) VEGF und als Negativkontrollen das Cy5-Albumin-Konjugat (500 pmol/l) und das reine Medium verwendet.

Vier Stunden vor der Stimulierung wurde das normale Kultivierungsmedium der HUVEC durch ein wachstumsfaktorfreies Medium ersetzt. Die Stimulierung wurde nach 15 Minuten beendet. Die durch den Cy5-VEGF Konjugat hervorgerufene Banden im pERK1/2 Western Blot waren mit der Positivkontrolle, 10 ng/ml VEGF, vergleichbar. Die Bandenstärke der beiden Kontrollen war entsprechend schwächer. Der ERK2 Western Blot zeigte eine ungefähr gleichmäßige Auftragung der einzelnen Proteinlösungen. Nur die Bande des Cy5-Albumin Konjugates war leicht stärker.

3.9.2.2. Untersuchung der Bindungsaktivität der Cy5-Konjugate

Nach der Abtrennung besaßen die Konjugate eine Farbstoffkonzentration von ungefähr 2 nmol/ml. Das Konjugat Cy5-VEGF und das entsprechende Kontrollkonjugat Cy5-Albumin wurden für eine einstündige Inkubation von HUVEC's eingesetzt. Danach wurden die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 4%

Paraformaldehyd fixiert, mittels DAPI gefärbt und anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.9.2.2.1. Cy5-VEGF-Konjugat

Die Bindungsaktivität in-vitro des Cy5-VEGF-Konjugates wurde an HUVEC's untersucht.

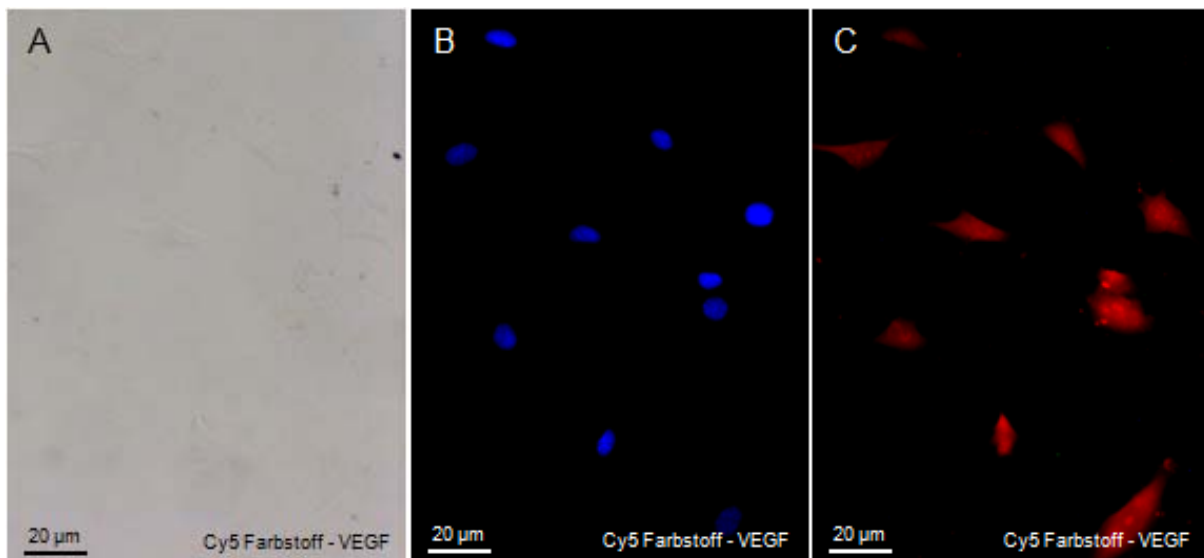


Abbildung 3.36.: Überprüfung der Bindungsaktivität des Cy5-VEGF-Konjugates. Die HUVEC's wurden eine Stunde mit ungefähr 2 nmol/ml des Farbstoffes und ungefähr 0,5 nmol/ml VEGF inkubiert, mit PBS (pH 7,4) gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach der DAPI-Kernfärbung wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. A = Lichtmikroskopische Aufnahme, B = DAPI Kernfärbung, C = Cy5-Färbung

Die Abbildung C, die den Filter für den Cy5 Farbstoff präsentiert, zeigt eine deutliche Fluoreszenz. Mit Hilfe der DAPI-Färbung konnten die Zellkerne angefärbt werden. Die Färbungen der Zellen sind mit der lichtmikroskopischen Aufnahme in Abbildung A deckungsgleich. Somit konnten alle Zellen markiert werden.

3.9.2.2.2. Cy5-Albumin-Konjugat

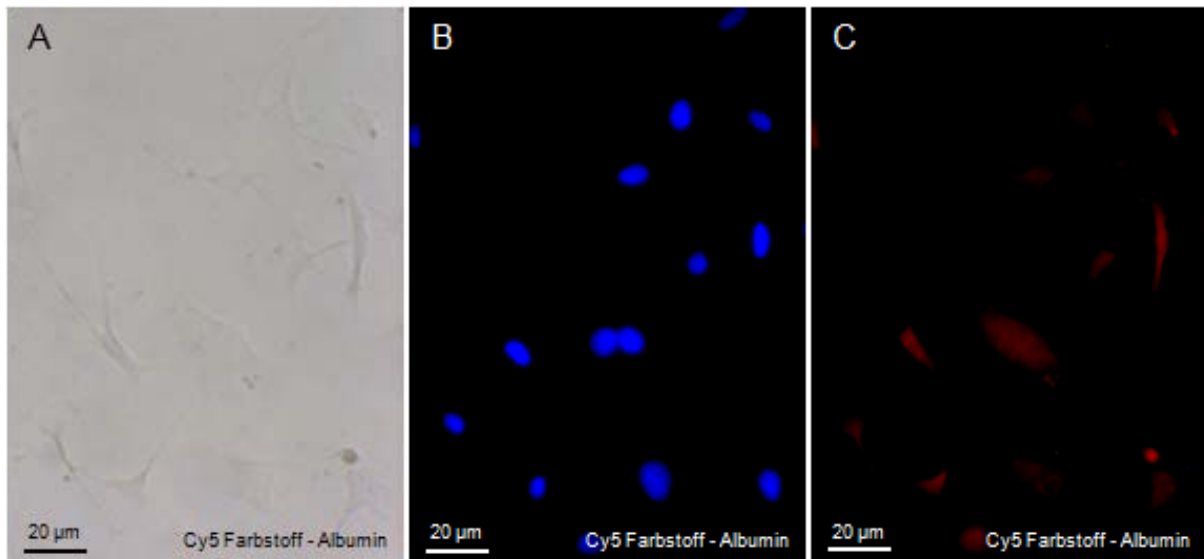


Abbildung 3.37.: Überprüfung der Bindungsaktivität des Cy5-Albumin-Konjugates. Nach der einstündigen Inkubation mit ungefähr 2 nmol/ml des Farbstoffes wurden die HUVEC's mit PBS (pH 7,4) gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach der DAPI-Kernfärbung wurden die Zellen dann mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. A = Lichtmikroskopische Aufnahme, B = DAPI-Kernfärbung, C = Cy5-Färbung

Die verschiedenen Messungen wurden mit der entsprechenden Belichtungszeit wie im Abschnitt 3.9.2.2.1. durchgeführt. Die detektierte Fluoreszenz war, wie in Abbildung C dargestellt, wesentlich schwächer als im vorherigen Abschnitt. Die DAPI-Kernfärbung zeigte in allen Versuchen eine gleichbleibend gute Detektion. Auch während dieses Versuches überlappen sich die Fluoreszenzmessungen mit der lichtmikroskopischen Aufnahme.

3.9.2.2.3. Negativkontrolle (nur Medium)

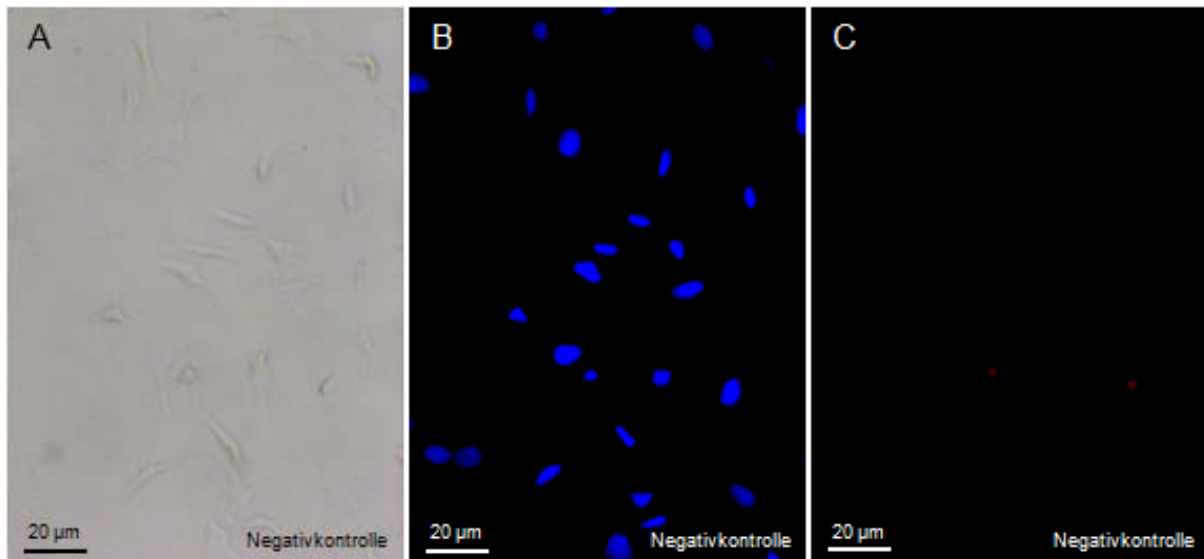


Abbildung 3.38.: Negativkontrolle. Die HUVEC's wurden nur mit dem entsprechenden Medium inkubiert, mit PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mittels DAPI angefärbt und dann mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop untersucht. A = Lichtmikroskopische Aufnahme, B = DAPI-Kernfärbung, C = Cy5-Färbung

Die Negativkontrolle wurde mit den entsprechenden Filtern ebenfalls mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Mit dem Cy5 bzw. Quantum Dot Filter konnte im Gegensatz zu den DAPI Filter keine Fluoreszenz detektiert werden. Die Abbildungen A und B sind erneut deckungsgleich.

3.9.3. Vergleich der Detektionsmöglichkeiten zwischen der Cy5-VEGF und der Quantum Dot-VEGF-Kopplung

Um eine qualitative Aussage zu treffen, wurden die Fluoreszenzaufnahmen des Cy5-VEGF-Konjugates und des Quantum Dot-VEGF-Konjugates bei der gleichen Belichtungszeit gemessen.

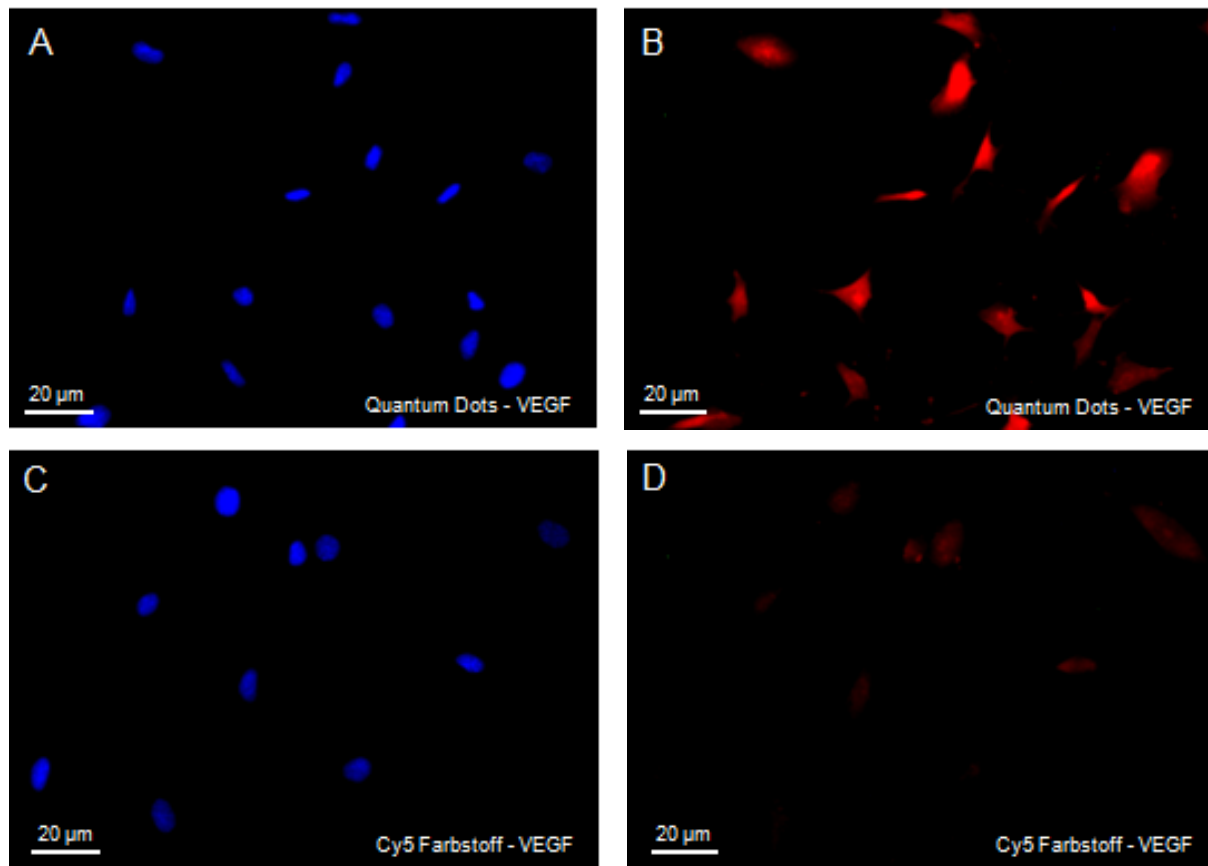


Abbildung 3.39.: Untersuchung des Cy5-VEGF-Konjugates und des Quantum Dot-VEGF-Konjugates bei gleicher Belichtungszeit. Die HUVEC's wurden mit dem Cy5-VEGF (2 nmol/ml Farbstoff) bzw. mit dem Quantum Dot-VEGF (0,4 nmol/ml) über eine Stunden inkubiert. Während der Analyse im Fluoreszenzmikroskop wurde die identische Belichtungszeit verwendet. A und C = DAPI-Kernfärbung, B und D = Quantum Dot- bzw. Cy5-Färbung.

Bei der gleichen Belichtungszeit ergibt sich für das Quantum Dot-Konjugat eine deutlich höhere Fluoreszenz als für das Cy5-Konjugat.

3.9.4. IRDye 800CW

Der IRDye Farbstoff enthält, wie auch Cy5 und Cy7, eine N-hydroxysuccinimid Estergruppe, über die eine Kopplung mit VEGF bzw. Albumin (siehe Abschnitt 2.12.3.) hergestellt werden konnte. Für die Konjugation wurden 5 µg des Farbstoffes angesetzt. Nach der Kopplung konnte der ungebundene Farbstoff mittels der MicroSpin G-25 Säule abgetrennt werden. Die biologische Aktivität sowie die Bindungsaktivität wurden in-vitro mit Hilfe von HUVEC's untersucht.

3.9.4.1. Biologische Aktivität des IRDye 800CW – VEGF Konjugates

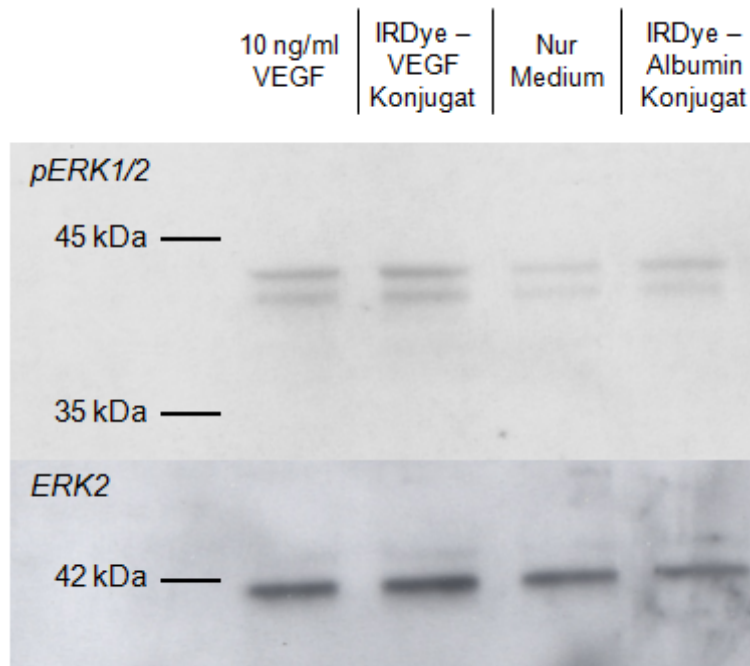


Abbildung 3.40.: Western Blot gegen pERK1/2 von HUVEC's nach einer Stimulierung mit dem IRDye 800CW-VEGF Konjugat. Das IRDye 800CW-VEGF-Konjugat besaß ungefähr eine VEGF-Konzentration von 20 ng/ml (500 pmol/l). Als Positivkontrolle wurden 10 ng/ml (250 pmol/l) VEGF verwendet und die zwei Negativkontrollen bestanden aus dem IRDye 800CW-Albumin-Konjugat, sowie aus reinem Medium.

Das Kultivierungsmedium der HUVEC wurde vier Stunden vor dem Versuchsbeginn durch wachstumsfaktorfreies Medium ersetzt. Die Stimulierung erfolgte über einen Zeitraum von 15 Minuten. Das IRDye 800CW-VEGF-Konjugat bewirkte in dem pERK1/2 Western Blot eine ähnliche Bandenstärke wie die Positivkontrolle, die aus 10 ng/ml VEGF bestand. Das Konjugat IRDye 800CW-Albumin verursachte nur eine leichte Bandenverstärkung im Vergleich zur Negativkontrolle. Der ERK2 Western Blot zeigte anschließend eine gleichmäßige Auftragung der einzelnen Proteinlösungen.

3.9.4.2. Untersuchung der Bindungsaktivität der IRDye 800CW Konjugate

Eine erfolgreiche Kopplung des IRDye 800CW Farbstoffes wurde in-vitro mit Hilfe des entsprechenden LICOR-Gerätes über Bindung an HUVEC nachgewiesen.

3.9.4.2.1. Verschiedene Zellzahl

Die Spezifität und Sensitivität des IRDye 800CW-VEGF-Konjugates wurde mittels verschiedener Zellzahlen (HUVEC) am LICOR-Odyssee-Gerät geprüft. Dafür wurden die Zellen ohne Farbstoff, mit dem Farbstoff und dem Konjugat eine Stunde inkubiert. Die Zellen allein oder diejenigen mit dem ungekoppelten Farbstoff ergaben kaum eine Fluoreszenz, wohingegen durch das IRDye 800CW-VEGF-Konjugat ein deutliches Signal detektiert werden konnte.

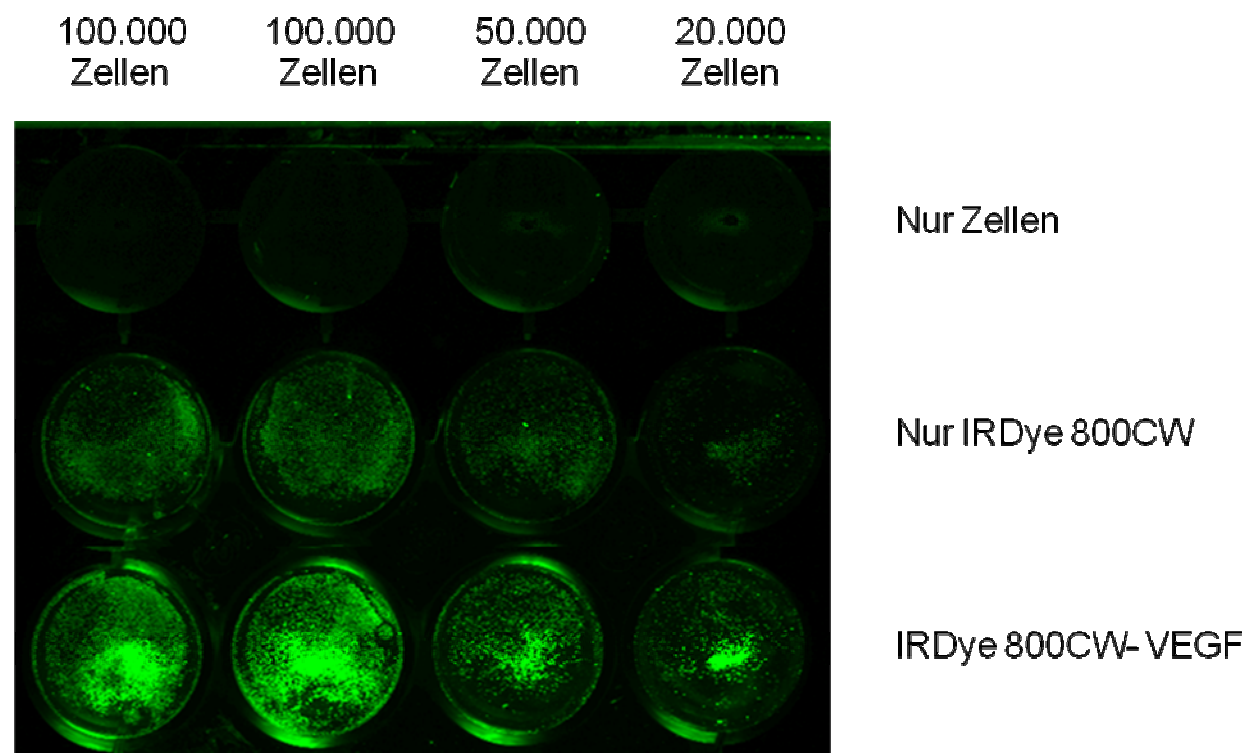


Abbildung 3.41.: Detektion des IRDye 800CW-VEGF-Konjugates in HUVEC's. Eine Zellzahl zwischen 20.000 und 100.000 wurde in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach der Markierung der Zellen wurden diese mit PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert. Das eingesetzte VEGF Konjugat hatte pro Well ungefähr eine Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ (53 nM) und die Farbstoffkonzentration betrug jeweils ungefähr 0,2 nmol/ml.

Mit steigender Zellzahl verstärkte sich auch die hervorgerufene Fluoreszenz durch das IRDye 800CW – VEGF Konjugat. Mit dem Einsatz des reinen Farbstoffes konnte dagegen nur ein deutlich schwächeres Signal erzeugt werden. Für die Negativkontrolle, in der kein Farbstoff eingesetzt wurde, konnten keine Zellen detektiert werden.

3.9.4.2.2. Verweildauer des IRDye 800CW Konjugates in den Zellen

Die Ausdünnung des IRDye 800CW Farbstoffes in HUVEC's wurde über den Zeitraum von 24 Stunden beobachtet. Es wurden jeweils 50.000 Zellen in 24 Well Platten ausgesät.

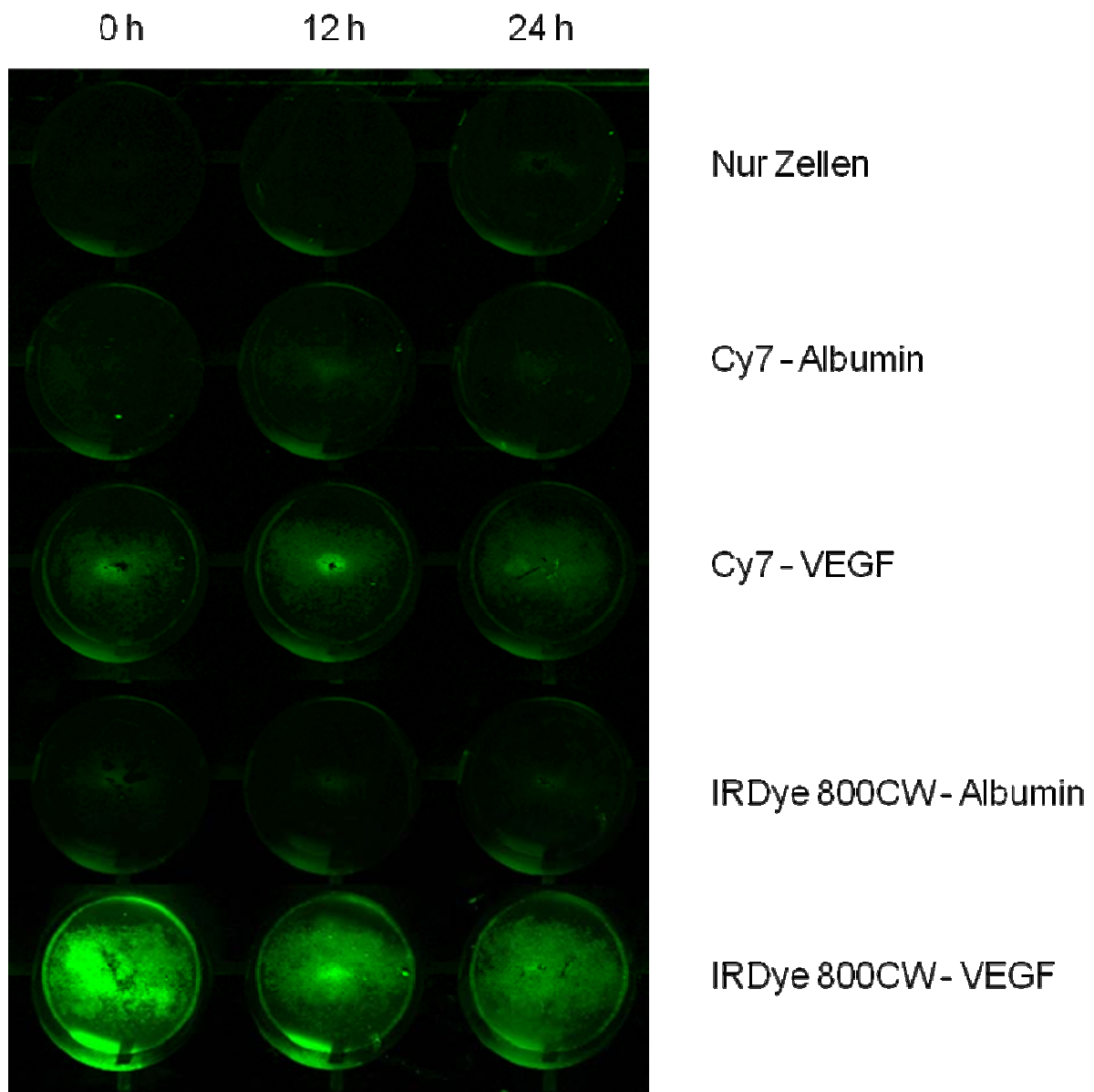


Abbildung 3.42.: Verweildauer verschiedener IRDye 800CW Konjugate in HUVEC's. Nach der einstündigen Markierung wurden die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen,

anschließend 12 Stunden bzw. 24 Stunden weiter kultiviert und dann mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Als Kontrolle auf unspezifische Bindungen für das IRDye 800CW – VEGF Konjugat fand das IRDye 800CW – Albumin Konjugat Verwendung. Als Qualitätsuntersuchung des IRDye 800CW Farbstoffes wurden die Kopplungen ebenfalls mit dem Cy7 Farbstoff, der ein sehr ähnliches Spektrum ausweist, durchgeführt. In der Negativkontrolle waren die Zellen keinem Farbstoff ausgesetzt. Die verwendeten VEGF Konjugate hatten pro Well ungefähr eine Konzentration von 2 µg/ml (53 nM). Die Farbstoffkonzentration betrug jeweils ungefähr 0,2 nmol/ml.

