Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielstellung 1

2 Physikalische Grundlagen und Magnetrelaxometrie 9

2.1 Grundlagen des Magnetismus 9

2.2 Magnetische Nanopartikel und Superparamagnetismus 12

2.3 Magnetrelaxometrie 18

2.3.1 Relaxationsverhalten von Ferrofluiden 18

2.3.2 Experimenteller Aufbau 21

2.3.3 Messung und Auswertung der Relaxation von Ferrofluiden 24

3 Magnetische Nanopartikel 30

3.1 Verwendung in der Magnetrelaxometrie 32

3.2 Stabilitätsuntersuchungen 34

3.3 Optimierung magnetischer Nanopartikel 37

3.4 Diskussion 42

3.5 Zusammenfassung 44

4 Herstellung magnetischer Sonden 46

4.1 Kopplungsmethoden 46

4.2 Herstellung der Stärke-Cobaltferrit-Sonden 48

4.3 Herstellung der Dextran-Eisenoxid-Sonden 52

4.4 Herstellung der Antikörper-Eisenoxid-Sonden 56

4.5 Diskussion 60

4.6 Zusammenfassung 62

5 Bindungsfähigkeit magnetischer Sonden 64

5.1 Aggregationsassays 64

5.1.1 Aggregationsassays mit Biotin-Sonden 64

5.1.2 Aggregationsassays mit Streptavidin-Sonden 67

5.2 Surface Plasmon Resonance Spektroskopy 71

5.2.1 Bindung der Antikörper- und Streptavidin-Eisenoxid-Sonden 71

5.3 Diskussion 73

5.4 Zusammenfassung 74

6 Festphasenassays 76

6.1 Bestimmung von humanem Immunglobulin G 79

6.2 Bestimmung von DSPA 84

6.3 Diskussion 87

6.4 Zusammenfassung 88

7 Flüssigphasenassays 91

7.1 Bestimmung von humanem IgG 92

7.2 Bestimmung von DSPA 93

7.3 Diskussion 94

7.4 Zusammenfassung 95

8 Magnetooptische Relaxationsmessungen 96

8.1 Methode 96

8.2 Nachweisgrenze 99

8.3 Aggregationsassay 99

8.4 Reaktion mit den biotinylierten Latexbeads 101

8.5 Bestimmung von verschiedenen Antigenen in flüssiger Phase 102

8.6 Diskussion 104

8.7 Zusammenfassung 106

9 Zellversuche 107

9.1 Charakterisierung der U 937-Zelllinie 108

9.2 Bindungsfähigkeit der hergestellten magnetischen Sonden 110

9.2.1 Isolierung von $CD4^+$-Lymphozyten aus Vollblut 111

9.2.2 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen 113

9.3 Magnetrelaxometrische Messungen 114

9.4 Diskussion 115

9.5 Zusammenfassung 117

10 Material und Methoden 118

10.1 Atom-Emissions-Spektroskopie zur Stoffmengenbestimmung 118

10.2 Photonenkorrelationsspektroskopie zur Partikelgrößenbestimmung 119

10.3 Gefriertrocknung 120

10.4 Iodierung von Proteinen 120

10.5 Größenausschlusschromatographie 122

10.6 Magnetrelaxometrische Messung magnetischer Nanopartikel 122

10.7 Magnetische Fraktionierung 122

10.8 Herstellung der Sonden 124

10.8.1 Herstellung der Stärke-Cobaltferrit-Sonden 124

10.8.2 Herstellung der Dextran-Eisenoxid-Sonden 126

10.9 Aggregationsassays 127

10.10 BIAcore Messungen 128

10.11 Festphasenassays 130

10.11.1 Bestimmung von humanem IgG 130

10.11.2 Bestimmung von DSPA 131

10.12 Flüssigphasenassays 132

10.13 Zellbiologische Methoden 132
10.13.1 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation 132
10.13.2 Magnetische Zellseparation 133
10.13.3 FACS-Messungen 135
10.14 Transmissionselektronenmikroskopie 138
10.14.1 Probenpräparation für elektronenmikroskopische Aufnahmen 138
10.15 Materiallisten 140

11 Zusammenfassung der Arbeit 148

12 Literaturverzeichnis 151

verwendete Abkürzungen

A	Ampère
AES	Atomemissionsspektroskopie
B	magnetische Flussdichte, magnetische Induktion
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BSA-Biotin	biotinyliertes Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
χ_m	magnetische Suszeptibilität
Ch.B.	Chargenbezeichnung
CD	Cluster of Differentiation = Oberflächenantigen
CF-Citrat	mit Citratpuffer inkubierte Cobaltferritpartikel
CF-Partikel	Cobaltferritpartikel
CF-Sonde	spezifisch bindende Cobaltferritpartikel
Ci	Curie
CT	Computed Tomography (Computertomographie)
Da	Dalton
d_{kern}	Kerndurchmesser der Nanopartikel
d_{hyd}	hydrodynamischer Durchmesser der Nanopartikel
DSPA	Desmodus Salivary Plasminogen Activating Factor
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid
ELISA	Enyzme-Linked Immunosorbent Assay (Enzym Immunoassay)
EO-Partikel	Eisenoxidpartikel
EO-Sonden	spezifisch bindende Eisenoxidpartikel
eV	Elektronenvolt
$F(ab)_2$-Fragment	Antikörperfragment: antigenbindender Bereich eines Antikörpers
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter (Durchflußzytometrie)
Fe	Eisen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
g	Gramm
H	magnetische Feldstärke
IgG	Immunglobulin G
h	Stunde
hIgG	humanes Immunglobulin G
hCD4	humanes CD4-Oberflächenantigen
I_{mag}	Stromstärke bei der Aufmagnetisierung

K	Anisotropiekonstante, Kelvin
kg	Kilogramm, 10^3 Gramm
Kontrolle	Isotypantikörper
kurze Sonde	Streptavidin-EO-Partikel
lange Sonde	Antikörper-EO-Partikel
Latex-Beads	Latexpartikel
L	Liter
m	Masse
m	magnetisches Moment
m	Meter
m	milli (10^{-3})
M	Magnetisierung
M	Molarität
M_r	relatives Molekulargewicht
M_s	Sättigungsmagnetisierung
µ	mikro (10^{-6})
μ_0	magnetische Feldkonstante des Vakuums
μ_r	relative Permeabilität
MACS	Magnetic Cell Separation System
MARIA	Magnetic Relaxation ImmunoAssay (Magnetischer Relaxations Immunoassay)
Miltenyi-Sonde	magnetische Nanopartikel der Firma Miltenyi
mIgG	maus Immunglobulin G
MION	Monocrystalline Iron Oxide Nanocompounds
MNP	magnetische Nanopartikel
MRT	Magnetresonanztomographie
MRX	Magnetrelaxometrie
MRX-Messsystem	Gerät zur Messung der Relaxation von magnetischen Nanopartikeln
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n	nano (10^{-9})
OD	Optische Dichte
OPD	O-Phenylendiamin

p	piko (10^{-12})
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, isotonisch)
PCS	Photon Correlation Spektroscopy (Photonenkorrelationsspektroskopie)
PE	Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
PET	Positron Emission Computed Tomography (Positronen Emissions Computertomographie)
pH	pH-Wert
POD	Meerrettich-Peroxidase
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro minute)
RU	Response Units, Einheit der Surface Plasmon Resonance Spektroskopy
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Sulfo-NHS	N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPIOs	Superparamagnetic Iron Oxides (superparamagnetische Eisenoxide)
SPR	Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (Oberflächen Plasmonen Resonanzspektroskopie)
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
T	Tesla
τ_B	Brown-Relaxationszeit
τ_{eff}	effektive Relaxationszeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
t_{mag}	Aufmagnetisierungsdauer
τ_N	Néel–Relaxationszeit
Tracer	radioaktiv markierte Substanz
USPIOs	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides
VS^+-, XS^+-Säule	mit Eisenkugeln gefüllte Säulen

1 Einleitung und Zielstellung

Die korrekte medizinische Diagnose ist eine unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Therapie von Erkrankungen. Entsprechend dem hohen Stellenwert der Diagnose, stehen dem Arzt in der modernen Medizin eine große Anzahl unterschiedlicher diagnostischer Verfahren zur Verfügung. Einen wichtigen Teilbereich der medizinischen Diagnostik stellt die bildgebende Diagnostik dar, bei der innere Strukturen des Körpers abgebildet werden. Die bildgebende Diagnostik kann in drei Bereiche unterteilt werden: Die Darstellung der Morphologie von Organen (morphologische Diagnostik), die Darstellung funktioneller Parameter von Körperorganen (Funktionsdiagnostik) sowie die Darstellung von Strukturen und Funktionen von Körpergeweben auf zellulärer Ebene (molekulare Diagnostik). Die bedeutendsten Techniken in der bildgebenden Diagnostik sind die Röntgenverfahren, die Ultraschallverfahren, die Magnetresonanztomographie sowie nukleardiagnostische Verfahren.

Die bildgebende medizinische Diagnostik fand ihren Anfang in der Entdeckung der Röntgenstrahlen durch W.C. Röntgen im Jahre 1895. Nach der Entwicklung der Röntgendiagnostik innerhalb der ersten 30 Jahre dieses Jahrhunderts werden seit ca. 1935 auch nuklearmedizinische Verfahren angewendet. Beide Verfahren beruhen auf der Verwendung energiereicher elektromagnetischer Wellen und werden in der klinischen Radiologie eingesetzt. Die verwendeten Röntgen- und Gammastrahlen haben diskrete Energien von etwa 50 keV bis ca. 1 MeV und besitzen eine hohe Durchdringungsfähigkeit [1].

Bei der Röntgendiagnostik wird der Patient ionisierender Strahlung ausgesetzt. Abhängig von der Beschaffenheit des bestrahlten Gewebes wird dabei ein Teil der Strahlung absorbiert, ein anderer gestreut und ein weiterer transmittiert. So kann ohne Einsatz von Kontrastmitteln das Skelett des Menschen, das im Vergleich zum übrigen Körpergewebe eine hohe Absorption für Röntgenstrahlung, eine sogenannte Röntgendichte, aufweist, sichtbar gemacht werden. Der absorbierte Teil entspricht in der Diagnostik der physikalischen Strahlenbelastung. Davon zu unterscheiden ist die biologische Strahlenbelastung, die durch die relative biologische Wirksamkeit (RBW) ausgedrückt werden kann. In der Strahlentherapie ist mit diesem Anteil der therapeutische Effekt verbunden [2]. Als Kontrastmittel für Röntgenstrahlung können chemische Elemente hoher Ordnungszahlen, wie Kalzium, Iod und Barium dienen. Heute finden vor allem

niederosmolare, nichtionische organische Iodverbindungen Anwendung. Als eine Erweiterung der kontrastreichen zweidimensionalen Darstellung von Strukturen wurde Anfang der 70er Jahre mit der Computertomographie (CT) eine dreidimensionale Rekonstruktion von Körpern möglich. Die CT ist ein hochsensitives Röntgen-Schnittbildverfahren, das sowohl für die morphologische als auch für die Funktionsdiagnostik eingesetzt wird [3].

Aus den Anfängen der Nuklearmedizin, deren Einsatz zunächst für die Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen durch J. Hamilton und M. Soley [4] entwickelt wurde, ist heute eine breite diagnostische Anwendung von Radionukliden entstanden. Dies betrifft die Funktions-, Stoffwechsel- und Lokalisationsdiagnostik am Patienten durch Messung inkorporierter Radionuklide mittels dreier bildgebender Verfahren: der planaren Szintigraphie, der SPECT (Single-Photon-Emission-Computed-Tomography) sowie der PET (Positron-Emission-Computed-Tomography). Als Markersubstanzen dienen bei der Szintigraphie und der SPECT Gammastrahlen-emittierende Isotope, die geeignete Halbwertszeiten und Strahlungsenergien aufweisen; z.B. ^{99m}Tc ($t_{1/2}$ = 6,2 h; 140 keV), ^{123}I ($t_{1/2}$ = 13 h; 159 keV) und ^{111}In ($t_{1/2}$ = 2,8 d; 245 keV). Bei der PET werden Positronen-emittierende Radionuklide wie ^{11}C ($t_{1/2}$ = 20,4 min), ^{15}O ($t_{1/2}$ = 2 min) und ^{18}F ($t_{1/2}$ = 110 min) verwendet. Detektiert werden hier nicht die emittierten Positronen (Antiteilchen der Elektronen), sondern die bei der Annihilation der Positronen mit Elektronen im Gewebe entstehende Vernichtungsstrahlung. Dabei werden aus Impulserhaltungsgründen jeweils zwei Photonen mit der Energie von 511 keV erzeugt und diametral gegeneinander abgestrahlt. Handelt es sich um eine Funktions- oder Lokalisationsdiagnostik, werden die Radionuklide als Markierung von körpereigenen Molekülen oder Zellen eingesetzt. Bei der Diagnose bestimmter Stoffwechselwege werden radioaktiv markierte Substanzen anstelle körpereigener Moleküle in bestimmte Stoffwechselwege eingeführt [5, 6].

Die Ultraschalldiagnostik wurde in den 50er Jahren entwickelt. Sie beruht auf der Reflexion von Schallwellen mit Frequenzen im Megahertz-Bereich an Phasengrenzen und kann gut zur morphologischen Untersuchung von verschiedenen Organen wie der Blase, der Gebärmutter, der Leber, der Niere und des Herzens verwendet werden. Für die Funktionsdiagnostik, z.B. der Perfusionsuntersuchung des Herzens, der Gefäße oder der harnableitenden Wege werden Kontrastmittel (Mikroblasen) eingesetzt oder auch das Dopplerphänomen an den sich bewegenden Erythrozyten oder den Mikroblasen ausgenutzt.

Anfang der 80er Jahre etablierte sich als weiteres hochauflösendes Schnittbildverfahren die Magnetresonanztomographie (MRT). Bei diesem Verfahren wird die sogenannte Kernspin-resonanz von Wasserstoffprotonen ausgenutzt. Das Proton eines Wasserstoffkerns kann als ein magnetischer (Kern-)Dipol betrachtet werden. Werden Protonen in ein homogenes äußeres Magnetfeld gebracht werden, kann sich ihr Kernspin im Feld ausrichten. Durch Erzeugen eines zusätzlichen Hochfrequenzfeldes (Radiofrequenzen), das senkrecht zu den ausgerichteten Momenten steht, bewegen sich die Kernspins der Protonen aus ihrer Ausgangslage, der ausgerichteten Achse, heraus. Nach Abschalten des Hochfrequenzfeldes fallen die magnetischen Momente in ihre weiterhin durch das äußere Magnetfeld gerichtete Ausgangspositionen zurück. Dieser Vorgang wird als Relaxation (die Relaxationsrate wird durch die relaxivity beschrieben) bezeichnet und ist messbar. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten der Relaxation: T_1-Relaxation (Spin-Gitter-), die die Energieabgabe an benachbarte Atome beschreibt und T_2-Relaxation (Spin-Spin-), die den Verlust des Phasenzusammenhangs (Kohärenz) der Protonen beschreibt. Mit der MRT können eine Vielzahl von Parametern bestimmt werden. Die Protonendichte wird zur Gewebedarstellung und die Relaxationszeit für die Gewebedifferenzierung genutzt. Bei der Bestimmung der Protonenrelaxation können zwei Arten von Kontrastmitteln eingesetzt werden: Die T_1-Relaxation beeinflussende paramagnetische Gadolinium-Verbindungen (Weißmacher) und die T_2-Relaxationszeit beeinflussende ferro- bzw. superpara-magnetische Eisen-(III)-oxid-haltigen Nanopartikel (Schwarzmacher) [6, 7, 8].

In Tabelle 1 werden die Unterschiede der Verfahren hinsichtlich ihres räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens und des Bereichs ihrer Empfindlichkeit in einer vereinfachten Form zusammengefasst und bewertet. Jedes Verfahren kann durch eine große Anzahl von Geräten, Geräteeinstellungen sowie Aufnahmemodi und eine zusätzliche Kontrastmittelgabe wiederum erhebliche Empfindlichkeitsunterschiede aufweisen. bzw. der Fragestellung angepasst werden.

Tab. 1: Vergleich der Empfindlichkeiten der bildgebenden Verfahren modifiziert nach Weitschies und Wolf [6, 9].

	Szintigraphie	CT	Ultraschall	MRT
Physikalische Grundlage	Strahlen-emission	Strahlen-absorption	Schallwellen Geschwindigkeit Reflexion	Kernspinrelaxation magnetisches Kernmoment
Räumliche Auflösung	~ cm	~ mm	~ mm	einige mm
Zeitliche Auflösung	niedrig	gut	gut	relativ gut
Sicherheitsaspekte	niedrige Strahlen-belastung	hohe Strahlen-belastung	keine bekannte Belastung	keine bekannte Belastung
Kontrastmitteldosis mg/kg Körpergewicht	10^{-5}-10^{-7}	10-10^{2}	1-10	10^{-1}-10^{-3}
mol/ml	10^{-15}	1-10^{-3}	10^{-15}	10^{-9}

Die CT und die MRT eignen sich beide für eine räumlich und zeitlich aufgelöste Bildgebung. Die Verbesserung des Kontrastes zwischen zwei verschiedenen Gewebebereichen (fett-, wasserhaltig, Luft, Knochen, verschiedene Organe und Tumore) ist sowohl auf der gerätetechnischen Seite als auch durch verbesserte Kontrastmittel zu erreichen. Die Nachweisempfindlichkeit der Kontrastmittel ist bei der Szintigraphie am höchsten. Neben dem Vorteil der hohen Empfindlichkeit sind allerdings auch die Nachteile der geringen räumlichen Auflösung und der radioaktiven Belastung des Patienten sowie, dass das geringe Signal/Rausch-Verhältnis zu langen Messzeiten führt, zu nennen.

