

**Untersuchungen zur Etablierung
CEACAM1-bindender Partikel für die bildgebende
Diagnostik des Prostatakarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

Fakultät für Chemie
der Universität Duisburg-Essen

Angefertigt am Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Jens Moser

aus Bremerhaven

Essen, im November 2013

Die praktische Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2007 bis April 2010 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ergün am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen der Universität Duisburg-Essen, unter der Anleitung von PD Dr. rer. nat. Bernhard B. Singer, durchgeführt. Die Finanzierung des Projektes erfolgte durch die Siemens AG.

Gutachter: PD Dr. Singer
Prof. Dr. Epple
Vorsitzende: Prof. Dr. Siebers

Tag der Disputation: 24.03.2014

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Des Weiteren versichere ich, dass alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet sind.

(Jens Moser)

Dortmund, 02.11.2013.

Meiner Familie

Ergebnisse dieser Arbeit sind wie folgt vorgestellt worden:

„Molecular imaging of tumor blood vessels via anti-CEACAM1 antibodies coupled on microbubbles“,
Poster beim Forschungstag des Universitätsklinikums Essen, 2008 in Essen.

„Molecular imaging of tumor blood vessels via microparticles targeting the endothelial CEACAM1“,
Poster und Vortrag beim 19th Annual International CEA Symposium, 2009 in Essen/Bochum.

„Molecular imaging of tumor blood vessels via microparticles targeting endothelial CEACAM1“,
Poster beim Forschungstag des Universitätsklinikums Essen, 2009 in Essen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Materialien	10
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	10
2.2. Geräte	13
2.3. Zelllinien	15
2.4. Proteinkonstrukte	15
2.5. Antikörper	16
2.6. Puffer	17
3. Methoden	18
3.1. Herstellung der Antikörper	18
3.1.1. Kultivierung von Hybridomazellen	18
3.1.2. Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie	18
3.1.3. Funktionalisierung der Antikörper	19
3.1.3.1. Kopplung von Biotin	19
3.1.3.2. Kopplung von Fluorescein	20
3.2. Bindung von Antikörpern an Partikel	20
3.2.1. Kopplung von Antikörper an SonoVue® [SV]	20
3.2.1.1. Kopplung von Antikörper 18/20Fluo	20
3.2.2. Kopplung von Antikörper an Targestar-B [TS]	21
3.2.2.1. Kopplung von Antikörper Bio18/20Fluo	21
3.2.3. Kopplung von Antikörper an Dynabeads® M-280 Streptavidin [SDB]	22
3.2.3.1. Kopplung von Antikörper Bio18/20Fluo	22
3.2.3.2. Kopplung von Antikörper Bio6/40cFluo	22
3.2.4. Kopplung von Antikörper an Roti®-MagBeads Protein G [RPGB]	22
3.2.4.1. Kopplung von Antikörper 18/20Fluo und chemische Kreuzvernetzung mit BS ³	22
3.2.4.2. Kopplung von Antikörper 6/40cFluo und chemische Kreuzvernetzung mit BS ³	23
3.2.5. Kopplung von Antikörper an µMACS™ Protein G MicroBeads [MPGB]	23
3.2.5.1. Kopplung von Antikörper 18/20Fluo	23
3.2.5.2. Kopplung von Antikörper 6/40cFluo	24
3.3. Zellkultur	24
3.3.1. Kultivierung von HeLa- Zelllinien	24
3.3.2. Kultivierung von AS-M.5 Zellen	25

3.3.3.	Lyse von HeLa Zellen	26
3.4.	Proteinbiochemische Methoden	26
3.4.1.	Proteinauftrennung mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese	26
3.4.2.	Charakterisierung elektrophoretisch getrennter Proteine	27
3.4.2.1.	Coomassie Brilliant Blau Färbung von Polyacrylamidgelen	27
3.4.2.2.	Western-Blot	28
3.4.3.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	28
3.4.4.	Bestimmung der Biotinininsertion	29
3.4.5.	Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA)	29
3.5.	Durchflusszytometrie	31
3.5.1.	Analyse antikörperbeladener Partikel	31
3.5.1.1.	Analyse antikörperbeladener [SV] und [TS] Partikel	32
3.5.1.2.	Analyse antikörperbeladener [SDB] und [RPGb] Partikel	32
3.5.2.	Analyse von Zellen nach der Antikörper- bzw. Partikelbindung	33
3.5.2.1.	Analyse der Zellbindung von [CD31 MicroBead] Partikeln	33
3.5.2.2.	Analyse der Bindung von Antikörpern an Zellen	33
3.5.2.3.	Analyse der Zellbindung von [SV] und [TS] Partikeln	34
3.5.2.4.	Analyse der Zellbindung von [SDB], [RPGb] und [MPGB] Partikeln	35
3.6.	Fluoreszenzmikroskopie	35
3.6.1.	Bindungsuntersuchungen mit AS-M.5 Zellen	35
3.6.2.	Bindungsuntersuchungen mit HeLa Zellen	36
3.6.3.	Bindungsuntersuchung mit HeLa Zellen unter Flußbedingungen	37
4.	Ergebnisse	39
4.1.	Bindung von [CD31 MicroBead] Partikeln an AS-M.5 Zellen	42
4.1.1.	Ergebnisse der Durchflusszytometrie	42
4.1.2.	Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie	44
4.2.	Modifizierung von 18/20 und 6/40c Antikörpern	45
4.2.1.	Untersuchung der Antikörper–Antigen-Bindung mittels Sandwich ELISA	46
4.2.2.	Untersuchung der Antikörper – Zell Bindung mittels Durchflusszytometrie	47
4.2.3.	Untersuchung der Antikörper Bindung an adhärenente Zell-Monolayer	49
4.2.3.1.	Bindung von 18/20 Antikörpern an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen	49
4.2.3.2.	Bindung von 6/40c Antikörpern an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen	51
4.3.	Herstellung antikörperbeladener [SV] Partikel	53
4.3.1.	Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [SV] Partikeln	54

4.4.	Herstellung antikörperbeladener [TS] Partikel	61
4.4.1.	Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [TS] Partikel	62
4.4.2.	Untersuchung der [TS-AK] Interaktion an Zellen in Suspension	66
4.4.2.1.	[TSBio18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen	66
4.4.3.	Untersuchung der [TS-AK] Bindung an adhärenente Zell-Monolayer	70
4.4.3.1.	[TSBio18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen	70
4.5.	Herstellung antikörperbeladener [SDB] Partikel	74
4.5.1.	Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [SDB] Partikel	76
4.5.2.	Bindungsanalyse von [SDB-AK] Partikeln an Antigen mittels ELISA	80
4.5.3.	Untersuchung der [SDB-AK] Interaktion an Zellen in Suspension	81
4.5.3.1.	[SDBBio18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen	82
4.5.3.2.	[SDBBio6/40cFluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellsuspensionen	85
4.5.4.	Untersuchung der [SDB-AK] Bindung an adhärenente Zell-Monolayer	89
4.5.4.1.	[SDBBio18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen	89
4.5.4.2.	[SDBBio6/40cFluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen	91
4.6.	Herstellung antikörperbeladener [RPGB] Partikel	95
4.6.1.	Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [RPGB] Partikeln	96
4.6.2.	Bindungsanalyse von [RPGB-AK] Partikel an Antigen mittels ELISA	100
4.6.3.	Untersuchung der [RPGB-AK] Interaktion an Zellen in Suspension	101
4.6.3.1.	[RPGB18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen	102
4.6.3.2.	[RPGB6/40cFluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellsuspensionen	106
4.6.4.	Untersuchung der [RPGB-AK] Bindung an adhärenente Zell-Monolayer	109
4.6.4.1.	[RPGB18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen	110
4.6.4.2.	[RPGB6/40cFluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen	112
4.7.	Herstellung antikörperbeladener [MPGB] Partikel	115
4.7.1.	Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [MPGB] Partikeln	116
4.7.2.	Bindungsanalyse von [MPGB-AK] Partikeln an Antigen mittels ELISA	119
4.7.3.	Untersuchung der [MPGB-AK] Interaktion an Zellen in Suspension	121
4.7.3.1.	[MPGB18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen	122
4.7.3.2.	[MPGB6/40cFluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellsuspensionen	126
4.7.4.	Untersuchung der [MPGB-AK] Bindung an adhärenente Zell-Monolayer	130
4.7.4.1.	[MPGB18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen	130
4.7.4.2.	[MPGB6/40cFluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen	132
5.	Diskussion	136

6. Zusammenfassung	159
7. Summary	162
8. Literaturverzeichnis	164
9. Anhang	175

A

ad	addiere
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS-M.5	Zellklon einer humanen Endothelzelllinie eines Angiosarkoms der Kopfhaut

B

BCA	Bicinchoninsäure
BGG	Rinder Gamma Globulin <i>(bovine gamma globulin)</i>
BioAK	Biotinylierter Antikörper
BME	2-Mercaptoethanol
BS ³	Bis[sulfosuccinimidyl]suberat
BSA	Rinder Serum Albumin <i>(bovine serum albumin)</i>

C

CD31	Gruppe der Differenzierung 31, alternative Bezeichnung für PECAM-1 <i>(cluster of differentiation 31)</i>
CD66a	Gruppe der Differenzierung 66a, alternative Bezeichnung für CEACAM1 <i>(cluster of differentiation 66a)</i>
CEA	Carcinoembryonale Antigene
CEACAM1	Carcinoembryonale Antigen zugehörige Zelladhäsionsmolekül 1 <i>(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)</i>
cgs	Zentimeter, Gramm, Sekunde (Einheitensystem) <i>(centimeter, gram, second)</i>
CLSM	Konfokales Laser-Abtastung-Mikroskop <i>(confocal laser scanning microscope)</i>
CT	Computertomographie

D

Da	Dalton
DF	Durchfluß
DLS	Dynamische Lichtstreuung <i>(dynamic light scattering)</i>

DMEM	Dulbecco's Modifizierte Adler Medium <i>(Dulbecco's Modified Eagle Medium)</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung <i>(dulbecco's phosphate buffered saline)</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
DW-MRT	Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomografie <i>(diffusion-weighted magnetic resonance imaging)</i>
dyn	cgs-Einheit der Kraft
E	
ECL	Erhöhte Chemilumineszenz <i>(enhanced chemiluminescence)</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppeltes Immunonachweisverfahren <i>(enzyme-linked immunosorbent assay)</i>
EP	Elutionspuffer
<i>et al.</i>	Und andere (lateinisch)
F	
Fab	Antigenbindendes Fragment, Antikörper <i>(antigen-binding fragment)</i>
Fc	Kristallisierbares Fragment, Antikörper <i>(crystallisable fragment)</i>
FCS-HI	Fetales Kälberserum Hitze-Inaktiviert <i>(fetal calf serum heat inactivated)</i>
Fe ₃ O ₄	Magnetit
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FluoAK	Fluoresceingebundener Antikörpers
G	
G418	Geneticin (Antibiotikum)

g	Erdbeschleunigung
Gb3	Globotriaosylceramid
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
Grün	Spektralbereich von 505 – 525 nm bei der Fluoreszenzmikroskopie

H

h	Stunde <i>(hour)</i>
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure <i>(2-(4'-hydroxybenzeneazo)benzoic acid)</i>
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidin Medium
hCG	humane Choriongonadotropin
HeLa	Menschliche Epithelzelle eines Zervixkarzinoms
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase <i>(horseradish peroxidase)</i>
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>(high-performance liquid chromatography)</i>
HS-Gruppe	Thiolgruppe
HT29	Endothelzelllinie des Kolorektalen Karzinoms

I

Ig	Immunglobulin
IgC2	Konstante Immunglobulin-Typ 2-Domäne
IgV	Variable Immunglobulin Domäne
IL-8	Interleukin-8
<i>in vitro</i>	Im Glas (lateinisch)
<i>in vivo</i>	Im Lebendigen (lateinisch)
ITAM	Tyrosinbasiertes Immunorezeptor Aktivierendes Motiv
ITIM	Tyrosinbasiertes Immunorezeptor Inhibierendes Motiv

K

K _a	Assoziationskonstante (Bindungskonstante)
----------------	-------------------------------------------

kDa	Kilodalton
KR	Kopplungsreagenz
L	
LN-MRT	Lymphotrope-Nanopartikelverstärkte-MRT <i>(lymphotrophic nanoparticle-enhanced mri)</i>
LP	Lagerpuffer
LS-Säule	Magnetische Säule der Firma Miltenyi
M	
M _w	Molekulargewicht <i>(molecular weight)</i>
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein, Signaltransduktionsweg <i>(mitogen-activated protein)</i>
MB	Mikrobläschen
MICAD	Datenbank molekularer Bildgebung und Kontrastmittel <i>(Molecular Imaging and Contrast Agent Database)</i>
min	Minute <i>(minute)</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
[MPGB]	μMACS™ Protein G MicroBeads
MRT	Magnetresonanztomographie
MSCT	Mehrschicht-Spiral-Computertomographie <i>(multislice computed tomography)</i>
MWCO	Molekulargewicht-Ausschlussgrenze <i>(molecular weight cut off)</i>
N	
n	Anzahl
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK	Negativkontrolle
O	
OD	optische Dichte

P

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung <i>(phosphate buffered saline)</i>
PECAM-1	Blutplättchenendothel Zelladhäsionsmolekül 1 <i>(platelet endothelial cell adhesion molecule 1)</i>
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Ph	Phasenkontrast
PK	Positivkontrolle
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
prim.	Primär
PSA	Prostata Spezifisches Antigen
PSG	Schwangerschaftsspezifische Glycoproteine <i>(pregnancy specific glycoproteins)</i>

R

RES	Retikuloendotheliales System
RIPA	Radioimmunoprecipitation Analysenpuffer <i>(radioimmunoprecipitation assay buffer)</i>
RPGB	Roti [®] -MagBeads Protein G
rpm	Umdrehungen pro Minute <i>(rounds per minute)</i>
RRL-Peptid	Arginin-Arginin-Leucin Peptid
RT	Raumtemperatur

S

s	Sekunde <i>(second)</i>
[SDB]	Dynabeads [®] M-280 Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat <i>(sodium dodecyl sulfate)</i>
sek.	Sekundär

SHP	Src-homologe Phosphatase <i>(src homology phosphatase)</i>
SPIO	Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel <i>(superparamagnetic iron oxide nanoparticles)</i>
Src	Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
ST _x B	Shiga Toxin B Untereinheit
[SV]	SonoVue [®]
T	
T	Temperatur
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung <i>(tris buffered saline)</i>
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor <i>(transforming growth factor)</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TRUS	Transrektale Ultraschalluntersuchung
[TS]	Targstar-B Mikrobäschen
U	
U	Einheit oder auch Unterstand <i>(unit)</i>
Ü	Überstand
US	Ultraschall
V	
V	Volt
VEGF	Vaskuläres Endothel stimulierender Wachstumsfaktor <i>(vascular endothelial growth factor)</i>
vgl.	Vergleiche
v/v	Volumenprozent <i>(volume per volume)</i>

W

W	Waschfraktion
WP	Waschpuffer
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)

1. Einleitung

Die geschätzte Zahl der Krebstoten lag im Jahr 2008 bei weltweit ca. 7,6 Millionen und die Zahl der Krebsneuerkrankungen bei ca. 12,7 Millionen.^[1] In Deutschland liegt die geschätzte Zahl der jährlichen Krebstoten seit den 1980er Jahren bei über 200000^[2] mit einer steigenden Zahl an jährlichen Neuerkrankungen, die für das Jahr 2006 bei über 420000 lag.^[3] Dabei bildet der Prostatakrebs in Deutschland, und auch in Europa, die häufigste Krebserkrankung bei Männern mit ca. 60000 Neuerkrankungen im Jahr.^[3,4] Sie ist für ca. 10 % aller krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich.^[3,5] In den letzten Jahren haben zwar Programme zur Früherkennung und moderne Diagnosemethoden dazu geführt, dass die Aussicht auf eine erfolgreiche Behandlung von Prostatakrebs gestiegen ist, aber die Kenntnisse über die Prädisposition und vermeintlichen Risikofaktoren sind immer noch begrenzt. Zu den Faktoren, die zu einem erhöhten Prostatakrebsrisiko führen, zählen neben dem Alter auch Ernährung, Alkoholkonsum, UV-Strahlung und genetische Faktoren.^[6] Da Prostatakrebs eine lange Latenzzeit aufweist, kann die Krankheit bereits früh durch Screening-Verfahren diagnostiziert werden. Eine frühestmögliche Diagnose ist hierbei entscheidend für eine positive Prognose für den Patienten. Als Screening-Verfahren werden hier die digitale Rektaluntersuchung in Kombination mit dem Nachweis des Prostata-spezifischen Antigens (PSA), welches ausschließlich in der Prostata drüse produziert wird, angewandt.^[7] Allerdings ist der PSA-Test umstritten, da das PSA zwar einfach im Serum nachgewiesen werden kann, eine Erhöhung der Serum-PSA Konzentration jedoch lediglich auf eine Anomalie in der Prostata hinweist. Diese Anomalie kann jedoch nicht nur durch Prostatakrebs, sondern auch durch eine gutartige Vergrößerung oder Entzündung hervorgerufen werden, wie sie zum Teil nach intensivem Radfahren zu beobachten ist.^[7,8] Mit Hilfe des PSA-Tests kann demnach nicht zwischen einer letalen und einer nicht letalen Krankheit unterschieden werden.^[8] Dies hat zur Folge, dass Männer mit einer nicht letalen Krankheit aufgrund einer erhöhten Serum-PSA Konzentration „überdiagnostiziert“ und womöglich „überbehandelt“ werden, da bei ihnen eine falsch-positive Diagnose gestellt wird.^[7] Eine eindeutige Diagnose des Prostatakrebses ist, unter Verwendung von Tumormarkern wie PSA, deshalb immer noch nicht möglich. Aber gerade eine frühzeitige und gesicherte Diagnose ist für eine erfolgreiche Tumorbehandlung nötig. Dies soll durch die Verwendung von Neoangiogenesemarkern zur Tumordetektion gewährleistet werden.

Als Neoangiogenese bezeichnet man die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Diese findet im adulten Leben, neben der Wundheilung, auch im Zusammenhang der Gefäßneubildung bei tumorösen Erkrankungen statt. Ab einer kritischen Größe von 3 - 5 mm müssen Tumore ein eigenes mikrovaskuläres Blutgefäßsystem aufbauen, um weiterhin lebensfähig zu sein. Die Diffusion zur alleinigen Versorgung des Tumors reicht ab dieser Größe nicht mehr aus und nur durch den Anschluss an das Blutgefäßsystem wird weiteres Tumorwachstum und eine Metastasierung

ermöglicht.^[9] Dieser Prozess wird durch eine Reihe von Mediatoren wie VEGF, TGF, HIF oder MMPs gesteuert, welche nicht nur von den Tumorzellen, sondern auch von den Endothelzellen selbst sezerniert werden.^[10]

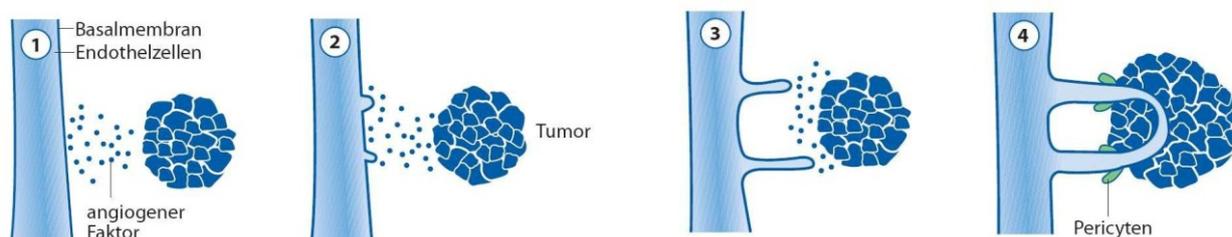


Abbildung 1: Neoangiogenese (Abbildung entnommen aus Dörrschuck *et al.*^[11]).

Bei der Neoangiogenese kommt es zunächst zu einer Aktivierung der Endothelzellen der vorhandenen Blutgefäße (Abbildung 1-1). Diese beginnen sich zu teilen und produzieren proteolytische Enzyme (Proteinasen), welche die Basalmembran der Blutgefäße abbauen (Abbildung 1-2). Nach erfolgter Proliferation migrieren die Endothelzellen aufgrund des angiogenen Reizes des Tumors (Abbildung 1-3) und schließen ihn, nach dem Aufbau einer neuen Basalmembran um die neugebildeten Blutgefäße, an das Blutgefäßsystem an (Abbildung 1-4).^[11] Ein zusätzliches Problem stellt sich dadurch dar, dass es keine spezielle Behandlung gibt, welche den Prostatakrebs kuriert. Stattdessen werden lokale Behandlungsmethoden wie die radikale Prostatektomie, die perkutane Strahlentherapie und die interstitiellen Strahlentherapie, bei der ein Strahlenträger in Tumornähe eingebracht wird, angewandt. Diese Therapien haben lediglich den Effekt der Tumorkontrolle und rufen meist gravierende Nebenwirkungen wie Impotenz und Inkontinenz hervor.^[12] Um eine gezielte Behandlungsmethode gegen den Prostatakrebs zu etablieren, müssen Langzeitstudien durchgeführt und deren Ergebnisse analysiert werden, um potentielle Heilungsprognosen abschätzen zu können. Solche Langzeitstudien fehlen jedoch bis heute. Daher ist der Einsatz molekular-diagnostischer Verfahren in den Vordergrund wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt, um nicht nur die Effizienz der Behandlung, sondern im Besonderen auch die Diagnose im Anfangsstadium (Neoangiogenese) zu verbessern. Die Entwicklung neuer Screening-Methoden auf Basis der molekularen Bildgebung stellt hier einen wichtigen Schritt dar. Zum einen wird durch die molekulare Bildgebung die Auflösung verbessert, wodurch eine genauere Lokalisation des Tumors ermöglicht wird und sogar Metastasen erkannt werden, die bei einer normalen Biopsie unerkannt bleiben. Zum anderen kann durch das Wissen über die genaue Lage und Abgrenzung des Tumors eine chirurgische oder strahlentherapeutische Behandlung effektiver eingesetzt werden.^[13] Die molekulare Bildgebung kombiniert konventionelle makroskopische Bildgebungsverfahren (Abbildung 2) wie die Ultraschalltechnik (US), die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit Erkenntnissen aus der Entwicklung

molekularbiologischer Tumorangiogenesemarker-moleküle, die mit hoher Affinität und Spezifität an pathologische Strukturen binden.^[14,15]

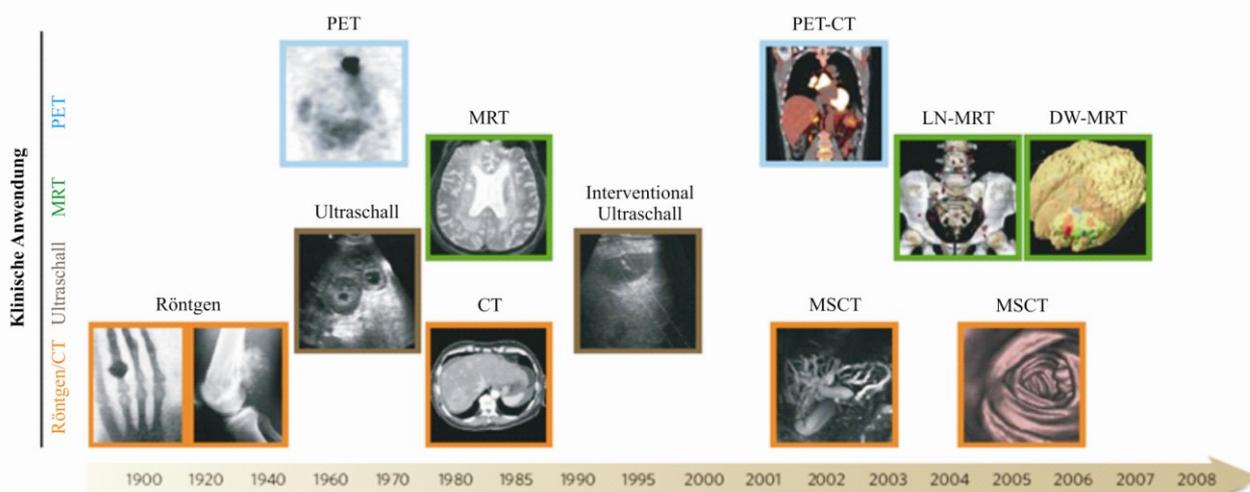


Abbildung 2: Bildgebungsverfahren in der Onkologie. Aufgeführt sind makroskopische Techniken zur Bildgebung und deren Eigenschaften anatomische und physiologische Informationen bildlich darzustellen. Der Zeitstrahl ist nur genähert und zur Veranschaulichung aufgeführt. PET: Positronen-Emissions-Tomographie; MRT: Magnetresonanztomographie; LN-MRT: Lymphotrope-Nanopartikelverstärkte-MRT; DW-MRT: Diffusionsgewichtete MRT; CT: Computertomographie; MSCT: Vielschnitt (Multislice) CT (Abbildung entnommen aus Weissleder *et al.*^[14]).

Diese Kombination ist notwendig, da die konventionellen Methoden alleine nur eine eingeschränkte Auflösung, sowie Sensitivität und Spezifität aufweisen. Da die konventionellen Bildgebungsverfahren für den zunächst lokal und meist mit gut ausdifferenzierten Zellen auftretenden Prostatakrebs nicht sensitiv und spezifisch genug sind, werden sie bei der Detektion nur begrenzt eingesetzt.^[13] So nehmen die CT und PET einzeln angewendet nur untergeordnete Rollen bei der Detektion von Prostatakrebs ein. Der Grund hierfür liegt in der begrenzten Auflösung bei Weichgewebe, so dass Tumore erst bei ausreichender Größe sicher identifiziert werden können.^[13,16] Auch das Fehlen geeigneter molekularer Marker ist ein Grund für den begrenzten Einsatz dieser Methoden in der Prostatakrebsdiagnostik.^[15,17] Die MRT liefert eine sehr gute räumliche Auflösung, so dass Weichgewebe sehr detailliert dargestellt werden können. Dadurch wird eine Sensitivität von 22 – 85 % und Spezifität von 50 – 99 % bei der Prostatakrebsdetektion erreicht.^[13] Werden die Auflösungseigenschaften der MRT mit Funktionsmessungen kombiniert, ermöglicht dies eine genauere Diagnose und Bestimmung des Prostatakrebsstadiums.^[18] Zu diesen Funktionsmessungen zählen zum einen die Messung der Diffusion von Wassermolekülen im Gewebe (DW), welche bei Tumoren aufgrund der hohen Zelldichte begrenzt ist.^[18,19] Zum anderen die Magnetresonanzspektroskopie, bei der der Metabolitenlevel im Gewebe insbesondere von Cholin und Citrat bestimmt wird. Liegt ein Prostatakarzinom vor, so wird im Gewebe eine erhöhte Cholinkonzentration bei gleichzeitig verringerter Citratkonzentration nachgewiesen.^[18,20,21] Die dynamische kontrastverstärkte MRT stellt

eine weitere Funktionsmessung dar, bei der die mikrovaskulären Eigenschaften wie die Permeabilität der Blutgefäße und die vaskuläre Durchlässigkeit des Gewebes mit Hilfe von Kontrastverstärkern bestimmt werden. Da bei Tumoren eine heterogene Vaskularität mit stark durchlässigen Gefäßen vorliegt, ist ein schneller Anstieg des Kontrastmittelsignals aber auch eine beschleunigte Abnahme des Signals durch Auswaschung des Kontrastmittels messbar.^[18,22,23] Inzwischen werden diese konventionellen Methoden miteinander kombiniert, so dass sich die Sensitivität und Spezifität erhöhen und detailliertere Darstellungen der Gewebe erzeugen lassen.^[14] Zum Beispiel wird die kombinierte PET/CT Technik zu den neuen Bildgebungsverfahren gezählt, da sie noch nicht als Standardmethode bei der Diagnose des Prostatakarzinoms eingesetzt wird.^[24] Durch die Entwicklung neuer molekularer Marker und durch die Verbindung der PET und CT Technik ist eine exakte anatomische Zuordnungen von funktionellen und morphologischen Informationen möglich.^[15] Die beschriebenen bildgebenden Verfahren dienen der direkten oder indirekten Darstellung der Tumoreigenschaften. Jedoch ist keine der Techniken in der Lage, das mikrovaskuläre Gefäßbett eines Tumors zuverlässig und reproduzierbar zu visualisieren.^[25] Zusätzlich rufen diese Techniken erhebliche Nebenwirkungen bei den Patienten hervor. Zum einen führen diese Verfahren zu einer hohen Strahlenbelastung, zum anderen können die eingesetzten Kontrastmittel in das umliegende Gewebe übertreten. Dagegen ist die Ultraschalltechnik ein Verfahren ohne Nebenwirkungen. Allerdings wird sie hauptsächlich in Form der transrektalen Ultraschalluntersuchung (TRUS) als Standardmethode während der Biopsie zur Richtungsweisung angewandt, da weder ein abschließender Nachweis noch die Bestimmung der genauen Tumorgrenzen mit dieser Methode möglich ist.^[26] Die anschließende Biopsie liefert das Ergebnis, ob es sich um Prostatakrebs handelt oder nicht.^[27,28] Jedoch wurden in den letzten Jahren große Fortschritte im Bereich der Bildgebung mittels Ultraschall erreicht. So werden inzwischen 3D-Ultraschall und intravenös applizierte Mikrobubbles eingesetzt, um die Effizienz dieser Methode zu steigern.^[29] Trotzdem ist es noch nicht möglich, das Gefäßbett des Tumors und den Umbau des Gefäßbettes (Abbildung 3) unter antiangiogenetischer Therapie darzustellen.^[25]

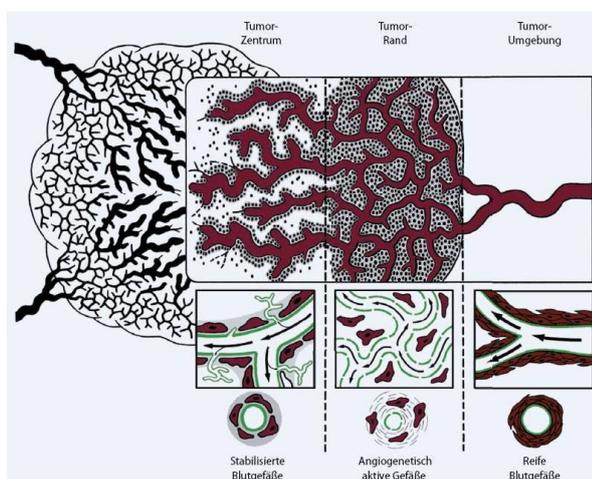


Abbildung 3: Durch den Tumor initiiertem Umbau des Gefäßbettes. Reife, durch Angiogenese an den Tumor angeschlossene, Blutgefäße gehen im Tumorrandbereich in ein dichtes Netzwerk chaotisch angeordneter und unreifer Blutgefäße über. Diese werden reorganisiert, um das tumoreigene Gefäßsystem aufzubauen, so dass im Tumorzentrum stabilisierte Blutgefäße zu finden sind.^[25]

Die neuen Methoden bedeuten jedoch bereits eine Verbesserung, da im Allgemeinen durch die Entwicklung und Kombination der konventionellen Bildgebungsverfahren vor allem die Auflösung, aber auch die Sensitivität und Spezifität gesteigert worden sind.^[25] Eine weitere Verbesserung der Sensitivität und besonders der Spezifität ist aber nur durch die Entwicklung neuer molekularer Marker (Abbildung 4) möglich, da diese immer noch den limitierenden Faktor darstellen.^[13,15]

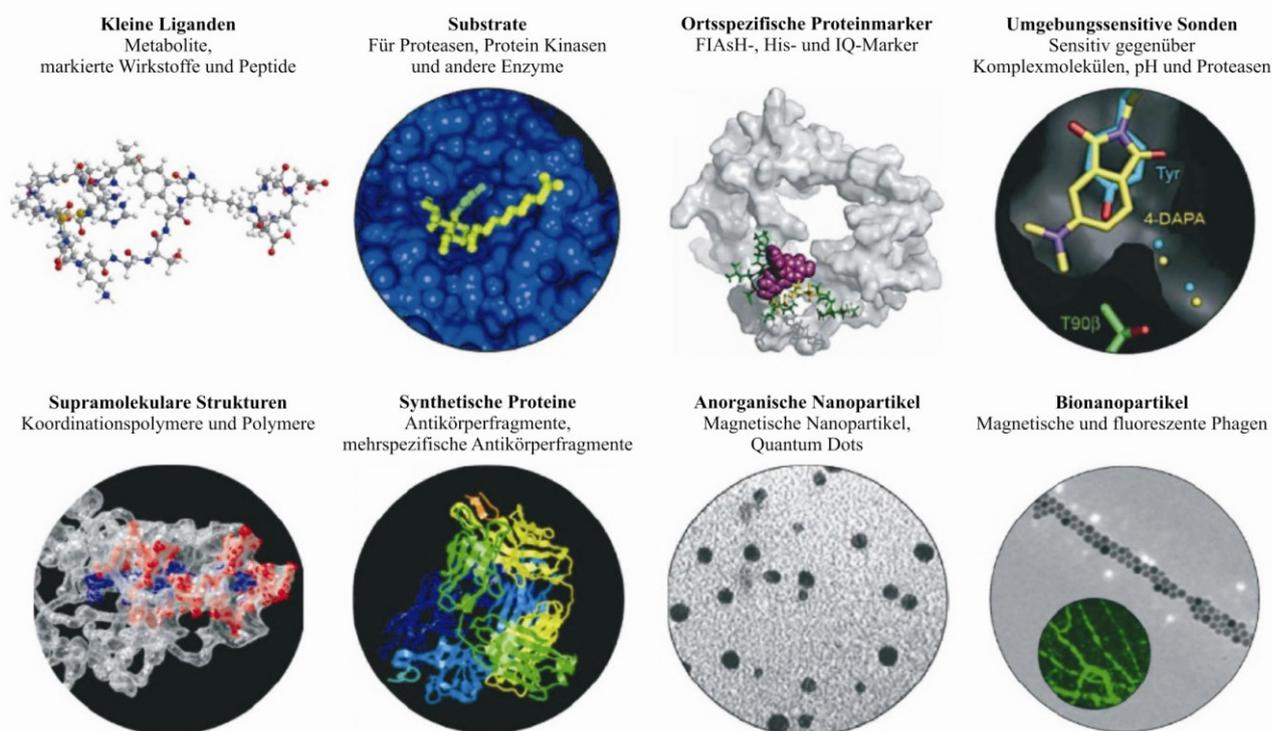


Abbildung 4: Verschiedene Arten von molekularen Markern. Als molekulare Marker können kleine Moleküle (obere Reihe) wie markierte Liganden, Substrate, die an das aktive Zentrum von Proteinen binden, ortsspezifische Proteinmarker oder umgebungssensitive Sonden, deren physikochemischen Eigenschaften sich bei Bindung an das Zielmolekül ändern, fungieren. Aber auch Makromoleküle (untere Reihe), wie synthetische Proteine und Polymere, mit zum Beispiel proteasespaltbaren Seitenketten, sowie Nanopartikel aus verschiedenen Materialien können als molekulare Marker eingesetzt werden (Abbildung entnommen aus Weissleder *et al.*^[14]).

Um diese Verbesserungen zu erzielen, müssen die molekularen Marker höchste Affinität mit entsprechenden pharmakokinetischen Eigenschaften vereinen.^[15,30] Essentiell ist zum Einen eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität gegenüber den Zielstrukturen, ohne diese zu verändern.^[31,32] Zusätzlich sollten die molekularen Marker ein sehr gutes Signal zu Rausch Verhältnis aufweisen.^[14,31] Zum Anderen sind nicht-toxische Eigenschaften und die Möglichkeit der Bioabbaubarkeit des Markers von großer Bedeutung, wobei eine zu schnelle Metabolisierung ebenfalls vermieden werden muss.^[31] Diese Voraussetzungen werden von Antikörpern, Makromolekülen und Nanopartikeln erfüllt, da deren Metabolisierung und Ausscheidung mehr Zeit in Anspruch nimmt, als bei kleinen Molekülen.^[30,33,34] Als Zielstrukturen können bei der molekularen Bildgebung auch solche Strukturen in Frage kommen, die zwar eine besondere Rolle bei der Erkrankung spielen, aber keine funktionellen Abläufe der Krankheit steuern. Diese müssen jedoch in ausreichender Menge zugänglich sein, um eine

entsprechende Markierung zu gewährleisten.^[31] Extrazelluläre Matrixproteine, Membranlipide, Strukturproteine oder extrazellulär abgelagerte Proteine stellen solche Zielstrukturen dar.^[35,36,37,38,39]

Ein extrazelluläres Matrixprotein, bei dem eine erhöhte Expression in Endothelzellen angiogenetisch aktivierter Kapillaren, unter anderem beim Prostatakarzinom, nachgewiesen wurde ist das humane Carcinoembryonale Antigen zugehörige Zelladhäsionsmolekül 1 (CEACAM1).^[40,41] Es ist aber nicht nur im tumorösen Gewebe des Prostatakarzinoms^[41,42], sondern auch in Karzinomen des Kolons^[43], der Leber^[43,44], der Brust^[44], der Lunge^[45], des Magens^[45] und der Harnblase^[46] zu finden. CEACAM1 gehört zu der Familie der Carcinoembryonalen Antigene (CEA), die wiederum zur Superfamilie der Immunoglobuline zählen (Abbildung 5).^[47]

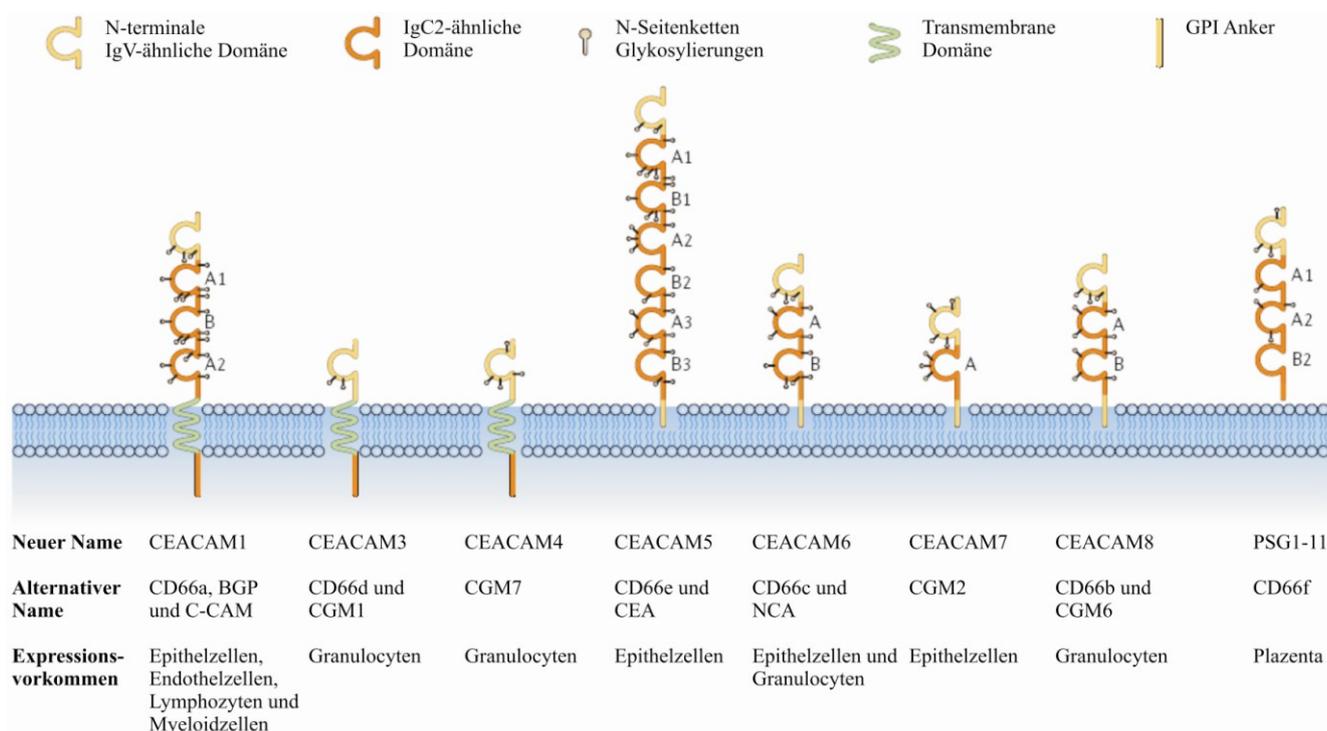


Abbildung 5: Proteine der Carcinoembryonalen Antigen Familie (CEA). Mit aufgeführt sind die alternativen Namen und ihr zelluläres Expressionsvorkommen (modifiziert nach Gray-Owen *et al.*^[48]).

Im Menschen ist die CEA-Familie durch 18 Gene und 11 Pseudogene auf dem Chromosom 19q3.2 kodiert.^[49,50] Diese lassen sich wiederum in die Untergruppen der CEA zugehörigen Zelladhäsionsmoleküle (CEACAMs) und der Schwangerschaftsspezifischen Glycoproteine (pregnancy specific glycoproteins, PSG) aufteilen.^[47,48] CEACAM1, 5, 6 und 8 wirken primär als interzelluläre Adhäsionsmoleküle und sind dadurch namensgebend für diese Proteinfamilie. Die Adhäsion der CEACAM Proteine kann dabei homophil, also zwischen gleichen CEACAMs, oder heterophil, also zwischen unterschiedlichen CEACAMs, ausgebildet werden.^[51,52,53,54,55]

Ein großer Unterschied der Untergruppen der CEA-Familie besteht, neben der Proteinhomologie und des Expressionsmusters, darin, in welcher Form die exprimierten Proteine zellulär vorliegen. So werden die Proteine der PSG Gruppe alle sekretiert, wohingegen die meisten Proteine der CEACAM

Gruppe an der Zelloberfläche mittels transmembraner Domänen oder Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) gebunden sind.^[47,48] Der extrazelluläre Teil der CEACAM Proteine ist hoch glykolysiert und hat am N-Terminus stets eine ca. 110 Aminosäuren umfassende Domäne. Diese wird als N-Domäne bezeichnet und ist der Immunoglobulin-Variablen Domäne (IgV) ähnlich. Der Rest des extrazellulären Teils der Proteine wird durch eine variable Anzahl von null bis sechs konstanter Immunoglobulin-Typ 2-Domänen (IgC2) aufgebaut, die aus 92 und 96 (A-Domäne) oder 86 (B-Domäne) Aminosäuren bestehen können.^[47,48,56] Jede dieser IgC2-ähnlichen Domänen besitzt mindestens zwei Cysteine, die in Form von Disulfidbrücken vorliegen und dadurch die immunoglobuline Faltung stabilisieren.^[56] Des Weiteren kann bei den transmembrangebundenen CEACAMs entweder eine lange aus 71 – 73 Aminosäuren (CEACAM-L) oder eine kurze aus 10 – 12 Aminosäuren (CEACAM-S) bestehende zytoplasmatische Domäne vorliegen.^[57,58,59] Genauere Untersuchungen dieser Domänen zeigten, dass die lange zytoplasmatische Domäne ein modifiziertes tyrosinbasiertes Immunorezeptor inhibierendes und/oder aktivierendes Motiv (ITIM oder ITAM) besitzt. Dadurch kommt es bei diesen CEACAM Isoformen durch Tyrosin-Phosphorylierung zur Weiterleitung eines Aktivierungs- oder Inhibierungssignal von der Zelloberfläche in den Nukleus, welche Einfluss auf die Tumorentstehung und Neoangiogenese haben.^[47,60,61]

Durch die strukturelle Vielfalt sind die Proteine der CEACAM Familie, sowohl im fetalen und entwickelten Normalgewebe, als auch im Tumorgewebe zu finden und weisen zusätzlich eine hohe Variabilität in ihren Funktionen auf.^[62,63] Diese Variabilität wird besonders bei der Expressionsverteilung von CEACAM1 deutlich (Abbildung 6).

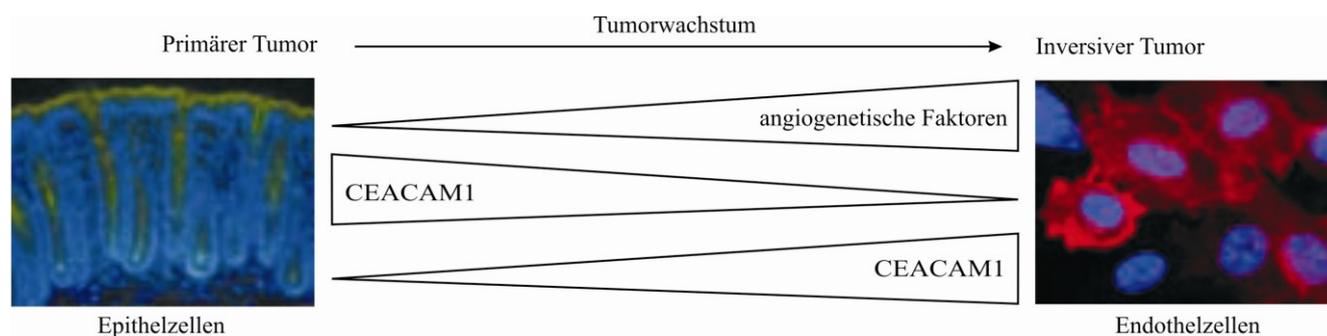


Abbildung 6: Expressionsverteilung von CEACAM1 zur Verdeutlichung des dualen Charakters (modifiziert nach Nouvion *et al.*^[64]).

Im normalen Gewebe wird CEACAM1 von Epithelzellen expremiert und agiert hier als Tumorsuppressor, indem es die Expression proangiogenetischer Faktoren verhindert.^[42,65] Der tumorsuppressive Effekt ist dabei auf die Phosphorylierbarkeit von Tyrosin (Tyr488/Tyr515) und Serin (Ser503) im ITIM/ITAM zurückzuführen.^[45,66,67] Durch diese Phosphorylierung können die Protein-Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 an CEACAM1 assoziieren und katalysieren die

Dephosphorylierung des Proteins. In Folge dessen kommt es zu weiteren intrazellulären Tyrosinphosphorylierungen von verschiedenen Proteinen, welche an der Regulation unterschiedlicher zellulärer Vorgänge wie Zellproliferation, -adhäsion, -und migration beteiligt sind (Abbildung 7).^[66]

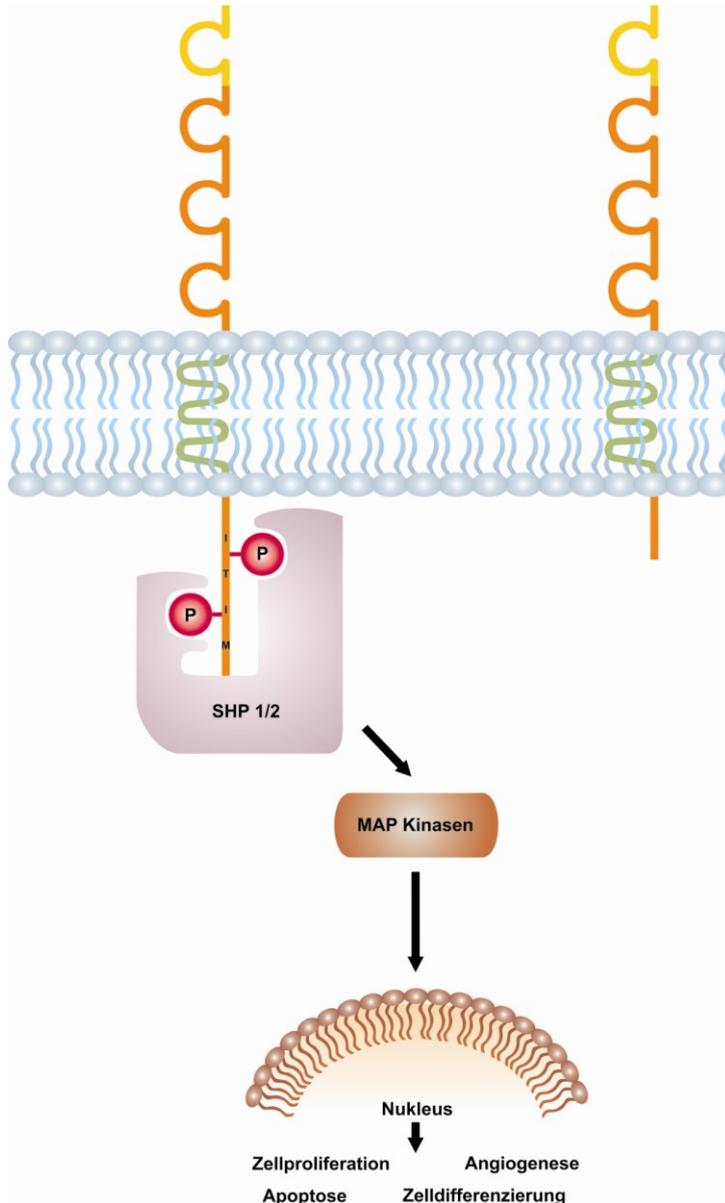


Abbildung 7: Signalweiterleitende Eigenschaft von CEACAM1-4L. Durch Phosphorylierung im ITIM/ITAM können Phosphatasen (SHP1/2) an CEACAM1 gebunden werden. Durch die Rekrutierung zytosomatischer Proteine an die Zellmembran ist es unter anderem über MAP Kinase Kaskaden möglich, Signale in den Nukleus zu leiten, wodurch tumorsuppressive bzw. tumoraktivierende Prozesse initiiert werden (modifiziert nach Gray-Owen et al.^[50]).

Auf diese Weise wirkt CEACAM 1 unter anderem auf den MAP Kinase Signalweg ein, wodurch nukleare Prozesse in Gang gesetzt werden, die einen tumorsuppressiven Effekt hervorrufen können. So werden mitunter Zellzyklusinhibitoren in ihrer Expression reduziert was zu einer Unterdrückung der Zellproliferation und gleichzeitig zu einer Erhöhung der Apoptose führt.^[68,69,70,71] Zusätzlich hat das Verhältnis der Expression der langen (CEACAM1-4L) zur kurzen Isoform des CEACAM1 (CEACAM1-4S) einen Einfluss auf die tumorsuppressiven Eigenschaften, wobei die kurze Isoform weder einen wachstumshemmenden noch zellverändernden Effekt aufweist.^[47,72,73] Kommt es jedoch

zur Entstehung von oberflächlichen primären Tumoren oder präkanzerösen Dysplasien, ist CEACAM1 nicht mehr in den Epithelzellen der betroffenen Organe nachweisbar. Stattdessen kann es in den Endothelzellen kleinerer Blutgefäße in der Umgebung der Tumore detektiert werden.^[41,46,65] Hier führt die Fähigkeit der Signalweiterleitung von CEACAM1 zur Hochregulierung von angiogenetischen Faktoren wie VEGF, IL-8, Angiogenin, Angiopoietin-1 und -2. Gleichzeitig werden Angiogeneseinhibitoren wie Collagen XVIII und Endostatin herunter reguliert.^[74] In der Literatur ist dieses gegensätzliche Expressionsmuster als dualer Charakter von CEACAM1 beschrieben (Abbildung 6).^[41,46,65]

Zielsetzung der Arbeit:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung CEACAM1-bindender Partikel für die molekulare Bildgebung des Prostatakarzinoms. Da eine frühzeitige und gesicherte Diagnose für eine erfolgreiche Tumorbehandlung und positive Prognose für den Patienten entscheidend ist, kann sich die Markierung der im Tumorfrühstadium gebildeten neuen Blutgefäße als ein vielversprechender Ansatz erweisen. Um neue Blutgefäße auszubilden, induziert der Tumor Neovaskulation, somit stellen die hierbei expremierten Neoangiogenesemarker optimale Zielmoleküle für eine frühzeitige Detektion dar. Das humane carcinoembryonale Antigen zugehörige Zelladhäsionsmolekül 1 (CEACAM1) ist ein solcher Neoangiogenesemarker, dessen Expression in Tumorblutgefäßen ausschließlich auf angiogenetisch-aktivierten Endothelzellen erhöht ist. Als Markersystem für diese Blutgefäße sollen Nano- bzw. Mikropartikel verwendet werden, welche unter anderem im Ultraschall detektiert werden können. Die Bindung dieser Partikel an die expremierten CEACAM1 Proteine wird hierbei über spezifische Antikörper vermittelt, welche auf den Partikeloberflächen immobilisiert werden. Da diese molekularen Marker im späteren Diagnose bzw. Therapieverfahren intravenös verabreicht werden sollen, müssen auch Eigenschaften wie Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und Toxizität berücksichtigt werden. Um diese Zielsetzung zu erreichen, befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Ermittlung eines geeigneten Antikörpers und Partikels, um damit zunächst ein *in vitro* Testsystem mit entsprechenden Nachweismethoden zu etablieren. Dieses soll dann im späteren Verlauf auf ein Tiermodell-Testsystem übertragen werden.

2. Materialien

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.A.-Qualität. Laborübliche Chemikalien, die in folgenden Tabellen nicht weiter aufgeführt sind, stammen von den Firmen Baker (Griesheim, GER), Fluka (Neu-Ulm, GER), Merck (Darmstadt, GER), Carl Roth (Karlsruhe, GER) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, GER).

<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Anbieter</i>
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford IL USA
BD Falcon™ Conical Tube 10 mL, 50 mL	BD Biosciences, Heidelberg GER
BD Falcon™ Polystyrene Round Bottom Tubes	BD Biosciences, Heidelberg GER
Biotin Quantitation Kit	Pierce, Rockford IL USA
Bis[sulfosuccinimidyl]suberat (BS ³)	Pierce, Rockford IL USA
Bovine Gamma Globulin (BGG) Standards	Pierce, Rockford IL USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
[CD31 MicroBead] Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach GER
Cystein × HCl × H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
Deckgläser (rund) Ø 12 mm	Oehmen Labortechnik, Essen GER
Dialysiermembran ZelluTrans MWCO 4000 – 6000	Carl Roth, Karlsruhe GER
Dialysiermembran ZelluTrans MWCO 8000 – 10000	Carl Roth, Karlsruhe GER
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
Disposable PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare, München GER
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman´s Reagenz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
Dithiothreitol	Bio-Rad Laboratories GmbH, München GER
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco Invitrogen GmbH, Darmstadt GER
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco Invitrogen GmbH, Darmstadt GER
Dynabeads® M-280 Streptavidin Ø 2,8 µm	Invitrogen GmbH, Darmstadt GER
Einmal-Kanülen	Carl Roth, Karlsruhe GER
Einmal-Spritzen 1 mL – 20 mL	Carl Roth, Karlsruhe GER

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Anbieter
Einmal-Spritzenfilter 0,45 µm	Carl Roth, Karlsruhe GER
Einmal-Waagschalen	Carl Roth, Karlsruhe GER
Elektrolytlösung (3 M KCl) 250 mL	Mettler-Toledo AG, Gießen GER
Endothelial Cell Growth Medium MV mit SupplementMix	PromoCell GmbH, Heidelberg GER
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford IL USA
Fetal Calf Serum Heat inactivated	PAA Laboratories GmbH, Pasching AUT
Flaschendosierer Ceramus® 2 mL – 10 mL	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt GER
Flußkammer µ-Slide I ^{0,4} Luer	Ibidi GmbH, Martinsried GER
Geneticin® selection agent	Gibco Invitrogen GmbH, Darmstadt GER
Gewindeflaschen DURAN® 100 mL – 2000 mL	Carl Roth, Karlsruhe GER
L-Glutamin	Gibco Invitrogen GmbH, Darmstadt GER
HiTrap™ Protein G HP Säule 1 mL	GE Healthcare, München GER
Hydroxylamin × HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
Magnetische Trennsäule M	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach GER
Magnetische Trennsäule MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach GER
Magnetische Trennsäule LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach GER
Magnetrührstäbe diverse	Carl Roth, Karlsruhe GER
Mehrkanal-Pipette Research® 8-Kanal, 300 µL	Eppendorf AG, Hamburg GER
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
Messpipette AS 1 mL – 20 mL (Glas)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt GER
Mikroliterspritze 702 NR 25µl Syr (22s/51/3)	Hamilton, Bonaduz CH
µMACS™ Protein A/G MicroBeads Ø 50 nm	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach GER
Natronlauge (2 M)	Carl Roth, Karlsruhe GER
NHS-Fluorescein	Pierce, Rockford IL USA
Nile-Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat (SATA)	Pierce, Rockford IL USA
<i>nunc maxisorp® flat-bottom 96 well immune plate</i>	Nunc GmbH, Langenselbold GER
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe GER
Penicillin	Gibco Invitrogen GmbH, Darmstadt GER
pH-Pufferlösung pH 9,21 250 mL	Mettler-Toledo AG, Gießen GER

<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Anbieter</i>
pH-Pufferlösung pH 7,00 250 mL	Mettler-Toledo AG, Gießen GER
pH-Pufferlösung pH 4,01 250 mL	Mettler-Toledo AG, Gießen GER
Pinzetten diverse	Carl Roth, Karlsruhe GER
Pipetten Research [®] 0,5 µL – 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg GER
Pipetten Reference [®] 0,5 µL – 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg GER
Pipettenspitzen 0,5 µL – 1000 µL	Oehmen Labortechnik, Essen GER
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt GER
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
Plastibrand [®] UV-Küvetten micro	BRAND GmbH, Wertheim GER
Proteinase Inhibitor Cocktail Set III EDTA-free	Merck KGaA, Darmstadt GER
Protein G Sepharose [™] 4 Fast Flow Ø 90 µm	GE Healthcare, München GER
Protein Standard PageRuler [™] Plus Prestained	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot GER
Protein Ladder #SM0671	
Protein Standard PageRuler [™] Plus Prestained	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot GER
Protein Ladder #SM1811	
Protein Standard Precision Plus Protein [™] Standard #161-0374	Bio-Rad Laboratories GmbH, München GER
Protran Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel GER
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL	Oehmen Labortechnik, Essen GER
Ripette [®] Handdispenser für Seriendosierungen im Volumenbereich 1 µL – 5 mL	Ritter GmbH, Schwabmünchen GER
Ritips [®] 0,05 mL – 50 mL	Ritter GmbH, Schwabmünchen GER
Roti [®] -MagBeads Protein G Ø 1,0 µm (10mg/mL)	Carl Roth, Karlsruhe GER
Salzsäure (1 M)	Carl Roth, Karlsruhe GER
Schwefelsäure (2 N)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München GER
Serologische Pipetten 1 mL – 25 mL (Polystyrol)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen GER
Spatel diverse	Carl Roth, Karlsruhe GER
Streptomycin	Gibco Invitrogen GmbH, Darmstadt GER
Targestar-B [™] Imaging Kit	Targeson Inc, San Diego CA USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat	Pierce, Rockford IL USA
Ultraschall Kontrastmittel SonoVue [®]	Bracco Diagnostics, Milano IT

<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Anbieter</i>
Vakuumfilter «rapid»-Filtermax 250 mL	TPP, Trasadingen CH
Vivaspin 20 Zentrifugal-Ultrafiltration	Sartorius Stedim Biotech, Goettingen GER
Konzentrator MWCO 5 kDa/ 30 kDa	
Zählkammer Neubauer	Carl Roth, Karlsruhe GER
Zellkulturflaschen 25 cm ² /75 cm ²	TPP, Trasadingen CH
Zellkulturtestplatten 6-, 12-, 24-, 96-well	TPP, Trasadingen CH

2.2. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Analysenwaage Precisa 40SM-200A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon CH
BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg GER
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg GER
Blotsystem Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München GER
Dampf-Sterilisator Varioklav Classic	Thermo Scientific, Langenselbold GER
Flockeneisbereiter AF 10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills IL USA
Gelsystem Mini Protean 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München GER
Gelsystem Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München GER
Heizblock Digital dry block heating system with single block QBD1	Grant Instruments Ltd, Shepreth UK
Heraeus Multifuge 3SR Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA
TTH-750 High-Capacity Swing-Out Rotor	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA
750 mL Round Buckets max 4600 rpm/4570g	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA
Hin- und Her-Schüttler 3006	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel GER
Inkubations-/Inaktivierungswasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel GER
CO ₂ -Inkubator Heracell 150	Thermo Scientific, Langenselbold GER
Kompaktwaage Ohaus Galaxy 400	Oehmen Labortechnik, Essen GER

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Luminescent Image Analyzer LAS-3000mini	Fujifilm, Düsseldorf GER
MACS [®] MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach GER
Magnetrührer mit Heizung RCT basic IKAMAG [®]	IKA [®] -Werke GmbH, Staufen GER
Magnetrührer MR Hei-Mix S	Heidolph Instruments, Schwabach GER
Membran-Vakuumpumpe	Carl Roth, Karlsruhe GER
Mikroliterzentrifuge MIKRO 200R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen GER
40° Winkelrotor, 24fach	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen GER
Mikroplattenleser Sunrise [™]	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim GER
Magellan [™] Analysesoftware	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim GER
Mikroskop (invers) Leica DM IL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar GER
Mikroskop (konfokal) Leica TCS SPE	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar GER
MiniMACS [™] Separation Unit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach GER
pH-Meter WTW pH521	WTW, Weilheim GER
Sentix20 pH Elektrode	WTW, Weilheim GER
Power Pac 1000 Netzgerät	Bio-Rad Laboratories GmbH, München GER
Rotationsmischer Heto RK 10-VS	Oehmen Labortechnik, Essen GER
Rotationsmischer Stuart [®] Rotator SB2	Bibby Scientific Limited, Stone UK
Schlauchpumpe REGLO Digital	ISMATEC, Wertheim-Mondfeld GER
Schüttler Vortex Genie2	VWR International GmbH, Darmstadt GER
Schüttler VXR basic IKA-Vibrax [®]	IKA [®] -Werke GmbH, Staufen GER
Taumel-Schüttler 3013 (im 4 °C Raum)	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel GER
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg GER
Standardrotor F-45-24-11	Eppendorf AG, Hamburg GER
Tischzentrifuge Rotina 380R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen GER
90° Ausschwingrotor, 4-fach	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen GER
Ultraschall Homogenisator SONOPULS HD2070	BANDELIN electronic GmbH, Berlin GER
Mikrospitze MS73	BANDELIN electronic GmbH, Berlin GER

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Ultraschallreiniger USC500TH	VWR International GmbH, Darmstadt GER
Zellzähler CASY [®] Model TT mit CASY [®] ton und CASY [®] cups	Roche Innovatis AG, Mannheim GER

2.3. Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Typ</i>	<i>Herkunft</i>
HeLa	Menschliche Epithelzelle eines Zervixkarzinoms	B. B. Singer, Universitätsklinikum Essen
AS-M.5	Zellklon einer humanen Endothelzelllinie eines Angiosarkoms der Kopfhaut	V. Krump-Konvalinkova, Klinikum der Universität München

2.4. Proteinkonstrukte

<i>Protein</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
CEACAM1-Fc (77/1)	PAGE ELISA	B. B. Singer, Universitätsklinikum Essen
CEACAM8-Fc (5-29)	PAGE ELISA	B. B. Singer, Universitätsklinikum Essen

2.5. Antikörper

<i>Primäre Antikörper</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
Monoklonal Maus anti-Human CD31	Durchflusszytometrie Immunzytochemie	Dianova, Hamburg GER
Monoklonal Maus anti-Human CD31(FITC)	Durchflusszytometrie Immunzytochemie	Dianova, Hamburg GER
Monoklonal Maus anti-Human CEACAM1 Klon 18/20 (18/20)	Partikelkopplung Durchflusszytometrie Immunzytochemie	B. B. Singer, Universitätsklinikum Essen
Monoklonal Maus anti-Human CEACAM8 Klon 6/40c (6/40c)	Partikelkopplung Durchflusszytometrie Immunzytochemie	B. B. Singer, Universitätsklinikum Essen
Polyklonal Hase anti-Human CEA	ELISA	Dako Deutschland GmbH, Hamburg GER
<i>Sekundäre Antikörper</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
Monoklonal Maus anti-Human CEACAM1 Klon 18/20 (18/20)	ELISA	B. B. Singer, Universitätsklinikum Essen
Monoklonal Maus anti-Human CEACAM8 Klon 6/40c (6/40c)	ELISA	B. B. Singer, Universitätsklinikum Essen
Polyklonal Ziege anti-Maus IgG(FITC)	Durchflusszytometrie Immunzytochemie	Jackson Immuno Res., Newmarket UK
Polyklonal Ziege anti-Maus IgG ^{H+L} (HRP)	Western Blot nach der Partikelkopplung ELISA (Tertiärer AK)	Pierce, Rockford IL USA

2.6. Puffer

<i>PBS150</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
140 mL A 360 mL B 150 mM NaCl ad 1000 mL pH 7,2	0,2 M NaH ₂ PO ₄ anhyd.	0,2 M Na ₂ HPO ₄ anhyd.

<i>PBS</i>	<i>PBS+Mg²⁺+Ca²⁺</i>	<i>RIPA-Lysis Puffer</i>
0,1 M Na ₂ HPO ₄ 138 mM NaCl pH 7,4	0,901 mM CaCl ₂ anhyd. 0,493 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 2,67 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137,93 mM NaCl 8,06 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O pH 7,2	1 % Triton X-100 1 % Na-Desoxycholat 0,1 % SDS 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 50 mM NaF 12 mM KH ₂ PO ₄ 35 mM Na ₂ HPO ₄ 1 % Proteinase Inhibitor (frisch) pH 7,2

<i>Blotpuffer</i>	<i>Blockpuffer</i>	<i>TBS</i>
133 mM Glycin 12 mM Tris/HCl pH 8,4	20 mM Tris/HCl pH 7,6 137 mM NaCl 3 % Magermilchpulver	20 mM Tris/HCl pH 7,6 137 mM NaCl

3. Methoden

3.1. Herstellung der Antikörper

3.1.1. Kultivierung von Hybridomazellen

Die Hybridomazellen, welche den gewünschten Antikörper sekretieren, werden selektiert. Diese positiven Zellklone werden in T75 Zellkulturflaschen in HAT-Medium mit der folgenden Zusammensetzung bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
HAT-Medium	DMEM mit 0,1 mM Natriumhypoxanthin, 0,4 µM Aminopetrin, 16 µM Thymidin

Alle 3 – 4 Tage wird der Zellkulturüberstand für 20 min. bei 4000 rpm zentrifugiert. Dieser Überstand wird in Vorratsflaschen gesammelt und wie unter 3.1.2 beschrieben aufgereinigt. Zudem werden unter Verwendung dieser zentrifugierten Überständen die Antikörper im Western-Blot, im Durchflusszytometer, in der Immunpräzipitation und in der Immunhistochemie auf ihre Spezifität hin untersucht. Des Weiteren werden die Isotypen der Antikörper unter Verwendung des IsoStrip Kits der Firma Roche bestimmt, um die monoklonalen Antikörper charakterisieren zu können. Hier sei erwähnt, dass die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchungen und der Charakterisierung der Isotypen, welche standardmäßig bei jeder Charge Antikörper durchgeführt werden, in dieser Arbeit nicht mit aufgeführt sind.

3.1.2. Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Da die Aufreinigung bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt wird, werden alle Puffer und Lösungen vorgekühlt.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Waschpuffer (WP)	0,1 M PBS pH 7,4
Elutionspuffer (EP)	0,1 M Glycin pH 2,5 (HCl)
Lagerpuffer (LP)	20 % (v/v) EtOH

Der gesammelte Überstand der Hybridomazellen, in den der generierte Antikörper sekretiert wurde, wird steril filtriert und wenn nötig wird der pH auf 7,3 – 8 eingestellt. Zum Äquilibrieren der HiTrap Protein G Säule wird diese bei einer Flußrate von 1,5 mL/min. mit 20 Säulenvolumina WP gespült, um den LP zu entfernen. Da ca. 500 mL Zellkulturüberstand eingesetzt werden, wird dieser im Kreislauf für mindestens zwölf Stunden bei einer Flußrate von 1,5 mL/min. über die Säule gepumpt. Dadurch wird gewährleistet, dass der gesamte Antikörper an die Säule bindet. Anschließend wird die Säule bei einer Flußrate von 1,5 mL/min. mit 20 Säulenvolumina WP gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgt mit ca. fünf bis zehn Säulenvolumina EP, wobei in ca. 3 mL Fraktionen gesammelt wird. Danach wird die Säule mit zehn Säulenvolumina WP gewaschen, um den EP vollständig von der Säule zu spülen und die Säule auf neutralen pH zu bringen. Hierbei wird ebenfalls in ca. 3 mL Fraktionen gesammelt. Die antikörperenthaltenden Fraktionen werden in eine Dialysiermembran (MWCO 4000 – 6000) überführt und gegen einen Liter WP dialysiert. Der zum Dialysieren verwendete WP wird ca. alle sechs Stunden, jedoch mindestens dreimal, ausgetauscht. Nach der Dialyse wird die Antikörperlösung durch einen 0,2 µm Spritzenfilter steril filtriert und die Konzentration über die Messung der optischen Dichte bei 280 nm (OD_{280}) bestimmt.

$$c \text{ [mg/mL]} = OD_{280}/1,35$$

Bei einer Konzentration unter 1 mg/mL Antikörper wird die Lösung mit Hilfe von Vivaspin 6 oder Vivaspin 20 Konzentratoren (MWCO 5000) auf ca. 1,5 mg/mL ankonzentriert und zu je 500 µL aliquottiert. Bis zum weiteren Gebrauch werden diese Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.1.3. Funktionalisierung der Antikörper

3.1.3.1. Kopplung von Biotin

Die Kopplung von Biotin erfolgt nach dem Protokoll der Firma Pierce (Rockford IL USA). Das verwendete Biotin liegt als aktivierter NHS-Ester in Form von Sulfo-NHS-LZ-Biotin vor. Es wird in 5fachem molarem Überschuss eingesetzt. Dadurch wird gewährleistet, dass nach der Biotinylierung noch freie Aminogruppen für eine spätere Markierung mit Fluorescein zur Verfügung stehen und trotzdem eine hohe Kopplungseffizienz an den übrigen Aminogruppen erreicht wird. Das hierzu entsprechende Volumen an Biotinlösung (1 mg Biotin in 180 µL H₂O) wird zur Antikörperlösung pipettiert und für die Dauer von einer Stunde bei RT durchmischt. Zum Entfernen des ungebundenen Biotins wird die Antikörperlösung über eine PD10 Säule aufgereinigt. Die PD10 Säule wird vor der Verwendung mit fünf Säulenvolumina PBS150 äquilibriert. Die Elution des biotinylierten Antikörpers (BioAK) erfolgt mit 3,5 mL PBS150. Mit Hilfe eines Vivaspin 6 Konzentrators (MWCO 30 kDa) wird

das Volumen bei 4000 rpm auf 1,5 mL – 2 mL eingengt. Anschließend wird die Konzentration mittels BCA-Test und die Biotinininsertion über den HABA-Test bestimmt. Zusätzlich wird die Zellbindungseigenschaft im Durchflusszytometer, wie unter 3.5.2.2 beschrieben, analysiert.

3.1.3.2. Kopplung von Fluorescein

Das eingesetzte Fluorescein liegt als aktivierter NHS-Ester in Form von NHS-Fluorescein vor. Um eine hohe Kopplungseffizienz zu erreichen, wird das Fluorescein in 10fachem molarem Überschuss eingesetzt, entsprechend des Protokolls der Firma Pierce (Rockford IL USA). Die Fluoresceinlösung (1 mg Fluorescein in 100 μ L DMF) wird zur Antikörperlösung pipettiert und im Dunkeln für die Dauer von einer Stunde bei RT durchmischt. Zum Entfernen des ungebundenen Fluoresceins wird die Antikörperlösung über eine, mit fünf Säulenvolumina PBS150 äquilibrierte, PD10 Säule aufgereinigt. Die Elution des Fluorescein gekoppelten Antikörpers (FluoAK) erfolgt mit 3,5 mL PBS150. Mit Hilfe eines Vivaspin 6 Konzentrators (MWCO 30 kDa) wird das Volumen bei 4000 rpm auf 1,5 mL – 2 mL eingengt. Anschließend wird die Konzentration und die Fluoresceininsertion über die Messung der Absorption bei 280 nm und 492 nm bestimmt. Zusätzlich wird die Zellbindungseigenschaft im Durchflusszytometer, wie unter 3.5.2.2 beschrieben, analysiert.

3.2. Bindung von Antikörpern an Partikel

Die Immobilisierung der Antikörper erfolgt auf unterschiedliche Weise. Zum einen über die Bindung des Fc-Fragments an Protein G, welches kovalent an den Partikeln gebunden ist. Dadurch ist gewährleistet, dass alle Antigenbindungsstellen zugänglich sind. Um einen kovalenten Charakter der Bindung zu erhalten, werden die immobilisierten Antikörper mit dem Protein G der Partikeloberfläche quervernetzt. Bei streptavidinbeladenen Partikeln erfolgt die Bindung über Biotin, welches zuvor in den Antikörper eingefügt wird. Um zu überprüfen, ob eine Bindung von Antikörpern an die Partikel stattfindet, werden die Überstände der Reaktionslösungen und die Waschfraktionen mittels PAGE und Western-Blot analysiert. Zusätzlich wird die Antikörperbindung an die Partikel mit Hilfe des Durchflusszytometers überprüft.

3.2.1. Kopplung von Antikörper an SonoVue[®] [SV]

3.2.1.1. Kopplung von Antikörper 18/20Fluo

Da die [SV] Partikel keine funktionalisierte Oberfläche besitzen, werden die Antikörper hier nur durch Adsorption gebunden. Auf Grund dessen werden testweise nur 18/20Fluo beladenen Partikel

hergestellt. Zunächst wird das lyophilisierte [SV] in 5 mL 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und in ein 10 mL Falcon Tube überführt. Dann werden unter leichtem vortexen a) 111,1 µL 18/20Fluo (1,8 mg/mL) bzw. b) 1111 µL 18/20Fluo (1,8 mg/mL) zugetropft. Dies entspricht a) 2 µg Antikörper/50 µL bzw. b) 20 µg Antikörper/50 µL [SV] Stammlösung. Die Partikel werden in einer 10 mL Spritze aufgenommen und 30 min. bei RT inkubiert. Zum Entfernen des ungebundenen Antikörpers wird das Volumen mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 10 mL erhöht und für 3 min. bei 500 rpm zentrifugiert. Der Unterstand wird abgenommen ([SV]+18/20Fluo U). Dann werden die Partikel einmal mit 10 mL 0,9 % NaCl-Lösung wie oben beschrieben gewaschen. Der Unterstand dieses Waschschrittes wird ebenfalls abgenommen ([SV]+18/20Fluo W). Die gewaschenen Partikel [SV18/20Fluo] werden in 5 mL 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und auf Eis gelagert. Es zeigt sich, dass die Partikelsuspensionen nach der Antikörperkopplung und den Waschschritten bei fast allen durchgeführten Ansätzen nicht mehr opaleszent sind, was auf eine Zerstörung der Partikel hindeutet.

3.2.2. Kopplung von Antikörper an Targestar-B [TS]

3.2.2.1. Kopplung von Antikörper Bio18/20Fluo

Die Kopplung von Antikörpern an Targestar-B erfolgt nach dem Protokoll der Firma Targeson Inc. (San Diego CA USA). Zu 1,5 mL [TS] Partikelstamm suspension werden 150 µL Kopplungsreagenz (KR) gegeben und für 20 min. bei RT inkubiert. Zum Waschen wird die Reaktionslösung in eine 3 mL Spritze aufgenommen und das Volumen mit Targestar-Puffer auf 3,5 mL erhöht. Dann wird für 3 min. bei 500 rpm zentrifugiert und der Unterstand in ein Eppi überführt ([TS]+KR). Der Rückstand wird in 1,5 mL Targestar-Puffer resuspendiert und in ein 5 mL Falcon Tube überführt. Dann werden unter leichtem vortexen a) 42 µL Bio18/20Fluo (1,43 mg/mL) bzw. b) 420 µL Bio18/20Fluo (1,43 mg/mL) zugetropft. Dies entspricht a) 2 µg Antikörper/50 µL bzw. b) 20 µg Antikörper/50 µL [TS] Stammlösung. Die Partikel werden wieder in der 3 mL Spritze aufgenommen und 20 min. bei RT inkubiert. Zum Entfernen des ungebundenen Antikörpers wird das Volumen mit Targestar-Puffer auf 3,5 mL erhöht und für 3 min. bei 500 rpm zentrifugiert. Da die Partikel sich an der Oberfläche anreichern, wird die Lösung darunter (der Unterstand) abgenommen ([TS]+Bio18/20Fluo U). Dann werden die Partikel einmal mit 3,5 mL Targestar-Puffer wie oben beschrieben gewaschen. Der Unterstand dieses Waschschrittes wird ebenfalls abgenommen ([TS]+Bio18/20Fluo W). Die gewaschenen Partikel [TSBio18/20Fluo] werden in 1,5 mL Targestar-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

3.2.3. Kopplung von Antikörper an Dynabeads[®] M-280 Streptavidin [SDB]

3.2.3.1. Kopplung von Antikörper Bio18/20Fluo

Es werden 100 µL der [SDB] Partikelstamm suspension in ein Eppi überführt und magnetisch pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Zum Waschen der Partikel werden sie in 1 mL PBS150 resuspendiert und magnetisch getrennt. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt, wobei die Überstände verworfen werden. Die gewaschenen Partikel werden in 500 µL PBS150 aufgenommen. Dann werden unter vortexen a) 2,8 µL Bio18/20Fluo (1,43 mg/mL) bzw. b) 28 µL Bio18/20Fluo (1,43 mg/mL) gelöst in 500 µL PBS150 zugetropft. Dies entspricht a) 2 µg Antikörper/50 µL bzw. b) 20 µg Antikörper/50 µL [SDB] Stammlösung. Die Partikel werden mit den Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Partikel mit Hilfe eines Magneten pelletiert. Der Überstand wird abgenommen ([SDB]+Bio18/20Fluo Ü) und die Partikel werden dreimal mit je 1 mL PBS150 wie oben beschrieben gewaschen. Die Überstände der einzelnen Waschschr itte werden ebenfalls abgenommen ([SDB]+Bio18/20Fluo W1-W3). Die gewaschenen Partikel [SDBBio18/20Fluo] werden in 500 µL PBS150 aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.3.2. Kopplung von Antikörper Bio6/40cFluo

Die Kopplung von Bio6/40cFluo erfolgt wie unter 3.2.3.1 beschrieben. Zudem wird das Volumen der Bio6/40cFluo Lösung aufgrund der unterschiedlichen Konzentration geändert in a) 6,7 µL Bio6/40cFluo (0,6 mg/mL) bzw. b) 67 µL Bio6/40cFluo (0,6 mg/mL) gelöst in 500 µL PBS150.