In den Untersuchungen zeigte sich, dass das IRDye 800CW – VEGF Konjugat eine deutlich höhere Fluoreszenz aufwies als die vergleichbare Kopplung mit dem Cy7. Eine weitere Inkubation nach der Markierung bewirkte eine Ausdünnung der jeweiligen Farbstoffe, was am Beispiel des IRDye 800CW – VEGF Konjugates aufgrund der erhöhten Fluoreszenz besonders gut zu erkennen war. Bereits nach 12 Stunden war eine Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen, die sich nach weiteren 12 Stunden noch verstärkte. Die Zellen der jeweiligen Kontrollen auf eine unspezifische Bindung konnten dagegen kaum detektiert werden. Die Negativkontrolle zeigte keine Fluoreszenz.

3.9.4.2.3. Verdrängungsversuch

Eine spezifische Bindung der VEGF-Konjugate wurde zusätzlich durch einen Verdrängungsversuch festgestellt. Dabei wurde die 5fache Konzentration von ungekoppelten VEGF hinzugefügt, so dass eine Konkurrenz mit den VEGF Konjugaten um die begrenzten Bindungsstellen auf den Zellen auftreten musste.

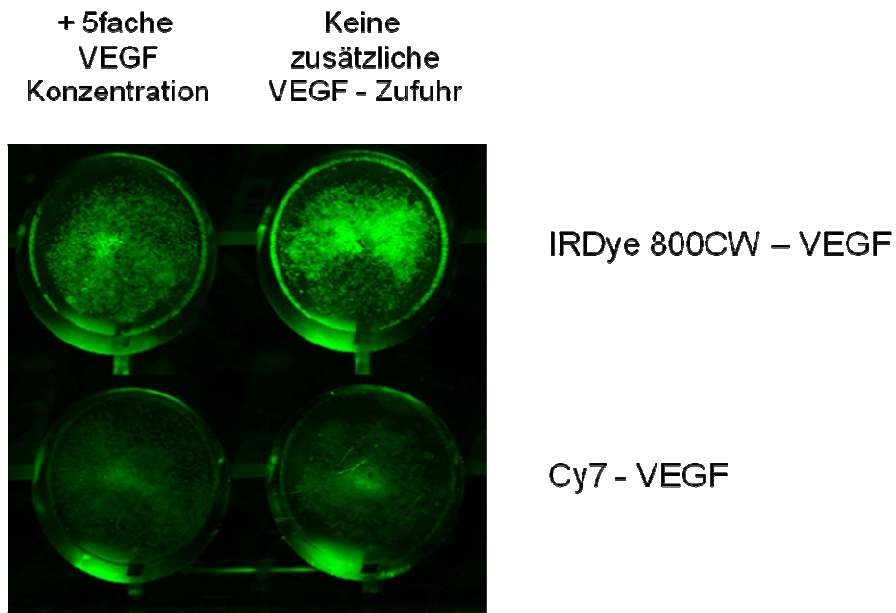


Abbildung 3.43.: Verdrängung der VEGF-Konjugate durch die Zugabe von ungekoppelten VEGF. Nach der einstündigen Markierung wurden die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Konjugate hatten eine VEGF – Konzentration von 2 µg/ml (53 nM) und eine Farbstoffkonzentration von 0,2 nmol/ml. Nach der Zufuhr der fünffachen VEGF Menge entstand eine Konzentration von 12 µg/ml (318 nM).

Durch das Zuführen von ungekoppelten VEGF verringerte sich im Vergleich zur Kontrolle die Fluoreszenz in den Zellen. Entsprechend der früheren Untersuchungen wurde für das IRDye 800CW – VEGF eine deutlich höhere Fluoreszenz festgestellt.

4. Diskussion

Mit Hilfe der Molekularen Bildgebung lassen sich biologische Prozesse auf zellulärer Ebene sichtbar machen. Wissenschaftlich erprobt werden die Verfahren, die sich noch im Experimentierstadium befinden, derzeit unter anderem in der Diagnostik von Krebserkrankungen (Wessels et al. 2007). Solche Verfahren haben das Ziel einer frühzeitigen spezifischen Detektion von pathologischen Veränderungen auf molekularer Ebene. Voraussetzung dafür ist die Entwicklung neuer Kontrastmittel (Pauwels et al. 2007, Matuszewski et al. 2007, Schmitz 2003). Pathogen veränderte Zellen verfügen über einen veränderten Stoffwechsel und eine veränderte Genaktivität. Beispielsweise werden Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsmolekülen verändert auf der Zelloberfläche expremiert (Bazan-Peregrino et al. 2007). Die molekulare Veränderungen sind Basis für die Entwicklung spezifischer Kontrastmittel (Delikatny et al. 2005).

Um Stoffwechselforgänge in Zellen sichtbar zu machen, stehen heute schon nuklearmedizinische Methoden, wie beispielsweise die Positronen – Emissions – Tomographie (PET) unter Verwendung des Kontrastmittels ^{18}F -Fluorodeoxyglukose (FDG) oder Fluorothymidin, zur Verfügung (Margolis et al. 2007). Das Verfahren liefert allerdings nur geringe morphologische Informationen. Daher überprüfen Forscher derzeit, ob die MRT sowie optische Verfahren für die molekulare Bildgebung eine bessere Auflösung liefern können. Die Magnetresonanztomographie (MRT) hat gegenüber anderen bildgebenden Verfahren den Vorteil, dass ohne eine Strahlenbelastung für Patienten gearbeitet werden kann. Zusätzlich ist die Ortsauflösung der MRT bis zum heutigen Zeitpunkt noch unerreicht (Seemann 2005). Neue Kontrastmittel in der MRT haben die Aufgabe, die Nachweisgrenzen zu senken und gleichzeitig die Selektivität zu erhöhen, um frühzeitig eine Tumorentstehung bzw. Tumorausbreitung zu erkennen (Wang et al. 2001, Lorusso et al. 2005).

Ein mögliches Ziel für die Detektion einer Tumorausbreitung ist die Verfolgung der Angiogenese mit Hilfe der Molekularen Bildgebung. Die Angiogenese spielt eine essentielle Rolle für das Wachstum und die Metastasierung von malignen Tumoren (Hawighorst 2002).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden verschiedene Eisenoxidnanopartikel in-vitro hinsichtlich ihrer Struktur und Größe, ihrer unspezifischen und spezifischen Aufnahme, ihrer Toxizität sowie ihrer Nachweisbarkeit im MRT und ihrer Lokalisation

in der Zelle charakterisiert. Es musste nicht nur eine Selektion geeigneter Eisenoxidnanopartikel erfolgen, sondern auch eine Auswahl der passenden Zielstruktur stattfinden. Für eine Visualisierung der Angiogenese sollte das molekulare Ziel leicht zugänglich sein, aber gleichzeitig eine entsprechend hohe Expression aufweisen (Bradbury et al. 2005). Deshalb wurde die Expression von Oberflächenmarkern in sechs verschiedenen Zelllinien untersucht und das Konjugat mit den vielversprechendsten in-vitro Ergebnissen anschließend in-vivo getestet.

Zusätzlich zu den Eisenoxidnanopartikelkonjugaten wurden verschiedene Fluoreszenzkonjugate, bestehend aus Cy Farbstoffen, IRDye 800CW Farbstoff bzw. Quantum Dots hergestellt und untereinander verglichen.

Das Wirtschaftsministerium Schleswig Holstein förderte in dem Projekt „Molecular Imaging in the North – MOIN“ die Arbeiten, die in Zusammenarbeit mit verschiedenen Universitätsinstituten in Kiel entstanden.

4.1. Eisenoxidnanopartikel

Unspezifische, niedermolekulare Gadolinium (Gd)-haltige MRT Kontrastmittel werden für die Diagnostik insbesondere von Blutgefäßen verwendet (Weinmann et al. 1984). Leider verursachen sie auch Nebenwirkungen. So kann ihre Applikation zu einer nephrogenen systemischen Fibrose (NSF) und akuten Nierenschäden führen (Penfield et al. 2007). Weniger Nebenwirkungen lassen Eisenoxid-haltige Kontrastmittel erwarten (Weissleder 1991). Eisenoxidnanopartikel haben darüberhinaus wesentlich stärkere magnetische Wirkungen als Gadolinium Verbindungen und eignen sich daher besser für die MRT-Bildgebung (Neuwelt et al. 2004). Spezifische Anwendungen gehen oftmals, wie auch in der vorliegenden Arbeit, mit einer intrazellulären Aufnahme des entsprechenden Kontrastmittels einher. Bezüglich toxikologischer Aspekte bieten die Eisenoxid – basierenden Substanzen ebenfalls Vorteile. Nach dem Abbau der Partikel im Körper wird das freiwerdende Eisen dem körpereigenen Eisenpool hinzugefügt (Weissleder et al. 1989). Die Freisetzung des Schwermetalls Gadolinium aus seinem Komplex, beispielsweise durch Temperatur-, pH Wert oder Ionenkonzentrationsveränderungen, ist dagegen toxisch (Sharma et al. 2006). Das freie Gadolinium bindet an Serumproteine und verbleibt schließlich fest und irreversibel in den Knochen.

Reine magnetische Eisenoxidnanopartikel, die als Diagnostika in der

Kernspintomographie in Frage kommen, aggregieren in wässriger Lösung bei neutralem pH Wert. Durch Umhüllen der Magnetkerne mit geeigneten Substanzen gelingt es, die Balance der Kräfte zwischen den Partikeln so zu verschieben, dass die thermische Energie (Brownsche Molekularbewegung) der Aggregation entgegenwirkt (Horak et al. 2007).

4.1.1. Aufnahme der Partikel in die Zellen

Unmodifizierte Eisenoxidnanopartikel wurden in der Vergangenheit unter anderem für die Markierung von Monozyten (Zelivyanskaya et al. 2003), Gliomazellen und Makrophagen (Moore et al. 1997) sowie von Oligodendrozyten Verläuferzellen (Franklin et al. 1999) verwendet. Durch große Mengen an Makrophagen in arteriosklerotischen Plaques konnte durch die Ansammlung von Eisenoxidnanopartikel eine Visualisierung im MRT erreicht werden (Kooi et al. 2003). Ultrakleine Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (USPIO) sind für eine Perfusions Bildgebung, beispielsweise vom Gehirn oder von Myokardiale ischämische Krankheiten prädestiniert (Bonnemain 1998). Die Perfusions-MRT bei Hirntumoren dient der Einstufung und der besseren Abgrenzung in der Diagnostik und der prätherapeutischen Planung. Weiterhin kann der Verlauf nach Chemo- oder Strahlentherapie in Kombination mit einer operativen Therapie optimiert werden (Essig et al. 2007).

In einer Reihe von Versuchen wurden in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme und Abgabe von verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln untersucht.

Der hydrodynamische Durchmesser von Nanopartikeln differiert in der Regel zwischen 10 und 500 nm (Van Beers et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit wurden Eisenoxidnanopartikel im Größenbereich von 20 bis 850 nm in einer Eisenkonzentration von 300 µg/ml eingesetzt, um die Aufnahme in U118 Gliomazellen und HUVEC's zu untersuchen. In der Vergangenheit sind für in-vitro Markierungen von humanen Monozyten Eisenkonzentrationen von 100 bis 3700 µg/ml verwendet worden (Oude Engberink et al. 2007), wobei für Eisenkonzentrationen im Bereich von 2000 µg/ml die Bildung von freien Radikalen, ein Abfall der Zellproliferation, sowie ein beginnendes Absterben von Zellen dokumentiert wurde (van den Bos et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit ist deshalb eine vergleichsweise niedrige Eisenkonzentration von 300 µg/ml gewählt worden. Die Aufnahme der untersuchten Eisenoxidnanopartikel erfolgte größtenteils unabhängig

von der Zelllinie. In allen in-vitro Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien zeigten die beiden Microspheres die stärkste Aufnahme, die im Vergleich zu Resovist mehr als doppelt so hoch war. Die Partikel Resovist, B102 und das kolloidale Fe_3O_4 positionieren sich bezüglich der Eisenaufnahme im Mittelfeld, während keines der Nanomag Partikel (N20, N70 und N100) in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Resovist hat sich bereits als sicher und effizient für eine Detektion von Lebermetastasen erwiesen (Kopp et al. 1997). Dabei färbt das Partikel die Leber, mit Ausnahme der Metastasen, dunkel an (Taupitz et al. 2003). Von dem B102 und dem kolloidalen Fe_3O_4 ist dagegen nur sehr wenig bekannt.

Die durchgeführten Experimente verdeutlichten, dass die verschiedenen Eisenpartikel in zwei große Hauptgruppen einzuordnen sind. Die Partikel der ersten Gruppe wurden von den Zellen schnell und stark aufgenommen. Sie eignen sich durch ihre unspezifische Aufnahme besonders gut zur Markierung von Zellen in-vitro. Anschließend kann mittels MRT der Weg der Zellen im Körper gut verfolgt werden („Cell Tracking“) (Wu et al. 2006). Durch diese Technik ist ein tieferer Einblick in die Dynamik der in-vivo Zellbiologie möglich (Bulte et al. 2004). Die Eisenpartikel der zweiten Gruppe, die von den Nanomag Partikeln repräsentiert werden, sind mindestens ebenso interessant. Sie werden von den Zellen kaum oder gar nicht aufgenommen, so dass eine spezifische Aufnahme bzw. Bindung durch den Einsatz einer Konjugation mit einem Antikörper bzw. Rezeptorliganden möglich ist (Strijkers et al. 2007).

Die Microspheres, die zur o.g. ersten Gruppe gehören, verfügen statt der Dextranhülle über eine Polystyrolhülle. Mit einer Eisenkonzentration im Medium von 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnte ein Eisengehalt von 30 bis 35 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen erreicht werden. Dies entspricht fast den Maximalaufnahmen bei bekannten Experimenten. Beispielsweise bewirkte eine Inkubation mit Streptavidin tragenden Eisenoxidnanopartikeln in Ratten T-Zellen ein Eisengehalt von 60 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen (Shapiro et al. 2007). Dabei wurde allerdings die starke Partikelaufnahme durch einen biotinylierten CD5-Antikörper erreicht, der spezifisch für die T-Zellen ist. Anschließend war nach einer Injektion der T-Zellen eine Visualisierung von Entzündungsherden durch eine Zellanreicherung möglich (Yeh et al. 1995). In Monozyten konnte mit SPIO's ebenfalls eine Eisenaufnahme von 50 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen erzielt werden (Metz et al. 2004).

Eine zusätzliche Methode für eine verstärkte Zellmarkierung ist die Mischung von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln mit Transfektionsreagenzien, die

durch elektrostatische Interaktionen gebildet wird (Kalish et al. 2003). Zu den Transfektionsreagenzien gehören Dendrimere (Zhang et al. 2000), Lipofectamin (Arbab et al. 2004) und Poly-L-Lysin (PLL).

Da die Partikelaufnahme von beiden Microspheres in den Versuchen sehr ähnlich war, ist wahrscheinlich nicht der um über 500 nm unterschiedliche Durchmesser zwischen ihnen, sondern die Polystyroloberfläche ein Kriterium für die Aufnahme in die Zellen. Für Ratten konnte bereits eine sehr schnelle Aufnahme in Leber, und teilweise in Lunge und Milz, beobachtet werden (Ogawara et al. 1999). Dabei bewiesen besonders die Kupfferschen Zellen der Leber ein starkes Aufnahmeverhalten.

Eisenoxidnanopartikel mit einem höheren Durchmesser zeigen sehr häufig eine stärkere Eisenaufnahme in den Zellen als kleinere Eisenoxidnanopartikel (Chouly et al. 1996). Mit größeren Eisenoxidnanopartikeln ist es möglich mehr Eisen pro aufgenommenes Partikel in die Zelle zu transportieren. Allerdings sind auch diesem Vorgang Grenzen gesetzt. Partikel über 1000 nm im Durchmesser sind zu groß für eine Aufnahme in nicht-phagozytären Zellen (Rejman et al. 2004). Während der Untersuchungen wurden zwei Wege der Endozytose festgestellt. Die Clathrin-vermittelte Internalisierung zeigte in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Rejman eine Größenbegrenzung von 200 nm. Dagegen wurden Partikel bis zu einer Größe von 1000 nm über den Caveolae-vermittelten Weg aufgenommen.

Die Eisenoxidnanopartikel der ersten Gruppe wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Aufnahme untersucht. Zur Feststellung der Konzentrationsabhängigkeit wurden die Eisenoxidnanopartikel in vier verschiedenen Eisenkonzentrationen im Bereich von 50 bis 300 µg/ml eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Partikelaufnahme entsprechend der eingesetzten Eisenkonzentration im Medium anstieg. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Versuchen, mit ähnlichen Eisenoxidnanopartikel in Konzentrationen von 10 bis 1000 µg Fe/ml, überein (Matuszewski et al. 2005).

Resovist wurde in den Versuchen bei geringer Konzentration verhältnismäßig schwach aufgenommen, wohingegen besonders das kolloidale Fe₃O₄, aber auch die anderen verwendeten Eisenoxidpartikel, eine deutlich geringere Abhängigkeit von der Konzentrationshöhe aufwiesen. Das, im Gegensatz zu den anderen Partikeln, ohne einen organischen Stabilisator hergestellte kolloidale Fe₃O₄ ist für den Einsatz in geringen Eisenkonzentrationen am besten geeignet. Berry et al. haben 2004

festgestellt, dass hüllenlose kolloidale Partikel von Zellen ebenso aufgenommen werden, wie Partikel, die über eine Dextranhülle verfügen. In der vorliegenden Arbeit war die Aufnahme des kolloidalen Fe_3O_4 im Vergleich zu Resovist sogar erleichtert. Für höhere Eisenkonzentrationen (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ist aber wieder eine vergleichbare Aufnahme zu erkennen. Offenbar wird das Maximum der möglichen Aufnahme für das kolloidale Fe_3O_4 schneller erreicht, als das für Resovist.

Vergleichbare Eisengehalte, wie die in der vorliegenden Arbeit festgestellten, konnten auch in Fibroblasten (Sun et al. 2005) und Lungen- oder Brustkrebszellen (Matuszewski et al. 2005) bestimmt werden. Unspezifische Eisenoxidnanopartikel wurden bereits für die MRT Bildgebung von Knochenmark (Simon et al. 2005) und von zirrhotischer Leber, Prostatakrebs und MR Lymphangiographie (Margolis et al. 2007) eingesetzt.

Um das Optimum der Aufnahme festzustellen, wurde in dieser Arbeit die Zeitabhängigkeit im Bereich von 12 bis 48 Stunden untersucht. Dabei zeigte sich für alle Partikel ein Maximum zwischen 24 und 36 Stunden. Eine Sättigung der Eisenoxidnanopartikel-Aufnahme nach 24 Stunden konnte beispielsweise in Prostatatumorzellen schon nachgewiesen werden (Kalambur et al. 2007). Eine längere Inkubation mit den Eisenoxidnanopartikeln bewirkte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit einen Abfall des Eisengehaltes. Dies könnte bedeuten, dass die Ausscheidung der Eisenoxidnanopartikel erhöht war. Allerdings sollte die Eisenkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Medium mindestens ein Gleichgewicht erreichen, falls das Maximum der Aufnahme erreicht war. Der Abfall der gemessenen Eisenkonzentration ist wahrscheinlich auf eine einsetzende Toxizität zurückzuführen. Die anhaltende Inkubation mit Eisenoxidnanopartikeln bewirkte offenbar ein Überschreiten der Aufnahmekapazität der Zellen (Pioletti et al. 1999). Da die Aufnahme unspezifisch war und somit nicht reguliert werden konnte, setzte wahrscheinlich nach 36 Stunden eine toxische Wirkung ein.

Für die Eisenoxidnanopartikel der ersten Gruppe ist es wichtig, dass sie zum Einen stark von den Zellen aufgenommen werden und zum Anderen lange in den Zellen verweilen ohne deren Proliferation zu beeinflussen (Valable et al. 2007). Eine längere Verweildauer gewährleistet ein größeres Zeitfenster für die Verfolgung der mit Eisenoxidnanopartikel beladenen Zellen. Deshalb wurden zusätzlich Abgabekinetiken aufgenommen. Nach Inkubation mit den Eisenoxidnanopartikeln wurden die U118 Gliomazellen mit PBS mehrmals gewaschen und mit reinem

Medium weiterinkubiert. Über einen Zeitraum von 15 Tagen wurde der zelluläre Eisengehalt quantitativ ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Eisenoxidnanopartikel unterschiedlich stark abgegeben wurden. Die Zellen schieden B102 wesentlich schneller aus als das Resovist. Eine Markierung von mesenchymalen Stammzellen mit Resovist konnte nach fünf Wochen noch nachgewiesen werden (Ittrich et al. 2005). Eine verhältnismäßig starke Ausscheidung wiesen auch die beiden Microspheres auf. Allerdings war der zu Beginn aufgenommene Eisengehalt bei ihnen auch deutlich höher. Daher waren die Zellen wahrscheinlich besonders bestrebt, das stark überschüssige Eisen zu entfernen. Der prozentuale Anteil der Ausscheidung war für Resovist und für das kolloidale Fe_3O_4 mit ungefähr 40% am geringsten, gefolgt von den Microspheres mit über 50%. Die extreme und nach 15 Tagen vollständige Ausscheidung der B102 Partikel schränkt deren mögliche Nutzung für ein „Cell Tracking“ ein.

Bis heute ist die mit am bedeutendste Anwendung von Eisenoxidnanopartikeln die Markierung und Verfolgung der Makrophagenaktivität, beispielsweise für die Stadieneinteilung von Leber- und Lymphknotenkrebs (Bulte et al. 2004). Weiterhin wurde die Zellwanderung von Vorläuferzellen mittels MRT untersucht (Sawada et al. 2007). Eisenoxidnanopartikel, die von sich nicht teilenden mesenchymalen Stammzellen aufgenommen wurden, konnten sogar noch nach sieben Wochen detektiert werden (Arbab et al. 2003). Durch Zellteilungen wird die Ausscheidung von Eisenoxidnanopartikel wesentlich beschleunigt.

Im Gegensatz zu den Partikeln der ersten Gruppe werden Nanopartikel der zweiten Gruppe zur spezifischen Markierung von pathophysiologisch relevanten Zellen bzw. Molekülen eingesetzt. Die Partikel werden von den Zellen kaum oder gar nicht aufgenommen, so dass eine spezifische Aufnahme oder Bindung mit Hilfe der Kopplung an Antikörpern bzw. Peptiden möglich ist. Außer einer hohen Affinität und Spezifität sollten diese Eisenoxidnanopartikel durch eine hohe Relaxivität gekennzeichnet sein (Artemov 2003).

In den Untersuchungen zeigten alle verwendeten Nanomag Partikel (N20, N70 und N100), trotz unterschiedlichem Durchmesser, eine extrem geringe unspezifische Aufnahme. Dies lässt vermuten, dass im Größenbereich von 20 bis 100 nm der Durchmesser der Partikel von geringerer Bedeutung ist, als die Hüllenzusammensetzung, da andere, gleich große Eisenoxidnanopartikel, wie Resovist oder B102 mit unterschiedlicher Hülle, von allen verwendeten Zelllinien

stark aufgenommen wurden.