Bei allem Fortschritt in der Diagnostik sind insbesondere der Tumordiagnostik weiterhin Grenzen gesetzt. Bei der Untersuchung von pathologischen Gewebsveränderungen *in vivo*, bei denen zwischen Benignität und Malignität unterschieden werden soll, müssen bisher meist unspezifische Veränderungen der Gewebe bewertet werden. Diagnostiziert werden beispielsweise Größenänderungen bei der Lymphknotendiagnostik mittels CT und Ultraschall. Des Weiteren werden Dichteänderungen bei Mammatumoren, die durch Kalkeinlagerungen im Tumor verursacht werden, mittels CT abgebildet sowie Inhomogenitäten im Gewebe die auf Zellgewebsveränderungen oder auf Entzündungen schließen lassen, mittels MRT dargestellt. Um die Art der Veränderung zu bestimmen, müssen im Allgemeinen Gewebeproben entnommen werden.

Diese genannten Veränderungen gehen immer auch mit einer Abweichung auf der molekularen Ebene, beispielsweise der Zelloberflächen, einher. Sogenannte Zelloberflächenantigene vermehren sich überproportional und können als sogenannte "Targets", also Zielstrukturen, für eine spezifische Detektion veränderter Zellen *ex vivo* in der Labor-Diagnostik, aber auch *in vivo* in der bildgebenden Diagnostik verwendet werden. Um neben der Größenveränderung auch die Veränderung auf molekularer Ebene diagnostizieren zu können, wird mit sogenannten target-spezifischen Kontrastmitteln versucht, den Tumor zu typisieren und die Größe sowie mögliche Metastasen des Tumors *in vivo* nicht invasiv zu detektieren.

Bisher wird diese Methode in der Klinik nur in der Immunszintigraphie, einem Teilgebiet der Nukleardiagnostik angewendet. Dabei wird die hohe Spezifität und Affinität von Antikörpern oder anderer Proteine bzw. Peptide für bestimmte Antigene mit der Empfindlichkeit der Nukleardiagnostik kombiniert. Dies wird auch als “targeted delivery of imaging agents” oder spezifische Bildgebung bezeichnet [10].

Mittlerweile können Tumore lokalisiert werden, die bisher mittels CT oder MRT nicht detektiert werden konnten. So wurde mit Hilfe von ^{99m}Tc markierten anti-CEA monoklonalen Antikörpern (CEA: carcinoembryonic antigen) eine vielversprechende Studie an Patienten mit medullärem Schilddrüsenkrebs durchgeführt. Gegenüber den üblichen Methoden wies die hier durchgeführte Immunszintigraphie eine höhere Sensitivität auf. Auch eine Prognose über die Art des Tumors (maligne oder benigne) schien möglich, da das Gewebe bei aggressivem Wachstum einen hohen CEA-Spiegel aufweisen soll [11]. Loutfi et al. [12] führten am Rattenmodel *In vivo*-Verteilungsstudien radioaktiv markierter Lymphozyten durch. Sie konnten zeigen, dass sowohl die direkte Markierung der Zellen mit ^{111}In, wie auch die *In vivo*-Markierung mit Hilfe eines ^{111}In-markierten Anti-T-Zellen Antikörpers zu einer Darstellung des lymphatischen Gewebes verwendet werden können.

Die Spezifität der Bildgebung ist bei der Immunszintigraphie hinsichtlich der ortsaufgelösten Detektion der radioaktiven Substanz jedoch nicht in bezug auf die Detektion der spezifischen Bindung des markierten Antikörpers gegeben. Detektiert wird die An- oder Abreicherung der radioaktiven Substanz im Körper, wobei hier auch die unspezifische Verteilung dieser im ganzen Körper als Hintergrundsignal mit gemessen

wird. Dadurch ergibt sich ein ungünstiges Verhältnis von Nutzsignal (spezifische Markierung) zu Hintergrundsignal.

Die spezifische Bildgebung in der MRT befindet sich noch in der vorklinischen Forschung. Dabei werden aufgrund der höheren Signalstärke superpara- bzw. ferromagnetische Nanopartikel (MNP) gekoppelt mit spezifisch bindenden Proteinen oder Peptiden anstelle der paramagnetischen Gadoliniumionen als Kontrastmittel eingesetzt. Eine Detektion der Partikel ist im Nano- bis Subnanomolaren-Bereich möglich [13].

In der Literatur werden die verwendeten Nanopartikel in SPIOs (Superparamagnetic Iron Oxides) mit einem Teilchendurchmesser > 50 nm und USPIOs (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides) mit einem Teilchendurchmesser von < 50 nm eingeteilt. Des Weiteren wird auch der Begriff MIONs (Monocrystalline Iron Oxide Nanocompounds) für superparamagnetische Nanopartikel verwendet [14, 15]. Die Eigenschaften superparamagnetischer Nanopartikel werden in Abschnitt 2.1 ausführlich dargestellt.

Verschiedene Arbeitsgruppen führten Untersuchungen mit SPIOs, USPIOs und MIONs durch, die mit unterschiedlichen Proteinen und Peptiden als immunspezifische Kontrastmittel gekoppelt wurden. Weissleder et al. [16] stellten beispielsweise 3 nm große, mit einem herzinfarkt-spezifischen Antikörper-Fragment gekoppelte magnetische Eisenoxidpartikel her und konnten damit an einem Rattenmodell zeigen, dass mit 100 µg Kontrastmittel/kg Körpergewicht eine Lokalisierung des vom Herzinfarkt betroffenen Gewebes möglich war. Josephson et al. [17] beschrieben die Kopplung einer Peptidsequenz an magnetische Nanopartikel. Die Peptidsequenz sollte eine Internalisierung der Partikel in die Zellen (Lymphozyten der Milz) bewirken, um eine intrazelluläre Markierung zu erreichen. Es konnte eine erhebliche Verbesserung der Aufnahme der modifizierten MIONs in die Zellen im Vergleich zu den nicht modifizierten Nanopartikeln festgestellt werden. Durch die hohe intrazelluläre Markierung von Zellen hofft man, diese später *in vivo* mit der MRT verfolgen zu können und entsprechend markierte Zellen aus Organen gewinnen zu können. Es konnten des Weiteren verschiedene rezeptorspezifische Kontrastmittel hergestellt werden: Ein hepatozyten-spezifisches Kontrastmittel, welches mit Arabinogalactan als Hüllpolymer mit hoher Affinität mit den Asialoglycoprotein-Rezeptoren auf normalen Hepatozyten reagiert [18] und Immunglobulin-MIONs zur Detektion von Entzündungsherden in Ratten [19].

Bei der Bildgebung mit der MRT werden die Veränderungen jedoch aufgrund von Anreicherungen der MNP im Körper und nicht die Bindung der MNP an ihr Target bestimmt. Unspezifische Bindungen oder Anreicherungen der Partikel im Körper können von tatsächlich spezifisch gebundenen Partikeln nicht unterschieden werden. Durch die im Körper verteilten Kontrastmittelmoleküle sinkt das Signal/Rausch Verhältnis. Damit ist die Detektion der gesuchten Targets wie bei der Immunszintigraphie mit der Unsicherheit behaftet, dass die Moleküle sich an verschiedenen Orten unspezifisch anreichern und dort ein starkes Signal hervorrufen.

Durch eine wiederholte Aufnahme eines Körpers zu verschiedenen Zeitpunkten wird zur Zeit versucht, das Hintergrundsignal bei beiden Verfahren zu reduzieren und gleichzeitig die Spezifität zu erhöhen. Man nutzt in diesem Fall einerseits das pharmakokinetische Verhalten der zirkulierenden Signalgeber (radioaktive Isotope bzw. MNP) aus: Die Moleküle werden mit der Zeit ausgeschieden, wodurch das Hintergrundsignal sinkt. Andererseits nimmt man an, dass unspezifisch gebundene Moleküle mit der Zeit vom Ort der Bindung dissoziieren, spezifisch gebundene Moleküle dagegen aufgrund der hohen Affinität zu ihrem Target am Ort der Bindung verweilen. So sollen die spezifischen szintigraphischen oder magnetresonanztomographischen Bilder über längere Zeiträume (z.B. nach 24 h) immer deutlicher und spezifischer werden.

Ein optimales Verfahren für die molekulare Diagnostik sollte es ermöglichen, die Wechselwirkung zwischen natürlichen oder synthetischen Liganden und Rezeptoren mit möglichst hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung im Organismus zu bestimmen. Dazu sollte von dem Verfahren möglichst keine Belastung des Organismus ausgehen. Von diesem Ziel sind alle bekannten Verfahren noch weit entfernt. Alle *in vivo* anwendbaren bildgebenden Verfahren erfordern eine Markierung der Liganden mit Molekülen, die ein physikalisch nachweisbares Signal emittieren (Signalgeneratoren). Durch diese Markierung mit Signalgeneratoren werden die Wechselwirkungseigenschaften der Liganden mit den Rezeptoren in der Regel beeinträchtigt. Die pharmakokinetischen Eigenschaften der markierten Liganden (Sonden) werden häufig ebenfalls durch die Markierung beeinflusst. Bei relativ großen Signalgeneratoren, wie beispielsweise den magnetischen Nanopartikeln, werden die pharmakokinetischen Eigenschaften der Sonden sogar häufig durch die Markierung dominiert. Des Weiteren ist man bei den bestehenden Verfahren nicht in der Lage, zwischen gebundenen und ungebundenen Sonden zu differenzieren.

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte neuartige Verfahren für den Nachweis magnetischer Nanopartikel kann zwischen gebundenen und ungebundenen Sonden differenzieren. Dadurch besteht hier, im Gegensatz zur Immunszintigraphie und der MRT, die einmalige Chance Hintergrundprobleme durch zirkulierende Sonden zu vermeiden.
Vor dem Beginn dieser Arbeit konnte in ersten orientierenden Untersuchungen gezeigt werden, dass gebundene magnetische Nanopartikel prinzipiell mittels des als Magnetrelaxometrie (MRX) bezeichneten neuen Nachweisverfahrens sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* empfindlich detektiert werden können [20, 21].

Zielstellung

Mit den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen sollten einige der erforderlichen Voraussetzungen für eine spätere *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie geschaffen und eine Einschätzung der erreichbaren Nachweisempfindlichkeit für magnetische Sonden anhand von *In vitro*-Untersuchungen ermittelt werden.

Zunächst sollten unterschiedliche magnetische Nanopartikel in Hinsicht auf ihre prinzipielle Anwendbarkeit als Signalgeneratoren in der Magnetrelaxometrie untersucht werden. Wesentliche Kriterien waren dabei ihre Signalstärke und Stabilität in verschiedenen Medien, da dies eine Voraussetzung für die chemische Modifizierung der Partikeloberfläche mit spezifisch bindenden Molekülen darstellt.

Im nächsten Schritt sollten Methoden zur Herstellung verschiedener spezifisch bindender Sonden auf der Basis von Antikörpern entwickelt werden. Die Stabilität der Sonden sollte in für *In vivo*- bzw. *In vitro*-Untersuchungen relevanten Medien, wie Phosphatpuffer und Blut untersucht werden.

Die Bindungsfähigkeit und Anwendbarkeit der Sonden sollte magnetrelaxometrisch und sofern möglich mittels weiterer unabhängiger Methoden bestimmt werden. Die *In vitro*-Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit der neuen Nachweismethode sollte durch einen Vergleich der Empfindlichkeiten mit der von Enzym Immunoassays (ELISAs) dargestellt werden.
Als ein weiterer Schritt zur Überprüfung der *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie sollten anschließend Bindungsstudien in Vollblut und anhand von Zellversuche durchgeführt werden.

2 Physikalische Grundlagen und Magnetrelaxometrie

Da die Magnetrelaxometrie auf den speziellen magnetischen Eigenschaften magnetischer Nanopartikel beruht, werden zunächst einige wichtige Grundlagen kurz erläutert und dann das Messverfahren und die Messgeräte vorgestellt.

2.1 Grundlagen des Magnetismus

Alle Materialien können abhängig von ihrem Verhalten im magnetischen Feld in dia-, para- und ferromagnetische Materialien unterteilt werden. Ein Magnetfeld wird an jedem Punkt im Raum durch seine magnetische Feldstärke (H) und seine magnetische Induktion (B) charakterisiert. Im Vakuum wird der Zusammenhang zwischen den magnetischen Feldgrößen durch die magnetische Feldkonstante (μ_0) gegeben. Die magnetische Feldkonstante ist das Verhältnis zwischen der magnetischen Induktion und der magnetischen Feldstärke im Vakuum

$$\mu_0 = \frac{B}{H} \quad [\mathrm{H/m}] \qquad \text{Gl. (1).}$$

Zur Beschreibung von Magnetfeldern in der Materie führt man die relative Permeabilität des Mediums (μ_r) ein. Die magnetische Induktion kann aus der magnetischen Feldstärke wie folgt berechnet werden:

$$B = \mu_0 * \mu_r * H \quad [\mathrm{T}] \qquad \text{Gl. (2) [22].}$$

In der Materie wird das Verhältnis von B/H als Permeabilität (μ) und das Verhältnis μ/μ_0 als relative Permeabilität (μ_r) bezeichnet. Die Größe der relativen Permeabilität hängt also von der Substanz ab, auf die eine magnetische Feldstärke einwirkt.

Diamagnetismus

Als Diamagnetismus wird die Eigenschaft aller Stoffe bezeichnet, ein von außen angelegtes Magnetfeld in ihrem Inneren abzuschwächen. Atome, Ionen oder Moleküle, die voll besetzte Elektronenschalen besitzen, verhalten sich diamagnetisch. Bei ihnen heben sich die Momente der Elektronenspins gegenseitig auf. Diese Eigenschaft wird aber bei vielen Stoffen vom Para- und Ferromagnetismus überdeckt [23].

Paramagnetismus

Paramagnetische Stoffe verstärken ein von außen angelegtes magnetisches Feld. Dazu gehören Ionen der Übergangselemente und alle Moleküle, die ein ungepaartes oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen. Die ungerade Elektronenzahl führt zu einem resultierenden Elektronenspin, so dass ein permanentes magnetisches Gesamtmoment entsteht. In Tabelle 2 ist die Verteilung der Elektronenspindrehmomente auf den relevanten Elektronenschalen am Beispiel einiger Elemente schematisch dargestellt.

Tab. 2: Anzahl der ungepaarten 3d und 4f-Elektronen einiger Übergangsmetalle und seltener Erden [24].

Ionen	**Elektronen**						**ungepaart**
			3d			**4f**	
Fe^{3+}	↑	↑	↑	↑	↑		5
Fe^{2+}	↑↓	↑	↑	↑	↑		4
Co^{2+}	↑↓	↑↓	↑	↑	↑		3
Gd^{3+}	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	7

Das gesamtmagnetische Moment (M) einer Substanz hängt wie folgt von der Suszeptibilität und dem äußeren Magnetfeld ab:

$$M = \chi_m H \quad [A/m] \qquad \text{Gl. (3) [25].}$$

Sie steht für die Ausrichtung der in diesem Material vorhandenen magnetischen Momente durch ein von außen angelegtes Magnetfeld. Die magnetische Suszeptibilität χ_m kann auf die Masse oder das Volumen bezogen werden. Sie ist dimensionslos und es gilt:

$$\chi_m = \frac{M}{H} = (\mu_r - 1) \qquad \text{Gl. (4) [26].}$$

Bei paramagnetischen Substanzen gilt $\chi_m > 0$ und $\mu_r > 1$, bei diamagnetischen Stoffen gilt $\chi_m < 0$ und $\mu_r < 1$. Daraus ergibt sich, dass die Magnetisierung von paramagnetischen Substanzen bei angelegtem Magnetfeld positiv und bei diamagnetischen negativ ist [26]. Die Suszeptibilität paramagnetischer Substanzen ist umgekehrt proportional zur Temperatur, bei diamagnetischen Stoffen ist die Suszeptibilität dagegen von der Temperatur unabhängig [27].

Ferro-, Ferri- und Antiferromagnetismus

Zu den ferromagnetischen Materialien gehören paramagnetische Stoffe, wie Metalle der Nebengruppe VIIIB des Periodensystems (Eisen, Cobalt, Nickel) und viele seltene Erden sowie deren Legierungen. Der Ferromagnetismus wird durch den Spin der Elektronen innerhalb einer Elementarzelle innerhalb eines Kristallgitters verursacht, der in den sogenannten Weißschen Bezirken gleichgerichtet ist. Diese Weißschen Bezirke (Domänen) unterliegen einer spontanen Magnetisierung und lassen sich durch das Anlegen eines äußeren Feldes einheitlich ausrichten (s. Abb. 1) [28].

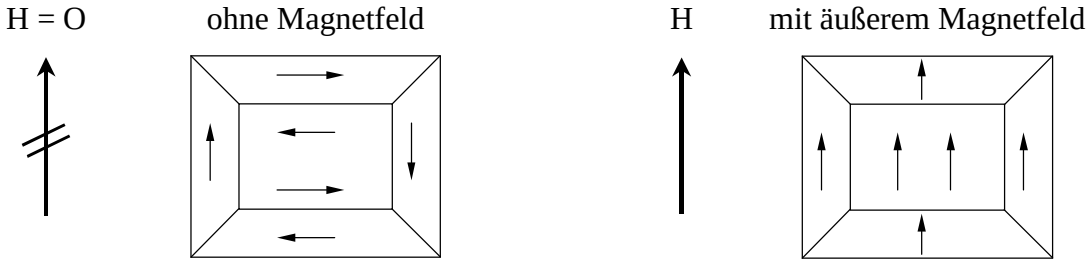
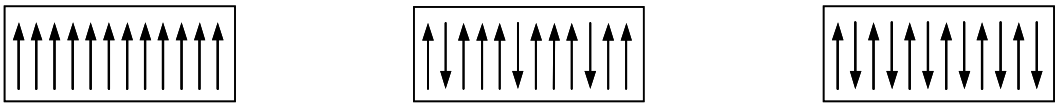


Abb. 1: Ausrichtung der magnetischen Momente in den Weißschen Bezirken eines Mehrdomänenteilchens [28].