3.2.4. Kopplung von Antikörper an Roti[®]-MagBeads Protein G [RPGB]

3.2.4.1. Kopplung von Antikörper 18/20Fluo und chemische Kreuzvernetzung mit BS³

Es werden 100 µL der [RPGB] Partikelstamm suspension in ein Eppi überführt und magnetisch pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Zum Waschen der Partikel werden sie in 1 mL PBS150 resuspendiert und magnetisch getrennt. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt, wobei die Überstände verworfen werden. Die gewaschenen Partikel werden in 500 µL PBS150 aufgenommen. Dann werden unter vortexen a) 2,2 µL 18/20Fluo (1,8 mg/mL) bzw. b) 22 µL 18/20Fluo (1,8 mg/mL) gelöst in 500 µL PBS150 zugetropft. Dies entspricht a) 2 µg Antikörper/50 µL bzw. b) 20 µg Antikörper/50 µL [RPGB] Stammlösung. Die Partikel werden mit den Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Partikel mit Hilfe eines Magneten pelletiert. Der Überstand wird abgenommen ([RPGB]+18/20Fluo Ü) und die Partikel werden dreimal mit je 1 mL PBS150 wie oben beschrieben gewaschen. Die Überstände der einzelnen Waschschr itte werden ebenfalls abgenommen

([RPGB]+18/20Fluo W1-W3). Die gewaschenen Partikel [RPGB18/20Fluo] werden in 500 μL PBS150 aufgenommen.

Nun folgt das Vernetzen der gebundenen Antikörper mit dem Protein G an der Partikeloberfläche. Hierfür wird der Crosslinker BS³ verwendet, dessen Endkonzentration in der Reaktionslösung 500 μM betragen soll. Zu den [RPGB18/20Fluo] Suspensionen a) und b) werden je 20 μL 25 mM BS³-Lösung (2 mg BS³ gelöst in 140 μl H₂O) in 480 μL gegeben, kurz geschwenkt und bei RT für 30 min. inkubiert. Nach der Inkubation werden die Partikel wieder magnetisch abgetrennt und der Überstand wird abgenommen ([RPGB18/20Fluo]+BS³ Ü). Es folgt das dreimalige Waschen mit je 1 mL PBS150, bei dem die einzelnen Überstände in Eppis überführt werden ([RPGB18/20Fluo]+BS³ W1-W3). Zum Schluss werden die Partikel [RPGB18/20Fluo(BS³)] in je 500 μL PBS150 aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

3.2.4.2. Kopplung von Antikörper 6/40cFluo und chemische Kreuzvernetzung mit BS³

Die Kopplung von 6/40cFluo erfolgt wie unter 3.2.4.1 beschrieben. Lediglich das Volumen der 6/40cFluo Lösung wird aufgrund der unterschiedlichen Konzentration geändert in a) 4,7 μL 6/40cFluo (0,85 mg/mL) bzw. b) 47 μL 6/40cFluo (0,85 mg/mL) gelöst in 500 μL PBS150.

3.2.5. Kopplung von Antikörper an $\mu\text{MACS}^{\text{TM}}$ Protein G MicroBeads [MPGB]

Um ungebundene Antikörper von den [MPGB] Partikeln abzutrennen, werden diese über spezielle Säulen in einem starken Magnetfeld aufgereinigt. Dies hat zur Folge, dass die Partikel teilweise magnetisiert werden und aggregieren. Dadurch lassen sich diese Partikel kein zweites Mal über die Säulen aufreinigen, da sie von den Partikelaggregaten verstopft werden. Aus diesem Grund werden die immobilisierten Antikörper nicht mit dem Protein G auf der Partikeloberfläche quervernetzt.

3.2.5.1. Kopplung von Antikörper 18/20Fluo

Zu 250 μL [MPGB] Partikelstamm suspension gelöst in 250 μL PBS150 werden unter vortexen a) 5,6 μL 18/20Fluo (1,8 mg/mL) bzw. b) 56 μL 18/20Fluo (1,8 mg/mL) gelöst in 500 μL PBS150 zugetropft. Dies entspricht a) 2 μg Antikörper/50 μL bzw. b) 20 μg Antikörper/50 μL [MPGB] Stammlösung. Die Partikel werden mit den Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Partikel auf eine mit dreimal 1 mL PBS150 äquilibrierten MS-Säule pipettiert. Der Durchfluss wird gesammelt ([MPGB]+18/20Fluo DF) und die Säule dreimal mit 1 mL PBS150 gewaschen, wobei die einzelnen Fraktionen ebenfalls gesammelt werden ([MPGB]+18/20Fluo W1-W3). Zum Eluieren der Partikel wird die MS-Säule zunächst vom Magneten getrennt und für 15 min.

in ein Eppi gestellt. Dann werden die Partikel mit 500 μL PBS150 von der Säule eluiert [MPGB18/20Fluo] und bei 4 °C gelagert.

3.2.5.2. Kopplung von Antikörper 6/40cFluo

Die Kopplung von 6/40cFluo erfolgt wie unter 3.2.5.1 beschrieben. Lediglich das Volumen der 6/40cFluo Lösung wird aufgrund der unterschiedlichen Konzentration geändert in a) 11,8 μL 6/40cFluo (0,85 mg/mL) bzw. b) 118 μL 6/40cFluo (0,85 mg/mL) gelöst in 500 μL PBS150.

3.3. Zellkultur

Für die verschiedenen Zelllinien werden Medien unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet, die mit Zusätzen und Antibiotika ergänzt sein können. Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Medien und sonstigen in der Zellkultur benötigten Lösungen aufgelistet.

<i>Medium/Zusatz/Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM mit 580 mg/L L-Glutamin, 4500 mg/L D-Glucose, 15 mg/L Phenolrot
Wildtyp-Medium	DMEM, 10 % FCS-Hi, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
Selektions-Medium	DMEM, 10 % FCS-Hi, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 1 mg/mL G418
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) Trypsin/EDTA	DPBS ohne Calcium, Magnesium, Phenolrot 0,5 g/L Trypsin (1:250); 0,2 g/L EDTA·4Na, 0,85 g/L NaCl
AS-M.5 Medium	Endothelial Cell Growth Medium MV mit Supplement Mix

3.3.1. Kultivierung von HeLa- Zelllinien

Nicht-transfizierte HeLa Zellen werden in 20 mL Wildtyp-Medium kultiviert. Mit humanem CEACAM1 bzw. CEACAM8 stabil transfizierte Zellen erhielten als Zusatz zur Selektion G418. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C und 5 % CO_2 in T75 Zellkulturflaschen. Zum Erhalt der Zelllinien werden diese bei Erreichen der Konfluenz in einem Verhältnis von 1:40 alle 3-4 Tage subkultiviert.

Hierfür wird das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 mL DPBS gewaschen und nach Zugabe von 1 mL 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C so lange inkubiert, bis sich die ersten Zellen ablösen. Durch leichtes Klopfen wird der gesamte Zellrasen vom Flaschenboden gelöst. Um das Trypsin/EDTA zu inaktivieren werden die Zellen im Anschluss in 9 mL Medium suspendiert, in ein 10 mL Falcon-Tube überführt und bei 300 × g für 3 min. pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in 1 mL Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden entweder 10 µL Zellsuspension in einer Neubauer Zählkammer unter dem inversen Mikroskop ausgezählt, oder die Zellsuspension wird in 10 mL CASY[®]ton im Verhältnis 1:1000 (HeLa) verdünnt und mit Hilfe des CASY[®] Model TT Zellzählers gezählt.

Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer Zählkammer:

$$Z \times T \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzellzahl/mL}$$

Z: Mittelwert der ausgezählten Zellen aus 8 Großquadraten

VF: Verdünnungsfaktor der Zellen

V: Volumen in dem die auszuzählende Zellsuspension resuspendiert wurde

10⁴: Kammerfaktor

3.3.2. Kultivierung von AS-M.5 Zellen

Die Kultivierung von AS-M.5 Zellen erfolgt bei 37 °C und 5 % CO₂ in 10 mL AS-M.5 Medium. Die Zellen werden hierfür in T25 Zellkulturflaschen ausgesät. Zweimal pro Woche werden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 subkultiviert. Das alte Medium wird abgesaugt, die Zellen mit 5 mL DPBS gewaschen und nach Zugabe von 1 mL 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C so lange inkubiert, bis sich die ersten Zellen ablösen. Durch leichtes Klopfen wird der gesamte Zellrasen vom Flaschenboden gelöst. Um das Trypsin/EDTA zu inaktivieren, werden die Zellen im Anschluss in 5 mL Medium suspendiert, in ein 10 mL Falcon-Tube überführt und bei 300 × g für 3 min. pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in 1 mL Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden entweder 10 µL Zellsuspension in einer Neubauer Zählkammer unter dem inversen Mikroskop ausgezählt, oder die Zellsuspension wird in 10 mL CASY[®]ton im Verhältnis 1: 50 verdünnt und mit Hilfe des CASY[®] Model TT Zellzählers gezählt.

3.3.3. Lyse von HeLa Zellen

Für die Lyse von HeLa Zellen werden diese wie unter 3.3.1 beschrieben in einer T75 Zellkulturflasche bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Zum Ernten der Zellen wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 mL DPBS gewaschen und nach Zugabe von 1 mL 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C so lange inkubiert, bis sich die ersten Zellen ablösen. Durch leichtes Klopfen wird der gesamte Zellrasen vom Flaschenboden gelöst. Um das Trypsin/EDTA zu inaktivieren werden die Zellen im Anschluss in 9 mL Medium suspendiert, in ein 10 mL Falcon-Tube überführt und bei $300 \times g$ für 3 min. pelletiert. Das Zellpellet wird mit 10 mL DPBS gewaschen, bevor es in 1 mL eiskalten RIPA-Lysis Puffer, dem Proteinase-Inhibitor im Verhältnis 1:100 frisch zugeben wurde, resuspendiert wird. Nach einer Inkubation von 30 min. auf Eis unter zwei- bis dreimaligem Durchmischen, wird das Lysat für 10 s unter Verwendung eines Ultraschall Homogenisator SONOPULS HD2070 mit Mikrospritze MS73 gepulst beschallt. Anschließend wird das Lysat für 20 min. bei $18000 \times g$, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Eppendorf-Tube überführt und bei -20 °C gelagert.

3.4. Proteinbiochemische Methoden

3.4.1. Proteinauftrennung mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird in 0,75 mm Flachgelen basierend auf den Methoden von Schägger & Jagow^[75] bzw. Lämmli^[76] durchgeführt. Für die Herstellung dieser Gele sind folgend die Lösungen bzw. Puffer und deren Zusammensetzungen aufgelistet.

<i>Lösung/Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Acrylamid Stammlösung (37,5:1)	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid
Gelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,45, 0,3 % (w/v) SDS
APS	10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in H ₂ O
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Anodenpuffer	0,2 M Tris/HCl pH 8,9
Kathodenpuffer	0,1 M Tris/HCl pH 8,3, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS

Die Gele haben eine Acrylamidkonzentration im Trenngel von 7 % und im Sammelgel von 4 % und werden wie folgt zusammen pipettiert. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgt bei 200 V für 45 min.

<i>Lösung / Puffer</i>	<i>Trenngel 7 %</i>	<i>Sammelgel 4 %</i>
Acrylamid Stammlösung	0,875 mL	0,415 mL
Gelpuffer	1,25 mL	0,775 mL
Wasser	1,25 mL	1,9 mL
Glycerin	0,375 mL	—
APS	37,5 µL	50 µL
TEMED	3,75 µL	5 µL

Die Proben werden vorbereitet, indem zu max. 100 µg Protein 3 µL 5x SDS-Probenpuffer gegeben und das Volumen mit H₂O auf insgesamt 15 µL aufgefüllt wird. Für reduzierende Bedingungen werden zusätzlich zum Probenpuffer 1,5 µL (10 %) 1 M DTT zum Protein gegeben und das Volumen mit H₂O auf insgesamt 15 µL aufgefüllt.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
5 x Probenpuffer	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau

3.4.2. Charakterisierung elektrophoretisch getrennter Proteine

Zur Detektion der Proteine im Gel stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit werden die Gele mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.^[77] Da die Sensitivität der Coomassie-Färbung bei Proteinmengen unter 0,2 µg/Bande nicht mehr ausreicht^[77] und um die aufgetrennten Proteine genauer zu charakterisieren, werden sie zusätzlich elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (geblottet).^[78] Dadurch werden die Proteine für Immunreaktionen, Enzymreaktionen, Sequenzierungen, Ligandenbindungen und einer Vielzahl anderer Reaktionen zugänglich.

3.4.2.1. Coomassie Brilliant Blau Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wird das Gel mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau für ca. 15 min. gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wird durch das Behandeln des Gels mit Entfärbelösung für ca. 2 h entfernt.

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, H ₂ O ad 100 %
Entfärbelösung	5 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, H ₂ O ad 100 %

3.4.2.2. Western-Blot

Das Blotten erfolgt in einer Nass-Blot Kammer unter Eiskühlung für 1 h bei konstanten 100 V. Die beim Western-Blot eingesetzten Puffer sind wie folgt zusammengesetzt.

<i>Blotpuffer</i>	<i>Blockpuffer</i>	<i>TBS</i>
133 mM Glycin 12 mM Tris/HCl pH 8,4	20 mM Tris/HCl pH 7,6 137 mM NaCl 3 % Magermilchpulver	20 mM Tris/HCl pH 7,6 137 mM NaCl

Vor der Immunfärbung wird die Membran entweder 30 min. bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer geschwenkt. Anschließend wird die Membran mit TBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper, 1:5000 verdünnt in 1,5 % Milchpulver in TBS, inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Membran mit TBS erfolgt die Inkubation mit dem Zweitantikörper, der ebenfalls 1: 5000 in 1,5 % Milchpulver in TBS verdünnt wird, für 2 h bei RT. Danach wird die Membran dreimal für 5 min. mit TBS gewaschen. Dann folgt die Detektion der Proteine, indem die ECL-Gebrauchslösung auf den Blot pipettiert und die Chemilumineszenz mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer LAS-3000mini aufgezeichnet wird.

<i>ECL-Gebrauchslösung</i>	<i>Lösung A</i>	<i>Lösung B</i>	<i>Lösung C</i>
10 µL Lösung A 1 mL Lösung B 3 µL Lösung C	6,8 mM p-Coumarsäure DMSO	1,25 mM Luminol 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	3 % (v/v) H ₂ O ₂

3.4.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei 280 nm (OD₂₈₀). Für die Bestimmung anderer Proteinkonzentrationen wird in dieser Arbeit das BCA™ Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Die Absorption des gebildeten violetten Farbkomplexes

wird bei 562 nm detektiert. Zur Generierung einer Standardkurve im Konzentrationsbereich von 25 µg/mL – 1000 µg/mL werden Bovine Gamma Globulin (BGG) Standards, bei Konzentrationsbestimmungen von funktionalisierten Antikörpern, und Bovine Serum Albumin (BSA) Standards, bei Konzentrationsbestimmungen anderer Proteine, der Firma Pierce eingesetzt.

3.4.4. Bestimmung der Biotinininsertion

Die Bestimmung der Biotinininsertion in Proteinen erfolgt mit dem HABA-Test. Hierbei wird die Abnahme der Intensität der Absorption bei 500 nm gemessen, über die sich die Konzentration von Biotin bestimmen lässt.^[79,80] Der Test wird mit Hilfe des Biotin Quantitation Kits der Firma Pierce im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Als Positivkontrolle liegt biotinyliertes HRP bei.

3.4.5. Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA)

Mit Hilfe des Sandwich ELISAs sollen die Antigenbindungseigenschaften der antikörperbeladenen Partikel analysiert werden. Die einzelnen Schritte zur Durchführung sind im Folgenden beschrieben. Im ersten Schritt wird der polyklonale Antikörper an den Boden der *nunc maxisorp[®] flat-bottom 96 well immune plate* adsorbiert. Hierfür werden in jedes *well* 50 µL (5 µg/mL) polyklonaler Hase Anti-HumanCEA Antikörper in DPBS pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Beim zweiten Schritt werden, nachdem die Antikörperlösung durch Ausschlagen entfernt wurde, die freien Proteinbindestellen durch Zugabe von 350 µL DPBS + 3 % BSA pro *well* blockiert. Die Inkubation mit dieser Blockierlösung erfolgt für 2 h bei RT. Im Anschluss wird diese Lösung ebenfalls ausgeschlagen und die *wells* werden dreimal mit je 150 µL DPBS gewaschen. Im dritten Schritt folgt die Inkubation mit dem Standard (Antigen bekannter Konzentration) bzw. der Probe (Antigen unbekannter Konzentration). Jeweils 100 µL dieser Lösungen werden in die einzelnen *wells* der *nunc maxisorp[®] flat-bottom 96 well immune plate* pipettiert, die dann für 4 h bei RT leicht geschüttelt wird. Es werden dreifach Bestimmungen durchgeführt. Als Standard werden CEACAM1-Fc (Tabelle 1) bzw. CEACAM8-Fc (Tabelle 2) Lösungen eingesetzt. Als Probe mit unbekannter Antigenkonzentration werden 1:25 verdünntes HeLa-CEACAM1 Lysat bzw. 1:40 verdünntes HeLa-CEACAM8 Lysat verwendet. Die Verdünnungsfaktoren der Lysate sind mittels Verdünnungsreihe im Vorfeld ermittelt worden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Zusätzlich werden 100 µL DPBS + 1,5 % BSA als Leerwert in ein *well* pipettiert. Nach der Inkubation werden die Antigenlösungen ausgeschlagen und die *wells* werden dreimal mit je 150 µL DPBS gewaschen. Nun folgt der vierte Schritt, bei dem der monoklonale Antikörper bzw. die Partikelprobe an das jeweilige Antigen gebunden werden. Dafür werden je 100

μL (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) monoklonaler Antikörper bzw. 1:10 verdünnte Partikelprobe in die entsprechenden *wells* pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Standardlösungen im ELISA mit CEACAM1 als Antigen.

<i>Standard</i>	<i>Konzentration</i>	<i>CEACAM1-Fc</i>	<i>DPBS + 1,5 % BSA</i>
1	0 ng/mL	0,0 μL	350,0 μL
2	15 ng/mL	1,1 μL	348,9 μL
3	30 ng/mL	2,1 μL	347,9 μL
4	50 ng/mL	3,5 μL	346,5 μL
5	75 ng/mL	5,3 μL	344,7 μL
6	100 ng/mL	7,0 μL	343,0 μL
7	150 ng/mL	10,5 μL	339,5 μL
8	200 ng/mL	25,0 μL	325,0 μL

Tabelle 2: Zusammensetzung der Standardlösungen im ELISA mit CEACAM8 als Antigen.

<i>Standard</i>	<i>Konzentration</i>	<i>CEACAM8-Fc</i>	<i>DPBS + 1,5% BSA</i>
1	0 ng/mL	0,0 μL	350,0 μL
2	0,5 ng/mL	0,7 μL	349,3 μL
3	1,0 ng/mL	1,4 μL	348,6 μL
4	2,5 ng/mL	3,5 μL	346,5 μL
5	5,0 ng/mL	7,0 μL	343,0 μL
6	7,5 ng/mL	10,5 μL	339,5 μL
7	10,0 ng/mL	14,0 μL	336,0 μL
8	15,0 ng/mL	21,0 μL	329,0 μL

Die verwendeten Antikörper bzw. Partikelproben sind in den Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgelistet. Aufgrund dieser langen Inkubationszeit und weil sich sowohl die [SV] als auch die [TS] Partikel an der Oberfläche der Suspensionen anreichern, werden keine [SV] und [TS] Partikel im ELISA eingesetzt. Zudem zeigt sich, dass die [SV] Partikelsuspensionen nach der Antikörperbindung und den Waschschritten nicht mehr opaleszent sind, was auf eine Zerstörung der Partikel hindeutet. Die Überprüfung der Lösungen im Durchflusszytometer bestätigt diese Vermutung. Um ungebundene Antikörper bzw. Partikel zu entfernen, werden die Lösungen ausgeschlagen und die *wells* dreimal mit je 150 μL DPBS gewaschen. Im fünften Schritt werden je 100 μL Detektionsantikörper in jedes *well* pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Als Detektionsantikörper wird ein Ziege anti-Maus IgG(HRP) in

einer Verdünnung von 1:5000 in DPBS + 1,5 % BSA verwendet. Vor der Zugabe des Substrats für die Farbreaktion wird die Detektionslösung ausgeschlagen und die *nunc maxisorp[®] flat-bottom 96 well immune plate* wird viermal mit je 150 µL DPBS gewaschen. Im letzten Schritt werden in jedes *well* 150 µL TMB Substrat pipettiert. Die Farbreaktion verläuft unter konstantem Schütteln im Dunkeln für 15-30 min. Durch Zugabe von je 20 µL 2 N H₂SO₄ wird die Reaktion abgestoppt. Es folgt die Messung der OD am Mikroplattenleser Sunrise[™] der Firma Tecan bei 450 nm (Referenz 620 nm).

Tabelle 3: Monoklonale Antikörper im ELISA.

<i>Monoklonale Antikörper gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>Monoklonale Antikörper gegen CEACAM8 gerichtet</i>
18/20	6/40c
18/20Fluo	6/40cFluo
Bio18/20	Bio6/40c
Bio18/20Fluo	Bio6/40cFluo

Tabelle 4: Partikelproben im ELISA.

<i>Partikelproben gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>Partikelproben gegen CEACAM8 gerichtet</i>
[SDB]	[SDB]
[SDBBio18/20Fluo 2µg]	[SDBBio6/40cFluo 2µg]
[SDBBio18/20Fluo 20µg]	[SDBBio6/40cFluo 20µg]
[RPGB]	[RPGB]
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 2µg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 2µg]
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 20µg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 20µg]
[MPGB]	[MPGB]
[MPGB18/20Fluo 2µg]	[MPGB6/40cFluo 2µg]
[MPGB18/20Fluo 20µg]	[MPGB6/40cFluo 20µg]

3.5. Durchflusszytometrie

3.5.1. Analyse antikörperbeladener Partikel

Um die Beladung der Partikel mit den Antikörpern, die gegen CEACAM1 und CEACAM8 gerichtet sind, zu bestimmen, werden diese durchflusszytometrisch analysiert. Dabei ist zu beachten, dass µMACS[™] Protein G MicroBeads bzw. [CD31 MicroBead] Partikel aufgrund ihres sehr kleinen

Durchmessers von ca. 50 nm für eine direkte Detektion im Durchflusszytometer ungeeignet sind. Allerdings konnte bei der Durchführung der Versuche beobachtet werden, dass diese Partikel während der magnetischen Aufreinigung zur Aggregation neigen. Diese Partikelaggregationen rufen dann im Durchflusszytometer Signale hervor, die bei der Auswertung jedoch nicht mit einbezogen werden.

3.5.1.1. Analyse antikörperbeladener [SV] und [TS] Partikel

Zu jeweils 200 μL [SV] bzw. [TS] Partikellösung werden 150 μL DMEM + 3 % FCS in ein Probenröhrchen pipettiert und bis zur Messung auf Eis gekühlt. Es werden die in Tabelle 5 zusammengestellten Partikelproben analysiert.

Tabelle 5: [SV] und [TS] Partikelproben für die Bestimmung der Antikörperbeladung.

<i>[SV] Proben gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>[TS] Proben gegen CEACAM1 gerichtet</i>
[SV]	[TS]
[SV18/20Fluo 2 μg]	[TSBio18/20Fluo 2 μg]
[SV18/20Fluo 20 μg]	[TSBio18/20Fluo 20 μg]

3.5.1.2. Analyse antikörperbeladener [SDB] und [RPGB] Partikel

Für die Analyse der [SDB] und [RPGB] Partikel werden jeweils 20 μL Partikellösung in 230 μL DMEM + 3 % FCS aufgenommen, in ein Probenröhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gekühlt. Für die Bestimmung der Antikörperbeladung werden die in Tabelle 6 aufgeführten [SDB] und [RPGB] Partikel im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 6: [SDB] und [RPGB] Partikelproben zur Bestimmung der Antikörperbeladung.

<i>Partikelproben gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>Partikelproben gegen CEACAM8 gerichtet</i>
[SDB] + anti-Maus FITC	[SDB] + anti-Maus FITC
[SDBBio18/20Fluo 2 μg]	[SDBBio6/40cFluo 2 μg]
[SDBBio18/20Fluo 20 μg]	[SDBBio6/40cFluo 20 μg]
[RPGB] + anti-MausFITC	[RPGB] + anti-Maus FITC
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 2 μg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 2 μg]
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 20 μg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 20 μg]

3.5.2. Analyse von Zellen nach der Antikörper- bzw. Partikelbindung

Um die Zellbindungseigenschaften der Antikörper selbst und der antikörperbeladenen Partikel zu verifizieren, werden die Bindungen an die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Für die Messungen werden HeLa Wildtyp, HeLa-CEACAM1, HeLa-CEACAM8, und AS-M.5 Zellen verwendet. Die Zellen werden wie unter 3.3 beschrieben geerntet, mit Hilfe des CASY® Model TT Zellzählers ausgezählt und jeweils 5×10^5 Zellen pro Probe in ein Probenröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1300 rpm für 3 min. und Abdekantieren des Überstandes, werden die Zellen in jeweils 50 μ L DMEM + 3 % FCS resuspendiert.

3.5.2.1. Analyse der Zellbindung von [CD31 MicroBead] Partikeln

Für die Inkubation der AS-M.5 Zellen mit den [CD31 MicroBead] Partikeln, auf deren Oberfläche Anti-Human CD31 Antikörper immobilisiert sind, werden jeweils 20 μ L Partikellösung in 30 μ L DMEM + 3 % FCS zu den Zellen pipettiert. Die Zellen werden für 15 min. auf Eis unter zwischenzeitlichem Durchmischen der Proben mit den Partikeln inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen in 1 mL DMEM + 3 % FCS suspendiert und bei 1200 rpm für 3 min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 1 mL DMEM + 3 % FCS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen auf eine mit dreimal 3 mL DMEM + 3 % FCS äquilibrierte LS-Säule pipettiert. Der Durchfluss wird gesammelt und die Säule dreimal mit 3 mL DMEM + 3 % FCS gewaschen, wobei die einzelnen Fraktionen zusammen mit dem Durchfluss gesammelt werden. Zum Eluieren der Zellen wird die LS-Säule zunächst vom Magneten getrennt und für 15 min. in ein 10 mL Falcon-Tube gestellt. Die Zellen werden mit 5 mL DMEM + 3 % FCS von der Säule eluiert, bei 1200 rpm für 3 min. pelletiert und in 250 μ L DMEM + 3 % FCS aufgenommen. Zum Binden des sekundären Antikörpers Ziege anti-Maus IgG(FITC), mit einer Konzentration von 0,1 μ g/ μ L, wird die Probe für 15 min. auf Eis unter zwischenzeitlichem Durchmischen inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die Probe dreimal gewaschen, um ungebundenen Zweitantikörper zu entfernen. Hierfür werden jeweils 200 μ L DMEM + 3 % FCS zugefügt, durchmischt und bei 1200 rpm für 3 min. zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen. Die Zellen werden in 250 μ L DMEM + 3 % FCS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gekühlt.

3.5.2.2. Analyse der Bindung von Antikörpern an Zellen

Die Inkubation der Zellen mit Antikörpern (Tabelle 7) erfolgt für eine Stunde auf Eis unter zwischenzeitlichem Durchmischen der Proben. Die Konzentration der jeweiligen Antikörper in der Probe beträgt dabei 0,1 μ g/ μ L. Nach jeder Antikörperinkubation werden die Proben dreimal

gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Hierfür werden jeweils 200 µL DMEM + 3 % FCS zugefügt, durchmischt und bei 1200 rpm für 3 min. zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen. Die Zellen werden in 250 µL DMEM + 3 % FCS resuspendiert und auf Eis gekühlt.

Tabelle 7: Antikörper für die Analyse der Zellbindungseigenschaften am Durchflusszytometer.

<i>Antikörper gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>Antikörper gegen CEACAM8 gerichtet</i>	<i>Antikörper gegen CD31 gerichtet</i>
anti-Maus FITC (NK) 18/20 (prim.) anti-Maus FITC (sek.) 18/20Fluo Bio18/20 (prim.) anti-Maus FITC (sek.) Bio18/20Fluo	anti-Maus FITC (NK) 6/40c (prim.) anti-Maus FITC (sek.) 6/40cFluo Bio6/40c (prim.) anti-Maus FITC (sek.) Bio6/40cFluo	anti-Maus FITC (NK) anti-Human CD31 (prim.) anti-Maus FITC (sek.)

(NK: Negativkontrolle; prim.: primärer Antikörper; sek.: sekundärer Antikörper)

3.5.2.3. Analyse der Zellbindung von [SV] und [TS] Partikeln

Zu den Zellen werden jeweils 200 µL [TS] Partikellösung pipettiert, die dann für eine Stunde auf Eis unter zwischenzeitlichem Durchmischen inkubiert werden. Nach der Inkubation werden die Zellen zweimal gewaschen, um ungebundene Partikel zu entfernen. Hierfür werden jeweils 400 µL DMEM + 3 % FCS zugefügt, durchmischt und bei 1200 rpm für 3 min. zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen. Das Volumen dieser Proben wird mit DMEM + 3 % FCS auf 250 µL eingestellt und die Proben werden bis zur Messung auf Eis gekühlt. In Tabelle 8 sind die eingesetzten [TS] Partikelproben aufgeführt.

Tabelle 8: [TS] Partikelproben für die Bestimmung der Zellbindung.

[TS] Proben gegen CEACAM1 gerichtet

[TS]

[TSBio18/20Fluo 2µg]

[TSBio18/20Fluo 20µg]

Da die [SV] Partikelsuspensionen nach der Antikörperbindung und den Waschschritten nicht mehr opaleszent sind, deutet dies auf eine Zerstörung der Partikel hin. Die Überprüfung der Lösungen im Durchflusszytometer bestätigt diese Vermutung. Daher werden keine Bindungsuntersuchungen an Zellen mittels Durchflusszytometer durchgeführt.

3.5.2.4. Analyse der Zellbindung von [SDB], [RPGB] und [MPGB] Partikeln

Für die Inkubation der Zellen mit den verschiedenen [SDB] und [RPGB] Partikelproben (Tabelle 9) werden jeweils 20 µL Partikellösung in 30 µL DMEM + 3 % FCS zu den Zellen pipettiert. Bei der Verwendung von [MPGB] Partikelproben (Tabelle 9) werden dagegen 50 µL Partikellösung zu den Zellen pipettiert. Die Zellen werden für eine Stunde auf Eis unter zwischenzeitlichem Durchmischen der Proben mit den Partikeln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt kein Waschschrift. Das Volumen dieser Proben wird mit DMEM + 3 % FCS auf 250 µL eingestellt und die Proben werden bis zur Messung auf Eis gekühlt.

Tabelle 9: [SDB], [RPGB] und [MPGB] Partikelproben für die Analyse der Zellbindung.

<i>Partikelproben gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>Partikelproben gegen CEACAM8 gerichtet</i>
[SDB] + anti-Maus FITC	[SDB] + anti-Maus FITC
[SDBBio18/20Fluo 2µg]	[SDBBio6/40cFluo 2µg]
[SDBBio18/20Fluo 20µg]	[SDBBio6/40cFluo 20µg]
[RPGB] + anti-Maus FITC	[RPGB] + anti-Maus FITC
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 2µg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 2µg]
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 20µg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 20µg]
[MPGB] + anti-Maus FITC	[MPGB] + anti-Maus FITC
[MPGB18/20Fluo 2µg]	[MPGB6/40cFluo 2µg]
[MPGB18/20Fluo 20µg]	[MPGB6/40cFluo 20µg]

3.6. Fluoreszenzmikroskopie

3.6.1. Bindungsuntersuchungen mit AS-M.5 Zellen

In diesem Teil der immunzytochemischen Analyse wird das [CD31 MicroBead] Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Es dient als Kontrolle für die Bindung von antikörperbeladenen Partikeln an Zellen. Um ungebundene Antikörper- bzw. Partikel nach den einzelnen Inkubationen durch einfaches Waschen entfernen zu können, werden die Zellen als adhärenente Einzelzellrasen auf runden Deckgläsern angezüchtet. Die Zellen werden wie unter 3.3.2 beschrieben geerntet, mit Hilfe des CASY[®] Model TT Zellzählers ausgezählt und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter im zellspezifischen Medium resuspendiert. Die Deckgläser werden in *wells* von Zellkulturtestplatten überführt, mit je 1 mL Zellsuspension überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen mit [CD31 MicroBead] Partikeln

inkubiert. Für die Kontrolle werden die Antikörper anti-Maus FITC und anti-Human CD31(FITC) eingesetzt. Für die Inkubation der Zellen werden die Deckgläser abgetropft und es werden jeweils 50 μL der Antikörperlösungen bzw. Partikelprobe auf die Zellen pipettiert. Die Konzentration der Antikörper beträgt dabei 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Nach 15 min. Inkubation bei RT unter Lichtausschluß werden die Deckgläser abgetropft und jedes Deckglas wird dreimal für die Dauer von 2 min. mit $\text{PBS}+\text{Mg}^{2+}+\text{Ca}^{2+}$ gewaschen, um ungebundenen Antikörper bzw. ungebundene Partikel zu entfernen. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung werden die Deckgläser in neue Zellkulturtestplatten überführt und mit je 1 mL $\text{PBS}+\text{Mg}^{2+}+\text{Ca}^{2+}$ überschichtet. Die Zellen werden an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM) analysiert, wobei Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) und im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) bei 200facher Vergrößerung durchgeführt werden.

3.6.2. Bindungsuntersuchungen mit HeLa Zellen

Um die ungebundenen Antikörper- bzw. Partikel nach den einzelnen Inkubationen durch einfaches Waschen entfernen zu können, werden die Zellen als adhärente Einzelzellrasen auf runden Deckgläsern angezüchtet. Die Zellen werden wie unter 3.3.1 beschrieben geerntet, mit Hilfe des CASY[®] Model TT Zellzählers ausgezählt und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter im zellspezifischen Medium resuspendiert. Die Deckgläser werden in *wells* von Zellkulturtestplatten überführt, mit je 1 mL Zellsuspension überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen mit den Antikörpern und Partikeln entsprechend der Auflistung in der Tabelle 10 und Tabelle 11 inkubiert. Da sich die [TS] und [SV] Partikel an der Oberfläche der Suspension anreichern, werden die Deckgläser für die Zeit der Inkubation mit den Zellen nach unten auf die entsprechende Partikelsuspension gelegt. Hierdurch ist ein Kontakt der Partikel mit den Zellen gewährleistet.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für die Analyse der Zellbindungseigenschaften *in vitro*.

<i>Antikörper gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>Antikörper gegen CEACAM8 gerichtet</i>
anti-Maus FITC (NK)	anti-Maus FITC (NK)
18/20 (prim.)	6/40c (prim.)
anti-Maus FITC (sek.)	anti-Maus FITC (sek.)
18/20Fluo	6/40cFluo
Bio18/20 (prim.)	Bio6/40c (prim.)
anti-Maus FITC (sek.)	anti-Maus FITC (sek.)
Bio18/20Fluo	Bio6/40cFluo

(NK: Negativkontrolle; prim.: primärer Antikörper; sek.: sekundärer Antikörper)

Tabelle 11: Verwendete Partikelproben für die Analyse der Zellbindungseigenschaften *in vitro*.

<i>Partikelproben gegen CEACAM1 gerichtet</i>	<i>Partikelproben gegen CEACAM8 gerichtet</i>
[SV]	
[SV18/20Fluo 2µg]	
[TS]	
[TSBio18/20Fluo 2µg]	
[TSBio18/20Fluo 20µg]	
[SDB]	[SDB]
[SDBBio18/20Fluo 2µg]	[SDBBio6/40cFluo 2µg]
[SDBBio18/20Fluo 20µg]	[SDBBio6/40cFluo 20µg]
[RPGB]	[RPGB]
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 2µg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 2µg]
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 20µg]	[RPGB6/40cFluo(BS ³) 20µg]
[MPGB]	[MPGB]
[MPGB18/20Fluo 2µg]	[MPGB6/40cFluo 2µg]
[MPGB18/20Fluo 20µg]	[MPGB6/40cFluo 20µg]

Für die Inkubation der Zellen werden die Deckgläser abgetropft und es werden jeweils 50 µL der Antikörperlösungen bzw. Partikelproben auf die Zellen pipettiert. Die Konzentration der Antikörper beträgt dabei 0,1 µg/µL. Nach 15 min. Inkubation bei RT unter Lichtausschluß werden die Deckgläser abgetropft und jedes Deckglas wird dreimal für die Dauer von 2 min. mit PBS+Mg²⁺+Ca²⁺ gewaschen, um ungebundenen Antikörper bzw. ungebundene Partikel zu entfernen. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung werden die Deckgläser in neue Zellkulturtestplatten überführt und mit je 1 mL PBS+Mg²⁺+Ca²⁺ überschichtet. Die Zellen werden an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM) analysiert, wobei Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) und im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) bei 200facher Vergrößerung durchgeführt werden.

3.6.3. Bindungsuntersuchung mit HeLa Zellen unter Flußbedingungen

Für die Bindungsuntersuchung unter Flußbedingungen werden Flusskammern der Firma IBIDI verwendet. Die Anzucht der Zellen in diesen Kammern erfolgt nach Herstellerangaben, wie es im Folgenden kurz beschrieben ist. Die in den Zellkulturflaschen konfluenten Zellen werden wie unter 3.3.1 beschrieben geerntet, mit Hilfe des CASY[®] Model TT Zellzählers ausgezählt und in einer Konzentration von 6×10^5 Zellen pro Milliliter im zellspezifischen Medium resuspendiert. 100 µL

dieser Zellsuspension werden in die Flußkammer pipettiert. Nach Anhaftung der Zellen wird jedes Reservoir der Flußkammer mit 60 μL des zellspezifischen Mediums befüllt. Die Zellen werden dann bei 37 °C und 5 % CO_2 für 48 Stunden kultiviert. Laut Herstellerangaben resultiert daraus eine Konfluenz von mehr als 50 %. In Abhängigkeit von den durchzuführenden Aufnahmen am Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM) werden die Zellmembranen mit dem Farbstoff PKH26 nach Herstellerangaben eingefärbt, um einen besseren Kontrast zu erzielen.

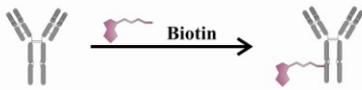
Für die Aufnahmen am Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM) wird die Flußkammer mit den Zellen nach oben, also über Kopf, auf dem Objektträgertisch angebracht und an eine Schlauchpumpe der Firma ISMATEC angeschlossen. Um Luftblasen aus dem System zu entfernen, wird mit 15 mL zellspezifischen Medium gespült. Die Partikelproben werden bei einer Flußrate von 1 mL/min in das System eingesaugt. Für die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) bzw. in den Spektralbereichen von 505 – 525 nm (Grün) und 555 – 575 nm (Rot) bei 200facher Vergrößerung wird die Flußrate auf 205 $\mu\text{L}/\text{min}$ reduziert. Dies entspricht einer Scherspannung von 0,2 – 0,3 dyn/cm^2 bzw. einer Scherrate von 20 – 30 s^{-1} .

4. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung CEACAM1-bindender Partikel für die molekulare Bildgebung des Prostatakarzinoms. Da eine frühzeitige und gesicherte Diagnose für eine erfolgreiche Tumorbehandlung und positive Prognose für den Patienten entscheidend ist, kann sich die Markierung der im Tumorfrühstadium gebildeten neuen Blutgefäße als ein vielversprechender Ansatz erweisen. Um neue Blutgefäße auszubilden, induziert der Tumor Neovaskulation, somit stellen die hierbei exprimierten Neoangiogenesemarker optimale Zielmoleküle für eine frühzeitige Detektion dar. Das humane carcinoembryonale Antigen zugehörige Zelladhäsionsmolekül 1 (CEACAM1) ist ein solcher Neoangiogenesemarker. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass dessen Expression in den neugebildeten Tumorblutgefäßen speziell in den Endothelzellen erhöht ist.^[40,41] Die Partikel sollen spezifisch an CEACAM1 exprimierende Zellen binden, um sie dann für die Detektion neoangiogenetisch aktivierter Endothelzellen zu verwenden. Um diese Zielsetzung zu erreichen, befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Ermittlung eines geeigneten Antikörpers und Partikels, um damit zunächst ein *in vitro* Testsystem mit entsprechenden Nachweismethoden zu etablieren. Dieses soll im späteren Verlauf auf ein Tiermodell-Testsystem übertragen werden. Die Verwendung einer Endothelzelllinie als *in vitro* Testsystem wäre hierfür optimal, insbesondere wenn diese Zellen CEACAM1 exprimieren. Freundlicherweise ist unserer Arbeitsgruppe ein Zellklon einer humanen Endothelzelllinie eines Angiosarkoms der Kopfhaut AS-M.5 von Frau Dr. V. Krump-Konvalinkova vom Klinikum der Universität München zur Verfügung gestellt worden. Eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Analyse des Expressionsmusters zeigt, dass diese Zellen unter anderem CEACAM1⁺ und CD31⁺ sind (Ergebnisse hier nicht aufgeführt) und sich daher für unser Testsystem sehr gut eignen. Bei der Verwendung der AS-M.5 Zellen gibt es allerdings keine Möglichkeit, den Grad der unspezifischen Bindung CEACAM1-bindender Partikel zu analysieren. Daher wird zunächst in einem *in vitro* Testsystem mit einer humanen CEACAM1 stabil transfizierten HeLa Zelllinie gearbeitet. Als Kontrolle und zum Nachweis unspezifischer Bindung steht dadurch die HeLa Wildtyp Zelllinie zur Verfügung. Auf diese Weise sollen die geeignetsten Partikel für das AS-M.5 *in vitro* Testsystem gefunden werden. Zur Herstellung CEACAM1-bindender Partikel wird der monoklonale Maus anti-Human CEACAM1 Antikörper Klon 18/20 auf der Oberfläche kommerziell erhältlicher Nano- bzw. Mikropartikel immobilisiert. Die Oberflächen der Partikel besitzen hierfür Biotin als reaktive Gruppe (Targestar), sind unmodifiziert (SonoVue) bzw. sind mit Protein G (Roti[®]-MagBeads Protein G; μ MACS[™] Protein G MicroBeads) oder Streptavidin (Dynabeads[®] M-280 Streptavidin) modifiziert. In der folgenden Abbildung 8 ist die experimentelle Vorgehensweise einmal bildlich veranschaulicht. Die Immobilisierung bei den Targestar und Dynabeads[®] M-280 Streptavidin Partikeln erfolgt über das Biotin-Streptavidin System.

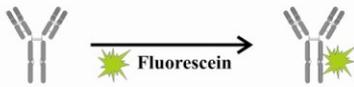
1.) Funktionalisieren der Antikörper

1a) Insertion von Biotin



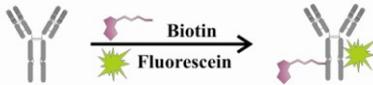
→ Bestimmung der Biotin-Insertion mittels HABA-Test

1b) Insertion von Fluorescein



→ Photometrische Bestimmung der Fluorescein-Insertion

1c) Insertion von Biotin und Fluorescein



→ i) Bestimmung der Biotin-Insertion mittels HABA-Test
ii) Photometrische Bestimmung der Fluorescein-Insertion

1d) Charakterisierung der Antigen-Bindungseigenschaften



→ i) ELISA

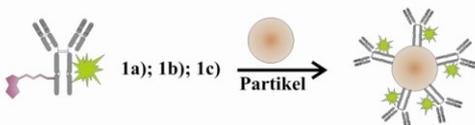


→ ii) Durchflusszytometrie



→ iii) Fluoreszenzmikroskopie

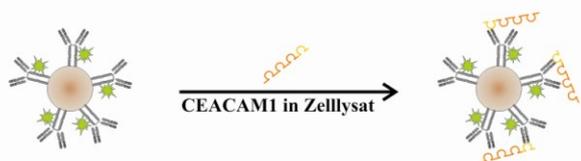
2.) Immobilisieren der Antikörper auf den Partikeln



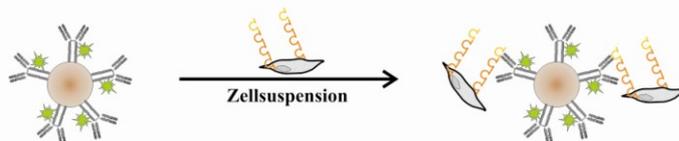
2a) Überprüfung der Beladung

→ i) Western-Blot
ii) Durchflusszytometrie

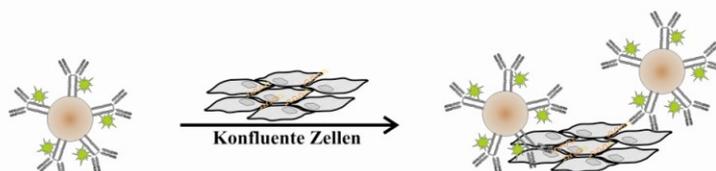
2b) Charakterisierung der Antigen-Bindungseigenschaften



→ i) ELISA



→ ii) Durchflusszytometrie



→ iii) Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung 8: Zusammenfassung der experimentellen Vorgehensweise.

Dieses stellt die stärkste nichtkovalente Bindung innerhalb der biologischen Interaktionen dar, wodurch quasi eine dauerhafte Anbindung des Antikörpers gegeben ist.^[81] Da die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG eine hohe Affinität gegenüber den Bindungsdomänen des Proteins G aufweist, erfolgt die Immobilisierung bei den Roti[®]-MagBeads Protein G und μ MACS[™] Protein G MicroBeads Partikeln entsprechend über diese Bindung, welche jedoch reversibel ist.^[82,83] Bei den SonoVue Partikeln, die keine Modifizierungen auf der Oberfläche besitzen, kann eine Bindung nur über Adsorption erfolgen, wobei schwache Van-der-Waals Kräfte zwischen Partikeloberfläche und Antikörper wirken.^[84] Diese CEACAM1-bindenden Partikel werden mit Hilfe des ELISAs, der Durchflusszytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert.

Die Expression von CEACAM1 findet vornehmlich an den Zell-Zell Kontakten statt, wo es an der Zelladhäsion beteiligt ist. Dadurch könnten die Interaktionsstellen des verwendeten Antikörpers bereits besetzt sein, so dass hierdurch die Bindung CEACAM1-bindender Partikel gehindert ist. Die Verwendung antikörperbeladener Partikel, die gegen ein besser zugängliches Zielprotein gerichtet sind, stellt eine Möglichkeit dar, um diese Fragestellung zu untersuchen. Da in unserer Arbeitsgruppe auch mit einer CEACAM8 stabil transfizierten HeLa Zelllinie gearbeitet wird, steht mit dem CEACAM8 ein wahrscheinlich besser zugängliches Zielprotein zur Verfügung, welches nicht nur an den Zell-Zell Kontaktstellen sondern auch apikal expremiert wird.^[85,86] Demzufolge sind freie Interaktionsstellen für die Bindung CEACAM8 spezifischer Partikel verfügbar. Hierdurch entsteht ein vergleichbares *in vitro* Testsystem für die CEACAM1-bindenden Partikel. Ein weiterer Unterschied zum CEACAM1 ist, dass CEACAM8 über einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden ist.^[87] Somit besitzt CEACAM8 eine laterale Beweglichkeit in der Zellmembran, wodurch ebenfalls eine Bindung von Partikeln begünstigt sein könnte.^[88] Allerdings wird CEACAM8 nicht auf Endothelzellen expremiert, so dass dieses System nicht für unsere eigentliche Fragestellung herangezogen werden kann. Als CEACAM8 spezifischer Antikörper wird der monoklonale Maus anti-Human CEACAM8 Klon 6/40c benutzt, welcher analog zum 18/20 Antikörper auf der Oberfläche der oben genannten Partikel immobilisiert wird. Hierbei werden standardmäßig bei jeder Charge 18/20 bzw. 6/40c Antikörper, welche in der Arbeitsgruppe generiert wird, Spezifitätsuntersuchungen und Charakterisierungen der Isotypen durchgeführt. Diese Ergebnisse (Daten nicht dargestellt) zeigen, dass es keinen Unterschied zwischen der Inkubation mit Isotyp IgG + Zweitantikörper anti-Maus FITC und der Inkubation nur mit dem Zweitantikörper anti-Maus FITC gibt. In den durchgeführten Experimenten ist daher der Zweitantikörper anti-Maus FITC alleine als Kontrolle eingesetzt worden. Durch die parallele Entwicklung CEACAM8-bindender Partikel wird jedoch eine Isotypenkontrolle für die CEACAM1-bindenden Partikel generiert, bei welcher der Nachweis einer spezifischen Bindung in einem vergleichbaren Testsystem charakterisiert wird. Bei standardmäßigen Isotypenkontrollen wird

dieser Aspekt nicht genauer untersucht. Die CEACAM8-bindenden Partikel werden allerdings erst als Isotypenkontrolle verwendet, wenn antikörperbeladene Partikel ermittelt sind, welche sowohl spezifisch an CEACAM1 exprimierende, als auch spezifisch an CEACAM8 exprimierende Zellen binden. Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass dies bei den vorliegenden Experimenten noch nicht im gewünschten Maß erfolgt ist, weshalb hier vorerst keine Isotypenkontrollen durchgeführt worden sind.

4.1. Bindung von [CD31 MicroBead] Partikeln an AS-M.5 Zellen

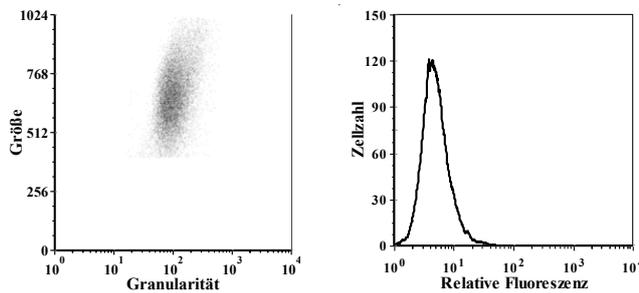
Um zunächst zu testen, ob eine Bindung von molekularen Markern an AS-M.5 Zellen möglich ist, werden diese Zellen in einem „Proof of Principle“ Versuch mit [CD31 MicroBeads] Partikeln der Firma Miltenyi Biotec inkubiert. Bei diesen Partikeln handelt es sich um superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel, auf deren Oberfläche monoklonaler Maus anti-Human CD31 immobilisiert ist. Die eigentliche Verwendung dieser Partikel besteht in der Isolierung CD31-positiver Endothelzellen. Da diese Partikel einem Markersystem für eine molekulare Bildgebung im MRT gut entsprechen, werden sie in dieser Arbeit für diese Bindungsuntersuchung genutzt. Darüber hinaus sollen die erhaltenen Ergebnisse den Nachweis liefern, dass auf diese Weise markierte Zellen im Durchflusszytometer und im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können.

4.1.1. Ergebnisse der Durchflusszytometrie

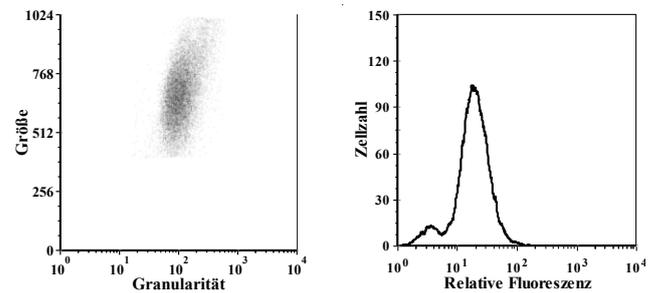
Da die [CD31 MicroBead] Partikel nur einen Durchmesser von ca. 50 nm aufweisen, ist eine direkte Detektion im Durchflusszytometer nicht möglich. Daher wird als Negativkontrolle der Zweitantikörper anti-Maus FITC eingesetzt. Als Positivkontrolle dient der monoklonale Maus anti-Human CD31 Antikörper. Die Bindungseigenschaften werden an AS-M.5 Zellsuspensionen untersucht, wie es in Abschnitt 3.5.2.1 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in Form von Dot-Blots zusammengestellt, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist. Des Weiteren sind diese Ergebnisse in Histogrammen dargestellt, bei denen die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz der Zellen mit einem Fluorochrom. Das heißt, je stärker das Signal der relativen Fluoreszenz ist, desto mehr Fluorophor ist an den Zellen gebunden. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der Zellen, die mit anti-Maus FITC Antikörper inkubiert werden, die Stärke der Eigenfluoreszenz der Zellen zusammen mit der Hintergrundfluoreszenz des Antikörpers, die durch unspezifische Bindung hervorgerufen wird, wieder. Die Eigenfluoreszenz, die durch endogene Fluorophore hervorgerufen wird^[89], wird als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt. Die Signalwolke in den Dot-Blots

(Abbildung 9) gibt die detektierten Zellen wieder. Die Zellen der Negativkontrolle zeigen im Histogramm Fluoreszenz mit einem Median von 5 (Tabelle 12), welche die Eigenfluoreszenz darstellt. Die Positivkontrolle weist im Histogramm eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf einen Median von 18 auf. Die Zellen exprimieren demnach humanes CD31 Protein auf ihrer Zelloberfläche. Nach Bindung der [CD31 MicroBead] Partikel und Detektion mit anti-Maus FITC ist ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um ca. das Dreifache gegenüber der Eigenfluoreszenz auf einen Median von 13 zu erkennen.

AS-M.5 + anti-Maus FITC



AS-M.5 mit anti-Human CD31 + anti-Maus FITC



AS-M.5 mit [CD31 MicroBead] + anti-Maus FITC

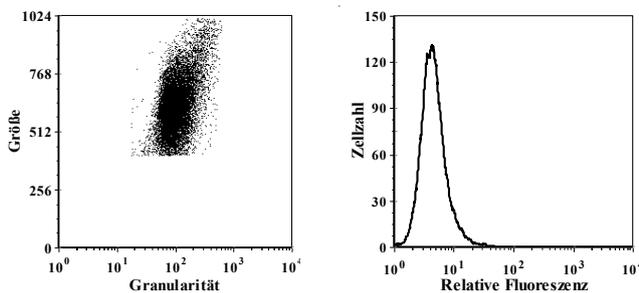


Abbildung 9: Dot-Blots und Histogramme von AS-M.5 Zellen nach der Inkubation mit anti-Maus IgG(FITC), anti-Human CD31 Antikörper und [CD31 MicroBead] Partikeln.

Tabelle 12: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist die prozentuale Verteilung der erfassten Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Antikörper/Partikel	Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen
AS-M.5	anti-Maus FITC	5 (100 %)
	anti-Human CD31	18 (100 %)
	[CD31 MicroBead]	13 (100 %)

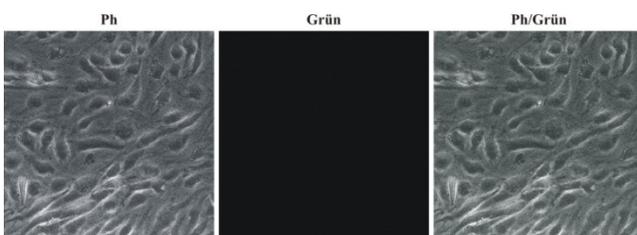
Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die Nanopartikel keinen verändernden Einfluss auf die Größe bzw. Granularität der Zellen besitzen, da sonst eine Verschiebung durch Zunahme der Größe bzw. Granularität in den Dot-Blots detektiert werden würde.

Somit zeigen die Ergebnisse, dass die hier eingesetzten Zellen $CD31^+$ sind. Des Weiteren ist eine spezifische Bindung von Partikeln an $CD31^+$ Zellen möglich, wenn an der Partikeloberfläche Antikörper gegen dieses Protein immobilisiert sind. Außerdem ist hiermit gezeigt, dass sich die Durchflusszytometrie als analytisches Verfahren für den Nachweis eignet.

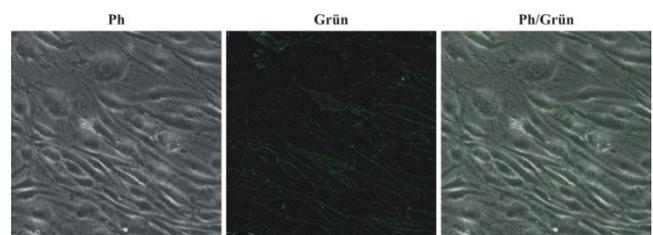
4.1.2. Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

Um zu testen, ob die Bindung der [CD31 MicroBead] Partikel an $CD31^+$ Zellen auch mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden kann, werden konfluente AS-M.5 Zellen mit den Partikeln, wie es in Abschnitt 3.6.1 beschrieben ist, inkubiert. Als Negativkontrolle wird der Zweitantikörper anti-Maus FITC eingesetzt und als Positivkontrolle dient der monoklonale Maus anti-Human CD31(FITC) Antikörper. Die Zellen werden an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM) analysiert, wobei Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) und im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) bei 200facher Vergrößerung durchgeführt werden. Da der Durchmesser der Partikel bei ca. 50 nm liegt, sind sie in den Phasenkontrastaufnahmen nicht zu erkennen. In Abbildung 10 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dieser Versuche aufgeführt. Nach der Inkubation der Zellen mit dem Zweitantikörper wird keine Fluoreszenz detektiert. Wie schon bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen liefert auch hier die Negativkontrolle das erwartete Ergebnis, da es zu keiner unspezifischen Bindung des Zweitantikörpers an die Zellen kommen soll. Nach der Inkubation mit dem anti-HumanCD31(FITC) Antikörper ist eine Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell Kontaktstellen erkennbar. Die Zellen exprimieren demnach CD31 auf der Zelloberfläche.

AS-M.5 + anti-Maus FITC



AS-M.5 + anti-Human CD31(FITC)



AS-M.5 mit [CD31 MicroBead] + anti-Maus FITC

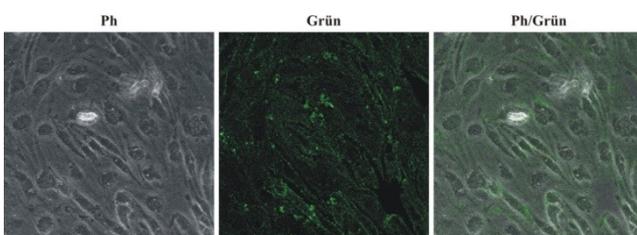


Abbildung 10: CLSM Aufnahmen von AS-M.5 Zellen nach der Inkubation mit anti-Maus FITC, anti-HumanCD31(FITC) und [CD31 MicroBead] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Des Weiteren zeigen die Aufnahmen, dass nach der Inkubation der Zellen mit [CD31 MicroBead] Partikeln ebenfalls eine deutliche Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell Kontaktstellen zu sehen ist. Damit ist eine spezifische Bindung der Partikel an CD31⁺ Zellen nachgewiesen und es ist gezeigt, dass auch die Fluoreszenzmikroskopie ein geeignetes analytisches Verfahren darstellt. Des Weiteren führt diese Methode sogar zu deutlicheren Ergebnissen, da sich die Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle bzw. der Probe signifikant von der Negativkontrolle unterscheidet. In der Durchflusszytometrie ist dieser Unterschied nur gering. Durch die Immobilisierung des anti-Human CD31 Antikörpers auf der Partikeloberfläche könnte die Zugänglichkeit für den sekundären anti-Maus FITC Antikörper beeinträchtigt sein, so dass dies im Durchflusszytometer nur zu einer geringen Verschiebung der Fluoreszenzintensität bei zellgebundenen Partikeln führt.^[90] Um den Einsatz eines sekundären Antikörpers zu umgehen, sind die in den nachfolgenden Experimenten verwendeten monoklonalen Maus anti-Human CEACAM1 Klon 18/20 (18/20) bzw. monoklonalen Maus anti-Human CEACAM8 Klon 6/40c (6/40c) Antikörper mit einem Fluorophor markiert worden. Dadurch wird die Detektion der Partikel auch ohne die Bindung eines sekundären Antikörpers gewährleistet. Den Ergebnissen der Bindung von [CD31 MicroBead] Partikeln an AS-M.5 Zellen zufolge sollte also eine Entwicklung CEACAM1 spezifischer Partikel und deren spezifischen Bindung an CEACAM1 exprimierenden Zellen möglich sein.

4.2. Modifizierung von 18/20 und 6/40c Antikörpern

Die Markierung der 18/20 bzw. 6/40c Antikörper mit dem Fluorophor Fluorescein (Abschnitt 3.1.3.2) ermöglicht eine direkte Visualisierung antikörperbeladener Partikel z.B. in der Durchflusszytometrie.

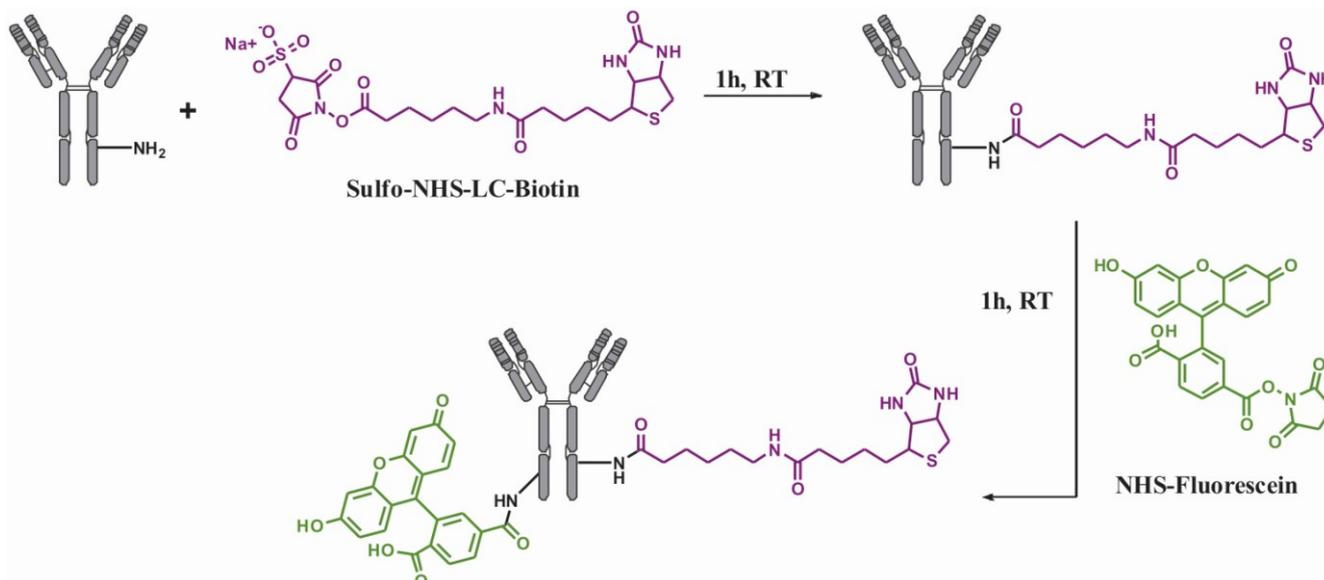


Abbildung 11: Reaktionsschema der Antikörpermodifizierung am Beispiel der Biotin- und Fluoresceininserktion.

Zusätzlich werden Inkubationszeiten und Waschschritte bei Zellexperimenten reduziert. Für die Bindung an die Partikel über das Biotin-Streptavidin-System ist die Biotinylierung der Antikörper notwendig (Abschnitt 3.1.3.1). In Abbildung 11 ist beispielhaft das Reaktionsschema der Biotin- und Fluoresceininsertion dargestellt. Die Einführung der Modifizierungen verläuft mit NHS-Ester aktivierten Reagenzien unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung.^[91,92] Die einfache Modifizierung der Antikörper verlief sehr gut und zeigt nahezu äquivalente Antikörperausbeuten von 80 % - 100 % (Tabelle 13). Bei der Biotinylierung ist jedoch darauf zu achten, dass die Insertion von Biotinmolekülen möglichst gering bleibt, um bei der Partikelbindung Quervernetzungen und somit Inaktivierung von Antikörpern bzw. Partikeln zu vermeiden.

Tabelle 13: Antikörpermodifizierungen.

	<i>18/20 + Biotin</i>	<i>18/20 + Fluorescein</i>	<i>Bio18/20 + Fluorescein</i>	<i>6/40c + Biotin</i>	<i>6/40c + Fluorescein</i>	<i>Bio6/40c + Fluorescein</i>
Insertion	5 mol	2 mol	3 mol	2 mol	3 mol	7 mol
Antikörperausbeute	95 %	80 %	64 %	100 %	95 %	57 %

Die zusätzliche Einführung von Fluorescein in biotinylierte Antikörper ist ebenfalls möglich. Dies führt jedoch zu Ausbeuteverlusten von ca. 40 % (Tabelle 13) bei den Antikörpern, was wahrscheinlich auf die Aufreinigung zurückzuführen ist. Da diese manuell über PD10 Säulen verläuft, ist eine exakte Fraktionierung der biotinylierten und fluoreszenzmarkierten Antikörper nicht möglich. Eine Aufreinigung über einen HPLC mit Fluoreszenzdetektor, welcher leider nicht zur Verfügung stand, könnte zu höheren Ausbeuten führen, da die jeweiligen Antikörper gezielt fraktioniert gesammelt werden würden.

4.2.1. Untersuchung der Antikörper–Antigen-Bindung mittels Sandwich ELISA

Um zu prüfen, ob die 18/20 und 6/40c Antikörper auch nach den Modifikationen das jeweilige Antigen binden, werden sie mittels Sandwich-ELISA, wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, getestet. Hier sei nochmals erwähnt, dass eine CEACAM8 stabil transfizierte HeLa Zelllinie nicht für unsere eigentliche Fragestellung herangezogen werden kann. Sie wird dennoch verwendet, da damit ein Zellsystem mit wahrscheinlich besser zugänglichem Zielprotein zur Verfügung steht. Zudem wird eine Isotypenkontrolle für die CEACAM1-bindenden Partikel generiert, bei welcher der Nachweis einer spezifischen Bindung in einem vergleichbaren Testsystem erfolgt. Verdünnte HeLa-CEACAM1 bzw. HeLa-CEACAM8 Lysate dienen als Antigen enthaltende Proben unbekannter Konzentration. Die Verdünnungsfaktoren der Lysate sind mittels Verdünnungsreihe im Vorfeld ermittelt worden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Als Positivkontrolle dienen die unmodifizierten Antikörper.

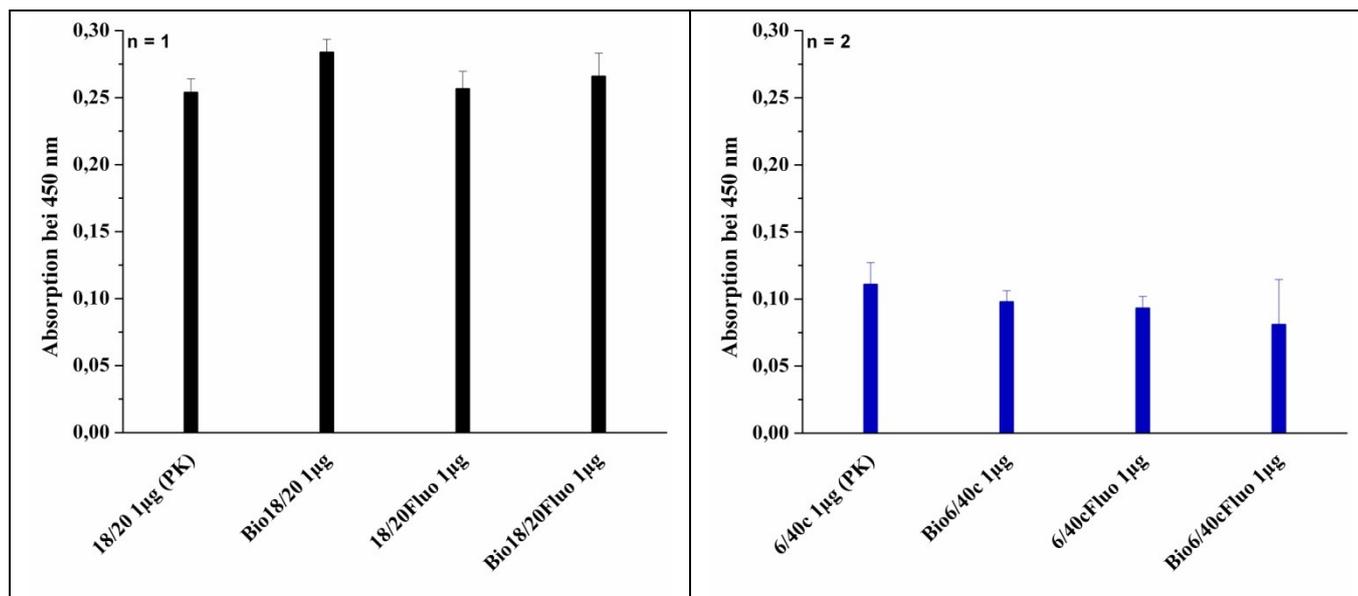


Abbildung 12: Test der modifizierten Antikörper im ELISA (PK: Positivkontrolle).

Die aus der Dreifachbestimmung erhaltenen Ergebnisse in Abbildung 12 weisen für den 18/20 Antikörper als Positivkontrolle eine Absorption von $0,254 \pm 0,010$, für den Bio18/20 Antikörper eine Absorption von $0,284 \pm 0,010$, für den 18/20Fluo Antikörper eine Absorption von $0,257 \pm 0,013$ und für den Bio18/20Fluo Antikörper eine Absorption von $0,266 \pm 0,017$ auf. Somit zeigt sich bei dem 18/20 Antikörper durch die Modifikationen keine signifikante Verminderung der Antigenbindung. Der unmodifizierte 6/40c Antikörper zeigt eine Absorption von $0,111 \pm 0,016$, der Bio6/40c Antikörper eine Absorption von $0,098 \pm 0,008$, der 6/40cFluo Antikörper eine Absorption von $0,093 \pm 0,009$ und der Bio6/40cFluo Antikörper eine Absorption von $0,081 \pm 0,034$. Auch bei dem 6/40c Antikörper ergeben sich durch die Modifizierungen keine signifikanten Verminderungen der Antigenbindung. Allerdings ist die Intensität der Absorption bei allen 6/40c Antikörpern sehr gering. Eine erneute Durchführung mit höheren Lysatkonzentrationen hätte sehr wahrscheinlich zu besseren Absorptionsintensitäten geführt und aussagekräftigere Ergebnisse geliefert. Aufgrund der guten Ergebnisse bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen (vgl. Abschnitt 4.2.2) ist darauf aber verzichtet worden.

4.2.2. Untersuchung der Antikörper – Zell Bindung mittels Durchflusszytometrie

Des Weiteren werden die Antikörper im Durchflusszytometer, wie es in Abschnitt 3.5.2.2 beschrieben ist, auf ihre Zellbindungseigenschaften hin getestet. Als Kontrolle für die modifizierten Antikörper dienen die jeweiligen unmodifizierten Antikörper, die durch den Zweitantikörper anti-Maus FITC detektiert werden. Der 18/20 Antikörper wird an HeLa-CEACAM1 und der 6/40c Antikörper an HeLa-CEACAM8 Zellen getestet. Zur Kontrolle werden HeLa Wildtyp Zellen mit den Antikörpern inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Zellen auszuschließen. Die Ergebnisse

dieser Messungen sind in Form von Histogrammen dargestellt, bei denen die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz aufgetragen ist. Die Kurven sind in diesen Histogrammen entsprechend der Antikörpermodifikation farblich unterschieden. Die Mediane der relativen Fluoreszenz bei den HeLa Wildtyp Zellen zeigen, dass der 18/20Fluo und vor allem Bio18/20Fluo Antikörper in geringem Maße unspezifisch an die Zellen bindet. Der 18/20 und Bio18/20 Antikörper weist dagegen keine unspezifische Bindung auf (Abbildung 13, Tabelle 14). Die maximale Fluoreszenzintensität wird durch die Bindung des 18/20 Antikörpers und anschließende Detektion mit dem anti-Maus FITC Antikörper ermittelt. Hier ergibt sich, wie aus Abbildung 13 und Tabelle 14 zu entnehmen, ein Median der relativen Fluoreszenz von 239 für die Bindung an HeLa-CEACAM1 Zellen.

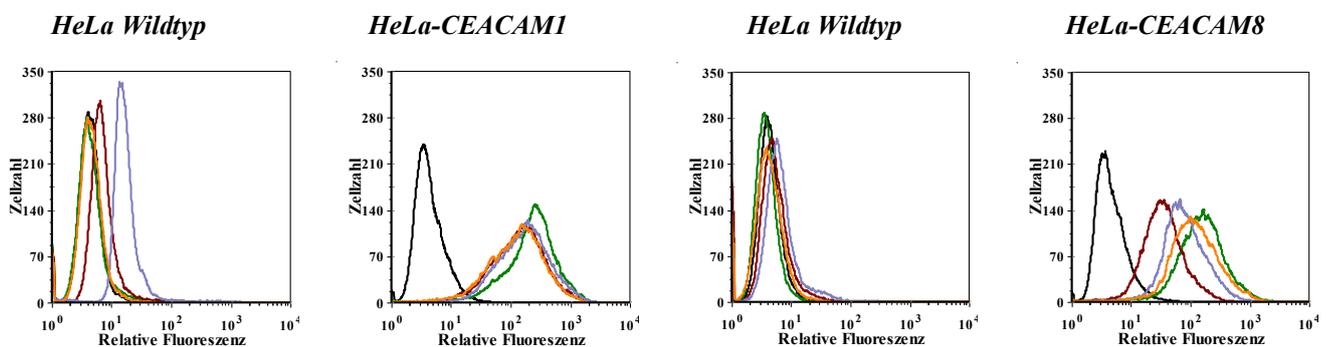


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der modifizierten Antikörper an HeLa Wildtyp, HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8; Linienfarbe im Histogramm: Schwarz: anti-Maus FITC; Grün: 18/20 (6/40c); Rotbraun: 18/20Fluo (6/40cFluo); Orange: Bio18/20 (Bio6/40c); Violett: Bio18/20Fluo (Bio6/40cFluo).

Tabelle 14: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen der Bindung von 18/20 bzw. 6/40c Antikörpern an HeLa Wildtyp, HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8.

<i>Antikörper</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>	
	<i>HeLa Wildtyp</i>	<i>HeLa-CEACAM1</i>
anti-Maus FITC	4	4
18/20	4	239
18/20Fluo	7	143
Bio18/20Fluo	16	175
Bio18/20	4	135
<i>Antikörper</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>	
	<i>HeLa Wildtyp</i>	<i>HeLa-CEACAM8</i>
anti-Maus FITC	4	4
6/40c	4	155
6/40cFluo	5	34
Bio6/40cFluo	6	76
Bio6/40c	4	114

Der 18/20Fluo Antikörper erreicht mit einem Median von 143 eine Effizienz von ca. 60 % bei HeLa-CEACAM1 Zellen. Die Markierungseffizienz des Bio18/20Fluo Antikörpers liegt bei ca. 73 % (HeLa-CEACAM1) und die des Bio18/20 Antikörpers bei ca. 56 % (HeLa-CEACAM1). Die Ergebnisse der 6/40c Antikörper sind ebenfalls in Abbildung 13 und Tabelle 14 aufgeführt. Diese Antikörper zeigen keine unspezifische Bindung. Der Median der relativen Fluoreszenz von 155 gibt die maximale Fluoreszenzintensität der Bindung von 6/40c an HeLa-CEACAM8 wieder. Einen Median von nur 34, welches eine Markierungseffizienz von ca. 22 % bedeutet, weist der 6/40cFluo Antikörper auf. Für den Bio6/40cFluo Antikörper ergibt sich aus dem Median der relativen Fluoreszenz von 76 eine Markierungseffizienz von ca. 49 % und für den Bio6/40c Antikörper aus dem Median von 114 eine Markierungseffizienz von ca. 74 %.

4.2.3. Untersuchung der Antikörper Bindung an adhärenente Zell-Monolayer

Die modifizierten Antikörper werden in *in vitro* Untersuchungen auf ihre Bindungseigenschaften hin getestet. Die genaue Durchführung der Experimente ist in Abschnitt 3.6.2 beschrieben. Als Positivkontrolle werden die jeweiligen unmodifizierten Antikörper, die durch den Zweitantikörper anti-Maus FITC detektiert werden, verwendet. Als Negativkontrolle werden die Zellen mit dem Zweitantikörper anti-Maus FITC inkubiert. Die modifizierten 18/20 Antikörper werden an HeLa-CEACAM1 Zellen getestet und die entsprechenden 6/40c Antikörper an HeLa-CEACAM8 Zellen. Zur Kontrolle werden die jeweiligen Wildtyp Zellen mit den Antikörpern inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Zellen auszuschließen. Die Zellen werden an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM) analysiert, wobei Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) und im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) bei 200facher Vergrößerung durchgeführt werden.