4.1.2. Lokalisation der Eisenoxidnanopartikel

Lichtmikroskopische Eisenfärbung und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden verwendet um festzustellen, ob nur eine Bindung der Partikel an der Zelloberfläche vorliegt oder eine Internalisierung stattgefunden hat (Shi et al. 2007, Mowat et al. 2007). Partikel, die an der Oberfläche verbleiben und nicht internalisiert werden, behindern wahrscheinlich die Zelloberflächeninteraktionen, lassen sich von den Zellen leicht wieder ablösen und können auf andere Zellen transferiert werden (Bulte et al. 2004). Lichtmikroskopische Eisenfärbungen bestätigten die im Abschnitt 4.1.1. beschriebenen quantitativen Eisenbestimmungen der verschiedenen Eisenoxidnanopartikel hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Aufnahme. Durch dieses Verfahren kann jedoch keine endgültige und gesicherte Aussage darüber getroffen werden, wo die verschiedenen Eisenoxidnanopartikel zellulär lokalisiert sind. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Bei dieser Methode werden Schnitte von in Araldit eingebetteten Zellen untersucht, wobei nachgewiesen werden konnte, dass die Eisenoxidnanopartikel von den Zellen internalisiert wurden. Eine Internalisierung hat nicht nur den Vorteil, dass die Markierung der Zellen durch die Partikel viel stabiler und langanhaltender ist, als dies eine Bindung an der Zelloberfläche leisten könnte, sondern es ermöglicht auch eine stärkere Beladung der Zellen. Der Mechanismus von hüllenlosen sowie hüllentragenden Partikeln ist sehr wahrscheinlich die Endozytose (Berry et al. 2004). Dabei spielen die Rho Proteine eine wichtige Rolle (Ridley 2001). In der vorliegenden Arbeit befanden sich die Eisenoxidnanopartikel im Zytoplasma der Zellen, was mit den Erkenntnissen von Daldrup-Link et al. (2003) übereinstimmt. Es konnte dagegen keine Aufnahme im endoplasmatischen Retikulum, Mitochondrien, Golgi Apparat oder aber im Kern nachgewiesen werden. Außerdem wurde deutlich, dass Resovist, B102 und das kolloidale Fe_3O_4 sich innerhalb der Zellen aneinander lagern. Offenbar verloren sie während der Aufnahme wenigstens teilweise ihre Partikelhülle. Ein Zusammenbruch der Partikelhülle während der Internalisation konnte bereits für mehrere dextranumhüllte Partikel beobachtet werden (Jordan et al. 1996). Dagegen sind die Microspheres in den Abbildungen noch voneinander getrennt. Ihre Polystyrolhülle wird wahrscheinlich während der Aufnahme zumindest nicht vollständig zerstört bzw. aufgelöst. Dies könnte auch den leicht höheren toxischen

Effekt gegenüber Resovist oder B102 erklären, der in Abschnitt 4.1.4. thematisiert wird. Weiterhin sind für die Microspheres unterschiedlich große Eisenoxidnanopartikel in den Abbildungen zu erkennen, was besonders für das M 310 nm gilt. Dies kann entweder auf einen Herstellungsfehler hindeuten oder die Hüllen der Partikel wurden unterschiedlich stark zerstört. Da viele Partikel eine gleichmäßige runde Struktur besitzen, ist diese Erscheinung wahrscheinlich auf den Herstellungsprozeß zurückzuführen. Auch in der TEM konnte keines der Nanomag nachgewiesen werden, was die früheren Ergebnisse zur Partikelaufnahme nochmals bestätigte.

4.1.3. Nachweis der Eisenoxidnanopartikel im MRT

Für MRT-Untersuchungen musste zu Beginn gewährleistet werden, dass die einzelnen Eisenoxidnanopartikel einen Kontrast bzw. eine Verkürzung der Relaxationszeiten bewirken (Tanimoto et al. 1994). Für Eisenoxidnanopartikel überwiegt der Einfluss auf die T₂-Zeit (Taupitz et al. 2003). Entsprechend der Konzentration und der gewählten Pulssequenzen kann es bis zur kompletten Signalauslöschung kommen.

In den Untersuchungen wurden die Partikel zunächst in fünf verschiedenen Eisenkonzentrationen in 10%igem Polyacrylamidgel eingebettet. Alle untersuchten Partikel bewirkten eine deutliche Kontrastierung. Die Schwankungen zwischen den r₂ Relaxivitäten der Eisenoxidnanopartikel war im Fehlerbereich, mit Ausnahme des kolloidalen Fe₃O₄, dessen Daten sich nicht linear verhielten. Aus diesem Grund konnte für dieses Partikel kein exakter Wert ermittelt werden. Die Wirkung der Hüllengröße auf die r₂ Relaxivität wird bestimmt durch zwei konkurrierende Faktoren. Zum Einen dem physikalischen Ausschluss der Protonen von dem Magnetfeld und zum Anderen von der Verweilzeit der Protonen innerhalb des Hüllenbereiches (LaConte et al. 2007). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanomag-Partikel scheint der zweite Einflussfaktor zu überwiegen. Mit zunehmendem hydrodynamischem Durchmesser bei gleichzeitig vergleichbaren Eisenkerndurchmessern steigt die r₂-Relaxivität an, wodurch der signalmindernde Effekt im MRT und somit die Schwärzung während der Bildgebung verstärkt wird.

Die MRT-Nachweisgrenze zellulär aufgenommener Eisenoxidnanopartikel wurde im Monolayer ermittelt. Die Bildgebung erfolgte mit T₂/T₂*-gewichteten Sequenzen. Für Monolayer-Experimente wurden U118 Gliomazellen in unterschiedlicher Zellzahl im

Bereich von 1000 bis 100.000 auf PET-Membranen ausgesät. Der hervorgerufene Kontrast verhielt sich erwartungsgemäß entsprechend der eingesetzten Zellzahl. Mehr Zellen konnten auch eine größere Menge an Eisenoxidnanopartikel aufnehmen, was einen stärkeren Kontrast erzeugte. Während des Versuches wurde ebenfalls erkannt, dass bereits eine Zellzahl von 5000 ausreichend war, um einen markanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen zu erhalten, was die Empfindlichkeit widerspiegelt. Matuszewski et al. haben im Jahr 2005 eine Detektionsgrenze von 10.000 Zellen von einem vergleichbaren Eisenoxidnanopartikel, das ebenfalls wie Resovist eine Carboxyldextranhülle aufwies, nachgewiesen. Die Zellen für diese 1,5 Tesla MRT-Untersuchungen wuchsen allerdings nicht als Monolayer, sondern wurden vor der Messung in Agarose eingebettet. Für diese Vorgehensweise mussten die Zellen zentrifugiert werden, wodurch es zu einer Abnahme der vitalen Zellen bzw. der intrazellulären Eisenkonzentration gekommen sein kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich auch die verschiedenen Nanomag-Partikel mit der höchstmöglichen Zellzahl von 100.000 getestet. Trotz der Empfindlichkeit des MRT-Verfahrens konnte kein verstärkter Kontrast gegenüber den Kontrollen festgestellt werden.

4.1.4. Toxizität

Durch den Einsatz von Nanomaterialien in Größenbereichen von 100 nm oder weniger können einige spezifische chemische oder biologische Interaktionen mit der Umgebung auftreten, wodurch eine potentielle Toxizität generiert werden kann (Nel et al. 2006). Effekte auf das biologische System werden durch die geringe Größe, Oberflächenstruktur, Größenverteilung, sowie durch die chemische Zusammensetzung, wie beispielsweise der Reinheit, kristalline Struktur und elektrischen Eigenschaften, hervorgerufen (Oberdörster et al. 2005). Auch die Oberflächenstruktur und Oberflächenreaktivität, sowie die Löslichkeit und mögliche Aggregationen können einen erheblichen Einfluss auf die zellulären Stoffwechsel nehmen, beispielsweise durch die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Colvin 2003). Zwar ist Dextran für einen direkten zytotoxischen Effekt nicht bekannt, jedoch kann die Internalisierung der Eisenoxidnanopartikel einen Zusammenbruch der Dextranhülle bewirken. Die hieraus gebildeten Aggregate könnten Einfluss auf den Zellprozess nehmen (Jordan et al. 1996).

Aufgrund einer massiven Partikelinternalisation kann es zu einer Induktion der Apoptose kommen (Pioletti et al. 1999), sowie zu Abweichungen in der Zellmorphologie und zu einem Abfall in der Zellmobilität (Berry et al. 2004).

Eine mögliche zelluläre Toxizität durch die verwendeten Eisenoxidnanopartikel wurde mit Hilfe der Freisetzung des zytologischen Enzyms LDH sowie über die Proliferation (CyQuant Test) bestimmt. Der LDH-Test offenbarte für alle Eisenoxidnanopartikel nur eine schwach toxische Wirkung. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Partikeln waren minimal. Alle untersuchten Eisenoxidnanopartikel besitzen somit eine vergleichbare Toxizität wie das bereits in der Medizin zugelassene Resovist. Allerdings wurde die Toxizität nicht über einen Zeitraum von 24 Stunden hinaus untersucht. Daher ist ein späteres Einsetzen des toxischen Effekts aufgrund einer unkontrollierten Eisenaufnahme durch die Flüssigphasen-Endozytose denkbar.

Der CyQuant-Test bestätigte die Ergebnisse des LDH-Testes. Alle getesteten Eisenoxidnanopartikel verursachten eine verminderte Zellzahl. Dies könnte entweder auf eine wachstumshemmende Wirkung durch eine Beeinflussung des Zellzykluses oder auf ein beginnendes Zellsterben durch einen zu hohen intrazellulären Eisengehalt zurückzuführen sein. Da der vorher durchgeführte LDH-Test eine geringe Konzentration der Laktatdehydrogenase im Medium feststellte und dieses Enzym nur nach einer Schädigung der Zellmembran ins Medium gelangen kann (Arechabala et al. 1999), ist ein teilweises Absterben der Zellen zumindest beteiligt.

Das Microsphere M 850 nm zeigte einen deutlich höheren Einfluss auf die Proliferation als das Microsphere M 310 nm. Beide Partikel besitzen nach der Aufnahme in den Zellen zumindest teilweise noch ihre Polystyrolhülle, wie im Abschnitt 4.1.2. bereits aufgezeigt wurde. Besonders die größeren Microspheres (M 850 nm) scheinen einen störenden Effekt zu besitzen.

Von den Nanomag Partikeln bewies das N100 die geringste inhibierende Wirkung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit steigendem Durchmesser die toxische Wirkung fällt (Nel et al. 2006). Die Größe der Partikel bestimmt unter anderem die Art und Anzahl der Zellinteraktionen, wodurch ein toxischer Effekt induziert werden könnte (Donaldson et al. 2002). Beispielsweise kann eine Verkleinerung der Partikelgröße zu diskontinuierlichen Kristallebenen führen und somit einen Anstieg der strukturellen Defekte, sowie eine Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften hervorrufen. Zusätzlich bewirkte ein 64 nm großer Partikel im Vergleich zu 202 nm und 525 nm großen Partikeln eine erhöhte intrazelluläre

Calciumkonzentration, eine gesteigerte LDH Konzentration im Medium, sowie eine vermehrte Radikalbildung (Brown et al. 2001).

Die Microspheres besitzen zwar einen wesentlich größeren Durchmesser als die anderen untersuchten Eisenoxidnanopartikel, verfügen allerdings gleichzeitig über eine andere Hüllenzusammensetzung, so dass weitere Faktoren, außer der Größe, die Toxizität beeinflussen. Dazu zählen beispielsweise die kristalline Struktur, die Oberflächenreaktivität oder auch die Löslichkeit der einzelnen Partikel (Nel et al. 2006).

Vertegel et al. konnten dagegen sogar zeigen, dass mit steigendem Durchmesser eine beschleunigte Proteindenaturierung auf der Partikeloberfläche zu strukturellen und funktionellen Veränderungen führen kann. Die Größe der Nanopartikel beeinflusst, wahrscheinlich aufgrund der Oberflächenkrümmung, die Struktur und Funktion von absorbierten Proteinen auf der Partikeloberfläche (Vertegel et al. 2004). Insgesamt jedoch waren alle untersuchten Eisenoxidnanopartikel nur gering zytotoxisch.

4.1.5. Auswahl einer geeigneten Zielstruktur

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Visualisierung der Angiogenese zur Verfolgung des Tumorwachstums. Zum Erreichen dieses Vorhabens musste eine geeignete Zielstruktur gewählt werden. Dafür wurden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR insgesamt sechs verschiedene Zelllinien auf die Expression der VEGF-Rezeptoren-1 und -2, Endoglin (ein membranständige Glykoprotein, welches Bestandteil des TGF β Rezeptorkomplexes ist; Oxmann et al. 2008) und hPECAM (ein einsträngiges Glykoprotein, dass besonders an der Zellmembran von Zellen vorkommt, die mit dem Gefäßsystem in Verbindung stehen; Woodfin et al. 2007) untersucht. Erwartungsgemäß war die Expression dieser Marker wesentlich stärker in den Endothelzellen als in den Tumorzellen. Zusätzlich besitzen Endothelzellen nach Injektion eines Kontrastmittels in die Blutbahn den Vorteil der direkten, barrierefreien Zugänglichkeit (Trachsel et al. 2006). Aus diesen zwei Gründen wurde sich in dieser Arbeit auf die Endothelzellen konzentriert. In den HUVEC's konnte die stärkste Expression aller untersuchten Oberflächenmarker detektiert werden, weshalb sie für die in-vitro Untersuchungen der konjugierten Eisenoxidnanopartikel Verwendung fanden. In verschiedenen Arbeiten ist dem VEGFR-2 eine Schlüsselrolle während der Angiogenese von Tumoren zugeschrieben worden

(Carmeliet 2005), weshalb es als Ziel für die spezifische Markierung ausgewählt wurde.

Während der Untersuchungen mit den HUVEC's musste allerdings beachtet werden, dass höhere Subkultivierungen ein verändertes Expressionsmuster ergeben. Bereits nach der zehnten Subkultivierung wurde ein deutlicher Abfall in der Expression der Oberflächenmarkern erkennbar. Daher besaßen die für die in-vitro Versuche verwendeten HUVEC's nur acht oder weniger Subkultivierungen.

4.1.6. Eigenschaften der Nanomag-Eisenoxidnanopartikel

Für eine spezifische Markierung müssen die Eisenoxidnanopartikel eine möglichst minimale unspezifische Aufnahme aufweisen, damit ein möglicher Erfolg der Kopplung und eine anschließend Bindung an die Zielstruktur auch detektiert werden kann. Für diese Zielsetzung kamen aufgrund ihrer Eigenschaften nur die Nanomag Partikel in Frage.

Vor der Konjugation wurden die Strukturen der drei Nanomag Partikel mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Durch die PCS konnte der vom Hersteller angegebene Partikeldurchmesser überprüft werden. Das N100- sowie das N70-Partikel hatten den erwarteten Durchmesser. Während beiden Messungen wurde auch nur ein Peak detektiert, was ebenfalls auf eine Monodispersivität hindeutet. Dagegen sind für das Partikel N20 zwei Peaks detektiert worden. Einen sehr großen Peak, der 99% der Gesamtintensität beinhaltet und einen durchschnittlichen Durchmesser von 132 nm repräsentiert, sowie einen zweiten Peak, weniger als 1% der Gesamtintensität, für den ungefähr der zu erwartenden Partikeldurchmesser von 15 nm ermittelt wurde. Es kam offenbar zu einer Zusammenlagerung der N20 Partikel, da noch ein minimaler Überrest von nicht aggregierten Partikeln detektiert werden konnte. Die verschiedenen Nanomag-Partikel wurden anschließend zusätzlich in der TEM analysiert. Dabei zeigten nicht nur die N20, sondern auch die N70 Partikel eine Aggregation. Der Durchmesser der gebildeten Aggregate lag zwischen 100 und 500 nm. Da die TEM Versuche nach dem PCS Analysen durchgeführt wurden, ist anzunehmen, dass für diese Partikel mit der Zeit eine zunehmende Aggregation auftrat. Die Halbwertszeit von sechs Monaten war zwar nicht überschritten, aber der beginnenden Zerfall der Partikel bzw. die partielle Degradation der Dextranhülle waren vielleicht trotzdem die Ursache für

diese Aggregation. Dieses Verhalten ist natürlich für in-vivo Versuche nicht akzeptabel. Die Aggregate könnten Ausmaße annehmen, die beispielsweise zu einer Verengung von Blutgefäßen führen würde. Möglich ist auch, dass die aggregierten Partikel eine erfolgreiche Konjugation verhindern.

In beiden Analyseverfahren wurde keine Aggregation der N100 Partikel festgestellt. Vielleicht ist dies auf eine geringfügige Veränderung der Partikelhülle zurückzuführen, die jedoch vom Hersteller nicht explizit beschrieben wurde. Nach Rücksprache mit der Herstellungsfirma Micromod konnte geklärt werden, dass die Partikel N20 und N70 im Gegensatz zu dem N100 zu Aggregationen neigen. Aus diesem Grund wurden die anschließenden Konjugationen nur mit den N100-Partikeln durchgeführt.

4.1.7. Eisenoxidnanopartikelkonjugat

Die molekulare Bildgebung ist ein schnell wachsendes Feld mit dem Ziel der Visualisierung von pathologischen-veränderten Zielstrukturen (Bulte et al. 2004).

Beispielsweise konnte der Her-2/neu Rezeptor, ein Mitglied der EGF Familie, aufgrund seiner Expression in verschiedenen Tumorarten durch einen Avidin – Gadolinium Komplex und einen biotinylierten anti-Her-2/neu Antikörper visualisiert werden (Artemov et al. 2003), wodurch der Tumorstatus bestimmt werden konnte. Weiterhin wurde für die Thrombusdiagnostik das RGD-Peptid, einem Zelladhäsionspeptid, das in der Thrombusbildung eine Rolle spielt, als Oberflächenbestandteil von Eisenoxidnanopartikeln verwendet (Johansson et al. 2001).

Auch der Umstand, dass in einigen Tumoren eine Korrelation zwischen der Anzahl der apoptotischen Zellen und dem Tumorwachstums festgestellt wurde (Meyn et al. 1995), konnte für eine molekulare Bildgebung bereits genutzt werden. Durch die Konjugation der C₂-Domäne des Synaptotagmin-I mit einem superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel wurde eine Bindung an die Plasmamembran von apoptotischen Zellen erreicht. Somit konnte der Einfluss von verschiedenen chemotherapeutischen Mitteln im MRT verfolgt werden (Zhao et al. 2001).

Wadghiri et al. war es 2003 möglich, die Amyloid-beta (Abeta) Plaques der Alzheimer Erkrankung im Gehirn von transgenen Mäusen zu detektieren, indem das Abeta1-40, das eine hohe Affinität gegenüber Abeta zeigt, magnetisch markiert wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanomag-Partikel zeigten im Vergleich zu einer Reihe anderer Eisenoxidnanopartikel mit Abstand die geringste unspezifische Aufnahme, sowie eine vergleichbar gute Relaxivität während der MRT Messungen. Die Kopplung der Nanomag-Partikel erfolgte über deren Dextranhülle durch den Einsatz von Bromcyan (Abbildung 4.1.). Die zwischenzeitlich entstandene, reaktive Imidogruppe reagierte mit den Aminogruppen der Peptide. Die Kopplung von Peptiden oder Antikörpern wurde anschließend mit Hilfe des „Dot-Spot-Testes“ überprüft.

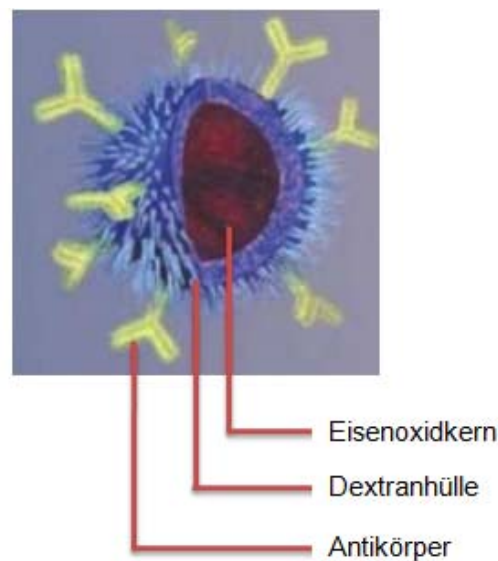


Abbildung 4.1.: Eisenoxidnanopartikel mit konjugierten Antikörpern

Nach einer Kopplung mit Peptiden wurde außerdem die biologische Aktivität des Liganden untersucht, um eine Reaktivität der Konjugate sicherzustellen.

Das VEGF bewirkt die Aktivierung einer der bekanntesten Signalweg-Familien, der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Die einzelnen Kinasen der Signalkaskade können in Gruppen eingeteilt werden. Die Kinasen p42/44 bzw. ERK1/2, p38MAPK, JNK/SAPK und ERK5 werden allgemein als MAPK bezeichnet. Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch die Phosphorylierung zweier Aminosäuren, die sich in einem für die jeweilige Gruppe charakteristischen Motiv befinden. Die Spezifitäten der aktivierenden Proteine werden durch typische Erkennungssequenzen gewährleistet und die Inaktivierung der MAP-Kinasen wird durch parallel induzierte MAPK-Phosphatasen reguliert.

Beispielsweise wird der ERK-Signalweg (extracellular regulated kinases), bestehend aus den beiden Isoformen ERK1 (p44) und ERK2 (p42), durch eine Vielzahl von

Mitogenen, osmotischen Stress und Zellkontakten sowie durch Wachstumsfaktoren (zum Beispiel VEGF), Zytokine und im Rahmen viraler Infektionen aktiviert (Arbabi et al. 2002, Johnson et al. 2002). Nachfolgend wird das Signal über raf-Proteine sowie die MAP-Kinase Kinasen MEK1 und MEK2 bis zu den ERK-MAP-Kinasen weitergegeben. Wichtige Funktionen der ERK sind die Beteiligung bei der Regulierung von Zellteilung und Proliferation (Seger et al. 1995, Chang et al. 2001).

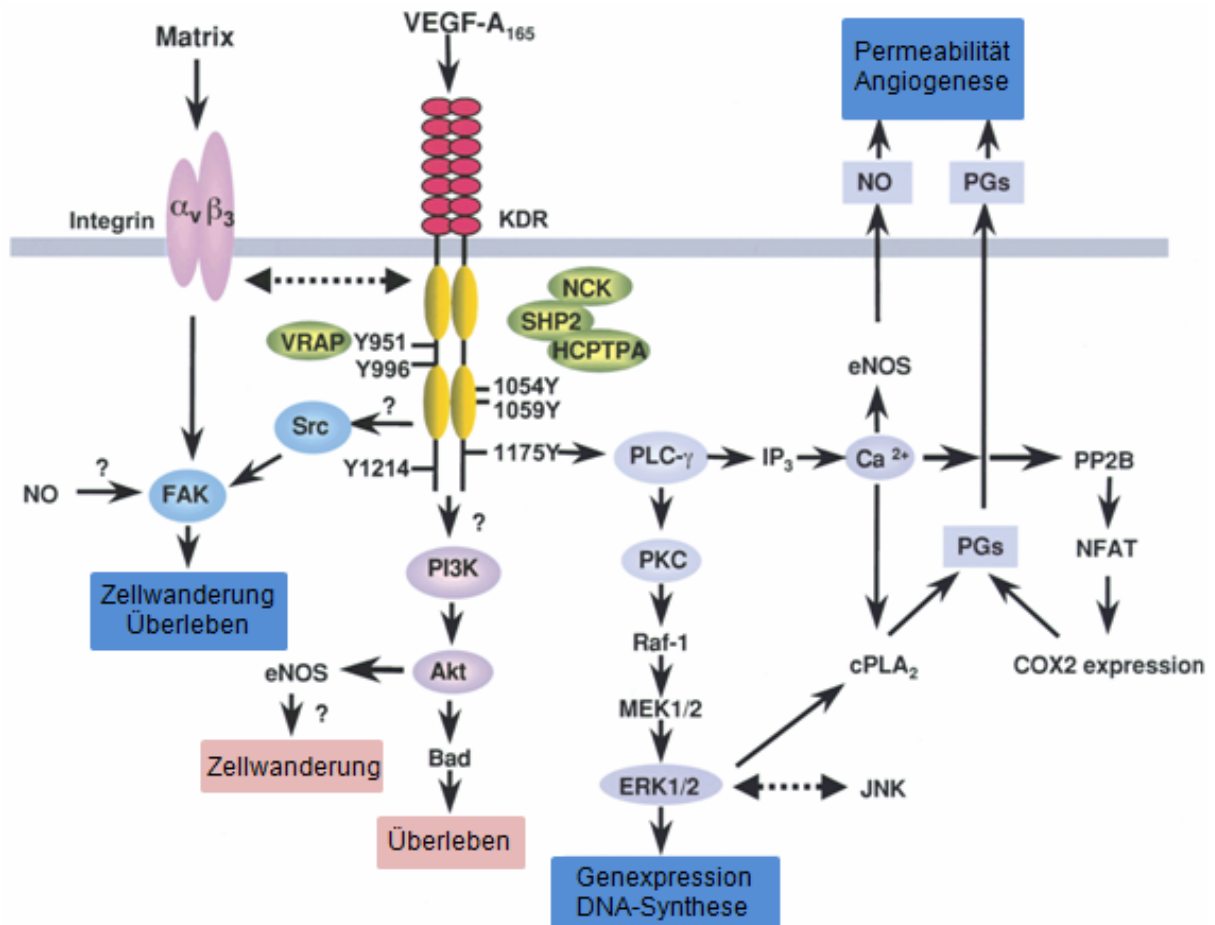


Abbildung 4.2.: Signalkaskade des VEGF-Rezeptors-2 (Zachary 2003).

Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde durch Western Blot nach Stimulation überprüft. Das N100-VEGF Konjugat verstärkte gegenüber den Kontrollen ähnlich wie die Positivkontrolle (10 ng/ml VEGF) die entsprechenden Banden. Dies beweist eine biologische Aktivität des an den Nanomag-Partikeln gebundenen VEGF. Der Durchmesser der verschiedenen Konjugate wurde durch den Einsatz der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt (Hupfeld et al. 2006). Dabei zeigte sich für alle Konjugate ein gering erhöhter Partikeldurchmesser gegenüber dem unkonjugierten N100. Durch die Konjugation veränderte sich die Größe der

Eisenoxidnanopartikel aber nur sehr wenig, da ein Antikörper nur einen Durchmesser von ungefähr 5 nm besitzt und das VEGF sogar nur ungefähr 0,5 bis 1 nm groß ist. Somit bewirkte die Konjugation keine Aggregationen.

In weiteren Versuchen wurde die Aufnahmekinetik der Konjugate untersucht. Zu diesem Zweck wurden HUVEC über einen Zeitraum von insgesamt vier Stunden mit dem N100-VEGF bzw. N100-Albumin Konjugat inkubiert. Der Eisengehalt in den Zellen stieg durch das N100-VEGF Konjugat im Laufe der ersten Stunde schnell an, um sich anschließend in den nächsten drei Stunden nur noch schwach zu erhöhen und schließlich zu stagnieren. Das Aufnahmemaximum war somit nach einer Stunde nahezu erreicht. Dagegen bewirkte das N100-Albumin Konjugat nur eine sehr schwache Aufnahme. Die Eisenaufnahme des spezifischen Konjugates war 10 bis 15fach stärker als die entsprechende Kontrolle.