Bei einer antiparallelen Ausrichtung der magnetischen Momente in den Weißschen Bezirken, also der vollständigen Aufhebung der spontanen Magnetisierung, spricht man von Antiferromagnetismus, bei einer teilweisen Aufhebung von Ferrimagnetismus (s. Abb. 2) [28].



a) ferromagnetische b) ferrimagnetische c) antiferromagnetische

Abb. 2: Ausrichtung der gekoppelten Momente innerhalb einer Domäne [28].

Bei ferromagnetischen Stoffen nimmt die magnetische Induktion mit steigender Feldstärke zu, jedoch behalten sie nach Abschalten des äußeren Feldes ihre Magnetisierung bei. Dies wird als Remanenz bezeichnet. Erst durch Überschreiten des sogenannten Koerzitivfeldes verlieren sie ihre Magnetisierung. Entsprechend haben ihre Magnetisierungskurven (die graphische Darstellung der Abhängigkeit der magnetischen Induktion B von der magnetischen Feldstärke H) eine Hystereseschleife. Die Magnetisierung erreicht bei ausreichend hohen Feldstärken eine Sättigung. Abbildung 3 zeigt eine Magnetisierungskurve ferromagnetischer Materialien [28].

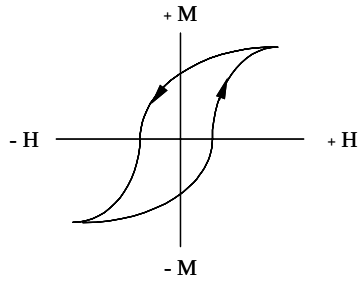


Abb. 3: Magnetisierungskurve ferromagnetischer Materialien mit der charakteristischen Hystereseschleife [28].

Der Ferromagnetismus nimmt bei höheren Temperaturen ab. Oberhalb der für jedes Material charakteristischen Curie-Temperatur verhält es sich paramagnetisch, da die ferromagnetische Kopplung durch die thermische Energie aufgebrochen wird. [29]. Die charakteristische Curie-Temperatur der in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Magnetit, Maghemit und Cobaltferrit, liegt bei 400-900 K [21, 30, 31].

2.2 Magnetische Nanopartikel und Superparamagnetismus

Da superparamagnetische Nanopartikel in der Magnetrelaxometrie die Signalgeber (Sonden) darstellen, werden ihre Eigenschaften genauer beschrieben. Je nach Größe der magnetischen Partikel handelt es sich um Ein- oder Mehrdomänenteilchen. Der kritische Durchmesser unterhalb dessen die einheitliche Ausrichtung aller Elektronenspins (eine Domäne) energetisch günstiger ist als die Bildung Weißscher Bezirke (mehrere Domänen) liegt bei Eisen zwischen 10-100 nm. Suspensionen kleiner ferro- (Cobaltferrit) bzw. ferrimagnetischer (Eisenoxid) Eindomänenteilchen werden Ferrofluide genannt. Die Eindomänenteilchen bestehen aus einem Kern und einer stabilisierenden Hülle, die aus verschiedenen Materialien bestehen kann (s.u.). In Abbildung 4 sind schematisch in a) magnetische Eindomänenteilchen in einer Trägerflüssigkeit, in b) das magnetische Moment sowie der Kern und die Hülle der Partikel dargestellt und in c) die Kern- und hydrodynamische Größe der MNP definiert.

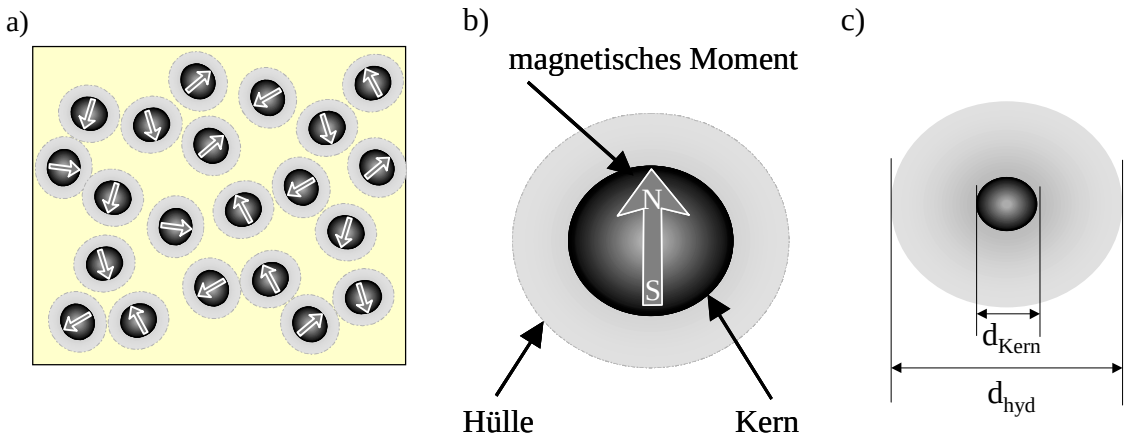


Abb. 4: a) Darstellung magnetischer Eindomänenteilchen in einer Trägerflüsigkeit, b) Definition des hydrodynamischen Durchmessers (d_{hyd}) und des Kerndurchmessers (d_{Kern}), c) Schematische Darstellung des Kerns, der Hülle und des magnetischen Moments eines Eindomänenteilchens.

Jedes Eindomänenteilchen hat ein permanentes magnetisches Moment m, das sich im Magnetfeld ausrichten kann. Die Magnetisierung der Nanopartikel ist für ein Eindomänenteilchen mit dem Volumen V gegeben durch:

$$m = ms * V \qquad \text{Gl. (5) [32].}$$

M_s bezeichnet die Sättigungsmagnetisierung. Wenn keine Wechselwirkung zwischen den Partikeln vorliegt, sie sich also wie ein ideales Gas verhalten, beschreibt die klassische Langevin-Funktion [33] den Zusammenhang zwischen (makroskopischer) Magnetisierung des Ensembles der Nanopartikel und dem externen Feld. Ohne äußeres Magnetfeld erscheint die Suspension solcher Teilchen nicht magnetisch, da die magnetischen Momente der Eindomänenteilchen statistisch verteilt vorliegen. Suspensionen ferromagnetischer Nanopartikel zeigen wie normale Paramagnetika nur in Anwesenheit eines magnetisierenden Feldes durch die bevorzugte Ausrichtung ihrer magnetischen Momente in Richtung des Feldes eine Nettomagnetisierung (s. Abb. 5).

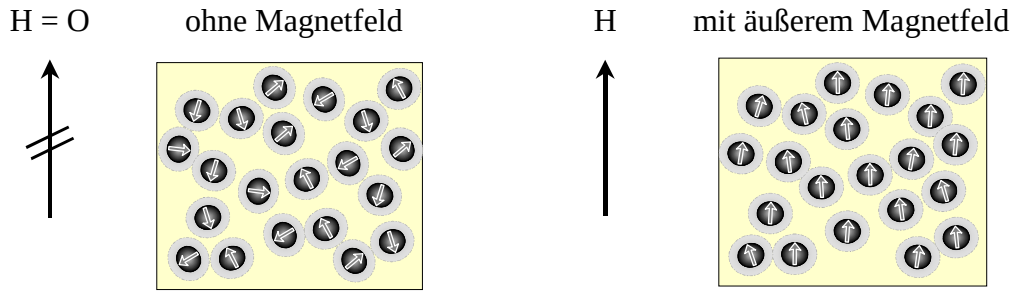


Abb. 5: Ausrichtung der magnetischen Momente magnetischer Nanopartikel eines Ferrofluids ohne äußeres und unter dem Einfluss eines äußeren Magnetfeldes.

Ferrofluide zeigen jedoch nach Abschalten des äußeren Feldes keine Remanenz und damit auch keine Hysterese (s. Abb. 6). Die Nettomagnetisierung des Ferrofluids zerfällt durch das Nachlassen der erzwungenen Ausrichtung der Magnetnanopartikel. Dieser Vorgang wird auch als Relaxation der Magnetisierung bezeichnet und durch die Brownsche Molekularbewegung der Trägerflüssigkeit bewirkt. Der wesentliche Unterschied magnetischer Nanopartikel zu paramagnetischen Materialien liegt in der Größenordnung des permanenten magnetischen Moments. Die Magnetisierung der einzelnen Nanopartikel entspricht selbst in Abwesenheit eines äußeren Feldes der Sättigungsmagnetisierung ms des ferro-/bzw. ferrimagnetischen Kernmaterials. Das magnetische Verhalten von Ferrofluiden wird daher auch als superparamagnetisch [32, 34, 35] bezeichnet.

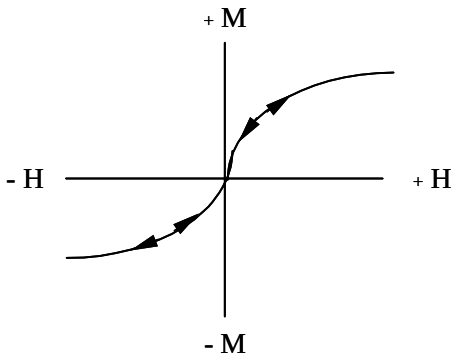


Abb. 6: Magnetisierungskurve superparamagnetischer Nanopartikel [28].

Vorkommen und Anwendung

Zuerst wurden Ferrofluide vor allem für die industrielle Anwendung z.B. zur Kühlung von Hochleistungslautsprechern und als reibungsarme Dichtungen von rotierenden Achsen (in Festplattenlaufwerken in der Computertechnik) eingesetzt. Diese Fluide werden auf der Basis von hochsiedenden organischen Lösungsmitteln, z.B. Paraffin, hergestellt [36]. In der medizinischen Diagnostik und Therapie werden wässrige, kolloiddisperse Systeme (kolloidale Lösungen) superparamagnetischer Eisenoxidkristalle, Magnetit und Maghemit eingesetzt. Tabelle 3 zeigt die allgemeinen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Ferrofluide.

Tab. 3: Eigenschaften von magnetischen Nanopartikeln [37, 21].

	Maghemit	Magnetit	Cobaltferrit
Material	Eisenoxid	Eisenoxid	Eisen-Cobaltoxid
Farbe	braun	Schwarz	schwarz
Modifikation	γ-Fe_2O_3	FeO x Fe_3O_4 oder Fe_3O_4	$Co_xFe_{3-1}O_4$
Dichte	4,9 g/cm^3	5,2 g/cm^3	5,2 g/cm^3
magnetische Eigenschaften	ferromagnetisch	ferromagnetisch	ferromagnetisch
Kristallstruktur	kubisch	inverser spinell	inverser spinell
Sättigungsmagnetisierung	484 kA/m [38]	446 kA/m [38]	422 kA/m [39]

Neben dem geologischen Vorkommen als Magneteisenstein wird Magnetit auch bei niederen Tieren als Magnetosome in magnetotaktischen Bakterien [40], im Gehirn von Tauben [41], bei Delphinen [42] und im menschlichen Gehirn [43] gefunden. Maghemit entsteht in der Natur aus Magnetit und kann durch weitere Oxidation zu α-Fe_2O_3 umgewandelt werden [37].

Herstellung und Stabilität magnetischer Nanopartikel

Superparamagnetische Eisenoxide können prinzipiell durch zwei Verfahren hergestellt werden: Durch mechanisches Zerkleinern von größeren Partikeln, z.B. aus natürlichem Vorkommen in Kugelmühlen oder durch Fällungsreaktionen einer nass-chemischen Synthese. Für die pharmazeutische Anwendung werden, wegen der erforderlichen geringen Partikelgrößen, die Partikel nass-chemisch hergestellt. Zur Stabilisierung der Partikel werden wahlweise Tenside, Silane, Polymere und Proteine als Hüllmaterialien verwendet. Am weitesten verbreitet sind Dextrane, d.h. Polymere auf Kohlenhydratbasis. Die Herstellung erfolgt entweder im Ein- oder Zweitopfverfahren. Beim Eintopfverfahren werden Eisen-II und Eisen-III-Salze im stark alkalischen Milieu als Eisen-(III)-hydroxid in Anwesenheit des Hüllmaterials ausgefällt und durch Erhitzen zu γ-Fe_2O_3 bzw. Fe_3O_4 oxidiert. Beim Zweitopfverfahren wird dagegen zuerst der Eisenoxidkern synthetisiert und anschließend das Hüllmaterial zugesetzt. Die Synthesebedingungen (Eisensalze, Temperatur, Hüllmaterial, Titrationsgeschwindigkeit, Alkaliwahl und anschließende Reinigung) sind entscheidend für die physikalischen Eigenschaften, wie die Teilchengröße, die Stabilität und die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel. Beispiele zur Synthese von MNP aus Magnetit, Maghemit und Cobaltferrit befinden sich in [30, 44-49].

Die Stabilität der magnetischen Nanopartikel ist eine wichtige Voraussetzung zur Anwendung von Ferrofluiden in der Pharmazie. Eine Dispersion gilt dann als stabil, wenn es während der Lagerung zu keiner Änderung der Teilchengrößenverteilung kommt, d.h. keine Flockung mit nachfolgender Agglomeration bzw. Aggregation eintritt. Die Stabilität von Ferrofluiden ist abhängig von dem Verhältnis der thermischen Energie (kT, mit k = Boltzmannkonstante $1{,}38*10^{-23}$ NmK^{-1}, T = absolute Temperatur 298 K (25°C)) zu der magnetischen- und der Gravitationsenergie. Solange die thermische Energie überwiegt, ist eine Partikelsuspension auch unter dem Einfluss eines äußeren Magnetfeldes stabil. Das Verhältnis der thermischen zur magnetischen Energie muss größer als 1 sein. Als Grenzwert für MNP ohne stabilisierende Hülle ergibt sich unter der Annahme von T = 298 K, M = $4{,}4 \times 10^5$ A/m und H = 8×10^2 A/m eine Partikelgröße von kleiner als 26 nm. Da jedes Teilchen ein permanentes magnetisches Moment besitzt, kommt es zusätzlich zu einer magnetischen Anziehung der Partikel untereinander. Entsprechend müssen bei der Beurteilung der Stabilität eines Ferrofluids die zwischen zwei Teilchen immer vorhandenen anziehenden magnetischen und van der Waals Wechselwirkungen sowie die sterische und elektrostatische Abstoßung durch die Hülle der Teilchen betrachtet werden. Nach der DLVO-Theorie [50] resultieren die Wechselwirkungskräfte zwischen kolloidalen Teilchen in einer Dispersion aus der Summe der ("positiven") elektrostatischen Abstoßungskräfte und der ("negativen") Van der Waalschen Massenanziehung. Bei einem bestimmten Gleichgewichtsabstand halten sich die abstoßenden und anziehenden Kräfte die Waage. In dieser Position ist die potentielle Energie der beiden Moleküle am geringsten, womit das System seinen stabilen Zustand erreicht hat. Es existieren im Allgemeinen zwei Energietäler bezüglich der Anziehung sowie eine dazwischen liegende Potentialbarriere. Diese Potentialbarriere muss wesentlich größer sein als die thermische Bewegungsenergie, sonst kommt es zu einer Ausfällungen, bzw. Sedimentation der Partikel. Die in dieser Arbeit verwendeten MNP waren in einem Fall mit einem negativgeladenen Detergenz elektrostatisch und in zwei weiteren Fällen mit Polymeren auf Kohlenhydratbasis vorwiegend sterisch stabilisiert [50].

Verträglichkeit magnetischer Nanopartikel

Für den Einsatz magnetischer Nanopartikel in der Diagnostik sind neben der Stabilität, einer starken Kontrastwirkung bzw. Signalintensität besonders auch die pharmako-kinetischen Eigenschaften ausschlaggebend. Sie werden weitgehend durch die Partikelgröße und die Oberflächeneigenschaften bestimmt. Es konnte festgestellt werden,

dass die Organverteilung intravenös applizierter Ferrofluide stark von den genannten Parametern abhängig ist [18, 51].

Weissleder et al. [52] haben toxikologische, wie auch pharmakokinetische Daten an Ratten und Hunden (Beagle) mit den Eisenoxidpartikeln, AMI-25 (d_{hyd} = 80 nm) erhoben. Die pharmakokinetischen Untersuchungen an der Ratte zeigten eine starke Anreicherung des Eisens vor allem in der Leber und in der Milz jedoch nur eine geringe Anreicherung in der Niere, der Lunge und dem Gehirn. 1 h nach Injektion von 1 mg Eisen/kg Körpergewicht konnten 83 % der applizierten Dosis in der Leber, und 6 % der applizierten Dosis in der Milz wiedergefunden werden.

Toxikologische Untersuchungen an der Ratte und am Hund, bei denen die Tiere eine einmalige Gabe von bis zu 3000 µmol Fe/kg (168 mg Fe/kg) Körpergewicht erhielten, zeigten über einen Zeitraum von 14 Tagen keine akute Toxizität [52]. Die subakute Toxizität wurde über 3 Wochen untersucht. Die Tiere erhielten 9 Injektionen von je 50 µmol oder 250 µmol Fe/kg Körpergewicht. Es wurden zahlreiche Parameter untersucht, wobei insgesamt keine erhöhte Mortalität oder Zelltoxizität festgestellt werden konnte. Die bei der Magnetresonanztomographie als Kontrastmittel verwendete Konzentration magnetischer Nanopartikel liegt im Bereich von wenigen Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht. Die Verwendung von MNP als Kontrastmittel ist daher für den Menschen toxikologisch unbedenklich.

Es befinden sich bereits verschiedene Eisenoxidpartikel als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie zur Darstellung von Leber- und Lymphknotenmetastasen oder des Gastrointestinal-Traktes sowie als "Blood Pool Agent" für Perfusions-untersuchungen des Myokards und der Niere auf dem Markt oder im Zulassungsverfahren. In Tabelle 4 sind verschiedene Kontrastmittel für die MRT sowie deren Anwendungs-gebiete aufgeführt.

Tab. 4: Liste der magnetischen Nanopartikel, die als MRT-Kontrastmittel bereits zugelassen sind oder sich in Zulassungsverfahren befinden nach [21].