4.2.3.1. Bindung von 18/20 Antikörpern an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen

Die Inkubationen der Zellen mit anti-Maus FITC (Abbildung 14) zeigen, dass der Zweitantikörper weder an HeLa Wildtyp noch an HeLa-CEACAM1 Zellen unspezifisch bindet. Die weiteren Ergebnisse (Abbildung 14) lassen erkennen, dass die Modifizierungen des 18/20 Antikörpers mit Fluorescein oder Biotin bzw. Fluorescein und Biotin zusammen keinen Einfluss auf dessen Spezifität in *in vitro* Experimenten hat. Nach der Inkubation der HeLa Zellen mit den verschiedenen modifizierten Antikörpern sind nur bei den CEACAM1 exprimierenden HeLa Zellen Fluoreszenzfärbungen an den Zell-Zell Kontakten detektierbar. Es ist zu erkennen, dass die modifizierten Antikörper mit annähernd gleicher Effizienz an die Zellen binden wie der unmodifizierte 18/20 Antikörper. Zusätzlich zeigen die Aufnahmen, dass keine Fluoreszenzfärbungen bei Verwendung von HeLa Wildtyp Zellen auftreten. Somit weisen die Antikörper keine unspezifischen Bindungen auf.

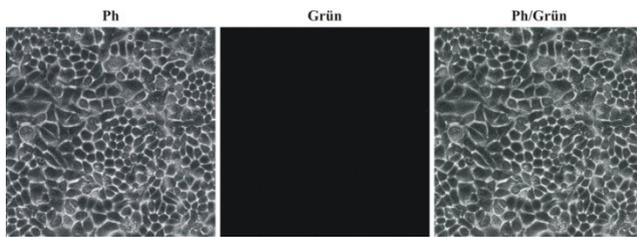
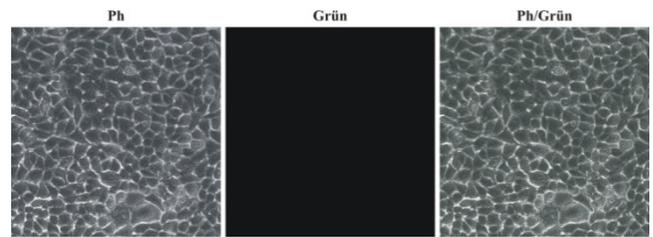
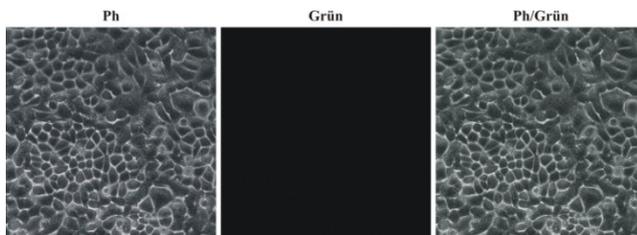
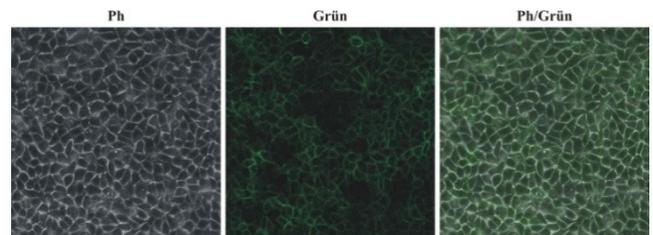
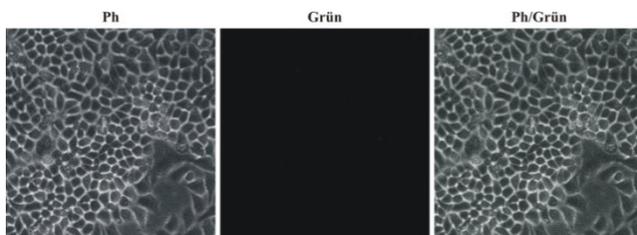
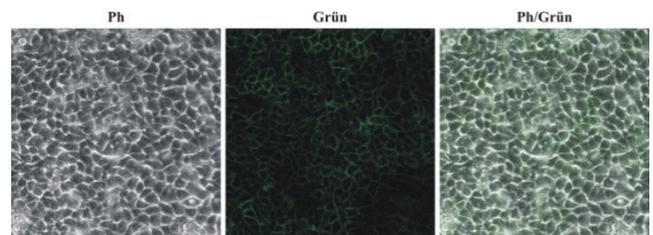
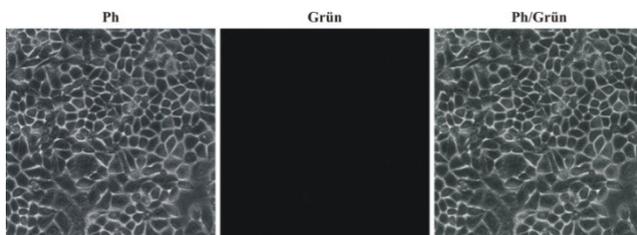
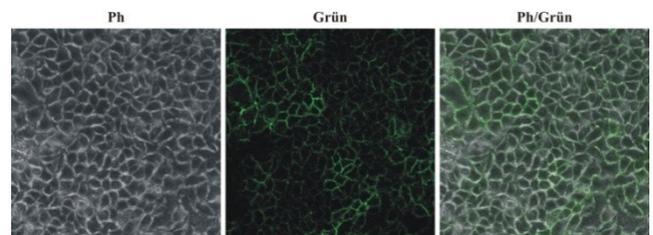
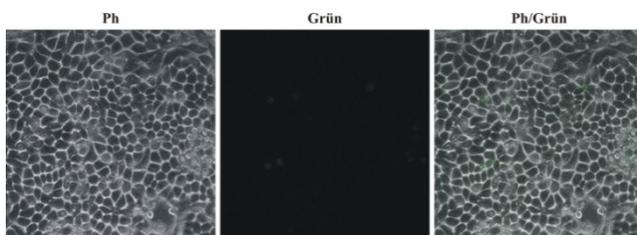
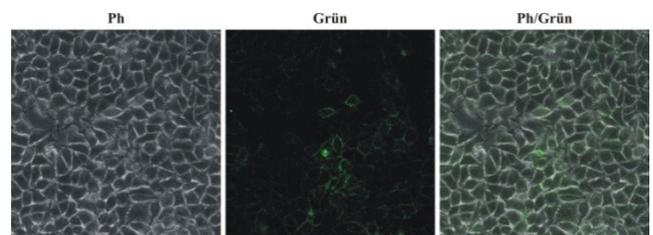
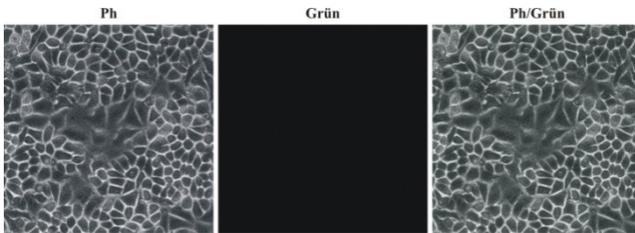
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC*HeLa-CEACAM1 + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp + 18/20 + anti-Maus FITC**HeLa-CEACAM1 + 18/20 + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp + 18/20Fluo**HeLa-CEACAM1 + 18/20Fluo**HeLa Wildtyp + Bio18/20 + anti-Maus FITC**HeLa-CEACAM1 + Bio18/20 + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp + Bio18/20Fluo**HeLa-CEACAM1 + Bio18/20Fluo*

Abbildung 14: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Bindung von 18/20 Antikörpern. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

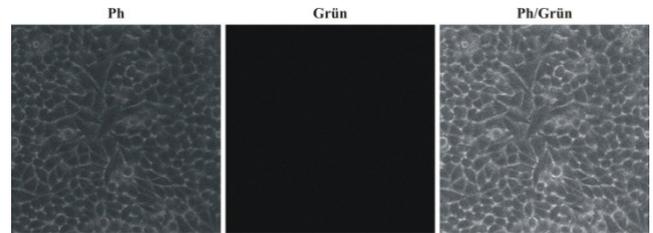
4.2.3.2. Bindung von 6/40c Antikörpern an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen

Die Negativkontrolle mit dem Zweitantikörper anti-Maus FITC zeigt wie erwartet keine Bindung.

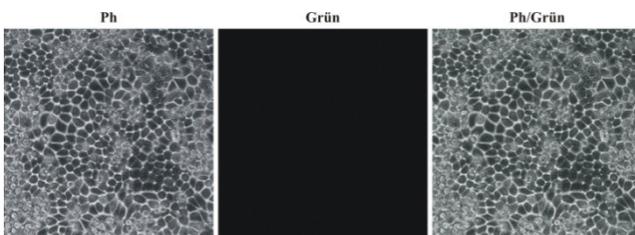
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC



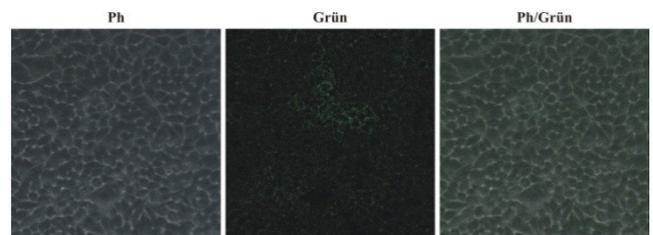
HeLa-CEACAM8 + anti-Maus FITC



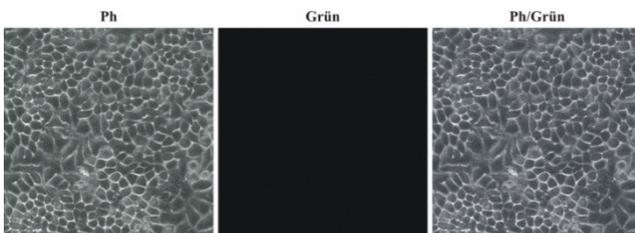
HeLa Wildtyp + 6/40c + anti-Maus FITC



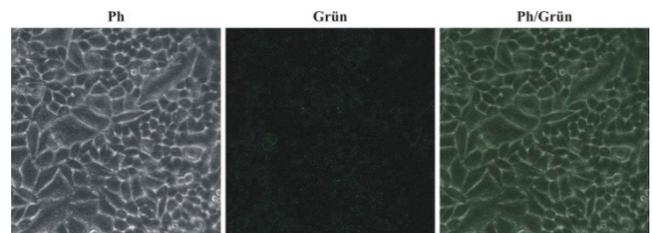
HeLa-CEACAM8 + 6/40c + anti-Maus FITC



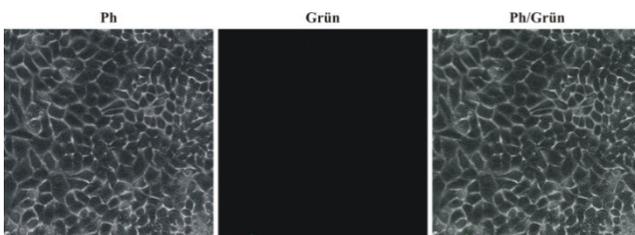
HeLa Wildtyp + 6/40cFluo



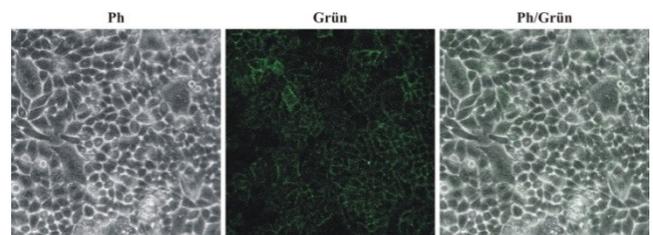
HeLa-CEACAM8 + 6/40cFluo



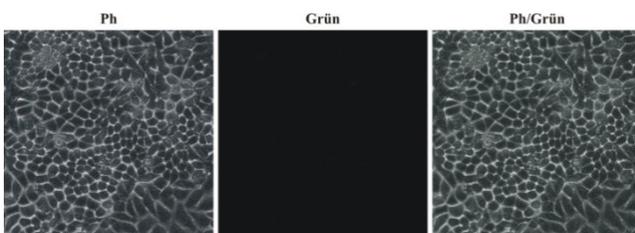
HeLa Wildtyp + Bio6/40c + anti-Maus FITC



HeLa-CEACAM8 + Bio6/40c + anti-Maus FITC



HeLa Wildtyp + Bio6/40cFluo



HeLa-CEACAM8 + Bio6/40cFluo

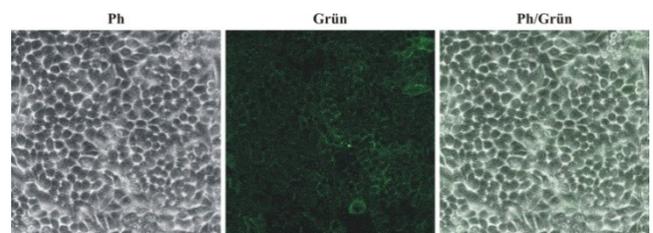


Abbildung 15: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Bindung von 6/40c Antikörpern. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Ebenso ist bei den Aufnahmen der Wildtyp Zellen in Abbildung 15 keine Fluoreszenz zu erkennen, so dass hier keine unspezifische Bindung vorliegt. Dagegen zeigen die mit den verschiedenen 6/40c Antikörpern inkubierten HeLa-CEACAM8 Zellen alle Fluoreszenz. Allerdings ist die Fluoreszenzintensität bei den mit Bio6/40c und Bio6/40cFluo Antikörpern inkubierten Zellen deutlich höher als bei den Zellen, die mit 6/40c und 6/40cFluo Antikörper inkubiert worden sind. Dies deutet auf eine effektivere Bindung der biotinylierten 6/40c Antikörper hin.

Im Gegensatz zu den Bindungsanalysen mittels ELISA, in denen die Modifizierungen der Antikörper im Vergleich zu den unmodifizierten Antikörpern zu keinen signifikanten Verminderungen der jeweiligen Antigenbindung aus Zelllysaten führen, zeigen die Analysen mit dem Durchflusszytometer deutlich geringere Markierungseffizienzen der modifizierten Antikörper. Hier fällt besonders die schlechte Effizienz beim 6/40cFluo Antikörper von nur ca. 22 % und Bio6/40cFluo von 49 % auf. Dass die Bindungseffizienz im ELISA besser ist als im Durchflusszytometer, liegt vor allem an der Zugänglichkeit des Zielproteins. Dieses befindet sich beim ELISA in Lösung und bei der Durchflusszytometrie liegt es zellgebunden vor. Dadurch können störende Oberflächeneffekte an den Zellen auftreten, welche die Bindungseffizienz reduzieren. Hinzu kommt, dass die Bindung von Biotin bzw. Fluorescein mittels NHS-Ester aktivierten Reagenzien an den H₂N-Gruppen der Seitenkette der Aminosäure Lysin oder den N-Termini.^[91,92] erfolgt. Diese Gruppen kommen nicht ausschließlich im Fc-Fragment vor, sondern überall im Antikörper und so auch in den antigenspezifischen Fv-Fragmenten.^[93] So kann die Bindung von Biotin bzw. Fluorescein in diesen Fragmenten zu einer Reduktion der Antigenpezifität führen. Diese Effekte treten natürlich auch bei den Bindungsanalysen an konfluenten Einzelzellrasen auf. Allerdings kann hier die Effizienz der Bindung nur über den optischen Vergleich mit der Positivkontrolle und den Negativkontrollen stattfinden. Hier ist zu erkennen, dass die Lokalisation wie auch die Fluoreszenzintensität der zellgebundenen modifizierten 18/20 Antikörper sehr gut mit der Positivkontrolle (unmodifizierter 18/20 Antikörper) übereinstimmen, so dass diese mit ähnlicher Effizienz an die Zellen binden. Ebenso zeigen die modifizierten 6/40c Antikörper die gleiche Bindungsspezifität wie der unmodifizierte 6/40c Antikörper, wobei die Fluoreszenzintensität der biotinylierten 6/40c Antikörper höher ist, was auf eine effektivere Bindung dieser Antikörper hindeutet. Dies konnte jedoch weder im ELISA noch bei der Durchflusszytometrie beobachtet werden, so dass dies wohl eher auf optische Effekte bei der Fluoreszenzmikroskopie zurückzuführen ist. Die Negativkontrollen mit dem Zweitantikörper anti-Maus FITC und die Kontrollen mit den Wildtyp Zellen zeigen keine unspezifischen Bindungen. Die Charakterisierung der modifizierten Antikörper mittels ELISA, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie belegt, dass die Modifizierungen die Spezifität der Antikörper gegenüber den Antigenen nicht beeinflussen und sie für die weiteren Untersuchungen verwendet werden können.

4.3. Herstellung antikörperbeladener [SV] Partikel

Zhou *et al.* beschreiben die erfolgreiche Herstellung human Choriongonadotropin (hCG) bindender SonoVue Partikel [SV] durch Adsorption von anti-hCG Antikörpern auf der Partikeloberfläche. In ihrer Veröffentlichung weisen sie die Bindung dieser Partikel an Chorionkarzinom Zellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie und Lichtmikroskopie nach.^[94] [SV] Partikel werden in der Klinik bereits als Ultraschall-Kontrastmittel eingesetzt. Daher wäre eine Beladung dieser Partikel mit gegen CEACAM1 gerichteten Antikörpern eine einfache und schnelle Methode, um die Zielsetzung dieser Arbeit zu erreichen. Bei [SV] Partikeln handelt es sich um Mikrogasbläschen, die von einer stabilisierenden Lipidmembran umhüllt sind. Daher stellt sich die Frage, ob die bei der Adsorption wirkenden Van-der-Waals Kräfte ausreichen, um den Antikörper auch bei *in vivo* Experimenten auf der Partikeloberfläche zu halten. Schließlich herrschen in den Venolen und Venen Scherspannungen im Bereich von $0,98 - 3,92 \text{ dyn/cm}^2$, was Scherraten von $140 - 560 \text{ s}^{-1}$ entsprechen.^[95] Außerdem ist eine gerichtete Bindung der Antikörper mittels Immobilisierung über Adsorption nicht möglich. Hierdurch werden Partikel generiert, die inaktive Antikörper auf der Oberfläche tragen, da die antigenspezifischen Fab-Fragmente nicht von der Oberfläche weggerichtet sind.^[96] Um die Eignung von antikörperbeladenen Partikeln, wie sie Zhou *et al.* beschreiben, für die hier zugrunde liegende Fragestellung zu prüfen, werden [SV] Partikel testweise mit gegen CEACAM1 gerichteten Antikörpern beladen, wie es schematisch in Abbildung 16 dargestellt ist. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben werden die Partikel mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert.

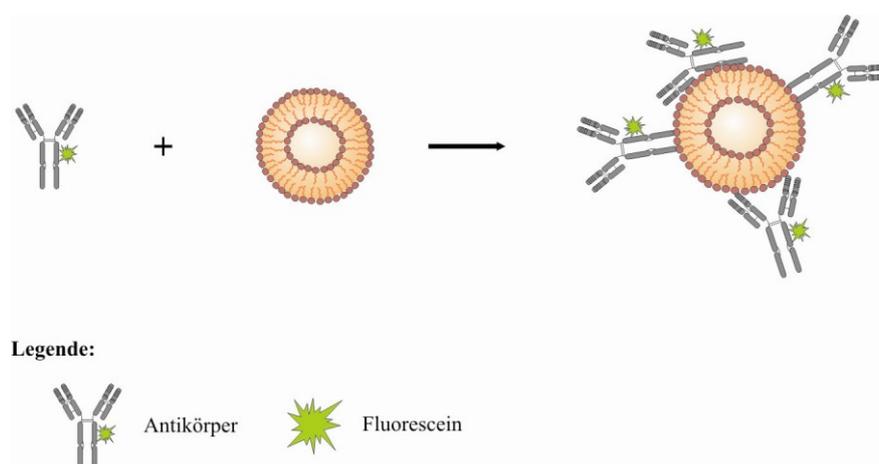


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Herstellung antikörperbeladener [SV] Partikel.

Da sich die [SV] Partikel aufgrund ihrer Eigenschaften an der Oberfläche der Suspension anreichern, werden die Unterstände der Reaktionslösungen und der Waschfraktionen mittels Western-Blot analysiert, um die Adsorption des Antikörpers an die [SV] Partikel indirekt nachweisen zu können. Ein direkter Nachweis der Partikel im Western-Blot ist nicht möglich, da die Partikel mit einem mittleren

Durchmesser von ca. 2,5 μm zu groß für die Poren der Polyacrylamidgele sind und in den Geltaschen verbleiben.

Während der Antikörperbeladung und den anschließenden Waschschritten nahm die Opaleszenz der Proben ab, was auf eine Zerstörung der Partikel hindeutet. Um dies zu überprüfen werden diese Lösungen im Durchflusszytometer und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Eine Analyse im ELISA ist, aufgrund der langen Inkubationszeit und der Beobachtung, dass sich die [SV] Partikel an der Oberfläche der Suspension anreichern, nicht möglich.

4.3.1. Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [SV] Partikeln

Die gesammelten Unterstände der Reaktionslösungen und der Waschfraktionen werden mittels Western-Blot analysiert, wie es in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist. Zur Detektion des ungebundenen Antikörpers wird der polyklonale Ziege anti-Maus IgG^{H+L}(HRP) Antikörper verwendet.

Die Western-Blots der Antikörperkopplung an [SV] Partikel sind in Abbildung 17 aufgeführt. In Reihe 2 ist der 18/20Fluo Antikörper als Kontrolle geladen und zeigt eine Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers in der Höhe des Markers von 130 kDa. Zusätzlich ist eine deutliche Bande oberhalb der 170 kDa und eine schwache Bande darüber zu erkennen, welche nicht zugeordnet werden können. Aufgrund der molekularen Masse eines IgG von ca. 150 kDa wäre nur eine Bande zwischen 130 kDa und 170 kDa zu erwarten. Durch die Modifikation mit dem sehr kleinen Fluoresceinmolekül ($M_w \sim 375 \text{ g/Mol}$) würde sich diese Bande weder verschieben noch würde hierdurch eine zweite Bande auftreten, die einer entsprechend höheren Proteinmasse zugeordnet werden könnte. Aus diesem Grund ist zusätzlich ein Gel in Abbildung 17 aufgeführt, bei welchem der unreduzierte monomere 18/20 Antikörper geladen ist. Dieses Gel zeigt ein den Western-Blots entsprechendes Bandenmuster. Es ist eine intensive Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers oberhalb der Markerbande von 110 kDa zu erkennen. Dies zeigt, dass die Banden der Markerproteine in den in dieser Arbeit verwendeten Gelen nicht auf der Höhe ihres eigentlichen Molekulargewichts auftreten. Dies liegt daran, dass die Hersteller der Standardmarker die Bandenhöhen auf Gelen ermitteln, die sich von den Gelen in den Laboren der Nutzer unterscheiden können. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Laufverhalten der Proteine. Des Weiteren ist in dem Gel eine Bande zwischen den Markerbanden von 160 kDa und 260 kDa zu erkennen, welche sich ungefähr auf der Höhe des doppelten Molekulargewichts der intensiven Bande befindet. Daher könnte es sich hierbei um Antikörper handeln, welcher nach der Denaturierung durch SDS, welches im Probenpuffer enthalten ist, dimerisiert. Es könnte auch sein, dass diese Bande durch unvollständig denaturierten Antikörper hervorgerufen wird. Dieser hat kein konstantes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und wird im Gel nicht entsprechend getrennt. Eine genauere Analyse dieser Bande ist nicht durchgeführt worden.

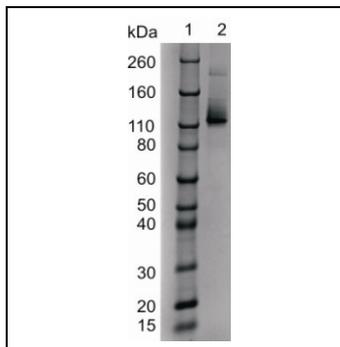
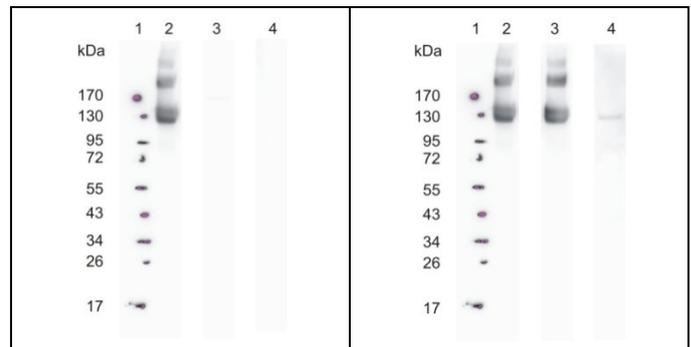
18/20 Antikörper*[SV18/20Fluo]
2 µg/50µL**20 µg/50µL*

Abbildung 17: Kontrollgel des 18/20 Antikörpers (links) mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Novex® Sharp Standard; 2: 18/20. Western-Blots der Antikörperkopplung an [SV] Partikel (rechts) mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Prestained Protein Ladder #SM0671; 2: 18/20Fluo zur Kontrolle; 3: Unterstand der Partikel-Antikörper-Kopplung; 4: Waschfraktion der Partikel-Antikörper-Kopplung.

Bei der Probe, bei der 2µg/50µL 18/20Fluo Antikörper eingesetzt worden sind, sind in Reihe 3 (Unterstand) und Reihe 4 (Waschfraktion) des Western-Blots keine Banden zu erkennen. Der Antikörper ist demnach vollständig an die [SV] Partikel adsorbiert. Bei der Probe, bei der 20µg/50µL 18/20Fluo Antikörper eingesetzt worden sind (Abbildung 17), ist in Reihe 3 des Blots (Unterstand) eine deutliche Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Zudem werden die weiteren Banden wie sie beim geladenen Kontrollantikörper zu sehen sind detektiert. In Reihe 4 (Waschfraktion) ist eine sehr schwache Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Die weiteren Banden, wie sie beim geladenen Kontrollantikörper zu sehen sind, sind hier nicht vorhanden. Somit liegt im Unterstand überschüssiger Antikörper vor, der nicht an die Partikel adsorbiert ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Sättigung der [SV] Partikel mit Antikörper stattgefunden hat.

Da es sich bei fast allen durchgeführten Ansätzen zur Beladung von [SV] Partikeln mit Antikörpern gezeigt hat, dass die Partikelsuspensionen nach der Antikörperbeladung und den Waschschrritten nicht mehr opaleszent sind, werden diese Proben wie in Abschnitt 3.5.1.1 beschrieben im Durchflusszytometer analysiert. Damit soll überprüft werden, ob ein Verlust der Opaleszenz auf eine Zerstörung der Partikel hindeutet. Die Ergebnisse sind in Form von Dot-Blots zusammengestellt, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist. Des Weiteren sind diese Ergebnisse in Histogrammen dargestellt, bei denen die Partikelzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz mit einem Fluorochrom. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der

unbeladenen Partikel die Stärke der Eigenfluoreszenz wieder, welche als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt wird.

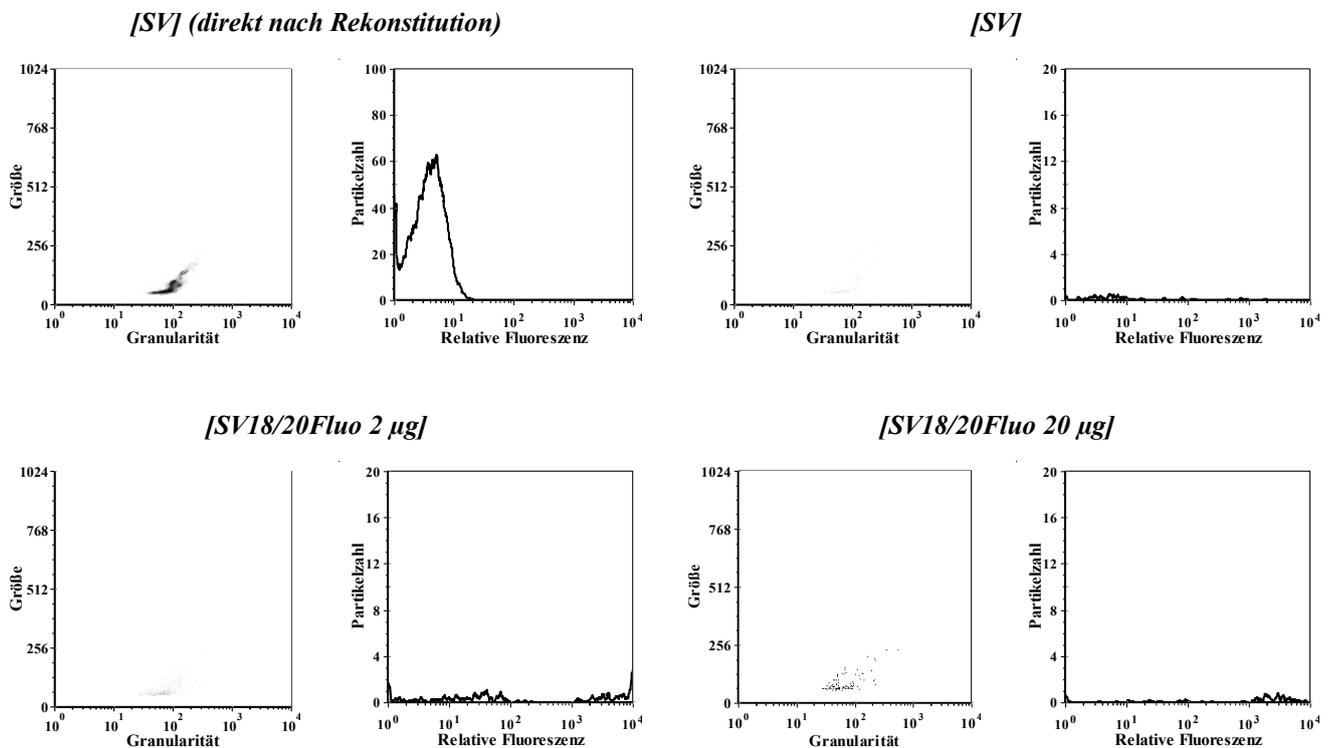


Abbildung 18: Analyse der [SV] Partikel nach der Beladung mit Antikörpern im Durchflusszytometer. Zusätzlich aufgeführt sind die [SV] Partikel direkt nach der Rekonstitution.

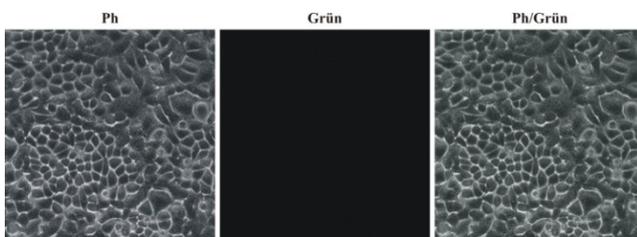
Tabelle 15: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen der Partikel.

<i>Partikel</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Partikel</i>
[SV] (direkt nach Rekonstitution)	4
[SV]	5
[SV18/20Fluo 2 µg]	75
[SV18/20Fluo 20 µg]	1928

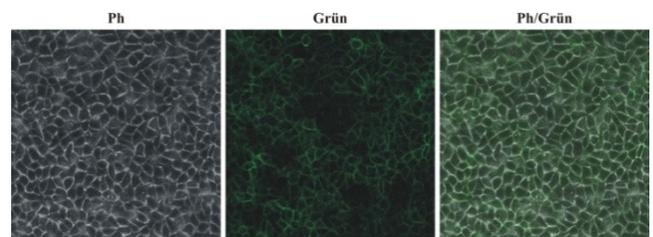
Als Kontrolle sind die Ergebnisse der unbeladenen [SV] Partikel, zum Einen direkt nach der Rekonstitution und zum Anderen nach der Beanspruchung unter den Reaktionsbedingungen, angegeben. Laut Herstellerangaben und Schneider *et al.* erhält man durch Rekonstitution der lyophilisierten Partikel eine Lösung mit einer Partikelkonzentration von ca. 5×10^8 Partikel/mL.^[97] Für die Antikörperkopplung werden 5 mL [SV] Lösung eingesetzt, wovon anschließend 200 µL für die Messung im Durchflusszytometer abgenommen werden. Würden die [SV] Partikel die Reaktionsbedingungen der Antikörperkopplung und der Waschschriffe überstehen, müssten für die Messung im Durchflusszytometer ca. 1×10^8 Partikel zur Verfügung stehen. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen, welche in Abbildung 18 als Dot-Blots und Histogramme

dargestellt sind, zeigen, dass direkt nach der Rekonstitution ausreichend Partikel in der Suspension vorhanden sind. Man erhält ein deutliches Signal, hier nach 13000 detektierten Partikeln, im Dot-Blot und im Histogramm. Diese [SV] Partikel weisen Eigenfluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf (Tabelle 15). Bei den unbeladenen als auch bei den antikörperbeladenen [SV] Partikeln, die durch die Reaktionsbedingungen und Waschschriffe stark beansprucht worden sind, lassen sich nahezu keine Signale detektieren. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich bei den nicht mehr opaleszenten Partikelsuspensionen nach der Antikörperbeladung und den Waschschriffen um zerstörte Partikel handelt. Um den, während der Antikörperbeladung und den Waschschriffen, auftretenden Effekt der Partikelzerstörung genauer zu charakterisieren sind HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen zur Kontrolle mit den [SV] und [SV18/20Fluo 2µg] Partikelproben inkubiert worden.

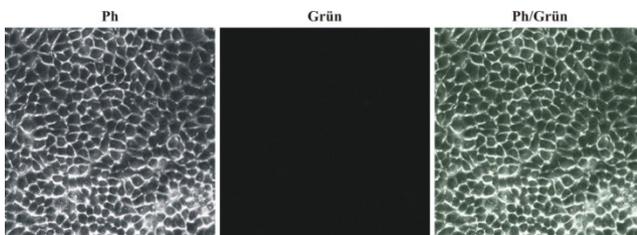
HeLa Wildtyp + 18/20 + anti-Maus FITC



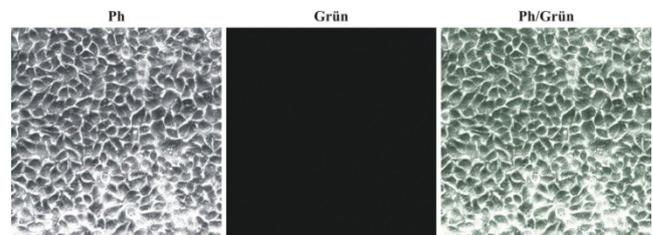
HeLa-CEACAM1 + 18/20 + anti-Maus FITC



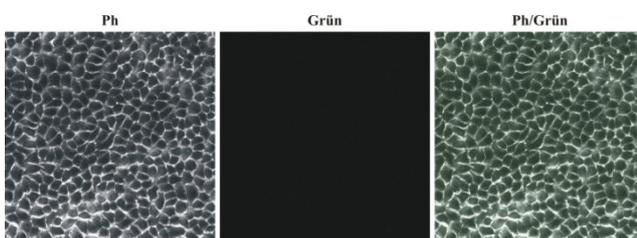
HeLa Wildtyp mit [SV] + anti-Maus FITC



HeLa-CEACAM1 mit [SV] + anti-Maus FITC



HeLa Wildtyp mit [SV18/20Fluo 2µg]



HeLa-CEACAM1 mit [SV18/20Fluo 2µg]



Abbildung 19: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [SV] und [SV18/20Fluo 2µg] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Die in Abbildung 19 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass weder in den Phasenkontrast- noch Fluoreszenzaufnahmen der HeLa Wildtyp bzw. HeLa-CEACAM1 Zellen die [SV] bzw. [SV18/20Fluo 2µg] Partikel zu erkennen sind. Dagegen zeigt die Aufnahme der Positivkontrolle eine deutliche

Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell Kontakten. Die Aufnahmen der HeLa Wildtyp Kontrollen zeigen keine Fluoreszenzfärbung. Somit liegt eine spezifische Bindung des 18/20 Antikörpers vor, und der Beweis, dass die Zellen CEACAM1 exprimieren. Die negativen Ergebnisse mit den [SV] Partikelproben sind demnach auf die Partikel selbst zurückzuführen, die in diesem Fall schon vor der Inkubation größtenteils durch die Reaktionsbedingungen und Waschschrte zerstört worden sind. Dies liegt zum Teil daran, dass die Partikel mit einem anderen Gas als Luft gefüllt sind. Bei Kontakt der Partikelsuspension mit Luft findet ein Gasaustausch zwischen dem Gas der Partikel und der umgebenden Luft statt, so dass die Partikelzahl sinkt^[98]. Dieser Effekt wird während des Waschens der Partikel, durch das Abnehmen des alten Puffers und Resuspendieren in neuem Puffer noch verstärkt. Dadurch ist es nicht möglich gewesen die antikörperbeladenen [SV] Partikel, wie von Zhou *et al.* beschrieben, zu untersuchen. Die in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme der Partikelzerstörung sind von Zhou *et al.* nicht beschrieben worden. Dies könnte an der Herstellung der antikörperbeladenen Partikel liegen. So haben Zhou *et al.* die [SV] Partikel nach der Kopplung mit Antikörpern lediglich durch Phasentrennung von der übrigen Lösung getrennt und nicht gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Partikel sind für weitere Untersuchungen direkt von der oberen Phase, wo sie sich anreichern, abgenommen worden. Aufgrund fehlender Waschschrte muss davon ausgegangen werden, dass sich dann noch erhebliche Mengen an ungebundenen Antikörper in der Phase der [SV] Partikel befinden, zumal Antikörper und [SV] Partikel im Verhältnis 1:1 gemischt worden sind. In der vorliegenden Arbeit werden dagegen Verhältnisse von [SV] Partikeln zu Antikörper von 5:1 bzw. 50:1 verwendet. Zwar sind mehrere Versuche nach dem Protokoll von Zhou *et al.* durchgeführt worden (Daten nicht dargestellt), aber auch diese führten zu keinem eindeutigen und zweifelsfreien Ergebnis. Um falsch-positive Ergebnisse durch ungebundenen Antikörper in der [SV] Partikel Phase definitiv ausschließen zu können, ist das Protokoll von Zhou *et al.* modifiziert und um mehrere Waschschrte ergänzt worden. Vor allem bei der Durchflusszytometrie können die Ergebnisse schnell als falsch positiv interpretiert werden, wenn nur auf die Fluoreszenzintensität in dem Histogramm geachtet wird. Diese wird schließlich sowohl von zellgebundenen Partikeln als auch freien antikörperbeladenen Partikeln hervorgerufen, wenn diese nicht zuvor von den Zellen abgetrennt werden. Wird dann die Fluoreszenz, die von den Zellen bzw. den Partikeln hervorgerufen wird, nicht getrennt voneinander durch eine entsprechende Auswahl in den Dot-Blots betrachtet, führt dies zu einer falschen Interpretation. Zhou *et al.* geben in ihrer Veröffentlichung nicht an, ob ungebundene antikörperbeladene Partikel vor der durchflusszytometrischen Analyse von den Zellen abgetrennt worden sind. In ihren Ergebnissen führen sie dann auch nur das Histogramm auf, so dass eine vernünftige Interpretation nicht möglich ist. Hinzu kommt, dass bei Zhou *et al.* einige Ergebnisse im

Text beschrieben sind, hierzu jedoch keine belegenden Abbildungen gezeigt werden, wodurch ein Vergleich erschwert wird.

Allerdings führen Zhou *et al.* ein Experiment zur Bindungseffizienz und –stärke auf, bei dem auf Objektträger gewachsene Zellen mit antikörperbeladenen [SV] Partikeln inkubiert und anschließend mit PBS Puffer bei einer Geschwindigkeit von 0,6 m/s gewaschen werden. Da sie hier keinen signifikanten Unterschied vor dem Waschen mit PBS und danach feststellen können, schließen sie daraus, dass die Bindungseffizienz sehr hoch und die Bindung zwischen [SV] Partikel und Zellen so stabil ist, dass diese auch unter Blutflussbedingungen standhalten sollte. Um diese Hypothese zu prüfen, sind in der vorliegenden Arbeit Zellbindungsuntersuchungen mit [SV] Partikeln unter Flussbedingungen durchgeführt worden, wie es in Abschnitt 3.6.3 beschrieben ist. Da in den Venolen und Venen Scherspannungen im Bereich von $0,98 - 3,92 \text{ dyn/cm}^2$, herrschen^[95] (entspricht einer Scherrate von $140 - 560 \text{ s}^{-1}$), muss für diese Bestimmung ein Fluss von ca. $0,7 \text{ mL/min} - 3,0 \text{ mL/min}$ an die Flusskammer angelegt werden.

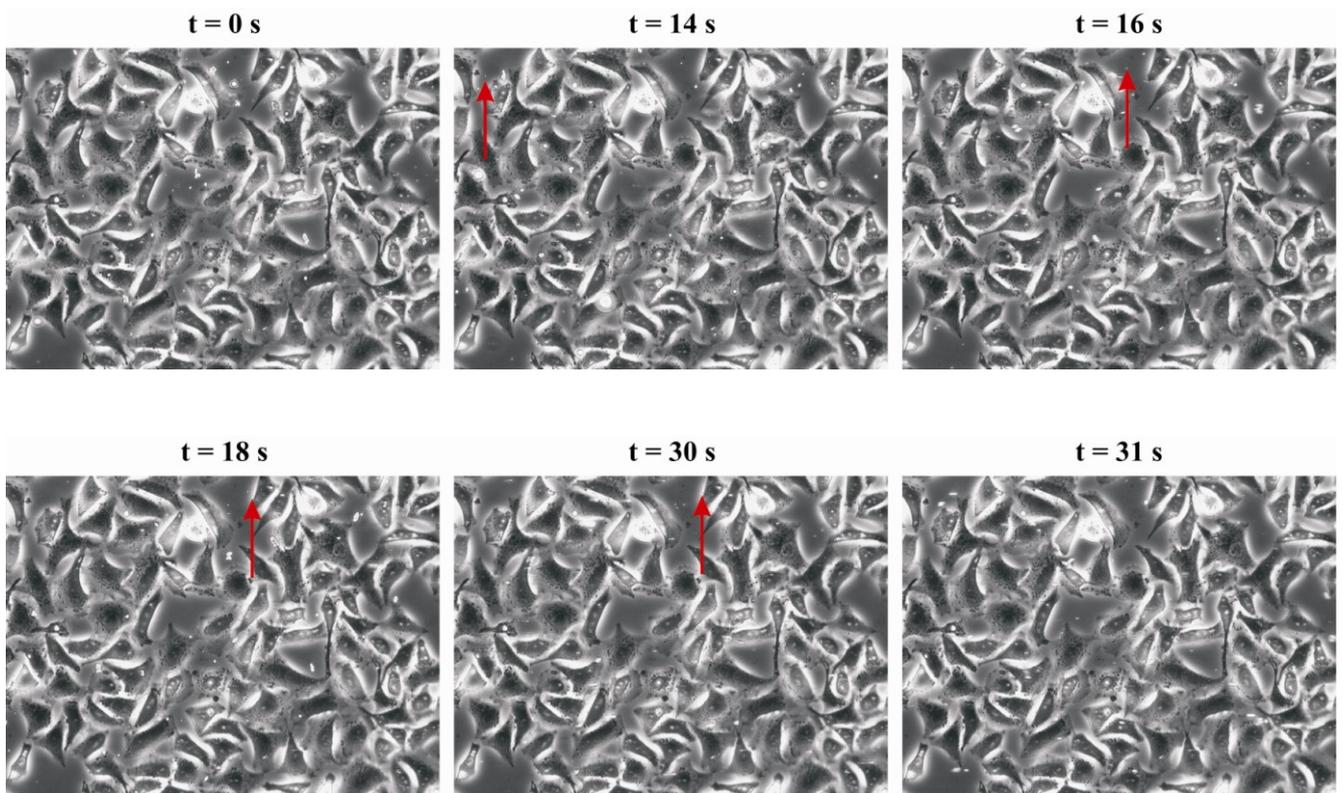


Abbildung 20: CLSM Aufnahmen von HeLa-CEACAM1 Zellen unter Flussbedingungen nach der Injektion von [SV18/20] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) zu verschiedenen Zeitpunkten. Mit dem roten Pfeil ist ein Partikel markiert, welcher nach 14 s in das Betrachtungsfeld eintritt, nach 18 s für eine Dauer von 13 s an eine Zelle bindet und nach 31 s nicht mehr im Betrachtungsfeld zu erkennen ist.

Da die Partikel unter diesen Bedingungen nur für eine sehr kurze Zeitdauer im Betrachtungsfeld erscheinen, wird die Flußrate zunächst auf $205 \mu\text{L/min}$ reduziert, um das Bindungsverhalten genauer

dokumentieren zu können. Bei dieser Flußrate herrscht eine Scherspannung von lediglich $0,2 - 0,3 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. eine Scherrate von $20 - 30 \text{ s}^{-1}$. Aber selbst bei dieser geringen Flußrate können nur vereinzelt Zellen detektiert werden an welchen die antikörperbeladene [SV] Partikel für einige Sekunden haften bleiben, bevor sie wieder vom Fließmittel mitgerissen werden. Dies ist beispielhaft in Abbildung 20 in Form von Phasenkontrastaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Flussexperiments dargestellt. Trotz der Vielzahl an [SV] Partikeln im Betrachtungsfeld treten keine Bindungen dieser Partikel an die Zellen auf. Hier ist mit einem roten Pfeil ein einzelner Partikel hervorgehoben, der für eine Dauer von lediglich 13 s an eine Zelle bindet, bevor er wieder aus dem Betrachtungsfeld verschwindet. Daraus folgt, dass unter dynamischen Bedingungen eine Bindung von antikörperbeladenen [SV] Partikel nahezu ausgeschlossen ist. Beziehungsweise wenn eine Bindung erfolgt, diese nicht stark genug ist, um über mehrere Minuten aufrecht gehalten werden zu können. Damit wäre selbst eine Lokalisation dieser Partikel mittels Ultraschall nicht möglich, da hierfür mindestens 10 min bei einfachen Untersuchungen benötigt werden. Eine fehlende Bindung der [SV] Partikel an die Zellen kann durch eine ungenügende Kopplung des Antikörpers oder durch eine unzureichend feste Verankerung des Antikörpers an der Oberfläche der Partikel, wie es in Abbildung 21 dargestellt ist, hervorgerufen werden. Schließlich ist der Antikörper lediglich über Adsorption an die Partikel gekoppelt, bei der nur Van-der-Waals Kräfte wirken.

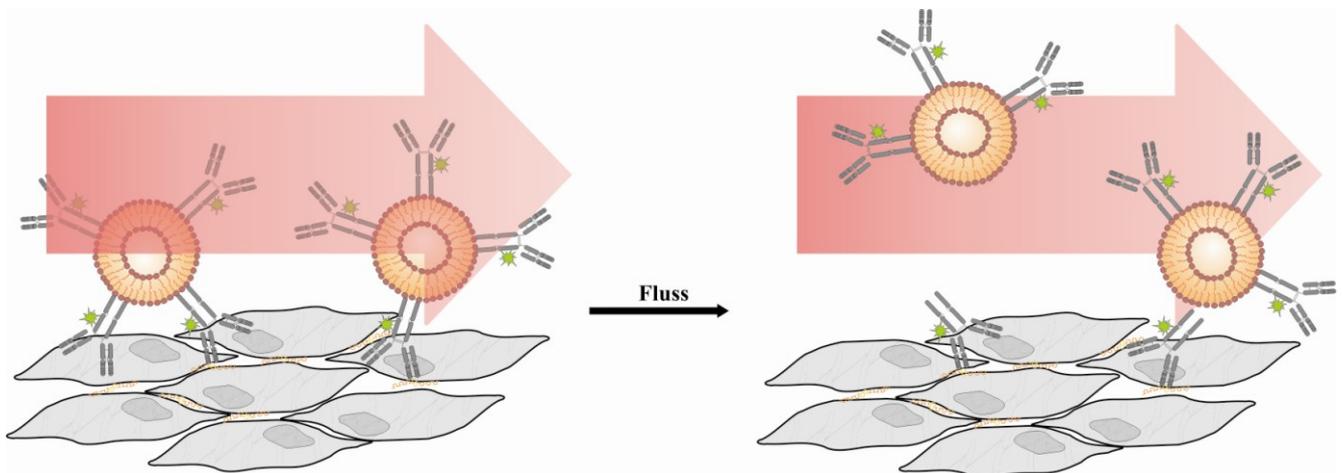


Abbildung 21: Schema der Bindungsanalyse unter Flussbedingungen. Dargestellt ist der mögliche Verlauf der kurzen Bindung der [SV] Partikel an die Zellen. Aufgrund der unzureichend festen Verankerung des Antikörpers auf der Oberfläche der [SV] Partikel, werden die Partikel unter den Flussbedingungen mitgerissen.

Damit ist auch die Hypothese von Zhou *et al.*, dass antikörperbeladenen [SV] Partikel unter Blutflußbedingungen effektiv an Zellen binden, widerlegt. Um eine schwache Bindung der Antikörper an die Partikel und eine möglicherweise damit verbundene unzureichende Bindung der Partikel an die Zellen auszuschließen, sind im weiteren Verlauf dieser Arbeit Partikel ausgewählt worden, an deren Oberfläche Antikörper nahezu kovalent gebunden werden können.

4.4. Herstellung antikörperbeladener [TS] Partikel

Trotz der Probleme mit den [SV] Partikeln bieten die mit einer stabilisierenden Lipidmembran umhüllten Mikrogasbläschen einige Vorteile. Sie werden im Ultraschall sehr gut detektiert und besitzen im Gebrauch als Ultraschallkontrastmittel eine ausreichende Stabilität, um eine Untersuchung mittels Ultraschall zu überstehen. Zudem sind die Bestandteile biokompatibel und bioabbaubar, was für eine *in vivo* Anwendung von wesentlichem Vorteil ist. Um nun die Eigenschaften der [SV] Partikel mit der Anforderung der nahezu kovalenten Kopplung des Antikörpers zu vereinen, haben wir uns für die Verwendung von Targestar [TS] Partikeln entschieden. Sie werden von der Firma Targeson aus den USA als Ultraschallkontrastmittel angeboten und sind für Forschungszwecke zugelassen. Zusätzlich bieten die [TS] Partikel gegenüber den [SV] Partikeln den Vorteil, dass sie Biotin als reaktive Gruppe auf ihrer Oberfläche besitzen, wodurch biotinylierte Proteine oder andere biotinylierte Moleküle über Vernetzung mit Streptavidin gebunden werden können.^[99] Da das Biotin-Streptavidin System zudem die stärkste nichtkovalente Bindung biologischer Interaktionen darstellt, ist eine dauerhafte nahezu kovalente Anbindung des Antikörpers gegeben.^[81] In Abbildung 22 ist die Beladung der [TS] Partikel mit Antikörper nach Herstellerangaben schematisch dargestellt.

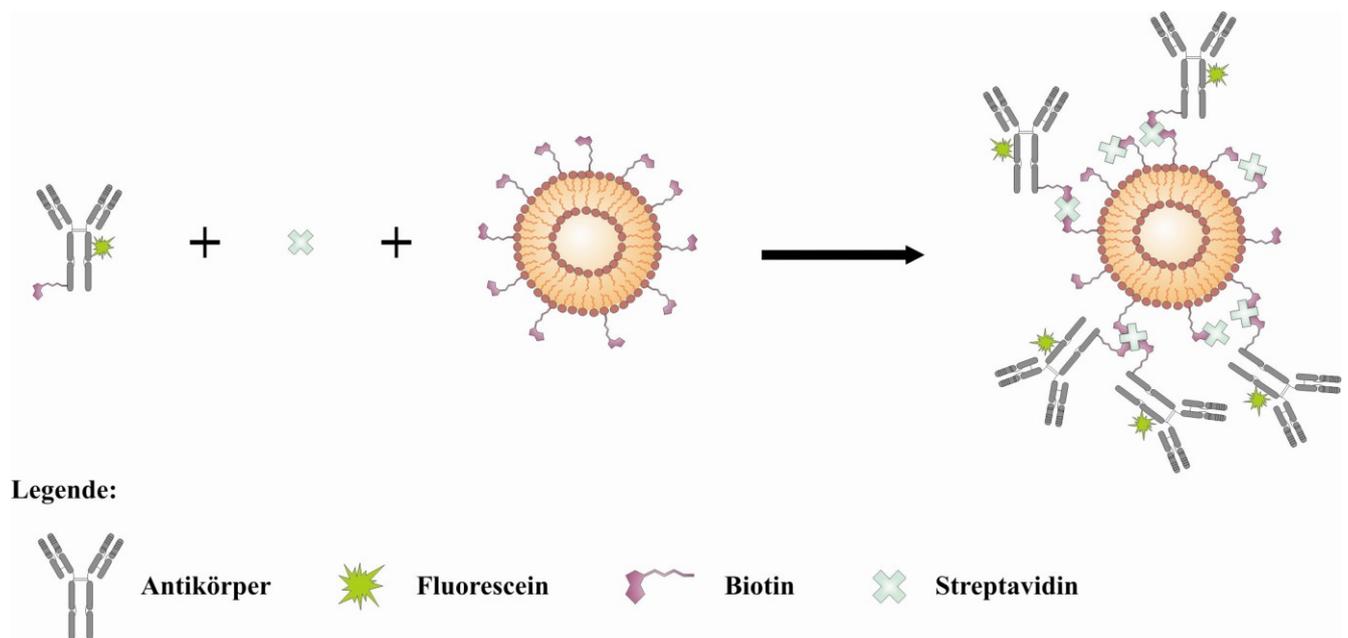


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Herstellung antikörperbeladener [TS] Partikel.

Die Anwendung von [TS] Partikeln als molekulare Marker im Ultraschall gehen auf Arbeiten von Klibanov *et al.*^[100], Lindner *et al.*^[101] und Rychak *et al.*^[102,99] zurück. In diesen wird zum Beispiel eine Signalverbesserung bei der Ultraschalldetektion von entzündetem Gewebe durch die Verwendung von P-Selektin bindenden Partikeln gezeigt^[101,102], beziehungsweise die Ultraschalldetektion von Tumorangiose mittels VEGFR-2 bindenden Partikeln im Mausmodell.^[99]

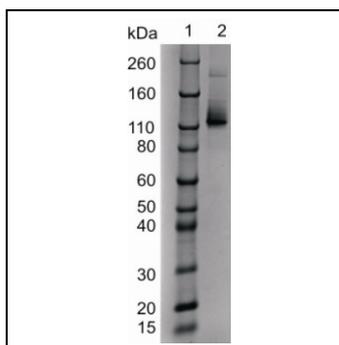
Wie in Kapitel 3.2 beschrieben werden die Partikel mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert. Da sich die [TS] Partikel aufgrund ihrer Eigenschaften an der Oberfläche der Suspension anreichern, werden die Unterstände der Reaktionslösungen und der Waschfraktionen mittels Western-Blot analysiert, um die Bindung des Antikörpers an die [TS] Partikel indirekt nachweisen zu können. Ein direkter Nachweis der Partikel im Western-Blot ist nicht möglich, da die Partikel mit einem mittleren Durchmesser von ca. 2,5 μm zu groß für die Poren der Polyacrylamidgele sind und in den Geltaschen verbleiben. Da auch diese Partikel instabil sind, ist bei deren Anwendung in chemischen Reaktionen und Zellversuchen darauf zu achten, dass die Partikelsuspensionen opaleszent bleiben. Sobald die opaleszente Suspension zu einer klaren Lösung wird, sind die Partikel nicht mehr verwendbar (Kommentar des Herstellers auf Anfrage). Daher werden die Partikelsuspensionen nach der Antikörperbindung zunächst im Durchflusszytometer analysiert. Da nur intakte Partikel im Dot-Blot ein Signal hervorrufen, kann hierdurch die Unversehrtheit der Partikel und zusätzlich die Beladung mit Antikörpern überprüft werden. Anschließend werden Bindungsuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Aufgrund der langen Inkubationszeit und der Beobachtung, dass sich die [TS] Partikel an der Oberfläche der Suspension anreichern, ist eine Bindungsuntersuchung mittels ELISA nicht möglich.

4.4.1. Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [TS] Partikel

Die gesammelten Unterstände der Reaktionslösungen und die Waschfraktionen werden mittels Western-Blot analysiert, wie es in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist. Zur Detektion des ungebundenen Antikörpers wird der polyklonale Ziege anti-Maus IgG^{H+L}(HRP) Antikörper verwendet. Die Western-Blots der Antikörperkopplung an [TS] Partikel sind in Abbildung 23 aufgeführt. In Reihe 2 ist das Kopplungsreagenz zur Kontrolle und in Reihe 3 ist der Unterstand der Bindung des Kopplungsreagenzes an die Partikel geladen. Dies wird in den Western-Blots natürlich nicht durch den Ziege anti-Maus IgG^{H+L}(HRP) Antikörper detektiert. In Reihe 4 ist der Bio18/20Fluo Antikörper als Kontrolle geladen und zeigt eine Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers in der Höhe des Markers zwischen 100 und 150 kDa. Zusätzlich sind eine deutliche Bande unterhalb der Höhe von ca. 250 kDa und eine schwache Bande darüber zu erkennen. Somit zeigt der geladene Bio18/20Fluo Antikörper ein ungewöhnliches Bandenmuster, da aufgrund der molekularen Masse eines IgG von ca. 150 kDa nur eine Bande bei ca. 150 kDa zu erwarten wäre. Durch die Modifikation mit dem sehr kleinen Fluoresceinmolekül ($M_w \sim 375 \text{ g/Mol}$) und Biotinmolekül ($M_w \sim 356 \text{ g/Mol}$) würde sich diese Bande weder verschieben noch würde hierdurch eine zweite Bande auftreten, die einer entsprechend höheren Proteinmasse zugeordnet werden könnte. Aus diesem Grund ist zusätzlich ein Gel in Abbildung 23 aufgeführt, bei welchem der unreduzierte monomere 18/20 Antikörper geladen ist.

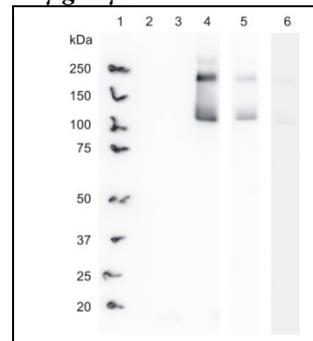
Dieses Gel zeigt ein den Western-Blots entsprechendes Bandenmuster. Es ist eine intensive Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers oberhalb der Markerbande von 110 kDa zu erkennen. Dies zeigt, dass die Banden der Markerproteine in den in dieser Arbeit verwendeten Gelen nicht auf der Höhe ihres eigentlichen Molekulargewichts auftreten. Dies liegt daran, dass die Hersteller der Standardmarker die Bandenhöhen auf Gelen ermitteln, die sich von den Gelen in den Laboren der Nutzer unterscheiden können. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Laufverhalten der Proteine. Des Weiteren ist in dem Gel eine Bande zwischen den Markerbanden von 160 kDa und 260 kDa zu erkennen, welche sich ungefähr auf der Höhe des doppelten Molekulargewichts der intensiven Bande befindet. Daher könnte es sich hierbei um Antikörper handeln, welcher nach der Denaturierung durch SDS, welches im Probenpuffer enthalten ist, dimerisiert. Es könnte aber auch sein, dass diese Bande durch unvollständig denaturierten Antikörper hervorgerufen wird. Dieser hat kein konstantes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und wird im Gel nicht entsprechend getrennt. Eine genauere Analyse dieser Bande ist nicht durchgeführt worden.

18/20 Antikörper



[TSBio18/20Fluo]

2 µg/50µL



20 µg/50µL

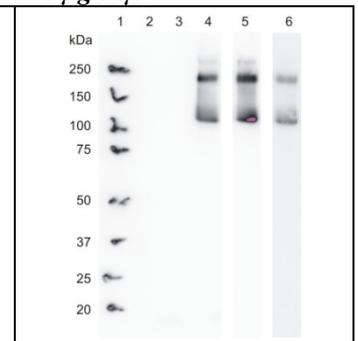


Abbildung 23: Kontrollgel des 18/20 Antikörpers (links) mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Novex[®] Sharp Standard; 2: 18/20. Western-Blots der Antikörperkopplung an [TS] Partikel (rechts) mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Prestained Protein Ladder #SM1811; 2: Kopplungsreagenz zur Kontrolle; 3: Unterstand der Bindung des Kopplungsreagenzes 4: Bio18/20Fluo zur Kontrolle; 5: Unterstand der Partikel-Antikörper-Kopplung; 6: Waschfraktion der Partikel-Antikörper-Kopplung.

In der Probe, bei der 2 µg/50 µL Antikörper zur Beladung eingesetzt worden sind, sind die Banden in Reihe 5 (Unterstand) schwach und in Reihe 6 (Waschfraktion) nicht detektierbar. Somit ist bei dieser Probe fast der gesamte eingesetzte Antikörper an die Partikel gebunden und es scheint schon eine Sättigung der Bindungsstellen vorzuliegen, da geringe Mengen überschüssiger Antikörper im Unterstand (Reihe 5) detektiert werden. In der Probe, bei der 20 µg/50 µL Antikörper zur Beladung eingesetzt worden sind, ist dieses Bandenmuster sowohl in Reihe 5 (Unterstand) als auch in Reihe 6 (Waschfraktion) deutlich zu erkennen. Somit liegt hier eine klare Sättigung der Bindungsstellen durch den Antikörper an den Partikeln vor. Aus den Ergebnissen der Western-Blots folgt, dass an die [TS]

Partikel nur eine geringe Menge Bio18/20Fluo Antikörper gebunden ist, da es anscheinend schon bei geringen Antikörperkonzentrationen zu einer Sättigung der Bindungsstellen kommt.

Wie oben beschrieben weisen auch die [TS] Partikel eine hohe Instabilität auf, weshalb sie nach der Antikörperkopplung im Durchflusszytometer analysiert worden sind, um damit unter anderem die Intaktheit zu überprüfen. Die geringe Stabilität lässt sich schon während der Durchführung der Versuche durch die abnehmende Opaleszenz beobachten. Teilweise lässt sich die Instabilität der Partikel durch die mechanische Beanspruchung während der durchgeführten Reaktions- und Waschbedingungen zurückführen. In der Literatur ist dieser Effekt nicht näher beschrieben. Hier finden sich nur Hinweise darauf, dass die Partikelzahl aufgrund des Gasaustausches zwischen dem Gas der Partikel und der umgebenden Luft sinken kann.^[98] Die Ergebnisse der Analyse im Durchflusszytometer, wie es in Abschnitt 3.5.1.1 beschrieben ist, sind in Abbildung 24 in Form von Dot-Blots, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist und zusätzlich in Histogrammen dargestellt, bei denen die Partikelzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist, dargestellt.

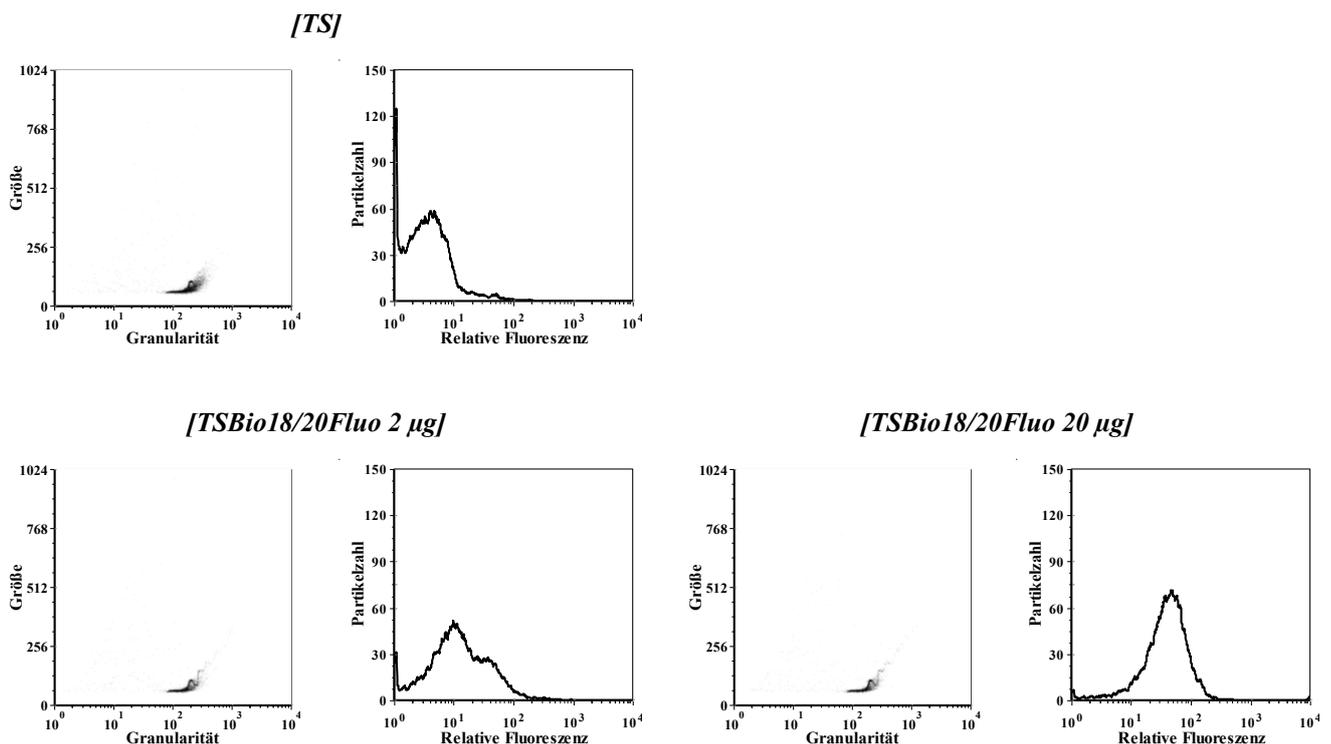


Abbildung 24: Analyse der [TS] Partikel nach der Beladung mit Antikörpern im Durchflusszytometer.

Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz mit einem Fluorochrom. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der unbeladenen Partikel die Stärke der Eigenfluoreszenz wieder, welche als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt wird. Die Signalwolke in den Dot-Blots weist auf sehr gleichmäßige Beschaffenheit und Größe der [TS] Partikel

auf. Als Negativkontrolle dienen die unbeladenen [TS] Partikel mit einem Median der relativen Fluoreszenz von ca. 4 (Tabelle 16).

Tabelle 16: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen der Partikel.

<i>Partikel</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Partikel</i>
[TS]	4
[TSBio18/20Fluo 2 µg]	12
[TSBio18/20Fluo 20 µg]	41

Die Ergebnisse der [TSBio18/20Fluo] Partikel zeigen bei beiden eingesetzten Antikörperkonzentrationen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle. Die Partikel, die mit niedriger Antikörperkonzentration inkubiert worden sind, weisen eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 12 und die Partikel mit hoher Antikörperkonzentration eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 41 auf (Tabelle 16). Damit ist mittels der durchflusszytometrischen Analysen nicht nur die erfolgreiche Bindung des Antikörpers über die Vernetzung mit Streptavidin nachgewiesen, sondern auch eine konzentrationsabhängige Beladung der Partikel gezeigt. Eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei steigender Antikörperkonzentration resultiert nur aus einer stärkeren Beladung der Partikel. Diese Beobachtungen stimmen gut mit den Ergebnissen bezüglich Partikelzahl von Lindner *et al.*^[101] und Rychak *et al.*^[102,99] überein. Des Weiteren wird auch dort eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von Proteinen an die [TS] Partikel beschrieben. Lediglich die hier ermittelte Fluoreszenzintensität scheint deutlich geringer als in der Literatur, so dass die Beladungseffizienz in der vorliegenden Arbeit nicht das Optimum erreicht. Dies wird zusätzlich durch die Ergebnisse der Western-Blots bestätigt, in denen noch große Mengen an freiem Antikörper detektiert werden. Leider lassen sich hierzu keine näheren Angaben in der Literatur finden, da die Beladungsmengen dort wohl höher und für die durchgeführten Experimente ausreichend war. In der hier vorliegenden Arbeit könnte ein Grund darin bestehen, dass die [TS] Partikel als Suspension aus den USA geliefert werden. In dieser Suspension sind die [TS] Partikel auch im verschlossenen Gefäß nur über einen begrenzten Zeitraum stabil. Wie eigene Beobachtungen gezeigt haben, ist schon nach einer kurze Lagerungszeit teilweise eine Zersetzung der Partikel anhand einer Reduktion der Opaleszenz zu beobachten (Ergebnisse nicht aufgeführt). Dies tritt wahrscheinlich auch schon während der Lieferungszeit auf. Werden solche in der Zersetzung befindlichen Suspensionen, die trotzdem opaleszent scheinen, für die Antikörperkopplung eingesetzt, liegen zu wenig Partikel für eine ausreichende Bindung vor. Daraus resultiert, dass in der Lösung mehr freier Antikörper vorhanden ist, welcher im Western-Blot detektiert werden kann und im Durchflusszytometer zu niedrigeren Fluoreszenzintensitäten führt. Zudem sind solche

Partikelsuspensionen gegenüber einer Zersetzung während der Waschschritte wesentlich anfälliger, so dass sehr häufig keine ausreichenden Partikel für die Analysen zur Verfügung stehen.

4.4.2. Untersuchung der [TS-AK] Interaktion an Zellen in Suspension

Die Bindungseigenschaften der antikörperbeladenen [TS] Partikel werden zunächst an Zellsuspensionen untersucht und mittels Durchflusszytometrie analysiert, wie es in Abschnitt 3.5.2.3 beschrieben ist. Hierfür werden HeLa-CEACAM1 Zellsuspensionen verwendet. Als Kontrolle und um den Grad unspezifischer Bindung zu ermitteln, werden HeLa Wildtyp Zellsuspensionen eingesetzt. Als weitere Negativkontrolle dienen antikörperfreie Partikel. Die Ergebnisse sind in Form von Dot-Blots zusammengestellt, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist. Des Weiteren sind die Ergebnisse in Histogrammen dargestellt, bei denen die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz der Zellen mit einem Fluorochrom. Das heißt, je stärker das Signal der relativen Fluoreszenz ist, desto mehr Fluorophor ist an den Zellen gebunden. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der Zellen, die mit anti-Maus FITC Antikörper inkubiert werden, die Stärke der Eigenfluoreszenz der Zellen zusammen mit der Hintergrundfluoreszenz des Antikörpers, die durch unspezifische Bindung hervorgerufen wird, wieder. Die Eigenfluoreszenz, die durch endogene Fluorophore hervorgerufen wird^[89], wird als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt. Da kein geeignetes Trennverfahren ermittelt werden konnte, um die Zellen von ungebundenen Partikeln vor der Analyse im Durchflusszytometer zu trennen, werden Zellen und Partikel detektiert. Diese unterscheiden sich jedoch in Größe und Granularität voneinander, so dass eine Unterscheidung mit Hilfe des Dot-Blots möglich ist. Eine Trennung zwischen mit Partikeln markierten Zellen von unmarkierten Zellen ist vor der Analyse im Durchflusszytometer nicht möglich. Eine Unterscheidung dieser Zellen sollte aber über die Fluoreszenzsignale erreicht werden. Bei Vorliegen von mit Partikeln markierten Zellen und unmarkierten Zellen sollten im Histogramm zwei Peaks mit unterschiedlichen Medianen der relativen Fluoreszenz detektiert werden. Daher sind zur Auswertung Zellen und Partikel in farblichen Gates (Partikel = Rot; Zellen = Blau) unterschieden. Die farbliche Unterscheidung ist in den Histogrammen entsprechend übernommen.

4.4.2.1. [TSBio18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Bindung von [TS] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellsuspensionen aufgeführt. Zusätzlich sind die Mediane der relativen Fluoreszenz und der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen in Tabelle 18 zusammengefasst. Die freien [TS] Partikel sind in Gate Rot und die Zellen in Gate Blau der Dot-Blots zusammengefasst. Bei den

Signalen in den Dot-Blots, die nicht in den Gates erfasst sind, handelt es sich um Zelltrümmer. Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM1 exprimieren, sind die Ergebnisse der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC alleine und der Kombination aus primären Antikörper 18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC in Abbildung 25 und Tabelle 17 aufgeführt.

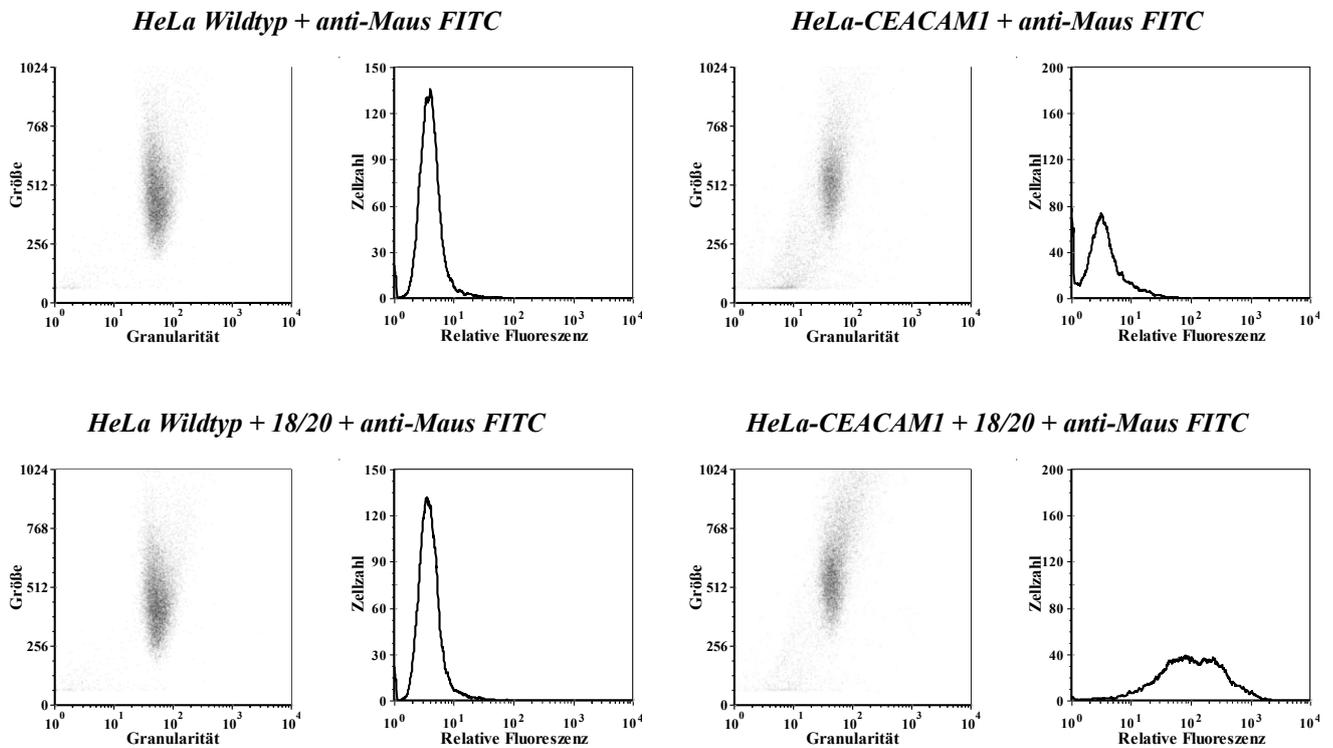


Abbildung 25: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit anti-Maus FITC und 18/20 + anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis der CEACAM1 Expression der Zellen.

Tabelle 17: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>Wildtyp</i>	18/20 + anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	3 (100 %)
<i>CEACAM1</i>	18/20 + anti-Maus FITC	101 (100 %)

Die HeLa Wildtyp Zellen weisen sowohl nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC alleine als auch nach der Kombination aus primären Antikörper 18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf. Die HeLa-CEACAM1 Zellen zeigen dagegen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität vom Median 3, nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC alleine, auf einen Median von 101 nach der

Inkubation mit primären Antikörper 18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC. Damit ist nachgewiesen, dass die verwendeten HeLa-CEACAM1 Zellen auch tatsächlich CEACAM1⁺ sind. Die Ergebnisse der Inkubation mit den Partikeln zeigen in allen Dot-Blots nur eine schwache Signalwolke, was in den Histogrammen zu keinem eindeutig detektierbaren Fluoreszenzsignal führt.