In früheren Arbeiten wurde bereits der Antikörper anti-CD11c mit Eisenoxidnanopartikeln konjugiert (Ahrens et al. 2003). CD11c gehört zur Familie der β 2-Integrinen. Es handelt sich dabei um einen Rezeptor, der hauptsächlich für die Herstellung von intrazellulären Kontakten verantwortlich ist und dabei von Gewebemakrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird (Klein et al. 1994, Kumasaka et al. 1996). Bulte et al. konnten mit Hilfe des anti-CD11c Konjugates eine 50fache Erhöhung der Eisenaufnahme gegenüber unkonjugierten Eisenoxidnanopartikeln erzielen. Der mehr als doppelt so hohe Faktor zwischen spezifischer und unspezifischer Kopplung gegenüber den Konjugationen der vorliegenden Arbeit könnte unter anderem auf das verwendete Eisenoxidnanopartikel zurückzuführen sein. Weiterhin wurde von Ahrens et al. wahrscheinlich unkonjugierte Eisenoxidnanopartikel als Bezugspunkt ausgewählt, und nicht, wie in dieser Arbeit, das Albumin Konjugat, von dem eine geringfügige Aufnahme festgestellt wurde.

Die dargestellte stärkere Partikel- bzw. Eisenaufnahme der HUVEC's gegenüber den bEnd3 Zellen lässt sich mit der erhöhten Expression der VEGF Rezeptoren in den HUVEC's erklären. Weiterhin konnte in den Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Antikörperkonjugate, wie beispielsweise das VEGFR-2 Antikörperkonjugat, eine um ungefähr 20% geringere Aufnahme zeigen, als vergleichbare Ligandkonjugate (N100-VEGF). Durch die Internalisierung der Liganden ist eine höhere Anreicherung der Eisenoxidnanopartikel möglich.

Die verschiedenen Konjugate wurden aber nicht nur quantifiziert, sondern auch visualisiert. Durch die Eisenfärbung und besonders durch die

Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die N100-VEGF Konjugate sich hauptsächlich in Vesikeln innerhalb der Zellen befinden, im Gegensatz zu den an der Zelloberfläche befindlichen N100-anti-VEGFR-2-Konjugaten. Nach der Bindung des Antikörpers erfolgte keine Internalisierung ins Zellinnere. Wollte man dies erreichen, müssten die Zellen zusätzlich mit VEGF inkubiert werden. Eine Internalisierung der Eisenoxidnanopartikel ermöglicht einen größeren Eisengehalt in den Zellen. Eine oberflächliche Bindung ist nicht nur dem Blutstrom ständig ausgesetzt, sondern präsentiert die Eisenoxidnanopartikel zusätzlich für eine mögliche Aufnahme durch Makrophagen, wodurch das MRT Signal gestreut und verfälscht werden würde (Bulte et al. 2004).

Die anschließenden Experimente konzentrierten sich auf die Detektionsmöglichkeiten der Eisenoxidnanopartikelkonjugate im MRT. Hierfür wurden die Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen N100-Konjugaten in 10% Polyacrylamid eingebettet und die Bildgebung mittels T2/T2*-gewichteten Sequenzen erreicht. Mit Hilfe einer zuvor aufgenommenen Eichgeraden konnte der Eisengehalt in den Zellen bestimmt werden. Es herrschte ein strenger linearer Zusammenhang zwischen den R2*-Messwerten des MRTs und der Anzahl der markierten Zellen (Pintaske et al. 2006). Allerdings wurden in der Vergangenheit auch unterschiedliche Regressionsgeraden für verschiedene Zelltypen festgestellt (Rad et al. 2007). Daher muss für jede Zelllinie die genaue Abhängigkeit bestimmt werden. Das im MRT festgestellte Aufnahmeverhalten der Konjugate war mit den vorherigen Untersuchungen vergleichbar. Die VEGF- und anti-VEGFR-2-Konjugate sind deutlich besser aufgenommen worden, als die entsprechenden Kontrollkonjugate mit Albumin bzw. Ig G. In weiteren MRT-Experimenten wurden als Monolayer wachsende Zellen untersucht, wodurch die biologischen Bedingungen von Endothelzellen nachgestellt werden konnte. Mit Hilfe der PET-Membranen, die im MRT keinen Kontrast verursachen (Heneweer et al. 2006), wurden HUVEC's mit verschiedenen N100-Konjugaten getestet. Das Verhältnis zwischen dem anti-VEGFR-2-Konjugat bzw. dem VEGF-Konjugat und den entsprechenden Kontrollen konnte dabei bestätigt werden. Aufgrund der vertikal ausgerichteten Schnittrichtung während der MRT-Messungen war die kontrastbildende Fläche zu klein, um mit der vorhandenen Softwareausrüstung eine quantitative Eisenbestimmung vorzunehmen. Da die HUVEC's nicht zu einer 100%igen Konfluenz anwachsen, wurde die Detektion der sehr dünnen Zellschicht zusätzlich erschwert. Eine Messung mit horizontal

ausgerichteter Schnittrichtung war aufgrund des sehr geringen Durchmessers der PET-Membran nicht möglich.

Die verschiedenen in-vitro Untersuchungen ergaben, dass das N100-VEGF-Konjugat die mit Abstand beste Eignung für eine molekulare Bildgebung in-vivo besitzt. Von den untersuchten Eisenoxidnanopartikeln zeigten nur die Nanomag Partikel eine äußerst geringe unspezifische Aufnahme. Zwar ist von kleineren Eisenoxidnanopartikeln in-vivo eine geringere unspezifische Aufnahme, beispielsweise von Makrophagen, zu erwarten (Raynal et al. 2004, Metz et al. 2004), allerdings zeigten diese Partikel (N20 und N70) eine Tendenz zur Aggregatbildung.

4.1.8. Erprobung der Eisenoxidnanopartikelkonjugate in-vivo

Die Entwicklung von intelligenten Kontrastmitteln mit ausreichender Spezifität und Sensitivität zur Detektion spezieller Zelltypen für mögliche klinische Studien im MRT haben erst begonnen (Delikatny et al. 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein tumorspezifisches Kontrastmittel für die MRT im Tiermodell zu erproben. Sehr kleine Tumore sollten über ihre Angiogenese mit ausreichendem Bildkontrast erfasst werden können. Aufgrund der mit der Nuklearbildgebung vergleichbar geringen Sensitivität der MRT ist eine verhältnismäßig hohe Konzentration des Kontrastmittels erforderlich (Artemov 2003). In den in-vivo MRT-Versuchen kann jedoch die spezifische Bildgebung eines Tumors in anatomischen Strukturen analysiert werden (Strijkers et al. 2007).

4.1.8.1. In-vivo Untersuchung von Resovist, N20 und N70

In einem ersten Vorversuch wurden die Partikel Resovist, N20 und N70 unkonjugiert in jeweils zwei gesunde Mäuse injiziert. Das bereits klinisch eingesetzte Leberkontrastmittel Resovist bewirkte erwartungsgemäß in beiden Mäusen eine sofortige Schwärzung der Leber, welche nach 24 Stunden nur wenig zurückging (Savranoglu et al. 2006). Somit ist die Ausscheidung des Resovist als gering einzustufen. Injektionen der unkonjugierten N20 und N70 Partikel zeigten dagegen sehr unterschiedliche Eisenaufnahmen durch die Leber. Jeweils eine der zwei Mäuse demonstrierte eine starke Aufnahme, dagegen konnte für die zweite Maus keine Schwärzung der Leber detektiert werden. Nach der Tötung der Mäuse wurden in allen vier Mäusen makroskopische Nekrosen festgestellt. Für die beiden Mäuse, die Resovist injiziert bekommen hatten, wurde dies nicht beobachtet, so dass eine gute

Verträglichkeit in-vivo anzunehmen ist. Eine mögliche Erklärung für die Wirkung des N20 und N70 Partikels ist die Zersetzung der Dextranhülle, wodurch es zur Aggregationen gekommen sein kann, wie dies bereits mittels PCS und TEM in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel, die frei in der Blutbahn zirkulieren oder sich im Extrazellulärraum befinden, zeigen im Wesentlichen die unter in-vitro Bedingungen bestimmten MRT-Eigenschaften. Nach einer intrazellulären Aufnahme, beispielsweise in die Kupfferschen Zellen der Leber, steigt allerdings der signalmindernde Effekt der superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel zusätzlich an (Oswald et al. 1997, Fleige et al. 2002). Dadurch wird die Schwärzung der Leber nochmals verstärkt. Geringe Unterschiede in der Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln in-vivo könnten somit zu größeren Unterschieden während der Detektion im MRT führen. Die Phagozytose erfolgt in der Leber generell für größere Partikel schneller und vollständiger als für kleinere (Raynal et al. 2004). Die Endozytose der Makrophagen wird über den Scavenger Rezeptor SR-A vermittelt (Raynal et al. 2004). Die größenabhängige Aufnahme könnte eine von mehreren Ursachen sein, weshalb für das N70-Partikel, das einen Durchmesser von 70 nm aufweist, größere Schwankungen in den MRT-Messungen zwischen den beiden Mäusen verzeichnet wurden, als für das N20-Partikel. Zusätzlich hängt die Aufnahme der Eisenoxidnanopartikel teilweise von der Verteilung und Funktionsfähigkeit der Kupfferschen Zellen bzw. der Milz-Makrophagen ab. Auch diese biologischen Parameter müssen bei den verwendeten Mäusen nicht gleich gewesen sein. Die unterschiedliche Schwärzung der Leber der einzelnen Mäuse kann auch auf eine unterschiedliche Menge an gespritzten Eisenoxidnanopartikeln hindeuten. Allerdings war der Unterschied so markant, dass ein Fehler während der Injektion in dieser Größenordnung fast auszuschließen ist, weil ein deutliches Anschwellen an der Injektionsstelle angezeigt hätte, dass die Schwanzvene während der Injektion nicht exakt getroffen wurde. Die gespritzten Lösungen waren gleich alt. Vor Entnahme aus der Ausgangslösung und vor der Injektion wurde die Injektionslösung leicht geschüttelt, so dass eine weitgehend gleichmäßige Durchmischung gegeben war. Daher sollte das Verhalten im MRT vergleichbar sein. Der extreme Unterschied der Leberschwärzung kann auch durch eine falsche Wahl der MRT Parameter erklärbar sein, wobei allerdings für die Versuche ein standardisiertes Programm verwendet wurde. Wahrscheinlich sind die unterschiedlichen Messdaten das Resultat mehrerer

der oben aufgeführten ungünstigen Umstände.

Weiterhin können Unterschiede in den einzelnen MRT-Messungen auf Veränderungen in den Proteinen- bzw. Enzymaktivitäten, Metaboliten- und Metallionenkonzentrationen, sowie im pH-Wert und der Temperatur zurückzuführen sein (Yoo et al. 2008). Durch den Verlust der Dextranhülle und die nachfolgende Aggregationen könnten die Eisenoxidnanopartikel auch von anderen Organen als der Leber, wie beispielsweise der Niere und der Milz, abgefangen worden sein. Dazu ist keine Aussage möglich, da nur die Leber in den MRT Messungen analysiert wurde. Aufgrund der großen Variabilität der Ergebnisse ist keine gesicherte Aussage über das in-vivo Verhalten der beiden Partikel, N20 und N70, möglich. Weitere Versuche wurden aufgrund der Unverträglichkeiten und der Tendenz zur Aggregation nicht durchgeführt.

4.1.8.2. HT-29-Tumormodell

Als Tumormodell wurde ein Lebermetastasenmodell verwendet, das den Vorteil hatte, die Tumore bzw. Metastasen in einem homogenen, sonst weitgehend störungsfreien, da luffreien, Gewebe detektieren zu können (Oliva et al. 2004, Braga et al. 2004). Die histologische Struktur der Leber besteht aus Hepatozyten, Lebersinusoiden (Kapillaren der Leber), Ito-Zellen, sowie Makrophagen (Kupfferschen Zellen). Ein breites Spektrum an gutartigen und bösartigen Leberläsionen können aus diesen verschiedenen Zellen ihren Ursprung haben (Bassalamah et al. 2007). Auch für eine spätere klinische Anwendung sind Lebermetastasen von großem Interesse, da sie relativ häufig vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 verwendet, die sich für Analysen des Lebermetastasen-Mechanismus in der Vergangenheit als nützlich erwiesen hat (Ishizu et al. 2007, Price et al. 1989). In Deutschland ist Darmkrebs bei Männern und Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung, an der mehr als sechs Prozent aller Deutschen im Laufe ihres Lebens erkranken. Kolorektale Karzinome verursachen zunächst sehr selten Symptome, da sie fast immer aus anfangs gutartigen Darmpolypen entstehen. Erst wenn der Tumor in größerem Maße blutet, oder wenn er das Darmlumen nennenswert einengt, kommt es zu Symptomen (Schulmann et al. 2002). Die Tumorzellverschleppung erfolgt über die Pfortader, so dass hämatogene Metastasen in der Leber auftreten (Yorozuya et al. 2005). Die invasiven und metastasierenden Eigenschaften der

Kolonkarzinomzelllinie sind mit der Expression der Cyclooxygenase (COX-2) verknüpft (Chen et al. 2001). Die Expression des Plasminogen-Aktivators uPA korreliert mit der Metastasenkapazität der Tumorzellen. Die Bildung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) hängt mit der Tumorentwicklung zusammen (Wang et al. 2003). Bei Patienten mit Verdacht auf ein Kolonkarzinom ist die präoperative Bildgebung immens wichtig, um die Ausbreitung des Tumors und eine eventuelle Metastasierung festzustellen und so die weiteren Therapiemöglichkeiten abschätzen zu können.

4.1.8.3. Expression des VEGFR-1 und -2 in Lebermetastasen

Vor den in-vivo Untersuchungen der Angiogenese von Lebermetastasen wurde die Expression des VEGF-Rezeptor-1 und -2 in Gewebeproben untersucht. Die Gewebeproben stammten zum Einen aus HT-29 metastasierten und zum Anderen aus gesunden Lebern, wobei letztere als Negativkontrollen eingesetzt wurden. In der quantitativen RT-PCR wurden Primer für Mausrezeptoren eingesetzt, da trotz der humaner Tumorzelllinie HT-29 die neugebildeten Gefäße aus Mausendothelzellen hervorgingen. Die Extraktion der RNA war besonders für das metastasierte Gewebe schwierig, weil die zähen Strukturen kaum zerkleinert und homogenisiert werden konnten. Der Tumor war nach fünf Wochen sehr weit fortgeschritten und das nekrotische Gewebe hatte sich bereits extrem ausgebreitet.

Durch die stetige Volumenvergrößerung des Tumors wurde das Zentrum nekrotisch und die Gefäße konnten nur noch in den Randbereichen detektiert werden. Ishizu et al. zeigten, dass nach 30 Tagen Tumorstadium der HT-29 Zellen die stark metastasierte Leber im Vergleich zu der gesunden Leber nur gering an Masse zugenommen hatte (Ishizu et al. 2007).

Aufgrund des großen Anteils an nekrotischen Gewebe waren wahrscheinlich auch die Ct-Werte der mGAPDH unverhältnismäßig hoch, was eine exakte Bestimmung der mVEGF-Rezeptoren-1 und -2 sehr erschwerte.

Die delta Ct Werte für das metastasierte Gewebe waren mit einem Mittelwert von 4,3 für den VEGF-Rezeptor-1 und 5,8 für den VEGF-Rezeptor-2 für eine Gewebeextraktion verhältnismäßig klein, was auf eine hohe Expression hindeutete. Die delta Ct-Werte für die gesunden Mäuse waren zwar größer, es konnte jedoch für die Expression von dem VEGF-Rezeptor-2 nur ein Unterschied um den Faktor 3,3 festgestellt werden, während die VEGF-Rezeptor-1 Expression um den Faktor 14

beeinflusst wurde.

Die hohe Expression der VEGF-Rezeptoren in den gesunden Mäusen ist möglicherweise auf eine Entzündung zurückzuführen (Zhao et al. 2004).

Während der Immunhistochemie konnte ein starkes Fortschreiten der Metastasenausdehnung in der Leber festgestellt werden. Nach fünf Wochen Wachstum war in den Gewebeschnitten kaum gesundes Gewebe zu erkennen. Die Expression des mVEGF-Rezeptor-1 und -2 in den Metastasen wurde deutlich nachgewiesen, wohingegen die gesunde Leber nur eine geringe Braunfärbung und somit eine niedrige Expression der mVEGF-Rezeptoren zeigte.

4.1.8.4. In-vivo Untersuchung des N100-VEGF-Konjugates

Das zuvor eingehend in-vitro untersuchte und optimierte N100-VEGF-Konjugat ist völlig neu und es existieren noch keine in-vivo Daten. Das VEGF-N100-Konjugat sollte in der Lage sein, die für den Tumor bereits in einer sehr frühen Phase lebensnotwendige Einwanderung von Blutgefäßen (Angiogenese) zu erfassen (Abbildung 4.3.).

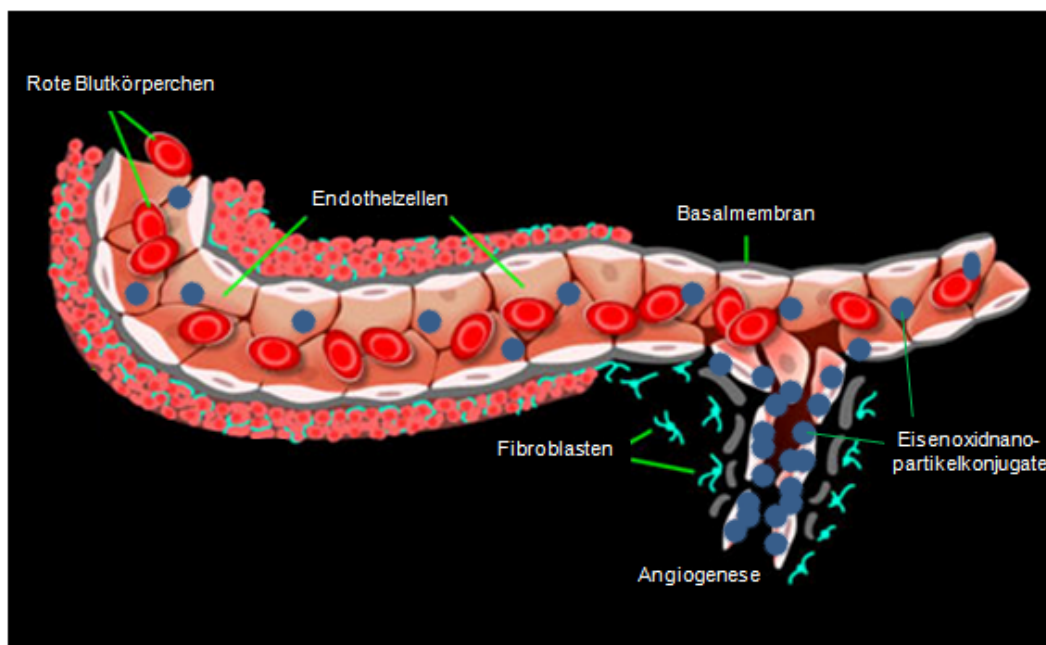


Abbildung 4.3.: Detektion der Angiogenese durch Eisenoxidnanopartikelkonjugate

Zunächst musste in-vivo die Verteilung, sowie die Sensitivität des N100-VEGF-Konjugates in einer gesunden Maus untersucht werden, um später im nächsten Schritt, d.h. der Injektion des Konjugates in eine tumortragende Maus, eine bessere

Aussage hinsichtlich der Effektivität des Konjugates treffen zu können.

In dem Versuch wurden drei gesunde SCID Mäuse das N100-VEGF-Konjugat injiziert. Die Partikel waren nach fünf Minuten annähernd vollständig von der Leber aufgenommen, da der Kontrast in der Aorta nach dieser Zeit fast auf das Niveau vor der Injektion zurückgegangen war, während die Leber eine anhaltende starke Schwärzung zeigte. Die Abnahme des Kontrastes in der Aorta stimmt zeitlich mit der Zunahme des Kontrastes in der Leber überein, so dass man annehmen muss, dass der Großteil der Eisenoxidnanopartikel von der Leber aufgenommen wurde. Die sehr schnelle Aufnahme des Konjugates war nicht nur wegen der vorausgehenden in-vitro Untersuchungen überraschend, sondern auch weil das N100-Hüllenmaterial Dextran für gewöhnlich über eine lange Zirkulationszeit verfügt (Moore et al. 2000). Durch die rasche Aufnahme der Eisenoxidnanopartikel in der Leber, vermutlich durch die Kupfferschen Zellen, nahm die intravasale Eisenkonzentration schnell ab.

Während der Untersuchung der Verweildauer der Eisenoxidnanopartikel in der Leber wurden für die o.g. drei Mäuse sehr unterschiedliche Eisenausscheidungen festgestellt, von einer vollständigen Ausscheidung schon nach sechs bis neun Tagen bis hin zu einer Maus, die noch nach 12 Tagen Eisenoxidnanopartikel in ihrer Leber besaß. Briley-Saebo et al. zeigte für andere Partikel mit Dextranhüllen in Rattenlebern eine Halbwertszeit von acht Tagen, für Partikel mit einer Carboxydextranhüllen 10 Tage und 14 bis 29 Tage für Partikel, die über eine Stärkehülle verfügten (Briley-Saebo et al. 2006). Die Halbwertszeit des verwendeten N100-VEGF-Konjugates betrug zwischen fünf und neun Tagen. Mögliche Ursachen für die ungleiche Eisenausscheidung der einzelnen Mäuse könnte eine unterschiedlich gespritzte Eisenmenge, aber auch teilweise auf Abweichungen während der MRT-Messung zurückzuführen sein. Der Fehler während der MRT-Messung liegt generell zwischen 10 und 20%. Das MRT ist von einer Reihe Einflussfaktoren abhängig, beispielsweise der Homogenität des Untersuchungsgewebes, dem Zugang zum Wasser bzw. dem Wassergehalt des Gewebes, dem Elektronenspinstatus der einzelnen Atome sowie der gewählten MR-Frequenz (Yoo et al. 2008). Das Untersuchungsorgan Leber verfügt im Vergleich zu anderen Organen bzw. Regionen des Körpers über eine ausgeprägte Homogenität, die eine Messung mit den MRT vereinfacht. Außerdem stören keine Luftareale, wie sie in Lunge, Magen oder Darm vorkommen. Der Wassergehalt in der Leber der einzelnen Mäuse sollte aufgrund der identischen Haltung vergleichbar sein, jedoch

sind einzelne individuelle Unterschiede denkbar. Für alle MRT-Versuche wurde ein optimiertes MRT-Programm verwendet, so dass sämtliche Experimente mit der gleichen MR Frequenz durchgeführt wurden.

Die verwendete Eisenmenge von 50 µg war um den Faktor 6,25 höher als die in der Klinik eingesetzte Eisenmenge von Resovist bezogen auf das Gewicht der Maus. Eine Maus mit einem Gewicht von 20 bis 25 g besitzt ein Blutvolumen von 4 ml, wobei allerdings nur 2 ml im Umlauf sind und der Rest sich im Gewebe befindet. Durch die Injektion von 50 µg Eisen entstand im Blut eine Konzentration von ungefähr 25 µg Fe/ml. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten in-vitro Untersuchungen der verschiedenen Konjugate wurde eine Eisenkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Aufgrund der starken Schwärzung der Leber waren die MRT-Daten in den ersten Tagen nicht auswertbar. Die Eisenkonzentration wurde für diesen Versuch deshalb so hoch angesetzt, weil für das anschließende Experiment mit einer tumortragenden Maus genügend Eisenoxidnanopartikelkonjugate für eine spezifische Bindung zur Verfügung stehen sollten. Damit hätten sich die Chancen für eine spezifische Detektion der Lebermetastasen erhöht. Die Empfindlichkeit des MRTs erfordert aber eine Minimierung der eingesetzten Eisenmenge in in-vivo Versuchen auf höchstens 10 µg. Mit einer geringeren Eisenmenge reduziert sich ebenfalls die unspezifisch aufgenommene Eisenmenge so stark, dass sich nach Veränderungen des Hüllenmaterials, zum Beispiel durch PEG (Polyethylenglycol), die Blutverweildauer erhöhen würde und somit eine bessere Unterscheidung zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung erreicht werden könnte.

Polyethylenglykol (PEG) verhindert durch die Abschirmung antigener Strukturen die Erkennung von körperfremden Oberflächen durch Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES), das die Gesamtheit aller Zellen bezeichnet, die zu Phagozytose und Speicherung von Stoffen bzw. Partikeln befähigt sind. Somit wird einer schnellen Entfernung der Partikel aus dem Blut und ihrer Anreicherung in Leber und Milz entgegengewirkt. Zusätzlich wird eine Reduzierung der proteolytischen Degradation, sowie eine Verminderung der renalen Filtration durch das Ansteigen des Partikeldurchmessers erreicht (Roberts et al. 2002). Die Grundeinheit einer linear gebauten PEG Kette, die eine hohe Flexibilität aufweist, besteht aus Monomeren (-CH₂-CH₂-O-). Chemisch handelt es sich dabei um einen Polyether des Glykols Ethandiol, an den zwei bis drei Wassermoleküle pro Ethylenglykoleinheit binden. PEG ist sowohl in Wasser und als auch in vielen organischen Lösungsmitteln gut

löslich und wird als toxikologisch unbedenklich eingestuft (Klinke et al. 2005).