Handelsnamen	**Hauptanwendung**	**Beschreibung der wässrigen Partikelsuspension**
Endorem® [53] (100-300 nm)	Intravenöse Anwendung zur Detektion von Lebertumoren	Dextran-stabilisierte, ferro-magnetische Nanopartikel
Sinerem® [54] (30 nm)	Nierenperfusionsdarstellung Lymphknotendarstellung	Dextran-stabilisierte, ferro-magnetische Nanopartikel
Resovist® [53] (60 nm)	Lebertumoren	Carboxydextran-stabilisierte ferromagnetische Nanopartikel
Lumirem® [53] (300 nm)	Orale und rektale Anwendung zur Untersuchung des Gastrointestinal-Traktes	Silikon-stabilisierte ferromagnetische Nanopartikel
Abdoscan® [21]	Orale Anwendung zur Untersuchung von abdominellen Erkrankungen	Granulat enthält an Polymerpartikel gebundene ferromagnetische Nanopartikel

Das magnetische Nanopartikel bereits vielfach pharmako- und toxikologisch untersucht und einige Präparate z.T. als Diagnostika zugelassen wurden, ist für die *In vivo*-Anwendung der Magnetrelaxometrie eine gute Voraussetzung.

2.3 Magnetrelaxometrie

Bei der Magnetrelaxometrie wird prinzipiell die Relaxation der Magnetisierung von magnetischen Nanopartikeln nach Abschalten eines äußeren Magnetfeldes bestimmt.

Magnetisierung

Wie in Abschnitt 2.1 bereits beschrieben, richten sich die magnetischen Momente der Nanopartikel eines Ferrofluids durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes in Richtung des Feldes aus. Die Ausrichtung der magnetischen Momente kann durch ein von außen angelegtes Magnetfeld über zwei Mechanismen erfolgen: Entweder durch die interne Rotation des Magnetisierungsvektors im Kern der Teilchen oder durch die Rotation des ganzen Teilchens in der Trägerflüssigkeit.

2.3.1 Relaxationsverhalten von Ferrofluiden

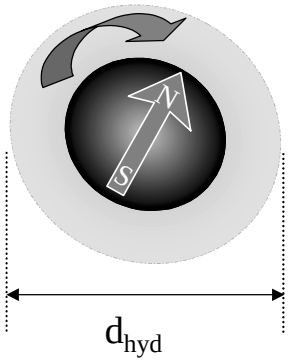
Entsprechend kann die Abnahme der Magnetisierung nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes grundsätzlich ebenso durch diese zwei Mechanismen beschrieben werden. Bei der Rotation des gesamten Teilchens um seine eigene Achse, handelt es sich um eine Relaxation verursacht durch die Brownsche Bewegung der Trägerflüssigkeit. Sie wird im Folgenden als *Brown-Relaxation* bezeichnet. Die Rotation des Magnetisierungsvektors

gegen die leichte Achse der Magnetisierung innerhalb des Teilchenkerns wird als *Néel-Relaxation* bezeichnet.

Von Chantrell et al. [55] wurde eine Beschreibung des Zeitsignals der magnetischen Relaxation nach dem Néelschen Prozess angegeben. Dabei wurde mit plausiblen physikalischen Annahmen berücksichtigt, dass ein Ensemble von MNP im Allgemeinen eine breite Verteilung der Relaxationszeiten aufweist. Der Gültigkeitsbereich dieser Theorie wurde durch experimentelle Untersuchungen von Kötitz [32] verifiziert. Diese Arbeiten bilden die Voraussetzung für die hier vorgestellten Messungen der magnetischen Relaxation magnetischer Nanopartikel zur Bestimmung von spezifischen Bindungsreaktionen.

Brown-Relaxation

Die Brown-Relaxation beschreibt den Verlust der Magnetisierung eines Ferrofluids nach Abschalten eines äußeren Magnetfeldes durch rotatorische Diffusion, d.h. die Nanopartikel verlieren durch die Brownsche Molekularbewegung des Trägermediums ihre Ausrichtung. Dies wird auch als extrinsischer Superparamagnetismus bezeichnet und ist schematisch in Abbildung 7 wiedergegeben. Die Geschwindigkeit dieser Brown-Relaxation (τ) hängt nach Gl. (6) von dem hydrodynamischen Volumen der Partikel und der Viskosität des Mediums ab.



$$\tau_B \approx \frac{3 \cdot \eta \cdot V_{hyd}}{kT} \qquad \text{Gl. (6)}$$

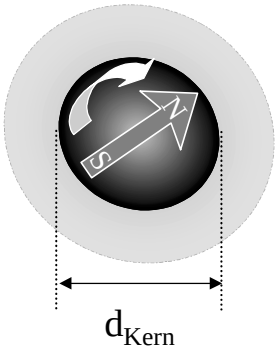
τ_B: Brown-Relaxationszeit
η: Viskosität der umgebenden Flüssigkeit Pa*s
V: hydrodynamisches Teilchen Volumen
k: Boltzmannkonstante $1{,}38 \cdot 10^{-23}$ J/K,
T: Temperatur in Kelvin

Abb. 7: Darstellung des Brown-Relaxationsmechanismus.

Néel-Relaxation

Die Néel-Relaxation wird durch die Drehung des internen Magnetisierungsvektors des Kerns bewirkt. In Abwesenheit eines Magnetfeldes sind die magnetischen Momente parallel oder antiparallele zu einer sogenannten leichten Achse ausgerichtet, die die Anisotropie des Teilchens beschreibt. Die Anisotropie magnetischer Nanopartikel ist durch ihre Kristallstruktur und bei Abweichungen von der Kugelform durch die Form der Partikel bedingt. Beide Anteile werden zusammengefasst mit der Anisotropiekonstanten K

beschrieben, die bei Magnetiten mit einem Wert von 20 kJm^{-3} [21] angegeben wird. Um von einer Orientierung zur anderen zu wechseln, muss eine Energiebarriere KV_{Kern} überwunden werden. Gilt KV << kT ist die thermische Energie ausreichend hoch, um eine Magnetisierungsfluktuation im Teilchen auszulösen. Dies wird auch als intrinsischer Superparamagnetismus bezeichnet und ist in Abbildung 8 dargestellt.



$$\tau_N \approx \tau_0 e^{\frac{KV_{Kern}}{kT}} \qquad \text{Gl. (7)}$$

τ_N: Néel-Relaxationszeit
τ_0: 10^{-9} s (Vorfaktor)
V_{Kern}: Kernvolumen
k: Boltzmannkonstante 1,38 * 10^{-23} J/K
T: Temperatur in Kelvin
K: Anisotropiekonstante (Fe_3O_4): 20 kJm^{-3} [21],
(γ-Fe_2O_3): 4,7 kJm^{-3} [56],
($CoFe_2O_3$): 200 kJm^{-3} [49]

Abb. 8: Darstellung des Néel-Relaxationsmechanismus.

Nach Gl. (7) ist die Néel-Relaxationszeit τ_N exponentiell abhängig von der Energiebarriere KV/kT. Abbildung 9 zeigt die nach der obigen Formel berechnete Abhängigkeit der Brown- und Néel-Relaxationszeit vom Teilchendurchmesser.

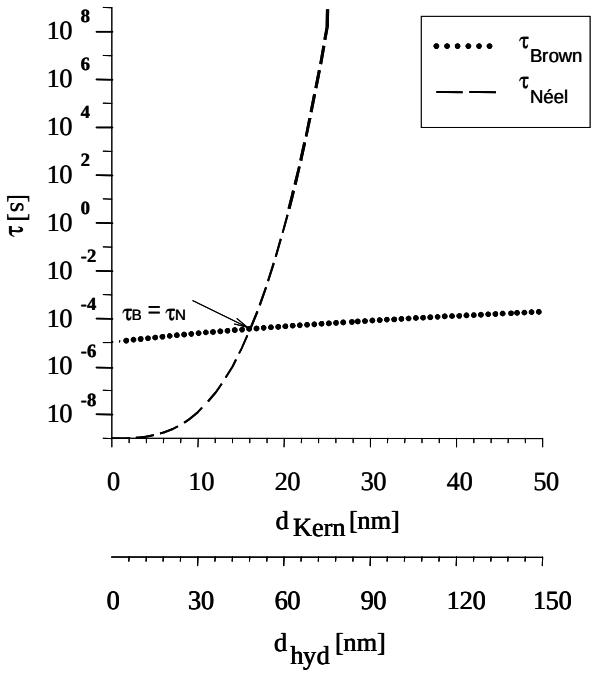


Abb. 9: Abhängigkeit der Néel (τ_N)- und Brown (τ_B)-Relaxationzeiten von dem Kern- sowie dem hydrodynamischen Partikeldurchmesser (Annahmen: T = 298 K, K = 20 kJ/m^3, $\eta_0 = 10^{-3}$ Pa s, $\tau_0 = 10^{-9}$).

Deutlich ist in Abbildung 9 die exponentielle Abhängigkeit der Néel-Relaxation von der Partikelkerngröße zu erkennen. Im Vergleich dazu ist die Abhängigkeit der Brown-Relaxation von der hydrodynamischen Partikelgröße deutlich weniger ausgeprägt.

Effektive Relaxation von Ferrofluiden

In flüssiger Phase sind beide Relaxationsmechanismen in Konkurrenz zueinander möglich, der schnellere Mechanismus tritt jedoch bevorzugt auf: Für $\tau_N << \tau_B$ dominiert der Néel-Mechanismus, für $\tau_N >> \tau_B$ ist der Brown-Mechanismus bestimmend. Durch die breite Teilchengrößenverteilung der Ferrofluide kommt es zu einer Überlappung von Relaxationsprozessen verschiedener Geschwindigkeiten und beider Mechanismen. So ergibt sich eine effektive Zeitkonstante, die sich aus der Relaxation nach beiden Mechanismen wie folgt zusammensetzt (Gl. 8).

$$\tau_{eff} = \tau_B \tau_N / (\tau_B + \tau_N) \qquad \text{Gl. (8)}$$

2.3.2 Experimenteller Aufbau

Die magnetrelaxometrischen Signale werden als Änderungen (Abnahmen) des Magnetfelds in der Nähe der Proben gemessen, die unmittelbar nach einer Aufmagnetisierung aufgezeichnet werden. Zur Magnetfeldmessung werden empfindliche SQUID-Magnetometer eingesetzt. Zusammen mit der Aufmagnetisierungseinheit, die aus einer Spule besteht, bilden sie die grundlegenden Komponenten des Messsystems.

Das Messsystem für die magnetrelaxometrischen Messungen wird innerhalb einer begehbaren, magnetisch abgeschirmten Kammer (Berlin Magnetically Shielded Room, BMSR) [57] in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Berlin betrieben, die einen Abschirmfaktor für magnetische Störfelder von 10^4 gewährleistet [21]. Die Abbildung 10 gibt eine Übersicht der magnetischen Induktion biomagnetischer Felder und des Magnetfeldes der Umgebung sowie die Auflösung verwendeter Magnetometer [58].

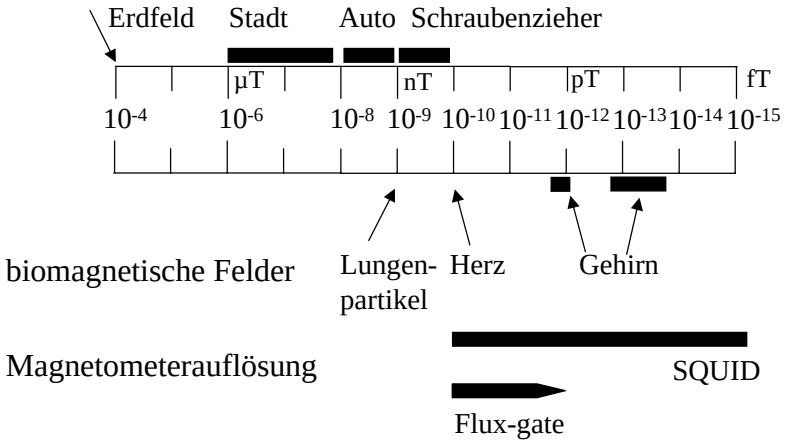


Abb. 10: Übersicht der biomagnetischen Felder und des Magnetfeldes der Umgebung sowie die Auflösung verwendeter Magnetometer [58].

Mit SQUID-Magnetometern sind derzeit die empfindlichsten Magnetfeldmessungen möglich. Der Aufbau des in dieser Arbeit vorwiegend verwendeten Gerätes (MRX-Messsystem) ist in Abbildung 11 dargestellt. Er setzt sich aus dem Kryostaten mit den Magnetometern und zwei Spulen zusammen. Ein Gestell fixiert den Kryostaten. Unterhalb des "Kryostatenfingers", dem unteren Teil des Kryostaten, befindet sich die Zwillings-spule, die für die Aufmagnetisierung und für die reproduzierbare Positionierung von Proben erforderlich sind. In dem Kryostaten befinden sich auf Flüssig-Helium-Temperatur (T= 4,2 K) zwei SQUID-Magnetometer, die zur weiteren Unterdrückung von Störsignalen zu einem elektronischen Gradiometer verschaltet sind. Die zu untersuchenden Proben werden in möglichst geringem Abstand zu dem unteren SQUID-Magnetometer, d.h. direkt unter dem Kryostatengefäß in der Spule platziert.

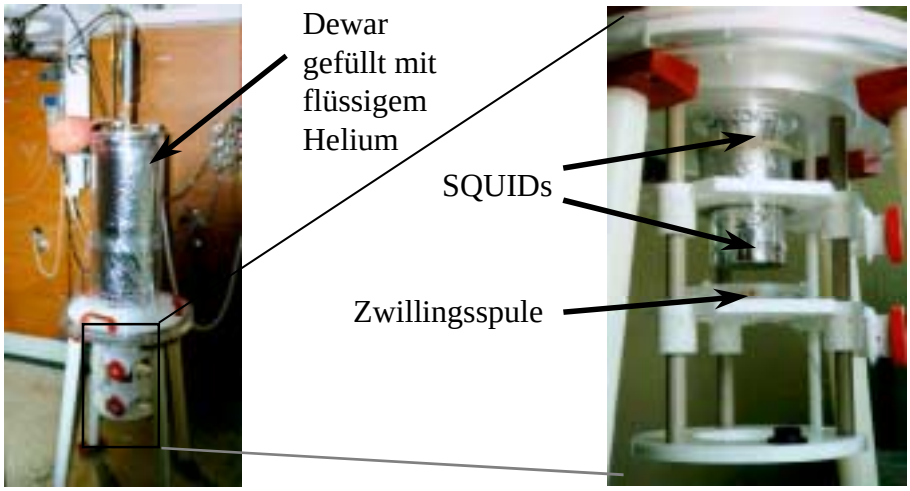


Abb. 11: Links: Foto des MRX-Messgerätes in einer magnetisch geschirmten Kammer; Rechts: Vergrößerung des linken Fotos. Am Ort der Zwillingsspule werden die Probengefäße platziert.

Die Unsicherheit der Magnetisierungsfeldstärke, der Probenpositionierung, des Leersignals und die Schwankung der Systemempfindlichkeit werden wie folgt angegeben [59].

Tab. 5: Nachweisempfindlichkeit und Unsicherheiten des Messgeräts [59].

geschätzte relative Unsicherheit der Magnetisierungsfeldstärke	< 5 %
minimale nachgewiesene Änderung des magnetischen Moments	1,8 10^{-11} Am^2
geschätzte relative Unsicherheit der Relaxationsamplitude aufgrund unsicherer Höhenpositionierung	6 %
Drift der Relaxationsamplitude, Leersignal (bei maximaler Magnetisierungsfeldstärke)	< 1 pT/h
relative Schwankung der Systemempfindlichkeit über Monate, untersucht mit Hilfe von Verdünnungsreihen von Ferrofluiden	< ± 10 %

Mit diesem Messgerät konnten Relaxationsprozesse in einem Zeitfenster von 250 µs bis mehrere Sekunden (typischerweise 1 s) nach Abschalten des magnetischen Feldes beobachtet werden. In Abbildung 12 sind die mit dem beschriebenen Messgerät erfassbaren Brown- und Néel-Relaxationszeiten von magnetischen Nanopartikeln erneut in Abhängigkeit von der Teilchengröße dargestellt.

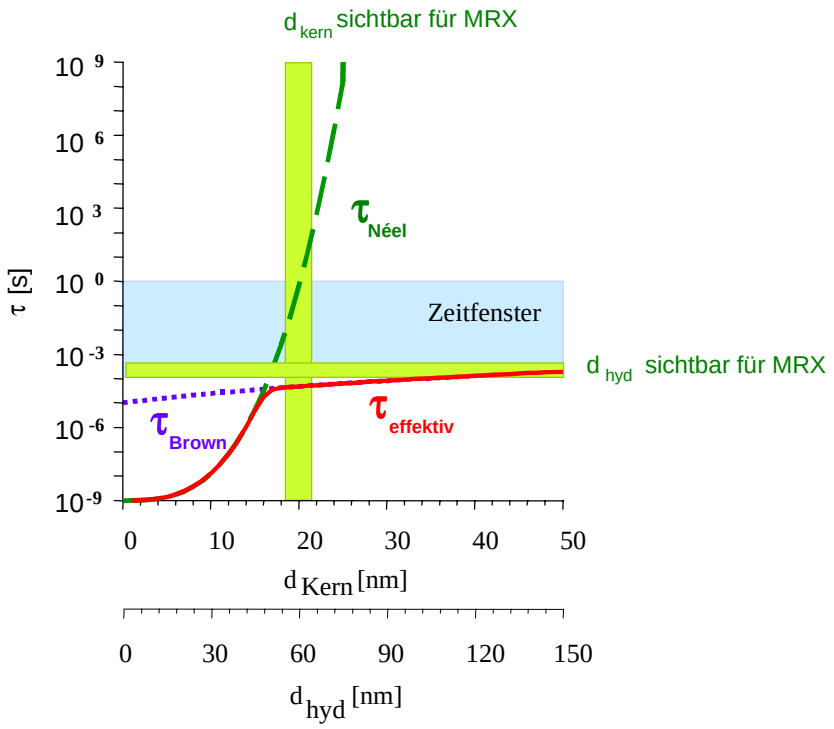


Abb. 12: Néel-, Brown- und effektive Relaxationszeiten in Abhängigkeit von dem Kern- sowie hydrodynamischen Partikeldurchmesser (T = 298 K, K = 20 kJ/m^3, η_0 = 10^{-3} Pa*s, τ_0 = 10^{-9}).