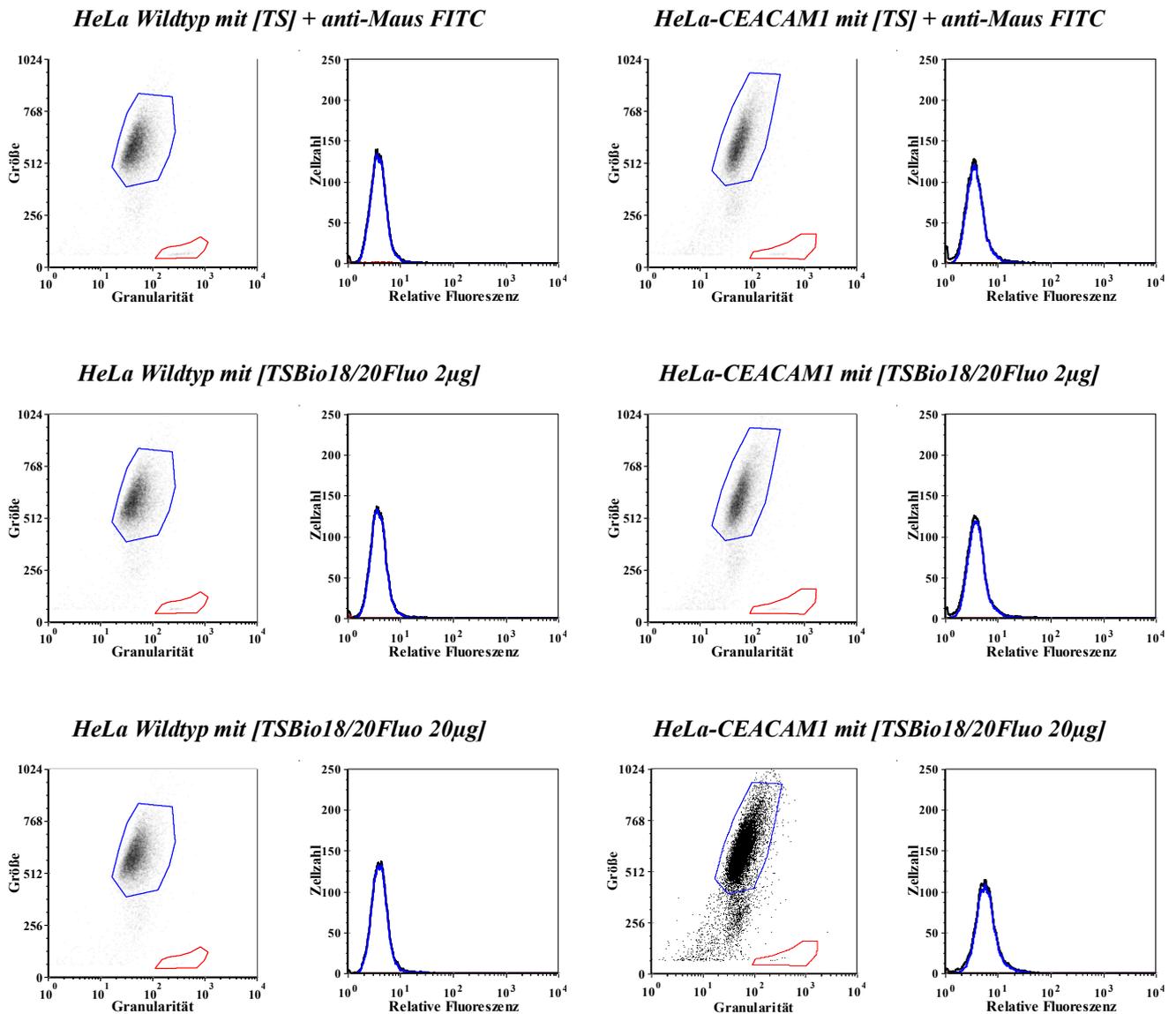


Abbildung 26: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit [TS], [TSBio18/20Fluo 2µg] und [TSBio18/20Fluo 20µg] Partikeln. (Rot: Partikel; Blau: Zellen; Schwarz: Gesamtmesssignal).

Darüber hinaus lässt sich sowohl für die mit unbeladenen [TS] Partikeln als auch für die mit antikörperbeladenen [TSBio18/20Fluo 2µg] bzw. [TSBio18/20Fluo 20µg] Partikeln inkubierten Zellen lediglich deren Eigenfluoreszenz mit Medianen von 2 – 4 Tabelle 18 detektieren. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob es sich um HeLa Wildtyp oder CEACAM1 expremierende HeLa Zellen handelt. Somit sind die [TS] Partikel womöglich schon vor der Inkubation der Zellen zerstört gewesen. Diese Ergebnisse betätigen das Hauptproblem beim Arbeiten mit den [TS] Partikeln, welches in der

Literatur jedoch nicht näher beschrieben ist. Obwohl die antikörperbeladenen Partikel bis zur Durchführung der Experimente gekühlt aufbewahrt werden und die Experimente, wie in der Literatur^[99] beschrieben, am selben Tag erfolgen, erhält man keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Möglichkeit der Detektion der Partikelbeladung im Durchflusszytometer variiert sehr stark. Mal sind die Partikel stabil genug, um die Beladung mittels Durchflusszytometer zu bestimmen, beim nächsten Mal jedoch so instabil, dass sie nicht einmal mehr im Durchflusszytometer ausreichend detektiert werden.

Tabelle 18: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Partikel	Relative Fluoreszenz (Median)	
		der Partikel	der Zellen
HeLa Wildtyp	[TS] + anti-Maus FITC	4	4 (100 %)
	[TSBio18/20Fluo 2µg]	2	4 (100 %)
	[TSBio18/20Fluo 20µg]	4	4 (100 %)
HeLa CEACAM1	[TS] + anti-Maus FITC	3	4 (100 %)
	[TSBio18/20Fluo 2µg]	2	4 (100 %)
	[TSBio18/20Fluo 20µg]	3	6 (100 %)

Die aufgeführten Ergebnisse machen lediglich deutlich, dass die Partikel schon vor der Inkubation der Zellen zerstört gewesen sein mussten. Wären die Partikel erst während der Zellinkubation zerstört worden, hätte Fluoreszenz detektiert werden müssen, da der freigesetzte Bio18/20Fluo Antikörper an die Zellen hätte binden können. Es zeigt sich also, dass die Instabilität der [TS] Partikel eine genauere durchflusszytometrische Untersuchung der Partikelbindung an CEACAM1 exprimierende Zellen verhindert. Couture *et al.* zeigen dagegen eine erfolgreiche Bindung von Shiga Toxin B Untereinheiten (STxB) über das Biotin-Streptavidin System an Mikrobläschen und die anschließende Bindung dieser STxB beladenen Mikrobläschen an HT29 Zellen, welche mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen wird.^[103] Gegenüber Zhou *et al.* scheinen dagegen Couture *et al.* ebenfalls erkannt zu haben, dass ungebundenes Protein zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Sie führen Waschschrte nach der Kopplung des Proteins an die Mikrobläschen durch, wie es auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben ist. Zusätzlich führen sie einen Waschschrte nach der Inkubation der HT29 Zellen mit den STxB beladenen Mikrobläschen vor der Analyse im Durchflusszytometer durch. Dies birgt jedoch die Gefahr, dass die Mikrobläschen aufgrund dieser Beanspruchung zerstört werden, eine Bindung des Proteins aber dennoch erfolgt und dadurch ein Fluoreszenzsignal im Durchflusszytometer detektiert wird. Eine alleinige Betrachtung dieses Fluoreszenzsignals würde zu einer falsch-positiven

Interpretation führen. Da Couture *et al.* keine Dot-Blots in ihrer Arbeit mit aufführen und keine Aussagen zur Intaktheit der Mikrobäschen nach den Waschschritten machen, ist eine Bewertung ihrer Ergebnisse nicht möglich. Um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können, werden in der vorliegenden Arbeit, die ungebundenen Partikel nicht durch Waschschriffe entfernt, sondern zusammen mit den Zellen detektiert. Hierbei wird die mechanische Belastung der Partikel durch das mehrmalige Zentrifugieren und dem Austausch des Puffers vermindert und durch das Einfügen entsprechender Gates in den Dot-Blots eine genaue Unterscheidung zwischen den Zellen und den ungebundenen Partikeln ermöglicht.

4.4.3. Untersuchung der [TS-AK] Bindung an adhärenle Zell-Monolayer

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse bleiben nur noch die Untersuchungen mit adhärenlen Einzelzellrasen, um eine Bindung von antikörperbeladenen [TS] Partikeln an Zellen nachzuweisen oder auszuschließen. Hierfür werden wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben auf Deckgläschen gewachsenen HeLa-CEACAM1 bzw. HeLa Wildtyp Zellen verwendet. Diese werden für die Zeit der Inkubation mit den Zellen nach unten auf die entsprechende [TS] Partikelsuspension gelegt, um einen Kontakt der [TS] Partikel mit den Zellen zu gewährleisten, da sich die [TS] Partikel an der Oberfläche anreichern. Die Analyse erfolgt bei 200facher Vergrößerung an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM), indem die Fluoreszenz im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) detektiert wird. Parallel werden Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) durchgeführt.

4.4.3.1. [TSBio18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen

In Abbildung 27 sind die CLSM Aufnahmen der Bindung von [TS], [TSBio18/20Fluo 2µg] und [TSBio18/20Fluo 20µg] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen aufgeführt. Die Negativkontrollen mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC sind negativ. Die Aufnahmen der Zellen, die mit dem 18/20 Antikörper inkubiert worden sind, zeigen, dass bei den HeLa Wildtyp Zellen keine Fluoreszenz detektiert wird. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen ist dagegen eine deutliche Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell Kontakten erkennbar. Somit zeigt diese Kontrolle, dass die verwendeten Zellen CEACAM1⁺ sind und verdeutlicht die vorwiegende Expression der CEACAM1 Proteine an den Zell-Zell-Kontaktstellen, an welchen das Protein an der Zelladhäsion beteiligt ist. Demnach sollte bei einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Antikörpern eine vergleichbare Fluoreszenzfärbung auftreten.

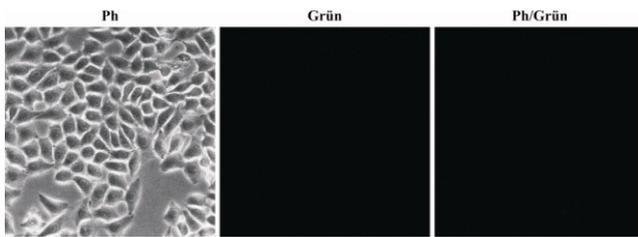
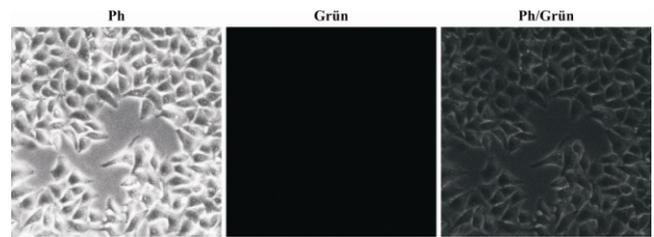
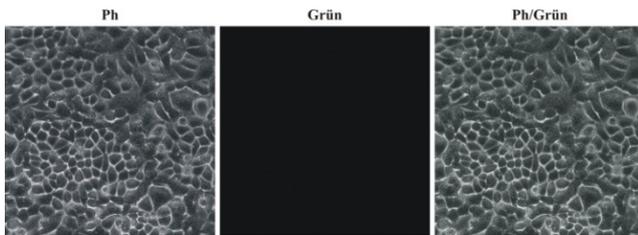
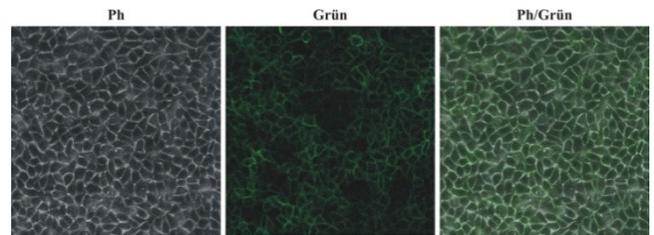
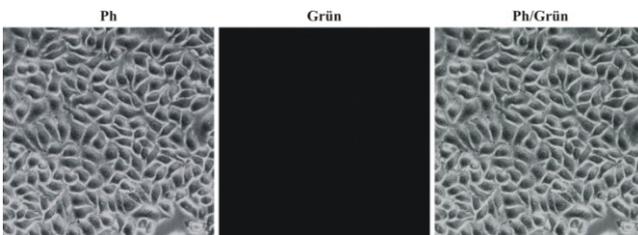
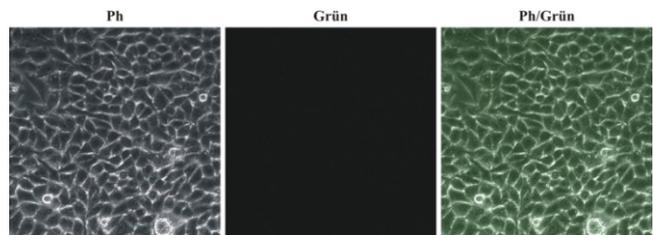
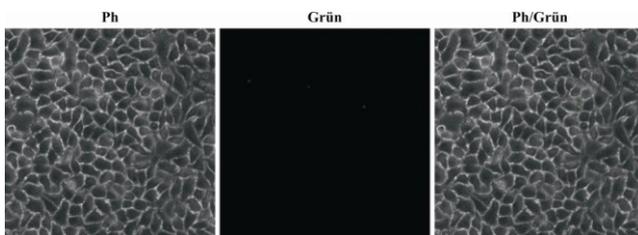
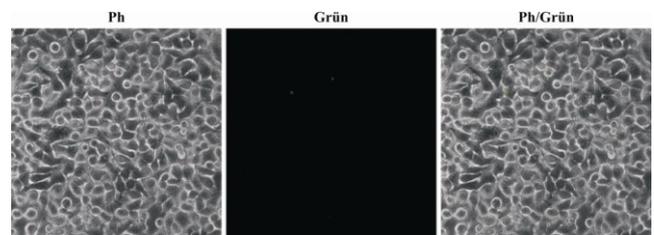
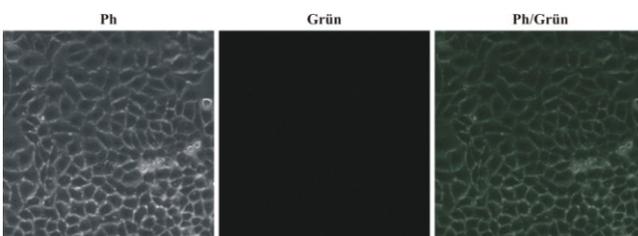
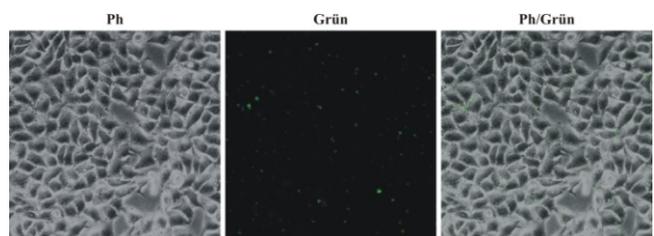
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC*HeLa-CEACAM1 + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp + 18/20 + anti-Maus FITC**HeLa-CEACAM1 + 18/20 + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp mit [TS] + anti-Maus FITC**HeLa-CEACAM1 mit [TS] + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp mit [TSBio18/20Fluo 2µg]**HeLa-CEACAM1 mit [TSBio18/20Fluo 2µg]**HeLa Wildtyp mit [TSBio18/20Fluo 20µg]**HeLa-CEACAM1 mit [TSBio18/20Fluo 20µg]*

Abbildung 27: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [TS], [TSBio18/20Fluo 2µg] und [TSBio18/20Fluo 20µg] Partikeln und den freien Antikörpern als Kontrolle. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen der HeLa Wildtyp Zellen zeigen, dass weder nach der Inkubation mit antikörperfreien [TS] Partikeln noch nach der Inkubation mit antikörperbeladenen [TSBio18/20Fluo 20µg] Partikeln Fluoreszenz zu erkennen ist. Bei den mit [TSBio18/20Fluo 2µg]

Partikeln inkubierten HeLa Wildtyp Zellen sind einzelne Partikel in den Aufnahmen sichtbar. Hierbei handelt es sich um Partikel, welche durch die Waschschriffe nicht vollständig entfernt worden sind. Auch bei den HeLa-CEACAM1 Zellen sind nach der Inkubation mit antikörperfreien [TS] Partikeln keine Partikel in der Phasenkontrastaufnahme sichtbar. Somit liegt keine unspezifische Bindung der Partikel vor.

Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen, die mit [TSBio18/20Fluo 2 μ g] und [TSBio18/20Fluo 20 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, sind die Partikel sowohl in den Phasenkontrastaufnahmen als auch in den Fluoreszenzaufnahmen nachweisbar. Allerdings ist kein signifikanter Unterschied in der Menge der [TSBio18/20Fluo 2 μ g] Partikel zwischen HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen zu erkennen. Somit liegt in diesem Fall keine spezifische Bindung an den HeLa-CEACAM1 Zellen vor. Die detektierte Menge an [TSBio18/20Fluo 20 μ g] Partikeln und die Fluoreszenzintensität in den Aufnahmen der HeLa-CEACAM1 Zellen ist dagegen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Zudem sind diese Partikel an den Zell-Zell Kontaktstellen lokalisiert, wie die Überlagerung der beiden Aufnahmen (Ph/Grün) verdeutlicht. Hier liegt demnach eine spezifische Bindung der Partikel an den Zellen vor. Die eingesetzte Bio18/20Fluo Antikörperkonzentration der Partikelbeladung scheint einen Einfluss auf die detektierte Partikelmenge zu haben.

Um die Bindungseffizienz und -stärke sowie den Einfluss der Bindungsart der Antikörper an die [TS] Partikel im Vergleich zu den [SV] Partikeln zu untersuchen, sind Zellbindungsuntersuchungen mit antikörperbeladenen [TS] Partikeln unter Flußbedingungen durchgeführt worden (Abschnitt 3.6.3). Analog zu den Untersuchungen mit [SV] Partikeln ist auch hier die Flußrate zunächst auf 205 μ L/min reduziert worden, um das Bindungsverhalten genauer zu dokumentieren. Bei dieser Flußrate herrscht eine Scherspannung von lediglich 0,2 – 0,3 dyn/cm^2 bzw. eine Scherrate von 20 – 30 s^{-1} . Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Flusseperimente mit antikörperbeladenen [SV18/20] Partikeln zeigen die Ergebnisse mit antikörperbeladenen [TSBio18/20Fluo] Partikeln, dass eine Bindung der Partikel an die Zellen über mehrere Minuten unter Flußbedingungen möglich ist. Beispielhaft sind in Abbildung 28 CLSM Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Flusseperiments dargestellt. Für einen besseren Kontrast sind die Zellmembranen mit dem Farbstoff PKH26 gefärbt. Da die Partikel über die Zellen hinweg fließen und der Antikörper mit Fluorescein modifiziert ist, ergibt sich in der Überlagerung der CLSM Aufnahmen eine orange-grüne Färbung. Mit den roten Pfeilen sind Partikel markiert, welche innerhalb des Betrachtungsfeldes an die Zellen binden. Die ersten Partikel treten nach 4 min 12 s in das Betrachtungsfeld ein. Bereits innerhalb von vier Sekunden binden die ersten [TSBio18/20Fluo] Partikel an die Zellen. Mit fortschreitender Fließdauer binden immer mehr Partikel an die Zellen, wie die Aufnahmen nach 4 min 16s, 5 min 48 s und 7 min 40 s zeigen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass auch die bereits gebundenen Partikel weiterhin an den Zellen verbleiben. Nach 9

min 48 s ist der Hauptteil der injizierten [TSBio18/20Fluo] Partikel aus dem Betrachtungsfeld ausgetreten. Erst nach 12 min 24 s ist zu erkennen, dass sich die ersten [TSBio18/20Fluo] Partikel von den Zellen gelöst haben bzw. die Fluoreszenzintensität aufgrund von Bleaching-Effekten abnimmt. Erst nach 16 min 40s sind die zu Anfang gebunden [TSBio18/20Fluo] Partikel nicht mehr im Betrachtungsfeld nachweisbar. Dafür sind einzelne, später gebundene [TSBio18/20Fluo] Partikel zu erkennen, welche dann nach 23 min 20 s ebenfalls nicht mehr an den Zellen lokalisiert werden können. Die Ergebnisse zeigen, dass die [TSBio18/20Fluo] Partikel unter diesen Flußbedingungen für eine Dauer von ca. 10 min an den Zellen verbleiben.

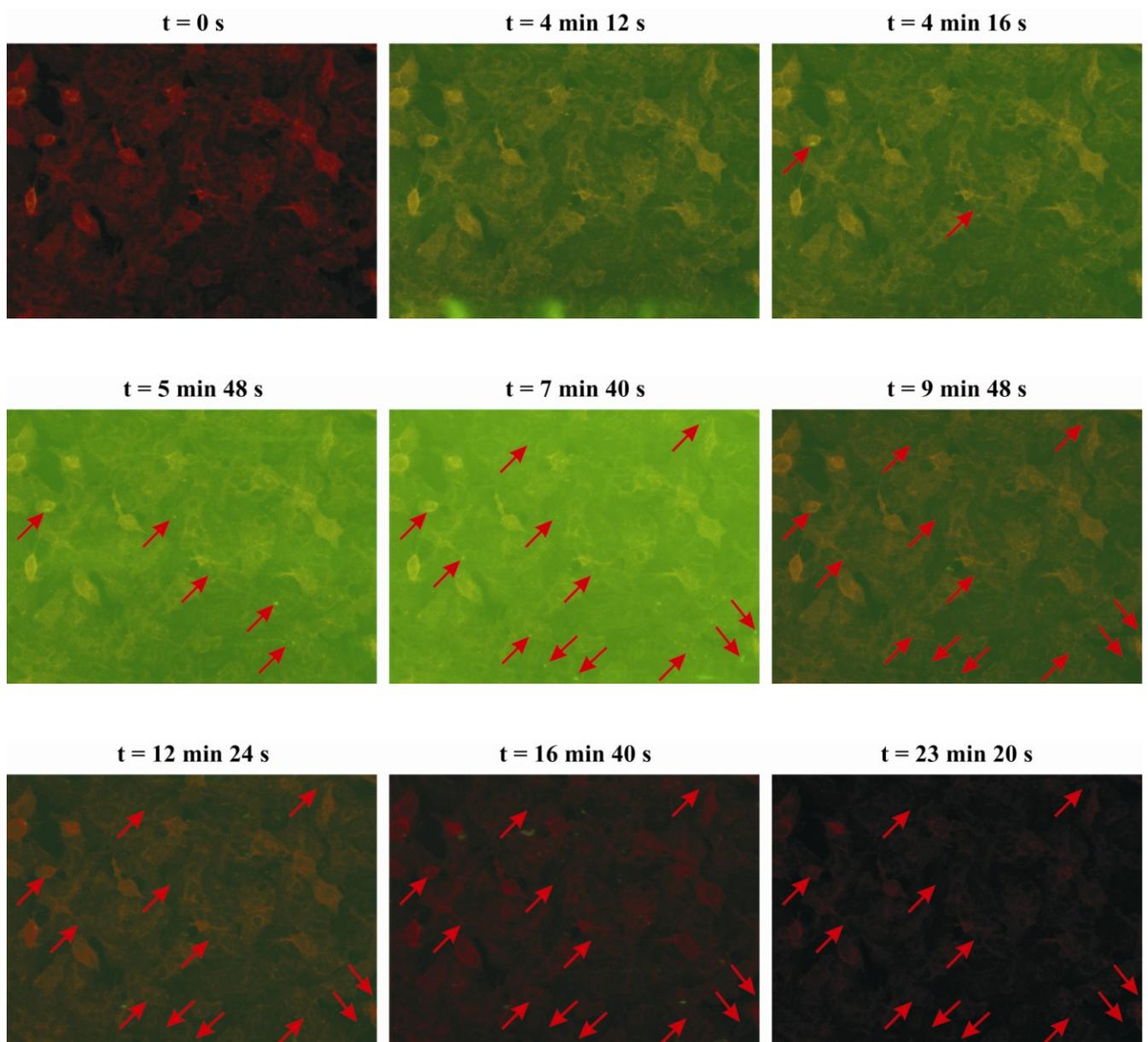


Abbildung 28: CLSM Aufnahmen von HeLa-CEACAM1 Zellen unter Flussbedingungen nach der Injektion von [TS18/20Fluo] Partikeln. Für einen besseren Kontrast sind die Zellmembranen mit dem Farbstoff PKH26 gefärbt. Dargestellt sind die Aufnahmen in der Überlagerung der Spektralbereiche von 505-525 nm (Grün) und 555 – 575 nm (Rot) zu verschiedenen Zeitpunkten. Mit den roten Pfeilen sind Partikel markiert, welche innerhalb des Betrachtungsfeldes an die Zellen binden. Die ersten Partikel treten nach 4 min 12 s in das Betrachtungsfeld ein. Nach einer Dauer von 23 min 20 s sind keine Partikel mehr im Betrachtungsfeld zu erkennen.

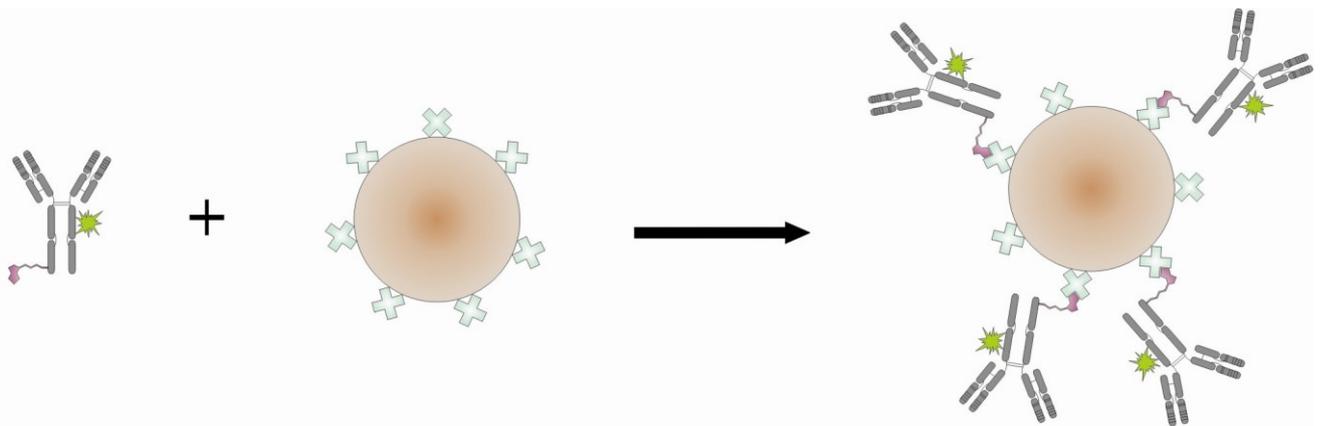
Die hier ermittelte Verweildauer der Partikel an den Zellen würde ausreichen, um *in vivo* Ultraschalluntersuchungen durchzuführen. Dies zeigen die Arbeiten von Rychak *et al.* oder auch Korpanty *et al.*, in denen die Ultraschalluntersuchung an Mäusen vier bzw. fünf Minuten nach der Partikelinjektion gestartet worden sind.^[99,104] Allerdings müssen die Ergebnisse, die mit den [TSBio18/20Fluo] Partikeln unter den vorliegenden Bedingungen erzielt worden sind, zunächst in Kontrolluntersuchungen und bei höher angelegten Flußraten bestätigt werden. So werden in den von Rychak *et al.* durchgeführten Bindungsuntersuchungen mit gegen P-Selektin gerichteten Partikeln Scherspannungen von 0,34 dyn/cm², 0,84 dyn/cm² und 1,3 dyn/cm² angelegt, welche Flußraten von ca. 0,3 mL/min, 0,6 mL/min und 1,0 mL/min entsprechen.^[102] Das Ergebnis mit den [TSBio18/20Fluo] Partikeln im Vergleich mit den [SV18/20] Partikeln weist aber eindeutig darauf hin, dass eine feste, quasi kovalente Verbindung zwischen Antikörper und Partikel notwendig ist, um eine entsprechende Bindung zwischen Partikeln und Zellen zu erzielen.

Die mit den [TS] Partikeln erzielten Ergebnisse zeigen eine spezifische Bindung an CEACAM1 exprimierende Zellen und sind damit äußerst vielversprechend, um die Fragestellungen dieser Arbeit zu bearbeiten. Im Vergleich mit den [CD31 MicroBead] Partikeln zeigen die [TSBio18/20Fluo] Partikel, insbesondere bei den Bindungsuntersuchungen an konfluenten Zellen, deutlich schlechtere Bindungseigenschaften. Dies könnte aber auf die Instabilität der [TS] Partikel zurückgeführt werden. Allerdings zeigt sich in der Anwendung, dass die Instabilität der Partikel eine genauere Untersuchung der Bindungseigenschaften oftmals verhindert. Dies äußert sich zum Einen darin, dass geplante Experimente erst gar nicht durchgeführt werden können, oder zum Anderen die anschließende Analytik und die resultierende Auswertung nicht durchführbar sind. Aufgrund dieser Probleme sind vorerst keine weiteren Untersuchungen wie Kontrollexperimente oder Analysen mit 6/40cFluo beladenen [TS] Partikeln durchgeführt worden. Es ist, trotz der vielversprechenden Ergebnisse, entschieden worden, zunächst stabilere Partikel zu verwenden, um mit diesen vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die grundlegenden Methoden der Antikörperbindung, Aufreinigung und Analyse zu erarbeiten. Da es zahlreiche Partikel für die verschiedensten Anwendungen auf dem Markt gibt, sind magnetische Partikel ausgewählt worden, um die Vorteile der magnetischen Aufreinigung nutzen zu können.^[105]

4.5. Herstellung antikörperbeladener [SDB] Partikel

Um die Probleme der Instabilität der mit einer stabilisierenden Lipidmembran umhüllten Mikrogasbläschen, wie es bei den [SV] und [TS] Partikeln, zu umgehen, sind im nächsten Schritt Polystyrolpartikel mit eingeschlossenem superparamagnetischem Eisenoxid der Firma Invitrogen

untersucht worden. Aufgrund ihrer Beschaffenheit weisen diese [SDB] Partikel eine hohe Stabilität auf und sind bei Aufreinigungsschritten durch die magnetischen Eigenschaften einfach zu handhaben. Allerdings handelt es sich bei diesen Partikeln um kein Kontrastmittel für Ultraschallanwendungen oder andere Bildgebungstechniken, sondern um Partikel, die für DNA-Isolierung^[106], die Peptid/Protein-Aufreinigung^[107] oder Zellisolierung^[108] entwickelt worden sind. Aufgrund ihrer superparamagnetischen Eigenschaften wäre aber eine Anwendung in Magnetresonanz-Experimenten vorstellbar, um weitere Erkenntnisse in den Abläufen der Zellbindung CEACAM1-gerichteter Partikel zu erhalten. Da die [SDB] Partikel einen mittleren Durchmesser von 2,8 μm aufweisen und auf ihrer Oberfläche Streptavidin kovalent gebunden ist, sind sie in Bezug auf Größe und Antikörperbindung den [TS] sehr ähnlich. Daher erhoffen wir uns mit diesen [SDB] Partikeln weiterführende und vielleicht auch auf die [TS] Partikel übertragbare Ergebnisse zu erlangen, welche mit den [TS] Partikeln, aufgrund der Instabilität, nicht erzielt werden konnten. Durch das Streptavidin als reaktive Gruppe auf der Oberfläche, kommt auch bei den [SDB] Partikeln die stärkste nichtkovalente Bindung biologischer Interaktionen zum Einsatz, die eine nahezu dauerhafte kovalente Anbindung des Antikörpers garantiert.^[81] In Abbildung 29 ist die Beladung der [SDB] Partikel mit Antikörper schematisch dargestellt.



Legende:



Abbildung 29: Schematische Darstellung der Herstellung antikörperbeladener [SDB] Partikel.

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, werden die [SDB] Partikel mit unterschiedlichen Konzentrationen an Antikörper beladen. Da sich die [SDB] Partikel magnetisch pelletieren lassen, werden die Überstände der Reaktionslösungen und der Waschfraktionen mittels Western-Blot analysiert, um die Bindung des Antikörpers an die [SDB] Partikel indirekt nachweisen zu können. Ein direkter Nachweis der Partikel im Western-Blot ist nicht möglich, da die Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 2,8 μm zu

groß für die Poren der Polyacrylamidgele sind und in den Geltaschen verbleiben. Aufgrund der Größe sind sie aber im Durchflusszytometer nachweisbar, so dass die Partikelsuspensionen nach der Antikörperbindung zunächst im Durchflusszytometer analysiert werden, um die Beladung mit Antikörper zu bestimmen. Anschließend werden Bindungsuntersuchungen mittels ELISA, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

4.5.1. Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [SDB] Partikel

Die gesammelten Überstände der Reaktionslösungen und die Waschfraktionen werden, wie es in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, mittels Western-Blot analysiert. Zur Detektion des ungebundenen Antikörpers wird der polyklonale Ziege anti-Maus IgG^{HRP} Antikörper verwendet. Die Analyse der Überstände und Waschfraktionen in Abbildung 30 zeigt, dass eine Bindung der beiden Antikörper Bio18/20Fluo und Bio6/40cFluo stattfindet. In Reihe 2 ist der Bio18/20Fluo bzw. Bio6/40cFluo Antikörper als Kontrolle geladen. Diese zeigen jeweils eine Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers in der Höhe des Markers von ca. 130 kDa. Der Bio18/20Fluo Antikörper zeigt zusätzlich eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 250 kDa und eine schwache Bande darüber. Dieses Bandenmuster ist ungewöhnlich, da aufgrund der molekularen Masse eines IgG von ca. 150 kDa nur eine Bande bei ca. 150 kDa zu erwarten wäre. Durch die Modifikation mit dem sehr kleinen Fluoresceinmolekül ($M_w \sim 375$ g/Mol) und Biotinmolekül ($M_w \sim 356$ g/Mol) würde sich diese Bande weder verschieben noch würde hierdurch eine zweite Bande auftreten, die einer entsprechend höheren Proteinmasse zugeordnet werden könnte. Aus diesem Grund ist zusätzlich ein Gel in Abbildung 30 aufgeführt, bei welchem der unreduzierte monomere 18/20 Antikörper geladen ist.

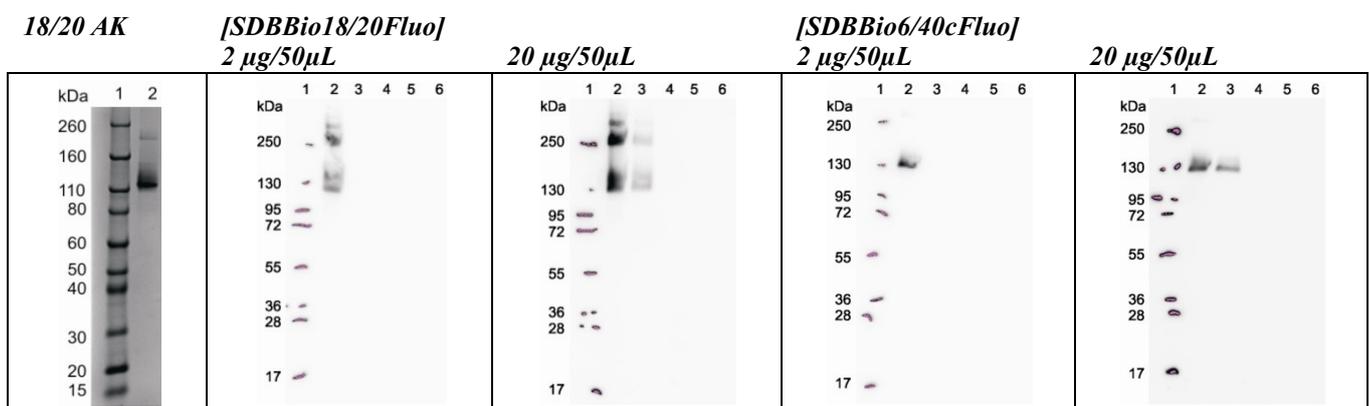


Abbildung 30: Kontrollgel des 18/20 Antikörpers (links) mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Novex[®] Sharp Standard; 2: 18/20. Western-Blots der Antikörperkopplung an [SDB] Partikel mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Prestained Protein Ladder #SM1811; 2: Antikörper zur Kontrolle; 3: Überstand der Partikel-Antikörper-Kopplung; 4-6: Waschfraktion 1-3 der Partikel-Antikörper-Kopplung.

Dieses Gel zeigt ein den Western-Blots entsprechendes Bandenmuster. Es ist eine intensive Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers oberhalb der Markerbande von 110 kDa zu erkennen. Dies zeigt, dass die Banden der Markerproteine in den in dieser Arbeit verwendeten Gelen nicht auf der Höhe ihres eigentlichen Molekulargewichts auftreten. Dies liegt daran, dass die Hersteller der Standardmarker die Bandenhöhen auf Gelen ermitteln, die sich von den Gelen in den Laboren der Nutzer unterscheiden können. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Laufverhalten der Proteine. Des Weiteren ist in dem Gel eine Bande zwischen den Markerbanden von 160 kDa und 260 kDa zu erkennen, welche sich ungefähr auf der Höhe des doppelten Molekulargewichts der intensiven Bande befindet. Daher könnte es sich hierbei um Antikörper handeln, welcher nach der Denaturierung durch SDS, welches im Probenpuffer enthalten ist, dimerisiert. Es könnte aber auch sein, dass diese Bande durch unvollständig denaturierten Antikörper hervorgerufen wird. Dieser hat kein konstantes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und wird im Gel nicht entsprechend getrennt. Eine genauere Analyse dieser Bande ist nicht durchgeführt worden.

Bei der Probe, bei der 2µg/50µL Bio18/20Fluo Antikörper eingesetzt worden sind, sind in Reihe 3 (Überstand) und den Reihen 4 – 6 (Waschfraktionen) keine Banden zu erkennen. Somit ist bei dieser Probe der gesamte eingesetzte Antikörper an die Partikel gebunden. Bei der Probe, bei der 20µg/50µL Bio18/20Fluo Antikörper eingesetzt worden sind, ist in Reihe 3 des Blots (Überstand) eine Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Zudem werden die weiteren Banden, wie sie beim geladenen Kontrollantikörper zu sehen sind, detektiert. Somit liegt hier eine klare Sättigung der Bindungsstellen durch den Antikörper an den Partikeln vor, so dass überschüssiger Antikörper detektiert wird. In den Reihen 4 – 6 (Waschfraktionen) werden keine Banden detektiert. Bei der Probe, bei der 2µg/50µL Bio6/40cFluo Antikörper eingesetzt worden sind, sind in Reihe 3 (Überstand) und den Reihen 4 – 6 (Waschfraktionen) keine Banden zu erkennen. Somit ist bei dieser Probe der gesamte eingesetzte Antikörper an die Partikel gebunden. Bei der Probe, bei der 20µg/50µL Bio6/40cFluo Antikörper eingesetzt worden sind, ist in Reihe 3 des Blots (Überstand) eine deutliche Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Somit liegt hier eine klare Sättigung der Bindungsstellen durch den Antikörper an den Partikeln vor, so dass überschüssiger Antikörper detektiert wird. In den Reihen 4 – 6 (Waschfraktionen) werden keine Banden detektiert.

Die Ergebnisse der weitergehenden durchflusszytometrischen Analysen dieser Partikel, wie sie in Abschnitt 3.5.1.2 beschrieben sind, sind in der Abbildung 31 in Form von Dot-Blots, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist, und Histogrammen, bei denen die Partikelzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist, aufgeführt. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im

Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz mit einem Fluorochrom. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der unbeladenen Partikel die Stärke der Eigenfluoreszenz wieder, welche als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt wird.

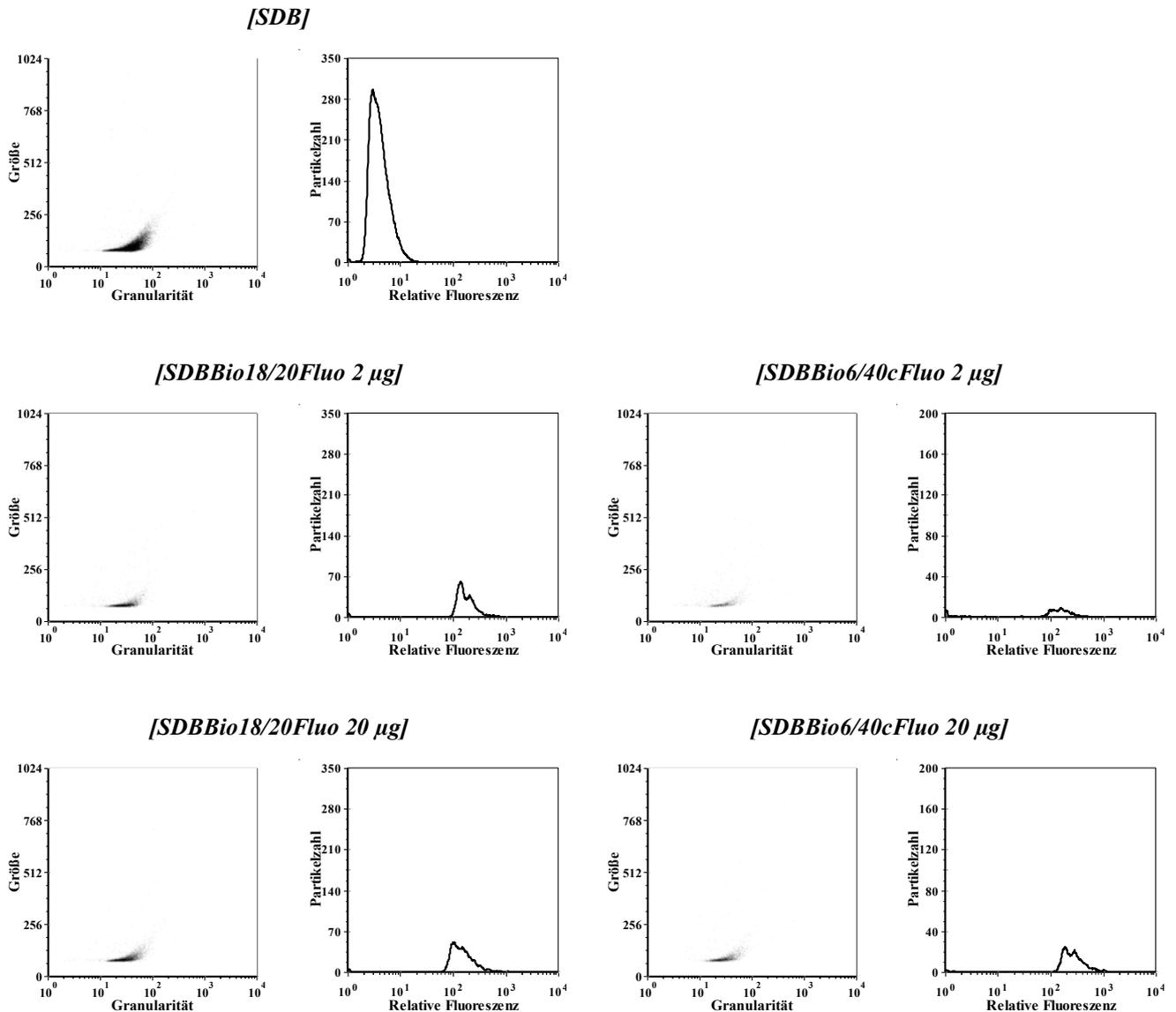


Abbildung 31: Analyse der [SDB] Partikel nach der Beladung mit Antikörpern im Durchflusszytometer.

Tabelle 19: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen der Partikel.

<i>Partikel</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Partikel</i>
[SDB]	4
[SDBBio18/20Fluo 2 µg]	160
[SDBBio18/20Fluo 20 µg]	139
[SDBBio6/40cFluo 2 µg]	141
[SDBBio6/40cFluo 20 µg]	255

Die Dot-Blots zeigen, dass die antikörperbeladenen [SDB] Partikel gut im Durchflusszytometer detektierbar sind und eine sehr gleichmäßige Beschaffenheit und Größe aufweisen. Allerdings ist auch zu erkennen, dass die Partikelzahl in den Proben sehr gering ist. Als Negativkontrolle dienen die unbeladenen [SDB] Partikel mit einem Median von ca. 4 (Tabelle 19). Die Ergebnisse der [SDBBio18/20Fluo] Partikel zeigen beide eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle. Die Partikel mit der niedrigen Antikörperkonzentration weisen einen Median von ca. 160 und die Partikel mit hoher Antikörperkonzentration einen Median von ca. 139 auf (Tabelle 19). Der Bio18/20Fluo Antikörper ist somit an den Partikeln gebunden. Da die Fluoreszenzintensitäten nahezu identisch sind und keine Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörperkonzentration aufweisen, sind die Bindungsstellen an den Partikeln schon beim Einsatz der niedrigen Antikörperkonzentration vollständig besetzt. Die Ergebnisse der [SDBBio6/40cFluo] Partikel zeigen ebenfalls beide eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber der Negativkontrolle. Der Bio6/40cFluo Antikörper ist somit auch an den Partikeln gebunden. Die Fluoreszenzintensität zeigt hier eine Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörperkonzentration. So erreichen die Partikel mit der niedrigen Antikörperkonzentration einem Median von ca. 141 und die Partikel mit hoher Antikörperkonzentration einen Median von ca. 255 (Tabelle 19). Somit sind die Partikel, die mit der höheren Antikörperkonzentration inkubiert worden sind, stärker beladen wie es Lindner *et al.* auch bei Mikrobläschen beobachten.^[101] Die hier ermittelten Fluoreszenzintensitäten sind, trotz einer leichten Erhöhung, mit den in der Literatur angegebenen Werten zu vergleichen. Jedoch ist die Partikelzahl in den Proben der antikörperbeladenen Partikel gering, wie der Vergleich der Histogramme mit den unbeladenen Partikeln zeigt. In der Literatur werden bei den durchflusszytometrischen Analysen höhere Partikelzahlen detektiert.^[99,101] Dieser Unterschied kann jedoch auf die Ansatzgröße der Beladung mit den Antikörpern zurückgeführt werden und darauf, dass während der Waschschriffe auch immer Partikel gewaschen werden. Die Beladung der [SDB] Partikel ist demnach erfolgreich verlaufen. Die vollständige Besetzung der Bindungsstellen, schon beim Einsatz niedriger Antikörperkonzentrationen, wie die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen zeigen, wird durch die Ergebnisse der Western-Blots bestätigt. Auch hier wird bei hohen Antikörperkonzentrationen freier Antikörper detektiert. Dass die Sättigung der Bindungsstellen durch den Bio6/40cFluo Antikörper erst bei der hohen Antikörperkonzentration zu erfolgen scheint, liegt wohl ebenfalls an der geringen Partikelzahl. Hierdurch ist die Peakform in den Histogrammen nicht gleichförmig, wodurch unterschiedliche Mediane der relativen Fluoreszenz ermittelt werden. Bei der Verwendung großer Probenmengen sollte dies nicht mehr auftreten.

4.5.2. Bindungsanalyse von [SDB-AK] Partikeln an Antigen mittels ELISA

Mittels Sandwich-ELISA, wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, wird analysiert, ob die antikörperbeladenen [SDB] Partikel das jeweilige Antigen aus einer Proteinlösung binden. Als Proteinlösungen mit unbekannter Antigenkonzentration dienen verdünnte HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Lysate. Die Verdünnungsfaktoren der Lysate sind mittels Verdünnungsreihe im Vorfeld ermittelt worden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Als Positivkontrolle dienen die unmodifizierten Antikörper. Als Negativkontrolle dienen die unbeladenen Partikel. Die aus der Dreifachbestimmung erhaltenen Ergebnisse sind in Balkendiagrammen dargestellt, bei denen die Absorptionen bei 450 nm gegen die jeweiligen Partikelproben aufgetragen sind.

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse des ELISAs mit den antikörperbeladenen [SDB] Partikeln aufgeführt. Als Negativkontrolle dienen die unbeladenen [SDB] Partikel. Für die Positivkontrolle werden die jeweiligen freien Antikörper verwendet. In dem Diagramm der gegen CEACAM1 gerichteten Proben ist für den freien Bio18/20Fluo Antikörper eine Absorption von $0,266 \pm 0,017$ zu erkennen. Die unbeladenen [SDB] Partikel und auch die gegen CEACAM1 gerichteten antikörperbeladenen Partikelproben weisen dagegen keine Absorption und somit keine Bindung auf.

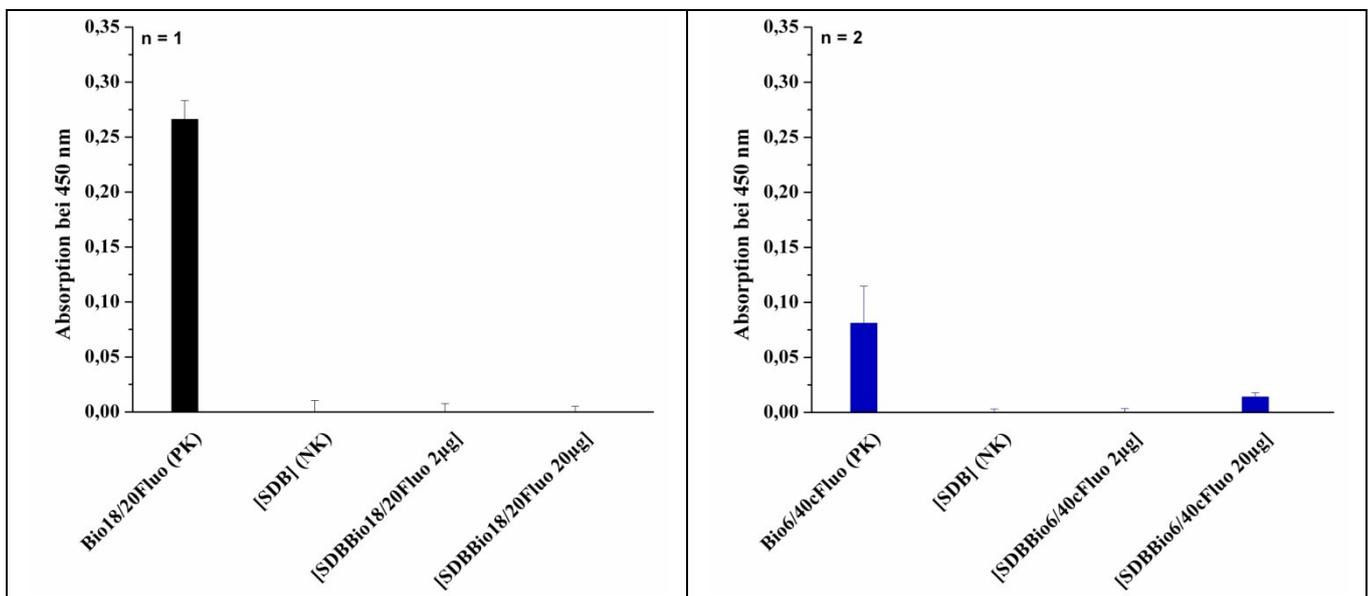


Abbildung 32: Bindung des Antigens durch antikörperbeladene [SDB] Partikel aus HeLa-CEACAM1 Lysat (schwarz) und HeLa-CEACAM8 Lysat (blau) (PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle).

Die Ergebnisse der gegen CEACAM8 gerichteten Partikel zeigen für den freien Antikörper eine Absorption von $0,081 \pm 0,034$ und für die unbeladenen [SDB] Partikel eine Absorption von 0. Auch die [SDBBio6/40cFluo 2 µg/l] Partikel zeigen keine Absorption, die [SDBBio6/40cFluo 20 µg/l] Partikel dagegen eine geringe Absorption von $0,014 \pm 0,004$. Diese Absorption ist jedoch so gering, dass sie als nicht signifikant angesehen werden kann. Demnach binden sowohl die mit 18/20Fluo Antikörper als

auch die mit 6/40cFluo Antikörper beladenen Partikel nicht im ELISA. Somit kann ELISA nicht verwendet werden, um die Antikörperbindung der Partikel zu analysieren. Dadurch ist es auch nicht möglich, Erkenntnisse über die Eignung der Partikel zur Bindung des jeweiligen Antigens aus einem Zelllysate zu erhalten. Auch in der Literatur ist nur ein erfolgreicher Bindungsnachweis von antikörperbeladenen Nanopartikeln zu finden.^[90] Die Erklärung für diesen negativen Verlauf ist schon bei der Durchführung der Experimente zu beobachten. Hier zeigt sich, dass die Partikel aufgrund ihrer Masse auf dem Plattenboden der *wells* absinken und zum Teil durch die Waschschriffe vollständig gewegewaschen werden. In diesen *wells* kann kein Signal mehr detektiert werden. Anstelle des Nachweises der Antigenbindung mittels ELISA wäre es möglich, den Nachweis in weiteren Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie zu erbringen.^[109] Hierfür müsste der Detektionsantikörper gegen eine andere Domäne von CEACAM1 bzw. CEACAM8 gerichtet sein als der an den Partikeln gebundene Antikörper, der die N-Domäne erkennt. Zudem müssten der Detektionsantikörper und der partikelgebundene Antikörper mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert sein, um die Partikel und die Bindung des Antigens getrennt voneinander nachweisen zu können.

4.5.3. Untersuchung der [SDB-AK] Interaktion an Zellen in Suspension

Die Bindungseigenschaften der antikörperbeladenen [SDB] Partikel werden an Zellsuspensionen untersucht und mittels Durchflusszytometrie analysiert, wie es in Abschnitt 3.5.2.4 beschrieben ist. Hierfür werden HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Zellsuspensionen verwendet. Als Kontrolle und um den Grad unspezifischer Bindung zu ermitteln, werden HeLa Wildtyp Zellsuspensionen eingesetzt. Als weitere Negativkontrolle dienen antikörperfreie Partikel. Die Ergebnisse sind in Form von Dot-Blots zusammengestellt, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist. Des Weiteren sind die Ergebnisse in Histogrammen dargestellt, bei denen die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz der Zellen mit einem Fluorochrom. Das heißt, je stärker das Signal der relativen Fluoreszenz ist, desto mehr Fluorophor ist an den Zellen gebunden. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der Zellen, die mit anti-Maus FITC Antikörper inkubiert werden, die Stärke der Eigenfluoreszenz der Zellen zusammen mit der Hintergrundfluoreszenz des Antikörpers, die durch unspezifische Bindung hervorgerufen wird, wieder. Die Eigenfluoreszenz, die durch endogene Fluorophore hervorgerufen wird^[89], wird als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt. Da das Trennverfahren der magnetischen Pelletierung aller Proben aufgrund zu weniger Magnete hätte nacheinander stattfinden und zudem für jeden Waschschriff angewendet werden müssen, ist dies hier nicht anwendbar gewesen. Daher ist eine Trennung zwischen mit Partikeln markierten Zellen von

unmarkierten Zellen vor der Analyse im Durchflusszytometer nicht möglich. Eine Unterscheidung dieser Zellen sollte über die Fluoreszenzsignale erreicht werden. Bei Vorliegen von mit Partikeln markierten Zellen und unmarkierten Zellen sollten im Histogramm zwei Peaks mit unterschiedlichen Medianen der relativen Fluoreszenz detektiert werden. Auch die ungebundenen Partikel werden neben den Zellen im Durchflusszytometer detektiert. Aufgrund der Unterschiede in Größe und Granularität sollten sie mit Hilfe des Dot-Blots voneinander zu unterscheiden sein. Zur Auswertung sind die Zellen und die Partikel in farblichen Gates (Partikel = Rot; Zellen = Blau) unterschieden. Die farbliche Unterscheidung ist in den Histogrammen entsprechend übernommen. Bei den Signalen in den Dot-Blots, die nicht in den Gates erfasst sind, handelt es sich um Zelltrümmer.

4.5.3.1. [SDBBio18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen

Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM1 exprimieren, sind die Ergebnisse der Inkubation mit dem anti-Maus FITC Antikörper alleine und der Kombination aus primären Antikörper Bio18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC in Abbildung 33 und Tabelle 20 aufgeführt. Die HeLa Wildtyp Zellen weisen, sowohl nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC, als auch nach der Kombination aus primären Antikörper Bio18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf. Ebenso zeigen die HeLa-CEACAM1 Zellen einen Median von 4 nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC. Hier liegt demnach keine unspezifische Bindung einer der Antikörper vor und die Negativkontrollen sind negativ. Die Positivkontrolle mit HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit primären Antikörper Bio18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC weist einen Median von 135 auf. Damit ist nachgewiesen, dass die verwendeten Zellen CEACAM1⁺ sind.

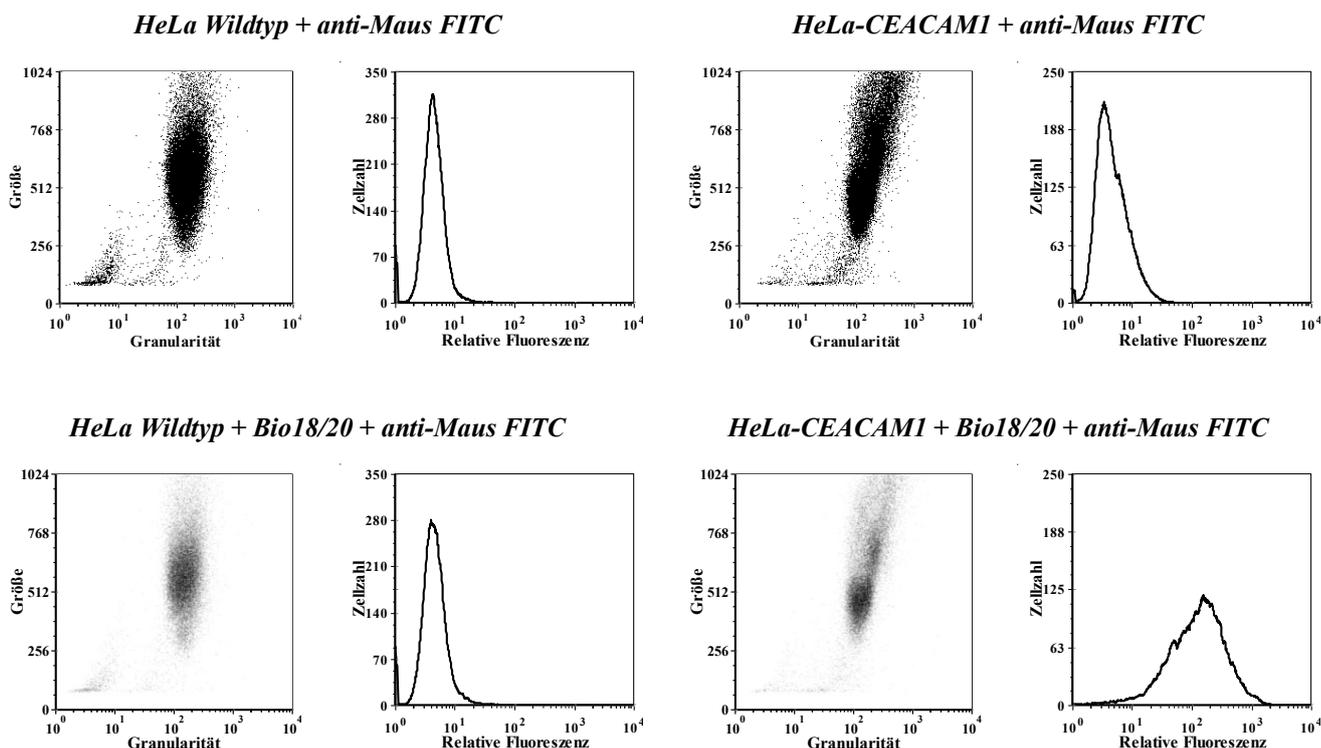


Abbildung 33: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit anti-Maus FITC und Bio18/20 + anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis der CEACAM1 Expression der Zellen.

Tabelle 20: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>Wildtyp</i>	Bio18/20 + anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>CEACAM1</i>	Bio18/20 + anti-Maus FITC	135 (100 %)

In Abbildung 34 sind die aus den durchflusszytometrischen Messungen resultierenden Dot-Blots und Histogramme der Bindung von antikörperfreien [SDB] und antikörperbeladenen [SDBBio18/20Fluo] Partikeln an HeLa Wildtyp bzw. HeLa-CEACAM1 Zellsuspensionen aufgeführt. Ergänzend sind die Mediane der relativen Fluoreszenz und der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen in Tabelle 21 zusammengefasst. Ausreichend [SDB] Partikel, die ein auswertbares Signal hervorrufen, sind nur in den Dot-Blots zu erkennen, bei denen die Zellen mit unbeladenen [SDB] Partikel inkubiert worden sind. Diese werden jedoch durch eine klare Signalwolke detektiert, die in den Histogrammen die entsprechende Eigenfluoreszenz zeigen. In den Proben, bei denen die Zellen mit antikörperbeladenen [SDBBio18/20Fluo] bzw. [SDBBio6/40cFluo] Partikeln inkubiert worden sind, werden nur sehr geringe Partikelzahlen detektiert. Diese weisen dafür sehr hohe Fluoreszenzintensitäten auf (Tabelle 21).

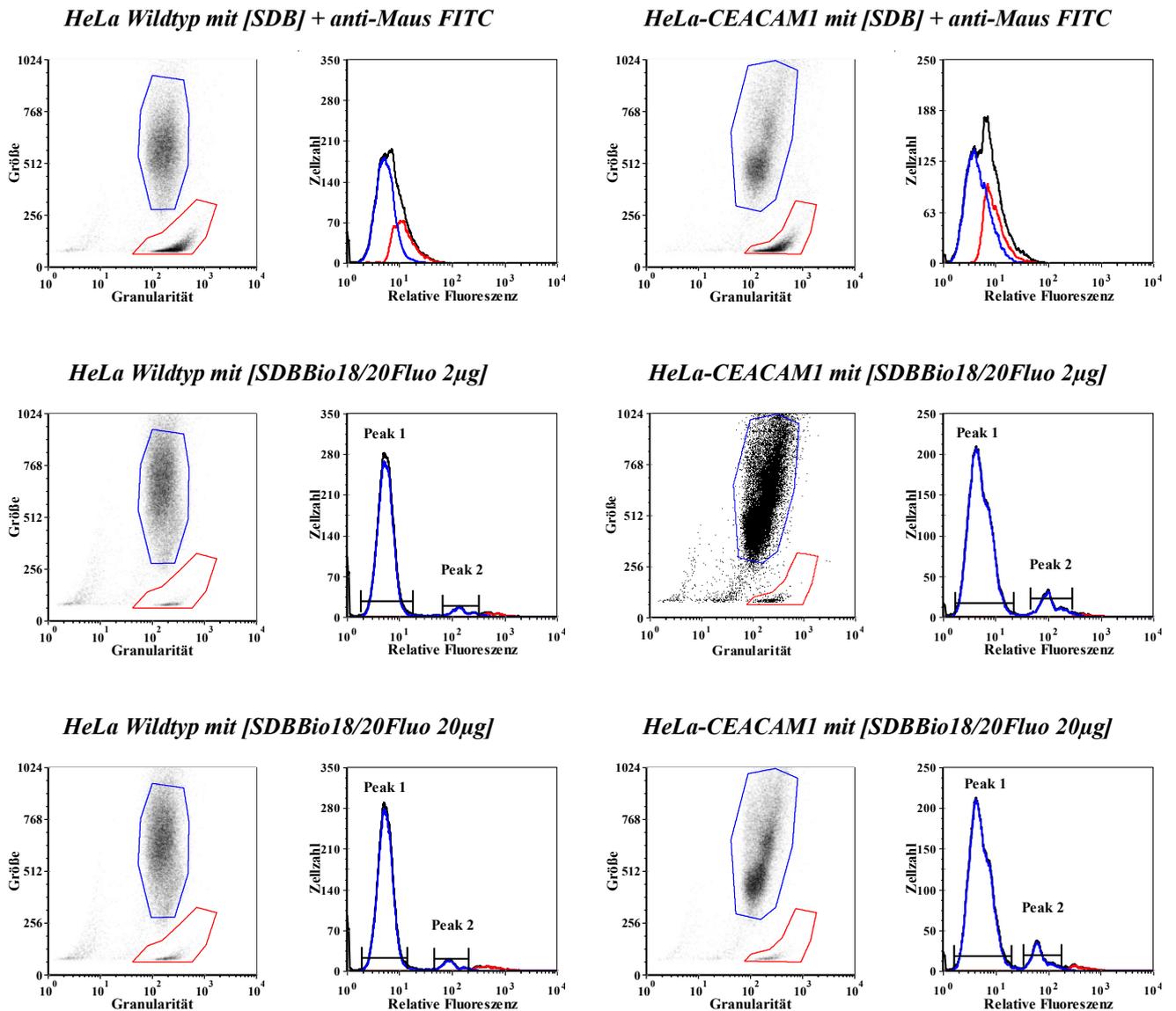


Abbildung 34: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit [SDB], [SDBBio18/20Fluo 2µg] und [SDBBio18/20Fluo 20µg] Partikeln. (Rot: Partikel; Blau: Zellen; Schwarz: Gesamtmesssignal).

Tabelle 21: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Partikel	Relative Fluoreszenz (Median)		
		der Partikel	der Zellen – Peak 1	der Zellen – Peak 2
HeLa Wildtyp	[SDB] + anti-Maus FITC	12	5 (100 %)	-
	[SDBBio18/20Fluo 2µg]	632	5 (94 %)	143 (6 %)
	[SDBBio18/20Fluo 20µg]	491	5 (94 %)	90 (6 %)
HeLa CEACAM1	[SDB] + anti-Maus FITC	9	4 (100 %)	-
	[SDBBio18/20Fluo 2µg]	491	5 (90 %)	102 (10 %)
	[SDBBio18/20Fluo 20µg]	379	5 (90 %)	66 (10 %)

Die HeLa Wildtyp Zellen, die mit unbeladenen [SDB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen nur Eigenfluoreszenz mit einem Median von 5. Bei den HeLa-Wildtyp Zellen, welche mit antikörperbeladenen [SDB] Partikeln inkubiert worden sind, lassen sich im Histogramm dagegen zwei Peaks zuordnen. Hier zeigen 94 % (Peak 1) der Zellen, die mit [SDBBio18/20Fluo 2 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, Eigenfluoreszenz und 6 % (Peak 2) der Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 143. Ebenso weisen 94 % (Peak 1) der Zellen, die mit [SDBBio18/20Fluo 20 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, Eigenfluoreszenz auf und 6 % (Peak 2) dieser Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 90. Somit liegt eine geringe unspezifische Bindung der Partikel an die HeLa Wildtyp Zellen vor. Die Ergebnisse der HeLa-CEACAM1 Zellen sind nahezu identisch zu den der HeLa Wildtyp Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass die Bindung der Partikel an HeLa-CEACAM1 Zellen unspezifisch ist. Die mit unbeladenen [SDB] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM1 Zellen weisen lediglich Eigenfluoreszenz auf. Dagegen lassen sich im Histogramm der mit antikörperbeladenen [SDB] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM1 Zellen zwei Peaks zuordnen. Hierbei zeigen 90 % (Peak 1) der mit [SDBBio18/20Fluo 2 μ g] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM1 Zellen Eigenfluoreszenz und 10 % (Peak 2) der Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 102. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen, die mit [SDBBio18/20Fluo 20 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, weisen 90 % (Peak 1) Eigenfluoreszenz und 10 % (Peak 2) erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 66 auf. Würde man hier das Ergebnis der unspezifisch markierten HeLa Wildtyp Zellen von 6 % als Hintergrund subtrahieren, wären an 4 % der HeLa-CEACAM1 Zellen Partikel spezifisch gebunden. Da die Oberfläche der [SDB] Partikel nicht speziell funktionalisiert ist, um Proteinablagerungen zu verhindern, ist es durchaus möglich, dass die unspezifische Bindung durch Wechselwirkungen mit Zellmembranproteinen hervorgerufen wird. Die unspezifische Bindung sollte jedoch schwächer sein als die Bindung über den jeweiligen Antikörper. Hier macht sich der fehlende Schritt der Trennung von partikelgebundene Zellen, freien Zellen und freien Partikeln bemerkbar, der wie beschrieben aufgrund des hohen Probenaufkommens weggelassen werden musste. Es hätte sonst immer nur eine einzelne Proben untersucht werden können, da bei zu langen Wartezeiten die Gefahr der Schädigung der Zellen bzw. der antikörperbeladenen Partikel bestanden hätte.

4.5.3.2. [SDBBio6/40cFluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellsuspensionen

Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM8 exprimieren, sind die Ergebnisse der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC alleine und der Kombination aus primären Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC in Abbildung 35 und Tabelle 22 aufgeführt. Die HeLa Wildtyp Zellen weisen, sowohl nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC, als auch nach der Kombination aus primären Antikörper 6/40c

und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf. Ebenso zeigen die HeLa-CEACAM8 Zellen einen Median von 4 nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC. Hier liegt demnach keine unspezifische Bindung einer der Antikörper vor und die Negativkontrollen sind negativ. Die Positivkontrolle mit HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Inkubation mit primärem Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC weist einen Median von 114 auf. Damit ist nachgewiesen, dass die verwendeten HeLa-CEACAM8 Zellen auch tatsächlich CEACAM8⁺ sind. Die Ergebnisse der Bindung von antikörperfreien [SDB] und antikörperbeladenen [SDBBio6/40cFluo] Partikeln an HeLa Wildtyp bzw. HeLa-CEACAM8 Zellsuspensionen sind in Abbildung 36 aufgeführt. Ergänzend sind die Mediane der relativen Fluoreszenz und der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen in Tabelle 23 zusammengefasst.

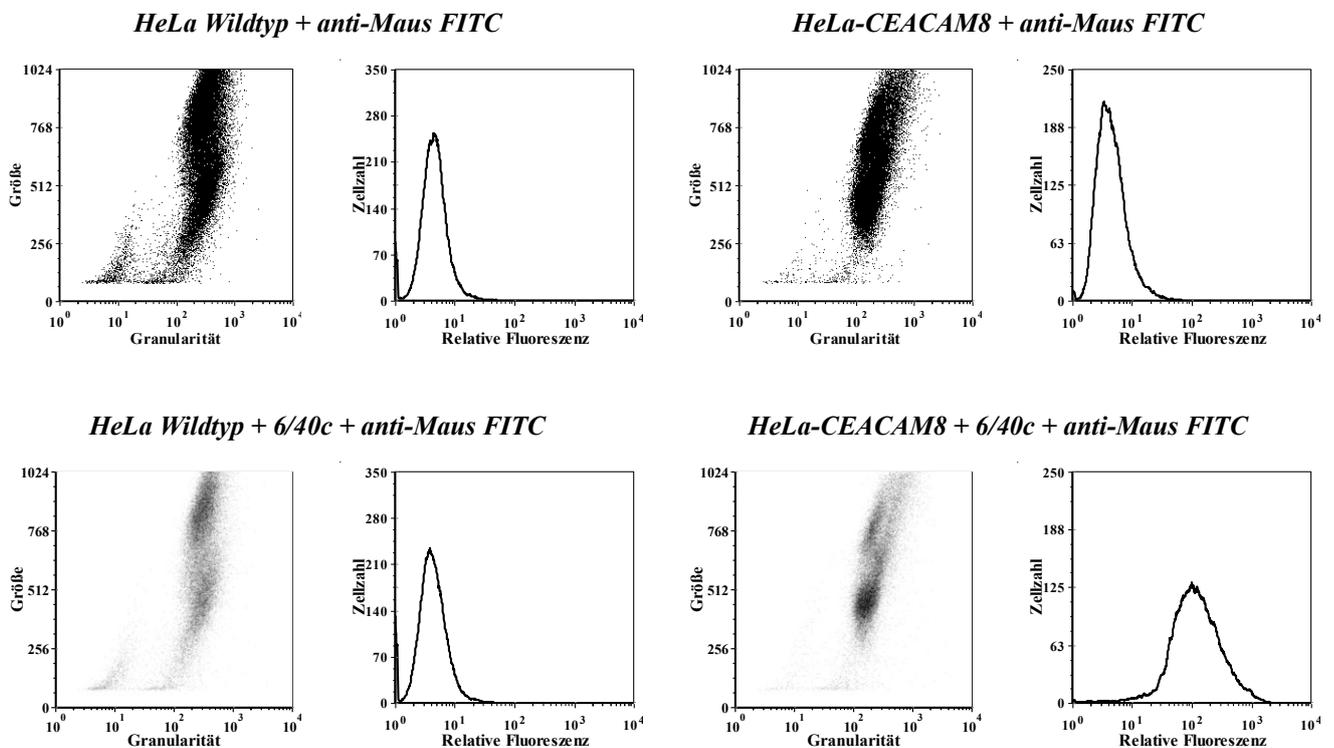


Abbildung 35: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 mit anti-Maus FITC und 6/40c + anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis der CEACAM8 Expression der Zellen.

Tabelle 22: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Relativen Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>Wildtyp</i>	6/40c + anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>CEACAM8</i>	6/40c + anti-Maus FITC	114 (100 %)

Die Ergebnisse der Bindung der Partikel in Abbildung 36 zeigen, dass ausreichend [SDB] Partikel, mit einem auswertbaren Signal nur in den Dot-Blots zu erkennen sind, bei denen die Zellen mit unbeladenen [SDB] Partikel inkubiert worden sind. Diese werden jedoch durch eine klare Signalwolke detektiert, die in den Histogrammen die entsprechende Eigenfluoreszenz zeigen. Die antikörperbeladenen [SDBBio6/40cFluo 2 μ g] bzw. [SDBBio6/40cFluo 20 μ g] Partikel werden dagegen nur vereinzelt in den Dot-Blots detektiert, weisen aber sehr hohe Fluoreszenzen auf, die bei Partikeln mit höheren Antikörperkonzentrationen entsprechend intensiver sind (Tabelle 23). Dies verdeutlicht noch einmal die erfolgreiche Beladung der Partikel mit Antikörpern.

Die mit unbeladenen [SDB] Partikeln inkubierten HeLa Wildtyp Zellen zeigen nur Eigenfluoreszenz mit einem Median von 5. Bei den mit antikörperbeladenen [SDBBio6/40cFluo 2 μ g] Partikeln inkubierten HeLa-Wildtyp Zellen lassen sich im Histogramm dagegen zwei Peaks zuordnen. Hier zeigen 89 % (Peak 1) der Zellen Eigenfluoreszenz und 11 % (Peak 2) der Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 58. In dem Histogramm der HeLa-Wildtyp Zellen, die mit antikörperbeladenen [SDBBio6/40cFluo 20 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, lassen sich sogar drei Peaks zuordnen. Mit 76 % (Peak 1) weist der Hauptteil der Zellen wieder Eigenfluoreszenz auf. Zusätzlich weisen 17 % (Peak 2) der Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 96 auf. 7 % (Peak 3) der Zellen weisen sogar einen erhöhten Median von 198 auf.

Die Ergebnisse der HeLa-CEACAM8 Zellen sind den der HeLa Wildtyp Zellen sehr ähnlich. Die mit unbeladenen [SDB] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM8 Zellen zeigen Eigenfluoreszenz. Bei den HeLa-CEACAM8 Zellen, die mit antikörperbeladenen [SDBBio6/40cFluo 2 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, können im Histogramm zwei Peaks zugeordnet werden. Hier zeigen 85 % (Peak 1) der Zellen Eigenfluoreszenz und 15 % (Peak 2) der Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 79. In dem Histogramm der HeLa-CEACAM8 Zellen, die mit antikörperbeladenen [SDBBio6/40cFluo 20 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, lassen sich drei Peaks zuordnen. Hierbei zeigen 48 % (Peak 1) der Zellen Eigenfluoreszenz, 25 % (Peak 2) der Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 131 und 27 % (Peak 3) der Zellen einen noch höheren Median von 302. Die antikörperbeladenen [SDBBio6/40cFluo] Partikel binden demnach unspezifisch an HeLa Wildtyp Zellen. Da die Ergebnisse der HeLa-CEACAM8 Zellen den Ergebnissen der HeLa Wildtyp Zellen sehr ähnlich sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch hier ein Teil der Partikel unspezifisch an die Zellen gebunden hat. Würde man hier das Ergebnis der unspezifisch markierten HeLa Wildtyp Zellen von 11 % bei der Inkubation mit [SDBBio6/40cFluo 2 μ g] Partikeln als Hintergrund subtrahieren, wären an 4 % der HeLa-CEACAM8 Zellen [SDBBio6/40cFluo 2 μ g] Partikel spezifisch gebunden. Entsprechend wären an 8 % - 20 % der HeLa-CEACAM8 Zellen [SDBBio6/40cFluo 20 μ g] Partikel spezifisch gebunden.