Als zusätzlicher Faktor für eine rasche Partikelaufnahme kommt hinzu, dass die Phagozytose in der Leber im Allgemeinen für größere Partikel schneller und vollständiger abläuft, als für kleinere Partikel (Raynal et al. 2004). Mit abnehmender Partikelgröße verlängert sich somit die intravasale Verweildauer. Aus diesem Grund war das N100 für die Konjugation möglicherweise nicht optimal geeignet. Allerdings konnten die N20 und N70 Partikel aufgrund ihrer Aggregation und daraus resultierenden Unverträglichkeit in-vivo nicht für die Konjugation eingesetzt werden.

Weiterhin sollte ein Durchmesser unterhalb von 200 nm ausreichend sein, eine Ansammlung der Partikel in der Milz zu verhindern und ein Durchmesser im Bereich von 100 bis 200 nm sollte vor einem Wegfangen im hepatischen Parenchym schützen (Moghimi et al. 2001).

Die Partikeloberfläche spielt eine große Rolle während der Entwicklung von superparamagnetischen Partikeln für in-vivo Anwendungen. Sie sollte eine Stabilisierung der Partikel unter physiologischen Bedingungen ermöglichen, funktionelle Gruppen besitzen und einer schneller Erkennung und Aufnahme der Partikel durch das Retikuloendotheliale System (RES) entgegenwirken.

Als Hüllenmaterial für die Partikel wird Dextran, aber auch Stärke (Lind et al. 2002), Chitosan (Wang et al. 2007), Gelatine (Coester et al. 2006), Albumin (Roser et al. 1998), Folsäure (Zhang et al. 2002) Lipide (Yu et al. 2000), Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) (Panyam et al. 2003), sowie Polystyrol (Ogawara et al. 1999) verwendet. Die Chitosan Nanopartikel besitzen ohne weitere Modifizierungen Aminofunktionen auf der Oberfläche und sind aufgrund der biologischen Abbaubarkeit für in-vivo Anwendungen geeignet. Das natürlich biologisch abbaubare Polymer Gelatine wird als Hüllenmaterial für Nanopartikel eingesetzt, die anschließend als Trägermodell für die gezielte Medikamentenzufuhr in dendritischen Zellen benutzt werden (Coester et al. 2006).

Weiterhin wären Lipidhüllen eine Möglichkeit für eine Erhöhung der Verweildauer der Partikel im Blut. Die längste Zirkulationszeit im Blut zeigen Liposomen mit einem Durchmesser von 160 bis 220 nm (Awasthi et al. 2003). Mit Hilfe eines Fibrin-gerichteten Kontrastmittels, das über eine Lipidhülle verfügte, konnte eine Detektion eines Thrombus erreicht werden (Yu et al. 2000). Häufig werden liposomale Partikel auch als Trägersubstanzen für Medikamente (Hong et al. 2001) oder DNA (Choi et al. 2004) eingesetzt.

Lipid-basierende Nanopartikel sind bezüglich ihrer Größe und Zusammensetzung leicht manipulierbar. Durch die mögliche Einführung von Lipiden mit unterschiedlichen spezifischen Gruppen sind verschiedene Konjugationen denkbar. Der amphipatische Charakter der Lipide ermöglicht die Löslichkeit des hydrophoben Eisenoxidpartikels (Mulder et al. 2006). Allerdings zeigen diese Partikel in der Regel eine hohe unspezifische Aufnahme, so dass eine selektive Markierung schwierig ist und eine Verwendung für „Cell Tracking“ Versuche geeigneter erscheint (Vuu et al. 2005). Die Kombination von Lipidhülle mit PEG bewirkt zwar eine erhöhte Zirkulationszeit im Blut (Immordino et al. 2006) und eine deutliche Minimierung der Aufnahme, trotzdem ist die unspezifische Bindung noch deutlich höher als die von den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanomag-Partikel. Weiterhin wurde in Versuchen mit Ratten und Affen gezeigt, dass eine zweiten Injektion von PEG tragenden Liposomen wenige Tage nach der Ersten eine deutliche Verkürzung der Zirkulationszeit zu Folge hat (Dams et al. 2000). Offenbar ist dies auf einen opsonisierenden Faktor zurückzuführen, der während der ersten Injektion gebildet wird und - sollte die nächste Injektion in der kommenden Woche erfolgen - eine verstärkte Opsonisierung bewirkt. Daher ist ein Einsatz über einen längeren Zeitraum schwierig.

Als eine weitere polymere Beschichtung ist Citrat möglich (Taupitz et al. 2004). Die Partikel konnten bereits über eine Stunde nach Injektion im Blut nachgewiesen werden. Allerdings zeigen mit Citrat umhüllte Eisenoxidnanopartikel eine stärkere unspezifische Aufnahme als Partikel mit einer Carboxyldextranhülle (Fleige et al. 2002). Sogar Eisenoxidnanopartikel, die über eine Stärkehülle verfügen und für die Visualisierung von Lymphknoten eingesetzt wurden, zeigten zumindest eine Bluthalbwertszeit von 13 Minuten (Lind et al. 2002). Für beide Beschichtungen ist jedoch keine spezifische Markierung erfolgversprechend.

Heutzutage werden biologisch abbaubare oder biokompatible Partikel mit den verschiedensten Hülleneigenschaften angeboten (Ikada et al. 2000). Außer den Oberflächenfunktionalitäten OH, NH₂ oder COOH, die für eine kovalente Konjugation mit Proteinen eingesetzt werden können, gibt es zusätzlich Partikel mit kovalent gebundenen Proteinen, wie beispielsweise Avidin (Artemov et al. 2003), Streptavidin (Shapiro et al. 2007), Protein A oder Albumin (Roser et al. 1998). Auch Chelatoren wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) können kovalent auf der Partikeloberfläche zur

Komplexierung von Metallionen gebunden sein. Weiterhin ist ein positives Oberflächenpotential durch N^+R_3 Gruppen oder ein negatives Oberflächenpotential durch COOH oder SO_3H Gruppen realisierbar.

Anionische Nanopartikel zeigen eine hohe Affinität zur Zellmembran, wodurch es zu einer dreifach höheren Aufnahme kommt, als bei den gewöhnlich verwendeten dextranhüllten Eisenoxidnanopartikeln (Wilhelm et al. 2003).

Ein weiteres mögliches Hüllenmaterial ist das Chondroitin, das zu den Glycosaminoglykanen zählt. Es kommt ubiquitär im Körper vor. Die Funktion hängt stark von den Eigenschaften des gesamten Proteoglykans ab und kann sowohl strukturelle als auch regulierende Aufgaben beinhalten. Chondroitinsulfat Proteoglykane scheinen an der Apolipoprotein-E-vermittelten Lipoproteinaufnahme in Gehirnzellen beteiligt zu sein (Rapp et al. 2005). Mizellen, bestehend aus Chondroitinsulfat und Polymilchsäure, zeigen - vermittelt durch Endozytose - eine deutliche Aufnahme in Zellen (Lee et al. 2006). Nach intrazellulärer Auflösung wird auch in diesem Fall das freigesetzte Eisen in den körpereigenen Eisenpool eingeschleust. Trotzdem scheint auch dieses Hüllenmaterial ungeeignet für einen spezifischen Markierungsansatz.

Das Protein A ist ein Protein von 40 bis 60 kDa Größe, das in der Lage ist, die Fc-Region von Immunglobulinen, vor allem von IgG, zu binden. Das Bakterium *Staphylococcus aureus* schützt sich so vor dem Abwehrmechanismus des Immunsystems, indem die Antikörper falsch herum (mit der schweren Kette) an die Zellwand binden, so dass es vor Opsonisierung und Phagozytose geschützt ist. Diese Eigenschaft könnte für Nanopartikel übernommen werden. Eine Vorinkubation mit IgG könnte eine vor dem Immunsystem schützende Hülle aufbauen. Nach der Injektion würden die Partikel nur gering phagozytiert werden. Allerdings tötet das Protein A die B-Lymphozyten, die eine wichtige Rolle während der Immunabwehr gegen bakterielle Infektionen spielen (Goodyear et al. 2003). Die Unterdrückung der B-Zell-Antwort könnte zu neuen Therapien bei Autoimmunerkrankungen führen (Viau et al. 2005), wobei eine weitere Verwendung schwierig ist. Außerdem ist die spezifische Markierung bestimmter Zelltypen sehr schwer, da selbst nach einer erfolgreichen Konjugation mit einem Liganden die anschließenden Bindungen von IgG wahrscheinlich eine sehr starke Abschirmung bewirken, so dass der Ligand an der speziellen Zielstruktur kaum noch binden kann.

Aber nicht nur der Partikeldurchmesser und die reine Hüllenzusammensetzung der

Partikel beeinflussen die Aufnahme in die Zellen. Die Art und Menge der absorbierten Plasmaproteine sowie auch deren Verhältnis untereinander besitzen eine entscheidende Bedeutung für die Verteilung einer Nanopartikelsuspension im Körper. Es existieren Plasmaproteine, die die Interaktion mit dem RES beschleunigen und als Oponine bezeichnet werden. Sie bilden eine Verbindung zwischen dem Partikel und den Zellen des RES und fördern dadurch die Phagozytose (Frank et al. 1991). Dazu gehören unter anderem IgG, Proteine des Komplementsystems, wie beispielsweise C1q und C3, Fibronectin, Thrombospondin, sowie das Fibrinogen (Szebeni 1998, Moghimi et al. 2001). Das Fibrinogen verursacht zusätzlich eine Aggregation der Partikel untereinander, wodurch eine Phagozytose noch zusätzlich beschleunigt wird. Andererseits gibt es auch Plasmaproteine, die diese Interaktion negativ beeinflussen und somit dem Nanopartikel einen gewissen Schutz vor dem RES bieten. Sie bezeichnet man als Dysopsonine, wozu unter anderem das IgA und das Albumin zählen (Lück et al. 1998).

Aufgrund der schnellen Aufnahme der Eisenoxidnanopartikelkonjugate in die Leber wurden N100-Partikel mit Blutplasma, Fibrinogen (in physiologischer Konzentration) und als Kontrolle mit 0,9%iger Kochsalzlösung vermischt und mittels TEM untersucht. Das Blutplasma bewirkte eine deutliche Aggregation der N100-Partikel, wodurch eine Aufnahme durch das RES stark beschleunigt wurde und die intravasale Eisenkonzentration schnell abnahm. Bereits das Fibrinogen bewirkte eine deutliche Konzentrierung der N100-Partikel während der TEM-Untersuchung, so dass während der Aggregation im Blutplasma eine Beteiligung des Proteins anzunehmen ist. Durch die Aggregation scheint das N100 Partikel mit der derzeitigen Hüllenzusammensetzung nur für in-vitro, jedoch nicht für in-vivo Versuche geeignet zu sein.

Die Proteinadsorption wird unter anderem durch das Zetapotential des Partikels beeinflusst. Das Zetapotential ist eine relative Messgröße für das Oberflächenpotential und somit für die Ladung des Partikels. Daraus resultieren entsprechende elektrostatische Interaktionen, die einen Einfluss auf die Proteinadsorption nehmen (Yin et al. 2002). Beispielsweise erreicht ein positives Zetapotential eine Adsorption von Albumin, wodurch die Aufnahme erniedrigt und die Blutverweildauer erhöht werden konnte (Patil et al. 2007). Weiterhin nimmt der pH-Wert Einfluss auf das Zetapotential der Nanopartikel. Aber auch die Proteinladung ist abhängig vom pH Wert und dem jeweiligen isoelektrischen Punkt (IEP). So besitzt

Albumin einen IEP Wert von 4,78, wodurch das Protein in Wasser (pH 7,0) eine negative Ladung bekommt. Damit ist eine Interaktion mit einem Nanopartikel, das über ein positives Zetapotential verfügt, begünstigt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass kleinere Proteine eine höhere Sensitivität gegenüber der entsprechenden Absorptionsoberfläche besitzen als größere (Sigal et al. 1998). Die Anheftung der Proteine, beispielsweise Albumin, Fibrinogen oder γ -Globulin, konnte auch nach dem Entfernen der Proteinlösung durch Spülen nicht von der Absorptionsoberfläche gelöst werden. Das Absorptionsverhalten wird nicht nur durch elektrostatische Interaktionen, sondern auch von van-der-Waals-Kräften, hydrophobischen, hydrophilischen, strukturellen, sowie sterischen Interaktionen zwischen den Proteinen untereinander bzw. der Absorptionsoberfläche und dem jeweiligen Protein beeinflusst. Allerdings zeigt die elektrostatische Interaktion den größten Einfluss (Patil et al. 2007).

Die Interaktion von Nanopartikel mit Plasmaproteine kann außer der Opsonisierung weitere Auswirkungen hervorrufen. Beispielsweise die Beeinflussung der Blutgerinnungskaskade und der Fibrinbildung, sowie die Aktivierung des Komplementsystems (Moghimi et al. 2001). Weiterhin besteht die Oberfläche vieler Partikel aus einer großen Anzahl von Hydroxylgruppen, die möglicherweise ebenfalls zur einen Aktivierung des Komplementsystems beitragen (Moghimi et al. 2004).

Aufgrund der starken unspezifischen Partikelaufnahme in der Leber, die möglicherweise trotz veränderter Partikelgröße oder Partikeloberfläche nicht vollständig unterdrückt werden kann, ist vielleicht auch eine Veränderung des Tumormodells notwendig. Ein subkutaner Tumor ist leicht zu injizieren und gut zu verfolgen. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines Mammakarzinoms. In beiden Fällen ist eine gute Vaskularisierung unerlässlich, um eine ausreichende Zugänglichkeit der Konjugate sicherzustellen.

4.2. Fluoreszenzkonjugate

In der heutigen Zeit stehen neue optische bildgebende Verfahren auf den Prüfstand. Eines davon ist die sogenannte NIR (Near Infrared)-Bildgebung, bei der Infrarotlicht bis in den Bereich von wenigen Zentimetern tief ins Gewebe eindringen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt vier Fluoreszenzmoleküle eingesetzt. Das Quantum Dot („Jonamac Red“) und das Cy5, die knapp unterhalb 700 nm detektiert

werden; sowie das IRDye 800CW und das Cy7, die ungefähr bei 780 nm bestimmt werden. Somit liegen die letzterwähnten Fluoreszenzmoleküle deutlich im NIR-Bereich, der sich von 700 bis 900 nm erstreckt. Hier ist der Absorptionskoeffizient des Gewebes am niedrigsten, was eine maximale Eindringtiefe zu Folge hat (Hawrysz et al. 2000).

Für die Untersuchungen wurden nicht nur Fluoreszenzmoleküle, sondern auch Partikel auf Halbleiterbasis verwendet. Die etablierten Cy Farbstoffe haben sich in den letzten Jahren bewährt und dienen als Vergleichssubstanz für die Quantum Dots bzw. für das IRDye 800CW.

4.2.1. Vergleich zwischen Quantum Dot Konjugat und Cy5 Konjugat

Die NIR-Technologie erfordert von den Fluorophoren bestimmte Eigenschaften hinsichtlich hydrodynamischen Durchmessers, Absorption, Quantenausbeute, sowie Stabilität (Kim et al. 2004, Hild et al. 2008).

Die Quantum Dots können im Gegensatz zu einem Farbstoff, das nur ein enges Absorptionsspektrum aufweist, über einen sehr breiten Wellenlängenbereich angeregt werden (Han et al. 2001). Weiterhin besitzen sie ein sehr enges Emissionsspektrum, einen sehr hohen molekularen Extinktionskoeffizienten und eine hohe Quantenausbeute (Chan et al. 2002). Die Quantenausbeute schwankt entsprechend dem Lösungsmittel für organische Fluorophore zwischen 15 und 28%, während die Quantum Dots eine Ausbeute von 50 bis 90% erzielen (Frangioni 2003). Für viele organische Fluorophore führt ein breites Emissionsspektrum häufig zu einer Überlappung mit anderen Fluorophoren (Sharma et al. 2006). Im Gegensatz zu den Fluoreszenzstoffen verfügt das Quantum Dot über eine hohe Resistenz gegenüber chemischem und metabolischem Abbau, sowie gegen das Ausbleichen der Fluoreszenz (Jaiswal et al. 2003).

Die selektive Kopplung der Quantum Dots mit Peptidliganden ist über eine Verknüpfung von Amin oder Thiol Gruppen möglich (Zhou et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit verfügten die Quantum Dots über endständige Aminogruppen. Zu Beginn wurde mittels Traut's Reagenz eine Thiol Gruppe eingeführt. Anschließend erfolgte die Konjugation mit dem Peptidliganden, dem zuvor der Spacer Sulfo-SMCC angefügt wurde.

Von den in der Praxis häufig eingesetzten Cy-Farbstoffen fiel für einen Vergleich mit

dem Quantum Dot („Jonamac Red“) aufgrund der identischen Emissionwellenlänge die Wahl auf Cy5. Mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit hergestellten VEGF-Konjugates soll in späteren Versuchen das Tumorgefäßsystem visualisiert werden.

Beispielsweise wurde der Cy5.5 Farbstoff bereits mit dem EGF (epidermal growth factor) konjugiert und anschließend für die Detektion von Kopf-Hals-Karzinomzellen eingesetzt (Rosenthal et al. 2007). In einer weiteren Konjugation konnte das Chlorotoxin (CTX) erfolgreich verwendet werden. CTX bindet, nachdem es die Blut-Hirn-Schranke überwunden hat, spezifisch an Gliomazellen, jedoch nicht an normalen Gehirnzellen (Soroceanu et al. 1998). Das Cy5.5-CTX Konjugat bewirkte ein deutliches Signal gegenüber dem Hintergrund des normalen Gehirngewebes, während keine durch das Konjugat hervorgerufenen pathologischen Veränderungen auftraten (Veiseh et al. 2007). In einer anderen Arbeit wurde das Phosphatidylserin-sensitive Annexin-V mit einem Cy-Farbstoff zur Detektion der Apoptose eingesetzt (Ntziachrstos et al. 2004).

Für eine spätere in-vivo Anwendung ist es notwendig, dass das fluoreszierende Konjugat eine ausreichend lange Zirkulationsdauer aufweist. Allerdings werden die Cy-Farbstoffe durch eine Kombination von renaler Filtration und Ausscheidung in die Galle verhältnismäßig schnell aus dem Blut entfernt. Dagegen wird das Quantum Dot aufgrund des hohen hydrodynamischen Durchmessers von 25 nm kaum renal filtriert (Frangioni 2003).

Durch die lange Zirkulationszeit kommt auch eine weitere interessante Anwendung in Frage. Die Kombination der Quantum Dots mit siRNA ermöglicht eine Inhibierung eines bestimmten Proteins. Derfus et al. haben das F3 (tumor-homing Peptid), sowie die siRNA, die gegen das EGFP (enhanced green fluorescent protein) gerichtet war, mit der Oberfläche eines Quantum Dots konjugiert. Während das F3, das gegen den Oberflächenmarker Nucleolin gerichtet war (Christian et al. 2003), die spezifische Markierung ermöglichte, konnte durch die siRNA eine deutliche Fluoreszenzreduktion der EGFP transfizierten Zellen erreicht werden (Derfus et al. 2007). Statt dem EGFP könnten natürlich auch andere siRNA Sequenzen, beispielsweise eines Onkogens, verwendet werden. Dadurch wäre nicht nur eine Detektion, sondern gleichzeitig ein therapeutischer Ansatz möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Quantum Dots („Jonamac Red“) und Cy5 mit dem VEGF und - zur Kontrolle auf unspezifische Bindungen - mit Albumin gekoppelt. Bevor die Konjugate jedoch mit den HUVEC's inkubiert wurden, musste die

biologische Aktivität überprüft werden. Beide VEGF-Konjugate konnten ebenso wie die Positivkontrolle (10 ng/ml VEGF) ERK1/2 phosphorylieren, im Gegensatz zu den Albumin-Konjugaten.

Quantum Dots sind bereits für die in-vitro Markierung von Pankreastumorzellen durch die Konjugation mit einem Antikörper gegen Claudin-4 (Qian et al. 2007) oder für das „Cell Tracking“ von fluoreszierenden dendritischen Zellen eingesetzt worden (Cambi et al. 2007). Mit Hilfe von biotinylierten EGF konnte über einen auf der Oberfläche Streptavidin tragenden Quantum Dot die Detektion des EGF-Rezeptor an Zellen erfolgen (Liu et al. 2008). Streptavidin gewährleistet nicht nur eine starke Bindung, sondern auch eine geringe unspezifische Bindung (Howarth et al. 2005). Durch die modifizierbare Oberfläche der Quantum Dots wurde ebenfalls eine Verknüpfung mit ICAM-1 und VCAM-1 erreicht und mit den Konjugaten konnte anschließend in einem Rattenmodell eine erhöhte Fluoreszenz im Netzhautgefäßsystem festgestellt werden (Jayagopal et al. 2007).

Außer einer Konjugation über die modifizierbare Oberfläche ist auch eine Bindung über die Metallaffinität von Polyhistidinen (His₆ tag) möglich (Medintz et al. 2005). Beispielsweise interagiert His₆ tagged Streptavidin mit den Zink-Ionen auf der Quantum Dot Oberfläche. Anschließend kann das Streptavidin mit Hilfe eines biotinylierten Liganden verbunden und somit für eine Zellmarkierung verwendet werden. Für diese Bindungsreaktion ist die Dichte der PEG-Ketten entscheidend. Eine zu hohe Packungsdichte würde die Bindung der Polyhistidinen verhindern (Liu et al. 2008). Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass eine zu geringe PEG-Dichte die unspezifische Bindung erhöht und die Zirkulationsdauer im Blut erniedrigen würde. Eine Konjugation über die modifizierbare Oberfläche, beispielsweise über Aminogruppen, scheint deshalb geeigneter.

Unkonjugierte Quantum Dots können auch geringfügig von den Zellen aufgenommen werden und befinden sich anschließend in zytoplasmatischen Vakuolen oder auch teilweise an der Peripherie der Zellmembran (Zhang et al. 2008). Daher werden Quantum Dots auch für die Bestimmung des metastatischen Potentials in-vitro eingesetzt. Während der Wanderung müssen die Zellen in dem Versuchsaufbau eine dünne Schicht von Quantum Dots durchqueren, wodurch die Zellen markiert werden. Der Rückgang der Fluoreszenz in der Schicht ist ein Maß für die Zellmobilität (Gu et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Quantum Dots mit einer Stoffmenge von 40

pmol in 100 μ l angesetzt und das Cy5 mit der fünffachen Stoffmenge. Trotzdem konnte durch die Quantum Dots eine wesentlich bessere Markierung mit identischer Belichtungszeit erreicht werden. Unter Verwendung der identischen Belichtungszeit für beide Farbstoffe war nur mit den Quantum Dots eine Detektion möglich. Dieser markante Unterschied könnte natürlich auf eine unterschiedliche Kopplungseffizienz hindeuten. Allerdings ist die Quantum Dot-Kopplung wesentlich komplexer, so dass eine höhere Ausbeute von der Cy5-Kopplung zu erwarten ist. Durch eine höhere Quantenausbeute, die auch von der Konjugation mit Peptiden nicht signifikant beeinflusst wird, war es den Quantum Dots gestattet, schon mit einer geringen Stoffmenge eine ausreichende Fluoreszenz in den Zellen hervorzurufen (Peng et al. 2001, Sharma et al. 2006).

Die Konzentration des VEGF war für das Cy5 mit 500 nM wie auch für die Quantum Dots mit ungefähr 400 nM ziemlich hoch, so dass eine maximale Besetzung der Rezeptoren in beiden Fällen erreicht war.

Für einige Quantum Dots zeigte sich aber, dass während ihrer Verwendung in biologischen Systemen ein sogenanntes „blinking“ Phänomen auftrat (Heuff et al. 2007). Das beschreibt den Wechsel zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht fluoreszierenden Zustand der Nanopartikel. Zudem kann das „blinking“ Phänomen einen Zerfall des Nanopartikelkernes anzeigen, wodurch der Kern, häufig bestehend aus dem toxischen Cadmium, in den Körper freigesetzt werden kann. Das ist besonders gefährlich, weil sich die Quantum Dots teilweise in der Leber, Milz oder auch im Nervensystem ansammeln und in höheren Konzentrationen erhebliche Schäden verursachen können (Medintz et al. 2005). Das „blinking“ Phänomen kann durch reduzierende Reagenzien, wie beispielsweise β -Mercaptoethanol und Glutathion, inhibiert werden (Li-Shishido et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde eines der wenigen Quantum Dots verwendet, die über einen Indium-Kern verfügen. Über das Indium sind keine toxischen Effekte bekannt. Um trotzdem einem Zerfall entgegenzuwirken besitzt das verwendete Quantum Dot („Jonamac Red“) eine Zinksulfid-Hülle mit einer zusätzlichen Schicht aus Polyethylenglycol (PEG) (Carion et al. 2007). Dies schützt nicht nur vor dem Zerfall des Partikels, sondern minimiert auch die unspezifische Aufnahme in die Leber oder Milz (Bentzen et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass Quantum Dots, die über lange PEG-Ketten verfügen, in-vivo eine stabile Fluoreszenz für mindestens vier Monate besitzen (Ballou et al. 2004). Weiterhin konnte kein Anzeichen für Nekrosen festgestellt werden, was für

eine geringe Toxizität spricht.

Die Fluoreszenzspektren der verschiedenen erhältlichen Quantum Dots sind abhängig von der Größe der Partikel. Ein rot fluoreszierendes Quantum Dot besitzt einen größeren Durchmesser als ein grün fluoreszierendes. Die Lokalisation der Partikel ist abhängig von der Größe. Während rot fluoreszierende Quantum Dots sich nur im Zytoplasma aufhalten, gelangen die kleineren grün fluoreszierenden Partikel in den Nukleus, wodurch es, sollte Cadmium als Kernmaterial verwendet werden, zu einer Chromatinkondensation kommen kann (Lovric et al. 2005).