Aufgrund der exponentiellen Abhängigkeit der Néel-Relaxationszeit von dem Produkt aus der Partikelkerngröße und der Anisotropie trägt nur eine sehr schmale Fraktion von Teilchen zum gemessenen Relaxationssignal bei. Der erfassbare Kerngrößenbereich liegt

bei den angegebenen Annahmen um 20 ± 2 nm. Die Brown-Relaxation kann mit diesem Messsystem ab einer hydrodynamischen Größe von ca. 100 nm erfasst werden. Da die verwendeten Partikel eine Verteilung bezüglich der hydrodynamischen Durchmesser als auch der Energiebarrieren aufweisen, ergibt sich wie bereits diskutiert als resultierendes Relaxationssignal eine Überlagerung von Signalen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob mit diesem neuartigen Verfahren bindungspezifische Messungen durchgeführt werden können, da dies die Voraussetzung für eine spätere *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie darstellt. Um zu ermitteln, ob mit der MRX zwischen gebundenen und ungebundenen magnetischen Nanopartikeln differenziert werden kann, wurden zunächst flüssige Proben, bei denen die Brown-Relaxation der MNP gemessen und ausgewertet wurde und gefriergetrocknete, feste Proben untersucht. Das Gefriertrocknen der Proben diente der Bestimmung des Anteils nach Néel relaxierender Partikel in der Probe. Dieser Anteil ist ausschlaggebend für die mögliche Nachweisempfindlichkeit bei der Durchführung von *In vitro*-Festphasenassays (s. Abschn. 6).

2.3.3 Messung und Auswertung der Relaxation von Ferrofluiden

Die Ferrofluidproben wurden in einzelnen Plastikvials (5,6 mm Innendurchmesser x 8 mm Höhe) von „Break-apart“ Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur vermessen. Die Vials wurden mit Kunstoffdeckeln verschlossen und zur Messung mit dem Gefäßboden nach oben über einen Stempel von Hand unterhalb des Kryostaten in die Aufmagnetisierungs-spulen des Messgeräts eingesetzt. Es ergibt sich so ein minimal effektiver Abstand des Gefäßbodens zum unteren SQUID-Sensor von ca. 11 mm. Die Proben wurden mit Feldstärken von bis zu 1,3 kA/m (Stromstärke 350 mA) für ca. 1 s aufmagnetisiert. Nach Abschalten des Magnetisierungsfeldes wurde die zerfallende Magnetisierung der Probe nach einer technisch bedingten Totzeit des Messsystems von mindestens 250 µs aufgezeichnet und die Relaxationssignale mittels eines PCs weiterverarbeitet. Die Messdauer lag üblicherweise bei 500 ms bis 1 s. In der Abbildung 13 ist eine schematische Zeichnung der Messung der Relaxation von Ferrofluiden, wobei t_{mag}, die Magnetisierungszeit, t_{delay} die technisch bedingte Totzeit des Messsystems und $t_{Messung}$ die Messdauer darstellen. H_{mag} steht für die Feldstärke des angelegten Magnetfeldes und B ist die gemessene magnetische Induktion.

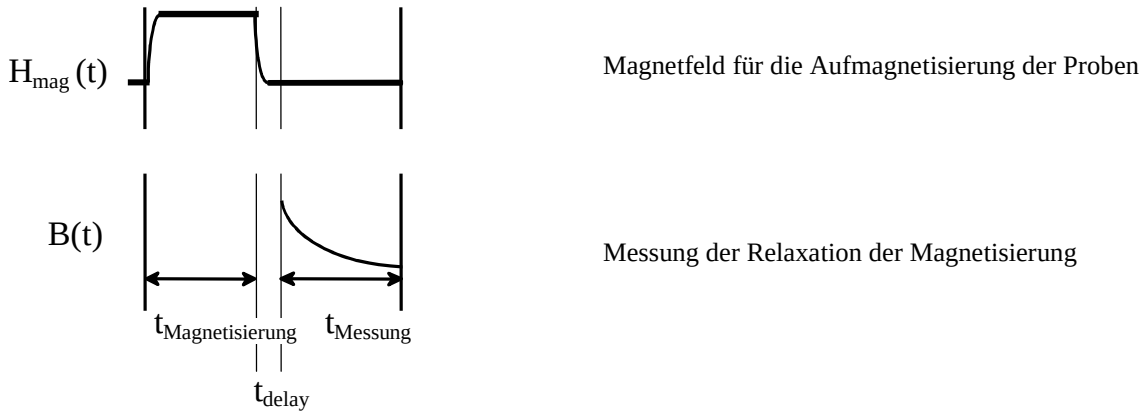


Abb. 13: Messung der Relaxation der Magnetisierung von magnetischen Nanopartikeln nach Abschalten eines externen Magnetfeldes.

Die Auswertung der Relaxationssignale erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher Kurvenanpassungen, die in Abhängigkeit von den vorliegenden Relaxationsprozessen verwendet wurden.

Brown-Relaxation

Der Zeitverlauf des Brown-Relaxationsprozesses, kann im einfachsten Fall, d.h. insbesondere für gleichartige Teilchen (bzgl. KV_{Kern}), durch einen einfach exponentiellen Zerfall beschrieben werden.

$$B(t) = B_0 e^{-(t/\tau)} \qquad \text{Gl. (9).}$$

Abbildung 14 zeigt das Signal der Brown-Relaxation einer flüssigen Probe, an dem eine Kurvenanpassung mit dem Modell des einfach exponentiellen Zerfalls (Gl. (9)) entsprechend dargestellt wird.

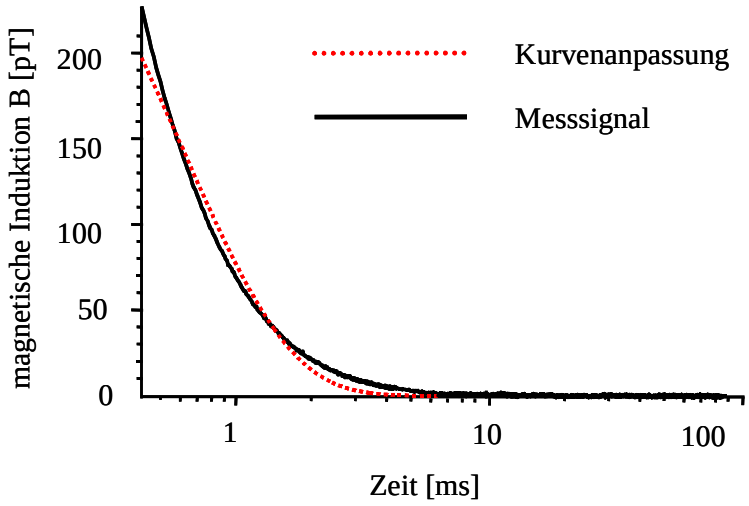


Abb. 14: Relaxationssignal einer flüssigen Probe und Kurvenanpassung an einen einfach exponentiellen Zerfall.

Zur Charakterisierung des Relaxationssignals wurden die Amplituden und die Relaxationszeitkonstanten herangezogen. Aus der ermittelten Relaxationszeit kann der mittlere hydrodynamische Teilchendurchmesser über Gl. (6) berechnet werden. Die Amplitude ist ein Maß für die Anzahl der jeweils erfassten Partikel. Als Messgröße dient die Flussdichtedifferenz ΔB zwischen zwei festgelegten Zeitpunkten, die bei den jeweiligen Ergebnissen angegeben werden.

Aus der Abbildung 14 wird deutlich, dass die Brown-Relaxation durch das Modell des einfach exponentiellen Zerfalls beschrieben werden kann, die angepasste Kurve jedoch teilweise erheblich von der gemessenen Relaxationskurve abweicht. Bei Zeiten unmittelbar nach Beginn der Messung verläuft die gemessene Relaxation schneller, zu späteren Zeiten langsamer als die angepasste Kurve. Das gemessene Relaxationssignal wird entsprechend durch eine einzelne Zeitkonstante nicht exakt beschrieben, da die Probe sowohl Teilchen mit schnelleren als auch langsameren Relaxationszeiten im Vergleich zur mittleren Relaxationszeit enthält. Deshalb wurden auch Kurvenanpassungen mit einer Überlagerung von zwei exponentiellen Relaxationsprozessen durchgeführt:

$$B(t) = B_{0,1} e^{-(t/\tau_1)} + B_{0,2} e^{-(t/\tau_2)} \qquad \text{Gl. (10)}$$

Diese sogenannte doppelt exponentielle Kurvenanpassung an das Relaxationssignal der gleichen flüssigen Probe ist in Abbildung 15 dargestellt und zeigt, dass das gemessene Relaxationssignal der Probe mit diesem Modell gut angepasst werden kann.

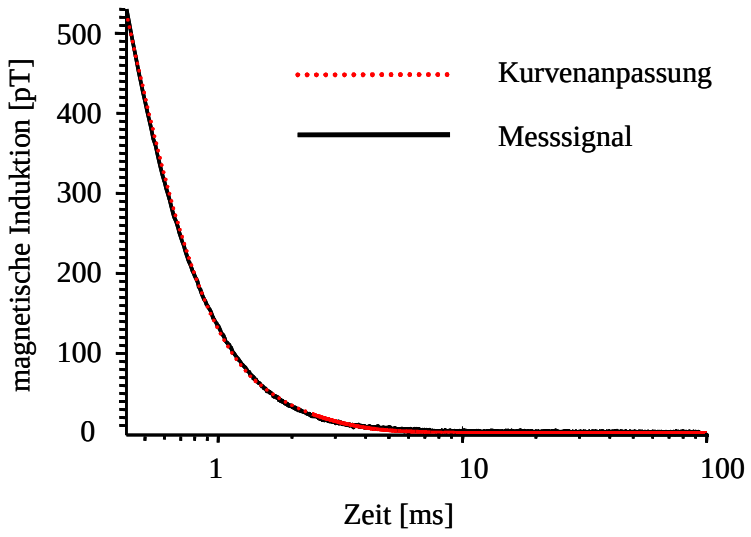


Abb. 15: Relaxationssignal einer flüssigen Probe und Kurvenanpassung mit einem doppelt exponentiellen Zerfall.

Mit Hilfe dieser Kurvenanpassung können entsprechend eine minimale Relaxationszeit und eine maximale Relaxationszeit bestimmt werden, die ein Maß für die Breite der Verteilung der Relaxationszeiten liefern.

Néel-Relaxation

Zur Beschreibung der Néel-Relaxation wurde eine Modellfunktion der modifizierten logarithmischen Zeitabhängigkeit eingesetzt, bei der nur Teilchen berücksichtigt werden, die im Messzeitfenster relaxieren, also kleiner als ein kritisches Kernvolumen sind, und nur einem schwachen Magnetisierungsfeld H_{mag} ausgesetzt sind [60]. Die folgende Gleichung wurde zur Kurvenanpassung verwendet, wobei t_{mag} die Magnetisierungszeit darstellt.

$$B(t) = B_0 \cdot \ln(1 + {t_{mag}}/{t}) \qquad \text{Gl. (11)}$$

Als Beispiel ist in Abbildung 16 die Kurvenanpassung entsprechend der obigen Gleichung dargestellt.

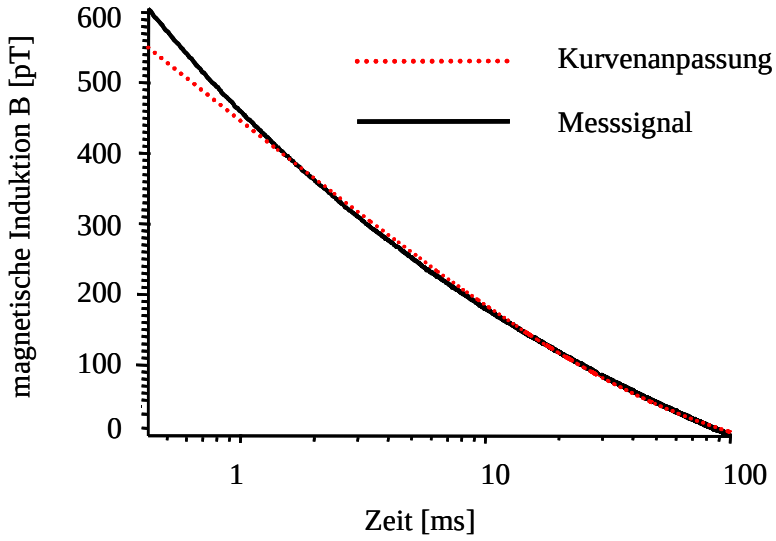


Abb. 16: Relaxationssignal einer festen Probe und Kurvenanpassung mit einer modifizierten logarithmischen Zeitabhängigkeit.

Für Zeiten > 10 ms wird das Néel-Relaxationssignal der festen Probe durch den Fit gut beschrieben. Die Abweichungen zwischen Messung und Fit insbesondere im Zeitbereich < 1 ms ist durch die Breite der Teilchengrößenverteilung der Proben zu erklären. Die Proben enthalten auch kleine Teilchen mit einer kurzen Relaxationszeit, für die die Bedingungen unter denen Gl. (11) gilt, nicht erfüllt sind. Die in den Abschnitten 2.3.1 und 2.3.2 diskutierte exponentielle Abhängigkeit der Relaxationszeit von der Energiebarriere KV bedingt, dass selbst eine geringe Verteilungsbreite von K bzw. V_{Kern} zu einer sehr

breiten Verteilung von Relaxationszeiten führt. Werden diese Teilchen durch einen in Abschnitt 3.3 beschriebenen Separationsprozess entfernt, lässt sich das Relaxationssignal durch Gl. (11) deutlich besser beschreiben.

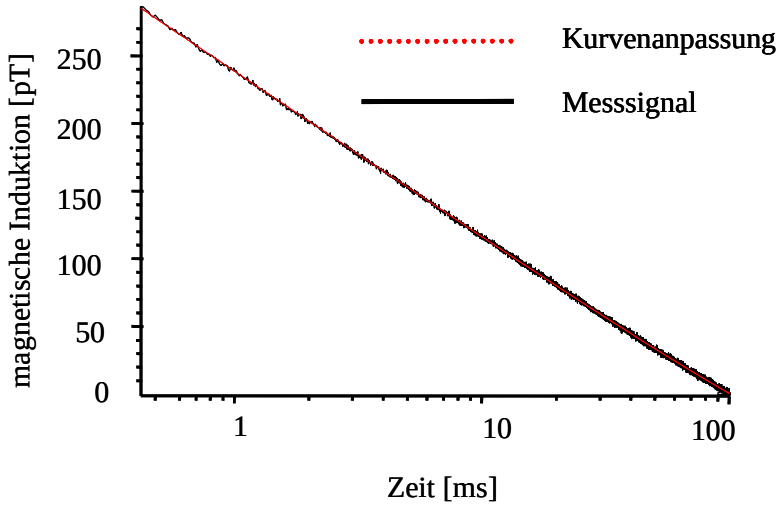


Abb. 17: Relaxationssignal einer festen magnetisch separierten Probe und Kurvenanpassung mit einer modifizierten logarithmischen Zeitabhängigkeit.

Die Abhängigkeit der Relaxationszeiten von der Größe der magnetischen Nanopartikel bzw. von deren Bindungszustand werden in Abbildung 18 noch mal schematisch verdeutlicht.

Die Detektion von Bindungsreaktionen in flüssiger Phase beruht auf der Beobachtung von Größenveränderungen der magnetischen Nanopartikel, die durch die Bindung der Partikel an einen Reaktionsspartner (s. Abschnitt 5 und 7) verursacht werden. Anhand von magnetischen Festphasenassays, sogenannten Magnetischen Relaxationsimmunoassays (MARIAs, s. Abschnitt 6), sollte des Weiteren die *In vitro*-Anwendbarkeit und Sensitivität der Magnetrelaxometrie im Vergleich zu etablierten Assayverfahren, wie z.B. ELISAs, untersucht werden.

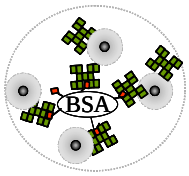
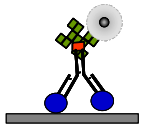
	Relaxations - mechanismus	Relaxations – zeit (τ)	Symbol
magnetische Nanopartikel (MNP) s. Abschnitt 3	Brown	< 1 ms	
<u>geringe Volumenzunahme</u>: Kopplung von Proteinen an die Oberfläche der MNP s. Abschnitt 4	Brown	1-2 ms	
<u>starke Volumenzunahme</u>: Agglomeration der MNP s. Abschnitt 5	Brown + Néel	2-10 ms	
<u>Immobilisation</u> an eine feste Phase s. Abschnitt 6	Néel	>10 ms	

Abb. 18: Abhängigkeit der Relaxationsmechanismen und der dazugehörigen Relaxationszeiten von der Größe der magnetischen Nanopartikel bzw. von deren Bindungszustand.

Um die *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie zu beweisen, sollte die Bindungsspezifität der Methode gezeigt werden. Diese ergibt sich theoretisch aus den unterschiedlichen Relaxationszeitkonstanten gebundener und ungebundener magnetischer Nanopartikel. Die Brown-Relaxationszeit ungebundener Nanopartikel liegt unterhalb von 5 ms und die Néel-Relaxationszeit gebundener Nanopartikel oberhalb 10 ms. Dass die spezifische Detektion gebundener magnetischer Nanopartikel in Anwesenheit ungebundener MNP möglich ist, sollte anhand der Festphasenassays gezeigt werden indem das Bindungsausmaß der magnetischen Nanopartikel (Sonde) an eine feste Phase in Anwesenheit der ungebundenen (überschüssigen) Sonde bestimmt werden sollte.