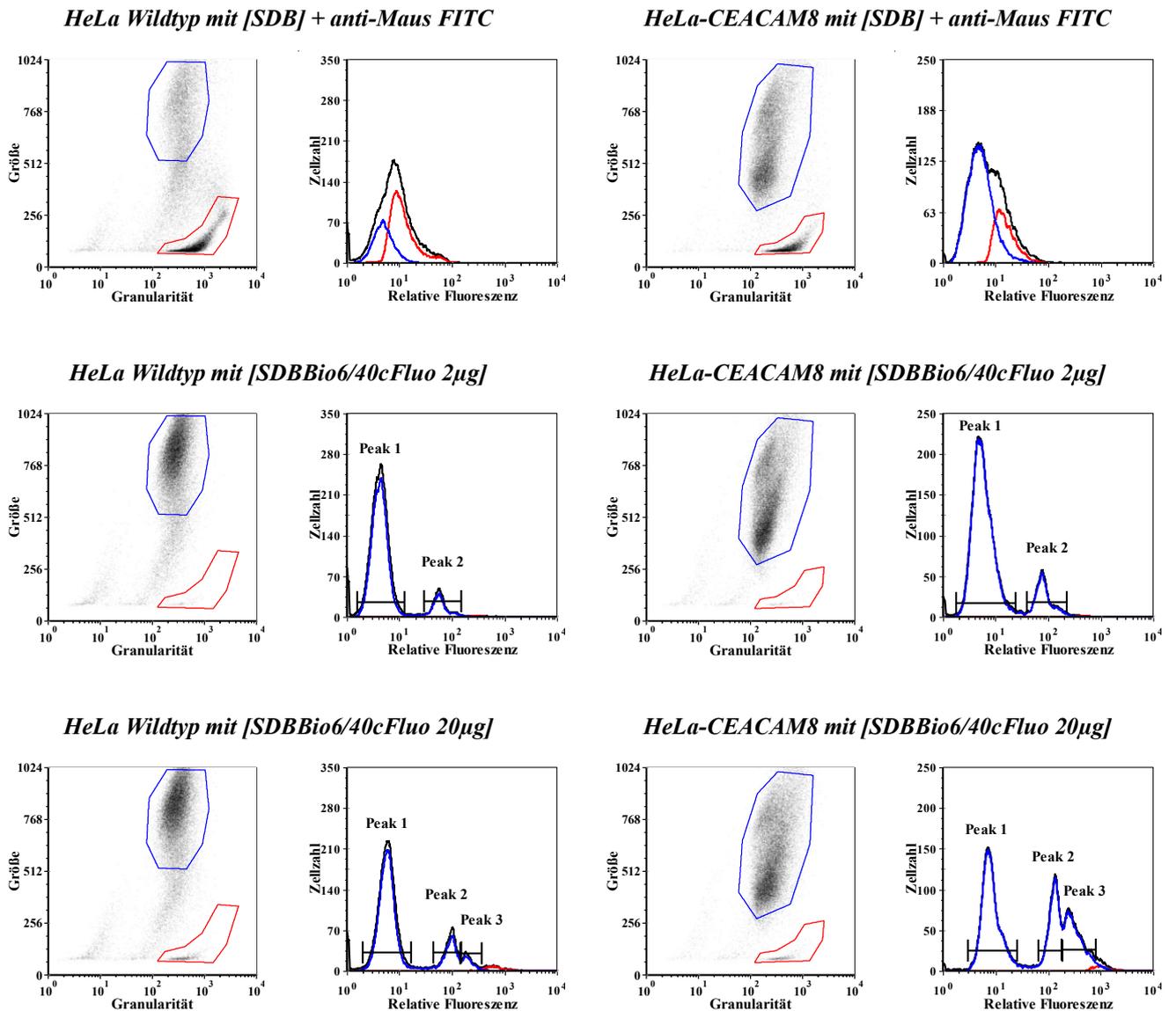


Abbildung 36: Dot-Plots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 mit [SDB], [SDBBio6/40cFluo 2µg] und [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikeln. (Rot: Partikel; Blau: Zellen).

Tabelle 23: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Partikel	Relative Fluoreszenz (Median)			
		der Partikel	der Zellen – Peak 1	der Zellen – Peak 2	der Zellen – Peak 3
HeLa Wildtyp	[SDB] + anti-Maus FITC	10	5 (100 %)	-	-
	[SDBBio6/40cFluo 2µg]	297	4 (89 %)	58 (11 %)	-
	[SDBBio6/40cFluo 20µg]	626	6 (76 %)	96 (17 %)	198 (7 %)
HeLa CEACAM8	[SDB] + anti-Maus FITC	14	6 (100 %)	-	-
	[SDBBio6/40cFluo 2µg]	453	5 (85 %)	79 (15 %)	-
	[SDBBio6/40cFluo 20µg]	973	8 (48 %)	131 (25 %)	302 (27 %)

Da die Oberfläche der [SDB] Partikel nicht speziell funktionalisiert ist, um Proteinablagerungen zu verhindern, ist es durchaus möglich, dass die unspezifische Bindung durch Wechselwirkungen mit Zellmembranproteinen hervorgerufen wird. Die unspezifische Bindung sollte jedoch schwächer sein als die Bindung über den jeweiligen Antikörper. Hier macht sich der fehlende Schritt der Trennung von partikelgebundene Zellen, freien Zellen und freien Partikeln bemerkbar, der wie beschrieben aufgrund des hohen Probenaufkommens weggelassen werden musste. Es hätte sonst immer nur eine einzelne Proben untersucht werden können, da bei zu langen Wartezeiten die Gefahr der Schädigung der Zellen bzw. der antikörperbeladenen Partikel bestanden hätte.

Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt, dass superparamagnetischem Eisenoxid Mikropartikel für die Zellmarkierung und weiterführende Bildgebungsverfahren nicht eingesetzt werden. Stattdessen werden entsprechende Nanopartikel, sogenannte SPIO's, mit Durchmessern um 50 nm verwendet.^[110,90] So zeigen Peldschus *et al.* eine vermeintliche Markierung von HT29 Zellen mit gegen CEACAM5 gerichteten SPIO Partikeln im Durchflusszytometer durch eine Erhöhung des Medians der relativen Fluoreszenz von ca. 5 (Eigenfluoreszenz) auf ca. 10. Allerdings fehlen in dieser Arbeit die Kontrollen mit entsprechenden Wildtyp Zellen, die kein CEACAM1 exprimieren.^[90] Die Experimente von Peldschus *et al.* zeigen jedoch, dass die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen, sowohl für gegen CEACAM1, als auch für gegen CEACAM8 gerichtete [SDB] Partikel sehr vielversprechend sind.

4.5.4. Untersuchung der [SDB-AK] Bindung an adhärenzte Zell-Monolayer

Um die antikörperbeladenen Partikel weiter zu untersuchen, werden Bindungsuntersuchungen an auf Deckgläschen gewachsenen Zellen durchgeführt, wie es in Abschnitt 3.6.2 beschrieben ist. Für die Untersuchungen werden HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Zellen mit den jeweiligen Partikelproben inkubiert. Als Kontrolle und um den Grad unspezifischer Bindung zu ermitteln, werden HeLa Wildtyp Zellen eingesetzt. Die Analyse erfolgt bei 200facher Vergrößerung an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM), indem die Fluoreszenz im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) detektiert wird. Parallel werden Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) durchgeführt.

4.5.4.1. [SDBBio18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen

In Abbildung 37 sind die CLSM Aufnahmen der Bindung von [SDB], [SDBBio18/20Fluo 2 μ g] und [SDBBio18/20Fluo 20 μ g] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen aufgeführt. Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM1 exprimieren, sind sie alleine mit dem sekundären Antikörper anti-Maus FITC als Negativkontrolle inkubiert worden. Als Positivkontrolle dient die Inkubation mit dem primären Antikörper 18/20 und dessen Detektion mit dem sekundären Antikörper.

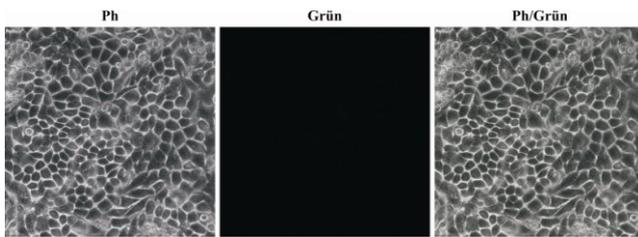
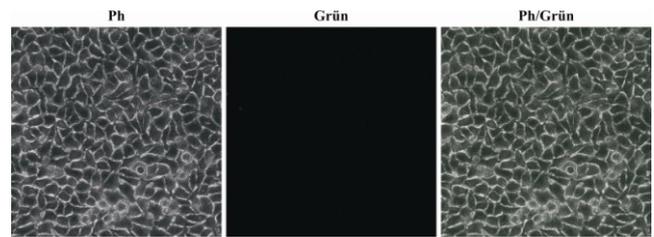
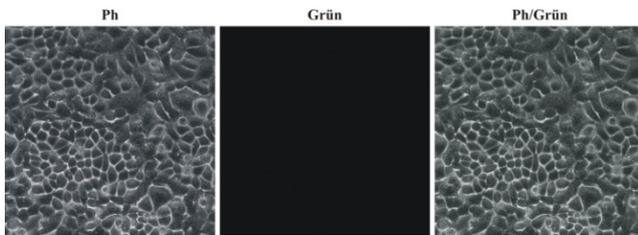
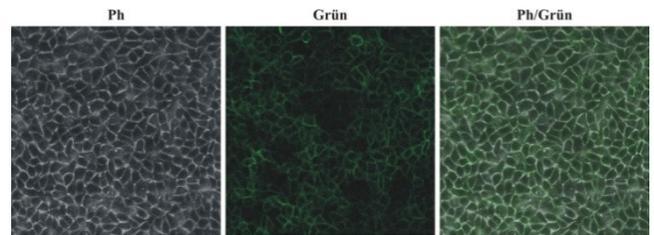
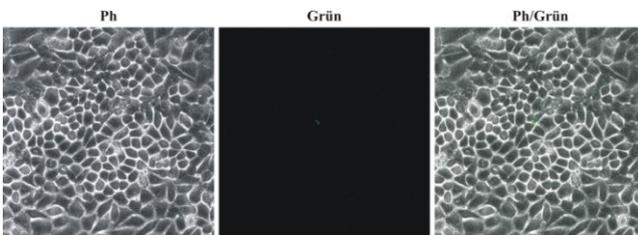
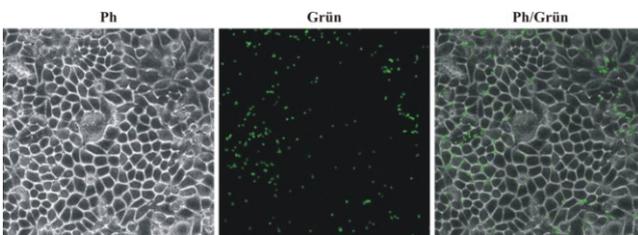
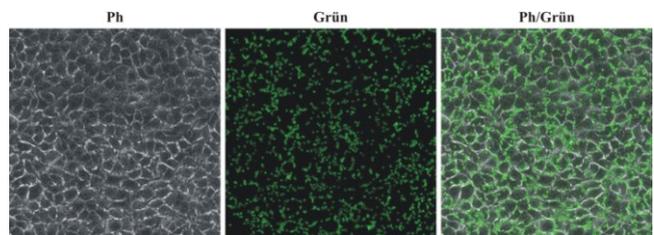
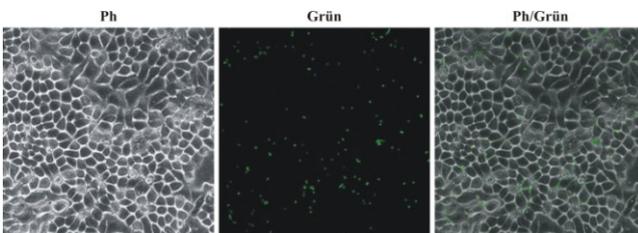
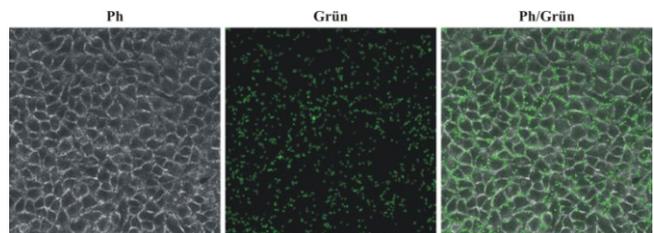
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC*HeLa-CEACAM1 + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp + 18/20 + anti-Maus FITC**HeLa-CEACAM1 + 18/20 + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp mit [SDB] + anti-Maus FITC**HeLa-CEACAM1 mit [SDB] + anti-Maus FITC**HeLa Wildtyp mit [SDBBio18/20Fluo 2µg]**HeLa-CEACAM1 mit [SDBBio18/20Fluo 2µg]**HeLa Wildtyp mit [SDBBio18/20Fluo 20µg]**HeLa-CEACAM1 mit [SDBBio18/20Fluo 20µg]*

Abbildung 37: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [SDB], [SDBBio18/20Fluo 2µg] und [SDBBio18/20Fluo 20µg] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Die Aufnahmen der Zellen, die mit dem 18/20 Antikörper inkubiert worden sind zeigen, dass bei den HeLa Wildtyp Zellen keine Fluoreszenz detektiert wird. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen ist dagegen eine deutliche Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell Kontakten erkennbar. Die Negativkontrolle ist bei

beiden erwartungsgemäß negativ. Dies zeigt, dass die Zellen CEACAM1⁺ sind und der Antikörper nur spezifisch an die CEACAM1 exprimierenden Zellen bindet. Demnach sollte bei einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Antikörpern eine vergleichbare Fluoreszenzfärbung auftreten. Bei den HeLa Wildtyp Zellen, die mit antikörperfreien [SDB] Partikeln inkubiert worden sind, sind vereinzelt Partikel in der Phasenkontrastaufnahme zu erkennen.

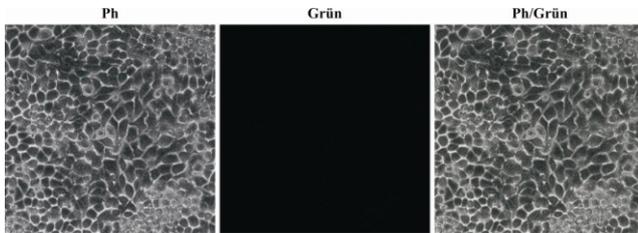
In den Aufnahmen der HeLa Wildtyp Zellen, die mit [SDBBio18/20Fluo 2µg] und [SDBBio18/20Fluo 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, sind dagegen deutlich mehr Partikel in den Phasenkontrastaufnahmen sichtbar. Diese werden zudem, aufgrund des fluoreszenzmarkierten Antikörpers, sehr gut in den Fluoreszenzaufnahmen detektiert. Anhand der Überlagerung dieser Aufnahmen (Ph/Grün) ist außerdem erkennbar, dass die Partikel vorwiegend an Zell-Zell Kontaktstellen lokalisiert sind. Vereinzelt antikörperfreie [SDB] Partikel sind ebenfalls in der Phasenkontrastaufnahme der HeLa-CEACAM1 Zellen zu erkennen. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen, die mit [SDBBio18/20Fluo 2µg] und [SDBBio18/20Fluo 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, sind die Partikel sowohl in den Phasenkontrastaufnahmen als auch in den Fluoreszenzaufnahmen sehr gut zu erkennen. Zusätzlich zeigt die Überlagerung der beiden Aufnahmen (Ph/Grün), dass die Partikel hauptsächlich an den Zell-Zell Kontakten lokalisiert sind. Da die jeweiligen Aufnahmen dieser beiden Proben nahezu identisch sind, hat die eingesetzte Bio18/20Fluo Antikörperkonzentration der Partikelbeladung keinen Einfluss auf die detektierte Partikelmenge. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein gewisser Grad an unspezifischer Bindung der antikörperbeladenen [SDB] Partikel an HeLa Wildtyp Zellen vorliegt. Im Vergleich der HeLa Wildtyp und der HeLa-CEACAM1 Aufnahmen, ist jedoch ein signifikanter Unterschied in der detektierbaren Zahl der Partikel zu erkennen, da bei den HeLa-CEACAM1 Zellen deutlich mehr Partikel sichtbar sind. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchungen. Zudem zeigen die Aufnahmen der HeLa-CEACAM1 Zellen, dass die bei der Beladung eingesetzte Antikörperkonzentration keinen Einfluss auf die Bindungseffizienz hat. Sowohl bei den mit [SDBBio18/20Fluo 2µg] als auch mit [SDBBio18/20Fluo 20µg] Partikeln inkubierten Zellen, sind keine signifikanten Unterschiede in der detektierten Partikelzahl zu erkennen. Auch dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den zuvor in durchflusszytometrischen Analysen erhaltenen Ergebnissen.

4.5.4.2. [SDBBio6/40cFluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen

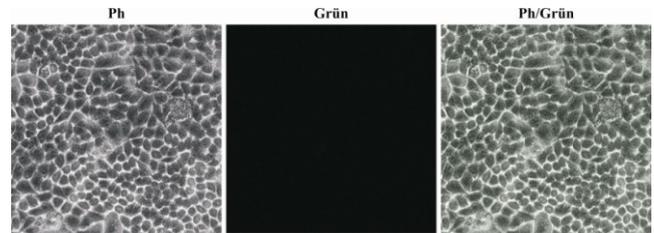
Die Ergebnisse der Bindung von [SDB], [SDBBio6/40cFluo 2µg] und [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen sind in Abbildung 38 dargestellt. Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM8 exprimieren, sind sie alleine mit dem sekundären

Antikörper anti-Maus FITC als Negativkontrolle inkubiert worden. Als Positivkontrolle dient die Inkubation mit dem primären Antikörper 6/40c und dessen Detektion mit dem sekundären Antikörper.

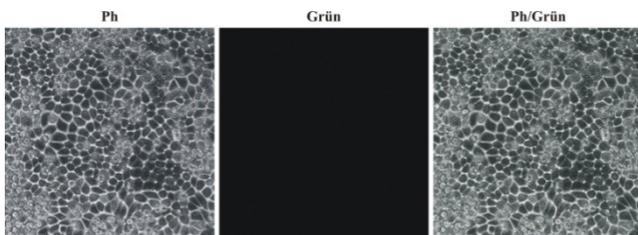
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC



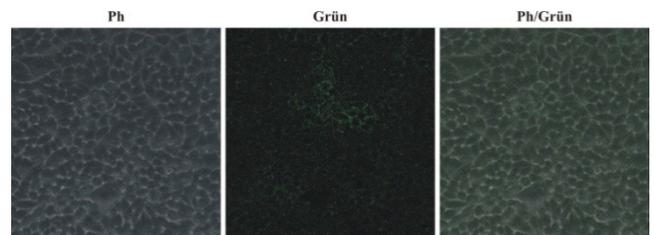
HeLa-CEACAM8 + anti-Maus FITC



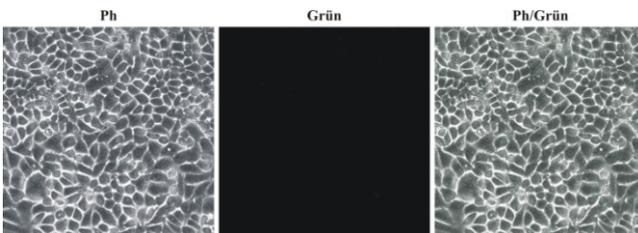
HeLa Wildtyp + 6/40c + anti-Maus FITC



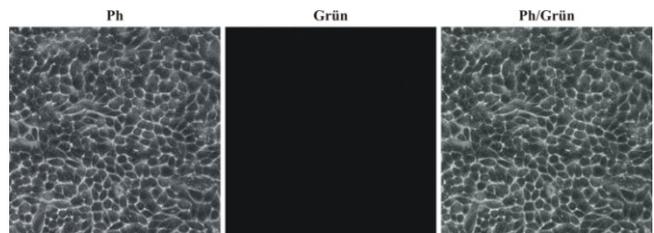
HeLa-CEACAM8 + 6/40c + anti-Maus FITC



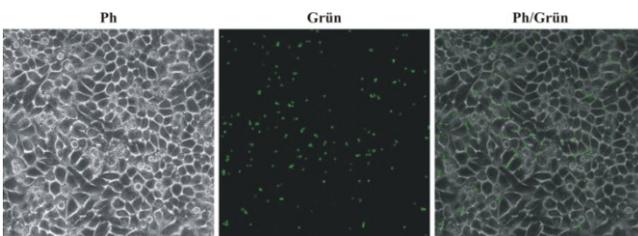
HeLa Wildtyp mit [SDB] + anti-Maus FITC



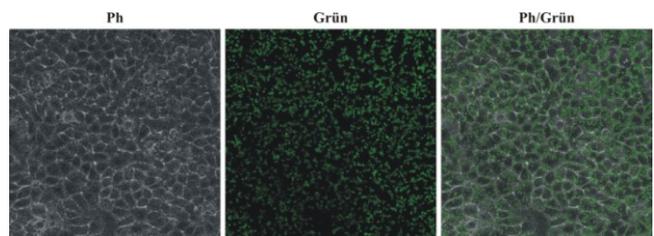
HeLa-CEACAM8 mit [SDB] + anti-Maus FITC



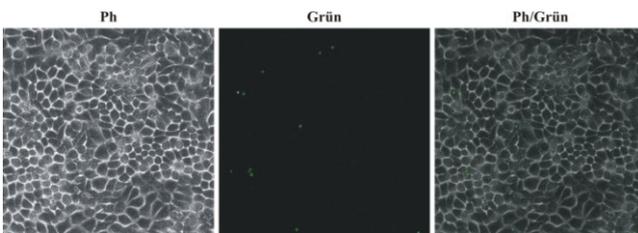
HeLa Wildtyp mit [SDBBio6/40cFluo 2µg]



HeLa-CEACAM8 mit [SDBBio6/40cFluo 2µg]



HeLa Wildtyp mit [SDBBio6/40cFluo 20µg]



HeLa-CEACAM8 mit [SDBBio6/40cFluo 20µg]

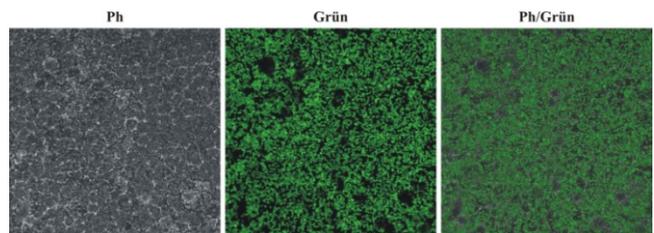


Abbildung 38: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Inkubation mit [SDB], [SDBBio6/40cFluo 2µg] und [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Die mit dem 6/40c Antikörper inkubierten HeLa-Wildtyp Zellen zeigen in den CLSM Aufnahmen keine Fluoreszenz. Bei den HeLa-CEACAM8 Zellen ist dagegen Fluoreszenzfärbung sowohl an den Zell-Zell Kontakten als auch auf den Zellen selbst detektierbar. Die Negativkontrolle ist bei beiden negativ. Dies zeigt, dass die Zellen CEACAM8⁺ sind und der Antikörper nur spezifisch an die CEACAM8 exprimierenden Zellen bindet. Zudem wird deutlich, dass CEACAM8 auch vermehrt apikal expremiert wird. Bei einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Antikörpern sollte eine vergleichbare Fluoreszenzfärbung auftreten.

In der Phasenkontrastaufnahme der HeLa Wildtyp Zellen, die mit antikörperfreien [SDB] Partikeln inkubiert worden sind, sind diese vereinzelt zu erkennen. In den Aufnahmen der HeLa Wildtyp Zellen, welche mit [SDBBio6/40cFluo 2µg] und [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, sind die Partikel in den Phasenkontrastaufnahmen und aufgrund des fluoreszenzmarkierten Antikörpers in den Fluoreszenzaufnahmen nachweisbar. Hierbei werden die meisten Partikel in der Kontrolle mit den [SDBBio6/40cFluo 2µg] Partikeln auf den Zellen detektiert. Aber auch die Probe mit den [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikeln weist deutlich mehr Partikel auf als die Probe mit den antikörperfreien [SDB] Partikeln. Die Überlagerung der Aufnahmen (Ph/Grün) zeigt zudem, dass die Partikel vorwiegend an Zell-Zell Kontakten der HeLa Wildtyp Zellen lokalisiert sind. Auch in der Phasenkontrastaufnahme der HeLa-CEACAM8 Zellen sind vereinzelte antikörperfreie [SDB] Partikel zu erkennen. Bei den HeLa-CEACAM8 Zellen, die mit [SDBBio6/40cFluo 2µg] und [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, sind die Partikel sowohl in den Phasenkontrastaufnahmen als auch in den Fluoreszenzaufnahmen sehr gut nachweisbar. Hierbei zeigen die [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikel eine höhere Fluoreszenzintensität als die [SDBBio6/40cFluo 2µg] Partikel und auch die Anzahl der Partikel auf den Zellen ist höher, so dass die eingesetzte Bio6/40cFluo Antikörperkonzentration zur Partikelbeladung einen Einfluss auf die detektierte Partikelmenge hat. Die detektierten antikörperbeladenen Partikel sind hauptsächlich an den Zell-Zell Kontakten, wie die Überlagerung der beiden Aufnahmen (Ph/Grün) verdeutlicht, lokalisiert. Allerdings ist auch deutlich zu erkennen, dass ein Teil der Partikel auf den Zellen verteilt ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein gewisser Grad an unspezifischer Bindung der antikörperbeladenen [SDB] Partikel an HeLa Wildtyp Zellen vorliegt. Im Vergleich der HeLa Wildtyp und der HeLa-CEACAM8 Aufnahmen, ist aber ein deutlich signifikanter Unterschied in der detektierbaren Zahl der Partikel zu erkennen. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchungen. Zudem lässt sich ein Einfluss der zur Beladung eingesetzten Antikörperkonzentration feststellen, da eine signifikante Erhöhung der Partikelzahl bei höherer Antikörperkonzentration festgestellt werden kann. So haben die [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikel gegenüber den [SDBBio6/40cFluo 2µg] Partikeln eine bessere Bindungseffizienz. Auch dieses

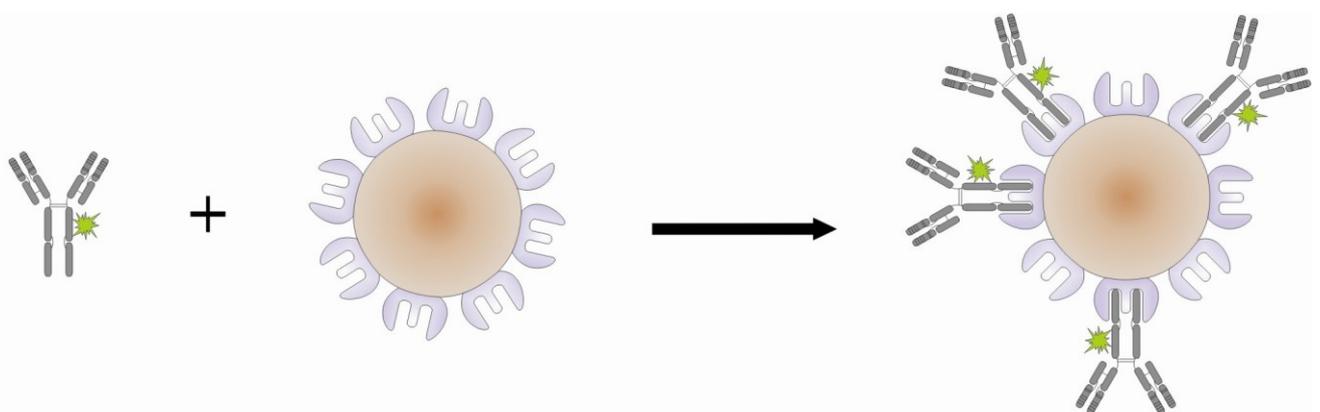
Ergebnis korreliert sehr gut mit den zuvor in durchflusszytometrischen Analysen erhaltenen Ergebnissen.

Da die Oberfläche der [SDB] Partikel nicht speziell funktionalisiert ist, um Proteinablagerungen zu verhindern, ist es durchaus möglich, dass die hier auftretende unspezifische Bindung bei sowohl gegen CEACAM1 als auch gegen CEACAM8 gerichteten [SDB] Partikeln durch Wechselwirkungen mit Zellmembranproteinen hervorgerufen wird. Diese unspezifische Bindung sollte jedoch schwächer sein als die Bindung über den jeweiligen Antikörper, so dass womöglich ein noch intensiveres Waschen der Zellen nach der Partikelinkubation zu verbesserten Ergebnissen führen könnte. Auch in der Literatur ist gezeigt, dass unspezifische Bindung auftritt. Allerdings zeigen Peldschus *et al.* dies nur für die Isotypenkontrolle ihrer SPIO Partikel, eine Kontrolle mit Wildtyp Zellen fehlt hier.^[90] Bei dieser Arbeit würde, wie bereits erwähnt, zunächst bewusst auf die Isotypenkontrollen mit CEACAM8-bindenden Partikeln an HeLa-CEACAM1 Zellen bzw. mit CEACAM1-bindenden Partikeln an HeLa-CEACAM8 Zellen verzichtet. Vorrangiges Ziel war es zuerst geeignete antikörperbeladene Partikel zu finden, welche spezifisch an die jeweiligen Zellen binden, bevor eine weitergehende Analyse der Partikel erfolgen sollte.

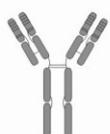
Die mit den [SDB] Partikeln erzielten Ergebnisse zeigen eine Bindung sowohl an CEACAM1 als auch an CEACAM8 exprimierende Zellen und sind damit äußerst vielversprechend, um Erkenntnisse zur Bearbeitung der Fragestellungen zu erhalten und auf andere Partikel übertragen zu können. Zudem zeigen die antikörperbeladenen [SDB-AK] Partikel vergleichbare Bindungseigenschaften an konfluenten Zellen wie die [CD31 MicroBead] Partikel. Gegenüber den [TS-AK] Partikeln sind diese sogar wesentlich besser. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sind schwer einzuordnen, da bei den Ergebnissen der [SDB-AK] Partikel eine große Zahl unmarkierter Zellen mit detektiert wird. Dies ist bei den Ergebnissen mit den [CD31 MicroBead] Partikel nicht der Fall. Dafür zeigen die Zellen, an welche [SDB-AK] Partikel gebunden sind, eine deutlich stärkere Erhöhung der Fluoreszenzintensität als die Zellen, an die [CD31 MicroBead] Partikel gebunden sind. Allerdings zeigt sich, dass die [SDB-AK] Partikel zu einem gewissen Grad unspezifisch an Wildtyp Zellen binden und dass eine Verwendung im ELISA aufgrund ihrer Masse nicht möglich ist. Diese hohe Masse hat auch zu Problemen bei ersten Bindungsuntersuchungen unter Flußbedingungen geführt (Daten nicht gezeigt). Auch die Vorteile der magnetischen Aufreinigung sind nur bei der Beladung der Partikel mit Antikörper zum Tragen gekommen, da die Aufreinigung für die durchflusszytometrischen Analysen aufgrund des hohen Probenaufkommens nicht praktikabel gewesen ist. Parallel zu den Untersuchungen mit den [SDB] Partikeln sind die identischen Experimente an Siliziumoxidpartikeln mit eingeschlossenem superparamagnetischem Eisenoxid der Firma Carl Roth [RPGb] durchgeführt worden, da diese Partikel in der Arbeitsgruppe vorhanden gewesen sind.

4.6. Herstellung antikörperbeladener [RPGb] Partikel

Aufgrund ihrer Beschaffenheit sind die [RPGb] Partikel vergleichbar mit [SDB] Partikeln, da auch die [RPGb] Partikel eine hohe Stabilität aufweisen und bei Aufreinigungsschritten durch die magnetischen Eigenschaften einfach zu handhaben sind. Allerdings handelt es sich auch bei diesen Partikeln um kein Kontrastmittel für Ultraschallanwendungen oder andere Bildgebungstechniken, sondern um Partikel, die für die Isolierung von Immunoglobulinen, für Immunpräzipitation oder Protein-Protein Interaktionsassays entwickelt worden sind (Herstellerangabe). Aufgrund ihrer superparamagnetischen Eigenschaften wäre eine Anwendung in Magnetresonanz-Experimenten vorstellbar, um weitere Erkenntnisse in den Abläufen der Zellbindung CEACAM1-gerichteter Partikel zu erhalten. Die Unterschiede gegenüber den [SDB] Partikeln bestehen darin, dass das Eisenoxid bei den [RPGb] Partikeln in einer Matrix aus Siliziumoxid und nicht Polystyrol eingeschlossen ist und die [RPGb] Partikel mit einem mittleren Durchmesser von ca. 1 μm nur etwa halb so groß sind wie die [SDB] Partikel. Hierdurch werden sich Vorteile zum Beispiel für die ELISA Experimente erhofft. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den [RPGb] Partikeln und den [SDB] Partikeln besteht zusätzlich in ihren Oberflächenmodifikationen. Gegenüber den [SDB] Partikeln sind die [RPGb] Partikel mit Protein G modifiziert, wodurch die Antikörper über ihr Fc-Fragment so immobilisiert werden können, dass die F(ab)₂-Fragmente des Antikörpers in die Peripherie ausgerichtet sind. Hierdurch sollte eine optimale Bindungskapazität gewährleistet sein. Allerdings ist die Bindung zwischen Antikörper und Protein G ($K_a \approx 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)^[83] im Vergleich zu der Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ($K_a \approx 1.8 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$)^[111] wesentlich schwächer. Aus diesem Grund wird der Antikörper nach der Beladung der [RPGb] Partikel mit dem Protein G über einen homobifunktionellen Crosslinker quervernetzt.



Legende:



Antikörper



Protein G



Fluorescein

Abbildung 39: Schematische Darstellung der Herstellung antikörperbeladener [RPGb] Partikel.

Inwiefern diese Quervernetzung erfolgreich gewesen ist, wird in dieser Arbeit nicht erörtert, sondern es wird davon ausgegangen, dass diese Vernetzung nicht bei 100 % liegen wird.^[112] Mit Hilfe dieser [RPGB] Partikeln sollen weiterführende Erkenntnisse gesammelt werden, um im späteren Vergleich der unterschiedlichen Partikeleigenschaften diese Eigenschaften herausarbeiten zu können, welche für eine optimale Bindung an CEACAM1 exprimierenden Zellen essentiell sind. In Abbildung 39 ist die Beladung der [RPGB] Partikel mit Antikörper schematisch dargestellt. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, werden die Partikel mit unterschiedlichen Konzentrationen an Antikörper inkubiert. Da sich die [RPGB] Partikel magnetisch pelletieren lassen, werden die Überstände der Reaktionslösungen und der Waschfraktionen mittels Western-Blot analysiert, um die Bindung des Antikörpers an die [RPGB] Partikel indirekt nachweisen zu können. Ein direkter Nachweis der Partikel im Western-Blot ist nicht möglich, da die Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 μm zu groß für die Poren der Polyacrylamidgele sind und in den Geltaschen verbleiben. Die Partikelsuspensionen werden nach der Antikörperbindung zunächst im Durchflusszytometer analysiert, um die Beladung mit Antikörper zu bestimmen. Anschließend werden Bindungsuntersuchungen mittels ELISA, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

4.6.1. Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [RPGB] Partikeln

Die gesammelten Überstände der Reaktionslösungen und die Waschfraktionen werden mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 40), wie es in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist. Zur Detektion des ungebundenen Antikörpers wird der polyklonale Ziege anti-Maus IgG^{H+L}(HRP) Antikörper verwendet.

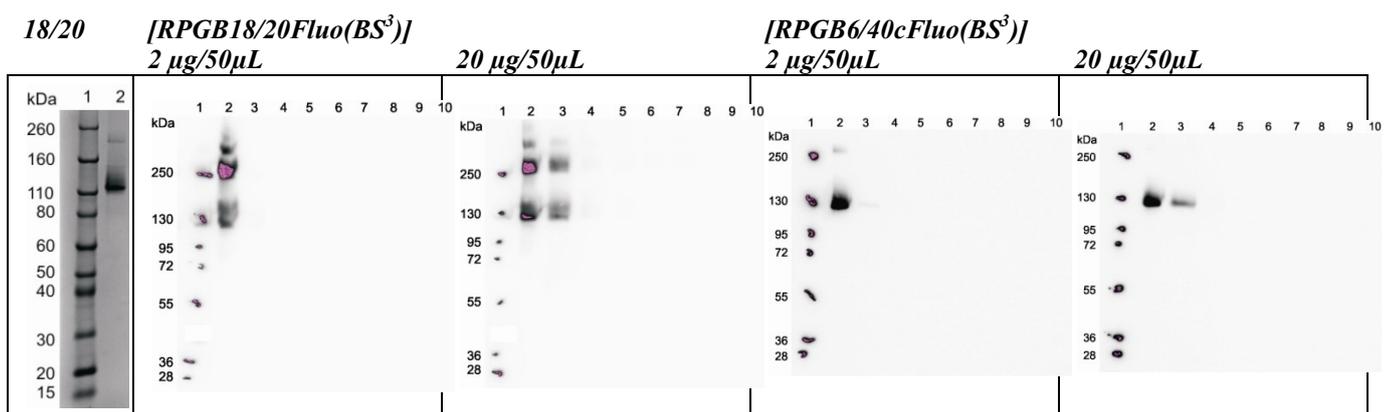


Abbildung 40: Kontrollgel des 18/20 Antikörpers (links) mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Novex[®] Sharp Standard; 2: 18/20. Western-Blot Analyse der Antikörperkopplung an [RPGB] Partikel mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Prestained Protein Ladder #SM1811; 2: Antikörper zur Kontrolle; 3: Überstand der Partikel Antikörper Kopplung; 4-6: Waschfraktion 1-3 der Partikel Antikörper Kopplung; 7: Überstand der Quervernetzung der antikörperbeladenen Partikel mit BS³; 8-10: Waschfraktion 1-3 der Quervernetzung der antikörperbeladenen Partikel mit BS³.

In Reihe 2 ist der 18/20Fluo bzw. 6/40cFluo Antikörper als Kontrolle geladen. Diese zeigen jeweils eine Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers in der Höhe des Markers von ca. 130 kDa. Der 18/20Fluo Antikörper zeigt zusätzlich eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 250 kDa und eine schwache Bande darüber. Dies ist ungewöhnlich, da aufgrund der molekularen Masse eines IgG von ca. 150 kDa nur eine Bande bei ca. 150 kDa zu erwarten wäre. Durch die Modifikation mit dem sehr kleinen Fluoresceinmolekül ($M_w \sim 375$ g/Mol) und Biotinmolekül ($M_w \sim 356$ g/Mol) würde sich diese Bande weder verschieben noch würde hierdurch eine zweite Bande auftreten, die einer entsprechend höheren Proteinmasse zugeordnet werden könnte. Aus diesem Grund ist zusätzlich ein Gel in Abbildung 40 aufgeführt, bei welchem der unreduzierte monomere 18/20 Antikörper geladen ist. Dieses Gel zeigt ein den Western-Blots entsprechendes Bandenmuster. Es ist eine intensive Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers oberhalb der Markerbande von 110 kDa zu erkennen. Dies zeigt, dass die Banden der Markerproteine in den in dieser Arbeit verwendeten Gelen nicht auf der Höhe ihres eigentlichen Molekulargewichts auftreten. Dies liegt daran, dass die Hersteller der Standardmarker die Bandenhöhen auf Gelen ermitteln, die sich von den Gelen in den Laboren der Nutzer unterscheiden können. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Laufverhalten der Proteine. Des Weiteren ist in dem Gel eine Bande zwischen den Markerbanden von 160 kDa und 260 kDa zu erkennen, welche sich ungefähr auf der Höhe des doppelten Molekulargewichts der intensiven Bande befindet. Daher könnte es sich hierbei um Antikörper handeln, welcher nach der Denaturierung durch SDS, welches im Probenpuffer enthalten ist, dimerisiert. Es könnte aber auch sein, dass diese Bande durch unvollständig denaturierten Antikörper hervorgerufen wird. Dieser hat kein konstantes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und wird im Gel nicht entsprechend getrennt. Eine genauere Analyse dieser Bande ist nicht durchgeführt worden.

In den Western-Blots (Abbildung 40) der Proben, bei denen $2 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 18/20Fluo bzw. 6/40cFluo Antikörper zur Beladung eingesetzt worden sind, werden in den Reihen 3 (Überstand) und 4 – 6 (Waschfraktionen) keine Banden detektiert, so dass eine vollständige Bindung der Antikörper stattfindet. Auch nach der Quervernetzung mit dem Crosslinker BS³ wird kein Antikörper in den entsprechenden Fraktionen (Reihen 7-10) detektiert. In den Western-Blots der Probe, bei der $20 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 18/20Fluo Antikörper zur Beladung eingesetzt worden sind, wird in Reihe 3 (Überstand) eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 130 kDa detektiert, welche dem unreduzierten monomeren Antikörper zugeordnet werden kann. Zudem werden die weiteren Banden wie sie beim geladenen Kontrollantikörper zu sehen sind detektiert. In den Reihen 4 – 6 (Waschfraktionen) werden keine Banden detektiert und auch nach der Quervernetzung mit dem Crosslinker BS³ wird kein Antikörper in den entsprechenden Fraktionen (Reihen 7-10) detektiert. Somit liegt hier eine klare Sättigung der Bindungsstellen durch den Antikörper an den Partikeln vor. In den Western-Blots der Probe, bei der

20 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 6/40cFluo Antikörper zur Beladung eingesetzt worden sind, wird in Reihe 3 (Überstand) eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 130 kDa detektiert, welche dem unreduzierten monomeren Antikörper zugeordnet werden kann. In den Reihen 4 – 6 (Waschfraktionen) werden keine Banden detektiert und auch nach der Quervernetzung mit dem Crosslinker BS^3 wird kein Antikörper in den entsprechenden Fraktionen (Reihen 7-10) detektiert. Somit liegt hier eine klare Sättigung der Bindungsstellen durch den Antikörper an den Partikeln vor.

Die Ergebnisse der weitergehenden durchflusszytometrischen Analysen dieser Partikel, wie sie in Abschnitt 3.5.1.2 beschrieben sind, sind in der Abbildung 41 in Form von Dot-Blots und Histogrammen aufgeführt.

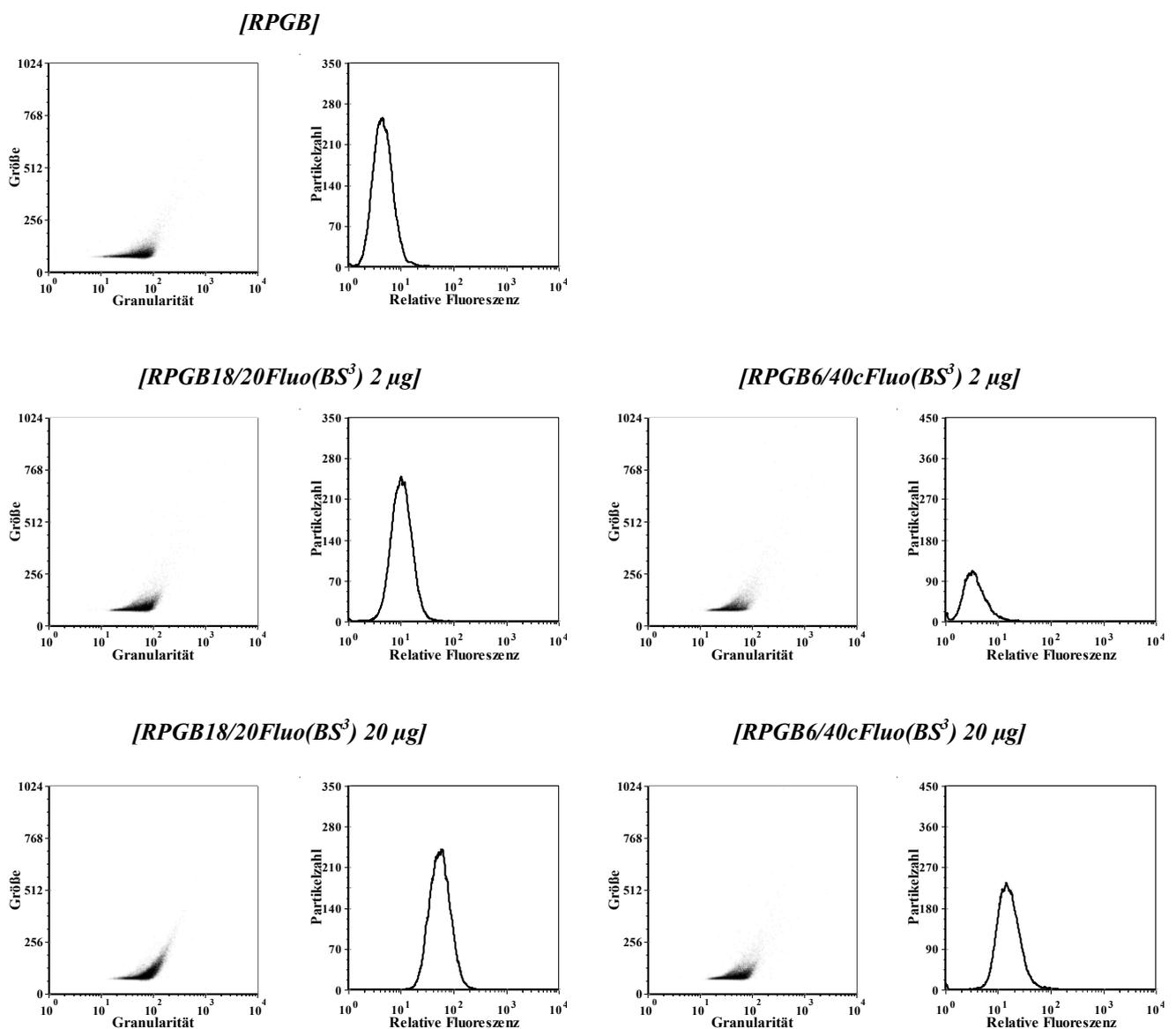


Abbildung 41: Analyse der [RPGB] Partikel nach der Beladung mit Antikörpern im Durchflusszytometer.

In den Dot-Blots ist die Größe gegen die Granularität und in den Histogrammen ist die Partikelzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz mit einem Fluorochrom. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der unbeladenen Partikel die Stärke der Eigenfluoreszenz wieder, welche als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt wird. Die Dot-Blots zeigen, dass die antikörperbeladenen [RPGB] Partikel sehr gut im Durchflusszytometer detektierbar sind und eine sehr gleichmäßige Beschaffenheit und Größe aufweisen. Als Negativkontrolle dienen die freien Partikel ohne Antikörperbeladung, die eine relative Fluoreszenz mit einem Median von 4 (Tabelle 24) aufweisen.

Tabelle 24: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen der Partikel.

<i>Partikel</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Partikel</i>
[RPGB]	4
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 2 µg]	10
[RPGB18/20Fluo(BS ³) 20 µg]	55
[RPGB6/40cFluo(BS ³) 2 µg]	3
[RPGB6/40cFluo(BS ³) 20 µg]	15

Die Ergebnisse der antikörperbeladenen Partikel zeigen jedoch, dass nur bei den [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikeln eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf einen Median von 55 gegenüber der Negativkontrolle gegeben ist. Die mit geringer Antikörperkonzentration beladenen [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] Partikel zeigen nur eine geringe Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf einen Median von 10. Bei den gegen CEACAM8 gerichteten Partikeln zeigen nur die [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikel eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf einen Median von ca. 15. Das Ergebnis der [RPGB6/40cFluo(BS³) 2 µg] Partikel ist negativ (Tabelle 24). Diese Ergebnisse sind aufgrund der Western-Blot Analysen unerwartet, da laut den hier gewonnenen Ergebnissen alle Partikel mit Antikörpern beladen sein sollten. Die Ergebnisse der relativen Fluoreszenz liegen jedoch in der vergleichbaren Größenordnung wie die Ergebnisse, welche bei den [TS] Partikeln, mit Medianen von 12 bei [TSBio18/20Fluo 2 µg] und 41 bei [TSBio18/20Fluo 20 µg], ermittelt worden sind. Zudem stimmen die hier erhaltenen Ergebnisse mit denen von Peldschus *et al.* für antikörperbeladene SPIO Partikel gut überein, da dort Mediane der relativen Fluoreszenz von ca. 10 für die beladenen Partikel angegeben sind.^[90] Im Vergleich mit den Ergebnissen, welche die antikörperbeladenen [SDB] Partikel mit Medianen der relativen Fluoreszenz von weit über 100 zeigen, sind die Mediane der relativen Fluoreszenz der [RPGB] Partikel doch sehr gering. Auch gegenüber den Ergebnissen von Lindner *et al.*, wo antikörperbeladenen Mikrobläschen im Durchflusszytometer

analysiert worden sind, zeigen die [RPGB] Partikel geringere Fluoreszenz und somit eine geringere Beladungseffizienz.^[101]

4.6.2. Bindungsanalyse von [RPGB-AK] Partikel an Antigen mittels ELISA

Mittels Sandwich-ELISA, wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, wird analysiert, ob die antikörperbeladenen [RPGB] Partikel das jeweilige Antigen aus einer Proteinlösung binden. Als Proteinlösungen mit unbekannter Antigenkonzentration dienen verdünnte HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Lysate. Die Verdünnungsfaktoren der Lysate sind mittels Verdünnungsreihe im Vorfeld ermittelt worden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Als Positivkontrolle dienen die unmodifizierten Antikörper. Als Negativkontrolle dienen die unbeladenen Partikel. Die aus der Dreifachbestimmung erhaltenen Ergebnisse sind in Balkendiagrammen dargestellt, bei denen die Absorptionen bei 450 nm gegen die jeweiligen Partikelproben aufgetragen sind. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse des ELISAs mit den antikörperbeladenen [RPGB] Partikeln aufgeführt. Bei den gegen CEACAM1 gerichteten Partikeln weist die Positivkontrolle eine Absorption von $0,257 \pm 0,013$ auf. Die unbeladenen [RPGB] Partikel als Negativkontrolle liefern einen Absorptionswert von $0,015 \pm 0,017$. Die [RPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikel zeigen eine Absorption von $0,019 \pm 0,018$ und die [RPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikel von $0 \pm 0,006$. Da diese Werte aufgrund der Standardabweichungen keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle aufweisen, kann eine Bindung des Antigens ausgeschlossen werden.

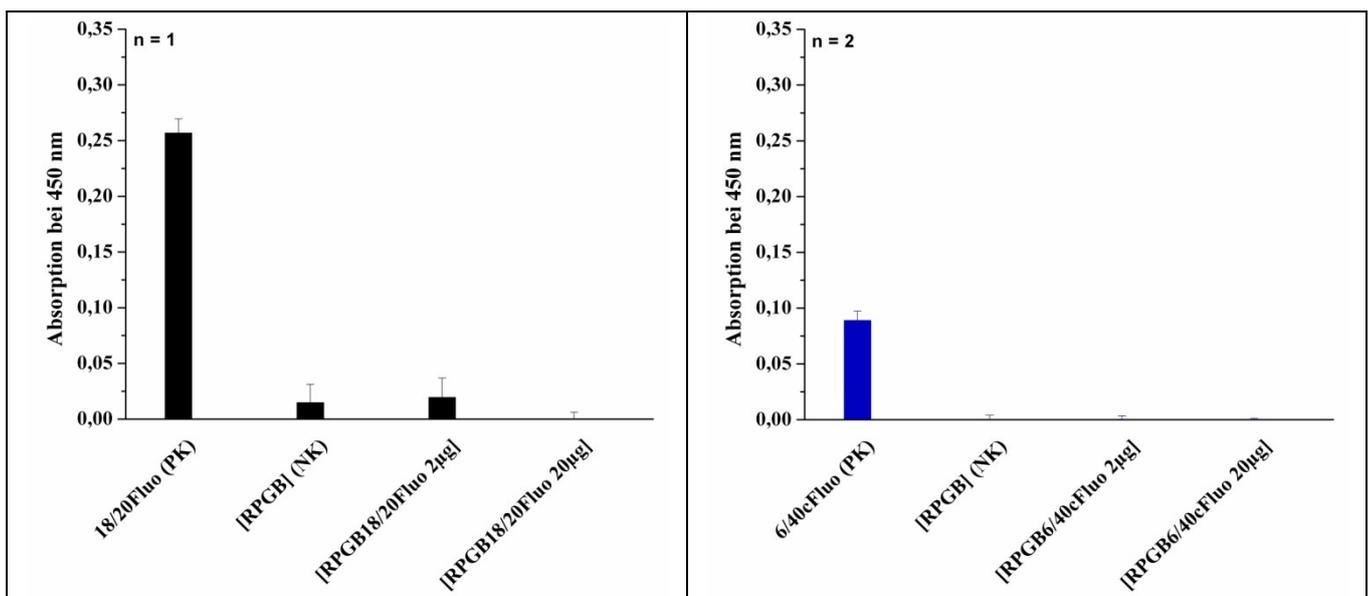


Abbildung 42: Bindung des Antigens durch antikörperbeladene [RPGB] Partikel aus HeLa-CEACAM1 Lysat (schwarz) und HeLa-CEACAM8 Lysat (blau) (PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle).

Bei den [RPGb6/40cFluo] Partikeln zeigen weder die Negativkontrolle noch die beiden Proben eine Absorption, der freie Antikörper als Positivkontrolle dagegen eine Absorption von $0,089 \pm 0,009$. Somit wird auch hier kein Antigen gebunden. Demnach binden sowohl die mit 18/20Fluo Antikörper als auch die mit 6/40cFluo Antikörper beladenen Partikel nicht im ELISA, welcher somit nicht geeignet ist, um bei diesen Partikeln die Antigenbindung zu analysieren. Dadurch ist es ebenfalls nicht möglich, Erkenntnisse über die Eignung der Partikel zur Bindung des jeweiligen Antigens aus einem Zelllysate zu erhalten. Die Erklärung für diesen negativen Verlauf ist schon bei der Durchführung der Experimente zu beobachten. Hier zeigt sich, dass die Partikel aufgrund ihrer Masse auf dem Plattenboden der *wells* absinken und zum Teil durch die Waschschriffe vollständig gewegewaschen werden. In diesen *wells* kann kein Signal mehr detektiert werden. Auch in der Literatur ist nur ein erfolgreicher Bindungsnachweis von antikörperbeladenen Nanopartikeln zu finden.^[90] Anstelle des Nachweises der Antigenbindung mittels ELISA wäre es möglich, den Nachweis in weiteren Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie zu erbringen.^[109] Hierfür müsste der Detektionsantikörper gegen eine andere Domäne von CEACAM1 bzw. CEACAM8 gerichtet sein als der an den Partikeln gebundene Antikörper, der die N-Domäne erkennt. Zudem müssten der Detektionsantikörper und der partikelgebundene Antikörper mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert sein, um die Partikel und die Bindung des Antigens getrennt voneinander nachweisen zu können.

4.6.3. Untersuchung der [RPGb-AK] Interaktion an Zellen in Suspension

Die Bindungseigenschaften der antikörperbeladenen [RPGb] Partikel werden zudem an Zellsuspensionen untersucht und mittels Durchflusszytometrie analysiert, wie es in Abschnitt 3.5.2.4 beschrieben ist. Hierfür werden HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Zellsuspensionen verwendet. Als Kontrolle und um den Grad unspezifischer Bindung zu ermitteln, werden HeLa Wildtyp Zellsuspensionen eingesetzt. Als weitere Negativkontrolle dienen antikörperfreie Partikel. Die Ergebnisse sind in Form von Dot-Blots zusammengestellt, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist. Des Weiteren sind diese Ergebnisse in Histogrammen dargestellt, bei denen die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz der Zellen mit einem Fluorochrom. Das heißt, je stärker das Signal der relativen Fluoreszenz ist, desto mehr Fluorophor ist an den Zellen gebunden. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der Zellen, die mit anti-Maus FITC Antikörper inkubiert werden, die Stärke der Eigenfluoreszenz der Zellen zusammen mit der Hintergrundfluoreszenz des Antikörpers, die durch unspezifische Bindung hervorgerufen wird, wieder. Die Eigenfluoreszenz, die durch endogene Fluorophore hervorgerufen wird^[89], wird als

Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt. Da das Trennverfahren der magnetischen Pelletierung aller Proben aufgrund zu weniger Magnete hätte nacheinander stattfinden und zudem für jeden Waschschrift angewendet werden müssen, ist dies hier nicht anwendbar gewesen. Daher ist eine Trennung zwischen mit Partikeln markierten Zellen von unmarkierten Zellen vor der Analyse im Durchflusszytometer nicht möglich. Eine Unterscheidung dieser Zellen sollte über die Fluoreszenzsignale erreicht werden. Bei Vorliegen von mit Partikeln markierten Zellen und unmarkierten Zellen sollten im Histogramm zwei Peaks mit unterschiedlichen Medianen der relativen Fluoreszenz detektiert werden. Auch die ungebundenen Partikel werden neben den Zellen im Durchflusszytometer detektiert. Aufgrund der Unterschiede in Größe und Granularität sollten sie mit Hilfe des Dot-Blots voneinander zu unterscheiden sein. Zur Auswertung sind die Zellen und die Partikel in farblichen Gates (Partikel = Rot; Zellen = Blau) unterschieden. Die farbliche Unterscheidung ist in den Histogrammen entsprechend übernommen.

4.6.3.1. [RPG18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen

Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM1 exprimieren, sind die Ergebnisse der Inkubation mit dem anti-Maus FITC Antikörper alleine und der Kombination aus primären Antikörper Bio18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC in Abbildung 43 und Tabelle 25 aufgeführt.

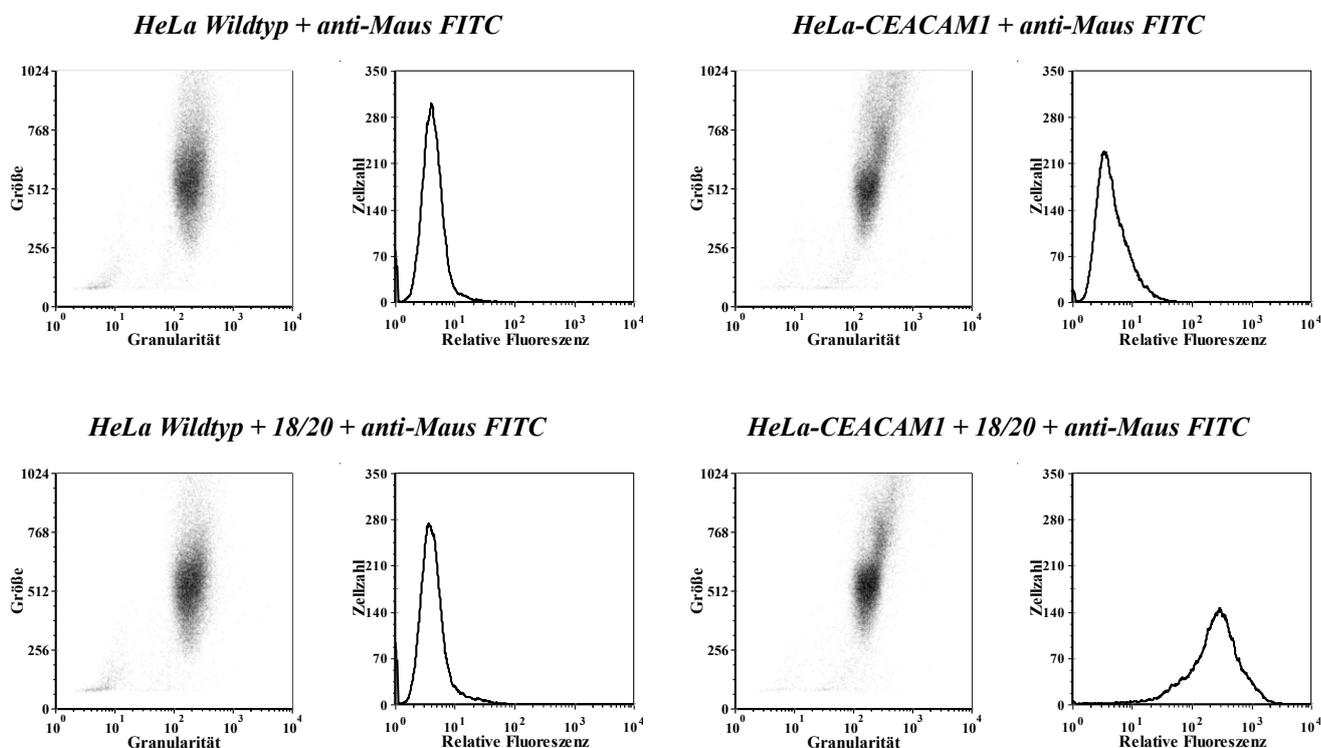


Abbildung 43: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit anti-Maus FITC und 18/20 + anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis der CEACAM1 Expression der Zellen.

Tabelle 25: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>Wildtyp</i>	18/20 + anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>CEACAM1</i>	18/20 + anti-Maus FITC	225 (100 %)

Die HeLa Wildtyp Zellen weisen, sowohl nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC, als auch nach der Kombination aus primären Antikörper Bio18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf.

Ebenso zeigen die HeLa-CEACAM1 Zellen einen Median von 4 nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC. Hier liegt demnach keine unspezifische Bindung einer der Antikörper vor und die Negativkontrollen sind wie zu erwarten negativ. Die Positivkontrolle mit HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit primären Antikörper 18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC weist einen Median von 225 auf. Damit ist nachgewiesen, dass die verwendeten Zellen CEACAM1⁺ sind.

In Abbildung 44 sind die aus den durchflusszytometrischen Messungen resultierenden Dot-Blots und Histogramme der Bindung von antikörperfreien [RPGB] und antikörperbeladenen [RPGB18/20Fluo(BS³)] Partikeln an HeLa Wildtyp bzw. HeLa-CEACAM1 Zellsuspensionen aufgeführt. Ergänzend sind die Mediane der relativen Fluoreszenz und der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen in Tabelle 26 zusammengefasst. Die Partikel werden in allen Dot-Blots durch eine klare Signalwolke detektiert und zeigen in den Histogrammen deutliche Fluoreszenz. Selbst die unbeladenen [RPGB] Partikel weisen Fluoreszenz mit einem Median von 28 (HeLa Wildtyp) bzw. 23 (HeLa-CEACAM1) auf. Dies kann auf die direkte Bindung des anti-Maus FITC Antikörpers an das Protein G auf der Partikeloberfläche zurückgeführt werden. Durch die Verwendung eines anti-MausF(ab)₂ FITC Antikörpers hätte dies umgangen werden können. Jedoch werden die Ergebnisse dadurch nicht negativ beeinflusst, da zur Beladung der Partikel fluoresceinmarkierte Antikörper eingesetzt worden sind, wodurch kein sekundärer anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis verwendet werden muss. Somit stimmen diese Ergebnisse sehr gut mit den Ergebnissen der Western-Blots überein und verdeutlichen die erfolgreiche Beladung der Partikel mit Antikörpern, welche zudem konzentrationsabhängig ist. Dies Ergebnis ist mit dem von Lindner *et al.* erhaltenen Ergebnis für die Mikrobäschen vergleichbar.^[101]

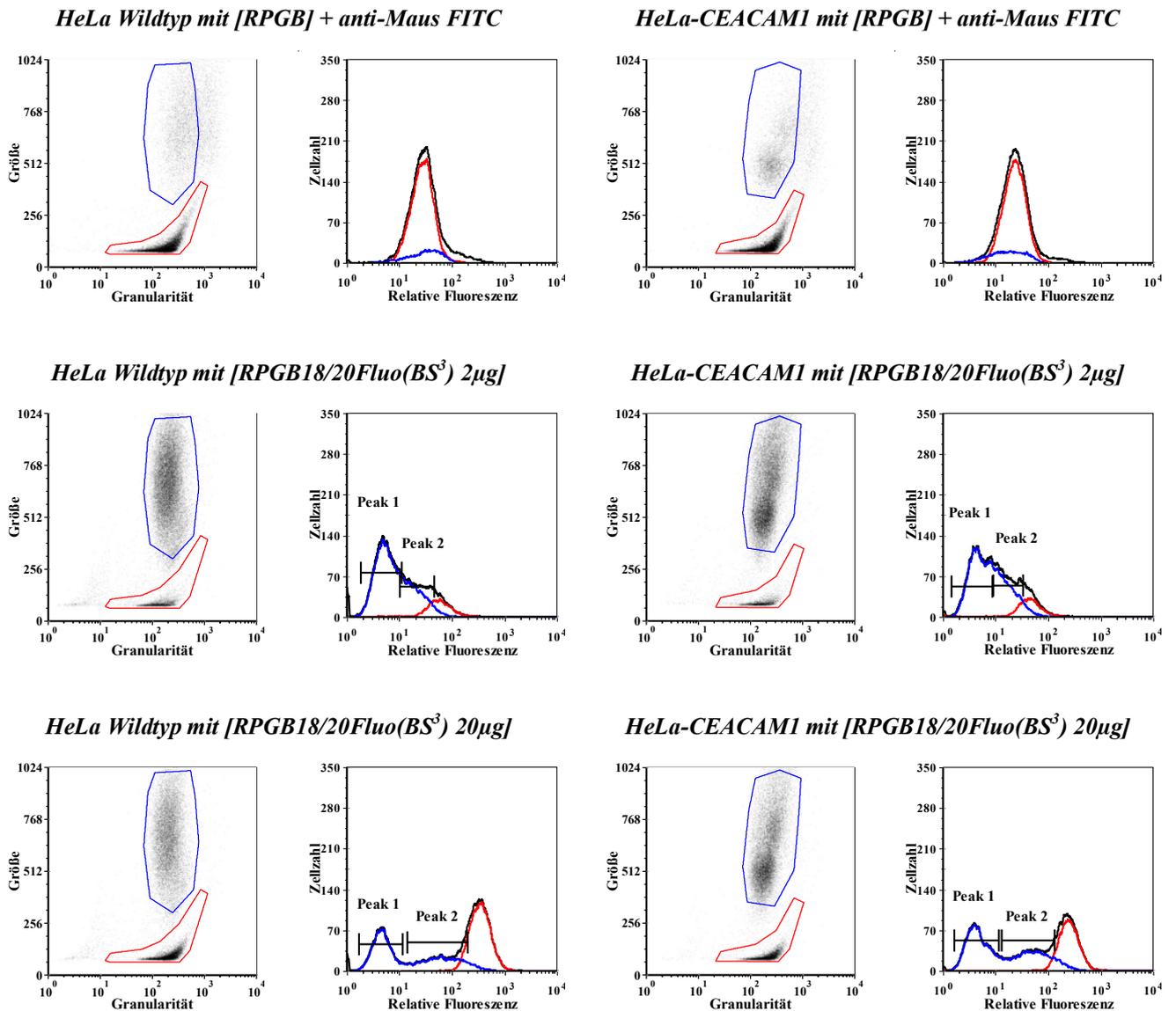


Abbildung 44: Dot-Plots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit [RPG]B], [RPG]B18/20Fluo(BS³) 2µg] und [RPG]B18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikeln (Rot: Partikel; Blau: Zellen; Schwarz: Gesamtmesssignal).

Tabelle 26: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Partikel	Relative Fluoreszenz (Median)		
		der Partikel	der Zellen – Peak 1	der Zellen – Peak 2
HeLa Wildtyp	[RPG]B] + anti-Maus FITC	28	33 (100 %)	-
	[RPG]B18/20Fluo(BS ³) 2µg]	56	5 (64 %)	20 (36 %)
	[RPG]B18/20Fluo(BS ³) 20µg]	340	5 (52 %)	81 (48 %)
HeLa CEACAM1	[RPG]B] + anti-Maus FITC	23	17 (100 %)	-
	[RPG]B18/20Fluo(BS ³) 2µg]	43	5 (60 %)	16 (40 %)
	[RPG]B18/20Fluo(BS ³) 20µg]	244	4 (56 %)	50 (44 %)

Im Allgemeinen liegen die hier ermittelten Fluoreszenzintensitäten und detektierten Partikelzahlen im Bereich der von Lindner *et al.* und Rychak *et al.* ermittelten Werte bei Mikrobläschen.^[99,101] Die hier erhaltenen Ergebnisse widerlegen demnach die Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Analysen der antikörperbeladenen [RPGB] Partikel, welche nach der Beladung ohne Zellen durchgeführt worden sind. Weshalb sich diese Ergebnisse widersprechen, könnte nicht abschließend geklärt werden.

Die HeLa Wildtyp Zellen, die mit unbeladenen [RPGB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen Fluoreszenz mit einem Median von 33. Bei den mit antikörperbeladenen [RPGB] Partikeln inkubierten HeLa Wildtyp Zellen, lassen sich in den Histogrammen zwei Peaks zuordnen. Eigenfluoreszenz mit einem Median von 5 zeigen hier 64 % (Peak 1) der Zellen, die mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] Partikeln inkubiert worden sind. Und 36 % (Peak 2) dieser Zellen weisen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 20 auf. Ebenso weisen 52 % (Peak 1) der Zellen, die mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, Eigenfluoreszenz auf und 48 % (Peak 2) dieser Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 81. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine starke unspezifische Bindung der Partikel vorliegt, da schon unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen binden und durch die direkte Bindung des sekundären Antikörpers anti-Maus FITC eine Fluoreszenzerhöhung hervorrufen. Die HeLa-CEACAM1 Zellen, die mit unbeladenen [RPGB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen Fluoreszenz mit einem Median von 17. Die Ergebnisse der HeLa-CEACAM1 Zellen zeigen für 60 % (Peak 1), der mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] Partikeln inkubierten Zellen, Eigenfluoreszenz und für 40 % (Peak 2) der Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 16. Ebenso weisen 56 % (Peak 1) der Zellen, die mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, Eigenfluoreszenz auf und 44 % (Peak 2) dieser Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 50. Auch diese Ergebnisse zeigen, dass eine starke unspezifische Bindung der Partikel vorliegt, da schon unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen binden und durch die direkte Bindung des sekundären Antikörpers anti-Maus FITC eine Fluoreszenzerhöhung hervorrufen. Aufgrund dieser starken unspezifischen Bindung der [RPGB] Partikel schon an Wildtyp Zellen ist eine seriöse Auswertung der Ergebnisse der HeLa-CEACAM1 Zellen nicht möglich, da nicht geklärt werden kann, ob die Partikel unspezifisch oder spezifisch über CEACAM1 binden. Würde man das Ergebnis der unspezifisch markierten HeLa Wildtyp Zellen als Hintergrund subtrahieren, wären an 4 % der HeLa-CEACAM1 Zellen [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] Partikel und an -4 % [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikel „gebunden“. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass das Protein G auf der Oberfläche anscheinend eine starke Affinität zu Zellmembranproteinen aufweist. Bei dieser ausgeprägten unspezifischen Bindung würde noch nicht einmal die Trennung von partikelgebundene Zellen, freien Zellen und freien Partikeln etwas verbessern können. Dieser Reinigungsschritt ist aufgrund des hohen

Probenaufkommens weggelassen worden, da sonst immer nur eine einzelne Probe hätte untersucht werden können.

4.6.3.2. [RPG6/40cFluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellsuspensionen

Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM8 exprimieren, sind die Ergebnisse der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC alleine und der Kombination aus primären Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC in Abbildung 45 und Tabelle 27 aufgeführt. Die HeLa Wildtyp Zellen weisen sowohl nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC als auch nach der Kombination aus primären Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf. Ebenso zeigen die HeLa-CEACAM1 Zellen einen Median von 4 nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC. Hier liegt demnach keine unspezifische Bindung einer der Antikörper vor und die Negativkontrollen sind wie zu erwarten negativ. Die Positivkontrolle mit HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Inkubation mit primären Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC weist einen Median von 97 auf. Damit ist nachgewiesen, dass die verwendeten HeLa-CEACAM8 Zellen auch tatsächlich CEACAM8⁺ sind.

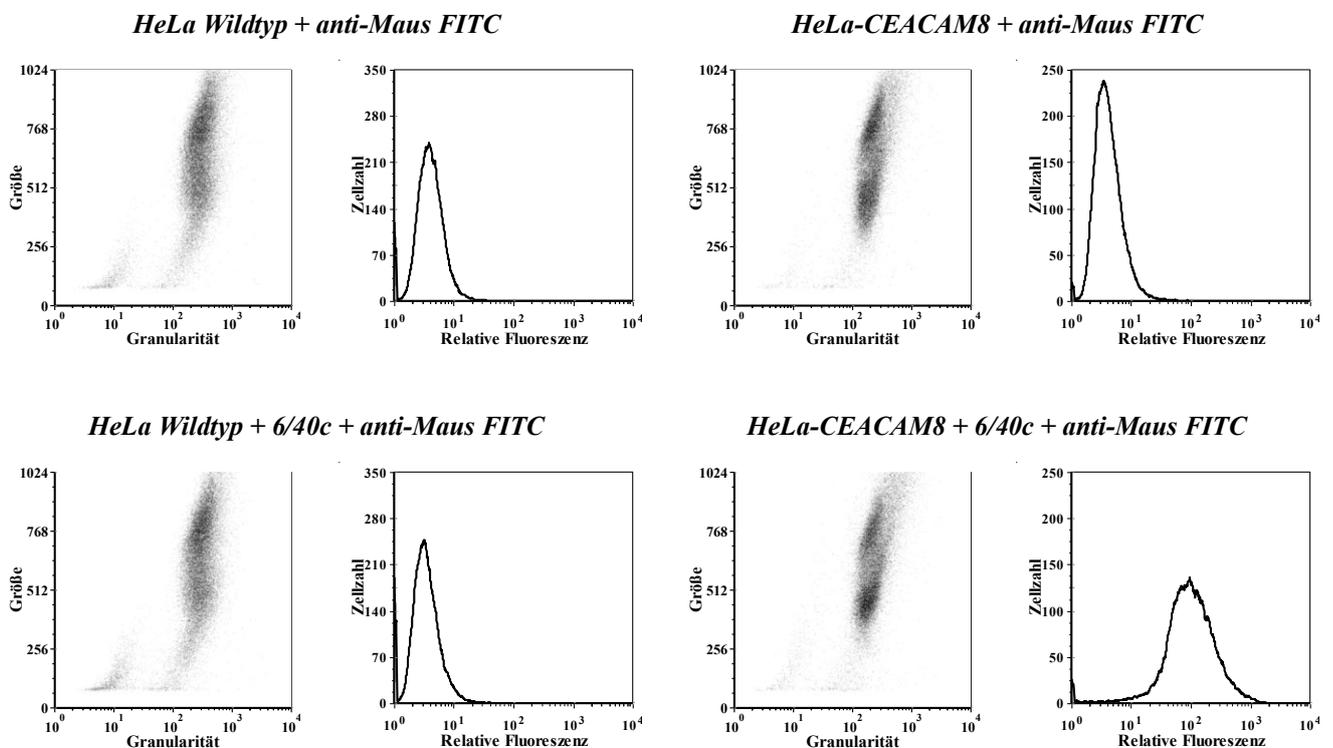


Abbildung 45: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 mit anti-Maus FITC und 6/40c + anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis der CEACAM8 Expression der Zellen.

Tabelle 27: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Relativen Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>Wildtyp</i>	6/40c + anti-Maus FITC	3 (100 %)
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>CEACAM8</i>	6/40c + anti-Maus FITC	97 (100 %)

Die Ergebnisse der Bindung von antikörperfreien [RPGB] und antikörperbeladenen [RPGB6/40cFluo(BS³)] Partikeln an HeLa Wildtyp bzw. HeLa-CEACAM8 Zellsuspensionen sind in Abbildung 46 aufgeführt. Ergänzend sind die Mediane der relativen Fluoreszenz und der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen in Tabelle 28 zusammengefasst. Ausreichend [RPGB] Partikel, die ein auswertbares Signal hervorrufen, sind nur in den Dot-Blots zu erkennen, bei denen die Zellen mit unbeladenen [RPGB] Partikeln inkubiert worden sind. Diese werden jedoch durch eine klare Signalwolke detektiert, und zeigen in den Histogrammen Mediane der relativen Fluoreszenz von 37 (HeLa Wildtyp) bzw. 41 (HeLa-CEACAM1), welche durch direkte Bindung des sekundären Antikörpers anti-Maus FITC hervorgerufen werden. Durch die Verwendung eines anti-MausF(ab)₂ FITC Antikörpers hätte dies umgangen werden können. Jedoch werden die Ergebnisse dadurch nicht negativ beeinflusst, da zur Beladung der Partikel fluoresceinmarkierte Antikörper eingesetzt worden sind, wodurch kein sekundärer anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis verwendet werden muss. Die antikörperbeladenen [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] bzw. [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikel werden dagegen nur vereinzelt in den Dot-Blots detektiert, weisen aber sehr hohe Fluoreszenzen auf, die bei Partikeln mit höheren Antikörperkonzentrationen entsprechend intensiver sind (Tabelle 28). Somit stimmen diese Ergebnisse sehr gut mit den Ergebnissen der Western-Blots überein und verdeutlichen die erfolgreiche Beladung der Partikel mit Antikörpern, welche zudem konzentrationsabhängig ist und wie es Lindner *et al.* auch bei Mikrobläschen beobachten.^[101] Im Allgemeinen liegen die hier ermittelten Fluoreszenzintensitäten im Bereich der von Lindner *et al.* und Rychak *et al.* ermittelten Werte bei Mikrobläschen. Allerdings ist die Partikelzahl in den Proben der antikörperbeladenen Partikel gering, wie der Vergleich der Histogramme mit den unbeladenen Partikeln zeigt. Auch in der Literatur werden bei den durchflusszytometrischen Analysen höhere Partikelzahlen detektiert.^[99,101] Die hier erhaltenen Ergebnisse widerlegen demnach die Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Analysen der antikörperbeladenen [RPGB] Partikel, welche nach der Beladung ohne Zellen durchgeführt worden sind. Weshalb sich diese Ergebnisse widersprechen ist nicht endgültig geklärt worden.