Die Anschaffungskosten der Quantum Dots sind im Vergleich zu den Cy-Farbstoffen verhältnismäßig hoch und aufgrund der mehrstufigen Kopplung steigt die Wahrscheinlichkeit einer Minimierung der Kopplungsausbeute. Bis heute ist nur wenig bekannt über die Verteilung, Absorption, Metabolismus, sowie über die Ausschleusung der Quantum Dots in-vivo (Hardman 2006, Nel et al. 2006). Yang et al. haben im Jahr 2007 eine lange Halbwertszeit der Quantum Dots festgestellt. Dabei sammelten sich die Quantum Dots vorzugsweise in der Leber (29 - 42%), in der Niere (1,5 - 9,2%) und in der Milz (4,5 - 5,2%) an. Die Versuchsmäuse zeigten nur eine äußerst geringe Ausscheidung der Quantum Dots innerhalb der untersuchten 28 Tage. Polyethylenglykollhüllen, über die auch das in der vorliegende Arbeit verwendete Quantum Dot verfügt, verzögerte die Aufnahme in Leber und Milz nur um einige Minuten (Schipper et al. 2007). Obwohl eine lange Halbwertszeit für eine Untersuchung wünschenswert ist, besteht im Falle der Quantum Dots die Gefahr des Zerbrechens der Hülle, wodurch der Kern frei werden würde. Andere Nanopartikel, wie beispielsweise die auf Eisenoxid basierenden Partikel, besitzen zwar eine kurze Halbwertszeit im Körper, aber das nach dem Hüllenverlust freiwerdende Eisen wird in diesem Fall in den Eisenpool des Organismus aufgenommen (Weissleder et al. 1989).

Im Gegensatz zu den Farbstoffen kann die Größe des Quantum Dots-Komplexes, die zwischen 25 und 40 nm beträgt, zusätzlich die Zugänglichkeit bzw. Diffusion in gedrängten Zellansammlungen reduzieren (Howarth et al. 2005).

Daher sollten die Quantum Dots vorzugsweise für Untersuchungen verwendet werden, in denen eine geringe Zellzahl mit einem möglichst geringen Volumen detektiert werden soll. Für großangelegte Untersuchungen sollte auf den Cy5 Farbstoff zurückgegriffen werden.

4.2.2. Vergleich zwischen IRDye 800CW Konjugat und Cy7 Konjugat

Für die Analyse des Licor Farbstoffes IRDye 800CW wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der sehr nahe aneinander liegende Emissionswellenlängen der Cy7 Farbstoff verwendet. Die Untersuchungen erfolgten mit einem Licor-Gerät, das speziell für diesen Wellenlängenbereich ausgelegt ist. Die Detektionswellenlängen der o.g. Farbstoffe sind deutlich langwelliger als die der Cy5 bzw. der Quantum Dots, so dass eine größere Eindringtiefe in Geweben gegeben ist (Weissleder et al. 2003). Während der in-vivo Detektion von Mammakarzinomzellen mit Hilfe eines EGF Konjugates konnte im Vergleich zwischen dem IRDye 800CW und dem Cy5.5 ein reduzierter Hintergrund, sowie ein verstärktes Tumor-zu-Hintergrund Verhältnis für das IRDye 800CW Konjugat festgestellt werden (Adams et al. 2007).

Weiterhin wurde das IRDye 800CW-EGF-Konjugat für die Detektion und Verfolgung von Pankreastumorzellen in Mäusen verwendet (Kovar et al. 2007). Dabei zeigte sich in den in-vivo Versuchen in den ersten drei bis vier Stunden eine Fluoreszenz, die sich durch die Zirkulation in den Kapillaren der Haut über die gesamte Maus erstreckte. Nach acht Stunden war 75% und nach 24 Stunden über 90% des Farbstoffes ausgeschieden. Das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis und somit die maximale Sensitivität wurde nach 72 bis 96 Stunden ermittelt. Mit Hilfe des IRDye 800CW-EGF-Konjugates konnte dann ein subkutaner Tumor mit einem ungefähren Durchmesser von 0,5 cm visualisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden von dem IRDye 800CW, sowie von dem Cy7 ebenfalls Konjugate mit dem VEGF und - für die Bestimmung der unspezifischen Bindungen - mit dem Albumin hergestellt.

In den verschiedenen Versuchen ist das VEGF jeweils in einer Konzentration von ungefähr 50 nM eingesetzt worden. Diese Konzentration ermöglichte eine ausreichende Bindungskapazität.

Im ersten Versuch wurde die Nachweisgrenze des IRDye 800CW-VEGF-Konjugates ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass in einer 12-Well-Platte eine Zellzahl von 20.000 noch gut detektierbar war. 100.000 Zellen wuchsen auf der Platte so dicht zusammen, dass eine Separierung der einzelnen Zellen aufgrund der starken Fluoreszenz kaum noch möglich war. Mittels Eisenoxidnanopartikelkonjugaten konnten 20.000 Zellen nicht detektiert werden. Hier wurden 50.000 HUVEC's, wachsend auf PET-Membranen, nur schwach nachgewiesen. Die Fluoreszenz bleibt

aber im Gewebe nur wenige Zentimeter detektierbar, während mit Hilfe des MRT Schnittbilder unabhängig von der Größe des Organismus hergestellt werden können (Sevick-Muraca et al. 2002).

Der IRDye 800CW-Farbstoff wurde nach einer Stunde in dem NaHCO_3 Puffer ebenfalls ohne Konjugation auf die Zellen gegeben. In der anschließenden Untersuchung zeigte sich eine schwache Fluoreszenz der Zellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der IRDye 800CW Farbstoff teilweise mit Zelloberflächenproteine reagieren konnte, was die Notwendigkeit der Abtrennung des unkonjugierten Farbstoffes bestätigte. Es könnte auch zusätzlich aufgrund der teilweise unpolaren Struktur des Farbstoffes eine geringe unspezifische Aufnahme beteiligt sein.

In weiteren Untersuchungen wurden die HUVEC's mit den verschiedenen IRDye 800CW- und Cy7-Konjugaten inkubiert und anschließend weitere 0, 12 bzw. 24 Stunden kultiviert. Die Inkubation mit den Albuminkonjugaten offenbarte eine sehr geringe unspezifische Bindung für beide Farbstoffe. Im Vergleich zu dem Cy7-VEGF-Konjugat bewirkte das IRDye 800CW-VEGF-Konjugat eine eindeutig erhöhte Fluoreszenz. Da nicht nur die Ausgangsmenge für die Kopplung bei beiden Farbstoffen identisch war, sondern auch die während der Kopplung verwendeten reaktiven Gruppen, ist der Unterschied wahrscheinlich auf die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe und nicht auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten zurückzuführen.

Eine weitere Kultivierung der Zellen nach der Markierung mit den Farbstoffkonjugaten bewirkte eine Schwächung der gemessenen Fluoreszenz, weil diese sich nach Zellteilungen auf die entstandenen Zellen aufteilte. Ein Ausbleichen des Farbstoffes kann nicht der Grund für den Fluoreszenzrückgang sein, da die Lichtexposition für alle Zellen identisch war und nur einige Zellen früher als andere fixiert wurden. Die verminderte Fluoreszenz deutet vielleicht auch teilweise auf ein beginnendes Ausschleusen des Farbstoffes hin.

Die jeweils eingesetzte Farbstoffkonzentration von ungefähr 0,2 nmol/ml entsprach nur einem Zehntel der in vorherigen Versuchen verwendeten Cy5-Menge. Aus diesem Grund konnte für das Cy7-Konjugat auch nur eine geringe Aufnahme in die Zellen festgestellt werden, wodurch die guten Fluoreszenzeigenschaften des IRDye 800CW zusätzlich bestätigt wurden.

Die Vorteile des IRDye 800CW-Farbstoffes gegenüber den Quantum Dots sind die

langwelligeren Detektionswellenlängen und die damit verbundene höhere Eindringtiefe und das geringere Hintergrundrauschen. Die Quantum Dots sind mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 25 nm deutlich größer, was eine renale Ausscheidung kaum möglich macht und ein starkes Hintergrundsignal entstehen lässt (Frangioni 2003). Auch die niedrigeren Herstellungskosten sowie die vergleichsweise einfache Kopplungsstrategie sprechen für den IRDye 800CW-Farbstoff. Ein direkter Vergleich ist aufgrund der unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen jedoch nicht möglich. Die Quantum Dots verfügen gegenüber den IRDye 800CW- und Cy-Farbstoffen aufgrund ihrer Halbleitereigenschaften über Vorteile im Bereich des Extinktionskoeffizienten und der Quantenausbeute.

Bei der Wahl des Detektionsverfahren, MRT oder Fluoreszenzmessung, sollten verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Durch den Einsatz des MRTs gibt es keine Eindringtiefe-Probleme, wie sie während Fluoreszenzmessungen auftreten können. Emittiertes Licht wird durch diverse Gewebetypen absorbiert und gestreut, wodurch die Beurteilung der exakten räumlichen Lokalisation und die Quantifizierung der Signalintensität beeinträchtigt ist. Im MRT werden die morphologischen bzw. anatomischen Strukturen deutlich besser dargestellt. Die Fluoreszenzdetektion ist allerdings bei dem heutigen Stand der Technik sensitiver als das MRT. Auch die Anschaffungs- und Unterhaltskosten sprechen für die Fluoreszenzmessung.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Molekularen Bildgebung lassen sich biologische Prozesse auf zellulärer Ebene sichtbar machen. Für die MRT ist eine Verbesserung der Auflösung und die Entwicklung von molekular angreifenden Markern mit erhöhter Sensitivität und Spezifität eine wesentliche Voraussetzung. Die veränderte Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsmolekülen wird während der Entwicklung von spezifischen Kontrastmitteln ausgenutzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein tumorspezifisches Kontrastmittel für die MRT im Tiermodell zu erproben. Sehr kleine Tumore sollten über ihre Angiogenese mit ausreichendem Bildkontrast erfasst werden können. Weiterhin wurde die Sensitivität von Fluoreszenzfarbstoff-, sowie Quantum Dots-Konjugaten untereinander verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Partikel Resovist, B102, die Microspheres M 310 nm und M 850 nm, sowie das kolloidale Fe_3O_4 von den Zellen schnell und stark aufgenommen. Sie eignen sich zur in-vitro Zellmarkierung mit anschließender Verfolgung im Organismus („Cell Tracking“). Eine längere Inkubation bewirkte allerdings einen Abfall des Eisengehaltes, was wahrscheinlich auf ein Überschreiten der Aufnahmekapazität und somit auf eine einsetzende Toxizität zurückzuführen war. Die drei verwendeten Nanomag-Partikel, N20, N70 und N100, wurden von den Zellen kaum bis gar nicht aufgenommen, so dass eine spezifische Konjugation vielversprechend war. Das Aufnahmeverhalten bewies sich als größtenteils unabhängig von der Zelllinie. Eine quantitative Bestimmung der Freisetzung der Laktatdehydrogenase sowie ein Proliferationstest (CyQuant) offenbarten nur eine geringe zytotoxische Wirkung für alle untersuchten Eisenoxidnanopartikel, wobei von den Nanomag-Partikeln das N100 den geringsten inhibierenden Einfluss zeigte. Mittels Eisenfärbung und Transmissionselektronenmikroskopie konnte eine Internalisierung der Eisenoxidnanopartikel und anschließende Lokalisation im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Durch die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde eine Aggregatbildung der Partikel N20 und N70 mit einer Größe von 100 bis 500 nm festgestellt. Allerdings wurde in beiden Analyseverfahren keine Aggregation der N100-Partikel beobachtet. Als Zielstruktur für eine spezifische Markierung wurde der VEGF-Rezeptor-2 aufgrund

seiner hohen Expression, einer guten Zugänglichkeit der VEGFR-2-tragenden Endothelzellen, sowie der Schlüsselrolle während der Angiogenese von Tumoren, ausgewählt.

Das Aufnahmemaximum des N100-VEGF-Konjugates war nach einer Stunde nahezu erreicht. Die spezifischen Konjugate bewirkten eine 10- bis 15-fach stärkere Eisenaufnahme im Vergleich zu den Kontrollkonjugaten (IgG-N100 bzw. Albumin-N100), wobei das VEGFR-2-Antikörper-Konjugat eine um ungefähr 20% geringere Aufnahme als das Ligandkonjugat N100-VEGF zeigte. Das N100-VEGF-Konjugat wurde mittels TEM in Vesikeln innerhalb der Zellen und das N100-anti-VEGFR-2-Konjugat an der Zelloberfläche lokalisiert. Weiterhin wurden die Konjugate an Monolayer wachsenden Zellen mittels MRT nachgewiesen.

Als Tumormodell wurde ein Lebermetastasenmodell verwendet. Eine hohe Expression der VEGF-Rezeptoren-1 und -2 konnte in den Metastasen der Leber mittels Real-Time-RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen werden.

Das N100-VEGF-Konjugat wurde in-vivo nach fünf Minuten annähernd vollständig von der Leber aufgenommen. Durch die rasche Aufnahme, vermutlich durch die Kupfferschen Zellen, nahm die intravasale Eisenkonzentration schnell ab. Die Halbwertszeit des N100-VEGF-Konjugates betrug in der Leber anschließend zwischen 5 und 9 Tagen.

Außerdem wurde eine Absorption von Plasmaproteinen gezeigt, wodurch eine Interaktion mit dem RES (retikuloendotheliales System) wahrscheinlich sehr beschleunigt wurde.

Für Fluoreszenzmarkierungen konnte bei identischer Belichtungszeit im Vergleich mit dem Cy5-VEGF-Konjugat eine wesentlich höhere Effizienz mit dem Quantum Dot-VEGF-Konjugat erzielt werden. Die Quantum Dots verfügen über ein breites Absorptionsspektrum, ein enges Emissionsspektrum, einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten, eine hohe Quantenausbeute sowie über eine hohe Stabilität. Jedoch sind die Anschaffungskosten höher und die Konjugation komplexer als für die Cy-Farbstoffe.

Im Vergleich zu dem Cy7-VEGF-Konjugat bewirkte das IRDye 800CW-VEGF-Konjugat eine eindeutig erhöhte Fluoreszenz. Die Spezifität der Bindung konnte in Verdrängungsversuchen nachgewiesen werden. Die Inkubation mit den Albuminkonjugaten offenbarte eine sehr geringe unspezifische Bindung.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen sorgen für ein besseres Verständnis beim Einsatz von spezifischen Kontrastmitteln auf dem Gebiet der MRT und der optischen Bildgebung.

Summary

Molecular Imaging is a new discipline that enables the visualization of cellular functions. The changed expression of receptors for growth factors and adhesion molecules is used for development of specific contrast agents.

There are different methods for noninvasive molecular imaging, such as Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Optical imaging. MRI has the advantages of having very high spatial resolution and it is very adept at morphological and functional imaging. Iron oxide nanoparticles improve the resolution of MRI images by increasing the darkness in various parts of the body where the agent resides.

Angiogenesis is a fundamental step in the transition of tumors from a dormant state to a malignant state. Contrast agents that visualize tumor-induced angiogenesis hold great promise for sensitive diagnosis of cancer. To achieve this goal in this study iron oxide nanoparticles conjugates were developed. Furthermore the sensitivity of different fluorescence- and quantum dots conjugates was compared.

In the present work, unconjugated Nanomag-Particle (N20, N70 and N100) showed a very low non-specific uptake rendering them ideal for specific molecular imaging. In contrast, Resovist, B102, non-coated Fe_3O_4 and two microspheres were highly absorbed by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and glioblastoma cells (U118). Their strong uptake and the also noticed long intracellular retention of Resovist, non-coated Fe_3O_4 and the two microspheres offer the possibility of cell tracking and migration monitoring in MRI.

Cell toxicity determinations by measuring the release of lactic dehydrogenase (LDH) exhibited a minor toxicity of all investigated particles and conjugates. Cell proliferation assays (CyQuant) confirmed this impression.

The structure of the different iron oxide nanoparticles were investigated by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Photon Correlation Spectroscopy (PCS). Thereby, an aggregation in the size from 100 nm to 500 nm could be determined for N20 and N70.

As target structure was chosen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), because it has been demonstrated to be a major contributor to angiogenesis and its receptors are highly expressed on endothelial cells during tumor-induced angiogenesis. Furthermore endothelial cells are better reachable than tumor cells.

The maximum uptake of N100-VEGF conjugate was almost reached after one hour.

The specific conjugates caused a ten- to twentyfold increase in iron uptake in comparison to the control conjugates (N100-IgG and N100-Albumin). In relation to the anti-VEGFR-2-conjugate, the VEGF-conjugate showed a slight intensified iron uptake. The examination by transmission electron microscopy showed the N100-VEGF conjugate in cytoplasmatic vacuoles and the N100-VEGFR-2-antibody conjugate at the cell surface. Furthermore, the MRI could distinguish specific conjugates from control conjugates labeled cells.

In-vivo was used a liver metastasis model. A high expression of VEGFR-1 and -2 could be detected in the liver metastasis by quantitative RT-PCR and immunohistochemical methods. After N100-VEGF was administered in the tail vein of the mice, the conjugate was adsorbed almost completely in the liver within five minutes. Because of the rapid uptake, probably by Kupffer cells, the intravascular iron concentration dropped very fast. The half-life period of N100-VEGF was between five and nine days.

Furthermore it could be demonstrated an adsorption of plasma proteins, whereby the interaction with the RES (reticuloendothelial system) was probably accelerated.

The fluorescence investigations about effective targeting agents showed a higher efficiency of labeling for the Quantum Dot-VEGF-conjugate in comparison to the Cy5-VEGF-conjugate.

Quantum Dots possess a broad absorption spectrum, a narrow emission spectrum, a very high extinction coefficient, a high quantum yield, a great photochemical stability and a good stability across a wide pH range. But their acquisition costs are higher and their conjugation process is more complicated than for the Cy-dyes.

In addition it could be shown that the IRDye 800CW-VEGF-conjugate possesses a definitely increased fluorescence in comparison with the Cy7-VEGF-conjugate. The specificity of binding could be proved in displacement experiments. All Albumin-fluorescence-conjugates revealed an inferior nonspecific binding.

The investigations in this study provide for a better insight while using specific contrast agents for MRI and optical imaging.

Literaturverzeichnis

- Achen M.G., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks A.F., Alitalo K., Stacker S.A.; Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 548-53
- Adams KE., Ke S., Kwon S., Liang F., Fan Z., Lu Y., Kirschi K., Mawad ME., Barry MA., Sevick-Muraca EM.; Comparison of visible and near infrared wavelength excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer. J Biomed Opt. 2007; 12: 24-17
- Ades EW., Candal FJ., Swerlick RA., George VG., Summers S., Bosse DC., Lawley TJ.; HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. J Invest Dermatol. 1992; 99: 683-90
- Ahrens ET., Feili-Hariri M., Xu H., Genove G., Morel PA.; Receptor-mediated endocytosis of iron oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging. Magn Reson Med. 2003; 49: 1006-13
- Albrecht T., Hohmann J., Oldenburg A., Skrok J., Wolf KJ.; Detection and characterization of liver metastases. Eur Radiol. 2004; 14: 25-33
- Arbab AS., Bashaw LA., Miller BR., Jordan EK., Lewis BK., Kalish H., Frank JA.; Characterization of biophysical and metabolic properties of cell labelled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. Radiology. 2003; 229: 838-46
- Arbab AS., Yocum GT., Wilson LB., Parwana A., Jordan EK., Kalish H., Frank JA.; Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labelling efficiency and cellular viability. Mol Imaging. 2004; 3: 24-32
- Arbabi S., Maier RV.; Mitogen – activated protein kinases. Crit. Care Med. 2002; 30: 74-79

- Arechabala B., Coiffard C., Rivalland P., Coiffard LJ., de Roeck-Holtzhauer Y.; Comparison of cytotoxicity of various surfactants testes on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol.* 1999; 19: 163-5
- Artemov D.; Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agnets. *J Cell Biochem.* 2003; 90: 518-24
- Artemov D., Mori N., Ravi R., Bhujwalla ZM.; Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor. *Cancer Res.* 2003; 63: 2723-7
- Awasthi VD., Garcia D., Goins BA., Phillips WT.; Circulation and biodistribution profiles of long circulating PEG liposomes of various sizes in rabbits. *Int J Pharm.* 2003; 253: 121-32
- Ba-Ssalamah A., Fakhrai N., Matzek WK., Herneth AM., Stadler A., Bastati N., Herold CJ., Schima W.; Magnetic resonance imaging of liver malignancies. *Top Magn Reson Imaging.* 2007; 18: 445-55
- Bangham A.D.; Liposomes: the Babraham connection. *Chem Phys Lipids* 1993; 64: 275-85
- Bates DO., Hillman NJ., Williams B., Neal CR., Pocock TM.; Regulation of micorvascular permeability by vascular endothelial growth factor. *J Anat.* 2002; 200: 581-97
- Bazan-Peregrino M., Seymour LW., Harris AL.; Gene therapy targeting to tumor endothelium. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14: 117-27
- Beliveau R., Delbecchi L., Beaulieu E., Mousseau N., Kachra Z., Berthelet F., Moumdjian R., Del Maestro R.; Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 886: 236-9

- Bentzen EL., Tomlinson ID., Mason J., Gresch P., Warnement MR., Wright D., Sanders-Bush E., Blakely R., Rosenthal SJ.; Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjug Chem.* 2005; 16: 1488-94
- Berman HM., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat TN., Weissig H., Shindyalov IN., Bourne PE.; The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* 2000; 28: 235-242
- Berry CC., Wells S., Charles S., Aitchison G., Curtis AS.; Cell response to dextran derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials.* 2004; 25: 5405-13
- Blomley MJ., Cooke JC., Unger EC., Monaghan MJ., Cosgrove DO.; Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *BMJ.* 2001; 322: 1222-5
- Bonnemain B.; Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical application. A review. *J Drug Target.* 1998; 6:167-74
- Bosma GC., Custer RP., Bosma MJ.; A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.* 1983; 301: 527-30
- Bradbury M., Hricak H.; Molecular MR imaging in oncology. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2005; 13: 225-40
- Braga L., Guller U., Semelka RC.; Modern hepatic imaging. *Surg Clin North Am.* 2004; 84: 375-400
- Briley-Saebo KC., Hustvedt SO., Haldorsen A., Bjornerud A.; Long-term imaging effects in rat liver after a single injection of an iron oxide nanoparticle based MR contrast agent. *J Magn Reson. Imaging.* 2004; 20: 622-31

- Briley-Saebo KC., Johansson LO., Hustvedt SO., Haldorsen AG., Bjornerud A., Fayad ZA., Ahlstrom HK.; Clearance of iron oxide particles in rat liver: effect of hydrated particle size and coating material on liver metabolism. *Invest Radiol.* 2006; 41: 560-71
- Brown DM., Wilson MR., MacNee W., Stone V., Donaldson K.; Size dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 175: 191-9
- Bulte JW., Douglas T., Witwer B., Zhang SC., Strable E., Lewis BK., Zywicke H., Miller B., Van Gelderen P., Moskowitz BM., Duncan ID., Frank JA.; Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001; 19: 1141-7
- Bulte JW., Duncan ID., Frank JA.; In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22: 888-907
- Bulte JW., Kraitchman DL.; Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* 2004; 17: 484-99
- Burnworth B., Arendt S., Muffler S., Steinkraus V., Bröcker EB., Birek C., Hartschuh W., Jauch A., Boukamp P.; The multi – Step process of human skin carcinogenesis: A role for p53, cyclin D1, hTERT, p16 and TSP-1. *Eur J Cell Biol.* 2006; 86: 763-80
- Cai J., Miller GW., Altes TA., Read PW., Benedict SH., de Lange EE., Cates GD., Brookeman JR., Mugler JP., Sheng K.; Direct measurement of lung motion using hyperpolarized helium -3 MR tagging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 68: 650-3
- Cailleau R., Young R., Olive M., Reeves WJ Jr.; Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974; 53: 661-74

- Carion O., Mahler B., Pons T., Dubertret B.; Synthesis, encapsulation, purification and coupling of single quantum dots in phospholipid micelles for their use in cellular and in vivo imaging. *Nat Protoc.* 2007; 2: 2383-90
- Cambi A., Lidke DS., Arndt-Jovin DJ., Figdor CG., Jovin TM.; Ligand-conjugated quantum dots monitor antigen uptake and processing by dendritic cells. *Nano Lett.* 2007; 7: 970-7
- Carmeliet P.; VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005; 69: 4-10
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A.; Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996; 380: 435-9
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward WW., Prasher DC.; Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 1994; 263: 802-5
- Chan WC., Maxwell DJ., Gao X., Bailey RE., Han M., Nie S.; Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13: 40-6
- Chang L., Karin M.; Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature.* 2001; 410: 37-40
- Chen WS., Wei SJ., Liu JM., Hsiao M., Kou-Lin J., Yang WK.; Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2 selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer.* 2001; 91: 894-9
- Choi WJ., Kim JK., Choi SH., Park JS., Ahn WS., Kim CK.; Lox toxicity of cationic lipid based emulsion for gene transfer. *Biomaterials.* 2004; 25: 5893-903

- Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune JJ., Jallet P.; Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul.* 1996; 13: 245-55
- Christian S., Pilch J., Akerman ME., Porkka K., Laakkonen P., Ruoslahti E.; Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol.* 2003; 163: 871-8
- Chua CC., Hamdy RC., Chua BH.; Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1401: 187-94
- Coester C., Nayyar P., Samuel J.; In vitro uptake of gelatine nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 62: 306-14
- Colvin VL.; The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 1166-70
- Cursiefen C., Chen L., Borges LP., Jackson D., Cao J., Radziejewski C., D'Amore PA., Dana MR., Wiegand SJ., Streilein JW.; VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1040-50
- Custer RP., Bosma GC., Bosma MJ.; Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am J Pathol.* 1985; 120: 464-77
- Dams E., Laverman P., Oyen W., Storm G., Scherphol G., van der Meer J., Corstens F., Boerman O.; Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292: 1071-9