3 Magnetische Nanopartikel

Der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln als Sonden für die Magnetrelaxometrie setzt die in Abschnitt 2 diskutierten physikalischen Eigenschaften und bestimmte physikochemische Eigenschaften des Hüllmaterials voraus. Neben dem stabilisierenden Effekt des Hüllmaterials soll das Material geeignet sein, die MNP zu funktionalisieren, d.h. spezifisch bindende Substanzen zu koppeln. Im Laufe der Arbeit wurden zwei verschiedene Eisenoxid- und Cobaltferritpartikel untersucht. Zur Stabilisierung waren die Kerne mit Polysacchariden und in einem Fall mit einem Tensid umhüllt.

Zur Charakterisierung der magnetischen Nanopartikel wurden der Metallgehalt (Eisen, Cobalt) und der mittlere hydrodynamische Partikeldurchmesser bestimmt sowie Magnetisierungskurven aufgenommen. Wenn möglich, wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel angefertigt, um auch die Kerngröße zu bestimmen. Des Weiteren wurden magnetrelaxometrische Messungen mit festen und flüssigen Proben des Materials vorgenommen. Die Stabilität der Partikel wurde im pH-Bereich von 4-12 und in verschiedenen physiologischen Medien untersucht, wobei als Maß die Teilchengröße mit der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS, s. Anhang) und die Relaxationszeit der Brown-Relaxation bestimmt wurde. In den folgenden Abschnitten sind die Charakteristika der verwendeten MNP zusammengefasst.

Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel

Die Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel wurden von der Firma Mediport Kardiotechnik zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Charakterisierung der magnetischen Nanopartikel sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Eigenschaften der Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel.

Bezeichnung	**Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel**
Magnetisches Material	Eisenoxid, Magnetit: Fe_3O_4
Konzentration [mmol Metall/L]	1484
Magnetisierung [Am^2/mol Metall]	6,4
d_{hyd} [nm]	90
pH-Wert	9

Das Hüllmaterial Oleoylsarcosin ($C_{21}H_{36}NO_3$) ist ein anionisches Tensid und besteht aus Ölsäure und N-Methylglycin (Sarcosin). Oleoylsarcosin wird in der Industrie als

Korrosionsschutzmittel und –inhibitor für Metalle gegen den Angriff von wässrigen Lösungen verwendet [61].

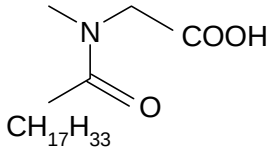


Abb. 19: Strukturformel des Oleoylsarcosins.

Bei der Verwendung des Oleoylsarcosins als Hüllmaterial für magnetische Nanopartikel geht man von der Vorstellung aus, dass der Ölsäurerest an die Oberfläche der Partikel adsorbiert ist, während die Carboxylgruppe hier eine ionische Stabilisierung der Teilchen nach außen bewirkt.

Stärke-Cobaltferritpartikel

Die Stärke-Cobaltferritpartikel (CF-Partikel) wurden von der Firma Chemicell bezogen. Viele verschiedene Cobaltferritsuspensionen, die unterschiedliche Partikelgrößen und Hüllmaterialien aufwiesen, wurden untersucht. In der Tabelle 7 sind die Eigenschaften der Partikel dargestellt, die aufgrund der Signalstärke prinzipiell für die Magnetrelaxometrie geeignet waren.

Tab. 7: Eigenschaften der Cobaltferritpartikel.

Bezeichnung	**CF-I**	**CF-II**	**CF-III**	**CF-IV**	**CF-V**
Magnetisches Material	Cobaltferrit, $CoFe_2O_4$				
Konzentration [mmol Metall /L]	132	111	128	100	87
Spezifisches magnetisches Moment [Am^2/mol Metall]	4,4	5,0	5,5	5,4	5,9
d_{hyd} [nm]	65	94	92	133	86
pH	7,7	6,2	6,8	7,5	6,3

Als Hüllmaterial wurde hier Stärke bzw. Stärkesulfonate verwendet. Stärke besteht hauptsächlich aus zwei Polysacchariden, der Amylose als linearem und dem Amylopektin als verzweigtem Polymer in einem Verhältnis von 11-35 % : 75-89 %, wobei die Glucoseeinheiten vorwiegend alpha-(1,4) o-glykosidisch verknüpft sind [62].

Dextran-Eisenoxidpartikel

Die Dextran-Eisenoxidpartikel (EO-Partikel) wurden von Meito Sangyo aus Japan bezogen. Dieses Ferrofluid wird regelmäßig in größerem Maßstab hergestellt und wurde

bereits umfangreich in anderem Zusammenhang charakterisiert. Die Stabilität der Partikel ist bei 4°C über mehrere Jahre gegeben [7].

Tab. 8: Eigenschaften der Dextran-Eisenoxidpartikel.

Bezeichnung	**DDM 128N/ Charge → EO**
magnetisches Material	$Fe_3O_4/\gamma\text{-}Fe_2O_3$-Eisenoxidgemisch
Konzentration [mmol Metall/L]	ca. 1000
Spezifisches magnetisches Moment [Am^2/mol Metall]	5,4
d_{hyd} [nm]	65
d_{Kern} [nm]	4-6
pH	5,5

Es wurden verschiedene Chargen der DDM 128N Partikel verwendet (Ch.B.: 1020, 1008, 1031). Aufgrund von früheren Analysen werden ca. 2000 Atome pro Kern (5 nm) angenommen [63]. Die Partikel liegen in Wasser suspendiert vor und werden sowohl durch die Carboxydextranhülle sowie durch freies Carboxydextran stabilisiert. Die Konzentration an Carboxydextran beträgt 56 mg/ml, wobei 50 % an die Eisenoxidpartikel gebunden vorliegen. Hochmolekulare Dextrane (M_r: 10^7 bis 10^8 g/mol) werden von Mikroorganismen, vorwiegend der Leuconostoc-Gruppe, in saccharosehaltiger Nährlösung synthetisiert. Es handelt sich um ein verzweigtes Polysaccharid, das vorwiegend aus α-1,6-verknüpften α-D-Glucopyranoseeinheiten besteht. Als Hüllpolymere werden Dextrane mit kleinerem Molekulargewicht (< 5 000 g/mol) eingesetzt. Durch alkalischen Abbau erhält man niedermolekulares Dextran mit durchschnittlich einer Carboxygruppe pro Dextrankette. Das für die Hülle der Partikel verwendete Carboxydextran hat nach Herstellerangaben einen pKs von 3,6-3,8 und ein mittleres Molekulargewicht von ca. 2600 g/mol [7].

3.1 Verwendung in der Magnetrelaxometrie

Die vollständige Charakterisierung der Partikel schließt die Bestimmung der spezifischen Signalintensität in der Magnetrelaxometrie ein, die in Tabelle 9 von den verwendeten MNP zusammengefasst wurden. Die Messungen werden auch als MRX-Messungen und die gewonnenen Daten als MRX-Daten bezeichnet.

Tab. 9: Néel-Amplitude der MNP im Vergleich bezogen auf die Menge Metall modifiziert nach [64].

magnetische Nanopartikel		Néel-Relaxationsamplitude ΔB [µT/mol Eisen]
Oleoylsarcosin-EO-Partikel		25
Stärke-CF-Partikel	CF-II	217
	CF-III	228
	CF-IV	240
	CF-V	166
Dextran-EO-Partikel	1008	51
	1011	112
	1031	135

Die Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel wurden nicht für magnetrelaxometrische Messungen verwendet, da die Modifizierung der Oberfläche der MNP zu keinem stabilen Produkt führte.

Stärke-Cobaltferritpartikel

Die Cobaltferritpartikel (CF-II, -III und -IV) wurden intensiv untersucht, um die Korrelation zwischen der Signalstärke und der Metallkonzentration zu bestimmen. Die Messung wurde mit einem 37-Kanal-SQUID-Magnetometer [65, 66] durchgeführt, dass vor der Entwicklung des MRX-Messgerätes für die ersten Relaxationsmessungen zur Verfügung stand. Es wurden ausschließlich feste, d.h. gefriergetrocknete Proben, mit Mannit als Gerüstbildner, vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

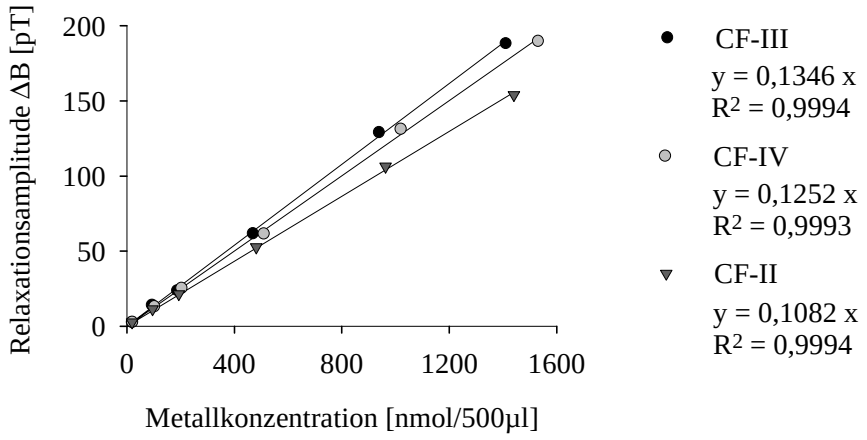


Abb. 20: Relaxationsamplitude (ermittelt ohne Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 1–100 ms) als Funktion der Metallkonzentration der Cobaltferrite CF-II, -III und –IV.

Es konnte bestätigt werden, dass in den untersuchten Konzentrationsbereichen der magnetischen Nanopartikel die Néel-Amplitude linear mit der Stoffmenge Metall zunimmt. Die Metallkonzentration wurde stets mit der Atomemissionsspektroskopie (AES, s. Abschn. 10) bestimmt. CF-III zeigt die höchste spezifische Signalintensität und hat mit 18 nmol Metall die geringste Nachweisgrenze. Die Partikelchargen CF-II und CF-III wurden für Kopplungsversuche mit Biomolekülen verwendet. Da jedoch keine ausreichenden Mengen zur Verfügung standen, wurde ein weiteres Cobaltferrit (CF-V) von der Firma Chemicell bezogen, das die gleichen Eigenschaften wie CF-III aufweisen sollte.

Dextran-Eisenoxidpartikel

Von den Eisenoxidpartikeln wurden Verdünnungsreihen mit dem beschriebenen MRX-Messsystem vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

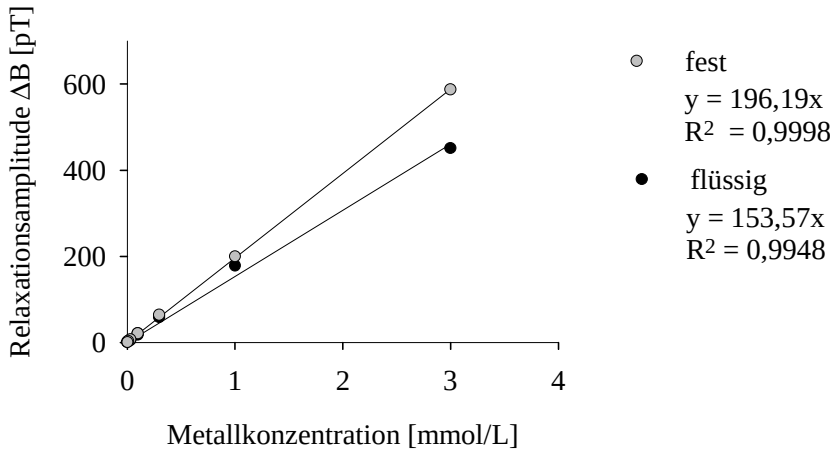


Abb. 21: Relaxationsamplitude (ohne Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 420 µs - 100 ms) als Funktion der Metallkonzentration der EO-Partikel (Probenvolumen: flüssig: 150 µl, fest: 100 µl).

Die Linearität zwischen der Relaxationsamplitude und der Metallkonzentration konnte hier sowohl für die Brown- (flüssigen Proben) als auch für die Néel-Amplitude (feste Proben) nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze lag bei den flüssigen Proben bei 1,5 nmol Eisen und bei den festen Proben bei 1 nmol Eisen.

3.2 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität der magnetischen Nanopartikel wurde in wässrigen Lösungen der pH-Bereiche 4-12, in einem Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) und weiteren für die Versuche relevanten Medien untersucht. Die Bestimmung der Instabilität, d.h. Agglomeration der Teilchen, erfolgte durch die Beobachtung der Teilchengrößenveränderung mit Hilfe der PCS und der Veränderung der Brown-Relaxationszeit.

Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel

In der Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen der Oleoylsarcosin-Partikel wiedergegeben. Die Stabilität in wässrigen Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten wurde nach 48 h, die Stabilität in Plasma und PBS nach 2 h bestimmt.

Tab. 10: Stabilität der Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel in unterschiedlichen Medien.

Medium	**pH 4**	**pH 7**	**pH 10**	**pH 12**	**0,1 M NaCl**	**Plasma**	**PBS pH 7,4**
d_{hyd} [nm]	92	92	88	126	170	69 ± 9	87 ± 1

Die mit Tensid stabilisierten Eisenoxidpartikel waren zwei Wochen bei pH 4-10 und in PBS stabil, dagegen bei pH 12 und in NaCl instabil. Die Partikel sind auch in Plasma stabil. Die hier im Vergleich zu der Originallösung verringerte Teilchengröße kann durch eine Desaggregation der Partikel und auch durch das Messverfahren (PCS) bedingt sein. Die Plasmaproteine werden bei diesem Verfahren aufgrund ihrer Größe als Partikel detektiert und bei der Berechnung der mittleren Partikelgröße mit einbezogen.

Stärke-Cobaltferritpartikel

Die Stärke-CF-Partikel I-V zeigten alle über einen Zeitraum von mindestens 2 Tagen eine ausreichende Stabilität in PBS und in wässrigen Lösungen mit pH-Werten von 4-12. Während der Lagerung wurde allerdings eine starke Agglomerations- und Sedimentationsneigung (Bildung eines Bodensatzes) der Cobaltferritsuspensionen beobachtet. Tabelle 11 zeigt die Veränderung des Metallgehaltes und der hydrodynamischen Durchmesser der Partikel über einen Zeitraum von 4 Monaten.

Tab. 11: Metallgehalt und mittlere hydrodynamische Teilchengrößen der Cobaltferritsuspensionen über einen Zeitraum von 4 Monaten (n.B. = nicht Bestimmt).

	1. Monat	3. Monat	4. Monat	1. Monat	3. Monat	4. Monat
Proben	Metallgehalt [mmol/L]			d_{hyd} [nm]		
CF-II	111	105	97	80	94	95
CF-III	128	94	n.B.	116	n.B.	139
CF-IV	100	102	n.B.	100	n.B.	112
CF-V	87	n.B.	n.B.	90	96	99

Die in der Tabelle 11 dargestellten Messergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme des mittleren Partikeldurchmessers der kolloidalen Lösungen, die mit einer Abnahme des Metallgehalts der Suspensionen (Überstand) einhergeht. Durch eine Inkubation der Lösungen mit Citratpuffer (s. Material) konnte jedoch eine Desaggregation und

Stabilisierung der Partikel bewirkt werden. Tabelle 12 zeigt die Veränderung der Partikelgröße von CF-II-V über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die Partikel wurden 1:1 mit Citratpuffer inkubiert und in regelmäßigen Abständen vermessen. Der Metallgehalt der Lösungen wurde nicht bestimmt, da keine Partikelsedimentation beobachtet wurde.

Tab. 12: Mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser der CF-V-Partikel in Citratpuffer.

Proben	**10 min** d_{hyd} [nm]	**2 h** d_{hyd} [nm]	**24 h** d_{hyd} [nm]	**4 d** d_{hyd} [nm]
CF-II	80 ± 1	64 ± 1	45 ± 1	39 ± 3
CF-III	72	54	50	n.B.
CF-IV	131	120	115	n.B.
CF-V	81	n.B.	69 ± 1	60

Um die Anwendbarkeit der Cobaltferrite in Blutplasma und anderen für die Versuche relevanten Medien zu untersuchen, wurde die Stabilität der Partikel in diesen Medien bestimmt. Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung der CF-V-Partikel sind in Abbildung 22 wiedergegeben.

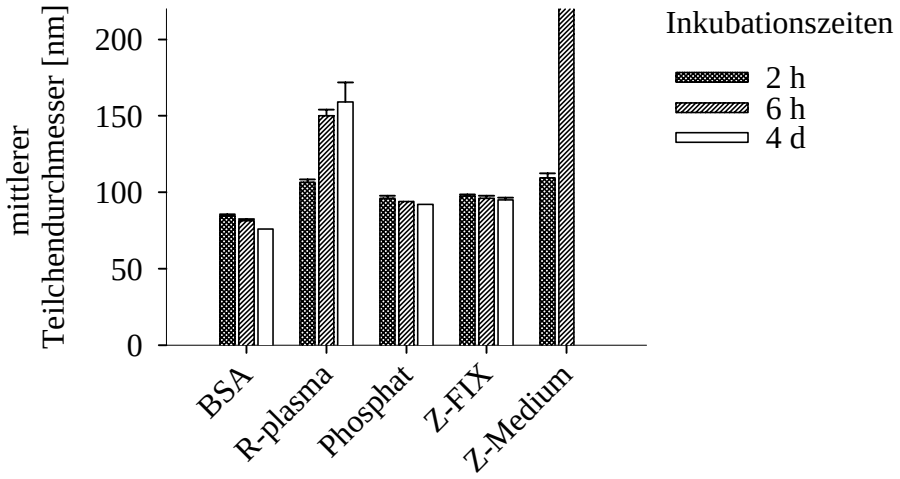


Abb. 22: Mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 24) der CF-V-Partikel in verschiedenen Medien.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Teilchen in 0,1 % BSA/PBS pH 7,4 (BSA-Puffer), Phosphatpuffer pH 7,4 und CellFIX über 4 Tage stabil sind. In Rinderplasma und Zellmedium neigen sie dagegen bereits nach 6 h zur Aggregation.

Dextran-Eisenoxidpartikel

Die Stabilität der EO-Partikel wurden entsprechend untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser der Partikel nach 2 h Inkubation in den angegebenen Medien.