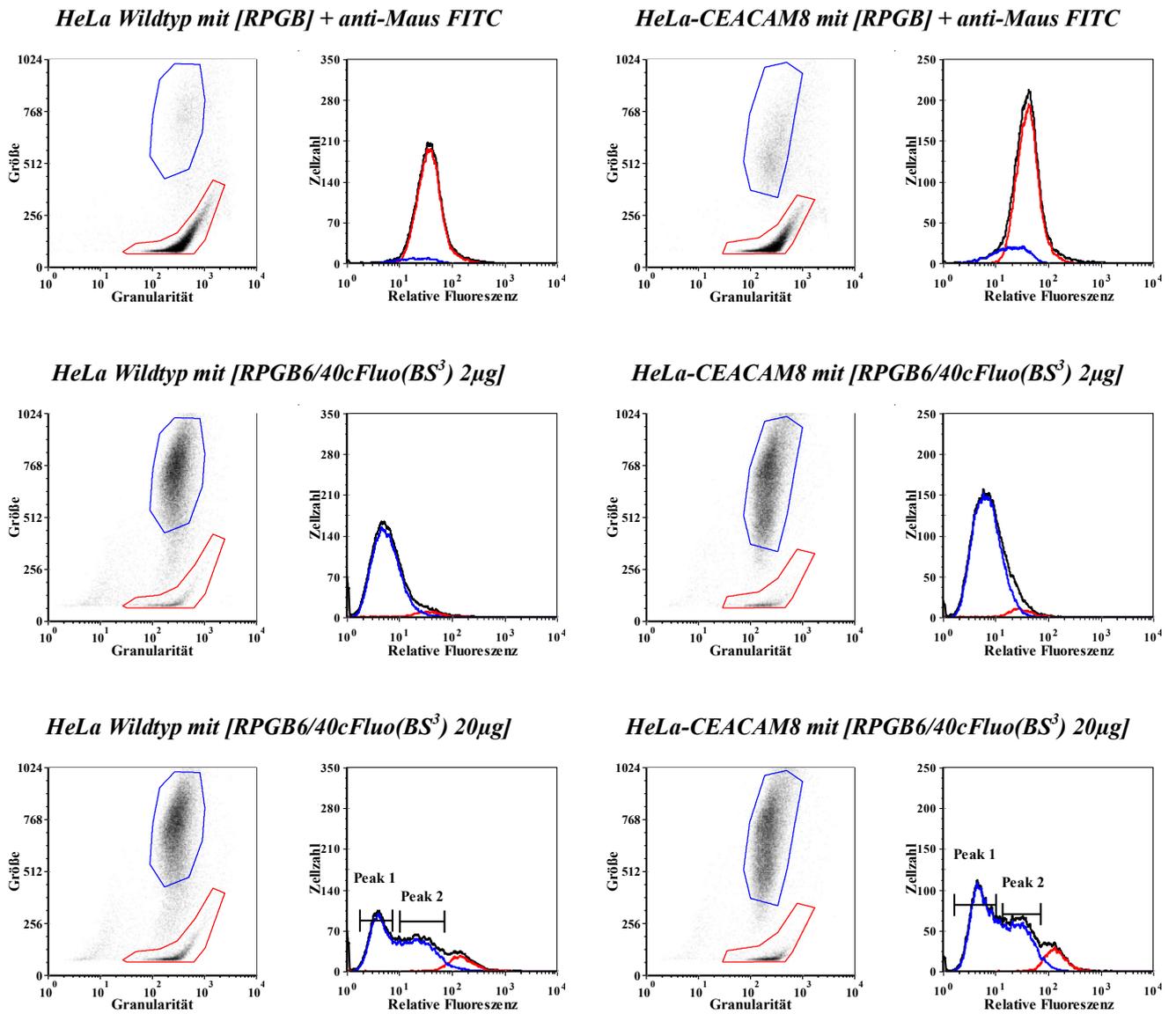


Abbildung 46: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 mit [RPGb], [RPGb6/40cFluo(BS³) 2µg] und [RPGb6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikeln. (Rot: Partikel; Blau: Zellen).

Tabelle 28: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Partikel	Relative Fluoreszenz (Median)		
		der Partikel	der Zellen – Peak 1	der Zellen – Peak 2
HeLa Wildtyp	[RPGb] + anti-Maus FITC	37	21 (100 %)	-
	[RPGb6/40cFluo(BS ³) 2µg]	32	5 (100 %)	-
	[RPGb6/40cFluo(BS ³) 20µg]	145	4 (49 %)	25 (51 %)
HeLa CEACAM8	[RPGb] + anti-Maus FITC	41	19 (100 %)	-
	[RPGb6/40cFluo(BS ³) 2µg]	28	7 (100 %)	-
	[RPGb6/40cFluo(BS ³) 20µg]	133	5 (55 %)	29 (45 %)

Die HeLa Wildtyp Zellen, die mit unbeladenen [RPGB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen Fluoreszenz mit einem Median von 21. Bei den HeLa Wildtyp Zellen, die mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] Partikeln inkubiert worden sind, werden nur Zellen mit Eigenfluoreszenz detektiert. Dagegen weisen bei den HeLa Wildtyp Zellen, die mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, 49 % (Peak 1) Eigenfluoreszenz auf und 51 % (Peak 2) dieser Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 25 (Tabelle 28). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine unspezifische Bindung der Partikel vorliegt, da schon unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen binden und durch die direkte Bindung des sekundären Antikörpers anti-Maus FITC eine Fluoreszenzerhöhung hervorrufen. Die HeLa-CEACAM8 Zellen, die mit unbeladenen [RPGB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen Fluoreszenz mit einem Median von 19. Die Ergebnisse der HeLa-CEACAM8 Zellen, die mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen für alle Zellen lediglich Eigenfluoreszenz. Dagegen weisen bei den HeLa-CEACAM8 Zellen, die mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, 55 % (Peak 1) Eigenfluoreszenz auf und 45 % (Peak 2) dieser Zellen erhöhte Fluoreszenz mit einem Median von 29. Auch diese Ergebnisse zeigen die unspezifische Bindung der unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen, welche durch die direkte Bindung des sekundären Antikörpers anti-Maus FITC eine Fluoreszenzerhöhung hervorrufen. Die Ergebnisse zeigen jedoch klar, dass keine Bindung von [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] Partikeln vorliegt. Wenn man das Ergebnis der unspezifisch markierten HeLa Wildtyp Zellen als Hintergrund subtrahieren würde, wären an -6 % der HeLa-CEACAM8 Zellen [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikel „gebunden“. Dies zeigt, dass aufgrund der hier ermittelten unspezifischen Bindung der [RPGB] Partikel an Wildtyp Zellen eine Auswertung der Ergebnisse der HeLa-CEACAM8 Zellen nicht möglich ist, da nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die Partikel unspezifisch oder spezifisch über CEACAM8 binden. Die Ergebnisse der gegen CEACAM8 gerichteten [RPGB6/40cFluo(BS³)] Partikel zeigen somit wie schon die Ergebnisse der gegen CEACAM1 gerichteten [RPGB18/20Fluo(BS³)] Partikel, dass das Protein G auf der Oberfläche anscheinend eine starke Affinität zu Zellmembranproteinen aufweist. Daher sind die [RPGB] Partikel trotz der sehr guten Beladungskapazität, welche sich in sehr hohen Fluoreszenzintensitäten äußert, auf Basis der durchflusszytometrischen Analysen als Partikel für die bildgebende Diagnostik nicht geeignet

4.6.4. Untersuchung der [RPGB-AK] Bindung an adhärenzte Zell-Monolayer

Des Weiteren werden Bindungsuntersuchungen an auf Deckgläschen gewachsenen konfluente Zellen durchgeführt (Kapitel 3.6.2), um zu prüfen, ob sich die zuvor erhaltenen Ergebnisse bestätigen lassen. Für die Untersuchungen werden HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Zellen mit den jeweiligen Partikelproben inkubiert. Als Kontrolle und um den Grad unspezifischer Bindung zu ermitteln, werden

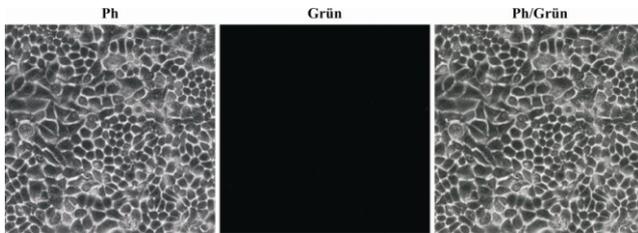
HeLa Wildtyp Zellen eingesetzt. Die Analyse erfolgt bei 200facher Vergrößerung an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM), indem die Fluoreszenz im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) detektiert wird. Parallel werden Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) durchgeführt.

4.6.4.1. [RPGB18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen

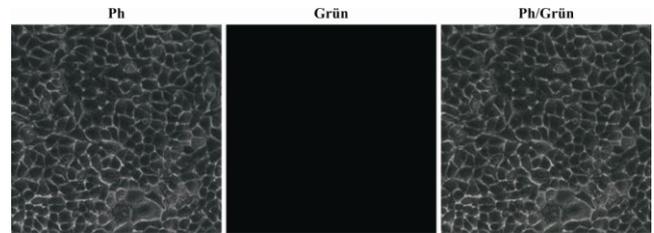
In Abbildung 47 sind die CLSM Aufnahmen der Bindung von [RPGB], [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] und [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen aufgeführt. Als Positivkontrolle dient die Inkubation mit dem primären Antikörper 18/20 und dessen Detektion mit dem sekundären Antikörper. Die Aufnahmen der Zellen, die mit dem 18/20 Antikörper inkubiert worden sind, zeigen, dass bei den HeLa Wildtyp Zellen keine Fluoreszenz detektiert wird. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen ist dagegen eine deutliche Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell Kontakten erkennbar. Die Negativkontrolle ist bei beiden erwartungsgemäß negativ. Dies zeigt, dass die Zellen CEACAM1⁺ sind und der Antikörper nur spezifisch an die CEACAM1 exprimierenden Zellen bindet. Demnach sollte bei einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Antikörpern eine vergleichbare Fluoreszenzfärbung auftreten. In den Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen der HeLa Wildtyp Zellen sind sowohl die antikörperfreien [RPGB] Partikel als auch die antikörperbeladenen [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] und [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikel willkürlich über den Zellrasen verteilt zu erkennen. Hierbei ist sogar kein signifikanter Unterschied in der Partikelzahl auszumachen, lediglich die Fluoreszenzintensität der [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] und [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikel ist bei höherer Antikörperkonzentration intensiver. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine starke unspezifische Bindung der Partikel vorliegt, da schon unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen binden. Dass diese schon in den Fluoreszenzaufnahmen zu erkennen sind, wird durch die direkte Bindung des sekundären Antikörpers anti-Maus FITC hervorgerufen. Durch die Verwendung eines anti-MausF(ab)₂ FITC Antikörpers hätte dies umgangen werden können. Jedoch werden die Ergebnisse dadurch nicht negativ beeinflusst, da zur Beladung der Partikel fluoresceinmarkierte Antikörper eingesetzt worden sind, wodurch kein sekundärer anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis verwendet werden muss. In den CLSM Analysen führt die Verwendung des anti-Maus FITC Antikörpers sogar zu dem positiven Nebeneffekt, dass die unbeladenen [RPGB] Partikel auch über den Fluoreszenzspektralbereich detektiert werden können. Auch bei den HeLa-CEACAM1 Zellen sind in den Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen die antikörperfreien [RPGB] Partikel und antikörperbeladenen [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] und [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikel willkürlich über den Zellrasen verteilt zu erkennen. Hierbei ist kein signifikanter Unterschied in der Partikelzahl auszumachen, lediglich die Fluoreszenzintensität der

[RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] und [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikel ist bei höherer Antikörperkonzentration intensiver.

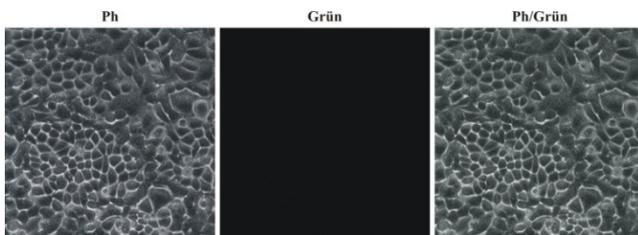
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC



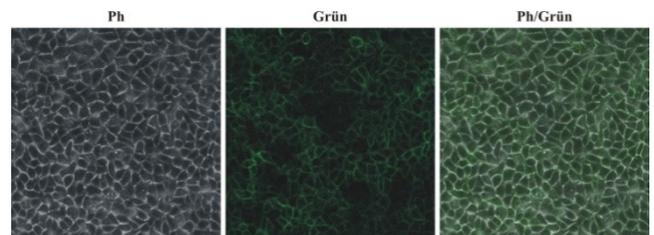
HeLa-CEACAM1 + anti-Maus FITC



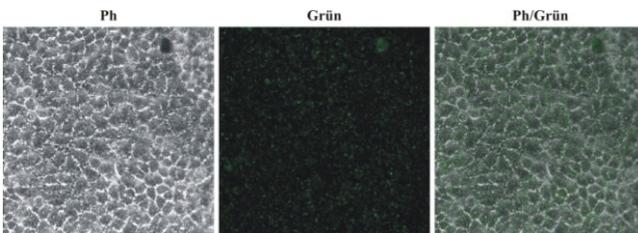
HeLa Wildtyp + 18/20 + anti-Maus FITC



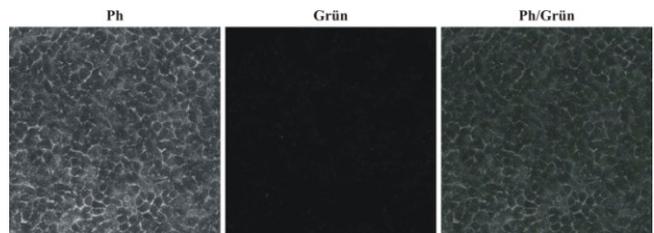
HeLa-CEACAM1 + 18/20 + anti-Maus FITC



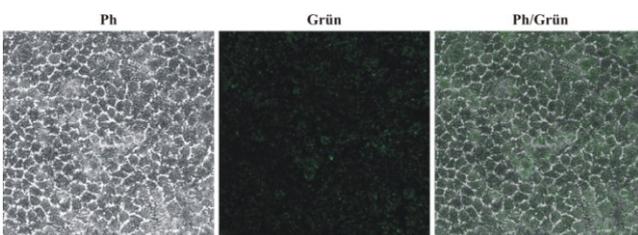
HeLa Wildtyp mit [RPGB] + anti-Maus FITC



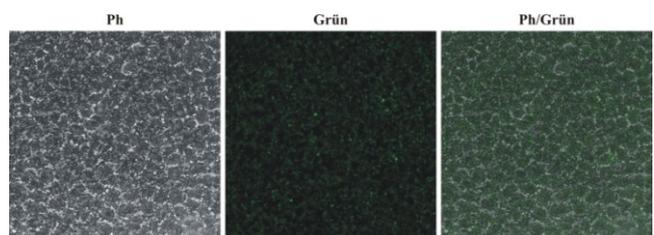
HeLa-CEACAM1 mit [RPGB] + anti-Maus FITC



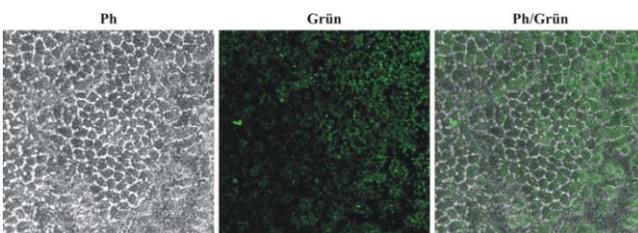
HeLa Wildtyp mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg]



HeLa-CEACAM1 mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg]



HeLa Wildtyp mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg]



HeLa-CEACAM1 mit [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg]

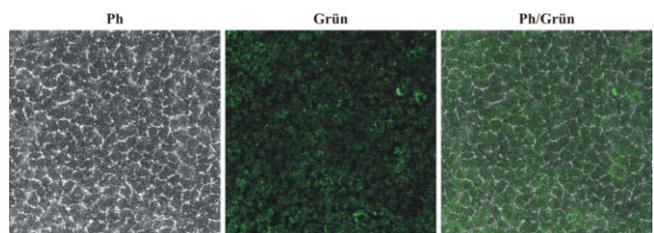


Abbildung 47: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [RPGB], [RPGB18/20Fluo(BS³) 2µg] und [RPGB18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

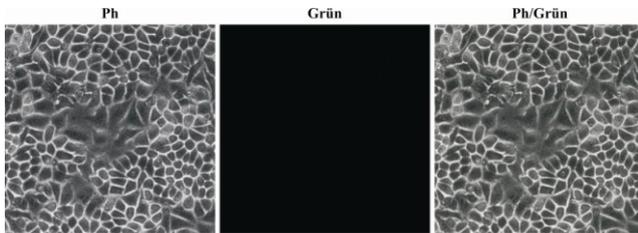
Da auch hier schon unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen binden, erkennt man, dass eine starke unspezifische Bindung der Partikel vorliegt. Aufgrund dieser bereits an Wildtyp Zellen auftretenden unspezifischen Bindung der [RPGB] Partikel ist eine seriöse Auswertung der Ergebnisse der HeLa-CEACAM1 Zellen nicht möglich. Es ist nicht möglich nachzuweisen, ob die Partikel unspezifisch oder spezifisch antikörpervermittelt an CEACAM1 binden. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass das Protein G auf der Oberfläche anscheinend eine starke Affinität zu Zellmembranproteinen aufweist und bestätigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen.

4.6.4.2. [RPGB6/40cFluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen

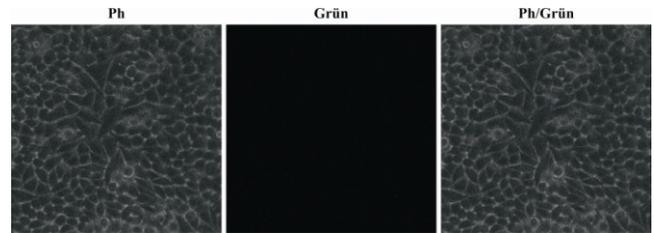
Die Ergebnisse der Bindung von [RPGB], [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] und [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen sind in Abbildung 48 dargestellt. Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM8 exprimieren, sind sie alleine mit dem sekundären Antikörper anti-Maus FITC als Negativkontrolle inkubiert worden. Als Positivkontrolle dient die Inkubation mit dem primären Antikörper 6/40c und dessen Detektion mit dem sekundären Antikörper. Die mit dem 6/40c Antikörper inkubierten HeLa-Wildtyp Zellen zeigen in den CLSM Aufnahmen keine Fluoreszenz. Bei den HeLa-CEACAM8 Zellen ist dagegen Fluoreszenzfärbung sowohl an den Zell-Zell Kontakten als auch auf den Zellen selbst detektierbar. Die Negativkontrolle ist bei beiden erwartungsgemäß negativ. Dies zeigt, dass die Zellen CEACAM8⁺ sind und der Antikörper nur spezifisch an die CEACAM8 exprimierenden Zellen bindet. Zudem erkennt man deutlich, dass das CEACAM8 auch vermehrt apikal exprimiert wird. Es sollte bei einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Antikörpern eine vergleichbare Fluoreszenzfärbung auftreten. In den Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen der HeLa Wildtyp Zellen sind sowohl die antikörperfreien [RPGB] Partikel als auch die antikörperbeladenen [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] und [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikel willkürlich über den Zellrasen verteilt zu erkennen. Hierbei ist kein signifikanter Unterschied in der Partikelzahl auszumachen, lediglich die Fluoreszenzintensität der [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] und [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikel ist bei höherer Antikörperkonzentration intensiver. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine starke unspezifische Bindung der Partikel vorliegt, da schon unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen binden. Die Detektion der Partikel in den Fluoreszenzaufnahmen wird durch die direkte Bindung des sekundären Antikörpers anti-Maus FITC hervorgerufen. Durch die Verwendung eines anti-MausF(ab)₂ FITC Antikörpers hätte dies umgangen werden können. Jedoch werden die Ergebnisse dadurch nicht negativ beeinflusst, da zur Beladung der Partikel fluoresceinmarkierte Antikörper eingesetzt worden sind, wodurch kein sekundärer anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis verwendet werden muss. In den CLSM Analysen führt die Verwendung des

anti-Maus FITC Antikörpers sogar zu dem positiven Nebeneffekt, dass die unbeladenen [RPGB] Partikel auch über den Fluoreszenzspektralbereich detektiert werden können.

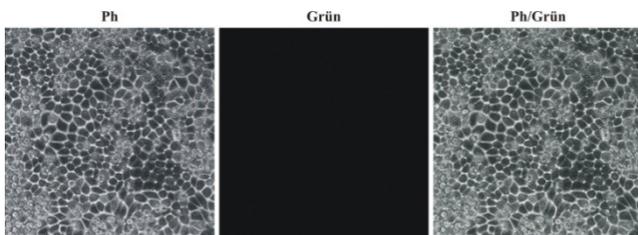
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC



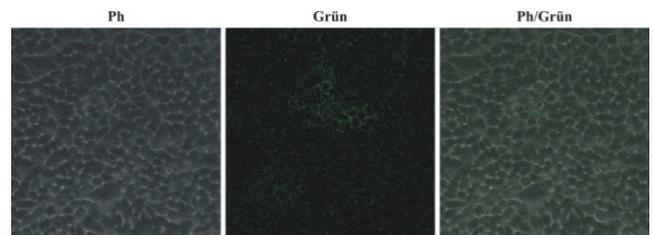
HeLa-CEACAM8 + anti-Maus FITC



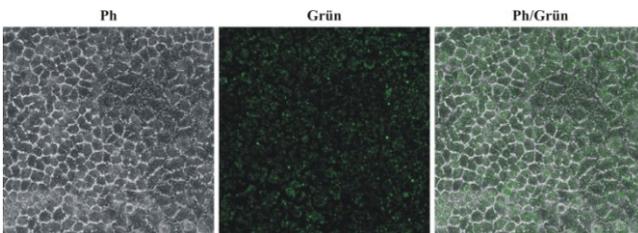
HeLa Wildtyp + 6/40c + anti-Maus FITC



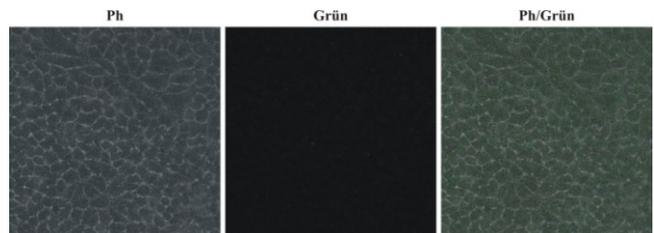
HeLa-CEACAM8 + 6/40c + anti-Maus FITC



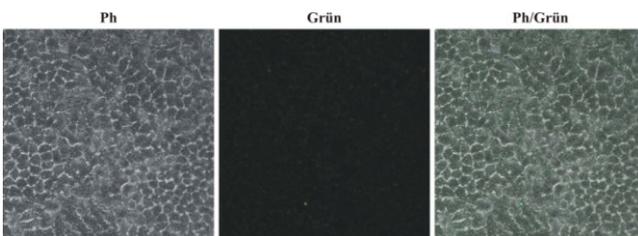
HeLa Wildtyp mit [RPGB] + anti-Maus FITC



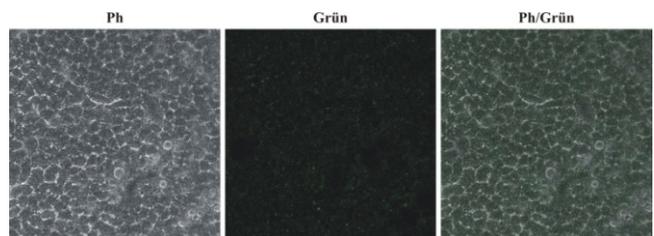
HeLa-CEACAM8 mit [RPGB] + anti-Maus FITC



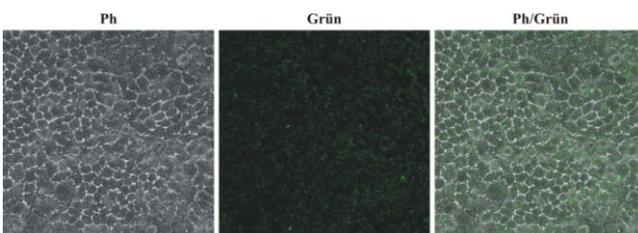
HeLa Wildtyp mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg]



HeLa-CEACAM8 mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg]



HeLa Wildtyp mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg]



HeLa-CEACAM8 mit [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg]

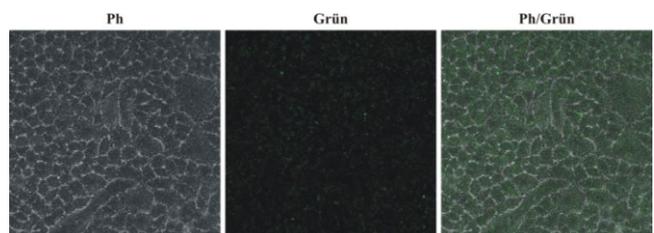


Abbildung 48: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Inkubation mit [RPGB], [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] und [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

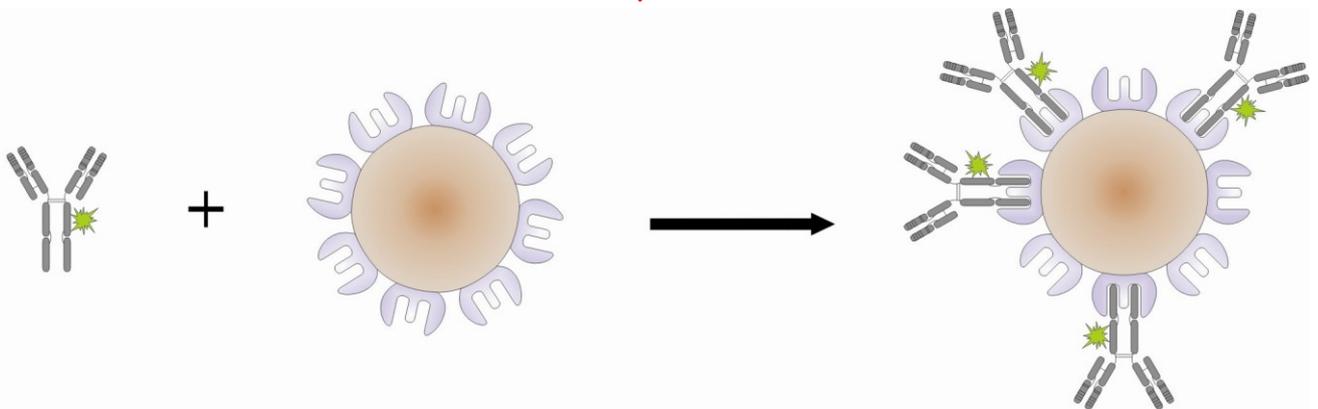
Auch bei den HeLa-CEACAM8 Zellen sind in den Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen die antikörperfreien [RPGB] Partikel und antikörperbeladenen [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] und [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikel willkürlich über den Zellrasen verteilt zu erkennen. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied in der Partikelzahl auszumachen, lediglich die Fluoreszenzintensität der [RPGB6/40cFluo(BS³) 2µg] und [RPGB6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikel ist bei höherer Antikörperkonzentration intensiver. Da auch hier schon unbeladenen [RPGB] Partikel an die Zellen binden, kann von einer starken unspezifischen Bindung der Partikel ausgegangen werden. Aufgrund dieser starken bereits an Wildtyp Zellen auftretenden unspezifischen Bindung der [RPGB] Partikel ist eine seriöse Auswertung der Ergebnisse der HeLa-CEACAM8 Zellen nicht möglich, da nicht geklärt werden kann, ob die Partikel unspezifisch oder spezifisch antikörpervermittelt an CEACAM8 binden. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass das Protein G auf der Oberfläche anscheinend eine starke Affinität zu Zellmembranproteinen aufweist und bestätigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen.

Werden die erhaltenen Ergebnisse mit den [RPGB] Partikeln zusammengefasst betrachtet, kann die eindeutige Aussage getroffen werden, dass die [RPGB] Partikel trotz der sehr guten Beladungskapazität, welche sich in sehr hohen Fluoreszenzintensitäten äußert, als Partikel für die bildgebende Diagnostik nicht geeignet sind. Hier sei zudem ein weiteres Mal erwähnt, dass bewusst auf die Isotypenkontrollen mit CEACAM8-bindenden Partikeln an HeLa-CEACAM1 Zellen bzw. mit CEACAM1-bindenden Partikeln an HeLa-CEACAM8 Zellen verzichtet worden ist, um erst antikörperbeladene Partikel zu ermitteln, welche spezifisch an die jeweiligen Zellen binden. Die Ergebnisse der [RPGB] Partikel bekräftigen diese Vorgehensweise, da bei den vorliegenden Untersuchungen die durchgeführten Kontrollen ausreichend gewesen sind, um die [RPGB] Partikel als Kandidat für die bildgebende Diagnostik auszuschließen. Die Verwendung eines weiteren Partikeltyps soll klären, ob das Protein G für die unspezifische Bindung der [RPGB] Partikel an Zellen verantwortlich ist, oder ob das Material und die Partikelgröße dieses beeinflussen. Schließlich beobachten Ling *et al.* bei DLS-Messungen und Messungen der Zeta-Potentiale in DMEM mit FCS, dass sich Proteine auf Silicananopartikeln ablagern. Hier führen die abgelagerten Proteine zu einem vergrößerten Durchmesser und zur Reduktion der Oberflächenladung der untersuchten Partikel.^[113] Da die Verwendung von paramagnetische und superparamagnetische Nanopartikeln, wie Eisenoxidnanopartikel (SPIO), als Kontrastmittel in der MRT weit verbreitet ist, wie Publikationen von Lewin *et al.*^[114] und Weissleder *et al.*^[115] zeigen, und auch Peldschus *et al.*^[90] interessante Ergebnisse mit gegen CEACAM5 gerichteten SPIO Partikeln erzielen konnten, sind auch in dieser Arbeit Eisenoxidnanopartikel eingesetzt worden, um den Einfluss des Protein G zu klären.

4.7. Herstellung antikörperbeladener [MPGB] Partikel

Als superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel werden Partikel der Firma Miltenyi Biotec eingesetzt, welche, mit Biotin als reaktive Gruppe auf der Partikeloberfläche, bereits erfolgreich in der Zellseparation verwendet worden sind.^[105] Um den Einfluss des Protein G zu klären werden in der vorliegenden Arbeit allerdings Partikel verwendet, an deren Oberfläche Protein G kovalent gebunden ist. Diese [MPGB] Partikel weisen aufgrund ihrer Beschaffenheit eine hohe Stabilität auf und sollten bei Aufreinigungsschritten durch die magnetischen Eigenschaften einfach zu handhaben sein. Allerdings handelt es sich auch bei diesen Partikeln um kein Kontrastmittel für Ultraschallanwendungen oder andere Bildgebungstechniken, sondern um Partikel für die Immunpräzipitation (Herstellerangabe).^[116] Da es sich um superparamagnetische Nanopartikel handelt wäre eine Anwendung in Magnetresonanz-Experimenten durchaus möglich, um weitere Erkenntnisse in den Abläufen der Zellbindung CEACAM1-gerichteter Partikel zu erhalten. Dass für MRT-Studien kommerziell erhältliche Eisenoxidnanopartikel verwendet werden, zeigen Veröffentlichungen von Peldschus *et al.*^[90], Frank *et al.*^[117] und Kraitchman *et al.*^[118]. Da mit den [MPGB] Partikeln unter anderem der Einfluss von Protein G auf die unspezifische Bindung von Partikeln an Zellen untersucht werden soll, bringt der Aufbau der [MPGB] Partikelmatrix einen großen Vorteil gegenüber den Matrices der [SDB] bzw. [RPGB] Partikel mit. Die [MPGB] Partikel bestehen aus einem Kern aus Ferrit-Kristall (Durchmesser ca. 10 nm) mit daran gebundenen verzweigten Dextranpolymeren, welche eine hohe Resistenz gegenüber Protein- und Zelladsorptionen aufweisen.^[119] Aufgrund ihrer Gesamtgröße von ca. 50 nm im Durchmesser sollten die [MPGB] Partikel zudem im ELISA und in Flussexperimenten einsetzbar sein. Durch das kovalent gebundene Protein G auf der Oberfläche können auch bei den [MPGB] Partikeln die Antikörper über ihr Fc-Fragment so immobilisiert werden, dass die F(ab)₂-Fragmente des Antikörpers in die Peripherie ausgerichtet sind. Hierdurch sollte eine optimale Bindungskapazität gewährleistet sein. Allerdings ist die Bindung zwischen Antikörper und Protein G ($K_a \approx 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)^[83] im Vergleich zu der Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ($K_a \approx 1.8 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$)^[111] wesentlich schwächer. Eine Quervernetzung der Antikörper mit dem Protein G über einen homobifunktionellen Crosslinker und damit eine kovalente Bindung des Antikörpers an die Partikel ist hier nicht möglich gewesen, da sich die [MPGB] Partikel nicht ein weiteres Mal über die magnetische Säule aufreinigen ließen. Nach der Beladung der Partikel mit Antikörpern, Auswaschen ungebundener Antikörper über eine magnetische Säule und Elution der Partikel von der Säule sind Aggregationen beobachtet worden. Diese verstopfen die magnetische Säule, so dass eine Aufreinigung nach einer Quervernetzung nicht möglich ist. Eine Aufreinigung über einen normalen Magneten ist ebenfalls nicht möglich gewesen, da sich gezeigt hat, dass das Magnetfeld eines solchen Magneten zu

schwach ist, um die [MPGB] Partikel zu pelletieren. Daher könnte sich die Antikörperkonzentration auf den Partikeln aufgrund der reversiblen Bindung zum Protein G mit der Zeit verringern.^[83]



Legende:



Abbildung 49: Schematische Darstellung der Herstellung antikörperbeladener [MPGB] Partikel.

In Abbildung 49 ist die Beladung der [MPGB] Partikel mit Antikörper schematisch dargestellt. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben werden die Partikel mit unterschiedlichen Konzentrationen an Antikörper inkubiert. Da sich die [MPGB] Partikel über eine magnetische Säule aufreinigen lassen, werden die Überstände der Reaktionslösungen und der Waschfraktionen mittels Western-Blot analysiert, um die Bindung des Antikörpers an die [MPGB] Partikel indirekt nachweisen zu können. Ein direkter Nachweis antikörperbeladener Partikel im Western-Blot ist nicht möglich, da die Partikel hierbei in den Geltaschen verbleiben. Zudem ist ein Nachweis antikörperbeladener [MPGB] Partikel im Durchflusszytometer aufgrund der geringen Größe von ca. 50 nm im Durchmesser, nicht möglich. Partikel-Antigen bzw. Partikel-Zell Bindungsuntersuchungen werden dafür über ELISA und mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

4.7.1. Überprüfung der effektiven Antikörperbeladung von [MPGB] Partikeln

Die gesammelten Überstände der Reaktionslösungen und die Waschfraktionen werden mittels Western-Blot analysiert, wie es in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist. Zur Detektion des ungebundenen Antikörpers wird der polyklonale Ziege anti-Maus IgG^{H+L}(HRP) Antikörper verwendet.

In Reihe 2 ist der 18/20Fluo bzw. 6/40cFluo Antikörper als Kontrolle geladen. Diese zeigen jeweils eine Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers in der Höhe des Markers von ca. 130 kDa. Der 18/20Fluo Antikörper zeigt zusätzlich eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 250 kDa und eine

Bande darüber. Dieses Bandenmuster ist ungewöhnlich, da aufgrund der molekularen Masse eines IgG von ca. 150 kDa nur eine Bande bei ca. 150 kDa zu erwarten wäre. Durch die Modifikation mit dem sehr kleinen Fluoresceinmolekül ($M_W \sim 375$ g/Mol) und Biotinmolekül ($M_W \sim 356$ g/Mol) würde sich diese Bande weder verschieben noch würde hierdurch eine zweite Bande auftreten, die einer entsprechend höheren Proteinmasse zugeordnet werden könnte. Aus diesem Grund ist zusätzlich ein Gel in Abbildung 50 aufgeführt, bei welchem der unreduzierte monomere 18/20 Antikörper geladen ist. Dieses Gel zeigt ein den Western-Blots entsprechendes Bandenmuster. Es ist eine intensive Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers oberhalb der Markerbande von 110 kDa zu erkennen. Dies zeigt, dass die Banden der Markerproteine in den in dieser Arbeit verwendeten Gelen nicht auf der Höhe ihres eigentlichen Molekulargewichts auftreten. Dies liegt daran, dass die Hersteller der Standardmarker die Bandenhöhen auf Gelen ermitteln, die sich von den Gelen in den Laboren der Nutzer unterscheiden können. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Laufverhalten der Proteine. Des Weiteren ist in dem Gel eine Bande zwischen den Markerbanden von 160 kDa und 260 kDa zu erkennen, welche sich ungefähr auf der Höhe des doppelten Molekulargewichts der intensiven Bande oberhalb 110 kDa befindet. Daher könnte es sich hierbei um Antikörper handeln, welcher nach der Denaturierung durch SDS, welches im Probenpuffer enthalten ist, dimerisiert. Es könnte aber auch sein, dass diese Bande durch unvollständig denaturierten Antikörper hervorgerufen wird. Dieser hat kein konstantes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und wird im Gel nicht entsprechend getrennt. Eine genauere Analyse dieser Bande ist nicht durchgeführt worden.

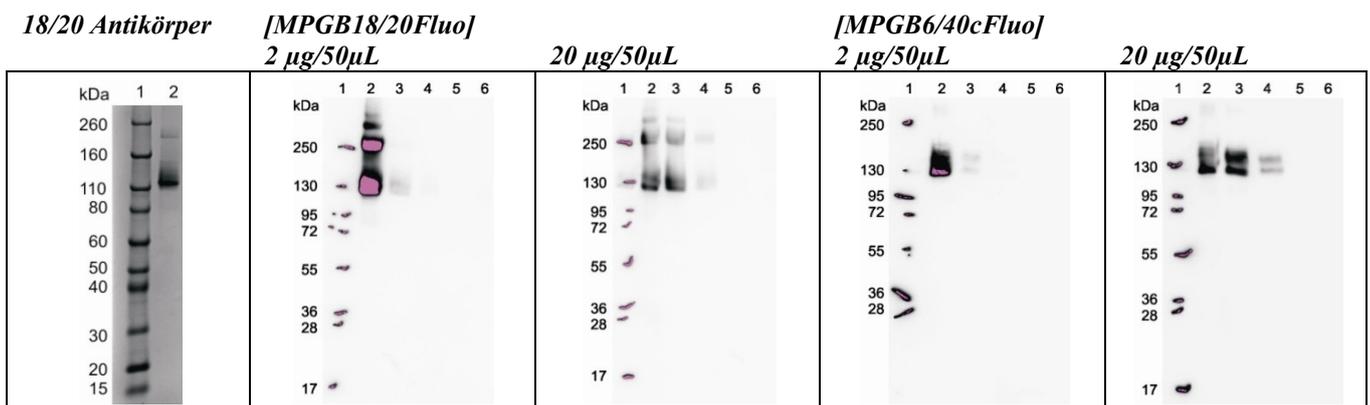


Abbildung 50: Kontrollgel des 18/20 Antikörpers (links) mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Novex[®] Sharp Standard; 2: 18/20.Western-Blots der Antikörperkopplung an [MPGB] Partikel mit folgender Beladung der Geltaschen 1: Prestained Protein Ladder #SM1811; 2: Antikörper zur Kontrolle; 3:Überstand der Partikel-Antikörper-Kopplung; 4-6: Waschfraktion 1-3 der Partikel-Antikörper-Kopplung.

Bei der Probe, bei der 2 µg/50 µL 18/20Fluo Antikörper eingesetzt worden sind, ist in Reihe 3 des Blots (Überstand) eine sehr schwache Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Die weiteren Banden wie sie beim geladenen Kontrollantikörper zu sehen sind, werden hier nicht detektiert. In den Reihen 4 – 6 des Blots, in denen

die Waschfraktionen geladen sind, werden keine Banden detektiert. Somit ist bei dieser Probe fast der gesamte eingesetzte Antikörper an die Partikel gebunden und es scheint schon eine Sättigung der Bindungsstellen vorzuliegen, da geringe Mengen überschüssiger Antikörper im Überstand detektiert werden. Bei der Probe, bei der 20µg/50µL 18/20Fluo Antikörper eingesetzt worden sind, ist in Reihe 3 des Blots (Überstand) die Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Zudem werden die weiteren Banden wie sie beim geladenen Kontrollantikörper zu sehen sind detektiert. In den Reihen 4, in der die erste Waschfraktion geladen ist, ist sehr schwach eine Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht und es sind die weiteren Banden, wie sie beim geladenen Kontrollantikörper zu sehen sind, sehr schwach vorhanden. des Blots, in denen die Waschfraktionen geladen sind, werden keine Banden detektiert. In den Reihen 5 – 6 des Blots, in denen die weiteren Waschfraktionen geladen sind, werden keine Banden detektiert. Somit liegt hier eine klare Sättigung der Bindungsstellen durch den Antikörper an den Partikeln vor.

Bei der Probe, bei der 2µg/50µL 6/40cFluo Antikörper eingesetzt worden sind, ist in Reihe 3 des Blots (Überstand) eine äußerst schwache Bande in Höhe von ca. 130 kDa zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Ungewöhnlicher Weise ist hier eine weitere äußerst schwache Bande kurz oberhalb von 130 kDa zu erkennen. Diese ist bei allen vorherigen Western-Blots, welche bei den anderen Partikeln durchgeführt worden sind, noch nie in Erscheinung getreten. Diese Bande könnte durch ein anderes Glycosylierungsmuster des Antikörpers hervorgerufen werden, sollte dann aber auch schon in den vorherigen Western-Blots auftauchen. Eine genaue Charakterisierung dieser Bande ist nicht durchgeführt worden. In den Reihen 4 – 6 des Blots, in denen die Waschfraktionen geladen sind, werden keine Banden detektiert. Somit ist bei dieser Probe wahrscheinlich der gesamte eingesetzte Antikörper an die Partikel gebunden.

Bei der Probe, bei der 20µg/50µL 6/40cFluo Antikörper eingesetzt worden sind, ist in Reihe 3 des Blots (Überstand) die Bande in Höhe von ca. 130 kDa deutlich zu erkennen, welche der Bande des unreduzierten monomeren Antikörpers entspricht. Zudem ist hier die Bande, kurz oberhalb von 130 kDa deutlich zu erkennen, wie sie bei der Probe der geringen Antikörperkonzentration beschrieben ist. Diese beiden Banden sind sogar noch in Reihe 4 des Blots (1. Waschfraktion) gut zu erkennen. In den Reihen 5 – 6 des Blots, in denen die weiteren Waschfraktionen geladen sind, werden keine Banden detektiert. Somit liegt hier eine eindeutige Sättigung der Bindungsstellen durch den Antikörper an den Partikeln vor, da im Überstand große Mengen an ungebundenen 6/40cFluo Antikörper detektiert werden. Aus den Ergebnissen der Western-Blots folgt, dass an die [MPGB] Partikel nur eine geringe Menge 18/20Fluo bzw. 6/40cFluo Antikörper gebunden ist.

4.7.2. Bindungsanalyse von [MPGB-AK] Partikeln an Antigen mittels ELISA

Die Bindungseigenschaften der antikörperbeladenen [MPGB] Partikel werden, wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, mittels Sandwich-ELISA analysiert. Hierbei wird überprüft, ob diese in der Lage sind das jeweilige Antigen aus einer Proteinlösung zu binden. Als Proteinlösungen mit unbekannter Antigenkonzentration dienen verdünnte HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Lysate. Die Verdünnungsfaktoren der Lysate sind mittels Verdünnungsreihe im Vorfeld ermittelt worden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Für die Positivkontrolle werden die jeweiligen Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle dienen die unbeladenen [MPGB] Partikel. Die aus einer Dreifachbestimmung erhaltenen Ergebnisse sind in Balkendiagrammen dargestellt, bei denen die Absorptionen bei 450 nm gegen die jeweiligen Partikelproben aufgetragen sind. In Abbildung 51 sind die Ergebnisse des ELISAs mit den antikörperbeladenen [MPGB] Partikeln aufgeführt. In dem Diagramm der gegen CEACAM1 gerichteten Proben ist für den freien Antikörper ein Absorptionswert von $ca. 0,257 \pm 0,013$ zu erkennen. Der Absorptionswert der unbeladenen Partikel liegt bei $0,024 \pm 0,037$. Die Absorptionswerte der antikörperbeladenen Partikelproben liegen deutlich darüber. Die [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikel weisen eine Absorption von $0,157 \pm 0,010$ und die [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikel eine Absorption von $0,098 \pm 0,010$. Damit erreichen die [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikel, korrigiert um den Wert der Negativkontrolle, eine Bindungseffizienz von ca. 52 % und die [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikel entsprechend eine Bindungseffizienz von ca. 29 % im Vergleich zum freien 18/20Fluo Antikörper. Diese Ergebnisse zeigen, dass die mit geringerer Antikörperkonzentration beladenen Partikel mehr Antigen binden als die mit höherer Antikörperkonzentration beladenen Partikel.

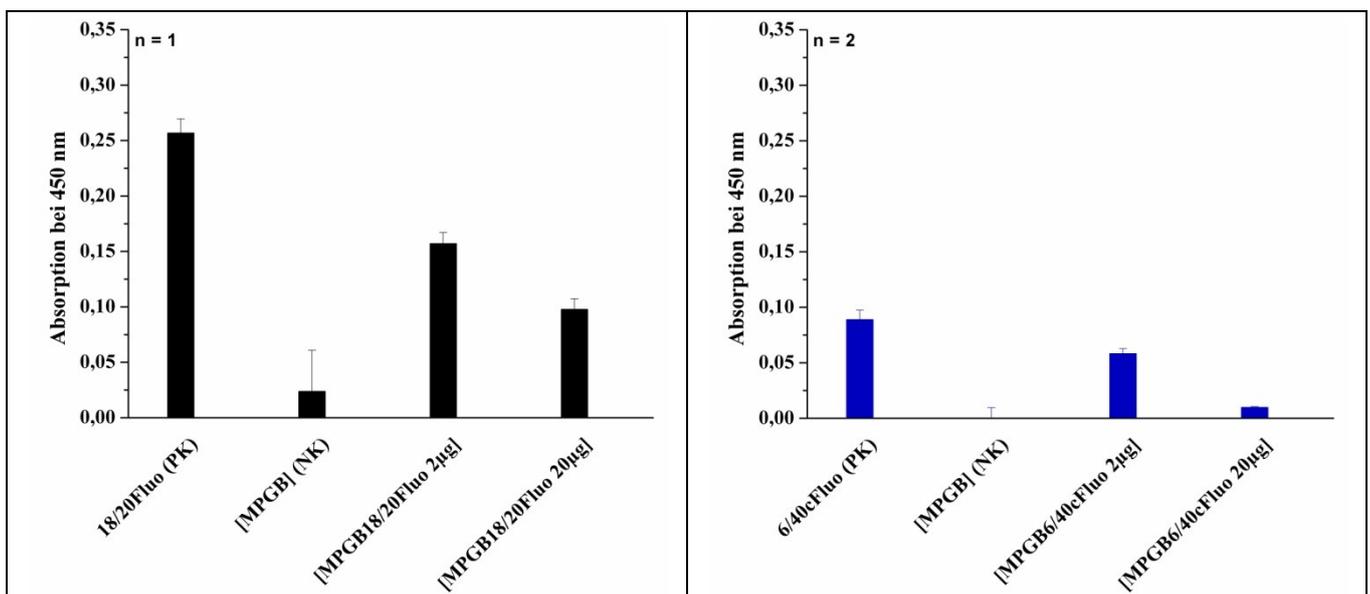


Abbildung 51: Bindung des Antigen durch antikörperbeladene [MPGB] Partikel aus HeLa-CEACAM1 Lysat (schwarz) und HeLa-CEACAM8 Lysat (blau) (PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle).

Bei den gegen CEACAM8 gerichteten Partikeln (Abbildung 51) liefert der freie Antikörper einen Absorptionswert von $0,089 \pm 0,009$ und die unbeladenen Partikel einen Wert von $0 \pm 0,01$. Der Absorptionswert der [MPGB6/40cFluo 2 μ g] Partikel liegt bei $0,058 \pm 0,005$ und der [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikel bei $0,01 \pm 0,001$. Auch diese Partikelproben binden das Antigen und erreichen eine Bindungseffizienz von ca. 65 %, korrigiert um den Wert der Negativkontrolle, für die [MPGB6/40cFluo 2 μ g] Partikel bzw. eine Bindungseffizienz von ca. 11 % für die [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikel im Vergleich zum freien 6/40cFluo Antikörper. Somit binden auch hier die mit geringerer Antikörperkonzentration beladenen Partikel mehr Antigen als die mit höherer Antikörperkonzentration beladenen Partikel.

Die hier erhaltenen Ergebnisse mit den gegen CEACAM1 bzw. CEACAM8 gerichteten [MPGB] Partikeln zeigen, dass diese aufgrund ihrer geringen Größe (ca. 50 nm Durchmesser) sehr gut im ELISA eingesetzt werden können. Die Messungen führen zu eindeutigen und aussagekräftigen Resultaten, wie es bereits in der Literatur für gegen CEACAM5 gerichtete antikörperbeladene Nanopartikel dokumentiert ist.^[90] Die Funktionalität und Spezifität antikörperbeladener [MPGB18/20Fluo] bzw. [MPGB6/40cFluo] Partikel ist damit nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Antigen-Bindungseigenschaften der mit niedrigen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 2 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 2 μ g] Partikel besser sind als die Antigen-Bindungseigenschaften der mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikel. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit den Ergebnissen des Western Blots. Hier kann zwar bereits bei mit niedrigen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 2 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 2 μ g] Partikeln freier Antikörper in den Überständen detektiert werden, aber eine Sättigung der Protein G Bindungsstellen liegt nur bei den mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikeln vor. Die Western-Blot Ergebnisse müssen demnach anders interpretiert werden.

Bei den Proben der niedrigen Antikörperkonzentrationen [MPGB18/20Fluo 2 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 2 μ g] wird eventuell freier Antikörper detektiert, weil sich ein Gleichgewicht von gebundenem zu ungebundenem Antikörper aufgrund der reversiblen Bindung zwischen Antikörper und Protein G einstellt.^[83] Dieses Gleichgewicht liegt mehr auf der Seite des gebundenen Antikörpers, wodurch nur sehr geringe Mengen freier, ungebundener Antikörper detektiert werden. Bei den Proben der hohen Antikörperkonzentrationen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 20 μ g] wird natürlich auch dieser geringe Anteil an freien ungebundenen Antikörper detektiert, jedoch werden die sehr intensiven Banden in den Western-Blots (Überstände) hauptsächlich durch überschüssigen

Antikörper hervorgerufen, der aufgrund der Sättigung der Bindungsstellen an den Partikeln nicht mehr binden kann.

Das umgekehrt proportionale Ergebnis der guten Antigen-Bindung bei mit niedrigen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 2 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 2 μ g] Partikeln gegenüber der schlechten Antigen-Bindung bei mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikeln wird bei den Zellbindungsuntersuchungen der zuvor behandelten [TS] und [SDB] Partikel nicht beobachtet. Eine Erklärung des hier erhaltenen Ergebnisses könnte darin bestehen, dass die Antikörper, bei den mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikeln, nicht mehr optimal zugänglich oder flexibel genug sind, um das jeweilige Antigen zu binden. Dadurch besitzt nicht jeder Antikörper auf der Partikeloberfläche die gleiche Funktionalität. Diese Beobachtung werden unter anderem von Tharakan *et al.* und Orthner *et al.* bei der Entwicklung von antikörperbeladenen Matrices beschrieben. Hier ist festgestellt worden, dass eine geringere Oberflächendichte von Antikörpern zu einer erhöhten Antigenbindungskapazität führt was auf die Reduktion der sterischen Hinderung zurückgeführt wird.^[120,121] Auch Calderon *et al.* beschreiben, dass bei antikörperbeladenen Polystyrol Partikeln eine Reduktion der Antikörperkonzentration zu einer besseren spezifischen Bindung führen kann.^[122]

4.7.3. Untersuchung der [MPGB-AK] Interaktion an Zellen in Suspension

Die Bindungseigenschaften der antikörperbeladenen [MPGB] Partikel werden des Weiteren an Zellsuspensionen untersucht und mittels Durchflusszytometrie analysiert, wie es in Abschnitt 3.5.2.4 beschrieben ist. Hierfür werden HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Zellsuspensionen verwendet. Als Kontrolle und um den Grad unspezifischer Bindung zu ermitteln, werden HeLa Wildtyp Zellsuspensionen eingesetzt. Als weitere Negativkontrolle dienen antikörperfreie Partikel. Die Ergebnisse sind in Form von Dot-Blots zusammengestellt, bei denen die Größe gegen die Granularität aufgetragen ist. Des Weiteren sind die Ergebnisse in Histogrammen dargestellt, bei denen die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz (Median) aufgetragen ist. Die Intensität der relativen Fluoreszenz im Histogramm ist ein Maß für die Markierungseffizienz der Zellen mit einem Fluorochrom. Das heißt, je stärker das Signal der relativen Fluoreszenz ist, desto mehr Fluorophor ist an den Zellen gebunden. Dabei gibt die Intensität der relativen Fluoreszenz der Zellen, die mit anti-Maus FITC Antikörper inkubiert werden, die Stärke der Eigenfluoreszenz der Zellen zusammen mit der Hintergrundfluoreszenz des Antikörpers, die durch unspezifische Bindung hervorgerufen wird, wieder. Die Eigenfluoreszenz, die durch endogene Fluorophore hervorgerufen wird^[89], wird als Referenzsignal bei allen Analysen bestimmt. Nach der Beladung der [MPGB] Partikel mit Antikörpern lassen sich

diese nicht ein weiteres Mal über die magnetische Säule aufreinigen, da nach Elution der Partikel von der Säule Aggregationen auftreten, welche die magnetische Säule verstopfen. Zudem ist eine Aufreinigung über einen normalen Magneten ebenfalls nicht möglich, da sich gezeigt hat, dass das Magnetfeld eines solchen Magneten zu schwach ist, um die [MPGB] Partikel zu pelletieren. Daher ist eine Trennung zwischen freien [MPGB] Partikeln, mit [MPGB] Partikeln markierten Zellen und unmarkierten freien Zellen vor der Analyse im Durchflusszytometer nicht möglich. Eine Unterscheidung dieser Zellen sollte über die Fluoreszenzsignale erreicht werden. Bei Vorliegen von mit [MPGB] Partikeln markierten Zellen und unmarkierten Zellen sollten im Histogramm zwei Peaks mit unterschiedlichen Medianen der relativen Fluoreszenz detektiert werden. Die ungebundenen freien [MPGB] Partikel sollten wegen ihrer Größe im Durchflusszytometer nicht detektiert werden. Es zeigt sich jedoch, dass die Partikelaggregate im Durchflusszytometer detektiert werden. Diese sollten aber aufgrund der Unterschiede in Größe und Granularität mit Hilfe der Dot-Blots von den Zellen zu unterscheiden sein. Zur Auswertung sind die Zellen und die Partikelaggregate in farblichen Gates (Partikel = Rot; Zellen = Blau) unterschieden. Die farbliche Unterscheidung ist in den Histogrammen entsprechend übernommen.

4.7.3.1. [MPGB18/20Fluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellsuspensionen

Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM1 exprimieren, sind die Ergebnisse der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC alleine und der Kombination aus primären Antikörper 18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC in Abbildung 52 und Tabelle 29 mit aufgeführt. Die HeLa Wildtyp Zellen weisen sowohl nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC als auch nach der Kombination aus primären Antikörper 18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf. Ebenso zeigen die HeLa-CEACAM1 Zellen einen Median von 4 nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC. Hier liegt demnach keine unspezifische Bindung einer der Antikörper vor und die Negativkontrollen sind negativ. Die Positivkontrolle mit HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit primären Antikörper 18/20 und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC weist einen Median von 239 auf. Damit ist nachgewiesen, dass die verwendeten Zellen CEACAM1⁺ sind.

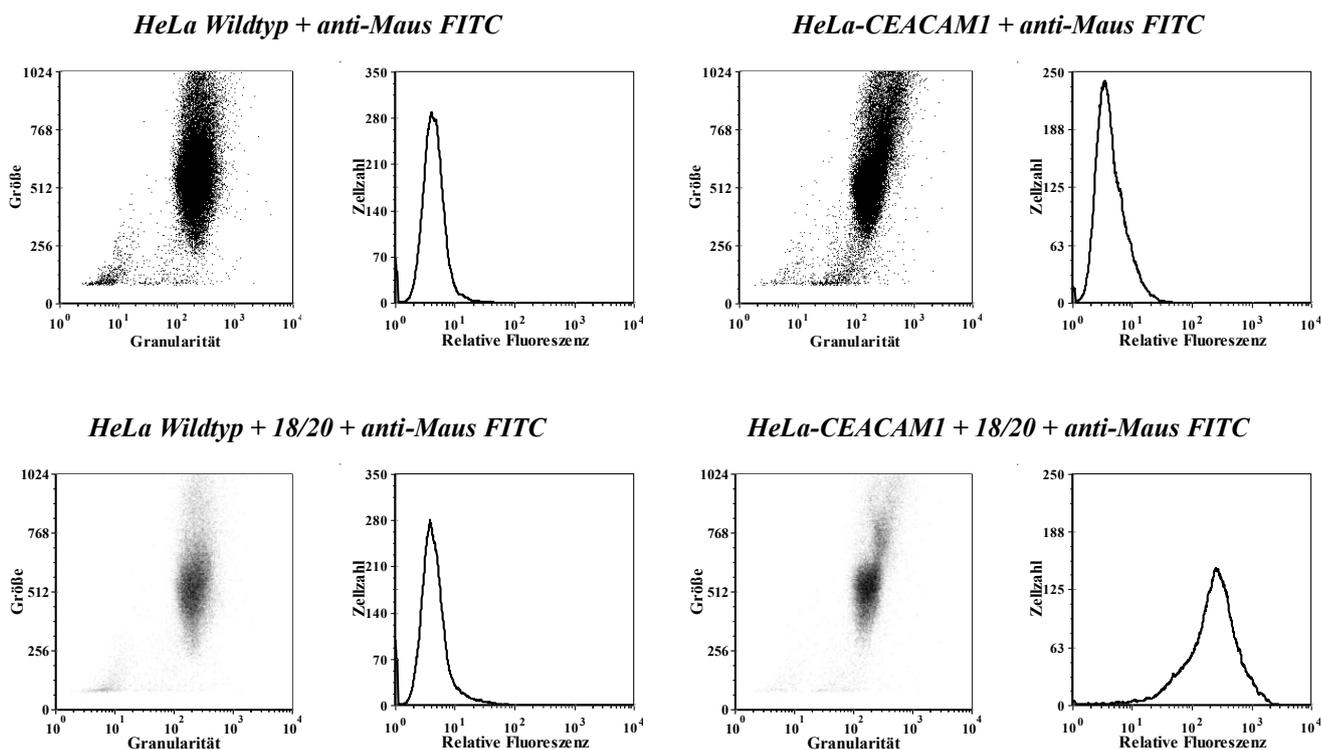


Abbildung 52: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit anti-Maus FITC und 18/20 + anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis der CEACAM1 Expression der Zellen.

Tabelle 29: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>Wildtyp</i>	18/20 + anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>CEACAM1</i>	18/20 + anti-Maus FITC	239 (100 %)

Die Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Messungen der Bindung antikörperfreier [MPGB] und antikörperbeladener [MPGB18/20Fluo 2 μ g] bzw. [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikel an HeLa Wildtyp bzw. HeLa-CEACAM1 Zellsuspensionen sind in Abbildung 53 aufgeführt. Ergänzend sind die Mediane der relativen Fluoreszenz und der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen in Tabelle 30 zusammengefasst. Die bereits erwähnten Partikelaggregate rufen nur in den Dot-Blots ein auswertbares Signal hervor, bei denen Zellen mit den antikörperbeladenen [MPGB18/20Fluo] Partikeln inkubiert worden sind. Hier werden sie durch eine klare Signalwolke detektiert, die in den Histogrammen sehr hohe Fluoreszenzintensitäten mit Medianen von 813 bzw. 982 bei den [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln und Medianen von 3191 bzw. 2502 bei den [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln aufweisen (Tabelle 30).

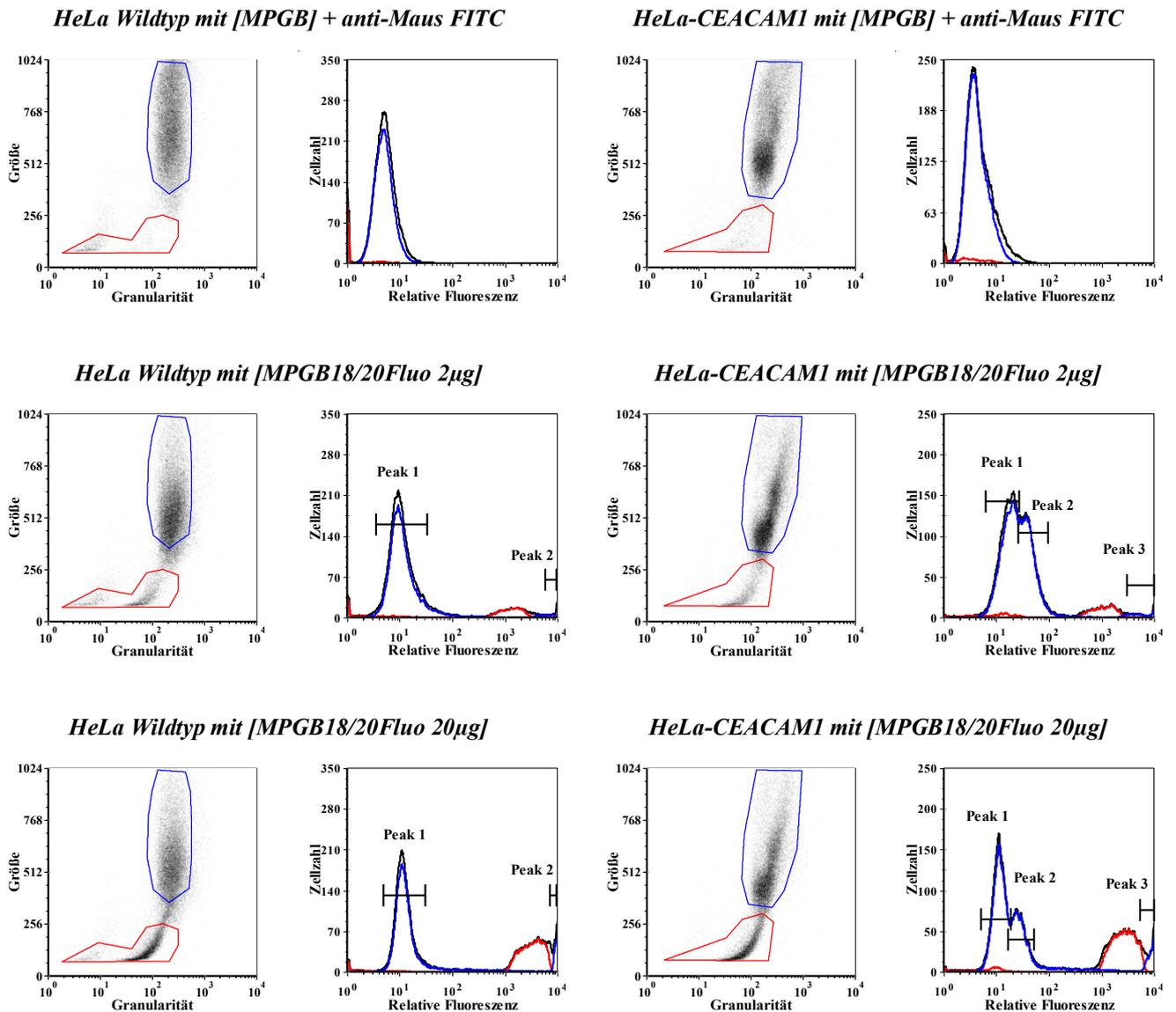


Abbildung 53: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit [MPGB], [MPGB18/20Fluo 2µg] und [MPGB18/20Fluo 20µg] Partikeln. (Rot: Partikel; Blau: Zellen; Schwarz: Gesamtsignal).

Tabelle 30: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Partikel	Relative Fluoreszenz (Median)			
		der Partikel	der Zellen – Peak 1	der Zellen – Peak 2	der Zellen – Peak 3
HeLa Wildtyp	[MPGB] + anti-Maus FITC	1	5 (100 %)	-	-
	[MPGB18/20Fluo 2µg]	982	10 (99 %)	7844 (1 %)	-
	[MPGB18/20Fluo 20µg]	3191	11 (92 %)	8505 (8 %)	-
HeLa CEACAM1	[MPGB] + anti-Maus FITC	3	4 (100 %)	-	-
	[MPGB18/20Fluo 2µg]	813	17 (56 %)	40 (42 %)	5573 (2 %)
	[MPGB18/20Fluo 20µg]	2502	11 (59 %)	26 (32 %)	7432 (9 %)

Diese Fluoreszenzintensitäten zeigen außerdem eine Konzentrationsabhängigkeit, da die Intensität bei den mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln höher ist. Somit ist die Bindung des Antikörpers 18/20Fluo an die [MPGB] Partikel erfolgreich gewesen und bestätigt die Ergebnisse der Western-Blots und des ELISA's. Die unbeladenen [MPGB] Partikel werden aufgrund ihrer Größe nicht detektiert. Die hier auftretenden minimalen Signale werden durch Zelltrümmer hervorgerufen.

Die HeLa Wildtyp Zellen, die mit unbeladenen [MPGB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen nur Eigenfluoreszenz mit einem Median von 5. Bei den HeLa Wildtyp Zellen, welche mit antikörperbeladenen [MPGB] Partikeln inkubiert worden sind, lassen sich im Histogramm dagegen zwei Peaks zuordnen. Hier zeigen 99 % (Peak 1) der Zellen, die mit [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 10, welche durch freie Zellen und Zellen mit vereinzelt unspezifisch gebundenen Partikeln hervorgerufen wird. Die restlichen 1 % (Peak 2) dieser HeLa Wildtyp Zellen weisen eine extrem hohe Fluoreszenzintensität mit einem Median von 7844 auf. Hierbei handelt es sich um Zellen mit internalisierten [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln, wie es bei Nanopartikel mit einer Größe bis zu 200 nm beschrieben ist.^[89,123,124] Bei den mit [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln inkubierten HeLa Wildtyp Zellen weisen 92 % (Peak 1) eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 11 auf, welche durch freie Zellen und Zellen mit vereinzelt unspezifisch gebundenen Partikeln hervorgerufen wird. Die restlichen 8 % (Peak 2) dieser HeLa Wildtyp Zellen weisen eine extrem hohe Fluoreszenzintensität mit einem Median von 8505 auf. Hierbei handelt es sich um Zellen mit internalisierten [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln.^[89,123,124]

Die HeLa-CEACAM1 Zellen, die mit unbeladenen [MPGB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen nur Eigenfluoreszenz mit einem Median von 4. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen, welche mit antikörperbeladenen [MPGB] Partikeln inkubiert worden sind, lassen sich in den Histogrammen drei Peaks zuordnen. Hier zeigen 56 % (Peak 1) der Zellen, die mit [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 17, welche durch freie Zellen und Zellen mit vereinzelt unspezifisch gebundenen Partikeln hervorgerufen wird. Weiter weisen 2 % (Peak 3) dieser HeLa-CEACAM1 Zellen eine, durch internalisierte [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln hervorgerufene, extrem hohe Fluoreszenzintensität mit einem Median von 5573 auf.^[89,123,124] Die restlichen 42 % (Peak 2) der Zellen zeigen eine erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 40. Hierbei handelt es sich um HeLa-CEACAM1 Zellen, an welche die [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikel spezifisch antikörpervermittelt gebunden sind. Bei den mit [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM1 Zellen zeigen 59 % (Peak 1) der Zellen eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 11, welche durch freie Zellen

und Zellen mit vereinzelt unspezifisch gebundenen Partikeln hervorgerufen wird. Weiter weisen 9 % (Peak 3) dieser HeLa-CEACAM1 Zellen eine extrem hohe Fluoreszenzintensität mit einem Median von 7432 auf. Hierbei handelt es sich um Zellen mit internalisierten [MPGB18/20Fluo 20µg] Partikeln.^[89,123,124] Die restlichen 32 % (Peak 2) der Zellen zeigen eine erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 26. Hierbei handelt es sich um HeLa-CEACAM1 Zellen, an welche die [MPGB18/20Fluo 20µg] spezifisch antikörpervermittelt gebunden sind.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Zell-Bindungseigenschaften der mit niedrigen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 2µg] Partikel besser sind als die Zell-Bindungseigenschaften der mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20µg] Partikel. Diese bestätigen die Ergebnisse des ELISA's. Zudem stimmen die hier erhaltenen Ergebnisse der spezifisch antikörpervermittelt gebunden [MPGB18/20Fluo 2µg] bzw. [MPGB18/20Fluo 20µg] Partikel gut mit den Ergebnissen von Cotoure *et al.* überein, die eine erfolgreiche Bindung von mit Shiga Toxin B Untereinheiten (STxB) beladenen Mikrobläschen an HT29 Zellen zeigen, welche mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen wird.^[103] Darüber hinaus zeigen die [MPGB18/20Fluo 2µg] bzw. [MPGB18/20Fluo 20µg] Partikel bessere Zell-Bindungseigenschaften, als sie von Peldschus *et al.* für gegen CEACAM5 gerichtete SPIO Partikel mit Medianen der relativen Fluoreszenz von 7 – 12 berichtet werden.^[90]

4.7.3.2. [MPGB6/40cFluo] Bindung an HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellsuspensionen

Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM8 exprimieren, sind die Ergebnisse der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC alleine und der Kombination aus primären Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC in Abbildung 54 und Tabelle 31 mit aufgeführt. Die HeLa Wildtyp Zellen weisen sowohl nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC als auch nach der Kombination aus primären Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC eine relative Fluoreszenz mit einem Median von ca. 4 auf. Ebenso zeigen die HeLa-CEACAM8 Zellen einen Median von 4 nach der alleinigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Maus FITC. Hier liegt demnach keine unspezifische Bindung einer der Antikörper vor und die Negativkontrollen sind negativ. Die Positivkontrolle mit HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Inkubation mit primären Antikörper 6/40c und sekundärem Antikörper anti-Maus FITC weist einen Median von 155 auf. Damit ist nachgewiesen, dass die verwendeten Zellen CEACAM8⁺ sind.

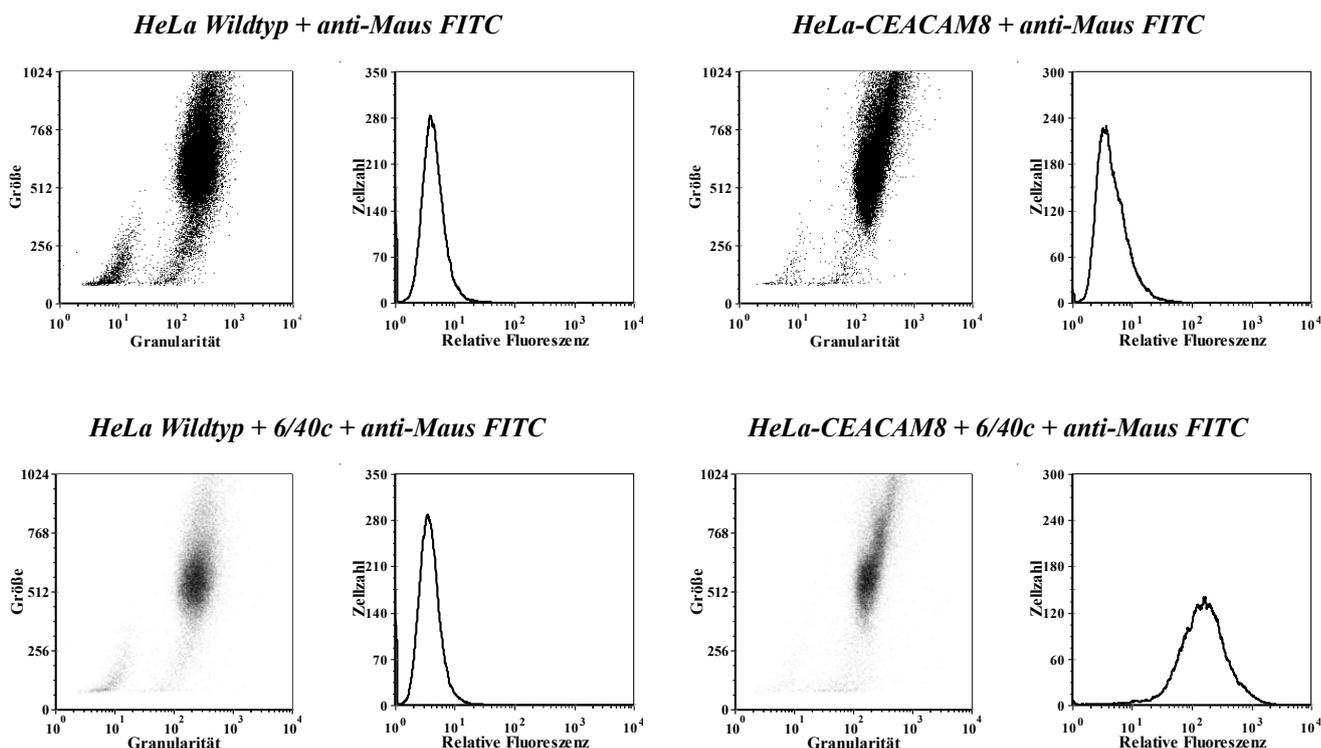


Abbildung 54: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 mit anti-Maus FITC und 6/40c + anti-Maus FITC Antikörper zum Nachweis der CEACAM8 Expression der Zellen.

Tabelle 31: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

<i>Zelllinie</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Relative Fluoreszenz (Median) der Zellen</i>
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>Wildtyp</i>	6/40c + anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>HeLa</i>	anti-Maus FITC	4 (100 %)
<i>CEACAM8</i>	6/40c + anti-Maus FITC	155 (100 %)

Die Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Messungen der Bindung antikörperfreier [MPGB] und antikörperbeladener [MPGB6/40cFluo 2 μ g] bzw. [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikel an HeLa Wildtyp bzw. HeLa-CEACAM8 Zellsuspensionen sind in Abbildung 55 aufgeführt. Ergänzend sind die Mediane der relativen Fluoreszenz und der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen in Tabelle 32 zusammengefasst. Die bereits erwähnten Partikelaggregate rufen in den Dot-Blots, bei denen Zellen mit den antikörperbeladenen [MPGB6/40cFluo] Partikeln inkubiert worden sind, geringe Signale hervor. Somit liegen hier nicht besonders viele Partikelaggregate vor, wie es auch die geringen Partikelzahlen in den Histogrammen bestätigen. Diese wenigen Partikelaggregate zeigen in den Histogrammen aber sehr hohe Fluoreszenzintensitäten mit Medianen von 219 bzw. 523 bei den [MPGB6/40cFluo 2 μ g] Partikeln und Medianen von 820 bzw. 1298 bei den [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikeln (Tabelle 32).

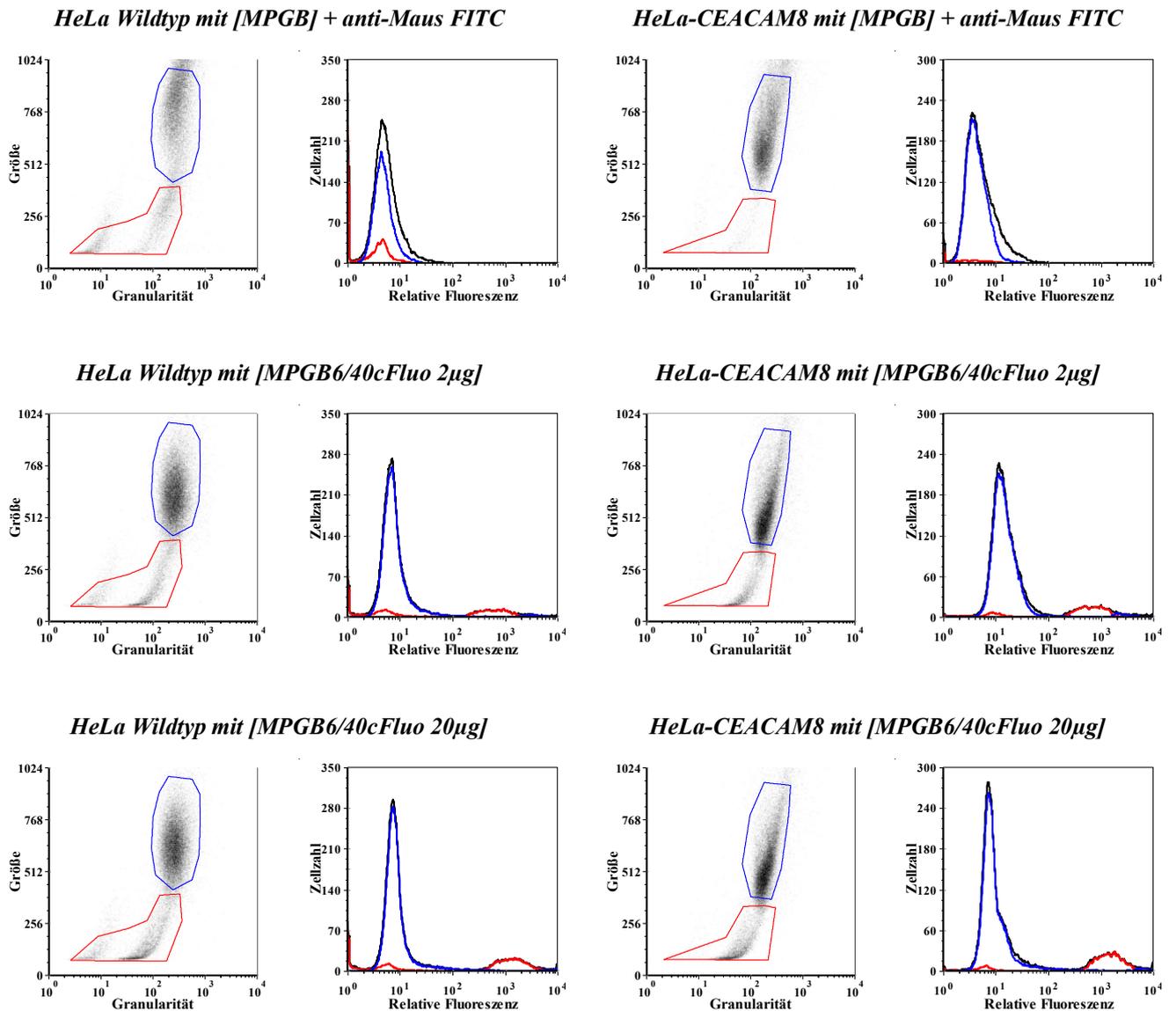


Abbildung 55: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 mit [MPGB], [MPGB6/40cFluo 2µg] und [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln. (Rot: Partikel; Blau: Zellen).