- Dayton PA., Ferrara KW.; Targeted imaging using ultrasound. *J Magn Reson Imaging*. 2002; 16: 362-77
- Decker T., Lohmann-Matthes M.L.; A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Immunol Methods* 1988; 155: 61-9
- Daldrup-Link HE., Rudelius M., Oostendorp RA., Settles M., Piontek G., Metz S., Rosenbrock H., Keller U., Heinzmann U., Rummeny EJ., Schlegel J., Link TM.; Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology*. 2003; 228: 760-7
- Deindl E., Schaper W.; The art of arteriogenesis. *Cell Biochem Biophys*. 2005; 45: 1-15
- Del Cerro Marin M., Fernandez Ruiz A., Garcia – Guereta L., Benito Bartolome F., Burqueros M., Ares Sequra S., Moreno F., Gracia Bouthelie R.; Thyroid function alterations in children with congenital cardiac disease after catheterization with iodinated contrast agents. *Rev Esp Cardiol*. 2000; 53: 517-24
- Delikatny EJ., Poptani H.; MR techniques for in vivo molecular and cellular imaging. *Radiol Clin North Am*. 2005; 43: 205-20
- Derfus AM., Chen AA., Min DH., Ruoslahti E., Bhatia SN.; Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery. *Bioconjug Chem*. 2007; 18: 1391-6
- Deroanne CF., Hajitou A., Calberg-Bacq CM., Nusgens BV., Lapiere CM.; Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*. 1997;57: 5590-7

- Diekmann F., Diekmann S., Taupitz M., Bick U., Winzer KJ., Hüttner C., Müller S., Jeunehomme F., Hamm B.; Use of iodine – based contrast media in digital full – field mammography: initial experience. *Rofo*. 2003; 175: 342-5
- Distler JH., Hirth A., Kurowska – Stolarska M., Gay RE., Gay S., Distler O.; Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *O J Nucl Med*. 2003; 47: 149-61
- Donaldson K., Tran CL.; Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol*. 2002; 14: 5-27
- Dunn IF., Heese O., Black PM.; Growth factors in glioma angiogenesis: FGF, PDGF, EGF and TGF. *J Neurooncol*. 2000; 50: 121-37
- Ellegala DB., Leong-Poi H., Carpenter JE., Klibanov AL., Kaul S., Shaffrey ME., Sklenar J., Lindner JR.; Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and micorbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation*. 2003; 108: 336-41
- Ellman GL.; Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959; 82: 70-7
- Esch F., Ueno N., Baird A., Hill F., Denoroy L., Ling N., Gospodarowicz D., Guillemin R.; Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 133: 554-62
- Essig M., Giesel F., Stieltjes B., Weber MA.; Functional imaging for brain tumors (perfusion, DTI and MR spectroscopy). *Radiologie*. 2007; 47: 513-9
- Fergelot P., Rioux-Leclercq N., Patard JJ.; Molecular pathways of tumour angiogenesis and new targeted therapeutic approaches in renal cancer. *Prog Urol*. 2005; 15: 1021-9
- Ferrara K., Pollard R., Borden M.; Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007; 9: 415-47

- Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea KS., Powell-Braxton L., Hillan KJ., Moore MW.; Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380: 439-42
- Finkenzeller G., Sparacio A., Technau A., Marme D., Siemeister G.; SP-1 recognition sites in the proximal promotor of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet derived growth factor induced gene expression. *Oncogene*. 1997; 15: 669-76
- Fleige G., Seeberger F., Laux D., Kresse M., Taupitz M., Pilgrimm H., Zimmer C.; In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol*. 2002; 37: 482-8
- Forster-Horvath C., Meszaros L., Raso E., Döme B., Ladanyi A., Morini M., Albini A., Timar J.; Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvasc Res*. 2004; 68: 110-8
- Frangioni JV.; In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol*. 2003; 7: 626-34
- Frank MM., Fries LF.; The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*. 1991; 12: 322-6
- Franklin RJ., Blaschuk KL., Bearchell MC., Prestoz LL., Setzu A., Brindle KM., French-Constant C.; Magnetic resonance imaging of transplanted oligodendrocyte precursors in the rat brain. *Neuroreport*. 1999; 10: 3961-5
- Garanger E., Boturyn D., Dumy P.; Tumor targeting with RGD peptide ligands – design of new molecular conjugated for imaging and therapy of cancers. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007; 7: 552-8
- Gevertz JL., Torquato S.; Modeling the effects of vasculature evolution on early brain tumor growth. *J Theor Biol*. 2006; 243: 517-31

- Gieldon A., Mori M., Del Conte R.; Theoretical study on binding of S100B protein. *J Mol Model.* 2007; 13: 1123-31
- Goodyear CS., Silverman GJ.; Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supereclonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin. *J Exp Med.* 2003; 197: 1125-39
- Gospodarowicz D., Ferrara N., Schweigerer L., Neufeld G.; Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev.* 1987; 8: 95-114
- Gruber H.J., Hahn C.D., Kada G., Riener C.K., Harms G.S., Ahrer W., Dax T.G., Knaus H-G. Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to Avidin. *Bioconjugate Chem.* 2000; 11: 696-704
- Gu W., Pellegrino T., Rarak WJ., Boudreau R., Le Gros MA., Alivisatos AP., Larabell CA.; Measuring cell motility using quantum dot probes. *Methods Mol Biol.* 2007; 374: 125-31
- Hamm B., Vogl TJ., Branding G., Schnell B., Taupitz M., Wolf KJ., Lissner J.; Focal liver lesions: MR imaging with Mn-DPDP initial clinical results in 40 patients. *Radiology.* 1992; 182: 167-74
- Han M., Gao X., Su JZ., Nie S.; Quantum dot tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol.* 2001; 19: 631-5
- Hanigan MH., Frierson HF. Jr., Swanson PE., De Young BR.; Altered expression of gamma – glutamyl transpeptidase in human tumors. *Hum Pathol.* 1999; 30:300-5

- Hardman R.; A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect.* 2006; 114: 165-72
- Hawigkorst T.: Angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor progression. *Zentralbl Gynakol.* 2002; 124: 497-505
- Hawrysz DJ., Sevick-Muraca EM.; Developments toward diagnostic breast cancer imaging using near-infrared optical measurements and fluorescent contrast agents. *Neoplasia.* 2000; 2: 388-417
- Heissig B., Hattori K., Friedrich M., Rafii S., Werb Z.; Angiogenesis vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases; *Curr Opin Hematol.* 2003; 10: 136-41
- Heneweer C., Kossel E., Schlorf T., Both M., Wolter J., Mentlein R., Glueer CC., Heller M.; Artefact free imaging of iron oxide labeled monolayers with magnetic resonance at 3T. In Conference Proceedings Molekulare Bildgebung 2006
- Hesse L., Schroeder B., Heller G., Kroll P.; Quantitative effect of intravitreally injected tissue plasminogen activator and gas on subretinal hemorrhage. *Retina.* 2000; 20: 500-5
- Hild WA., Breunig M., Goepferich A.; Quantum dots – Nano sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 68: 153-68
- Hirashima M., Suda T.; Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis. *Endothelium.* 2006; 13: 137-45
- Hita Rosino E., Aqut Gimenez A., Sanchez – Valverde Garcia MA.; The adverse effects of the water – soluble iodinated contrast media used in excretory urography in the canine species. *Actas Urol Esp.* 1999; 23: 385-93

- Hong MS., Lim SJ., Lee MK., Kim YB., Kim CK.; Prolonged blood circulation of methotrexate by modulation of liposomal composition. *Drug Deliv.* 2001; 8: 231-7
- Horak D., Babic M., Mackova H., Benes MJ.; Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environment separation. *J Sep Sci.* 2007; 30: 1751-72
- Houck K.A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung D.W.; The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991; 5: 1806-14
- Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M., Winer J., Ferrara N.; Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992; 267: 26031-7
- Houston JP., Ke S., Wang W., Li C., Sevick-Muraca EM.; Quality analysis of in vivo near infrared fluorescence and conventional gamma images acquired using a dual-labeled tumor targeting probe. *J Biomed Opt.* 2005; 10: 054010
- Howarth M., Takao K., Hayashi Y., Ting AY.; Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 7583-8
- Hughes MS., Lanza GM., Marsh JN., Wickline SA.; Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy: a brief review. *Medicamundi.* 2003; 47: 66-73
- Hupfeld S., Holsaeter AM., Skar M., Frantzen CB., Brandl M.; Liposome size analysis by dynamic/static light scattering upon size exclusion -/field flow-fractionation. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6: 3025-31

- Ikada Y.; Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications* 2000; 21: 117-132
- Immordino ML., Dosio F., Cattel L.; Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006; 1: 297-315
- Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ueno T.; Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *J Immunoassay*. 1983; 4: 209-327
- Ishizu K., Sunose N., Yamazaki K., Tsuruo T., Sadahiro S., Makuuchi H., Yamori T.; Development and characterization of a model of liver metastasis using human colon cancer HCT-116 cells. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30: 1779-83
- Ishiyama H., Ogino K., Hobara T.; Role of Kupffer cells in rat liver injury induced by diethyldithiocarbamate. *Eur J Pharmacol*. 1995; 292: 135-41
- Ittrich H., Lange C., Dahnke H., Zander AR., Adam G., Nolte-Ernsting C.; Labeling of mesenchymal stem cells with different superparamagnetic particles of iron oxide and detectability with MRI at 3T. *Rofo*. 2005; 177: 1151-63
- Jaiswal JK., Mattoussi H., Mauro JM., Simon SM.; Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol*. 2003; 21: 47-51
- Jiang BH., Agani F., Passaniti A., Semenza GL.; V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res*. 1997; 57: 5328-35
- Johansson LO., Bjornerud A., Ahlström HK., Ladd DL., Fujii DK.; A targeted contrast agent for magnetic resonance imaging of thrombus: implications of spatial resolution. *J Magn Reson Imaging*. 2001; 13: 615-8

- Johnson GL., Lapadat R.; Mitogen – activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science*. 2002; 298: 1911-2
- Jordan A., Wust P., Scholz R., Tesche B., Fahling H., Mitrovics T., Vogl T., Cervos-Navarro J., Felix R.; Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human carcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *Int J Hyperthermia*. 1996; 12: 705-22
- Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K.; Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*. 1997; 16: 3898-911
- Kalambur VS., Longmire EK., Bischof JC.; Cellular level loading and heating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2007; 23: 12329-36
- Kalish H., Arbab AS., Miller BR., Lewis BK., Zywicke HA., Bulte JW., Bryant LH Jr., Frank JA.; Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition. *Magn Reson Med*. 2003; 50: 275-82
- Kaur C., Sivakumar V., Zhang Y., Ling EA.; Hypoxia – induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia*. 2006; 54: 826-39
- Ke S., Wen X., Gurfinkel M., Charnsangavej C., Wallace S., Severick-Muraca EM., Li C.; Near-infrared optical imaging of epidermal growth factor receptor on breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 2003; 63: 7870-5
- Kerrebijn JD., Balm AJ., Knegt PP., Meeuwis CA., Drexhage HA.; Macrophage and dendritic cell infiltration in head and neck squamous – cell carcinoma; an immunohistochemical study. *Cancer Immunol Immunother*. 1994; 38: 31-7

- Kim S., Lim YT., Soltesz EG., De Grand AM., Lee J., Nakayama A., Parker JA., Mihaljevic T., Laurence RG., Dor DM., Cohn LH., Bawendi MG., Frangioni JV.; Near – infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 93-7
- Klein NA., Pergola GM., Tekmal RR., Montoya IA., Dey TD., Schenken RS.; Cytokine regulation of cellular proliferation in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 734: 322-32
- Klinke R., Pape HC., Silbernagel S.; *Physiologie.* 2005 Georg Thieme Verlag Stuttgart. 325
- Kooi ME., Cappendijk VC., Cleutjens KB., Kessels AG., Kitslaar PJ., Borgers M., Frederik PM., Daemen MJ., van Endelshoven JM.; Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in-vivo magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2003; 107: 2453-8
- Kovar JL., Volcheck WM., Chen J., Simpson MA.; Purification method directly influence effectiveness of an epidermal growth factor coupled targeting agent for noninvasive tumor detection in mice. *Anal Biochem.* 2007; 361: 47-54
- Kreft BP., Tanimoto A., Leffler S., Finn JP., Oksendal AN., Stark DD.; Contrast enhanced MR imaging of diffuse and focal splenic disease with use of magnetic starch microspheres. *J Magn Reson Imaging.* 1994; 4: 373-9
- Krieg FM., Andres RY., Winterhalter KH.; Superparamagnetically labelled neutrophils as potential abscess specific contrast agent for MRI. *Magn Reson Imaging.* 1995; 13: 393-400
- Kumasaka T., Doyle NA., Quinlan WM., Graham L., Doerschuk CM.; Role of CD11/CD18 in neutrophil emigration during acute and recurrent *Pseudomonas aeruginosa* induced pneumonia in rabbits. *Am J Pathol.* 1996; 148: 1297-305

Kwok S., Higuchi R.; Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989; 339; 237-8

LaConte LE., Nitin N., Zurkiya O., Caruntu D., O'Connor CJ., Hu X., Bao G.; Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R2 relaxivity. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 26: 1634-41

Lawaczeck R., Bauer H., Frenzel T., Hasegawa M., Ito Y., Kito K., Miwa N., Tsutsui H., Vogler H., Weinmann HJ.; Magnetic iron oxide particles coated with Carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical profile of SH U555A. *Acta Radiol*. 1997; 38: 584-97

Lee CT., Huang CP., Lee YD.; Preparation of amphiphilic poly(L-lactide) graft chondroitin sulfate copolymer self-aggregates and its aggregation behavior. *Biomacromolecules*. 2006; 7: 1179-86

Legrand C., Bour J.M., Jacob C., Capiamont J., Martial A., Marc A., Wudtke M., Kretzmer G., Demangel C., Duval D.; Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *Biotechnol*. 1993; 31: 234

Leu AJ., Berk DA., Lymboussaki A., Alitalo K., Jain RK.; Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*. 2000; 60: 4324-7

Li-Shishido S., Watanabe TM., Tada H., Higuchi H., Ohuchi N.; Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351: 7-13

Licha K., Riefke B., Ebert B., Grötzinger C.; Cyanine dyes as contrast agents in biomedical optical imaging. *Acad Radiol*. 2002; 9: 320-2

Lin EY., Pollard JW.; Macrophages: modulators of breast cancer progression. *Novartis Found Symp*. 2004; 256: 156-68

- Lind K., Kresse M., Debus NP., Müller RH.; A novel formulation for superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles enhancing MR lymphography: comparison of physicochemical properties and the in vivo behavior. *J Drug Target*. 2002; 10: 221-30
- Liu W., Howarth M., Greytak AB., Zheng Y., Nocera DG., Ting AY., Bawendi MG.; Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging. *J Am Chem Soc*. 2008; 130: 1274-84
- Liu Y., Cox SR., Morita T., Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*. 1995; 77: 638-43
- Lonardo F, Rusch V., Langenfeld J., Dmitrovsky E., Klimstra DS.; Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res*. 1999; 59: 2470-6
- Lorusso V., Pascolo L., Ferneti C., Anelli PL., Uggeri F., Tiribelli C.; Magnetic resonance contrast agents: from the bench to the patient. *Curr Pharm Des*. 2005; 11: 4079-98
- Lovric J., Bazzi HS., Cuie Y., Fortin GR., Winnik FM., Maysinger D.; Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J Mol Med*. 2005; 83: 377-85
- Lück M., Paulke BR., Schröder W., Blunk T., Müller RH.; Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res*. 1998; 39: 478-85
- Maher ER., Kaelin WG Jr.; von Hippel – Lindau disease. *Medicine (Baltimore)*. 1997; 76: 381-91
- Margolis DJ., Hoffman JM., Herfkens RJ., Jeffrey RB., Quon A., Gambhir SS.; Molecular imaging techniques in body imaging. *Radiology*. 2007; 245: 333-56

- Matuszewski L., Persigehl T., Wall A., Schwindt W., Tombach B., Fobker M., Poremba C., Ebert W., Heindel W., Bremer C.; Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection particle size and surface coating on labeling efficiency. *Radiology*. 2005; 235: 155-61
- Matuszewski L., Tombach B., Heindel W., Bremer C.; Molecular and parametric imaging with iron oxides. *Radiologe*. 2007; 47: 34-42
- Mattson G., Conklin E., Desai S., Nielander G., Savage MD., Morgensen S.; A practical approach to crosslinking. *Mol Biol Rep*. 1993; 17: 167-83
- Medinger M., Dreves J.; Receptor tyrosine kinases and anticancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2005; 11: 1139-49
- Medintz IL., Uyeda HT., Goldman ER., Mattoussi H.; Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater*. 2005; 4: 435-46
- Metz S., Bonaterra G., Rudelius M., Setles M., Rummeny EJ., Daldrup-Link HE.; Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol*. 2004; 14: 1851-8
- Meyn RE., Stephens LC., Hunter NR., Milas L.; Apoptosis in murine tumours treated with chemotherapy agents. *Anti-Cancer Drugs*. 1995; 6: 443-450
- Moghimi SM., Hunter AC., Dadswell CM., Savay S., Alving CR., Szebeni J.; Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor) induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1689: 103-13
- Moghimi SM., Hunter AC., Murray JC.; Long circulating and target specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 283-318

- Moore A., Weissleder R., Bagdanov A Jr.; Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxide in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging*. 1997; 7: 1140-5
- Moore A., Marecos E., Bogdanov A Jr., Weissleder R.; Tumoral distribution of long-circulating dextran coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology*. 2000; 214: 568-74
- Monaco C., Andreakos E., Kiriakidis S., Feldmann M., Paleolog E.; T – cell – mediated signaling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004; 3: 35-42
- Montesano R., Pepper MS., Möhle-Steinlein U., Risau W., Wagner EF., Orci L.; Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell*. 1990; 62: 435-45
- Moroz P., Jones SK., Gray BN.; Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol*. 2002; 80: 149-56
- Moschos SJ., Drogowski LM., Reppert SL., Kirkwood JM.; Integrins and cancer. *Oncology*. 2007; 21: 13-20
- Mowat P., Franconi F., Chapon C., Lemaire L., Dorat J., Hindre F., Benoit JP., Richomme P., Le Jeune JJ.; Evaluating SPIO labeled cell MR efficiency by three dimensional quantitative T2* MRI. *NMR Biomed*. 2007; 20: 21-7
- Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lexis C.J., and Waggoner A.S.; Cyanine dye labelling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconj. Chem*. 1993; 4: 105-111

- Mulder WJ., Strijkers GJ., van Tilborg GA., Griffioen AW., Nicolay K.; Lipid-based nanoparticles for contrast enhanced MRI and molecular imaging. *NMR Biomed.* 2006; 19: 142-64
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N.; Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006; 311; 622-7
- Neufeld G., Cohen T., Gitay – Goren H., Poltorak Z., Tessler S., Sharon R., Gengrinovitch S., Levi BZ.; Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer Metastasis Rev.* 1996; 15: 153-8
- Neuwelt EA., Varallyay P., Bago AG., Muldoon LL., Nesbit G., Nixon R.; Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004; 30: 456-71
- Ntziachristos V., Schellenberger EA., Ripoll J., Yessayan D., Graves E., Bogdanov A.Jr., Josephson L., Weissleder R.; Visualization of antitumor treatment by means of fluorescence molecular tomography with an annexin V – Cy5.5 conjugate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 12294-9
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.; Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 823-39
- Ogawara K., Yoshida M., Higaki K., Kimura T., Shiraishi K., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M.; Hepatic uptake of polystyrene microspheres in rats: effect of particle size on intrahepatic distribution. *J Control Release* 1999; 59: 15-22
- Oliva MR., Saini S.; Liver cancer imaging: role of CT, MRI, US and PET. *Cancer Imaging.* 2004; 4: 42-6
- Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R.F., Alitalo K., Eriksson U.; Vascular endothelial growth factor

- B, a novel growth factor for endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 2576-81
- Ortega N., Jonca F., Vincent S., Favard C., Ruchoux MM., Plouet J.; Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. Am J Pathol. 1997; 151: 1215-24
- Osterman HL., Schutz-Geschwender A.; Seeing beyond the visible with IRDye infrared dyes. LI-COR Bioscience. 2007
- Oswald P., Clement O., Chambon C., Schouman Claeys E., Fria G.; Liver positive enhancement after injection of superparamagnetic nanoparticles: respective role of circulating and uptaken particles. Magn Reson Imaging. 1997; 15: 1025-31
- Oude Engberink RD., van der Pol SM., Döpp EA., de Vries HE., Blezer EL.; Comparison of SPIO and USPIO for in vitro labeling of human monocytes: MR detection and cell function. Radiology. 2007; 243: 467-74
- Oxmann D., Held-Feindt J., Stark AM., Hattermann K., Yoneda T., Mentlein R.; Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. Oncogene. 2008; (ahead of print)
- Pajusola K., Aprelikova O., Korhonen J., Kaipainen A., Pertovaara L., Alitalo R., Alitalo K.; FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. Cancer Res. 1992; 52: 5738-43
- Panyam J., Labhasetwar V.; Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev. 2003; 55: 329-47

- Patz S., Hersman FW., Muradian I., Hrovat Ml., Ruset IC., Ketel S., Jacobson F., Topulos GP, Hatabu H., Butler JP.; Hyperpolarized (129)Xe MRI: A viable functional lung imaging modality? *Eur J Radiol.* 2007; 64: 335-44
- Päuser S., Reszka R., Wagner S., Wolf KJ., Buhr HJ., Berger G.; Liposome – encapsulated superparamagnetic iron oxide particles as markers in an MRI guided search for tumor specific drug carriers. *Anticancer Drug Des.* 1997; 12: 125-35
- Paweletz N., Knierim M.; Tumor – related angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1989; 9: 197-242
- Penfield JG., Reilly RF Jr.; What nephrologists need to know about gadolinium. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007; 3: 654-68
- Petrovsky A., Schellenberger E., Josephson L., Weissleder R., Bogdanov A Jr.; Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis. *Cancer Res.* 2003; 63: 1936-42
- Pintaske J., Bantleon R., Kehlbach R., Claussen CD., Wiskirchen J., Schick F.; Effect of concentration of SH U 555A labeled human melanoma cells on MR spin echo and gradient echo signal decay at 0.2, 1.5, 3T. *MAGMA.* 2006; 19:71-7
- Pioletti DP., Takei H., Kwon SY., Wood D., Sung KL.; The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 1999; 46: 399-407
- Price JE., Daniels LM., Campbell DE., Giavazzi R.; Organ distribution of experimental metastases of a human colorectal carcinoma injected in nude mice. *Clin Exp Metastasis.* 1989; 7: 55-68
- Prince MR., Zhang HL., Chabra SG., Jacobs P., Wang Y.; A pilot investigation of new superparamagnetic iron oxide (ferumoxytol) as a contrast agent for cardiovascular MRI. *J X-Ray Science Tech.* 2003; 11: 231-240

- Qian J., Yong KT., Roy I., Ohulchanskyy TY., Bergey EJ., Lee HH., Trampusch KM., He S., Maitra A., Prasad PN.; Imaging pancreatic cancer using surface functionalized quantum dots. *J Phys Chem B*. 2007; 111: 6969-72
- Quaia E.; Microbubble ultrasound contrast agents: an uptake. *Eur Radiol*. 2007; 17: 1995-2008
- Rad AM., Arbab AS., Iskander AS., Jiang Q., Soltanian Zadeh H.; Quantification of superparamagnetic iron oxide (SPIO) labelled cells using MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 26: 366-74
- Ramaswamy B., Elias AD., Kelbick NT., Dodley A., Morrow M., Hauger M., Allen J., Rhoades C., Kendra K., Chen HX., Eckhardt SG., Shapiro CL.; Phase II trial of bevacizumab in combination with weekly docetaxel in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 3124-9
- Rapp A., Hüttinger M.; Role of chondroitin sulphate in the uptake of beta-VLDL by brain cells. *Eur J Neurosci*. 2005; 22: 1400-8
- Patil S., Sandberg A., Heckert E., Self W., Seal S.; Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*. 2007; 28: 4600-7
- Pauwels EK., Erba P.; Towards the use of nanoparticles in cancer therapy and imaging. *Drug News Perspect*. 2007; 20: 213-20
- Raynal I., Prigent P., Peyramaure S., Najid A., Rebuzzi C., Corot C.; Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanism and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol*. 2004; 39: 56-63

- Reichenbach JR., Barth M., Haacke EM., Klarhöfer M., Kaiser WA., Moser E.; High – resolution MR venography at 3.0 Tesla. *J Comput Assist Tomogr.* 2000; 24: 949-57
- Rejman J., Oberle V., Zuhorn IS., Hoekstra D.; Size dependent internalization of particles via the pathway of clathrin and caveolae mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004; 377: 159-69
- Peng ZA., Peng X.; Formation of high quality CdTe, CdSe and CdS nanocrystals using CdO as precursor. *J Am Chem Soc.* 2001; 123: 183-4
- Ridley AJ.; Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic.* 2001; 2: 303-10
- Riener CK., Kada G., Gruber HJ.; Quick measurement of protein sulfhydryl with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem.* 2002; 373: 266-76
- Roberts MJ., Bentley MD., Harris JM.; Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54: 459-76
- Roca C., Adams RH.; Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* 2007; 21: 2511-24
- Roebuck MM., Helliwell TR., Chaudhry IH., Kaloqrianitis S., Carter S., Kemp GJ., Ritchie DA., Jane MJ., Frostick SP.; Matrix metalloproteinase expression is related to angiogenesis and histologic grade in spindle cell soft tissue neoplasms of the extremities. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123: 405-14
- Rosenthal EL., Kulbersh BD., King T., Chaudhuri TR., Zinn KR.; Use of fluorescent labeled anti-epidermal growth factor receptor antibody to image head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 1230-8