Proben	**EO** d_{hyd} [nm], 2 h	**Bemerkung**
PH-Werte 4- 12	visuell überprüft	stabil
Wasser	visuell überprüft	stabil
PBS	64 ± 2	stabil
Rinderplasma	182 ± 9	instabil
BSA-Puffer	66 ± 3	stabil

Die Dextran-EO-Partikel sind wie die Cobaltferrite in allen untersuchten Medien bis auf das Rinderplasma stabil.

3.3 Optimierung magnetischer Nanopartikel

Wie in Abschnitt 2.3 diskutiert, sollten die magnetischen Nanopartikel für die Magnetrelaxometrie eine möglichst definierte Größe mit einer engen Teilchengrößenverteilung aufweisen, damit sie innerhalb des Zeitbereichs der Messungen (0,25 ms – 1 s) detektiert werden können. Gerade die Néel-Relaxation hängt gemäß Gl. 7 exponentiell von dem Kernvolumen ab. Je enger die Teilchengrößenverteilung der Suspension ist, desto höher liegt die spezifische Brown- und Néel-Relaxationsamplitude, die ein Maß für die Anzahl der jeweils erfassten Partikel ist. Die meisten Ferrofluide wiesen allerdings eine breite Verteilung der Kerngrößen und der hydrodynamischen Partikelgrößen auf. Diese Kerngrößenverteilung kann häufig durch eine logarithmische Normalverteilung beschrieben werden [67, 68] Abbildung 23 zeigt schematisch eine solche Verteilung.

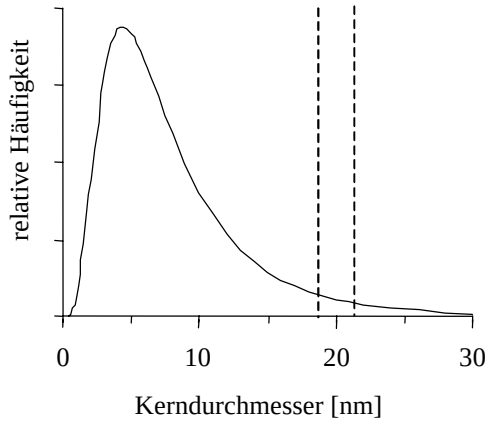


Abb. 23: Typische logarithmische Normalverteilung der Kerngröße in magnetischen Flüssigkeiten.

Da das Häufigkeitsmaximum deutlich bei Kerngrößen von unter 10 nm liegt, liefert nur ein kleiner Anteil der Kerne ein messbares Néel-Signal (s. Markierung). Um diese Ferrofluide zu optimieren, d.h. die Breite der Teilchengrößenverteilung zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit die magnetische Fraktionierung angewendet. Sie beruht auf der Trennung der Teilchen nach dem magnetischen Moment der Nanopartikel. Die gewonnene Fraktion sollte ein möglichst einheitliches Relaxationsverhalten, wie auch ein hohes spezifisches Relaxationssignal aufweisen. Das Prinzip der Methode und die Durchführung sind in Abschnitt 10 beschrieben.

Stärke-Cobaltferritpartikel

Die Chargen I und V der Cobaltferritpartikel wurden magnetisch fraktioniert. Die CF-I-Partikel wurden mit Wasser fraktioniert, CF-V dagegen mit verschiedenen Puffern, um den Einfluss des Fraktionsmediums auf die Fraktionierung zu untersuchen.

Cobaltferrit-I-Partikel

Die CF-I-Partikel wurden bei einer Feldstärke von 0,2 - 0 T magnetisch fraktioniert. Es wurde eine XS^+ Säule verwendet, die mit 1 ml der Originalsubstanz bei 0,2 T beschickt wurde. Der Metallgehalt, der Teilchendurchmesser sowie die Néel-Amplituden der Fraktionen wurde bestimmt. Das Volumen jeder Fraktion wurde ermittelt, um den absoluten Metallgehalt jeder Fraktion und die Wiederfindungsrate angeben zu können.

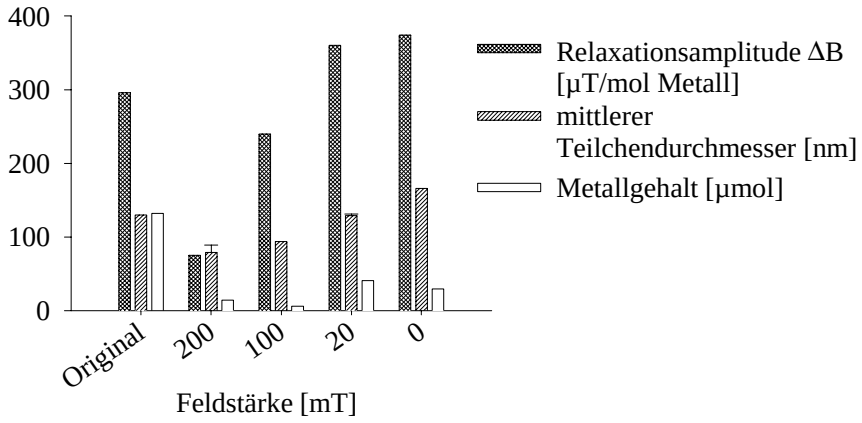


Abb. 24: Fraktionierung der CF-I-Partikel: Relaxationsamplitude pro Mol Metall (ermittelt ohne Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 1–100 ms), mittlere hydrodynamische Teilchengröße (MW ± SD, n = 24) und der Metallgehalt als Funktion der Feldstärke der einzelnen Fraktionen.

Die Zunahme der Teilchengröße geht mit der Zunahme des Relaxationssignals einher, wobei vor allem bei den hohen Feldstärken von 200 mT und 100 mT signalschwache Fraktionen gewonnen wurden. Die Signalstärke der bei 20 mT und 0 mT gewonnenen

Fraktionen liegt deutlich höher als die der Ausgangslösung. Bei 0 mT wurden die meisten Partikel (Metallgehalt) gewonnen. Die Wiederfindungsrate bezogen auf die Menge Metall lag bei 70 %.

Cobaltferrit-V-Partikel

Die magnetische Fraktionierung der CF-V-Partikel wurde mit Acetat (20 mM, pH 4,7), Citrat (pH 5,0), BSA-Puffer und Wasser mit einer VS^{+}-Säule bei Feldstärken zwischen 1150 mT und 0 mT durchgeführt. Die Partikel wurden ca. 16 h in einem Verhältnis von 1:1 mit dem jeweiligen Puffer inkubiert, wobei je 500 µl Originallösung mit Wasser und BSA-Puffer und je 1 ml mit Acetat- und Citratpuffer versetzt wurden (s. Eisengehalt, Abb. 25-28). Bei der Fraktionierung wurde zwischen 1,5–5 ml pro Fraktion aufgefangen und anschließend mit 5-10 ml gespült, ehe die Feldstärke reduziert wurde. Es wurden wegen der unterschiedlichen Partikelmengen, die je nach Feldstärke von der Säule gespült werden konnten, zum Teil zwei Fraktionen pro Feldstärke aufgefangen (z.B. Abb. 25: 170 mT (1,2)). Die Abbildungen 25-28 zeigen die Partikelgrößen und den Eisengehalt der Fraktionen. Der Eisengehalt wurde aus der Konzentrationsbestimmung und dem aufgefangenen Volumen berechnet.

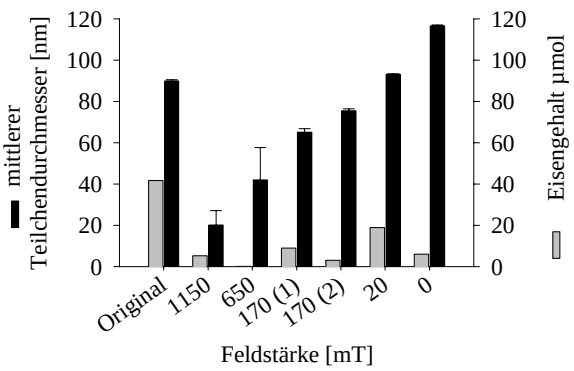


Abb. 25: Fraktionierung der CF-V-Partikel in *Wasser*: Eisengehalt und mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 24).
(1) und (2) steht für zwei Fraktionen, die bei der angegebenen Feldstärke gesammelt wurden.

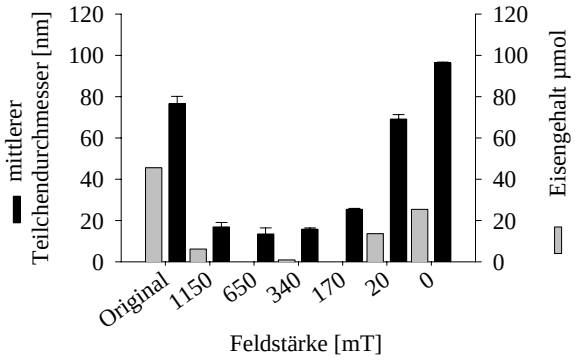


Abb. 26: Fraktionierung der CF-V-Partikel in *BSA-Puffer*: Eisengehalt und mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 24).

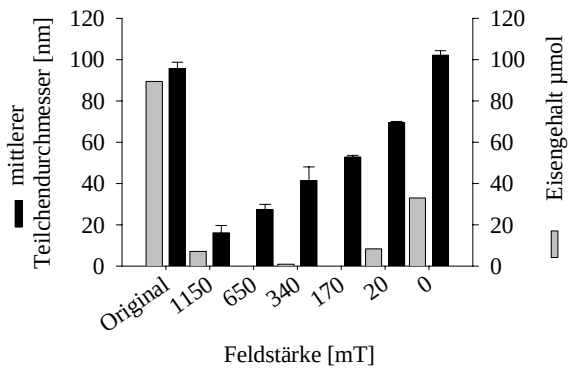


Abb. 27: Fraktionierung der CF-V-Partikel in *Acetat-Puffer*: Eisengehalt und mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 24).

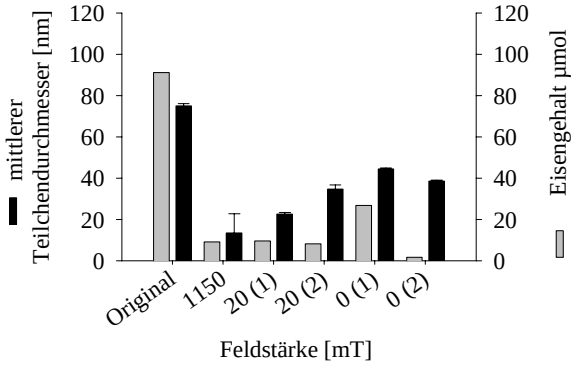


Abb. 28: Fraktionierung der CF-V-Partikel in *Citrat-Puffer*: Eisengehalt und mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 24). (1) und (2) steht für zwei Fraktionen, die bei der angegebenen Feldstärke gesammelt wurden.

Die Fraktionierung der Partikel in Wasser, BSA-Puffer und Acetatpuffer zeigen eine deutliche Zunahme der Teilchengröße mit abnehmender Feld- oder Stromstärke. Die Fraktionierung in Citratpuffer zeigt diese Tendenz allerdings nicht so ausgeprägt. Die gewonnenen Partikelgrößen sind alle geringer als die der Originallösungen. Die großen Standardabweichungen bei den Feldstärken 1150 mT bis 340 mT sind auf die geringen Partikelzahlen pro Fraktion zurückzuführen, die eine starke Messunsicherheit bei den PCS-Messungen bewirken. Die geringe Teilchengrößenveränderung der Fraktionierung mit BSA-Puffer im Bereich von 1150 mT bis 170 mT ist auf die Kombination des hochmolekularen aber dennoch im Verhältnis zu den Partikelgrößen kleinen Proteins (Durchmesser = ca. 12 nm) des Puffers mit der geringen Magnetnanopartikelkonzentration dieser Fraktionen zurückzuführen. Die Proteinmoleküle reduzieren dadurch den berechneten mittleren Teilchendurchmesser der Lösung.

Die Wiederfindungsrate der Partikel lag bezogen auf die eingesetzte Menge Eisen bei der Fraktionierung in Wasser und BSA-Puffer bei fast 100 % und bei den Fraktionierungen in Acetat- und Citratpuffer bei ca. 60 %. Die Originallösungen der Acetat- und Citratpuffer-Fraktionierungen waren doppelt so konzentriert, was wahrscheinlich zu einem Verstopfen der Säule führte.

Die Proben wurden gefriergetrocknet zweimal magnetrelaxometrisch vermessen. Die Ergebnisse einer Messung sind in Abbildung 29 wiedergegeben.

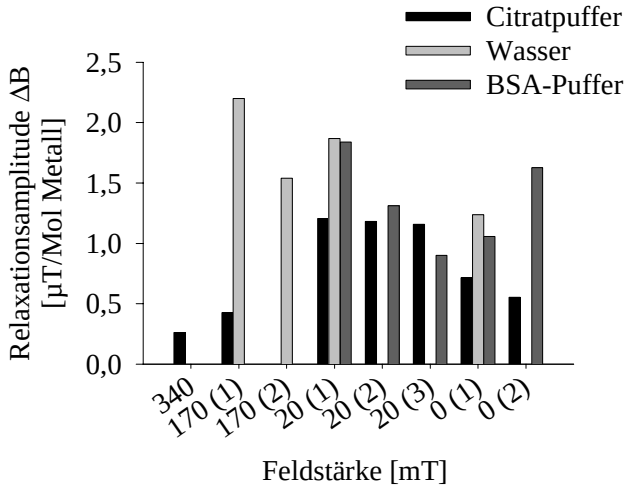


Abb. 29: Fraktionierung der CF-V-Partikel in den angegebenen Puffern: Relaxationsamplitude pro Mol Metall (ermittelt ohne Kurvenanpassung Auswerteintervall: 1–100 ms) als Funktion der Feldstärke.

Es zeigte sich bei keiner der Fraktionierungen eine Abhängigkeit der Relaxationsamplitude von der Feldstärke. In diesem Fall korrelieren die Ergebnisse der mittleren Partikeldurchmesser (s. Abb. 25-28) der einzelnen Fraktionen nicht mit den magnetrelaxometrischen Ergebnissen. Die mittleren Teilchengrößen der Fraktionen zeigen eine Zunahme mit abnehmender Feldstärke, die Relaxationsamplituden scheinen allerdings im Gegensatz zu allen anderen Fraktionierungen, die im Laufe der Arbeit durchgeführt wurden, keiner Gesetzmäßigkeit zu folgen.

Dextran-Eisenoxidpartikel

Die Dextran-EO-Partikel wurden in Wasser und Citratpuffer magnetisch fraktioniert. Der Eisengehalt der Fraktionen und die Teilchengröße der Partikel wurden bestimmt. Es wurde bei Feldstärken zwischen 1950 mT bzw. 1000 mT und 0 mT mit einer mit Citratpuffer bzw. Wasser equilibrierten Säule (XS^+) fraktioniert. 10 ml der Partikelsuspension (1 mmol EO-Partikel + 9 ml Medium) wurden auf die Säule gegeben und bei jeder gewählten Feldstärke mit 20 ml Puffer gespült.

Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit durch die Fraktionierung eventuell Artefakte entstanden sein könnten. Dafür wurden die Fraktionen dem jeweiligen Anteil entsprechend zusammengegeben und die Teilchengröße der vereinigten Fraktion ebenfalls bestimmt. Die Abbildungen 30 und 31 zeigen jeweils den mittleren Partikeldurchmesser und den Eisengehalt der in Wasser und Citratpuffer gewonnenen Fraktionen.

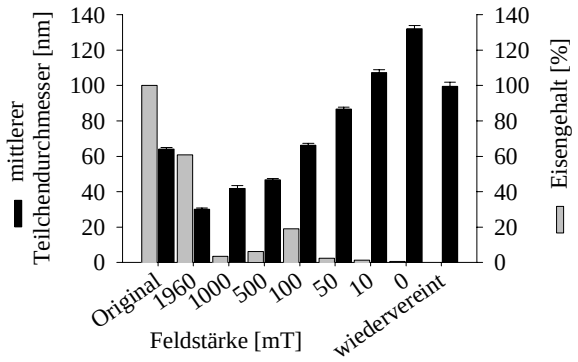


Abb. 30: Fraktionierung der EO-Partikel in *Wasser*: Eisengehalt und mittlerer hydro-dynamischer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 24).

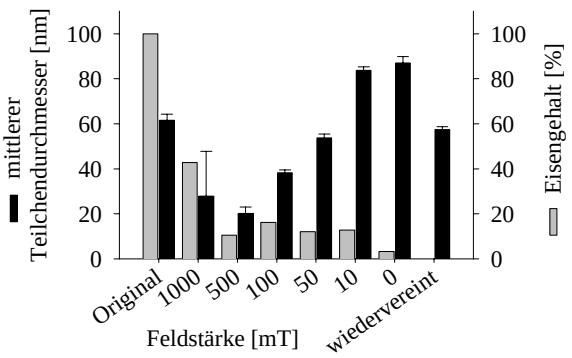


Abb. 31: Fraktionierung in *Citrat-Puffer*: Eisengehalt Eisengehalt und mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 24).

Die Fraktionierungen in Wasser und Citratpuffer zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Teilchengröße von der Sammelfeldstärke. Die große Standardabweichung bei 1000 mT (CP) ist wiederum auf die geringe Partikelzahl in der Probe zurückzuführen. Die wiedervereinte Probe der Citratpuffer-Fraktionierung ist mit 58 ± 1 nm etwas kleiner als die Originallösung mit 62 ± 3 nm. Die wiedervereinte Probe der Wasser-Fraktionierung wurde erst eine Woche nach der eigentlichen Fraktionierung zusammengegeben und liegt mit 100 ± 2 nm um mehr als 50 % über dem Originaldurchmesser der Partikel von 64 ± 1 nm. Der größere mittlere Partikeldurchmesser ist auf Instabilitäten der einzelnen Fraktionen durch die Lagerung zurückzuführen.