Tabelle 32: Median der relativen Fluoreszenz resultierend aus den durchflusszytometrischen Analysen. In Klammern ist der prozentuale Anteil der signalhervorrufenden Zellen aufgeführt.

Zelllinie	Partikel	Relative Fluoreszenz (Median)	
		der Partikel	der Zellen
HeLa Wildtyp	[MPGB] + anti-Maus FITC	4	5 (100 %)
	[MPGB6/40cFluo 2µg]	219	7 (100 %)
	[MPGB6/40cFluo 20µg]	820	8 (100 %)
HeLa CEACAMI	[MPGB] + anti-Maus FITC	3	4 (100 %)
	[MPGB6/40cFluo 2µg]	523	14 (100 %)
	[MPGB6/40cFluo 20µg]	1298	8 (100 %)

Diese Fluoreszenzintensitäten zeigen außerdem eine Konzentrationsabhängigkeit, da die Intensität bei den mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln höher ist. Somit ist die Bindung des Antikörpers 6/40cFluo an die [MPGB] Partikel erfolgreich gewesen und bestätigt die Ergebnisse der Western-Blots und des ELISA's. Die unbeladenen [MPGB] Partikel werden aufgrund ihrer Größe nicht detektiert. Die hier auftretenden minimalen Signale werden durch Zelltrümmer hervorgerufen.

Die HeLa Wildtyp Zellen, die mit unbeladenen [MPGB] Partikeln inkubiert worden sind, zeigen nur Eigenfluoreszenz mit einem Median von 5. Bei den HeLa Wildtyp Zellen, welche mit [MPGB6/40cFluo 2µg] Partikeln inkubiert worden sind, zeigt sich eine nicht signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 7, welche durch Zellen mit vereinzelt unspezifisch gebundenen Partikeln hervorgerufen wird. Bei den mit [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln inkubierten HeLa Wildtyp Zellen tritt ebenso eine nicht signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 8 auf, welche durch Zellen mit vereinzelt unspezifisch gebundenen Partikeln hervorgerufen wird.

Die HeLa-CEACAM8 Zellen zeigen ähnliche Ergebnisse. Die mit unbeladenen [MPGB] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM8 Zellen zeigen nur Eigenfluoreszenz mit einem Median von 4. Bei den HeLa-CEACAM8 Zellen, welche mit [MPGB6/40cFluo 2µg] Partikeln inkubiert worden sind, zeigt sich eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 14, welche möglicherweise durch spezifisch an Zellen gebundene Partikeln hervorgerufen wird. Bei den mit [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM8 Zellen tritt eine nicht signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität mit einem Median von 8 auf. Ob diese Fluoreszenzerhöhung durch Zellen mit spezifisch gebundenen oder unspezifisch gebundenen Partikeln hervorgerufen wird, kann aufgrund dieser sehr geringen Änderung in der Fluoreszenzintensität nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass womöglich eine antikörpervermittelte Zellbindung nur mit [MPGB6/40cFluo 2µg] Partikeln erreicht worden ist. Dieses kann für die [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikel nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Die ermittelten Mediane der relativen Fluoreszenz, der mit [MPGB6/40cFluo 2µg] bzw. [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln inkubierten HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen, liegen zwar in der Größenordnung, der von Peldschus *et al.* ermittelten Mediane, jedoch eben auch für HeLa Wildtyp Zellen, wodurch dies eher auf eine unspezifische Bindung der Partikel an HeLa Wildtyp Zellen hindeutet.^[90] Allerdings stimmen diese Ergebnisse von der Tendenz her gut mit den Ergebnissen der mit 18/20Fluo beladenen [MPGB] Partikeln überein und spiegeln somit auch die Ergebnisse des ELISA's wieder, jedoch verhindern die anscheinend sehr schlechten Bindungseigenschaften dieser [MPGB6/40cFluo 2µg] bzw. [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikel aussagekräftigere Ergebnisse.

4.7.4. Untersuchung der [MPGB-AK] Bindung an adhärenzte Zell-Monolayer

Die weitere Untersuchung der Bindungseigenschaften antikörperbeladener [MPGB] Partikel wird an auf Deckgläschen gewachsenen Zellen durchgeführt, wie es in Abschnitt 3.6.2 beschrieben ist. Für die Untersuchungen werden HeLa-CEACAM1 und HeLa-CEACAM8 Zellen mit den jeweiligen Partikelproben inkubiert. Als Kontrolle und um den Grad unspezifischer Bindung zu ermitteln, werden HeLa Wildtyp Zellen eingesetzt. Die Analyse erfolgt bei 200facher Vergrößerung an einem Leica TCS SPE Mikroskop (CLSM), indem die Fluoreszenz im Spektralbereich von 505 nm – 525 nm für Fluorescein (Grün) detektiert wird. Parallel werden Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph) durchgeführt.

4.7.4.1. [MPGB18/20Fluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen

In Abbildung 56 sind die CLSM Aufnahmen der Bindung von [MPGB], [MPGB18/20Fluo 2 μ g] und [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen aufgeführt. Als Positivkontrolle dient die Inkubation mit dem primären Antikörper 18/20 und dessen Detektion mit dem sekundären Antikörper. Die Aufnahmen der Zellen, die mit dem 18/20 Antikörper inkubiert worden sind, zeigen, dass bei den HeLa Wildtyp Zellen keine Fluoreszenz detektiert wird. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen ist dagegen eine deutliche Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell Kontakten erkennbar. Die Negativkontrolle ist bei beiden erwartungsgemäß negativ. Dies zeigt, dass die Zellen CEACAM1⁺ sind und der Antikörper nur spezifisch an die CEACAM1 exprimierenden Zellen bindet. Demnach sollte bei einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Antikörpern eine vergleichbare Fluoreszenzfärbung auftreten. Da die Partikel für eine Detektion im Phasenkontrast des CLSM's zu klein sind, können sie nur über Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzaufnahmen der HeLa Wildtyp Zellen zeigen, dass weder nach der Inkubation mit antikörperfreien [MPGB] Partikeln noch nach der Inkubation mit antikörperbeladenen [MPGB18/20Fluo 2 μ g] und [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln Fluoreszenz zu erkennen ist. Auch in der Überlagerung (Ph/Grün) ist keine Fluoreszenz zu erkennen. Demnach liegt keine unspezifische Bindung der [MPGB] Partikel vor. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen, die mit antikörperfreien [MPGB] Partikeln inkubiert worden sind, weist die Fluoreszenzaufnahme, wie zu erwarten, kein Fluoreszenz auf. Bei den HeLa-CEACAM1 Zellen, die mit [MPGB18/20Fluo 2 μ g] und [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, sind die Partikel über die Fluoreszenz sehr gut zu erkennen. Zusätzlich zeigt die Überlagerung der beiden Aufnahmen (Ph/Grün), dass die Partikel hauptsächlich an den Zell-Zell Kontakten lokalisiert sind. Im Vergleich der HeLa Wildtyp und der HeLa-CEACAM1 Aufnahmen, ist ein signifikanter Unterschied in der detektierbaren Zahl der Partikel zu erkennen, so dass eine spezifische antikörpervermittelte Bindung von [MPGB18/20Fluo 2 μ g] und [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln an den Zellen vorliegt.

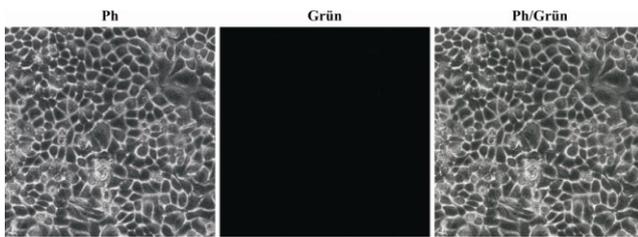
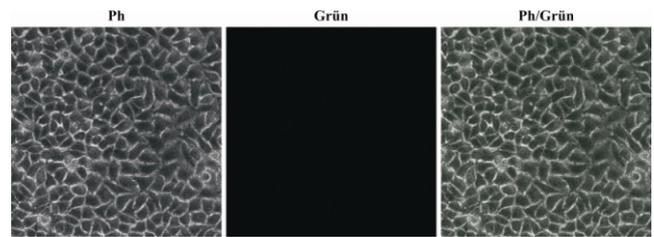
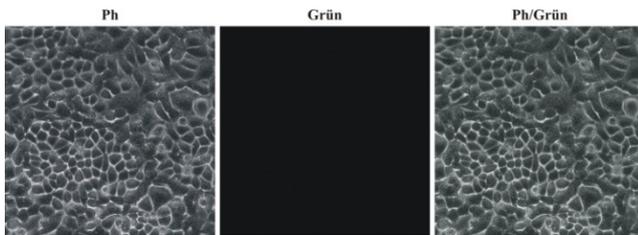
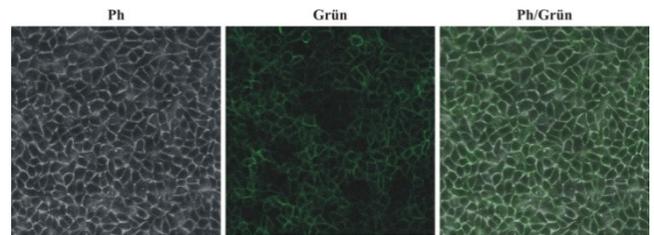
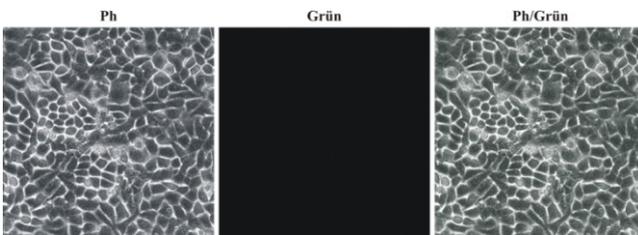
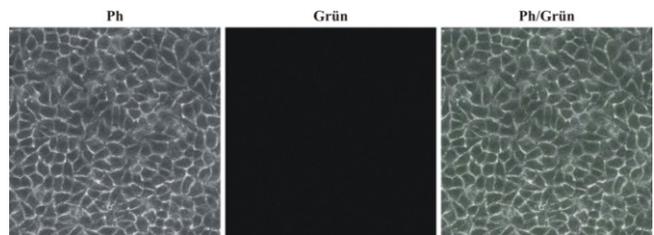
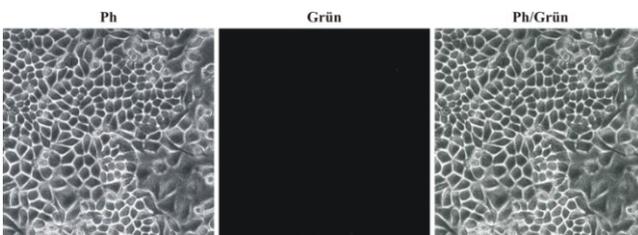
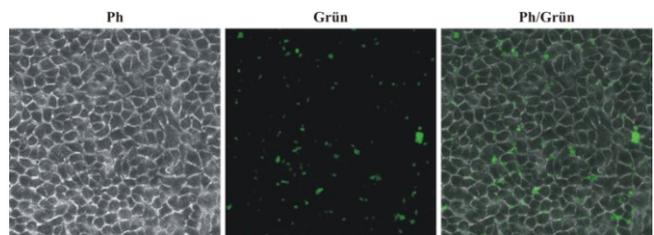
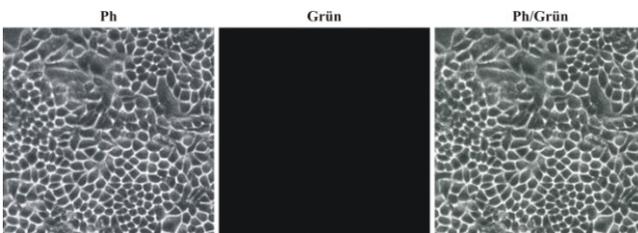
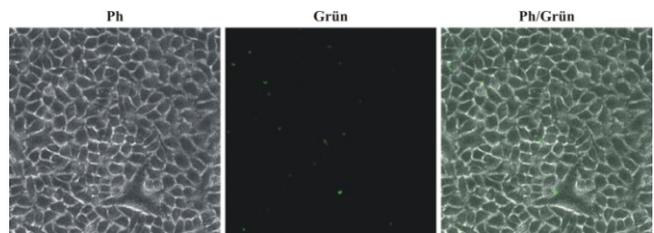
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC**HeLa-CEACAM1 + anti-Maus FITC****HeLa Wildtyp + 18/20 + anti-Maus FITC****HeLa-CEACAM1 + 18/20 + anti-Maus FITC****HeLa Wildtyp mit [MPGB] + anti-Maus FITC****HeLa-CEACAM1 mit [MPGB] + anti-Maus FITC****HeLa Wildtyp mit [MPGB18/20Fluo 2µg]****HeLa-CEACAM1 mit [MPGB18/20Fluo 2µg]****HeLa Wildtyp mit [MPGB18/20Fluo 20µg]****HeLa-CEACAM1 mit [MPGB18/20Fluo 20µg]**

Abbildung 56: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [MPGB], [MPGB18/20Fluo 2µg] und [MPGB18/20Fluo 20µg] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Somit stimmen diese Ergebnisse gut mit den Ergebnissen von Peldschus *et al.* für gegen CEACAM5 gerichtete SPIO Partikel und mit den Ergebnissen von Cotoure *et al.* für Shiga Toxin B Untereinheiten (STxB) beladene Mikrobläschen überein.^[90,103] Es ist zudem zu erkennen, dass bei den Zellen, die mit

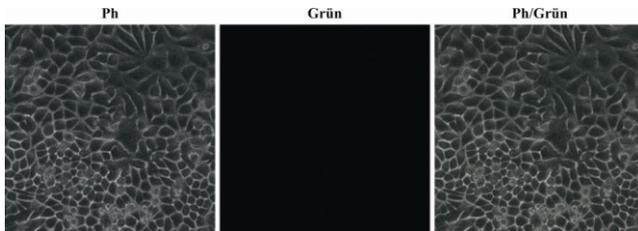
[MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln inkubiert worden sind, mehr Partikel an den Zellen gebunden sind als bei den mit [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM1 Zellen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Zell-Bindungseigenschaften der mit niedrigen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikel besser sind als die Zell-Bindungseigenschaften der mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikel. Dies bestätigt die Ergebnisse des ELISA's und der Durchflusszytometrie. Die guten Bindungseigenschaften der mit niedrigen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln gegenüber der schlechteren Zellbindung bei mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln könnte bei den Zellbindungsuntersuchungen der ebenfalls untersuchten [TS] und [SDB] Partikel nicht beobachtet werden. Eine Erklärung des hier erhaltenen Ergebnisses könnte darin bestehen, dass die Antikörper, bei den mit hohen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln, nicht mehr optimal zugänglich oder flexibel genug sind, um das jeweilige Antigen zu binden. Dadurch besitzt nicht jeder Antikörper auf der Partikeloberfläche die gleiche Funktionalität. Diese Beobachtungen werden unter anderem von Tharakan *et al.* und Orthner *et al.* bei der Entwicklung von antikörperbeladenen Matrices beschrieben. Hier ist festgestellt worden, dass eine geringere Oberflächendichte von Antikörpern zu einer erhöhten Antigenbindungskapazität führt was auf die Reduktion der sterischen Hinderung zurückgeführt wird.^[120,121] Auch Calderon *et al.* beschreiben, dass bei antikörperbeladenen Polystyrol Partikeln eine Reduktion der Antikörperkonzentration zu einer besseren spezifischen Bindung führen kann.^[122]

4.7.4.2. [MPGB6/40cFluo] Bindung an konfluente HeLa Wildtyp/CEACAM8 Zellen

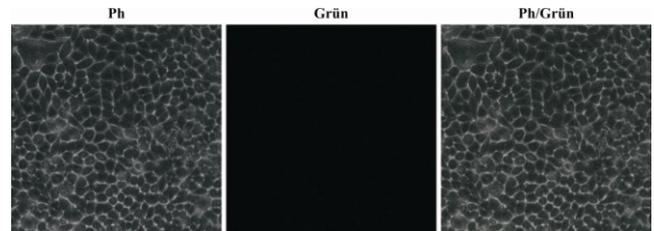
Die Ergebnisse der Bindung von [MPGB], [MPGB6/40cFluo 2 μ g] und [MPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikeln an HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen sind in Abbildung 57 dargestellt. Zum Nachweis, dass die verwendeten Zellen CEACAM8 exprimieren, sind sie alleine mit dem sekundären Antikörper anti-Maus FITC als Negativkontrolle inkubiert worden. Als Positivkontrolle dient die Inkubation mit dem primären Antikörper 6/40c und dessen Detektion mit dem sekundären Antikörper. Die mit dem 6/40c Antikörper inkubierten HeLa-Wildtyp Zellen zeigen in den CLSM Aufnahmen keine Fluoreszenz. Bei den HeLa-CEACAM8 Zellen ist dagegen Fluoreszenzfärbung sowohl an den Zell-Zell Kontakten als auch auf den Zellen selbst detektierbar. Die Negativkontrolle ist erwartungsgemäß negativ. Dies zeigt, dass die Zellen CEACAM8⁺ sind und der Antikörper nur spezifisch an die CEACAM8 exprimierenden Zellen bindet. Zudem wird deutlich, dass das CEACAM8 vermehrt apikal exprimiert wird. Bei einer erfolgreichen Beladung der Partikel mit Antikörpern sollte eine vergleichbare Fluoreszenzfärbung auftreten. Die Partikel sind für eine

Detektion im Phasenkontrast des CLSM's zu klein, so dass sie nur über Fluoreszenz nachgewiesen werden können.

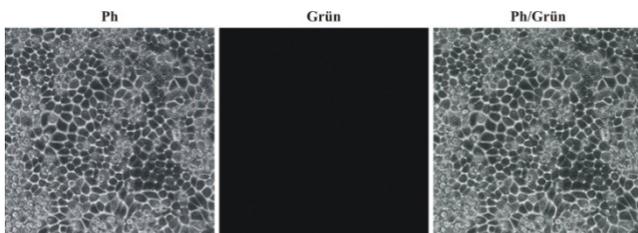
HeLa Wildtyp + anti-Maus FITC



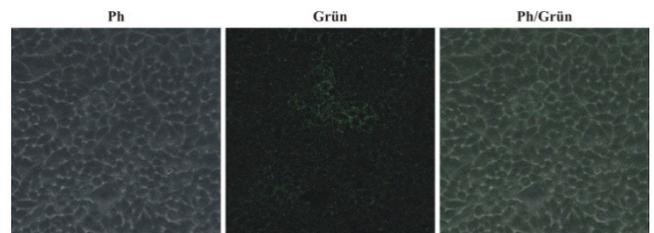
HeLa-CEACAM8 + anti-Maus FITC



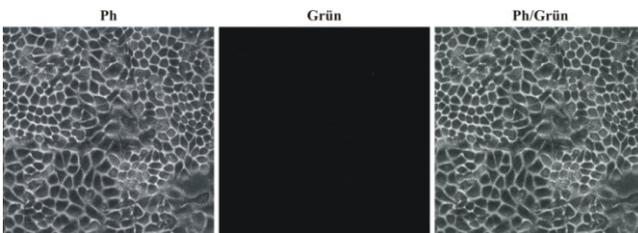
HeLa Wildtyp + 6/40c + anti-Maus FITC



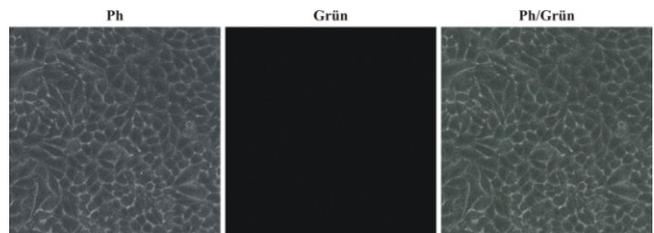
HeLa-CEACAM8 + 6/40c + anti-Maus FITC



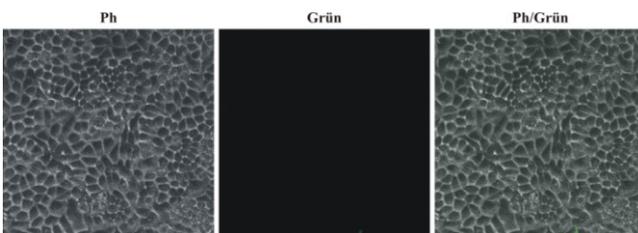
HeLa Wildtyp mit [MPGB] + anti-Maus FITC



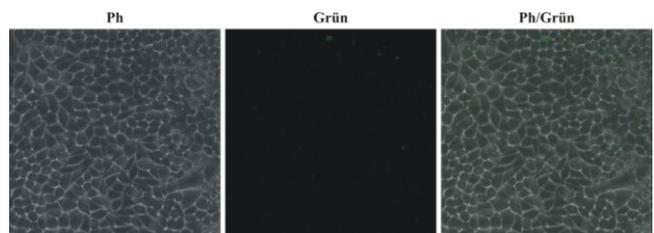
HeLa-CEACAM8 mit [MPGB] + anti-Maus FITC



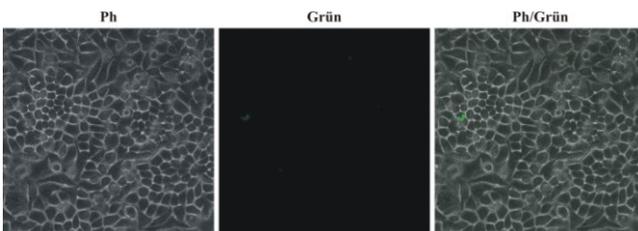
HeLa Wildtyp mit [MPGB6/40cFluo 2µg]



HeLa-CEACAM8 mit [MPGB6/40cFluo 2µg]



HeLa Wildtyp mit [MPGB6/40cFluo 20µg]



HeLa-CEACAM8 mit [MPGB6/40cFluo 20µg]

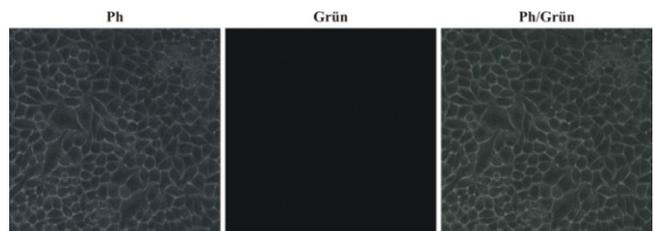


Abbildung 57: CLSM Aufnahmen von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Inkubation mit [MPGB], [MPGB6/40cFluo 2µg] und [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln. Dargestellt sind die Aufnahmen im Phasenkontrast (Ph), im Spektralbereich von 505-525 nm (Grün) und der Überlagerung (Ph/Grün).

Die Fluoreszenzaufnahmen der HeLa Wildtyp Zellen zeigen, dass weder bei den mit [MPGB] Partikeln noch bei den antikörperbeladenen [MPGB6/40cFluo 2µg] Partikeln Fluoreszenz und somit Partikel detektiert werden. Lediglich bei den Zellen, die mit [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln inkubiert worden sind, treten vereinzelt Fluoreszenzsignale auf. Diese vereinzelt Partikel sind unspezifisch an die Zellen gebunden und sind durch die Waschschriffe nicht entfernt worden. Somit werden die Ergebnisse der durchflusszytometrische Analyse hiermit bestätigt. Auch bei den mit antikörperfreien [MPGB] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM8 Zellen weisen die Fluoreszenzaufnahmen wie zu erwarten keine Fluoreszenzsignale auf. Ebenso wird keine Fluoreszenz in den Aufnahmen der mit [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikeln inkubierten HeLa-CEACAM8 Zellen detektiert. Lediglich bei den Zellen, die mit [MPGB6/40cFluo 2µg] Partikeln inkubiert worden sind, treten vereinzelt Fluoreszenzsignale auf. Hierbei könnte es sich um spezifisch an die Zellen gebundene Partikel handeln. Auch diese Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen der durchflusszytometrische Analyse überein und zeigen, dass womöglich eine antikörpervermittelte Zellbindung nur mit [MPGB6/40cFluo 2µg] Partikeln erreicht worden ist. Dieses kann für die [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikel nicht bestätigt werden, da diese Ergebnisse hier negativ sind. Auch diese Ergebnisse stimmen von der Tendenz her gut mit den Ergebnissen der mit 18/20Fluo beladenen [MPGB] Partikeln überein und spiegeln die Ergebnisse des ELISA´s und der Durchflusszytometrie wieder. Jedoch verhindern die anscheinend sehr schlechten Bindungseigenschaften dieser [MPGB6/40cFluo 2µg] bzw. [MPGB6/40cFluo 20µg] Partikel aussagekräftigere Ergebnisse. Im Vergleich mit den Ergebnissen von Peldschus *et al.* für gegen CEACAM5 gerichtete SPIO Partikel und mit den Ergebnissen von Cotoure *et al.* für Shiga Toxin B Untereinheiten (STxB) beladene Mikrobläschen, zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse eine deutlich schlechtere Bindung.^[90,103]

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der antikörperbeladenen [MPGB] Partikel, dass das kovalent gebundene Protein G auf der Partikeloberfläche zu keiner signifikanten unspezifischen Bindung der Partikel führt, wie es nach den Ergebnissen mit den antikörperbeladenen [RPGb] Partikeln angenommen worden ist. Zudem zeigt es sich, dass die Dextranpolymermatrix der [MPGB] Partikel tatsächlich eine hohe Resistenz gegenüber Protein- und Zelladsorptionen aufweist, wie es bei Farrell *et al.* beschrieben wird.^[119] Von den Bindungseigenschaften her zeigen die [MPGB18/20Fluo] Partikel ähnlich gute Eigenschaften wie die [TS18/20Fluo] Partikel, jedoch wesentlich schlechtere als die [CD31 MicroBead] Partikel und antikörperbeladene [SDB-AK] Partikel. Dies zeigt, dass die Ausrichtung der Antikörper mit den F(ab)₂-Fragmente in die Peripherie über die Bindung an Protein G keine Verbesserung der Bindungseigenschaften hervorruft. Vielmehr scheint die freie Beweglichkeit der Antikörper und ein gewisser Abstand dieser von der Partikeloberfläche einen weitaus größeren Einfluss auf die Bindungseigenschaften zu haben. Dies zeigen auch die Untersuchungen von

Maruyama *et al.* bei der die Einführung eines Polyethylenglycol-Linkers zu verbesserten Antigenerkennung führt.^[125]

5. Diskussion

Die Entwicklung CEACAM1-bindender Partikel als Markersystem für die molekulare Bildgebung, insbesondere für die ultraschallbasierte Visualisierung des Prostatakarzinoms, war Ziel dieser Arbeit. Da eine frühzeitige und gesicherte Diagnose für eine erfolgreiche Tumorbehandlung und positive Prognose für den Patienten entscheidend ist, wäre eine Markierung in dem sehr frühen Tumorstadium der Neoangiogenese erstrebenswert. Im Stadium der Neoangiogenese bildet der Tumor neue Blutgefäße aus, indem er Neovaskulation induziert. Dies geschieht unter anderem über die Expression von Neoangiogenesemarkern, welche sich somit als optimale Zielmoleküle für eine frühzeitige Detektion anbieten. In Endothelzellen ist CEACAM1 ein Neoangiogenesemarker, dessen Expression in den neugebildeten Tumorblutgefäßen zu finden ist.^[41] Somit würde eine Markierung dieses Proteins das mikrovaskuläre Gefäßbett eines Tumors zuverlässig darstellen, wozu die heutigen Bildgebungstechniken noch nicht in der Lage sind.^[25] Die Limitationen in der Bildauflösung sind allerdings nicht durch die Technik selbst, sondern durch die molekularen Marker bedingt. Sie stellen den limitierenden Faktor dar, da sie vielfältige Eigenschaften erfüllen müssen, um als molekulare Marker geeignet zu sein. Einige dieser Eigenschaften sind in der Abbildung 58 beispielhaft aufgeführt.

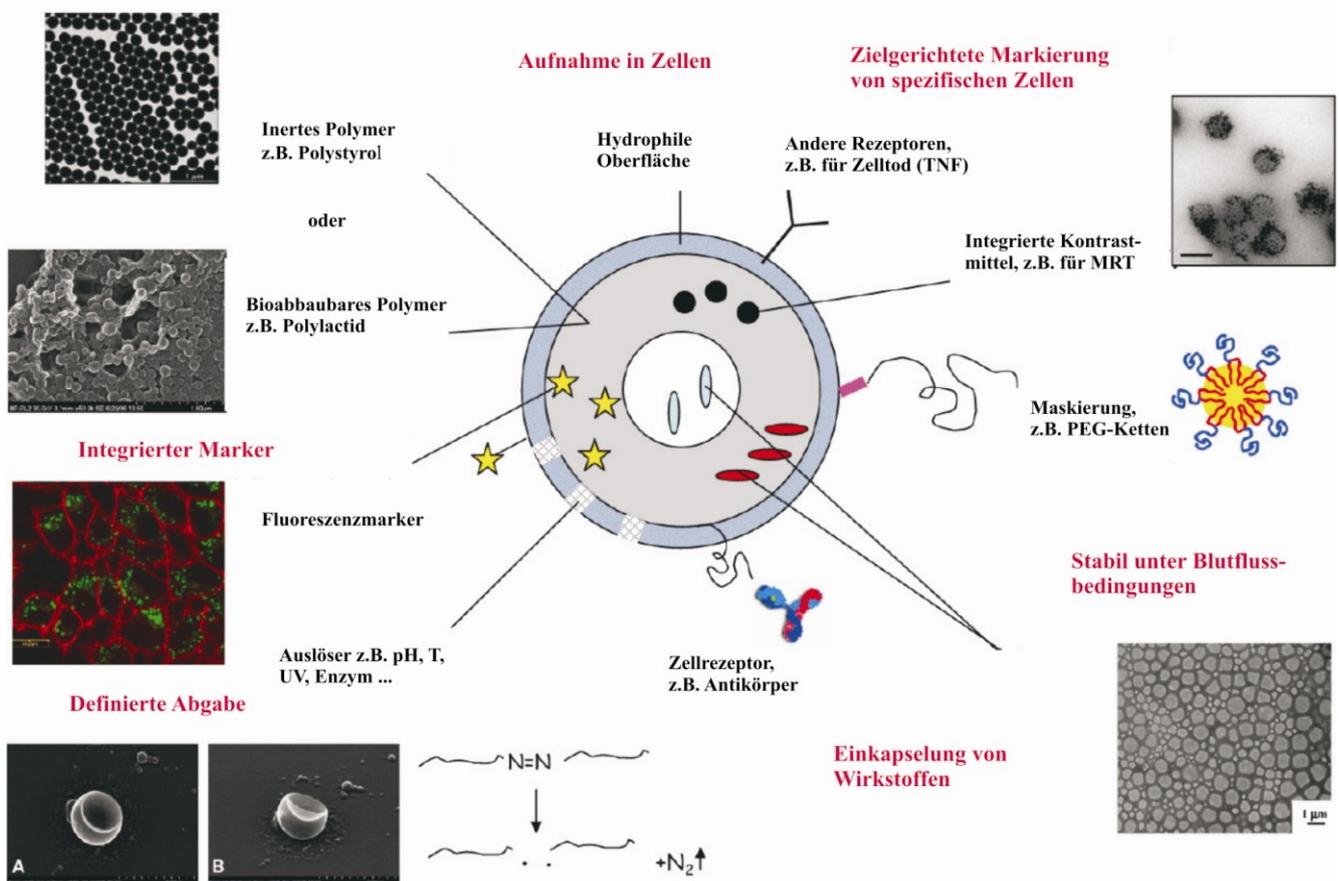


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Eigenschaften, Zusammensetzung und möglichen Anwendung von Partikeln (Abbildung entnommen aus Mailänder *et al.*^[110]).

So müssen sie die Eigenschaften eines Kontrastmittels, wie zum Beispiel Magnetismus für die MRT oder Echokontrastverstärkung für den Ultraschall mit sehr gutem Signal zu Rausch Verhältnissen aufweisen.^[14,31] Zusätzlich dazu müssen sie die Eigenschaften eines Wirkstoffes, wie zum Beispiel eine hohe Bindungsaffinität und -spezifität gegenüber der Zielstruktur, aufweisen.^[13,15] Des Weiteren dürfen sie keinen verändernden Einfluss, wie zum Beispiel Proteindenaturierung oder Zellaktivierung auf die Zielstrukturen aufweisen. Trotzdem müssen sie an diese in ausreichender Konzentration binden, wofür entsprechende pharmakokinetische Eigenschaften, wie die Verteilung im Körper, die Verstoffwechslung und die Ausscheidung, der molekularen Marker maßgeblich sind.^[15,30,31,32] Darüber hinaus stellt die Möglichkeit der Bioabbaubarkeit des Markers eine große Bedeutung dar, um eine Persistenz im Körper zu vermeiden, die möglicherweise zu schädlichen oder gar toxischen Effekten führen könnte. Allerdings darf es hier zu keiner zu schnellen Metabolisierung kommen.^[31] Neben der vorausgesetzten Nicht-Toxizität, dürfen die molekularen Marker und deren „Bausteine“ nicht immunogen wirken.^[126] Die Verwendung von oberflächenmodifizierten Nano-bzw. Mikropartikeln hat sich als bewährtes System herausgestellt, da sie viele dieser Voraussetzungen erfüllen (Abbildung 58).^[30,33,34,110] Hierbei können die molekularen Marker mit entsprechenden Eigenschaften versehen werden, indem unterschiedlicher Materialien der Partikel zum Einsatz kommen, wobei auch das spätere Anwendungsfeld des molekularen Markers die Relevanz der jeweiligen Eigenschaft beeinflusst. So haben schon die Materialien der Partikel einen direkten Einfluss auf pharmakokinetische Eigenschaften und die Bioabbaubarkeit. Partikel aus nicht bioabbaubaren Polymeren wie Polystyrol weisen eine hohe Stabilität und Verweildauer auf,^[110] da sie nur über den Ausscheidungsmechanismus aus dem Körper entfernt werden können. Bioabbaubare Polymere wie Polyester (z.B. PLGA) weisen dagegen durch Variation ihrer Monomere verschiedene Degradationszeiten auf und können auf diese Weise gewünschte Stabilitäten erhalten.^[110] Dem gegenüber besitzen Partikel aus gas- bzw. flüssigkeitsgefüllten Liposomen bzw. Mikrobäschen eine geringe Stabilität, welche unter anderem durch den Gas- bzw. Flüssigkeitsaustausch zwischen Umgebung und Partikel begründet ist.^[98] Da es sich bei der gasumhüllenden Schicht um Lipide handelt, welche verstoffwechselt werden können und das eingeschlossene Gas über die Atmung aus dem Körper entfernt wird, besitzen auch diese bioabbaubare Eigenschaften.^[97] Gerade gasgefüllte Mikrobäschen eignen sich sehr gut für eine Detektion mittels Ultraschall.^[127,128] Hierbei bildet das Gas, wie gasförmiges Perfluorcarbon oder Schwefelhexafluorid, dann die echokontrastverstärkende Komponente, um ein geeignetes Signal zu erzeugen.^[129,97,130] So haben Lyshchik *et al.* funktionalisierte Mikrobäschen zur Markierung von VEGF Rezeptoren in Mäusen, Ellegala *et al.* zur Markierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen in Ratten und Couture *et al.* zur Markierung von Globotriaosylceramid (Gb3) in Mäusen eingesetzt, um damit Tumorangiogenese zu

visualisieren.^[131,132,103] Neben der Verwendung der Mikrobäschen im Ultraschall findet man in der Literatur auch Arbeiten, welche andere Partikel für die Detektion mittels Ultraschall verwenden. So haben Pisani *et al.* vielversprechende Ergebnisse für die Verwendung von Perfluorcarbon gefüllten Poly(lactid-co-glycolid) Partikeln (PLGA) im Ultraschall erzielt.^[129] Liu *et al.* konnten zudem zeigen, dass auch reine Silica- und Polystyrolpartikel für die Anwendung im Ultraschall geeignet sind.^[133] Dies ermöglicht, auch langlebigere Partikel für Ultraschallanwendungen herzustellen. Des Weiteren hat die Größe der Partikel einen Einfluss auf die Eigenschaften. Partikel kleiner 50 nm werden sehr leicht von Zellen über Endocytose aufgenommen und selbst Partikel mit einer Größe bis zu 200 nm können noch von Zellen internalisiert werden.^[89,123,124] Hierdurch kann es schon zu einer Veränderung der Zielstruktur kommen, wenn durch diese Aufnahme Zellmechanismen beeinflusst werden. Liegen die Partikelgrößen über 1 µm werden die Partikel von Macrophagen erkannt und durch das Retikuloendotheliale System (RES) entfernt.^[134] Für Anwendungen im Ultraschall sind Partikelgrößen über 1 µm jedoch notwendig, da bei kleineren Partikeln die Frequenz des Ultraschalls bei über 30 MHz liegen müsste. Bei solchen Frequenzen würde der Ultraschall jedoch lebendes Gewebe nicht mehr ausreichend durchdringen.^[89] Um dem Abbau über das Retikuloendotheliale System zu entgehen, müssen die Partikel „maskiert“ werden. Das Verwenden von Polyethylenglycolen (PEG) hat sich hier als höchst effektiv erwiesen.^[125,135,136] Da PEG ungeladen, hydrophob und nicht immunogen ist, kann es bei der Partikelherstellung genutzt werden, ohne die Biokompatibilität zu beeinflussen.^[137,138] Gleichzeitig wirkt PEG Proteinablagerungen auf den Partikeln entgegen.^[139] Zudem ist eine kovalente Bindung an die Oberfläche über die terminalen Hydroxylgruppen an den PEG-Ketten möglich, wodurch diese auch gleichzeitig als Spacer zwischen Partikel und Ligand (z.B. Antikörper) genutzt werden können. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Flexibilität des Liganden, die zum Beispiel bei der Verwendung von Antikörpern die Antigenerkennung verbessert.^[125] Vor allem monoklonale Antikörper werden vielfach bei der Entwicklung molekularer Marker als spezifische Liganden, die die Bindung der Partikel an die Zielstrukturen ermöglichen, eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass sie gegen verschiedenste Zielmoleküle gerichtet sein können und dabei eine hohe Spezifität sowie Affinität zum jeweiligen Zielmolekül aufweisen.^[131,140,141,142,143] Allerdings können in Mäusen hergestellte monoklonale Antikörper nur bedingt in humanen Anwendungen verwendet werden, da sie bedingt durch ihr Fc-Fragment Immunogenität hervorrufen.^[144] Diese Immunogenität kann allerdings durch die Verwendung der Fab-Fragmente umgangen werden und ermöglicht gleichzeitig eine ortsspezifische kovalente Verankerung über die HS-Gruppen in der Hinge-Region.^[96] Für andere Anwendungen als im Ultraschall, gelten die zuvor genannten Punkte ebenfalls, müssen jedoch im Detail entsprechend variiert werden. Als Beispiel seien hier superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel genannt, die unter anderem als Kontrastmittel bei der

MRT eingesetzt werden, wie Publikationen von Weissleder *et al.* über erste Anwendungen zur Signalverstärkung bei der Detektion von Lebermetastasen und Lymphknoten zeigen.^[114,140,115] Um die Möglichkeit zu haben, die molekularen Marker auch in Zellexperimenten nachzuweisen, ist der Einsatz von Fluorophoren das Mittel der Wahl. Diese können zum Beispiel bei der Partikelherstellung in diese eingeschlossen werden,^[141] oder über die Monomere, an denen sie kovalent gebunden sind, in die Partikelmatrix bzw. Oberfläche eingebracht werden.^[145]

Trotz der Vielzahl an Literatur zum Thema molekulare Bildgebung bzw. molekulare Marker, zeigt die aktuelle „Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)“ des National Center for Biotechnology Information (US), dass es für ultraschallbasierte Diagnostik derzeit nur elf molekulare Markersysteme gibt, welche tier- oder humanbasierte *in vivo* Studien liefern. Obwohl zahlreiche Proteine und Enzyme in den Abläufen der Angiogenese beteiligt sind, sind die in der MICAD aufgelisteten Markersysteme nur gegen drei Zielmoleküle, VEGF Rezeptor 2 (VEGFR-2), $\alpha_v\beta_3$ Integrin und Endoglin, gerichtet.^[146] Für diese Zielmoleküle gibt es allerdings zahlreiche Studien darüber, dass sie im Vergleich zu normalen Blutgefäßen in angiogenetisch aktivierten Blutgefäßen von Tumoren überexprimiert werden.^[147,148,149] Der VEGFR-2, ein wichtiger Rezeptor in der Tumorangio-genese, ist ein Tyrosin-Kinase Rezeptor, an welchen VEGF-A bindet. Bei der Aktivierung von VEGFR-2 können mehrere Signalkaskaden ausgelöst werden, die unterschiedliche zelluläre Vorgänge wie Mitogenese, Migration, Differenzierung oder vaskuläre Permeabilität während der Tumorangio-genese regulieren. Studien zeigen, dass in tumorassoziierten Endothelzellen der VEGFR-2 überexprimiert wird. Hierbei besteht ein deutlicher Zusammenhang mit einem verstärkten Tumorwachstum und einer schlechten Prognose für den Patienten.^[150,151] Im Vergleich mit Endothelzellen von normalen Gewebe ist die Expression von VEGFR-2 in tumorvaskulären Endothelzellen um ein vielfaches höher, so dass dieser als Zielmolekül für die molekulare Bildgebung der Tumorangio-genese und -therapie sehr vielversprechend ist.^[152,153] Des Weiteren ist die extrazelluläre Matrix in den Abläufen der Angiogenese involviert, wobei hier im speziellen die Proteinfamilie der Integrine hervorzuheben ist. Integrine sind allerdings nicht nur auf Endothelzellen zu finden, wo sie an der Zellmigration und Überlebensfähigkeit während der Angiogenese beteiligt sind. Sie sind auch auf Krebszellen zu finden, wo sie bei der Tumordinvasion und Metastase eine wichtige Rolle spielen, indem sie Proteasen wie zum Beispiel Matrixmetalloproteinasen rekrutieren und aktivieren.^[153] Die Expression von solchen Matrixmetalloproteinasen führt wiederum zum Abbau der extrazellulären Matrix, wodurch es Krebszellen und Endothelzellen ermöglicht wird, in die Basalmembran einzudringen.^[153] Hierbei ist im tumorassoziierten Endothel die Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ besonders hoch, was eine gute Voraussetzung für eine molekulare Markierung ist. Hinzu kommt, dass dieses Protein in normalen Gefäßen nahezu überhaupt nicht expremiert wird, so dass es

als Zielmolekül zur Visualisierung von Angiogenese mittels molekularer Marker sehr gut geeignet ist.^[154,155] Das letzte in der MICAD aufgeführte Zielmolekül, das Endoglin, wird vorwiegend auf proliferierenden Endothelzellen expremiert.^[156] Es hat sich gezeigt, dass eine Inhibierung der Expression von Endoglin die wachstumsunterdrückenden Signale des TGF- β Signalwegs wiederherstellt.^[157] Dieser kann bei Krebszellen in der Art gestört sein, dass Zellwachstum, Zelldifferentiation und Zelltod nicht richtig reguliert werden. Da die Expression von Endoglin im tumorassoziierten Endothel hoch ist, dient auch dieses Protein als geeignetes Zielmolekül für die Visualisierung von Angiogenese mittels molekularer Marker.^[149]

In Zell- und Mausexperimenten, bei denen subkutan Brust-, Eierstock- und Pankreastumorzelllinien transplantiert worden sind, konnten Deshpande *et al.* eine erfolgreiche Markierung mit Mikrobläschen, welche gegen die drei Zielmoleküle (VEGFR-2, Endoglin und $\alpha_v\beta_3$ Integrin) gerichtet waren, erzielen.^[158] Weitere Markersysteme, bei denen der VEGFR-2 das Zielmolekül darstellt, sind von Anderson *et al.* beschrieben. Sie zeigen ein erfolgreiches Tumorimaging in Mäusen, bei dem sie Liposome verwendet haben, die mit einem rekombinant hergestellten scVEGF Konstrukt beladenen waren.^[159] Die von Pochon *et al.* entwickelten gegen VEGFR-2 gerichteten Mikrobläschen liefern vielversprechende Ergebnisse in Zellexperimenten und in Ratten und befinden sich derzeit in der klinischen Phase 0.^[160] Lyshchik *et al.* nutzten kommerziell erhältliche Mikrobläschen, an welche sie gegen VEGFR-2 gerichtete monoklonale Antikörpern über Biotin gebunden haben, um damit in Mausmodellen die Expression dieses Rezeptors im Tumorgewebe zu untersuchen.^[131] Gegen $\alpha_v\beta_3$ Integrin gerichtete Markersysteme sind von Leong-Poi *et al.*^[161], die mit Echistatin beladenen Mikrobläschen zur Visualisierung von Tumor-Angiogenese eingesetzt haben, von Weller *et al.*^[162], die mit cyclischen Peptiden beladene Mikrobläschen verwendet haben, und von Willmann *et al.*^[163], die Mikrobläschen mit Knoten-Peptide mit integriertem Integrin-Bindungs-Motiv zur Detektion von Tumor-Angiogenese benutzt haben, in Zellstudien und *in vivo* Studien eingesetzt worden. Des Weiteren nutzten Anderson *et al.* gegen $\alpha_v\beta_3$ Integrin gerichtete Liposome um Tumorangiogenese in Zell und Mausexperimenten zu visualisieren^[164] und Borden *et al.* untersuchten in Zellexperimenten die Bindungseigenschaften von RGD-Peptid beladenen Liposomen, welche mit hoher Affinität an $\alpha_v\beta_3$ Integrinen binden.^[165]

Dies zeigt, dass sich zum einen von den elf für die molekulare Bildgebung im Ultraschall entwickelten Markersystemen bisher nur eines in der klinischen Phase befindet. Zum anderen sind diese Markersysteme nur gegen drei unterschiedliche Zielmoleküle gerichtet, obwohl Tumorangiogenese ein sehr komplexer über mehrere Signalkaskaden verlaufender Prozess ist, bei dem zahlreiche Proteine und andere Moleküle involviert sind.^[153] Angiogenese spielt aber nicht nur bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle, sondern auch bei Entzündungsreaktionen, so dass nicht nur die zuvor genannten

Zielmoleküle, sondern viele andere, zu denen ebenfalls CEACAM1 zählt^[166], in beiden Fällen überexprimiert werden. Die klare Unterscheidung zwischen Tumorangiogenese und Angiogenese aufgrund einer Entzündung muss daher durch das gesamte molekulare Markersystem erfolgen, um eine eindeutige Diagnose stellen zu können.^[153] Eine Entwicklung eines molekularen Markersystems, welches CEACAM1 als Zielmolekül hat, ergänzt die Gruppe der genannten Markersysteme und kann somit unter anderem weitere Daten für eine bessere Unterscheidung liefern.

Des Weiteren zeigen die zuvor genannten Aspekte, dass man alleine für die Herstellung von Partikeln sehr viele verschiedene Ansätze verfolgen kann. Die Partikel mit den für die jeweilige Anwendung benötigten Eigenschaften auszustatten erfordert sehr viel Erfahrung, Zeit und eine entsprechende Ausstattung des Labors. Da wir unser Zielmolekül mit dem CEACAM1 bereits ausgewählt hatten und in unserer Arbeitsgruppe ein CEACAM1-spezifischer Antikörper für die zielgerichtete Markierung entwickelt wurde, war die Überlegung bei den Partikeln auf das bereits bekannte Modellsysteme zurückzugreifen. Daher wurden kommerziell erhältliche Partikel verwendet, welche unter anderem schon die Eigenschaften eines Ultraschallkontrastmittels hatten, um diese mit dem CEACAM1-spezifischen Antikörper zu beladen. Dadurch konnte direkt ins Screening der Bindungseigenschaften eingestiegen werden. Zudem bestand bei dieser Vorgehensweise die Möglichkeit, bereits klinisch zugelassene Partikel zu verwenden. Bei erfolgsversprechenden Ergebnissen hätte dies beim Zulassungsverfahren den Vorteil, dass nicht ein komplett neues Medikament hätte zugelassen werden müssen, sondern nur die Modifikation eines bereits zugelassenen. Die Folge wäre wahrscheinlich ein wesentlich kürzeres und damit kostengünstigeres Zulassungsverfahren.

Um das Screening der Bindungseigenschaften von CEACAM1-bindenden Partikeln für die Detektion neoangiogenetisch aktivierter Endothelzellen durchzuführen, war ein geeignetes *in vitro* Testsystem nötig. Die Verwendung einer Endothelzelllinie wäre optimal, insbesondere wenn diese Zellen CEACAM1 exprimieren. Freundlicherweise wurde unserer Arbeitsgruppe ein Zellklon einer humanen Endothelzelllinie eines Angiosarkoms der Kopfhaut AS-M.5 von Frau Dr. V. Krump-Konvalinkova vom Klinikum der Universität München zur Verfügung gestellt. Eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Analyse des Expressionsmusters hat gezeigt, dass diese Zellen unter anderem CEACAM1⁺ und CD31⁺ sind (Ergebnisse hier nicht aufgeführt) und sich daher für unser Testsystem sehr gut eignen würden. Um zunächst zu testen, ob eine Bindung von molekularen Markern an diese Zellen möglich ist, wurden diese Zellen in einem „Proof of Principle“ Versuch mit [CD31 MicroBeads] Partikeln der Firma Miltenyi Biotec inkubiert. Die Ergebnisse (Abschnitt 4.1) dieses Versuchs zeigten, dass die [CD31 MicroBeads] Partikel an CD31⁺ Zellen binden und ein Nachweis mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie möglich war. Allerdings war der Nachweis

in der Durchflusszytometrie nur schwach positiv mit einem Median der relativen Fluoreszenz von 13. Allerdings zeigten auch Peldschus *et al.* bei der Markierung von HT29 Zellen mit gegen CEACAM5 gerichteten SPIO Partikeln lediglich eine Erhöhung des Medians der relativen Fluoreszenz von ca. 5 (Eigenfluoreszenz) auf ca. 7 – 12.^[90] Auch dort wurde mit einem sekundären Antikörper gearbeitet, der gegen den immobilisierten Antikörper gerichtet war. Diese sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Peldschus *et al.* zu beobachtende geringe Fluoreszenzintensität könnte vielleicht an der Unzugänglichkeit aufgrund sterischer Hinderung der Epitope für den sekundären Antikörper liegen. Ein direkter Vergleich unseres Ergebnisses mit der Literatur war nicht möglich, da in der Literatur wie unter anderem bei Miranville *et al.* die [CD31 MicroBeads] lediglich zur Zellisolierung eingesetzt wurden. Bei den dort beschriebenen durchflusszytometrischen Analysen wurden keine sekundären Antikörper eingesetzt, die gegen die immobilisierten CD31 Antikörper gerichtet waren, sondern es wurden spezifische Zellproteine markiert.^[167] Die Markierung konfluenter AS-M.5 Zellen mit [CD31 MicroBeads] Partikeln führte zu einem deutlich positiven Ergebnis. Von der Art der Zellmarkierung und der resultierenden Fluoreszenzintensität in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind diese vergleichbar mit der Bindung von anti-CEACAM8 beladenen Fe₃O₄/CdTe-Nanopartikel an HeLa Zellen wie es von Sun *et al.* gezeigt wurde.^[168] Vergleichbare Ergebnisse zeigen auch Peldschus *et al.* mit der Bindung von anti-CEACAM5 beladenen Eisenoxidnanopartikeln an HT29 Zellen.^[90] Da die Firma Miltenyi Biotec für Analysen im Durchflusszytometer von mit [CD31 MicroBeads] Partikeln isolierten Zellen die Verwendung von [CD31 MicroBeads] Partikeln empfiehlt, deren immobilisierter Antikörper mit einem Fluorophor modifiziert ist, bestätigte die Vermutung der sterischen Hinderung. Aufgrund dieser Beobachtung wurde entschieden, die gegen CEACAM1 bzw. CEACAM8 gerichteten Antikörper vor der Immobilisierung auf den Partikeln mit dem Fluorophor Fluorescein zu modifizieren. Dadurch konnte der Einsatz eines sekundären Antikörpers umgangen werden. Dies hatte neben der direkten Detektion den weiteren Vorteil, dass die Inkubationszeiten für den sekundären Antikörper und die resultierenden Waschschriffe wegfielen.

Aus den zuvor genannten Gründen wurden die Antikörper vor der Immobilisierung auf den Partikeln mit dem Fluorophor Fluorescein modifiziert. Für die Bindung an die Partikel über das Biotin-Streptavidin-System war zudem die Biotinylierung der Antikörper notwendig. Die Einführung der Modifizierungen verlief mit NHS-Ester aktivierten Reagenzien unter Ausbildung einer kovalenten Amidbindung.^[91,92] Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die einfache Modifizierung der Antikörper sehr gut mit nahezu äquivalenten Antikörperausbeuten von 80 % - 100 % (Abschnitt 4.2) verlief. Die zusätzliche Einführung von Fluorescein in biotinylierte Antikörper war ebenfalls möglich, führte jedoch zu Ausbeuteverlusten von ca. 40 %. Borchers *et al.* beschreiben bei ihrer Arbeit unerklärte Ausbeuteverluste von ca. 60% bei der Fluoreszenzmarkierung von zuvor biotinylierten Cytochrom C,

die nicht erklärt wurden, sind in der Arbeit von Borchers *et al.* beschrieben.^[169] Die dort durchgeführten Modifizierungen, wie auch die in der vorliegenden Arbeit, erfolgten nach Protokollen des Herstellers, in denen solch hohe Verluste nicht beschrieben sind. Diese Verluste könnten auf die Aufreinigung zur Entfernung von überschüssigen Fluoresceinreagenz zurückgeführt werden, da diese manuell über PD10 Säulen verlief. Hierdurch war eine exakte Fraktionierung der biotinylierten und fluoreszenzmarkierten Antikörper nicht möglich. Die Nutzung eines HPLC-Systems mit Fluoreszenzdetektor könnte die Verluste reduzieren, da die jeweiligen Antikörper gezielt fraktioniert gesammelt werden könnten. Um zu überprüfen, ob diese Modifizierungen Auswirkungen auf die Spezifität und Antigenaffinität haben, wurden Bindungsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse der ELISA's deuten beim Vergleich der unmodifizierten gegenüber den jeweiligen modifizierten Antikörpern keine signifikante Verminderung der Antigenbindung in Folge dieser Modifizierungen an. In der Anwendung im Durchflusszytometer wiesen die modifizierten Antikörper jedoch deutlich geringere Markierungseffizienzen bezogen auf den jeweils unmodifizierten Antikörper auf. Die ausschließlich biotinylierten Antikörper zeigten eine gute Effizienz von ca. 56 % (Bio18/20) bzw. ca. 74 % (Bio6/40c). Ebenso zeigten die fluoresceinmarkierten 18/20 Antikörper mit einer Effizienz von ca. 60 % (18/20Fluo) bzw. ca. 73 % (Bio18/20Fluo) gute Bindungen an die Zellen. Die fluoresceinmarkierten 6/40c Antikörper wiesen dagegen mit einer Effizienz von nur ca. 22 % (6/40cFluo) bzw. 49 % (Bio6/40cFluo) eine deutlich verminderte Bindung auf. Diese Reduktion der Antigenpezifität könnte auf eine Modifizierung mit Biotin bzw. Fluorescein innerhalb der antigenspezifischen Fv-Fragmente zurückgeführt werden, da die Bindung von Biotin bzw. Fluorescein an den H₂N-Gruppen der Seitenkette der Aminosäure Lysin oder den N-Termini erfolgt,^[91,92] welche auch in den antigenspezifischen Fv-Fragmenten vorkommen.^[93] Bei der Bindung an konfluente HeLa-CEACAM1 bzw. HeLa-CEACAM8 Zellen zeigten die modifizierten Antikörper keine signifikanten Unterschiede zu den jeweils unmodifizierten Antikörpern. Zudem zeigten die HeLa Wildtyp Kontrollen, dass die Modifizierungen zu keiner unspezifischen Bindung führten. Abschließend lässt sich sagen, dass die modifizierten Antikörper erfolgreich generiert wurden. Diese eignen sich auch weiter für die Anwendungen im ELISA, der Durchflusszytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie, wenn auch zum Teil mit verminderter Antigenaffinität im Vergleich zum unmodifizierten Antikörper. Da es bei der Verwendung der AS-M.5 Zellen jedoch keine Möglichkeit gab, den Grad der unspezifischen Bindung CEACAM1-bindender Partikel zu analysieren, wurde das Screening der Partikel zunächst an einem HeLa *in vitro* Testsystem durchgeführt. Hierfür wurde eine mit humanem CEACAM1 stabil transfizierte HeLa Zelllinie verwendet. Als Kontrolle und zum Nachweis unspezifischer Bindung stand dadurch die HeLa Wildtyp Zelllinie zur Verfügung. Auf diese Weise sollten die geeignetsten Partikel für das AS-M.5 *in vitro* Testsystem gefunden werden. Zusätzlich

stand in unserer Arbeitsgruppe eine HeLa Zelllinie mit stabil transfiziertem CEACAM8 zur Verfügung, so dass parallel eine Isotypenkontrolle zu den CEACAM1-bindenden Partikeln entwickelt werden konnte. Das außergewöhnliche hierbei war, dass bei dieser Isotypenkontrolle der Nachweis einer spezifischen Bindung in einem vergleichbaren Testsystem charakterisiert wurde, was bei standardmäßigen Isotypenkontrollen nicht erfolgt. Aufgrund der Unterschiede, dass CEACAM8 nicht nur an Zell-Zell Kontaktstellen sondern auch vermehrt apikal expremiert wird^[85,86] und eine höhere laterale Beweglichkeit durch seine GPI-Verankerung in der Zellmembran besitzt^[87], konnten hieraus weitere Erkenntnisse über die Bindungseigenschaften erörtert werden.

Als erstes Modellsystem zur Etablierung CEACAM1-bindender Partikel wurden SonoVue [SV] Partikeln verwendet, da diese bereits als Ultraschallkontrastmittel in der Klinik eingesetzt wurden.^[97] Zudem haben Zhou *et al.* eine erfolgreiche Beladung dieser Partikel mit anti-hCG Antikörpern (human Choriongonadotropin) beschrieben und eine Bindung an Chorionkarzinom Zellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie und Lichtmikroskopie charakterisiert.^[94] In der vorliegenden Arbeit mit diesen [SV] Partikeln hat sich jedoch schon nach der Beladung mit Antikörper gezeigt, dass die normalerweise opaleszente Partikellösung nicht mehr opaleszent war. Diese Beobachtung deutete bereits auf eine Zerstörung der Partikel hin, welche bei Zhou *et al.* jedoch nicht beschrieben wurde. Die hier gezeigten Ergebnisse der Durchflusszytometrie in Abbildung 18 und der Fluoreszenzmikroskopie in Abbildung 19 bestätigten die Vermutung der Partikelzerstörung, da bei beiden Analysenverfahren keine Partikel nachgewiesen werden konnten. Daher war es nicht möglich, gegen CEACAM1 gerichtete [SV] Partikel analog zu den Analysen von Zhou *et al.* zu charakterisieren. Um den Grund für dieses mehrfach auftretende Problem der Partikelzerstörung zu finden, ist ein Vergleich unserer Vorgehensweise mit der von Zhou *et al.* angebracht. So haben Zhou *et al.* die [SV] Partikel nach der Kopplung mit Antikörpern lediglich durch Phasentrennung von der übrigen Lösung getrennt und nicht gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Partikel sind für weitere Untersuchungen direkt von der oberen Phase, wo sie sich anreichern, abgenommen worden.^[94] In der vorliegenden Arbeit dagegen wurde die Anreicherung der Partikel an der Lösungsoberfläche durch Zentrifugation bei geringer Umdrehungszahl beschleunigt, und die klare unterstehende Lösung wurde abpipettiert (vgl. Abschnitt 3.2.1). In dieser sollte sich ungebundener Antikörper befinden. Um auch restlichen ungebundenen Antikörper aus der Phase der Partikel zu entfernen, wurden diese durch Zugabe von Puffer auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und durch Zentrifugation wieder abgetrennt, was zu dem gewünschten Ergebnis führte, wie auch die Western-Blots in Abbildung 17 zeigen. Hiernach waren die Partikellösungen allerdings nur noch schwach opaleszent. Eine derartige Behandlung der Partikel zum Abtrennen unerwünschter Bestandteile wurde

auch von Rychak *et al.*^[102] oder Ellegala *et al.*^[132] beschrieben, ohne dass dort ein ähnliches Problem auftrat. Jedoch war eine Abtrennung ungebundener Antikörper jedoch als notwendig, da aufgrund fehlender Waschschriffe bei der Vorgehensweise von Zhou *et al.*^[94] davon ausgegangen werden musste, dass sich noch erhebliche Mengen an ungebundenen Antikörper in der Phase der [SV] Partikel befanden. Besonders weil Antikörper und [SV] Partikel im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Vor allem bei anschließenden Analysen wie der Durchflusszytometrie würde ungebundener Antikörper in Zellexperimenten zu falsch positiven Ergebnissen führen. Trotz der bereits genannten Probleme war es möglich, eine Charge CEACAM1-bindende [SV18/20] Partikel herzustellen, welche in Zellbindungsuntersuchungen unter Flußbedingungen, wie es in Abschnitt 3.6.3 beschrieben ist, eingesetzt haben. Dafür wurde zunächst nur mit einer Flußrate von 205 $\mu\text{L}/\text{min}$ gearbeitet, um die Partikel für eine längere Zeitdauer im Betrachtungsfeld zu haben und das Bindungsverhalten so genauer dokumentieren zu können. Bei dieser Flußrate herrschte eine Scherspannung von lediglich 0,2 – 0,3 dyn/cm^2 bzw. eine Scherrate von 20 – 30 s^{-1} . Da in den Venolen und Venen Scherspannungen im Bereich von 0,98 – 3,92 dyn/cm^2 , herrschen^[95] (entspricht einer Scherrate von 140 – 560 s^{-1}), wofür eine Flußrate von ca. 0,7 mL/min – 3,0 mL/min an die Flußkammer angelegt werden muss, können die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse vorerst nur einen Hinweis auf die Bindungseffizienz und –stärke in solchen Experimente geben. Aber es hat sich gezeigt, dass selbst bei dieser geringen Flußrate nur vereinzelt [SV18/20] Partikel für einige Sekunden an den Zellen hängen blieben, bevor sie wieder vom Fließmittel mitgerissen wurden. Dies ist beispielhaft in Abbildung 20 in Form von Phasenkontrastaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Flussexperiments dargestellt, in der ein einzelner Partikel hervorgehoben ist, der für eine Dauer von lediglich 13 s an eine Zelle gebunden hat, bevor er wieder aus dem Betrachtungsfeld verschwand. Daraus folgt, dass unter dynamischen Bedingungen eine Bindung von antikörperbeladenen [SV18/20] Partikeln nahezu ausgeschlossen ist. Zhou *et al.* hingegen erhielten in ihrer Arbeit positive Ergebnisse. Diese Diskrepanz zu den hier vorliegenden Ergebnissen kann durch den veränderten Versuchsaufbau liegen. Zhou *et al.* haben auf Objektträger gewachsene Zellen mit [SV-anti-hCG] Partikeln inkubiert und diese anschließend mit PBS Puffer bei einer Geschwindigkeit von 0,6 m/s gewaschen. Da sie hier keinen signifikanten Unterschied vor dem Waschen mit PBS und danach feststellen konnten, folgerten sie daraus, dass die Bindungseffizienz sehr hoch und die Bindung zwischen [SV-anti-hCG] Partikel und Zellen so stabil ist, dass diese auch unter Blutflußbedingungen stand halten sollte.^[94] Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, zumal ein Versuchsaufbau gewählt wurde, bei dem man annähernd reale Bedingungen bezüglich Scherspannungen und Scherraten einstellen kann. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse, dass eine erfolgte Zellbindung von Partikeln nicht stark genug war, um über mehrere Minuten aufrecht gehalten zu werden. Somit wäre

selbst eine Lokalisation dieser Partikel mittels Ultraschall nicht möglich, da hierfür mindestens 10 min bei einfachen Untersuchungen benötigt werden würden. Hier zeigte sich ein wesentlicher Nachteil, der bei Zhou *et al.* beschrieben und hier ebenfalls durchgeführten Beladung der [SV] Partikel mit Antikörpern. Diese erfolgte lediglich über Adsorption, so dass die Antikörper nur über Van-der-Waals Kräfte an den Partikeln gehalten wurden. Bei zu starker Beanspruchung dieser Bindung, wie es unter Flußbedingungen durchaus vorkommen kann, wäre es möglich, dass bereits zellgebundene Partikel unter Verbleib der Antikörper an den Zellen vom Fließmedium mitgerissen werden. Dies ist beispielhaft in Abbildung 59 dargestellt.

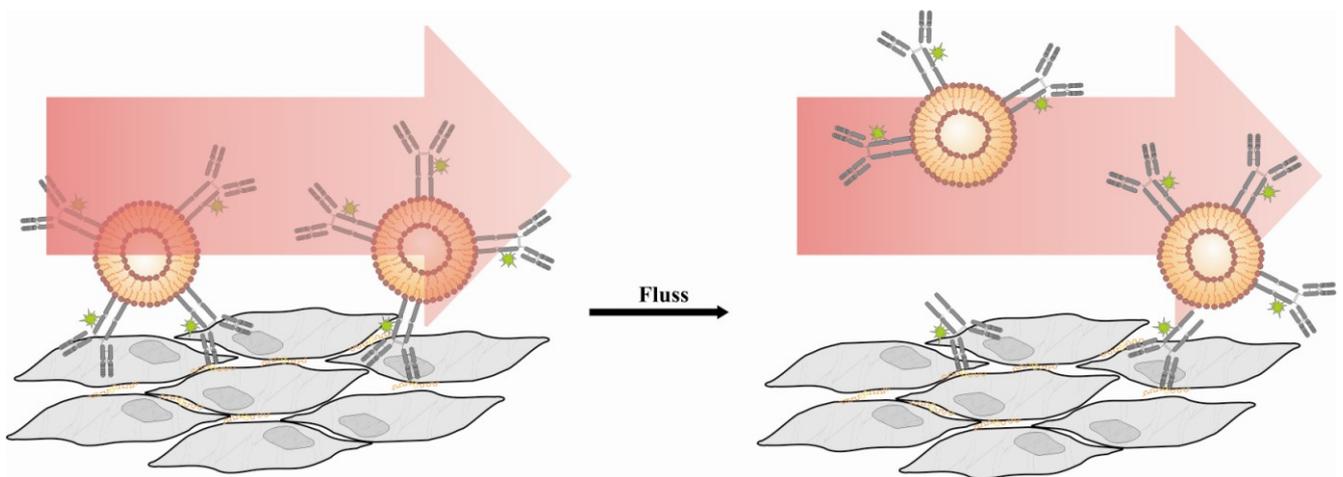


Abbildung 59: Schema der Bindungsanalyse unter Flußbedingungen. Dargestellt ist der mögliche Verlauf der kurzen Bindung der [SV] Partikel an die Zellen. Aufgrund der unzureichend festen Verankerung des Antikörpers auf der Oberfläche der [SV] Partikel, werden die Partikel unter den Flußbedingungen mitgerissen.

Eine quasi kovalente Anbindung der Antikörper auf der Partikeloberfläche scheint somit unumgänglich, so wie es auch vielfach in der Literatur zu finden ist. So beschrieben Allen *et al.* eine kovalente Bindung von Antikörpern an Liposomen unter Bildung eines Thioethers.^[170] Eine kovalente Bindung von Peptiden an Liposome über eine Disulfidbindung wurde wiederum von Anderson *et al.* gezeigt.^[164] Für diese Arten von kovalenter Anbindung an Partikeloberflächen müssen jedoch freie Thiole am Antikörper bzw. an der Partikeloberfläche vorhanden sein. Eine weitere Möglichkeit, Antikörper nahezu kovalent an Partikel zu binden, besteht in der Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systems, welches die stärkste nichtkovalente Bindung biologischer Interaktionen darstellt.^[81] Auf diese Art erfolgte zum Beispiel die Antikörperanbindung an Mikrobälchen bei Lyshchik *et al.*^[131] und Rychak *et al.*^[102] und die Bindung von Echistatin an Mikrobälchen bei Ellegala *et al.*^[132] Des Weiteren besteht insbesondere bei der Verwendung von Antikörpern die Möglichkeit, diese über ihr Fc-Fragment zu immobilisieren, sofern die Partikeloberflächen mit Protein G bzw. Protein A modifiziert sind. Diese Art der Antikörperbindung an Partikel wird besonders bei der Immunopräzipitation eingesetzt, um Proteine zu isolieren. So haben Schneider *et al.* Transferrin Rezeptor Proteine isoliert, indem sie Sepharose Partikel eingesetzt haben, an denen Antikörper über

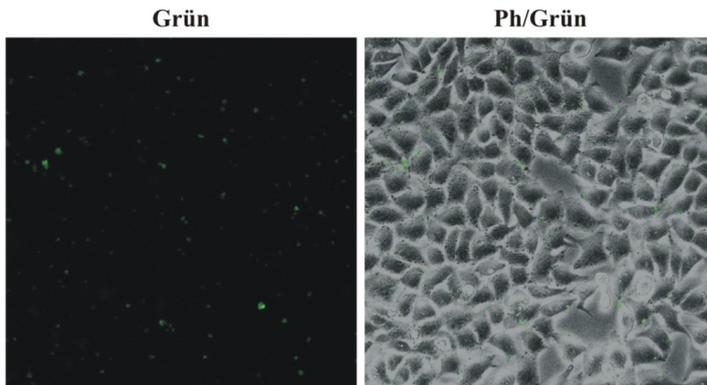
Protein A immobilisiert waren.^[112] Zur Isolierung von Rac1 Proteinkomplexen haben Switzer *et al.* magnetische Partikel eingesetzt, bei denen die entsprechenden Antikörper über Protein G immobilisiert waren.^[171]

Unter anderem waren es Arbeiten von Rychak *et al.* die zur Entwicklung eines Ultraschallkontrastmittels führten, welches kommerzialisiert werden konnte. Dieses Ultraschallkontrastmittel, welches unter dem Namen Targestar von der Firma Targeson aus den USA vertrieben wird, ist vom Aufbau her nahezu identisch zum SonoVue. Auch bei den Targestar Partikeln [TS] handelt es sich um Mikrogasbläschen, welche von einer stabilisierenden Lipidmembran umhüllt werden. Diese [TS] Partikel bieten gegenüber den [SV] Partikeln jedoch den Vorteil, dass sie Biotin als reaktive Gruppe auf ihrer Oberfläche besitzen, wodurch biotinylierte Proteine oder andere biotinylierte Moleküle über Vernetzung mit Streptavidin gebunden werden können.^[99] Zwar zeigten die [SV] Partikeln während der Aufreinigung und anschließenden Analysen große Stabilitätsprobleme, so dass Untersuchungen nicht durchführen konnten. Jedoch bieten Mikrogasbläschen einige wesentliche Vorteile, wie der sehr guten Detektierbarkeit im Ultraschall, der Biokompatibilität oder der Bioabbaubarkeit. Zudem wurden die [TS] Partikel bereits erfolgreich von Lindner *et al.* und Rychak *et al.* zur Signalverbesserung bei der Ultraschalldetektion von entzündetem Gewebe^[101,102] beziehungsweise zur Ultraschalldetektion von Tumorangiogenese im Mausmodell eingesetzt.^[99] Deshalb wurden als zweites Modellsystem zur Etablierung CEACAM1-bindender Partikel [TS] Partikel verwendet. Aber auch bei den [TS] Partikeln zeigte sich das Problem der geringen Stabilität. So konnte schon während der Durchführung der Versuche eine Abnahme der Opaleszenz beobachtet werden. In der Literatur lassen sich nur Hinweise darauf finden, dass die Partikelzahl aufgrund des Gasaustausches zwischen dem Gas der Partikel und der umgebenden Luft sinken kann.^[98] Daher wurde vermutet, dass die mechanische Beanspruchung während der durchgeführten Reaktions- und Waschbedingungen dieses verstärkte. Zudem zeigten Beobachtungen, dass schon nach einer kurzen Lagerungszeit eine Reduktion der Opaleszenz eintrat und somit eine teilweise Zersetzung der Partikel. Dies trat wahrscheinlich auch schon während der Lieferung aus den USA auf. Auf Grund dessen standen für die unterschiedlichen Verfahren, unterschiedliche Mengen an Partikel zur Verfügung, was sich auch in den Ergebnissen widerspiegelte. So konnte eine erfolgreiche und konzentrationsabhängige Beladung der [TSBio18/20Fluo] Partikel mit Antikörper mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abbildung 24), wie es auch von Lindner *et al.*^[101] und Rychak *et al.*^[102,99] beschrieben wurde. So erreichten Lindner *et al.* eine Sättigung der [TS] Partikel bei einer eingesetzten Antikörperkonzentration zwischen 7,5 µg und 75 µg pro $1 \cdot 10^8$ Partikel.^[101] Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zeigten, dass beim Einsatz der hohen Antikörperkonzentration

eine Sättigung erfolgte, welche demzufolge bei $40 \mu\text{g pro } 1 \cdot 10^8$ Partikel liegt. Die Beladungseffizienz, gemessen am Median der relativen Fluoreszenz, war dagegen mit einem Median von ca. 40 gegenüber einem Median von ca. 100 bei Lindner *et al.*^[101] deutlich geringer. Bei den Bindungsuntersuchungen mit HeLa Wildtyp/CEACAM1 Zellen zeigte sich dann die Instabilität der [TS] Partikel (vgl. Abschnitt 4.4.2). Es konnten weder freie [TS] Partikel noch mit [TSBio18/20Fluo] Partikeln markierte Zellen im Durchflusszytometer detektiert werden, obwohl die [TSBio18/20Fluo] Partikel, wie in der Literatur^[99] beschrieben, bis zur Durchführung der Experimente gekühlt aufbewahrt wurden und die Experimente am selben Tag erfolgten. Dadurch war kein Vergleich der Ergebnisse mit denen von Couture *et al.*^[103] möglich, welche ebenfalls Bindungsuntersuchungen mit Mikrobläschen durchgeführt hatten. Dabei nutzten sie für die Anbindung ihres Liganden ebenfalls das Biotin-Streptavidin System und führten sowohl Waschschriffe nach der Partikelbeladung als auch nach der Inkubation der beladenen Partikel mit Zellen durch. Zudem nutzten sie unter anderem die Durchflusszytometrie und die Fluoreszenzmikroskopie als analytische Methoden, um die Zellbindung der beladenen Partikel zu charakterisieren.^[103] Die Versuchsdurchführung von Couture *et al.* ähnelten der in dieser Arbeit verwendeten Durchführung sehr, so dass ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse sehr gut möglich gewesen wäre. Lediglich der Waschschriff nach der Inkubation der Zellen mit den beladenen Mikrobläschen, welcher vor der Analyse im Durchflusszytometer von Couture *et al.*^[103] durchgeführt wurde, könnte zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Aufgrund dieser mechanischen Beanspruchung könnten die beladenen Mikrobläschen zerstört werden und eine Bindung des „freigesetzten“ Liganden (Protein, Antikörper etc.) erfolgen. Dies hätte zur Folge, dass im Durchflusszytometer Zellen mit einem Fluoreszenzsignal detektiert würden. Eine alleinige Betrachtung dieses Fluoreszenzsignals im Histogramm würde zu einer falsch-positiven Interpretation, nämlich der Zellbindung von Partikeln, führen, obwohl nur der Ligand an den Zellen gebunden hätte. Um dies zu umgehen und falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, wurden die ungebundenen [TSBio18/20Fluo] Partikel nicht durch Waschschriffe von den Zellen entfernt, sondern zusammen mit diesen detektiert. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Zellen und ungebundenen [TSBio18/20Fluo] Partikeln, konnte über die Dot-Blots und das Einfügen entsprechender Gates ermöglicht werden. Leider zeigten die erhaltenen Ergebnisse, dass es zu einer Zerstörung der [TSBio18/20Fluo] in diesen Versuchen gekommen war, obwohl die mechanische Belastung der Partikel durch den Verzicht auf mehrmaliges Zentrifugieren und Austauschen des Puffers vermieden wurde. (Abbildung 26: Dot-Blots und Histogramme der Inkubation von HeLa Wildtyp und HeLa-CEACAM1 mit [TS], [TSBio18/20Fluo 2 μg] und [TSBio18/20Fluo 20 μg] Partikeln. (Rot: Partikel; Blau: Zellen; Schwarz: Gesamtmesssignal). Die Untersuchungen an konfluenten Zellen (vgl. Abschnitt 4.4.3.1) zeigten dagegen eine spezifische Bindung der [TSBio18/20Fluo] Partikel an die CEACAM1

expremierenden Zellen. Allerdings nur bei den Partikeln, welche mit der hohen Antikörperkonzentration beladen wurden. Im Vergleich mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Couture *et al.*^[103], dargestellt in Abbildung 60, war die Anzahl der zellgebundenen Partikel bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen jedoch deutlich geringer. So dass auch hier wahrscheinlich wieder die Instabilität der [TS] Partikel zum Tragen gekommen war.