- Ruohola JK., Valve EM., Karkkainen MJ., Joukov V., Alitalo K., Härkönen PL.; Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 149: 29-40
- Ryuto M., Ono M., Izumi H., Yoshida S., Weich HA., Kohno K., Kuwano M.; Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem.* 1996; 271: 28220-8
- Saeed M., Wendland MF., Engelbrecht M., Sakuma H., Higgins CB.; Value of blood pool contrast agents in magnetic resonance angiographie of the pelvis and lower extremities. *Eur Radiol.* 1998; 8: 1047-53
- Sales KM., Winslet MC., Seifalian AM.; Stem Cells and Cancer: An Overview. *Stem Cell Rev.* 2007; 3: 249-55
- Savranoglu P., Obuz F., Karasu S., Coker A., Secil M., Sagol O., Igci E., Dicle O., Astarcioglu I.; The role of SPIO – enhanced MRI in the detection of malignant liver lesions. *Clin Imaging.* 2006; 30: 377-81
- Sawada M., Ono K., Suzuki H.; Targeting and imaging of brain specific cell migration. *Nippon Rinsho.* 2007; 65: 213-8
- Schipper ML., Cheng Z., Lee SW., Bentolila LA., Iyer G., Rao J., Chen X., Wu AM., Weiss S., Gambhir SS.; microPET – based biodistribution of quantum dots inkiving mice. *J Nucl Med.* 2007; 48: 1511-8
- Schmitz SA.; Iron oxide enhanced MR imaging of inflammatory atherosclerotic lesions: overview of experimental and initial clinical results. *Rofo.* 2003; 175: 469-76
- Schräder R.; Contrast material – induced renal failure: an overview. *J Interv Cardiol.* 2005; 18: 417-23

- Schulmann K., Reiser M., Schmiegel W.; Colonic cancer and polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002; 16: 91-114
- Seemann MD.; Whole body PET/MRI: the future in oncological imaging. *Technol Cancer Res Treat.* 2005; 4: 577-82
- Seger R., Krebs EG.; The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995 Jun;9(9):726-35
- Sevick-Muraca EM., Houston JP., Gurfinkel M.; Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents. *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6: 642-50
- Shapiro EM., Medford Davis LN., Fahmy TM., Dunbar CE., Koretsky AP.; Antibody mediated cell labeling of peripheral T cells with micro sized iron oxide particles (MPIOs) allows single cell detection by MRI. *Contrast Media Mol Imaging.* 2007; 2: 147-53
- Sharma P., Brown S., Walter G., Santra S., Moudgil B.; Nanoparticles for bioimaging. *Adv Colloid Interface Sci.* 2006; 16: 471-85
- Shi X., Thomas TP., Myc LA., Kotlyar A., Baker JR Jr.; Synthesis, characterization and intracellular uptake of carboxyl terminated poly (amidoamine) dendrimer stabilized iron oxide nanoparticles. *Phys Chem Chem Phys.* 2007; 9: 5712-20
- Shibuya M., Matsushime H., Yamane A., Ikeda T., Yoshida M.C., Tojo A.; Isolation and characterization of new mammalian kinase genes by cross hybridization with a tyrosine kinase probe. *Princess Takamatsu Symp.* 1989; 20: 103-10
- Shweiki D., Itin A., Neufeld G., Gitay-Goren H., Keshet E.; Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggests a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2235-43

- Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359: 843-5
- Sigal GB., Mrksich M., Whitesides GM.; Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. *J Am Chem Soc*. 1998; 120: 3464-3473
- Simon GH., Raatschen HJ., Wendland MF., von Vopelius Feldt J., Fu Y., Chen MH., Daldrup Link HE.; Ultrasmall superparamagnetic iron oxide enhanced MR imaging of normal bone marrow in rodents: original research. *Acad Radiol*. 2005; 12: 1190-7
- Soroceanu L., Gillespie Y., Khazaeli MB., Sontheimer H.; Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Res*. 1998; 58: 4871-9
- Southwick P.L., Ernst L.A., Tauriello E.W., Parker S.R., Mujumdar R.B., Mujumdar S.R., Clever H.A., and Waggoner A.S.; Cyanine dye labelling reagents – carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry*. 1990; 11: 418-430
- Spicer SS., Sato A., Vincent R., Eguchi M., Poon KC.; Lysosome enlargement in the Chediak-Higashi syndrome. *Fed Proc*. 1981; 40: 1451-5
- Strijkers GJ, Mulder WJ., van Tilborg GA., Nicolay K.; MRI contrast agents: current status and future perspectives. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007; 7: 291-305
- Sun R., Dittrich J., Le-Huu M., Mueller MM., Bedke J., Kartenbeck J., Lehmann WD., Krueger R., Bock M., Huss R., Seliger C., Gröne HJ., Misselwitz B., Semmler W., Kiessling F.; Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide and Ultrasmall superparamagnetic iron oxide labelled cells: a comparison. *Invest Radiol*. 2005; 40: 504-13
- Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Utoquchi N., Maruyama K.; Effective gene delivery with liposomal bubbles and ultrasound as novel non – viral system. *J Drug Target*. 2007; 15: 531-7

- Szebeni J.; The interaction of liposomes with the complement system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1998; 15: 57-88
- Talantov D., Baden J., Jatko T., Hahn K., Yu J., Raipurohit Y., Jiang Y., Choi C., Ross JS., Atkins D., Wang Y., Mazumder A.; A quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction assay to identify metastatic carcinoma tissue of origin. *J Mol Diagn.* 2006; 8: 320-9
- Tanimoto A., Pouliquen D., Kreft BP., Stark DD.; Effects of spatial distribution on proton relaxation enhancement by particulate iron oxide. *J Magn Reson Imaging.* 1994; 4: 653-7
- Tarentino AL., Phelan AW., Plummer TH Jr.; 2-Iminothiolane: a reagent for the introduction of sulphydryl groups into oligosaccharides derived from asparagines-linked glycans. *Glycobiology.* 1993; 3: 279-85
- Taupitz M., Schmitz S., Hamm B.; Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development. *Rofo.* 2003; 175: 752-65
- Taupitz M., Wagner S., Schnorr J., Kravec I., Pilgrim H., Bergmann-Fritsch H., Hamm B.; Phase I clinical evaluation of citrat-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* 2004; 39: 394-405
- Terman B.I., Carrion M.E., Kovacs E., Rasmussen B.A., Eddy R.L., Shows T.B.; Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991; 6: 1677-83
- Tischer E., Gospodarowicz D., Mitchell R., Silva M., Schilling J., Lau K., Crisp T., Fiddes JC., Abraham JA.; Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165: 1198-206

- Trachsel E., Neri D.; Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58: 735-54
- Tweedle MF; Stability of gadolinium chelates. *Br J Radiol.* 2007; 80: 583-4
- Valable S., Barbier EL., Bernaudin M., Roussel S., Segebarth C., Petit E., Remy C.; In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage.* 2007; 37: 47-58
- Van Beers BE., Pringot J., Gallez B.; Iron oxides as contrast agents for MRI of the liver. *J Radiol.* 1995; 76: 991-5
- Van den Bos EJ., Wagner A., Mahrholdt H., Thompson RB., Morimoto Y., Sutton BS., Judd RM., Taylor DA.; Improved efficacy of stem cell labeling for magnetic resonance imaging studies by the use of cationic liposomes. *Cell Transplant.* 2003; 12: 743-56
- Van Meir EG., Polverini PJ., Chazin VR., Huang HJ., Detribolet N., Cavenee WK.; Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat. Genet.* 1994; 8: 171-6
- Veisheh M., Gabikian P., Bahrami SB., Veisheh O., Zhang M., Hackman RC., Ravanpay AC., Stroud MR., Kusuma Y., Hansen SJ., Kwok D., Munoz NM., Sze RW., Grady WM., Greenberg NM., Ellenbogen RG., Olson JM.; Tumor paint: a chlorotoxin:Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res.* 2007; 67: 6882-8
- Verkhusha VV., Lukyanov KA.; The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 289-96
- Vertegel AA., Siegel RW., Dordick JS.; Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir.* 2004; 20: 6800-7

- Viau M., Zouali M.; Effect of the B cell superantigen protein A from *S. aureus* on the early lupus disease of (NZBxNZW) F1 mice. *Mol Immunol.* 2005; 42: 849-55
- Vuu K., Xie J., McDonald MA., Bernardo M., Hunter F., Zhang Y., Li K., Bednarski M., Guccione S.; Gadolinium rhodamine nanoparticles for cell labeling and tracking via magnetic resonance and optical imaging. *Bioconjug Chem.* 2005; 16: 995-9
- Von Kleist S., Chany E., Burtin P., King M., Fogh J.; Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 55: 555-60
- Wadghiri YZ., Sigurdsson EM., Sadowski M., Elliott JI., Li Y., Scholtzova H., Tang CY., Aguinaldo G., Pappolla M., Duff K., Wisniewski T., Turnbull DH.; Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Magn Reson Med.* 2003; 50: 293-302
- Wang M., Vogel I., Kalthoff H.; Correlation between metastatic potential and variants from colorectal tumor cell line HT-29. *World J Gastroenterol.* 2003; 9: 2627-31
- Wang SF., Tan YM.; A novel amperometric immunosensor based on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles/chitosan composite film for determination of ferritin. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 387: 703-8
- Wang YX., Hussain SM., Krestin GP.; Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol.* 2001; 11: 2319-31
- Weinmann HJ., Brasch RC., Press WR., Wesbey GE.; Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *AJR Am J Roentgenol.* 1984; 142: 619-24

- Weissleder R.; Target-specific superparamagnetic MR contrast agents. *Magn Reson Med.* 1991; 22: 209-12
- Weissleder R., Ntziachristos V.; Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med.* 2003; 9: 123-8
- Weissleder R., Stark DD., Engelstad BL., Bacon BR., Compton CC., White DL., Jacobs P., Lewis J.; Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol.* 1989; 152: 167-73
- Wessels JT., Busse AC., Mahrt J., Dullin C., Grabbe E., Mueller GA.; In vivo imaging in experimental preclinical tumor research – a review. *Cytometry A.* 2007; 71: 542-9
- Wessendorf M.W. and Brelje T.C.; Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry* 1992; 98: 81-85
- Wetterwald A., van der Pluijm G., Qui I., Sijmons B., Buijs J., Karperien M., Löwik CW., Gautschi E., Thalmann GN., Cecchini MG.; Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1143-53
- Widder DJ., Greif WL., Widder KJ., Edelman RR., Brady TJ.; Magnetic albumin microspheres: a new MR contrast material. *AJR Am J Roentgenol.* 1987; 148: 399-404
- Widmark JM.; Imaging – related medication: a class overview. *Proc.* 2007; 20: 408-17
- Wilhelm C., Billotey C., Roger J., Pons JN., Bacri JC., Gazeau F.; Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials.* 2003; 24: 1001-11

- Winter PM., Caruthers SD., Yu X., Song SK., Chen J., Miller B., Bulte JW., Robertson JD., Gaffney PJ., Wickline SA., Lanza GM.; Improved molecular imaging contrast agent for detection of human thrombus. *Magn Reson Med.* 2003; 50: 411-6
- Wissmann C., Höcker M.; VEGF-C, VEGF-D and VEGF-receptor 3: novel key regulators of lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Z Gastroenterol.* 2002; 40: 853-6
- Woodfin A., Voisin MB., Nourshargh S.; RECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2514-23
- Wu YL., Ye Q., Foley LM., Hitches TK, Sato K., Williams JB., Ho C.; In situ labelling of immune cells with iron oxide particles: an approach to detect organ rejection by cellular MRI. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 1852-7
- Yang RS., Chang LW., Wu JP., Tsai MH., Wang HJ., Kuo YC., Yeh TK., Yang CS., Lin P.; Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment. *Environ Health Perspect.* 2007; 115: 1339-43
- Yang R., Thomas GR., Bunting S., Ko A., Ferrara N., Keyt B., Ross J., Jin H.; Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; 27: 838-44
- Yeh TC., Zhang W., Ildstad ST., Ho C.; In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron oxide particles. *Magn Reson Med.* 1995; 33: 200-8
- Yin G., Liu Z., Zhan J., Ding F., Yuan N.; Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite. *Chem Eng J.* 2002; 87: 181-6

- Yoo B., Pagel MD.; An overview of responsive MRI contrast agents for molecular imaging. *Front Biosci.* 2008; 13: 1733-52
- Yorozuya K., Kubota T., Watanabe M., Hasegawa H., Ozawa S., Kitajima M., Chikahisa LM., Yamada Y.; TSU-68 (SU6668) inhibits local tumor growth and liver metastasis of human colon cancer xenografts via anti-angiogenesis. *Oncol Rep.* 2005; 14: 677-82
- Yoshida A., Anand-Apte B., Zetter BR.; Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors.* 1996; 13: 57-64
- Yu X., Song SK., Chen J., Scott MJ., Fuhrhop RJ., Hall CS., Gaffney PJ., Wickline SA., Lanza GM.; High resolution MRI characterization of human thrombus using a novel targeted paramagnetic contrast agent. *Magn Reson Med.* 2000; 44: 867-72
- Yue PY., Mak NK., Cheng YK., Leung KW., Ng TB., Fan DT., Yeung HW., Wong RN.; Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulation and steroid-like activities of ginsenosides. *Chin Med.* 2007; 15: 2-6
- Zachary I.; VEGF signaling: integration and multi – tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 1171-7
- Zelivyanskaya ML., Nelson JA., Poluektova L., Uberti M., Mellon M., Gendelman HE., Boska MD.; Tracking superparamagnetic iron oxide labeled monocytes in brain by high-field magnetic resonance imaging. *J Neurosci Res.* 2003; 73: 284-95
- Zhang LW., Yu WW., Colvin VL., Monteiro-Riviere NA.; Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; (ahead of print)

- Zhang Y., Kohler N., Zhang M.; Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*. 2002; 23: 1553-61
- Zhang ZY., Smith BD.; High generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model. *Bioconjug Chem*. 2000; 11: 805-14
- Zhao Q., Ishibashi M., Hiasa K., Tan C., Takeshita A., Egashira K.; Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II induced vascular inflammation and remodeling. *Hypertension*. 2004; 44: 264-70
- Zhao M., Beauregard DA., Loizou L., Davletov B., Brindle KM.; Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nat Med*. 2001; 7: 1241-4
- Zhou M., Nakatani E., Gronenberg LS., Tokimoto T., Wirth MJ., Hruby VJ., Roberts A., Lynch RM., Ghosh I.; Peptide – labeled quantum dots for imaging GPCRs in whole cells and as single molecules. *Bioconjug Chem*. 2007; 18: 323-32

Abbildungsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Einflussfaktoren auf die Angiogenese	1
1.2. Zellulärer Verlauf der Angiogenese	2
1.3. Tertiärstruktur des VEGF-A	4
1.4.A Alternatives Spleißen des primären Transkriptes von VEGF	4
1.4.B Primärsequenz von VEGF-A ₁₆₅	4
1.5. Das VEGF/VEGF-Rezeptor Schema	6
1.6. Verschiedene Strukturen von Jodhaltigen-Kontrastmitteln in der Röntgendiagnostik	10
1.7.A Schema des Gentransfers in Zellen mit Hilfe von Microbubbles	12
1.7.B Struktur eines spezifischen Microbubbles	12
1.8. Präzessionsbewegung des Atomkerns durch das statische Magnetfeld B_0	13
1.9. Induktion einer Spannung durch die Quermagnetisierung m_T	14
1.10. Stokes-Differenz	21
1.11.A Absorptionseigenschaften von verschiedenen gebräuchlichen Farbstoffen im Bereich zwischen 350 und 900 nm und Absorption des Lichtes im Gewebe	21
1.11.B Molare Extinktionskoeffizienten von Hämoglobin, oxygeniertem Hämoglobin und Wasser im Bereich zwischen 400 und 1000 nm	21
2. Material und Methoden	
2.1. Anwendung der TaqMan Sonde	42
2.2. Positionierung der Nitrocellulose während des Blottes	49
2.3. Reaktion des zyklischen Diacylhydrazid (Luminol)	50
2.4. Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops	60
2.5. Schema der Kopplung von Eisenoxidnanopartikeln mit Dextranhülle durch den Einsatz von Bromcyan	63
2.6. Schematische Darstellung der Ultrafiltration-Apparatur	65
	209

2.7.	Darstellung des PET-Membran-Halterungssystems	66
2.8.	Struktur des Cy5 und Cy7	70
2.9.	Spektrum des Cy5 NHS-Esters	71
2.10.	Spektrum des Cy7 NHS-Esters	71
2.11.	Struktur des IRDye 800CW NHS-Esters	72
2.12.	Spektrum des IRDye 800CW NHS-Esters	73
2.13.	Konjugation mittels N-hydroxysuccinimidylester	74
2.14.	Absorptions- und Emissionsspektrum vom „Jonamac Red“ Quantum Dot	76
2.15.	Einführung von SH-Gruppen. Reaktion des 2-Iminothiolan (Traut Reagenz) mit primären Aminogruppen	77
2.16.	Struktur von Sulfo-SMCC	78
2.17.	Schema der Quantum Dot-Konjugation	79
2.18.	Reaktion der Ellman Reagenz mit SH-Gruppen	80
3.	Ergebnisse	
3.1.	Aufnahme von verschiedenen Eisenoxidnanopartikeln mit identischer Eisenkonzentration in U118 Gliomazellen und humanen Endothelzellen (HUVEC)	83
3.2.	Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln in verschiedenen Eisenkonzentrationen in U118 Gliomazellen	84
3.3.	Kinetik der Partikelaufnahme in U118 Gliomazellen bei einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml	85
3.4.	Verweildauer der verschiedenen Eisenoxidnanopartikel in U118 Gliomazellen	86
3.5.	Toxizität der Nanopartikel gemessen durch die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) in-vitro an U118 Gliomazellen	87
3.6.	Toxizität der Nanopartikel bestimmt durch den Einfluss auf die Proliferation von HT-29 Kolonkarzinomzellen	88
3.7.	Eisenfärbung von U118 Gliomazellen nach einer Inkubation mit den Eisenoxidnanopartikeln	90
3.8.	TEM-Untersuchung von U118 Gliomazellen nach Inkubation mit den Eisenoxidnanopartikeln	91
		210

3.9.	Bestimmung der Nachweisgrenze für Resovist auf Monolayers PET-Membranen unter Verwendung von U118 Gliomazellen	93
3.10.	Nachweis verschiedener Eisenoxidnanopartikel auf Monolayer mit Hilfe der PET-Membranen	94
3.11.	Überblick über das Expressionsverhalten von vier verschiedenen Oberflächenmarkern für sechs Zelllinien	95
3.12.	Vergleich der Expression von mVEGF-Rezeptor-1 und -2 zwischen gesunder und metastasierter Leber	97
3.13.	HE-Färbung einer gesunden und einer metastasierten Leber	97
3.14.	Immunhistochemie von gesunder und metastasierter Leber unter Verwendung der mVEGFR-1 und -2 Antikörper	98
3.15.	PCS-Messung der N100 (A), N70 (B) und N20 (C) Partikel	99
3.16.	Elektronenmikroskopieaufnahmen von Partikeln N20, N70, N100 und Resovist	100
3.17.	„Dot-Spot-Test“ verschiedener Fraktionen einer anti-hVEGF-Rezeptor-2-N100-Kopplung	101
3.18.	Western Blot gegen pERK1/2 und Re-Blot gegen ERK2 von HUVEC's nach einer Stimulierung mit dem VEGF-N100-Konjugat	102
3.19.	PCS-Messungen des VEGF-N100 Konjugates (A), des Albumin-N100 Konjugates (B), des VEGFR-2 Antikörper-N100 Konjugates (C) und des IgG-N100 Konjugates (D)	103
3.20.	Kinetik der Aufnahme von VEGF- und Albumin-N100 Konjugaten in HUVEC's	104
3.21.	Aufnahme unterschiedlicher Nanopartikelkonjugate in HUVEC und bEnd3 Zellen nach einer Stunde	105
3.22.	Eisenfärbung und anschließende Gegenfärbung mit Kernechtrot von HUVEC's nach einer Inkubation mit dem VEGF-N100 bzw. dem Albumin-N100 Konjugat	106
3.23.	Elektronenmikroskopische Aufnahme von bEnd3 Zellen nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen N100 Konjugaten	107

3.24.	Abhängigkeit der Delta R2* Werten der MRT-Messung von den Eisenkonzentrationen der N100 Partikel	108
3.25.	3T-MRT-Aufnahme von 50.000 HUVEC's als Monolayer auf PET-Membranen, die mit VEGF-, Albumin-, anti-VEGFR-2 Antikörper- bzw. IgG-Konjugaten, sowie Resovist eine Stunde inkubiert wurden	110
3.26.	Injektion von 10 µg Fe Resovist, N20 bzw. N70 in die Schwanzvene von jeweils zwei Mäusen. T2*-gewichteten MRT-Messungen von der Leber	112
3.27.	Kontrastverlauf in der MRT-Messung während der Injektion der N100-VEGF Konjugate	114
3.28.	Zeitlicher Verlauf der Kontrastierung der Leber nach einer Injektion des N100-VEGF-Konjugates in drei Mäusen	116
3.29.	Übersicht über die gemessenen T2*-Werte der Leber von drei Mäusen	116
3.30.	TEM- Untersuchung der Wirkung von Blutplasma und seinen Bestandteil Fibrinogen auf die N100-Partikel	117
3.31.	Western Blot gegen pERK1/2 von HUVEC's nach einer Stimulierung mit den Quantum Dot-VEGF-Konjugat	118
3.32.	Überprüfung der Bindungsaktivität des Quantum Dot-VEGF-Konjugates	119
3.33.	Untersuchung auf unspezifischen Bindungen durch das Quantum Dots-Albumin-Konjugat	120
3.34.	Negativkontrolle für die Quantum Dots-Konjugate	121
3.35.	Western Blot gegen pERK1/2 von HUVEC's nach der Stimulierung mit dem Cy5-VEGF-Konjugat	122
3.36.	Überprüfung der Bindungsaktivität des Cy5-VEGF-Konjugates	123
3.37.	Überprüfung der Bindungsaktivität des Cy5-Albumin-Konjugates	124
3.38.	Negativkontrolle für die Cy5-Konjugate	125
3.39.	Untersuchung des Cy5-VEGF-Konjugates und des Quantum Dot-VEGF-Konjugates bei gleicher Belichtungszeit	126

3.40.	Western Blot gegen pERK1/2 von HUVEC's nach einer Stimulierung mit dem IRDye 800CW-VEGF-Konjugat	127
3.41.	Detektion des IRDye 800CW-VEGF-Konjugates in HUVEC's	128
3.42.	Verweildauer verschiedener IRDye 800CW-Konjugate in HUVEC's	129
3.43.	Verdrängung der VEGF-Konjugate durch die Zugabe von ungekoppelten VEGF	131
4.	Diskussion	
4.1.	Eisenoxidnanopartikel mit konjugierten Antikörpern	146
4.2.	Signalkaskade des VEGF-Rezeptors-2	147
4.3.	Detektion der Angiogenese durch Eisenoxidnanopartikelkonjugate	154

Tabellenverzeichnis

	Seite
2. Material und Methoden	
2.1. Übersicht über verwendete Antikörper	27
2.2. Übersicht über verwendete Fluoreszenzmarker	27
2.3. Zusammensetzung des DNase Verdaus	38
2.4. Zusammensetzung des RQ1 Dnase 10 x Reaktionspuffer	38
2.5. Verlauf der Reversen Transkription	39
2.6. Ansatz für die quantitative RT-PCR	42
2.7. TaqMan Gen Expression Assays für die quantitative RT-PCR	44
2.8. Programm der quantitativen RT-PCR	44
2.9. Pipettierschema der Proteinbestimmung	46
2.10. Zusammensetzung des Probenpuffers	46
2.11. Bestandteile eines 10%igen Polyacrylamidgeles	47
2.12. Zusammensetzung des Elektrodenpuffers	48
2.13. Zusammensetzung des Transferpuffers	49
2.14. Programm des Western Blottes	49
2.15. Eingesetzte Antikörper während Western Blot	51
2.16. Eingesetzte Antikörper in der Immunhistochemie	53
2.17. Pipettierschema für den CyQuant Proliferationstest	55
2.18. Eigenschaften und Hersteller der verwendeten Eisenoxidnanopartikel	57
2.19. Übersicht über die verwendeten Mäuse	68
2.20. Zusammenfassung der Eigenschaften der zwei verwendeten Cyaninfarbstoffe	70
2.21. Übersicht über die Eigenschaften des IRDye 800CW NHS-Esters	72
2.22. Übersicht über die Eigenschaften der Quantum Dots (Jonamac Red)	76
2.23. Reaktionsansatz für die Einführung von SH-Gruppen auf die Oberfläche der Quantum Dots	77

3. Ergebnisse

3.1.	r_2 -Relaxivitäten der einzelnen Eisenoxidnanopartikel	92
3.2.	Bestimmung der von den Zellen aufgenommenen Eisenmenge durch die MRT nach Einsatz von verschiedenen N100-Konjugaten	110

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Mentlein gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Beitz für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Frau Martina Burmester bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit während der molekularbiologischen Arbeiten. Frau Miriam Lemmer danke ich für die Unterstützung im Rahmen der zellbiologischen Untersuchungen und Frau Ulla Prange für die Gewährleistung einer reibungslosen und komfortablen Laborarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Daniel Oxmann für die Geduld und Unterstützung während diversen, vielseitigen Problemstellungen.

Dankbar bin ich ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Professor Mentlein, die durch anregende fachliche Diskussionen und durch das freundschaftliche Arbeitsklima für eine angenehme Atmosphäre während der Erstellung dieser Arbeit sorgte.

Mein Dank gilt weiterhin dem Wirtschaftsministerium Schleswig Holstein, das die Untersuchungen im Rahmen des „Molecular Imaging in the North – MOIN“ Programmes unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen nun schon seit fast 28 Jahren unermüdlich unterstützen.

Lebenslauf

Name		Thomas Schlorf
Anschrift		Samwerstraße 21 24118 Kiel
Geboren		07.06.1980 in Schwerin
Familienstand		ledig
Staatsangehörigkeit		deutsch
Hochschulausbildung	seit 10/2005	Promotion am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel Arbeitsgruppe: Mentlein
	10/2000 – 08/2005	Studium der Biochemie an der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Diplom Note: sehr gut Diplomarbeit bei Prof. Dr. Friedrich Paulsen Thema: Antimikrobielle Peptide im Auge
Grundwehrdienst	11/1999 – 08/2000	Hamburg
Schulausbildung	08/1993 – 08/1999	Sportgymnasium Schwerin Abschluss: Abitur
	08/1987 – 08/1993	Waleri Bykowski Schule

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Dissertation wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Weiterhin erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den

.....

(Thomas Schlorf)