HeLa-CEACAM1 mit [TSBio18/20Fluo 20µg]



HT29 Zellen mit [MBBioSTxB-Alexa488]

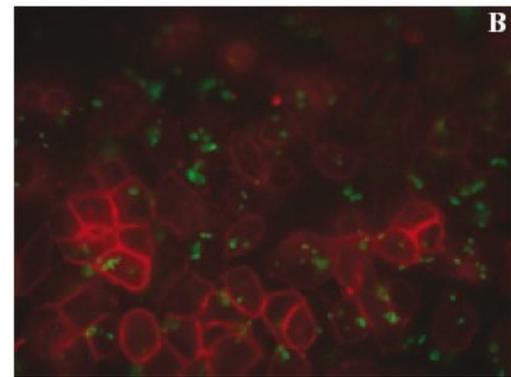


Abbildung 60: Vergleich der CLSM Aufnahme von HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [TSBio18/20Fluo 20µg] Partikeln und der Aufnahme von HT29 Zellen nach der Inkubation mit [MBBioSTxB-Alexa488] Mikrobällchen von Couture *et al.* (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme entnommen aus Couture *et al.*^[103]) Dieser Vergleich zeigt, dass bei Couture *et al.* deutlich mehr Partikel an die Zellen gebunden haben.

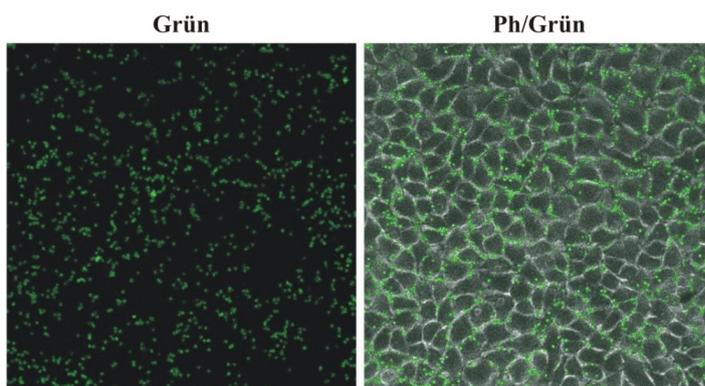
Dagegen war eine andere Charge der [TSBio18/20Fluo] Partikel stabil genug, um Bindungsuntersuchungen an HeLa-CEACAM1 Zellen unter Flußbedingungen durchzuführen. Diese waren zudem sehr erfolgreich, da die [TSBio18/20Fluo] Partikel für eine Dauer von ca. 10 min an den Zellen verblieben (Abbildung 28). Jedoch wurde für diese Versuche eine Flußrate von lediglich 205 µL/min verwendet. Dies entsprach einer Scherspannung von nur 0,2 – 0,3 dyn/cm² bzw. einer Scherrate von 20 – 30 s⁻¹. Da in den Venolen und Venen Scherspannungen im Bereich von 0,98 – 3,92 dyn/cm², herrschen^[95] (entspricht einer Scherrate von 140 – 560 s⁻¹), muss in weiteren Untersuchungen die Flußrate auf ca. 0,7 mL/min – 3,0 mL/min erhöht werden. Mit höheren Scherspannungen, die nur zum Teil denen in Venolen und Venen entsprechen, haben Rychak *et al.* bei Bindungsuntersuchungen mit gegen P-Selektin gerichteten Partikeln gearbeitet. Bei ihren Untersuchungen mit Scherspannungen von 0,34 dyn/cm², 0,84 dyn/cm² und 1,3 dyn/cm² konnten sie neben der Bindung der Partikel an P-Selektin aber auch zeigen, dass die Bindungseffizienz mit höheren Scherspannungen abnahm.^[102] Rychak *et al.* erklärten dies unter anderem mit den Beobachtungen von Chen *et al.*^[172] über die Eigenschaften von Antikörpern als Liganden. Diese seien eigentlich nicht für eine schnelle Bindung unter hohen Scherraten ausgelegt. Diese Beobachtung der niedrigen Effizienz einer Antikörpervermittelten Bindung wurden zum Beispiel schon von Eniola *et al.*^[173] und Dickerson *et al.*^[174] beschrieben. Trotzdem konnte mit den in dieser Arbeit erhaltenen Resultateneine selektive Bindung

von antikörperbeladenen [TS] Partikeln an CEACAM1 exprimierende Zellen auch unter Flußbedingungen nachgewiesen werden. Die ermittelte Verweildauer der Partikel an den Zellen unter Flußbedingungen würde sogar ausreichen, um *in vivo* Ultraschalluntersuchungen durchzuführen. Dies belegten Arbeiten von Rychak *et al.* oder auch Korpanty *et al.*, in denen Ultraschalluntersuchung an Mäusen vier bzw. fünf Minuten nach der Partikelinjektion begonnen wurden.^[99,104] Die Ergebnisse zeigten aber auch, dass noch weitere Untersuchungen mit den [TS] Partikeln notwendig sind. Allerdings war aufgrund der Instabilität der [TS] Partikel ein Reproduzieren und Optimieren der Ergebnisse derartig eingeschränkt, dass trotz der vielversprechenden Ergebnisse zunächst auf stabilere Partikel verwendet wurde, um vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die grundlegenden Methoden der Antikörperbindung, Aufreinigung und Analyse zu erarbeiten. So wurden als drittes Modellsystem magnetische Partikel zur Analyse CEACAM1-bindender Partikel ausgewählt, um unter anderem die Vorteile der magnetischen Aufreinigung nutzen zu können.^[105] Zwar sind diese für die Detektion im Ultraschall nicht geeignet, aber sie sollten einen definitiven Nachweis dafür liefern, dass Partikel an CEACAM1 exprimierende Zellen binden können.

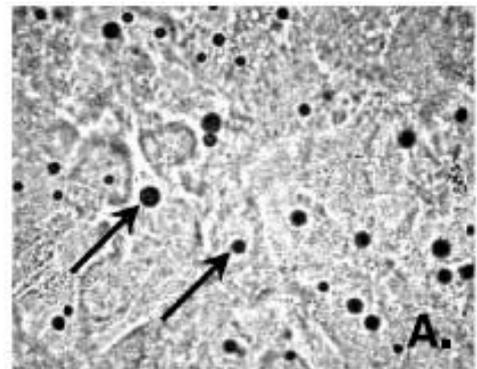
Da die Beladung über das Streptavidin-Biotin-System bei den [TS] Partikeln gut funktioniert hat, sollte diese Art der Beladung erhalten bleiben. Aus diesem Grund wurden Polystyrolpartikel mit eingeschlossenem superparamagnetischem Eisenoxid der Firma Invitrogen [SDB] für weitere Untersuchungen gewählt. Bei diesen [SDB] Partikeln zeigte sich zudem das Potential der Anbindung der Antikörper über das Streptavidin-Biotin-System. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten eine sehr erfolgreiche Beladung der [SDB] Partikel mit beiden verwendeten Antikörpern, sowohl beim Einsatz niedriger als auch hoher Antikörperkonzentrationen (vgl. Abbildung 31, Tabelle 19). Hierbei war die Beladungseffizienz, bewertet anhand des Medians der relativen Fluoreszenz mit Werten von ca. 140 – 250, im Bereich des in der Literatur für Mikrobäschen beschriebenen. So wiesen die beladenen Mikrogasbläschen bei Rychak *et al.*^[99] Mediane von ca. 100 und bei Lindner *et al.*^[101] von ca. 100 – 150 auf. Die Sättigung der [SDB] Partikel mit Antikörpern benötigte jedoch mit ca. 80 µg pro 1×10^8 Partikel mehr Antikörper als es bei Lindner *et al.*^[101] für Mikrogasbläschen beschrieben war. Die [SDB] Partikel verfügten demnach über mehr Bindungsstellen. Bei den Bindungsuntersuchungen zeigte sich, dass die [SDB] Partikel aufgrund ihrer Masse nicht im ELISA verwendet werden konnten und auch ihre Anwendung unter Flußbedingungen war aufgrund dessen nicht erfolgreich (Ergebnisse nicht aufgeführt). In der Durchflusszytometrie konnten sie aufgrund ihrer Größe dagegen sehr gut eingesetzt werden. Des Weiteren zeigten die Bindungsuntersuchungen mit Zellen, dass die antikörperbeladenen [SDB] Partikel sowohl wenn sie gegen CEACAM1 als auch wenn sie gegen CEACAM8 gerichtet waren, zu einem geringen Teil zur unspezifischen Bindung

neigten. Dies konnte mit dem Durchflusszytometer und dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (vgl. Abschnitte 4.5.3 und 4.5.4). Dabei korrelierten die Ergebnisse dieser beiden Methoden in Bezug auf die eingesetzte Antikörperkonzentration ($2\mu\text{g}$ bzw. $20\mu\text{g}$ pro $50\mu\text{L}$ Partikellösung) und den jeweiligen Antikörper (Bio18/20Fluo bzw. Bio6/40cFluo) sehr gut miteinander. Es konnte eine deutliche spezifische Markierung CEACAM1 und CEACAM8 expremierender Zellen gezeigt werden. Besonders bei den Ergebnissen mit konfluenten Zellen, zeigte sich eine sehr gute Bindungseffizienz. Hier war auch kein Unterschied bezüglich der Lokalisation des Zielproteins zu erkennen, da diese Bindungseffizienz sowohl bei den CEACAM1 als auch CEACAM8 expremierenden Zellen nahezu identisch war. In der Literatur sind keine Arbeiten zu finden in denen diese Art der superparamagnetischen Eisenoxid Mikropartikel für die Zellmarkierung und weiterführende Bildgebungsverfahren eingesetzt worden sind. Eine Bewertung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit Literaturdaten war also nicht möglich. Somit konnte ein Vergleich nur mit anderen in der Literatur erwähnten Partikeln erfolgen.

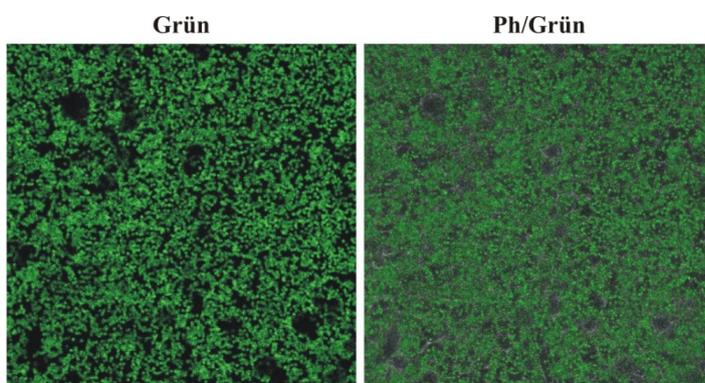
HeLa-CEACAM1 mit [SDBBio18/20Fluo 20 μg]



Tumor Endothelzellen mit [MBBioRRL]



HeLa-CEACAM8 mit [SDBBio6/40cFluo 20 μg]



Gb3 pos. HT29 Zellen mit [MBBioSTxB-Alexa488]

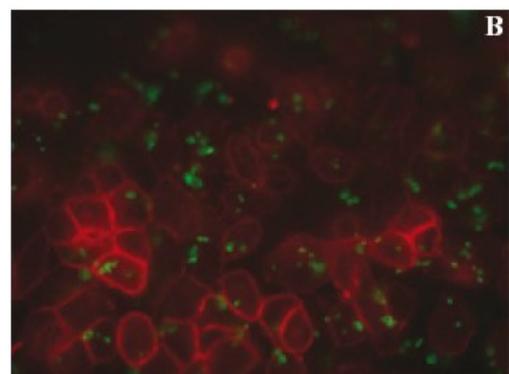


Abbildung 61: Vergleich der CLSM Aufnahme von HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [SDBBio18/20Fluo $20\mu\text{g}$] Partikeln bzw. HeLa-CEACAM8 Zellen nach der Inkubation mit [SDBBio6/40cFluo $20\mu\text{g}$] Partikeln und der Aufnahme aus Weller *et al.* von Tumor Endothelzellen nach der Inkubation mit [MBBioRRL] Mikrobläschen und der Aufnahme aus Couture *et al.* von Gb3 positiven HT29 Zellen nach der Inkubation mit [MBBioSTxB-Alexa488] Mikrobläschen (Aufnahmen entnommen aus Weller *et al.*^[162] bzw. Couture *et al.*^[103]) Dieser Vergleich zeigt, dass deutlich mehr antikörperbeladenen [SDB] Partikel gebunden haben als Mikrobläschen bei Weller *et al.* oder Couture *et al.*

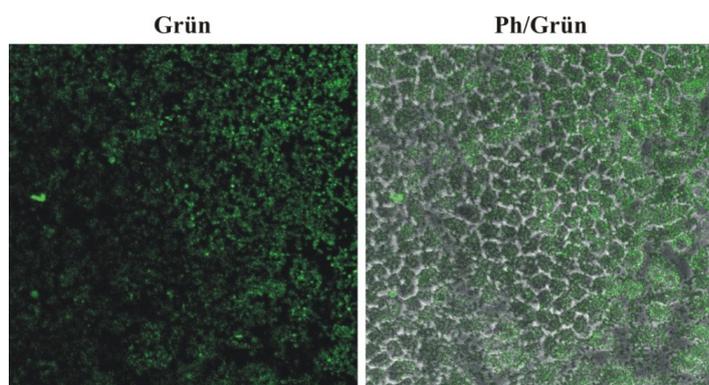
In Abbildung 61 ist zu sehen, dass die von hergestellten [SDB-AK] Partikel eine wesentlich höhere Zellbindungseffizienz zeigten, als die von Weller *et al.*^[162] hergestellten RRL-Peptid-Mikrobläschen (MBBioRRL) oder von Couture *et al.*^[103] hergestellten Shiga-Toxin-B-Mikrobläschen (MBBioSTxB-Alexa488). Allerdings zeigten die [SDB] Partikel bei der Inkubation mit Zellsuspensionen nur eine sehr geringe Bindungseffizienz. So waren lediglich 4 % der HeLa-CEACAM1 Zellen spezifisch mit [SDBBio18/20Fluo] Partikeln und 4 % der HeLa-CEACAM8 Zellen mit [SDBBio6/40cFluo 2µg] Partikeln bzw. 8 % - 20 % mit [SDBBio6/40cFluo 20µg] Partikeln spezifisch markiert. Anstatt superparamagnetischer Eisenoxid-Mikropartikel ist es üblich für Zellmarkierungen und Bildgebungsverfahren entsprechende superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO) einzusetzen. So zeigen Peldschus *et al.* eine vermeintliche Markierung von HT29 Zellen mit gegen CEACAM5 gerichteten SPIO Partikeln im Durchflusszytometer durch eine Erhöhung des Medians der relativen Fluoreszenz von ca. 5 (Eigenfluoreszenz) auf ca. 7 – 10.^[90] In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen Mediane von 60 – 100 bei mit [SDBBio18/20Fluo] markierten HeLa-CEACAM1 Zellen bzw. 80 – 300 bei mit [SDBBio6/40cFluo] markierten HeLa-CEACAM8 Zellen, ermittelt, obwohl nur eine geringe Zahl der jeweiligen Zellen markiert war. Die antikörperbeladenen [SDB] Partikel lieferten also eine klar bessere Markierung der Zellen, womöglich auch durch eine entsprechend hohe Zahl an Partikeln pro Zelle. Leider fehlten bei Peldschus *et al.* Kontrollen mit entsprechenden Wildtyp Zellen, die kein CEACAM5 exprimieren, um die nachgewiesene geringe unspezifische Bindung einordnen zu können.^[90] Die detektierte geringe unspezifische Bindung wurde aber ebenfalls bei Weller *et al.* an normalen Endothelzellen und bei Couture *et al.* an mit einem Inhibitor inkubierten HT29 Zellen beobachtet.

Da in unserer Arbeitsgruppe außerdem Mikropartikel aus Siliziumoxid mit eingeschlossenem superparamagnetischem Eisenoxid der Firma Carl Roth [RPGb] vorhanden waren, wurden diese parallel mit den [SDB] Partikeln getestet. Auch mit diesen Partikeln lässt sich die eigentliche Fragestellung dieser Arbeit bezüglich der Detektion mittels Ultraschall nicht beantworten. Trotzdem wurden sie als viertes Testsystem verwendet, um einen Nachweis für die Bindung von Partikeln an CEACAM1 exprimierende Zellen zu erhalten. Allerdings besaßen diese Partikel weder Biotin noch Streptavidin auf ihrer Oberfläche, so dass die Beladung nicht über das Streptavidin-Biotin-System möglich war. Stattdessen war die Oberfläche dieser [RPGb] Partikel mit Protein G modifiziert und eine Anbindung der Antikörper konnte über deren Fc-Fragment erfolgen. Dadurch waren die F(ab)₂-Fragmente des Antikörpers in die Peripherie ausgerichtet, was eine optimale Bindungskapazität gewähren sollte.^[175] Trotzdem zeigten die [RPGb] Partikel eine wesentlich schlechtere Beladung als die [SDB] Partikel. Besonders beim Einsatz niedriger Antikörperkonzentrationen (vgl. Abbildung 41,

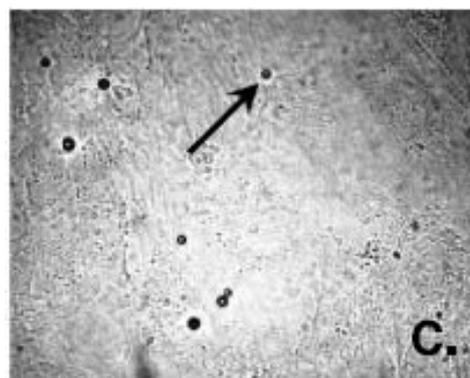
Tabelle 24) war die Beladungseffizienz, bewertet anhand des Medians der relativen Fluoreszenz, mit dem Wert 10 bei den [RPGB18/20Fluo 2 μ g] Partikeln gering und mit dem Wert von 3 bei den [RPGB6/40cFluo 2 μ g] Partikeln negativ. Lediglich beim Einsatz hoher Antikörperkonzentrationen (vgl. Abbildung 41, Tabelle 24) konnte bei beiden verwendeten Antikörpern von einer erfolgreichen Beladung ausgegangen werden. Hier war die Beladungseffizienz mit einem Median von 55 bei den [RPGB18/20Fluo 20 μ g] Partikeln. Bei den [RPGB6/40cFluo 20 μ g] Partikeln jedoch mit einem Median von 15 nur gering. Im Vergleich mit Mikrogasbläschen liegen diese Werte deutlich unter den beschriebenen Werten von Rychak *et al.*^[99] mit Medianen von ca. 100 und Lindner *et al.*^[101] mit Medianen von ca. 100 – 150. Allerdings liegen die Ergebnisse der relativen Fluoreszenz bei den antikörperbeladenen [RPGB] Partikeln in der Größenordnung der zuvor ermittelten relativen Fluoreszenz bei den antikörperbeladenen [TS] Partikeln. Bei diesen wurden wie beschrieben Medianen von 12 bei [TSBio18/20Fluo 2 μ g] und 41 bei [TSBio18/20Fluo 20 μ g] (vgl. Abbildung 24, Tabelle 16) erhalten. Auch Peldschus *et al.* konnten für ihre antikörperbeladene SPIO Partikel nur Medianen der relativen Fluoreszenz von ca. 10 ermitteln.^[90] Laut Herstellerangaben sollte eine Beladung mit mindestens 0,2 mg IgG pro 1 mL Partikellösung möglich sein. Dies wurde durch die Beobachtung der Sättigung bei der Beladung mit hohen Antikörperkonzentrationen, gezeigt in den Western-Blots (Abbildung 40) und in der Durchflusszytometrie (Abbildung 41), bestätigt. Hier wurden hochgerechnet auf 1 mL Partikellösung ca. 0,4 mg Antikörper eingesetzt. Das heißt eine Sättigung der [RPGB] Partikel erfolgte schon bei 8 μ g pro $1 \cdot 10^8$ Partikel. Verglichen mit den Ergebnissen von Rychak *et al.* lag dieses Ergebnis am Anfang der Sättigung von Mikrogasbläschen, welche dort zwischen 7,5 μ g und 75 μ g pro 1×10^8 Partikel angegeben wurde.^[101] Demzufolge hatten die [RPGB] Partikel deutlich weniger Bindungsstellen als die [TS] oder [SDB] Partikel. Dadurch würden die geringen Medianen der relativen Fluoreszenz bei den durchflusszytometrischen Analysen erklärt werden. Allerdings zeigten die Partikel bei den Bindungsuntersuchungen mit Zellsuspensionen deutlich höhere Medianen der relativen Fluoreszenz. Die [RPGB18/20Fluo] Partikel lieferten Werte von ca. 40 – 340 und die [RPGB6/40cFluo] Partikel von ca. 30 – 140. Sie lagen damit im Bereich der Werte der antikörperbeladenen [SDB] Partikel und der Werte wie sie für Mikrogasbläschen bei Rychak *et al.*^[99] mit Medianen von ca. 100 und bei Lindner *et al.*^[101] mit Medianen von ca. 100 – 150 ermittelt wurden. Demzufolge war die Beladung der [RPGB] Partikel trotz der wohl geringeren Anzahl an Bindungsstellen sehr erfolgreich. Des Weiteren zeigte sich bei den Bindungsuntersuchungen, dass die [RPGB] Partikel aufgrund ihrer Masse nicht im ELISA verwendet werden konnten und auch ihre Anwendung unter Flußbedingungen war aufgrund dessen nicht möglich. Allerdings zeigten die Ergebnisse der Bindungsuntersuchungen mit Zellen, dass trotz der guten Beladungskapazität der Partikel mit Antikörpern, sowohl die gegen CEACAM1 gerichteten [RPGB18/20Fluo] Partikel als

auch die gegen CEACAM8 gerichteten [RPG6/40cFluo] Partikel, eine äußerst ausgeprägte unspezifische Bindung. Dies wurde durch die Kontrollen mit HeLa Wildtyp Zellen eindeutig nachgewiesen. Somit waren diese Partikel für die hier durchgeführten Untersuchungen und für den Nachweis einer Bindung an CEACAM1 exprimierende Zellen nicht einsetzbar. Dieses Phänomen der stark ausgeprägten unspezifischen Bindung ist in der Literatur nicht beschrieben. Daher konnte lediglich ein Vergleich mit den Kontrollen von Weller *et al.*^[162] und Couture *et al.*^[103] herangezogen werden (Abbildung 62).

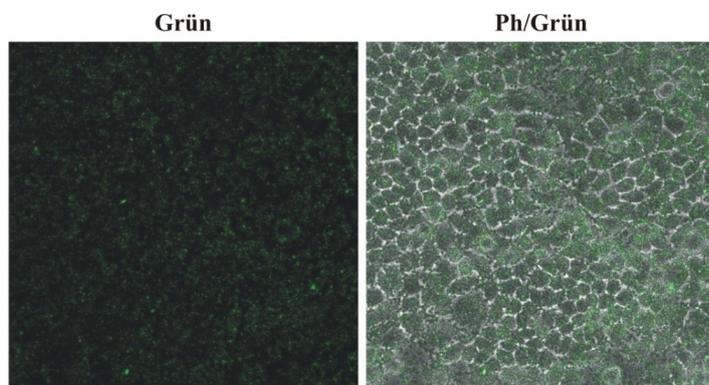
HeLa Wildtyp mit [RPG18/20Fluo(BS³) 20µg]



Normale Endothelzellen mit [MBBioRRL]



HeLa Wildtyp mit [RPG6/40cFluo(BS³) 20µg]



Gb3 neg. HT29 Zellen mit [MBBioSTxB-Alexa488]

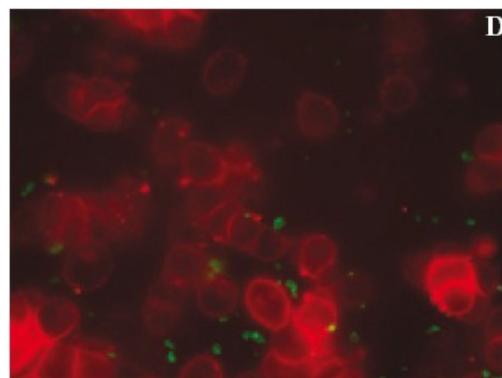


Abbildung 62: Vergleich der CLSM Aufnahme von HeLa-Wildtyp Zellen nach der Inkubation mit [RPG18/20Fluo(BS³) 20µg] Partikeln bzw. [RPG6/40cFluo(BS³) 20µg] Partikeln und der Aufnahme aus Weller *et al.* von Normalen Endothelzellen nach der Inkubation mit [MBBioRRL] Mikrobläschen und der Aufnahme aus Couture *et al.* von Inhibitor behandelten Gb3 negativen HT29 Zellen nach der Inkubation mit [MBBioSTxB-Alexa488] Mikrobläschen (Aufnahmen entnommen aus Weller *et al.*^[162] bzw. Couture *et al.*^[103]) Dieser Vergleich zeigt die äußerst ausgeprägte unspezifische Bindung antikörperbeladenen [RPG] Partikel.

Die hergestellten RRL-Peptid-Mikrobläschen (MBBioRRL) zeigten bei Weller *et al.*^[162] nur vereinzelt unspezifische Bindung an normale Endothelzellen. Ebenso waren bei Couture *et al.*^[103] nur einzelne [MBBioSTxB-Alexa488] Mikrobläschen an die mit einem Inhibitor behandelten Gb3 negativen HT29 Zellen unspezifisch gebunden. Diese geringe Zahl an unspezifisch gebundenen Partikeln konnte bei solchen Untersuchungen nie ausgeschlossen und als normal betrachtet werden. Jedoch sind die in

dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der unspezifischen Bindung der antikörperbeladenen [RPGGB] Partikeln an die CEACAM1 bzw. CEACAM8 eindeutig. Durch die Stärke der unspezifischen Bindung kann nicht mehr zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung unterschieden werden und somit können die Partikel nicht für weitere Experimente verwendet werden.

Um zu analysieren wodurch diese ausgeprägte unspezifische Bindung bedingt ist, sollte durch die Verwendung eines weiteren Partikeltyps unter anderem geklärt werden, ob das Protein G für die unspezifische Bindung der [RPGGB] Partikel an Zellen verantwortlich war, oder ob das Material und die Partikelgröße dieses beeinflussten. Schließlich beobachteten Ling *et al.* bei DLS-Messungen und Messungen der Zeta-Potentiale in DMEM mit FCS, dass sich Proteine auf Silicananopartikeln ablagerten. Hier führten die abgelagerten Proteine zu einem vergrößerten Durchmesser und zur Reduktion der Oberflächenladung der untersuchten Partikel.^[113] Um den Einfluss des Protein G zu klären, wurden Eisenoxidnanopartikel (SPIO) der Firma Miltenyi gewählt, an deren Oberfläche Protein G immobilisiert war. Da diese [MPGB] Partikel aus einem Kern aus Ferrit-Kristall (Durchmesser ca. 10 nm) mit daran gebundenen verzweigten Dextranpolymeren bestehen, welche eine hohe Resistenz gegenüber Protein- und Zelladsorptionen aufweisen,^[119] war damit eine durch die Oberflächenmatrix hervorgerufene unspezifische Bindung an Zellen ausgeschlossen. Zudem wäre bei einer erfolgreichen spezifischen Markierung von CEACAM1-exprimierenden Zellen, eine Anwendung in Magnetresonanz-Experimenten durchaus denkbar. Schließlich ist die Verwendung von SPIO's als Kontrastmittel in der MRT vielfach beschrieben, wie Publikationen von Lewin *et al.*^[114] und Weissleder *et al.*^[115] zeigen. Veröffentlichungen von Peldschus *et al.*^[90], Frank *et al.*^[117] und Kraitchman *et al.*^[118] zeigten, dass hierbei selbst kommerziell erhältliche SPIO's ihre Anwendung fanden. Aufgrund ihrer Größe von ca. 50 nm im Durchmesser war eine Analyse der Beladung im Durchflusszytometer nicht möglich. Dass die [MPGB] Partikel mit Antikörpern beladen waren, musste demnach indirekt über Bindungsanalysen erfolgen. Hier zeigte sich wiederum der Vorteil der geringen Größe, da die [MPGB] Partikel die einzigen Partikel, von denen in der vorliegenden Arbeit getestet, waren, welche im ELISA verwendet werden konnten. Die Ergebnisse der Western-Blots (Abbildung 50) ließen zwar eine Beladung der [MPGB] Partikel sowohl mit dem 18/20Fluo als auch mit dem 6/40cFluo Antikörper vermuten, jedoch erst die Analyse mittels ELISA lieferte eindeutige Beweise (Abbildung 51). So zeigten die antikörperbeladenen [MPGB18/20Fluo] bzw. [MPGB6/40cFluo] Partikel gegenüber der Negativkontrolle eine signifikant höhere Absorption und somit eine spezifische Bindung des Antigens. Auch bei Peldschus *et al.* wurde mittels ELISA die spezifische Bindung ihrer gegen CEACAM5 gerichteten SPIO's nachgewiesen, indem diese gegenüber der Kontrolle eine mehr als doppelt so hohe Absorption zeigten.^[90] Zudem zeigen die hier erhaltenen ELISA Ergebnisse ein

umgekehrt proportionales Verhalten, da eine signifikant bessere Antigen-Bindung bei mit niedrigen Antikörperkonzentrationen beladenen [MPGB18/20Fluo 2µg] bzw. [MPGB6/40cFluo 2µg] Partikeln erfolgt. Bei den zuvor beschriebenen Partikeln konnte dies nicht beobachtet werden. Dort wurde stattdessen eine verbesserte Zellbindung bei höherer Antikörperkonzentration beobachtet. Auch wenn bei den zuvor verwendeten Partikeln das umgekehrt proportionale Verhalten der Zellbindung nicht beobachtet wurde, so wurde dieses Phänomen bereits in der Literatur beschrieben. So beobachten Calderon *et al.* ebenfalls, dass bei antikörperbeladenen Polystyrol Partikeln eine Reduktion der Antikörperkonzentration zu einer besseren spezifischen Bindung führte.^[122] Und Tharakan *et al.* sowie Orthner *et al.* haben bei der Entwicklung von antikörperbeladenen Matrices festgestellt, dass eine geringere Oberflächendichte von Antikörpern zu einer erhöhten Antigenbindungskapazität führte. Dies wurde auf die Reduktion der sterischen Hinderung zurückgeführt.^[120,121] Aufgrund der geringen Größe der Nanopartikel tritt diese sterische Hinderung natürlich schneller auf, als bei ca. 100fach größeren Mikropartikeln. Bei den weiteren Zellbindungsuntersuchungen zeigten die gegen CEACAM1-gerichteten [MPGB18/20Fluo] Partikel eine deutliche spezifisch über den Antikörper vermittelte Bindung an die Zellen. Anhand der durchflusszytometrischen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Partikel mit der niedrigeren Antikörperkonzentration [MPGB18/20Fluo 2 µg] mit ca. 42 % markierter Zellen bessere Bindungseigenschaften aufwiesen, als die [MPGB18/20Fluo 20 µg] Partikel mit ca. 32 % markierter Zellen (Abbildung 53, Tabelle 30). Also konnte, wie schon Cotoure *et al.*^[103] mit Shiga Toxin B Untereinheiten (STxB) beladenen Mikrobläschen, eine erfolgreiche Zellmarkierung mit Partikeln mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten die [MPGB18/20Fluo] Partikel im Durchflusszytometer wesentlich bessere Zellbindungseigenschaften als die bereits beschriebenen [SDB] Partikel oder [CD31 MicroBeads] Partikel aus dem „Proof of Principle“ Versuch. Auch im Vergleich mit den Ergebnissen von Peldschus *et al.*^[90] für gegen CEACAM5 gerichtete SPIO Partikel mit Medianen der relativen Fluoreszenz von 7 – 12 waren die hier erhaltenen Ergebnisse mit Medianen der relativen Fluoreszenz von 26 und 40 deutlich besser und lieferten damit eine höhere Effizienz bei der Zellbindung. Vergleichbare Ergebnisse zum umgekehrt proportionalen Verhalten bei steigender Antikörperkonzentration auf den Partikeln wurden im Bezug zu molekularen Markern nicht gefunden. Dafür konnten wir sowohl die spezifische Bindung, als auch das umgekehrt proportionale Verhalten der [MPGB18/20Fluo] Partikel durch unsere Ergebnisse mit konfluenten Zellen bestätigen. Ein Vergleich mit Literaturdaten von Peldschus *et al.*^[90], Weller *et al.*^[162], Couture *et al.*^[103] und unseren Ergebnissen aus dem „Proof of Principle“ Versuch, bei dem ebenfalls Eisenoxidnanopartikel [CD31 MicroBeads] eingesetzt wurden (Abbildung 63) zeigt, dass die [MPGB18/20Fluo 20 µg] Partikel mit hoher Antikörperkonzentration die deutlich schlechteste Bindungseffizienz aufweisen.

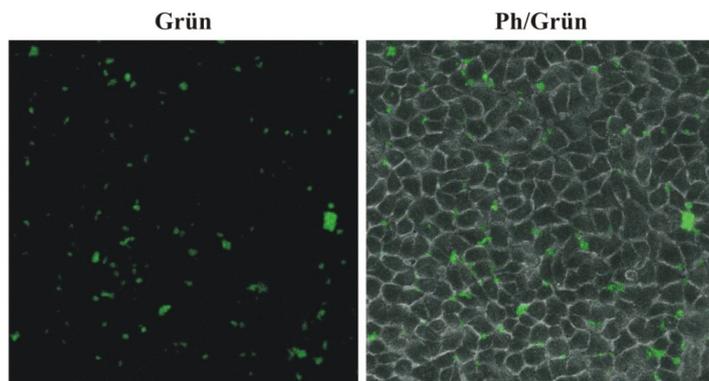
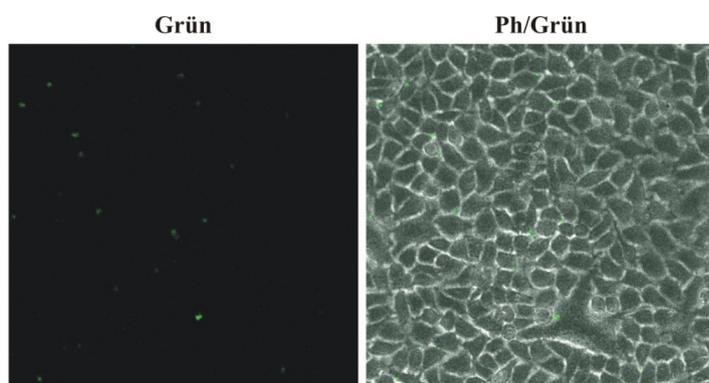
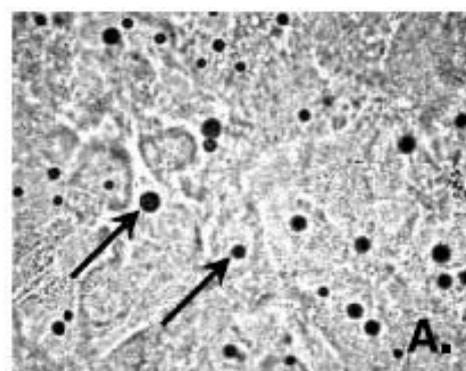
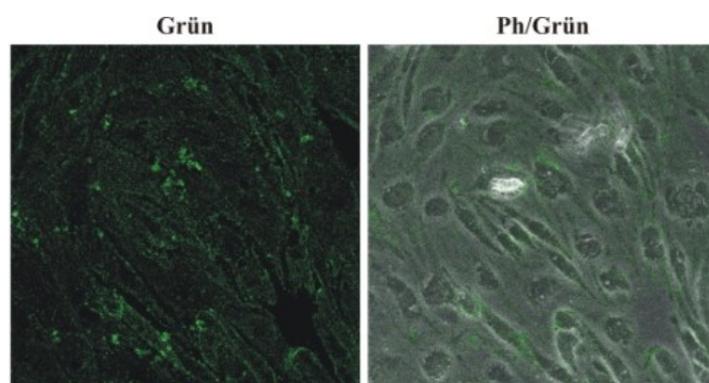
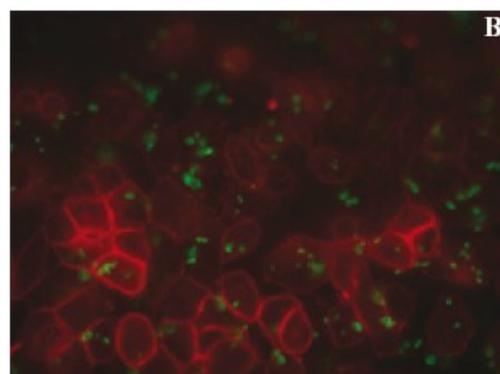
HeLa-CEACAM1 mit [MPGB18/20Fluo 2µg]*CEACAM5 pos. HT29 Zellen mit [T84.1-SPIO]**HeLa-CEACAM1 mit [MPGB18/20Fluo 20µg]**Tumor Endothelzellen mit [MBBioRRL]**AS-M.5 mit [CD31 MicroBead] + anti-Maus FITC**Gb3 pos. HT29 Zellen mit [MBBioSTxB-Alexa488]*

Abbildung 63: Vergleich der CLSM Aufnahme von HeLa-CEACAM1 Zellen nach der Inkubation mit [MPGB18/20Fluo 2µg] bzw. [MPGB18/20Fluo 20µg] Partikeln und der CLSM Aufnahme von AS-M.5 Zellen nach der Inkubation mit [CD31 MicroBead] Partikeln, sowie der Aufnahme aus Peldschus *et al.* von CEACAM5 positiven HT29 Zellen nach der Inkubation mit [T84.1-SPIO] Partikeln, der Aufnahme aus Weller *et al.* von Tumor Endothelzellen nach der Inkubation mit [MBBioRRL] Mikrobälchen und der Aufnahme aus Couture *et al.* von Gb3 positiven HT29 Zellen nach der Inkubation mit [MBBioSTxB-Alexa488] Mikrobälchen (Aufnahmen entnommen aus Peldschus *et al.*^[90], Weller *et al.*^[162] und Couture *et al.*^[103]).

Dagegen war die Bindungseffizienz der mit niedriger Antikörperkonzentration beladenen [MPGB18/20Fluo 2 µg] Partikel im Bereich der Effizienz von Weller *et al.*^[162] hergestellten RRL-Peptid-Mikrobälchen (MBBioRRL) und von Couture *et al.*^[103] hergestellten Shiga-Toxin-B-Mikrobälchen (MBBioSTxB-Alexa488). Gegenüber des „Proof of Principle“ Versuchs und der

Ergebnisse von Peldschus *et al.*^[90] scheint die Bindungseffizienz doch geringer zu sein. Dagegen waren die Ergebnisse mit gegen CEACAM8 gerichtete [MPGB6/40cFluo] Partikel als negativ zu bewerten, da weder mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 55, Tabelle 32) noch mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 57) eine spezifische antikörpervermittelte Bindung an Zellen nachgewiesen werden konnte. Der Grund weshalb die gegen CEACAM8 gerichteten [MPGB6/40cFluo] Partikel keine eindeutig spezifische Bindung zeigten, konnte abschließend nicht mehr geklärt werden.

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass sich die von der Siemens AG favorisierten [SV] Partikel der Firma Bracco nicht als geeignet erwiesen, um die Fragestellung dieser Arbeit zu bearbeiten. Dagegen lieferten die für Ultraschalluntersuchungen geeigneten [TS] Partikel der Firma Targeson positive Ergebnisse. Diese Partikel müssten aber, aufgrund der hier aufgezeigten Schwächen, weiterentwickelt werden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die aufgeführten magnetischen Partikel untersucht, obwohl bereits im Vorfeld bekannt war, dass die eigentliche Fragestellung mit diesen Partikeln nicht beantwortet werden konnte. Zwar traten auch hier wieder unterschiedliche partikelabhängige Probleme auf, aber die Dynabeads[®] M-280 Streptavidin [SDB] der Firma Invitrogen und die Protein G MicroBeads [MPGB] der Firma Miltenyi lieferten Ergebnisse, die eine spezifische Markierung CEACAM1 exprimierende Zellen mit CEACAM1-bindenden Partikeln zeigten. Von diesen wäre die Verwendung der [MPGB] Partikel aufgrund ihrer Größe und ihres Paramagnetismus bei Fragestellungen im Bereich von MRT-Untersuchungen durchaus möglich.

6. Zusammenfassung

Prostatakrebs stellt in Deutschland und in Europa mit ca. 60000 Neuerkrankungen im Jahr die häufigste Krebserkrankung bei Männern dar^[3,4] und ist für ca. 10 % aller krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich.^[3,5] Für eine erfolgreiche Tumorbehandlung ist eine gesicherte Diagnose im sehr frühen Anfangsstadium der Krebsentwicklung erforderlich. Zu Beginn der Krebsentwicklung kann der Tumor noch ohne ein eigenes Versorgungssystem wachsen. Sobald er aber eine bestimmte Größe überschreitet muss er zum weiteren Wachstum ein eigenes Gefäßbett initiieren. Deshalb ist der Nachweis einer Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) seit einiger Zeit im Fokus der Krebs-Diagnoseentwicklung. Diese Diagnostik sollte nicht-invasiv, kostengünstig und schnell durchführbar sein. Diese Voraussetzungen werden zurzeit nur von der Ultraschalldiagnostik erfüllt. Im Falle der Prostata-Diagnose werden Mikropartikel zur Kontrastverstärkung eingesetzt. Deren Verwendung, als molekulare Markersysteme zur zuverlässigen Darstellung des mikrovaskulären Tumorgefäßbetts, ist jedoch bisher nicht über tierbasierte *in vivo* Studien hinausgegangen, wie die aktuelle „Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)“ des National Center for Biotechnology Information (US) zeigt.^[153]

Unsere Arbeitsgruppe identifizierte in vorangegangenen Studien CEACAM1 als Neoangiogenesemarker in Endothelzellen in neugebildeten Tumorblutgefäßen.^[41] Eine spezifische Markierung dieses Proteins mit ultraschallgeeigneten Partikeln stellt ein neues molekulares Markersystem zur Visualisierung des Tumorgefäßbetts im Tumor-Frühstadium mittels Ultraschall dar. Daher wurde zunächst das kommerziell erhältliche Ultraschallkontrastmittel SonoVue [SV] der Firma Bracco mit einem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten CEACAM1-spezifischen Antikörper beladen, um ein solches Markersystem zu generieren. Allerdings stellten sich dabei die [SV] Partikel, aufgrund ihrer geringen Stabilität und des Fehlens einer kovalenten Bindungsmöglichkeit für Antikörper, als gänzlich ungeeignet heraus. Die Bindung erfolgte hier lediglich über Adsorption. Eine solch gering affine Bindung ist aber für Anwendungen in der Angiologie, wo starke Scherkräfte auftreten, nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden weitere kommerziell erhältliche Partikel mit dem CEACAM1-spezifischen Antikörper beladen und analysiert. Eine Bindung an Protein G Partikel sollte hierbei die korrekte Ausrichtung der Antikörper sicherstellen. Die Bindung über das Biotin-Streptavidin System mit weiteren Partikeln gewährleistete dagegen die Flexibilität der Antikörper. Beide Systeme ermöglichten zudem kovalent ähnlichen Bindungscharakter. Für die Untersuchung der Bindungseigenschaften dieser CEACAM1-bindenden Partikel sollte als *in vitro* Testsystem die Endothelzelllinie eines Angiosarkoms der Kopfhaut (AS-M.5) eingesetzt werden, da diese unter anderem CEACAM1⁺ sind. Bei deren Verwendung bestand jedoch keine Möglichkeit, den Grad der unspezifischen Bindung CEACAM1-bindender Partikel zu analysieren. Daher wurde zunächst in

einem *in vitro* Testsystem mit einer humanen CEACAM1 stabil transfizierten HeLa Zelllinie gearbeitet. Als Kontrolle und zum Nachweis unspezifischer Bindung stand somit die HeLa Wildtyp Zelllinie zur Verfügung. In unserer Arbeitsgruppe stand zusätzlich eine HeLa Zelllinie mit stabil transfizierten CEACAM8 zur Verfügung, welches normalerweise ausschließlich auf Granulozyten expremiert wird. Des Weiteren wird CEACAM8 nicht nur an Zell-Zell Kontaktstellen, sondern auch vermehrt apikal expremiert^[85,86]. Zusätzlich ist es über eine GPI-Verankerung und nicht wie CEACAM1 transmembran an der Zellmembran gebunden, wodurch CEACAM8 eine höhere laterale Beweglichkeit in der Zellmembran besitzt^[87]. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch, dass weder die Art der Membranverankerung noch die Lokalisation der Proteine einen Einfluss auf die Bindung antikörperbeladener Partikel hatte. Diese Zelllinie wurde daher ebenfalls zur parallelen Entwicklung einer Isotypenkontrolle zu den CEACAM1-bindenden Partikeln genutzt. Neben den [SV] Partikeln erwiesen sich auch die eingesetzten Roti-MagBeads Protein G [RPG] Partikel der Firma Carl Roth aufgrund ihrer unspezifischen Bindung für die geplanten Anwendungen als nicht geeignet. Diese war so stark ausgeprägt, dass die Ergebnisse der Kontrollen nahezu identisch zu den Versuchsergebnissen waren. Die Targestar [TS] Partikel der Firma Targeson, die Dynabeads[®] M-280 Streptavidin [SDB] der Firma Invitrogen und die Protein G MicroBeads [MPGB] der Firma Miltenyi ergaben hingegen vielversprechende positive Resultate. So zeigten diese drei Partikelarten eine eindeutige antikörpervermittelte Bindung und lediglich bei den [SDB] Partikeln einen vernachlässigbaren unspezifischen Bindungsanteil. Allerdings können [MPGB] Partikel für ultraschallbasierte Diagnostik nicht verwendet werden, da Nanopartikel im Ultraschall nicht detektierbar sind.^[89] Sie könnten jedoch bei Fragestellungen im Bereich von MRT-Untersuchungen eingesetzt werden. Für weiterführende Untersuchungen im *in vitro* Testsystem mit AS-M.5 Zellen sollten daher die vielversprechenden [TS] Partikel, welche speziell für *in vivo* Ultraschalluntersuchungen entwickelt wurden, und die [SDB] Partikel verwendet werden. Hierbei würden sich die [SDB] Partikel als Kontrollmarkersystem bei *in vitro* Untersuchungen anbieten. Trotz der eindeutigen Ergebnisse müssten die Partikel zur weiteren Verwendung modifiziert werden, da sie aufgrund ihrer Größe von Makrophagen erkannt und durch das Retikuloendotheliale System (RES) entfernt werden könnten.^[134] Eine Maskierung zum Beispiel durch das Verwenden von Polyethylenglycolen würde dies verhindern.^[125,135,136] Des Weiteren würden das Kopplungsprotein Streptavidin und das Fc-Fragment des gebundenen Antikörpers in humanen Anwendungen Immunogenität hervorrufen.^[126,144] Diese Immunogenität aufgrund des Fc-Fragments könnte durch die Verwendung der F(ab)₂-Fragmente umgangen werden, wobei die Beladung der Partikel über bivalente Crosslinker erfolgen müsste. Dadurch würde eine kovalente ortsspezifische Bindung erreicht und gleichzeitig der Einsatz eines Kopplungsproteins vermieden werden. Der Einsatz

von Polyethylenglycolen mit entsprechenden reaktiven Endgruppen als *Crosslinker* würde zudem die Flexibilität und damit die Antigenerkennung aufrecht halten.^[125]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit den ersten Schritt bei der Etablierung CEACAM1-bindender Partikel für die bildgebende Diagnostik des Prostatakarzinoms darstellen. Dieses System würde sich sehr gut in die molekularen Markersysteme der „Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)“ einfügen.^[153]

7. Summary

Prostate cancer is the most common cancer in men with about 60000 incidences per year in Germany and Europe and it is one of the leading causes of cancer-related death in men. ^[3,4,5] A very early confirmed diagnosis of prostate cancer is the basis for a successful cancer therapy. The reason for this is that tumors can develop only over a certain size, if they manage to initiate its own vascular bed. Therefore, detection of new blood vessels formation (neovascularization) is the focus of novel cancer diagnosis strategies. Such diagnosis should be non-invasive, cost-efficient and easy realizable. Currently, this is only achieved by ultrasonication based detection systems. In the case of prostate cancer diagnosis micro particles are used for contrast enhancement of neovascularization. But the application of micro particles as a molecular marker system in reliable visualization of the micro vascular bed of tumors is not yet beyond the point of animal *in vivo* studies, as documented by the current „Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)“ of the National Center for Biotechnology Information (US).^[153] In previous studies our group identified CEACAM1 as a novel marker for neovascularization in endothelial cells of new-formed blood vessels. Thus, combining anti CEACAM1 antibodies with ultrasound detectable particles would lead in a new molecular marker system to visualize early stage tumor vessels via ultrasound. Hence, the goal of this work was the development of such a marker system by coupling specific anti CEACAM1 antibodies to a commercial available ultrasound contrast agent. The used antibodies were developed in our group previously. The first particle used was the commercial available ultrasound contrast agent SonoVue [SV]. But due to their low stability and the lack of covalently antibody coupling sites the [SV] particles were proven as not suitable for our application. The binding of antibodies to [SV] particles was achieved via adsorption only. Such low affine binding would not be sufficient for applications in angiology, where strong shear forces appear. Due to these results other commercial available particles were used for coupling CEACAM1 specific antibody in addition. The advantage of these other particles was the possibility to have a nearly covalent binding which was reached by using protein G particles and biotin particles. Hereby the use of protein G particles should guarantee the correct binding direction of the antibodies without influencing their functionality and biotin particles provided flexibility. To analyze the binding properties of the antibody loaded particles a CEACAM1⁺ endothelial cell line of an angiosarcoma of the scalp (AS-M.5) should be used as *in vitro* test system. In addition, HeLa wild type, HeLa-CEACAM1 and HeLa-CEACAM8 cell lines were used to identify particles with nonspecific binding. The differences between the two proteins CEACAM1 and CEACAM8 is their membrane localization and the kind of membrane binding. CEACAM1 is transmembrane anchored whereas CEACAM8 is membrane-bound via a GPI-anchor. Thus, in contrast to CEACAM1 CEACAM8 has a higher lateral mobility and is localized not only at cell-cell contact areas but also

apical. ^[85,86,87] Due to the differences of the target proteins CEACAM1 and CEACAM8 it could be shown that neither the membrane anchorage nor the localization of the target protein had any influence on particle binding properties. In addition this cell line was used for parallel development of isotype control particles, resulting that the control particles were characterized in an analog test system like the normal particles. The achieved results demonstrated that next to the [SV] particles the used Roti-MagBeads Protein G [RPGB] particles of Carl Roth Company were not suitable for our applications as well. These particles had shown such high unspecific binding that the results of the control were more or less identical to the normal test results. In contrast, Targestar [TS] particles from Targeson, Dynabeads[®] M-280 Streptavidin [SDB] from Invitrogen and Protein G MicroBeads [MPGB] from Miltenyi were showing promising results. At all these different particles a distinct antibody mediated cell binding could be observed and only [SDB] particles showed negligible unspecific binding. Anyway, the usage of [MPGB] particles in ultrasonic based diagnostics would not be appropriate. Because of their size they would not be detectable by ultrasound. ^[89] Therefore they may be used in MRT applications. For prospective *in vitro* research with AS-M.5 cells [TS] and [SDB] particles should be used, in which [SDB] particles serve as a control marker system. Nevertheless a further development of both particles is required. Because of their size they can be identified by macrophages and removed by the reticuloendothelial system (RES), ^[134] which could be avoided by using a polyethylene glycol masking for example. ^[125,135,136] Another problem of the favored [TS] and [SDB] particles is caused by the coupling protein Streptavidin on the one hand and the Fc-fragment of the bound antibody on the other hand. These proteins would lead to an immunogenic reaction in human applications. ^[126,144] A simple way to overcome these problems is by the usage of F(ab)₂-fragments, whereupon specific coupling to the particles could be achieved via a bifunctional Crosslinker. Polyethylene glycols with appropriate reactive groups could serve as crosslinker for this application, because simultaneously masking of the particles and flexibility for antigen recognition are given. ^[125] In summary the results of this work provide the first step of establishing CEACAM1 binding particles as a marker in molecular imaging of prostate cancer. This kind of system would extend the list of molecular marker systems as mentioned in the „Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)“ ^[153]

8th Literaturverzeichnis

1. Ferlay J. et al. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* **127**, 12, 2893-2917.
2. Haberland Joerg et al. (2006). Die zukuenftige Entwicklung des Krebsgeschehens in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **49**, 5, 459-467.
3. Haberland Joerg (2010). *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin,
4. Bahler C. D. et al. (2010). Radical prostatectomy as initial monotherapy for patients with pathologically confirmed high-grade prostate cancer. *BJU International* **105**, 10, 1372-1376.
5. Ahmedin, J. (2008). *Cancer Facts & Figures 2008*. American Cancer Society, Atlanta,
6. Hohn O. et al. (2009). Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus(XMRV) in German prostate cancer patients. *Retrovirology* **6**, 1, 92-103.
7. Stroepe S. A. et al. (2010). Prostate cancer screening: current status and future perspectives. *Nat Rev Urol* **7**, 9, 487-493.
8. Gjertson C. K. et al. (2011). Use and Assessment of PSA in Prostate Cancer. *The Medical clinics of North America* **95**, 1, 191-200.
9. Beecken W. D. et al. (2005). Clinical relevance of serum angiogenic activity in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**, 3, 655-661.
10. Gehling U. M. et al. (2008). Mechanisms of tumour vascularisation. *magazine of european medical oncology* **1**, 3-7.
11. Dörrschuck A. (2006). Neoangiogenese - prognostischer Faktor bei Tumorerkrankungen. *Fachinformation 0019* 1-4.
12. Ganswindt U. et al. (2006). Combination of celecoxib with percutaneous radiotherapy in patients with localised prostate cancer - a phase I study. *Radiation Oncology* **1**, 1, 9.
13. Turkbey B. et al. (2009). Imaging Localized Prostate Cancer: Current Approaches and New Developments. *American Journal of Roentgenology* **192**, 6, 1471-1480.
14. Weissleder R. et al. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 7187, 580-589.
15. Schlemmer H. P. et al. (2009). Molekulare Bildgebung. *Dtsch med Wochenschr* **134**, 19, 1000,1005.
16. Platt J. F. et al. (1987). The accuracy of CT in the staging of carcinoma of the prostate. *American Journal of Roentgenology* **149**, 2, 315-318.

17. Sanz G. et al. (1999). Positron emission tomography with 18fluorine-labelled deoxyglucose: utility in localized and advanced prostate cancer. *BJU International* **84**, 9, 1028-1031.
18. Lindner U. et al. (2010). Image guidance for focal therapy of prostate cancer. *World Journal of Urology* **28**, 6, 727-734.
19. Kim C. K. et al. (2007). Value of Diffusion-Weighted Imaging for the Prediction of Prostate Cancer Location at 3T Using a Phased-Array Coil: Preliminary Results. *Investigative Radiology* **42**, 12, 842-847.
20. Costello L. C. et al. (2005). Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer. *Mitochondrion* **5**, 3, 143-153.
21. Ramirez de Molina A. et al. (2002). Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**, 3, 580-583.
22. Ocak I. et al. (2007). Dynamic Contrast-Enhanced MRI of Prostate Cancer at 3 T: A Study of Pharmacokinetic Parameters. *American Journal of Roentgenology* **189**, 4, W192-W201.
23. Noworolski S. M. et al. (2008). Dynamic contrast-enhanced MRI and MR diffusion imaging to distinguish between glandular and stromal prostatic tissues. *Magnetic Resonance Imaging* **26**, 8, 1071-1080.
24. Rioja J. et al. (2010). Role of positron emission tomography in urological oncology. *BJU International* **106**, 11, 1578-1593.
25. Tilki D. et al. (2007). Molecular imaging of tumor blood vessels. *Urologe A* **46**, 9, 1266-1271.
26. Beerlage H.P. (2001). Correlation of transrectal ultrasound, computer analysis of transrectal ultrasound and histopathology of radical prostatectomy specimen. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **4**, 1, 56-62.
27. Toi A. et al. (2007). The Continuing Importance of Transrectal Ultrasound Identification of Prostatic Lesions. *The Journal of Urology* **177**, 2, 516-520.
28. Norberg M. et al. (1997). The sextant protocol for ultrasound-guided core biopsies of the prostate underestimates the presence of cancer. *Urology* **50**, 4, 562-566.
29. Brannigan M. et al. (2004). Blood Flow Patterns in Focal Liver Lesions at Microbubble-enhanced US1. *Radiographics* **24**, 4, 921-935.
30. Wickline S. A. et al. (2003). Nanotechnology for Molecular Imaging and Targeted Therapy. *Circulation* **107**, 8, 1092-1095.
31. Agdeppa E. D. et al. (2009). A review of imaging agent development. *AAPS. J* **11**, 2, 286-299.
32. Backer M. V. et al. (2007). Molecular imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature with single-chain VEGF-based probes. *Nat Med* **13**, 4, 504-509.
33. Cai W. et al. (2006). Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects. *Nano Letters* **6**, 4, 669-676.

34. Sosnovik D. et al. (2008). Magnetic nanoparticles for MR imaging: agents, techniques and cardiovascular applications. *Basic Research in Cardiology* **103**, 2, 122-130.
35. Oostendorp M. et al. (2008). Quantitative Molecular Magnetic Resonance Imaging of Tumor Angiogenesis Using cNGR-Labeled Paramagnetic Quantum Dots. *Cancer Research* **68**, 18, 7676-7683.
36. Vanderheyden J. L. et al. (2006). Evaluation of ^{99m}Tc-MAG3-annexin V: influence of the chelate on in vitro and in vivo properties in mice. *Nuclear Medicine and Biology* **33**, 1, 135-144.
37. Liu J. et al. (2010). Molecular Mapping of Tumor Heterogeneity on Clinical Tissue Specimens with Multiplexed Quantum Dots. *ACS Nano* **4**, 5, 2755-2765.
38. Klunk W. E. et al. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of Neurology* **55**, 3, 306-319.
39. Neumaier B. et al. (2008). Short Communication: ¹⁸F-Immuno-PET: Determination of Anti-CD66 Biodistribution in a Patient with High-Risk Leukemia. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **23**, 6, 819-824.
40. Erguen S. et al. (2000). CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1: A Potent Angiogenic Factor and a Major Effector of Vascular Endothelial Growth Factor. *Molecular Cell* **5**, 2, 311-320.
41. Tilki D. et al. (2006). CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer. *Oncogene* **25**, 36, 4965-4974.
42. Kleinerman D. I. et al. (1995). Consistent Expression of an Epithelial Cell Adhesion Molecule (C-CAM) during Human Prostate Development and Loss of Expression in Prostate Cancer: Implication as a Tumor Suppressor. *Cancer Research* **55**, 6, 1215-1220.
43. Neumaier M. et al. (1993). Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **90**, 22, 10744-10748.
44. Gaur S. et al. (2008). Altered splicing of CEACAM1 in breast cancer: identification of regulatory sequences that control splicing of CEACAM1 into long or short cytoplasmic domain isoforms. *Mol Cancer* **7**, 46.
45. Hammarstroem S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in Cancer Biology* **9**, 2, 67-81.
46. Oliveira-Ferrer L. et al. (2004). Dual Role of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 in Angiogenesis and Invasion of Human Urinary Bladder Cancer. *Cancer Research* **64**, 24, 8932-8938.
47. Oebrink B. (1997). CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 5, 616-626.
48. Gray-Owen S. D. et al. (2006). CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol* **6**, 6, 433-446.

49. Brandriff B. F. et al. (1992). Order and genomic distances among members of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family determined by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **12**, 4, 773-779.
50. Olsen A. et al. (1994). Gene Organization of the Pregnancy-Specific Glycoprotein Region on Human Chromosome 19: Assembly and Analysis of a 700-kb Cosmid Contig Spanning the Region. *Genomics* **23**, 3, 659-668.
51. Benchimol S. et al. (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* **57**, 2, 327-334.
52. Ocklind C. et al. (1982). Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 12, 6788-6795.
53. Rojas M. et al. (1990). Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca²⁺(+)-dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differentiation* **1**, 11, 527-533.
54. Oikawa S. et al. (1989). Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: Homophilic and heterophilic adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **164**, 1, 39-45.
55. Oikawa S. et al. (1991). A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 13, 7995-8001.
56. Thompson J. A. et al. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **5**, 5, 344-366.
57. Edlund M. et al. (1993). Different isoforms and stock-specific variants of the cell adhesion molecule C-CAM (cell-CAM 105) in rat liver. *European Journal of Biochemistry* **213**, 3, 1109-1116.
58. Najjar S. M. et al. (1993). pp120/ecto-ATPase, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase, is expressed as two variably spliced isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 2, 1201-1206.
59. McCuaig K. et al. (1993). Expression of the Bgp gene and characterization of mouse colon biliary glycoprotein isoforms. *Gene* **127**, 2, 173-183.
60. Nagel G. et al. (1993). Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *European Journal of Biochemistry* **214**, 1, 27-35.
61. Ravetch J. V. et al. (2000). Immune Inhibitory Receptors. *Science* **290**, 5489, 84-89.
62. Oebrink B. (1991). C-CAM (cell-CAM 105) - a member of the growing immunoglobulin superfamily of cell adhesion proteins. *BioEssays* **13**, 5, 227-234.
63. Hammarstroem S. et al. (2001). Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? *Trends in Microbiology* **9**, 3, 119-125.

64. Nouvion A. L. et al. (2009). CEACAM1: modulateur central du métabolisme, de la progression tumorale, de l'angiogenèse et de l'immunité. *Med Sci (Paris)* **25**, 3, 247-252.
65. Tilki D. et al. (2007). One molecule, two faces. Epithelial loss of cell adhesion molecule CEACAM1 activates angiogenesis in bladder and prostate cancer. *Urologe A* **46**, 9, 1128-1134.
66. Huber M. et al. (1999). The Carboxyl-terminal Region of Biliary Glycoprotein Controls Its Tyrosine Phosphorylation and Association with Protein-tyrosine Phosphatases SHP-1 and SHP-2 in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1, 335-344.
67. Hsieh J. T. et al. (1995). Tumor Suppressive Role of an Androgen-regulated Epithelial Cell Adhesion Molecule (C-CAM) in Prostate Carcinoma Cell Revealed by Sense and Antisense Approaches. *Cancer Research* **55**, 1, 190-197.
68. Kuespert K. et al. (2006). CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Current Opinion in Cell Biology* **18**, 5, 565-571.
69. Volpert O. et al. (2002). Inhibition of Prostate Tumor Angiogenesis by the Tumor Suppressor CEACAM1. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 38, 35696-35702.
70. Scheffrahn I. et al. (2005). Control of density-dependent, cell state-specific signal transduction by the cell adhesion molecule CEACAM1, and its influence on cell cycle regulation. *Experimental Cell Research* **307**, 2, 427-435.
71. Abou-Rjaily G. A. et al. (2004). CEACAM1 modulates epidermal growth factor receptor-mediated cell proliferation. *The Journal of Clinical Investigation* **114**, 7, 944-952.
72. Oebrink B. et al. (2002). Computational Analysis of Isoform-Specific Signal Regulation by CEACAM1 – A Cell Adhesion Molecule Expressed in PC12 Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **971**, 1, 597-607.
73. Turbide C. et al. (1997). Optimal Ratios of Biliary Glycoprotein Isoforms Required for Inhibition of Colonic Tumor Cell Growth. *Cancer Research* **57**, 13, 2781-2788.
74. Kilic N. et al. (2005). Pro-angiogenic Signaling by the Endothelial Presence of CEACAM1. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 3, 2361-2369.
75. Schaeffer H. et al. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 2, 368-379.
76. LAEMMLI U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 5259, 680-685.
77. Neuhoff V. et al. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 6, 255-262.
78. Towbin H. et al. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 9, 4350-4354.

79. Green N. M. (1965). A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin. *Biochemical Journal* **94**, 23c-24c.
80. Green, N. M. (1970). [74] *Spectrophotometric determination of avidin and biotin*. Methods in Enzymology - Vitamins and Coenzymes, Academic Press, 418-424.
81. Holmberg A. et al. (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 3, 501-510.
82. Bjorck L. et al. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology* **133**, 2, 969-974.
83. Saha K. et al. (2003). Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Anal. Chem.* **75**, 4, 835-842.
84. Lu D. R. et al. (1991). Calculation of solvation interaction energies for protein adsorption on polymer surfaces. *J Biomater. Sci Polym. Ed* **3**, 2, 127-147.
85. Ducker T. P. et al. (1992). Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* **52**, 1, 11-16.
86. Kuroki M. et al. (1992). Augmented expression and release of nonspecific cross-reacting antigens (NCAs), members of the CEA family, by human neutrophils during cell activation. *Journal of Leukocyte Biology* **52**, 5, 551-557.
87. Berling B. et al. (1990). Cloning of a Carcinoembryonic Antigen Gene Family Member Expressed in Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients and Bone Marrow. *Cancer Research* **50**, 20, 6534-6539.
88. Noda M. et al. (1987). High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol-anchored membrane protein. *J Cell Biol* **105**, 4, 1671-1677.
89. Debbage P. et al. (2008). Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. *Histochem. Cell Biol* **130**, 5, 845-875.
90. Peldschus K. et al. (2010). Quantitative MR imaging of targeted SPIO particles on the cell surface and comparison to flow cytometry. *Magn Reson. Imaging* **28**, 4, 599-606.
91. Anderson G. W. et al. (1963). N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 19, 3039.
92. Montalbetti C. A. G. N. et al. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 46, 10827-10852.
93. Putnam F. W. (1969). Immunoglobulin Structure: Variability and Homology. *Science* **163**, 3868, 633-644.
94. Zhou L. X. et al. (2007). Binding of targeted microbubble contrast agent to choriocarcinoma cells in vitro. *Nan. Fang Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* **27**, 11, 1706-1708.

95. Lawrence M. B. et al. (1987). Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* **70**, 5, 1284-1290.
96. Cho I. H. et al. (2007). Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces. *Analytical Biochemistry* **365**, 1, 14-23.
97. Schneider M. (1999). SonoVue, a new ultrasound contrast agent. *European Radiology* **9**, 0, S347-S348.
98. Van Liew H. D. et al. (1997). Stabilized bubbles in the body: pressure-radius relationships and the limits to stabilization. *Journal of Applied Physiology* **82**, 6, 2045-2053.
99. Rychak J. J. et al. (2007). Microultrasound molecular imaging of vascular endothelial growth factor receptor 2 in a mouse model of tumor angiogenesis. *Mol Imaging* **6**, 5, 289-296.
100. Klibanov A. L. (1999). Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev* **37**, 1-3, 139-157.
101. Lindner J. R. et al. (2001). Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation* **104**, 17, 2107-2112.
102. Rychak J. J. et al. (2006). Deformable gas-filled microbubbles targeted to P-selectin. *Journal of Controlled Release* **114**, 3, 288-299.
103. Couture O. et al. (2011). Tumor delivery of ultrasound contrast agents using Shiga toxin B subunit. *Mol Imaging* **10**, 2, 135-143.
104. Korpanty G. et al. (2007). Monitoring Response to Anticancer Therapy by Targeting Microbubbles to Tumor Vasculature. *Clinical Cancer Research* **13**, 1, 323-330.
105. Miltenyi S. et al. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 2, 231-238.
106. Hansen-Hagge T. E. et al. (2001). Identification of sample-specific sequences in mammalian cDNA and genomic DNA by the novel ligation-mediated subtraction (Limes). *Nucleic Acids Research* **29**, 4, e20.
107. Cook P. J. et al. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* **458**, 7238, 591-596.
108. Konishi Y. et al. (2002). Isolation of living neurons from human elderly brains using the immunomagnetic sorting DNA-linker system. *Am J Pathol* **161**, 5, 1567-1576.
109. Chen R. et al. (1999). Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clinical Chemistry* **45**, 9, 1693-1694.
110. Mailaender V. et al. (2009). Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* **10**, 9, 2379-2400.
111. Reznik G. O. et al. (1998). A streptavidin mutant with altered ligand-binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **95**, 23, 13525-13530.

112. Schneider C. et al. (1982). A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 18, 10766-10769.
113. Ling Hu et al. (2011). Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of HepG2 cells. *Journal of Nanoscience Letters* **1**, 1, 1-16.
114. Lewin M. et al. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* **18**, 4, 410-414.
115. Weissleder R. et al. (1990). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology* **175**, 2, 494-498.
116. Fischer A. et al. (2002). Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Required for Associative Learning. *The Journal of Neuroscience* **22**, 9, 3700-3707.
117. Frank J. A. et al. (2002). Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents. *Acad. Radiol.* **9 Suppl 2**, S484-S487.
118. Kraitchman D. L. et al. (2003). In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Mesenchymal Stem Cells in Myocardial Infarction. *Circulation* **107**, 18, 2290-2293.
119. Farrell M. et al. (2010). Surface forces and protein adsorption on dextran- and polyethylene glycol-modified polydimethylsiloxane. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **81**, 2, 468-475.
120. Tharakan J. P. et al. (1990). Effect of feed flow-rate, antigen concentration and antibody density on immunoaffinity purification of coagulation factor IX. *Journal of Chromatography A* **522**, 153-162.
121. Orthner C. L. et al. (1991). Comparison of the performance of immunosorbents prepared by site-directed or random coupling of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A* **558**, 1, 55-70.
122. Calderon A. J. et al. (2011). Optimizing endothelial targeting by modulating the antibody density and particle concentration of anti-ICAM coated carriers. *Journal of Controlled Release* **150**, 1, 37-44.
123. Lorenz M. R. et al. (2006). Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials* **27**, 14, 2820-2828.
124. Mailaender V. et al. (2008). Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents. *Mol Imaging Biol* **10**, 3, 138-146.
125. Maruyama K. et al. (1995). Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol) s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1234**, 1, 74-80.
126. Pysz M. A. et al. (2010). Antiangiogenic cancer therapy: monitoring with molecular US and a clinically translatable contrast agent (BR55). *Radiology* **256**, 2, 519-527.
127. Correas J. M. et al. (2001). Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur. Radiol.* **11**, 8, 1316-1328.

128. Qin S. et al. (2009). Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering. *Phys. Med Biol* **54**, 6, R27-R57.
129. Pisani E. et al. (2006). Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization. *Langmuir* **22**, 9, 4397-4402.
130. Lindner J. R. (2002). Evolving applications for contrast ultrasound. *Am J Cardiol.* **90**, 10A, 72J-80J.
131. Lyshchik A. et al. (2007). Molecular imaging of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression using targeted contrast-enhanced high-frequency ultrasonography. *J Ultrasound Med* **26**, 11, 1575-1586.
132. Ellegala D. B. et al. (2003). Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation* **108**, 3, 336-341.
133. Liu J. et al. (2006). Nanoparticles as image enhancing agents for ultrasonography. *Phys. Med Biol* **51**, 9, 2179-2189.
134. Carrillo-Conde B. R. et al. (2012). Chemistry-dependent adsorption of serum proteins onto polyanhydride microparticles differentially influences dendritic cell uptake and activation. *Acta Biomater.* **8**, 10, 3618-3628.
135. Moghimi S. M. et al. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* **42**, 6, 463-478.
136. Vonarbourg A. et al. (2006). Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **27**, 24, 4356-4373.
137. Dunn S. E. et al. (1994). Polystyrene-poly (ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the in vitro cell interaction and in vivo biodistribution. *Pharm. Res.* **11**, 7, 1016-1022.
138. Gref R. et al. (1995). The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* **16**, 2ΓÇô3, 215-233.
139. Brigger I. et al. (2002). Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J Pharmacol. Exp. Ther* **303**, 3, 928-936.
140. Stark D. D. et al. (1988). Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* **168**, 2, 297-301.
141. Holzapfel Verena (2006). Synthesis and biomedical applications of functionalized fluorescent and magnetic dual reporter nanoparticles as obtained in the miniemulsion process. *Journal of Physics: Condensed Matter* **18**, 38, S2581.
142. Funovics M. A. et al. (2004). MR imaging of the her2/neu and 9.2.27 tumor antigens using immunospecific contrast agents. *Magnetic Resonance Imaging* **22**, 6, 843-850.
143. Sipkins D. A. et al. (1998). Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat Med* **4**, 5, 623-626.

144. Courtenay-Luck N. S. et al. (1986). Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. *Cancer Res.* **46**, 12 Pt 1, 6489-6493.
145. Bendas G. et al. (1999). Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int. J Pharm.* **181**, 1, 79-93.
146. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) (2013). *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. National Center for Biotechnology Information (US),
147. Hicklin D. J. et al. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* **23**, 5, 1011-1027.
148. Brooks P. C. et al. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**, 5158, 569-571.
149. Bernabeu C. et al. (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 10, 954-973.
150. Brekken R. A. et al. (2001). VEGF-VEGF receptor complexes as markers of tumor vascular endothelium. *J Control Release* **74**, 1-3, 173-181.
151. Paz K. et al. (2005). Development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor receptor 2. Current status and future perspective. *Front Biosci.* **10**, 1415-1439.
152. Ferrara N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev* **25**, 4, 581-611.
153. Deshpande N. et al. (2010). Molecular ultrasound assessment of tumor angiogenesis. *Angiogenesis.* **13**, 2, 175-188.
154. Desgrosellier J. S. et al. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **10**, 1, 9-22.
155. Cai W. et al. (2006). Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. *Anticancer Agents Med Chem.* **6**, 5, 407-428.
156. Fonsatti E. et al. (2003). Endoglin (CD105): a target for anti-angiogenetic cancer therapy. *Curr. Drug Targets.* **4**, 4, 291-296.
157. Ma X. et al. (2000). Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **20**, 12, 2546-2552.
158. Deshpande N. et al. (2011). Tumor angiogenic marker expression levels during tumor growth: longitudinal assessment with molecularly targeted microbubbles and US imaging. *Radiology* **258**, 3, 804-811.
159. Anderson C. R. et al. (2010). scVEGF microbubble ultrasound contrast agents: a novel probe for ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis. *Invest Radiol.* **45**, 10, 579-585.
160. Pochon S. et al. (2010). BR55: a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis. *Invest Radiol.* **45**, 2, 89-95.

161. Leong-Poi H. et al. (2003). Noninvasive assessment of angiogenesis by ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)-integrins. *Circulation* **107**, 3, 455-460.
162. Weller G. E. et al. (2005). Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine. *Cancer Res.* **65**, 2, 533-539.
163. Willmann J. K. et al. (2010). Targeted contrast-enhanced ultrasound imaging of tumor angiogenesis with contrast microbubbles conjugated to integrin-binding knottin peptides. *The Journal of Nuclear Medicine* **51**, 3, 433-440.
164. Anderson C. R. et al. (2011). Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent. *Invest Radiol.* **46**, 4, 215-224.
165. Borden M. A. et al. (2008). A stimulus-responsive contrast agent for ultrasound molecular imaging. *Biomaterials* **29**, 5, 597-606.
166. Horst A. K. et al. (2009). CEACAM1+ myeloid cells control angiogenesis in inflammation. *Blood* **113**, 26, 6726-6736.
167. Miranville A. et al. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 3, 349-355.
168. Sun P. et al. (2009). Preparation and Characterization of Fe₃O₄/CdTe Magnetic/Fluorescent Nanocomposites and Their Applications in Immuno-Labeling and Fluorescent Imaging of Cancer Cells. *Langmuir* **26**, 2, 1278-1284.
169. Borchers K. (2007). Mikrostrukturierte Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln als dreidimensionale Affinitätsfläche zum Proteinnachweis auf Microarrays. 1-127.
170. Allen T. M. et al. (1995). A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1237**, 2, 99-108.
171. Switzer C. H. et al. (2011). Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene* **30**, 22, 2504-2513.
172. Chen S. et al. (1997). Rolling and transient tethering of leukocytes on antibodies reveal specializations of selectins. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **94**, 7, 3172-3177.
173. Eniola A. O. et al. (2003). Artificial polymeric cells for targeted drug delivery. *J Control Release* **87**, 1-3, 15-22.
174. Dickerson J. B. et al. (2001). Limited adhesion of biodegradable microspheres to E- and P-selectin under flow. *Biotechnol Bioeng.* **73**, 6, 500-509.
175. Kumar S. et al. (2008). Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nat. Protocols* **3**, 2, 314-320.

9. Anhang

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. S. Ergün für die Überlassung dieses Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum in Essen.

Herrn PD Dr. B. B. Singer für seine fachliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Engagement zur Fertigstellung dieser Arbeit. Des Weiteren für die Übernahme der Arbeit als Fachgutachter.

Herrn Prof. Dr. M. Epple für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Siemens AG für die Finanzierung dieses Projektes.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Ergün für die freundliche Atmosphäre, Hilfsbereitschaft und Unterstützung während dieser Zeit.

Meinen Eltern und Schwestern für die Unterstützung und Motivation schon während des gesamten Studiums. Ohne sie wäre ich nie soweit gekommen.

Meiner Ehefrau Dr. Miria Moser für die Standleitung zum MPI nach Dortmund, um fachliche Fragen zu beantworten. Für ihr in mich gesetztes Vertrauen, ihre Unterstützung und ihren Rückhalt vor, während und vor allem auch jetzt nach meiner Promotionszeit.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