3.4 Diskussion

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Gewinnung von Partikelsuspensionen mit einer geringeren Teilchengrößenverteilung beschrieben. Die Fraktionierung anionischer polydisperser Ferrofluide gelang Massart et al. [67] beispielsweise durch eine induzierte Phasenseparation. Durch die Zugabe von NaCl, das die Ionenstärke der Lösung erhöhte, entstanden Zweiphasensysteme mit einer schmaleren Teilchengrößenverteilung. Weitere Verfahren, die sich zur Fraktionierung polydisperser magnetischer Nanopartikel eignen, wie die Crossflow Fractionation (Flow Field Flow Fractionation (FFFF)) [69], die Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatographie, SEC), die Zentrifugation und die magnetische Separation im Gleichfeld, wurden von Th. Rheinländer et al. [70] untersucht und verglichen. Die Trennung der Partikel beruht bei der FFFF, der SEC und der Zentrifugation auf den hydrodynamischen Teilchengrößen, bei der magnetischen Fraktionierung dagegen auf dem magnetischen Moment der Partikel. Als geeignet erwies

sich vor allem die magnetische Fraktionierung, die durch einen geringen Zeitaufwand und einer hohen Qualität der Fraktionierung den anderen Verfahren überlegen war.

Weitere Ansätze, um monodisperse Nanopartikel zu gewinnen, liegen beim Synthesevorgang. Durch eine gezielte Beeinflussung der Synthesebedingungen soll die gewünschte Partikelkerngröße in einer engen Verteilungsbreite gewonnen werden. Dies ist bisher nicht gelungen, wodurch in der Literatur auch verschiedene Beispiele für alternative Synthesewege über Proteinhüllen, z.B. dem Apoferritin [71], zu finden sind.

Die in dieser Arbeit angewendete magnetische Fraktionierung zur Gewinnung einer Fraktion mit einer engeren Teilchengrößenverteilung, die entsprechend ein möglichst einheitliches Relaxationsverhalten und auch ein hohes spezifisches Relaxationssignal aufweisen sollte, zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Bei der Fraktionierung der CF-I- und EO-Partikel konnte bestätigt werden, dass mit abnehmendem Magnetfeld die mittlere hydrodynamische Größe der Partikel steigt. Fraktionierungen mit den EO-Partikeln zeigten bei der Aufnahme von Magnetisierungskurven der Fraktionen [72], der Bestimmung der komplexen Suszeptibilität sowie der Bestimmung der Néel-Amplitude und relaxivity (MRT) eine Korrelation zwischen der Kerngrößen und hydrodynamischen Partikelgrößen [70, 73]. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die magnetische Fraktionierung von Ferrofluiden tatsächlich von dem magnetischen Moment der Partikel bestimmt wird. Bei den EO-Partikeln konnte außerdem durch die magnetische Fraktionierung eine Verbesserung des Signals erreicht werden. Das Originalmaterial wurde zur Herstellung der Sonden bei 50 mT fraktioniert, d.h. alle Partikel verwendet, die bei dieser Feldstärke auf der Säule blieben und bei 0 T eluiert werden konnten. Die relative Nachweis-empfindlichkeit konnte dadurch 2,2 pT/nmol Eisen auf 13,3 pT/nmol Eisen verbessert werden.

Theoretisch könnten mit dem beschriebenen MRX-Messgerät unter der Annahme idealer (kugelförmiger) Teilchen, die eine Anisotropiekonstante von 20 kJ/m³, einen Durchmesser von 18 nm, eine entsprechende Néel-Relaxationszeit von 10 ms (Annahme $\tau_0 = 10^{-9}$ s) und ein magnetisches Moment von $1.3 \cdot 10^{-18}$ Am^2 besitzen, ein minimales magnetisches Moment von $1{,}8 \cdot 10^{-11}$ Am^2 oder $14 \cdot 10^6$ ideale Teilchen nachgewiesen werden.

Die Fraktionierung der CF-V-Partikel zeigte im Gegensatz zu allen anderen Fraktionierungen bei der magnetrelaxometrischen Vermessung (s. Abb. 29) kein eindeutiges Ergebnis. Bei der Verwendung von Wasser, Acetat- und BSA-Puffer war eine deutliche Abhängigkeit der Teilchengröße von der angelegten Feldstärke zu erkennen.

Citratpuffer veränderte die Teilchengrößenverteilung deutlich. Das Ergebnis deutet auf eine starke Desaggregation der Partikel durch den Citratpuffer hin, die möglicherweise nach und nach von der Säule gespült wurden. Es konnte durch die Fraktionierung der Cobaltferrit-V-Partikel weder eine deutliche Verbesserung der Signalstärke noch eine eindeutige Veränderung des Néel-Signals in Abhängigkeit von der Fraktion detektiert werden. Dies kann vielleicht auf die hohe Anisotropiekonstante der Cobaltferrite mit 200 kJm^{-3} im Vergleich zu der der Eisenoxidpartikel mit 5-20 kJm^{-3} zurückgeführt werden, da dadurch ein noch engerer Teilchengrößenbereich der Partikel zur Néel-Relaxation beiträgt. Möglicherweise konnte der Anteil signalgebender Partikel aufgrund der von vornherein schon sehr geringen Konzentration innerhalb des Ferrofluids durch eine magnetische Fraktionierung nicht deutlich erhöht werden.

3.5 Zusammenfassung

Es wurden drei unterschiedliche Ferrofluide hinsichtlich ihrer Stabilität in verschiedenen Medien und ihrer magnetrelaxometrischen Signalstärke untersucht. Die Relaxationsmessungen von Verdünnungsreihen gefriergetrockneter Proben aus Cobaltferrit bzw. gefriergetrockneter und flüssiger Proben aus Eisenoxid zeigten eine lineare Abhängigkeit der Relaxationsamplitude von dem Metallgehalt der Proben. Die Konzentration der magnetrelaxometrischen Nachweisgrenze lag bei allen Ferrofluiden im nanomolaren Bereich (1-20 nmol Metall).

Alle Partikel waren in pH-Bereichen von 4-10 stabil, dagegen in verdünntem Rinderplasma und Zellmedien instabil. Die Cobaltferritpartikel neigten bei der Lagerung zur Aggregation und Sedimentation. Durch Inkubation mit Citratpuffer konnte jedoch eine Desaggregation der noch nicht sedimentierten Partikel des Ferrofluids erreicht werden.

Um diese Ferrofluide bezüglich des MRX-Signals zu optimieren, d.h. einen höheren Anteil an Partikeln zu gewinnen, die innerhalb des messbaren Zeitbereichs relaxieren, wurden magnetische Fraktionierungen durchgeführt. Eine Fraktionierung des CF-I in Wasser ergab bei abnehmender Feldstärke eine Zunahme der Teilchengröße sowie der Néel-Amplitude. Die Fraktionierung der CF-V-Partikel wurde mit verschiedenen Puffern durchgeführt und zeigte bei Wasser, Acetat- und BSA-Puffer eine entsprechende Abhängigkeit der Teilchengröße von der angelegten Feldstärke. Bei der Verwendung des Citratpuffers war die Abhängigkeit weniger deutlich. Bei den CF-V-Partikeln wurde keine Abhängigkeit der Néel-Amplitude von der Sammelfeldstärke gefunden, so dass die Nachweisgrenze durch die Fraktionierung nicht verbessert werden konnte.

Die Dextran-Eisenoxidpartikel wurden in Wasser und Citratpuffer fraktioniert und zeigten wiederum eine deutliche Abhängigkeit der Teilchengrößen von der angelegten Feldstärke. Durch die Wiedervereinigung der Fraktionen konnte an einem Beispiel demonstriert werden, dass bei der Fraktionierung tatsächlich Partikel unterschiedlicher Größe getrennt werden, da die Teilchengröße der wieder vereinten Lösung einen mit der Ausgangslösung vergleichbaren Partikeldurchmesser aufwies.

Es wurde berechnet, dass mit dem beschriebenen MRX-Messsystem ein minimales magnetisches Moment von $1{,}8 \cdot 10^{-11}$ Am^2 nachgewiesen werden kann, wodurch $14 \cdot 10^6$ idealer Teilchen detektiert werden könnten. Durch eine weitere Optimierung der Teilchengrößenverteilung der magnetischen Nanopartikel ließe sich die Empfindlichkeit der Methode jedoch noch wesentlich steigern.

4 Herstellung magnetischer Sonden

Zur Herstellung magnetischer Sonden können je nach Oberfläche der Nanopartikel und Eigenschaften der Kopplungspartner verschiedene Methoden verwendet werden. Da sich nur die Stärke-Cobaltferritpartikel und die Dextran-Eisenoxidpartikel als für die Kopplungen geeignet herausstellten, wird im Folgenden auf die Ergebnisse von Kopplungen mit diesen Partikeln eingegangen. Gekoppelt wurden verschiedene Antikörper, Bovines Serum Albumin (BSA), Biotin sowie Avidin, Neutravidin und Streptavidin. Die Substanzen sind im Abschnitt 10.15 genauer beschrieben.

4.1 Kopplungsmethoden

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Kopplung von Molekülen an Magnetnanopartikel verfolgt: Die Periodat-Methode und das Biotin-Avidin-System, welche beide kurz beschrieben werden.

Periodat-Methode

Bei der Periodat-Methode handelt es sich im ersten Schritt um eine oxidative Spaltung von 1,2-Glykolen mit Periodat. Durch die Oxidation der Zuckerstrukturen auf den Magnet-nanopartikeloberflächen entstehen Aldehydfunktionen, die zur Kopplung von Aminofunktionen, wie z.B Hydraziden und primären Aminen verwendet werden können. Bei der Reaktion entstehen Schiffsche Basen, die mit Reduktionsmitteln wie Natrium Borhydrid ($NaBH_4$), Natrium Cyanoborhydrid ($NaBH_3CN$), Pyridinaminoboran ($C_5H_5N\text{-}BH_3$) oder Dimethylaminoboran ($(CH_3)_2NH\text{-}BH_3$) zu sekundären Aminen reduziert werden können. Sie wird als reduktive Aminierung bezeichnet und ist in Abbildung 32 schematisch dargestellt.

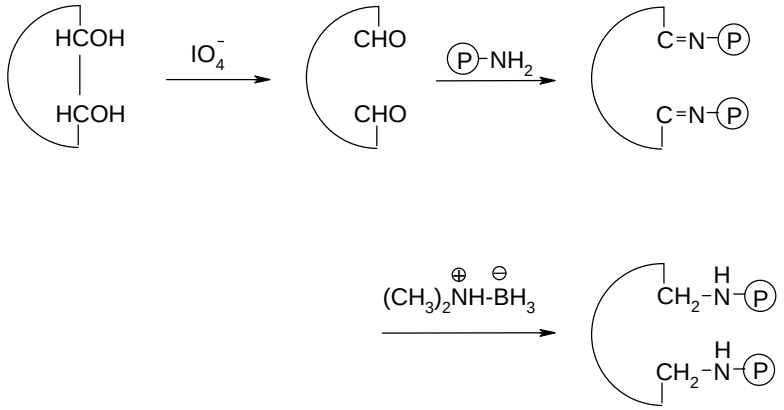


Abb. 32: Schema der Kopplung von Proteinen ($P\text{-}NH_2$) an Zuckerstrukturen.

Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der 1,2-Glykol-Oxidation ist stark von der gewählten Reaktionstemperatur und Periodat-Konzentration abhängig. In dieser Arbeit wurde die Konzentration des Oxidationsmittels sowie die Oxidationszeit empirisch ermittelt. Die genauen Bedingungen sind für jede Kopplungsreaktion angegeben.

Neben dem Oxidationsprozess ist bei der reduktiven Aminierung auch die Wahl des Reduktionsmittels für das Reaktionsmedium und Kopplungsprodukt ausschlaggebend. In der Literatur werden verschiedene Reduktionsmittel diskutiert: Borhydrid [74] als starkes nicht selektives Reduktionsmittel und Cyanoborhydrid als milderes selektives Reduktionsmittel von Schiffschen Basen [75]. Um diese Reaktionen flexibler und breiter anwendbar zu machen, wurde von Geoghegan et al. [76] und Cabacungan et al. [77] die Verwendung verschiedener Amin-Boran-Komplexe zur reduktiven Methylierung von Aminofunktionen systematisch für verschiedene Proteine untersucht. Es zeigte sich, dass Dimethylaminoboran zwar ein etwas schwächeres Reduktionsmittel als Cyanoborhydrid ist, dafür aber weniger toxisch, gut wasserlöslich und somit bei leichter denaturierenden Proteinen von Vorteil ist. Bei einem Vergleich der Reduktionsmittel Dimethyl-, Pyridin- und Triethylaminoboran zeigten alle eine ausreichende Reduktionskapazität bei pH-Werten zwischen 7,0-9,0, wodurch sie flexibel ohne eine genaue Kontrolle der Reaktions-bedingungen eingesetzt werden können. In dieser Arbeit wurde Dimethylaminoboran verwendet.

Biotin-Avidin-System

Das Biotin-Avidin-System [78] wird in den verschiedensten *in vitro* diagnostischen Verfahren, wie Immunoassays [79, 80], bei Zellseparationsmethoden [81] und der Affinitätschromatographie [82] sowie in der Elektronenmikroskopie [83] angewendet. Auch für die *In vivo*-Diagnostik und die Tumortherapie wird die Verwendung dieses Systems diskutiert [84-88.

Es handelt es sich um eine spezifische und hoch affine ($K_d=10^{-15}$ M) Interaktion zwischen dem Vitamin Biotin und dem Protein Avidin. Die Bindung ist selbst bei extremen pH-Werten, über weite Temperaturbereiche und gegenüber Lösungsmittel- und denaturierenden Bedingungen stabil. Jedes Avidin-Molekül besteht aus vier Untereinheiten, die je ein Biotin-Molekül binden können, d.h. ein Mol Avidin bindet vier Mol Biotin. Avidin wird in der Diagnostik mittlerweile durch verschiedene Biotin bindende Proteine, wie Streptavidin, Extravidin und Neutravidin ersetzt, da diese bei gleicher Affinität zu dem Bindungspartner Biotin, eine geringere Tendenz zu unspezifischen Bindungen aufweisen. Des Weiteren kann Biotin mit vielen Proteinen

konjugiert werden, ohne deren biologische Aktivität stark zu beeinflussen. So sind z.B. eine große Anzahl von biotinylierten Antikörpern kommerziell verfügbar.

4.2 Herstellung der Stärke-Cobaltferrit-Sonden

Da Voruntersuchungen zur Kopplung mit den Oleoylsarcosin-Partikeln gezeigt hatten, dass das Protokoll für die Kopplung eines Testmoleküls nicht ohne weiteres auf andere Reaktionspartner übertragbar ist, wurde die Kopplung an Stärke-Cobaltferritpartikel direkt mit den in dieser Arbeit relevanten Molekülen und Proteinen etabliert.

Kopplung von Antikörpern

Zur direkten Kopplung von Antikörpern an die CF-II- und –III-Partikel wurden die Partikel mit Periodat aktiviert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kopplungen mit den Antikörpern humanes IgG (hIgG) und Maus Anti-human-CD4 (Anti-hCD4) dargestellt. Um die Kopplungsausbeute verfolgen zu können, wurden die Antikörper radioaktiv markiert (s. Abschn. 10.4) und als Tracer dem nicht markierten Antikörper hinzugefügt.

Zwei Ansätze a 500 µl (ca. 2,5 µM Metall) und 50 µl (ca. 0,25 µM Metall) magnetisch gereinigter CF-II-Citrat-Partikel (Proben) wurden mit $NaIO_4$ oxidiert und zwei weitere nicht behandelt. Nach einer erneuten magnetischen Reinigung wurden die beiden Ansätze mit dem radioaktiv-markierten Antikörper (250 µg) inkubiert. Die Reinigung des Antikörper-Nanopartikel-Komplexes erfolgte wiederum magnetisch und die Radioaktivität der Waschlösungen und Eluate wurde vermessen. Das genaue Protokoll ist im Abschnitt 10.8.1 beschrieben. In Tabelle 14 sind die prozentualen Radioaktivitäten der Eluate sowie die daraus berechnete Proteinmenge und das Kopplungsausmaß angegeben.

Tab. 14: Kopplung von humanem IgG an CF-II-Partikel: Radioaktivität in % und gekoppelte Proteinmenge in µg, 2 Proben je Eluat (n.B.= nicht Bestimmt).

eingesetztes Volumen magnetischer Nanopartikel in µl	**Eluat**		**Kopplungsausmaß**
	Radioaktivität in %	**Antikörpermenge** in µg	**Protein** µg/ µg **Metall**
aktivierte MNP			
500	11-16	27,5 - 40	0,4-0,56
50	2	5	0,70
nicht aktivierte MNP			
500	22	55	0,70
50	n.B.	n.B.	

Es konnte eine hohe Adsorption von humanem IgG (22 %) an die nicht aktivierten Teilchen festgestellt werden. Das Bindungsausmaß liegt sogar höher als bei der kovalenten Kopplung. Um das Ergebnis zu überprüfen, wurde der Versuch leicht variiert wiederholt.

Bei der zweiten Kopplung wurden die Proben wie beschrieben hergestellt, allerdings wurden 500 µl (ca. 2,5 µM Metall) und 100 µl (ca. 0,5 µM Metall) der MNP eingesetzt und mit 100 µg Protein versetzt. Die Kopplungsausbeute wurde wie in Abschnitt 10.8.1 beschrieben berechnet und ist in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tab. 15: Kopplung von humanem IgG an CF-II-Partikel: Radioaktivität in % und gekoppelte Proteinmenge in µg, 2 Proben je Eluat.

eingesetztes Volumen magnetischer Nanopartikel in µl	**Eluat**		**Kopplungsausmaß**
	Radioaktivität in %	**Antikörpermenge** in µg	**Protein** µg/ µg **Metall**
aktivierte MNP			
500	40-47	40–47	0,56-0,66
100	22	22	1,60
nicht aktivierte MNP			
500	30	30	0,40
100	27	27	1,90

Bei beiden Versuchen konnten an die aktivierten Teilchen (500 µl) vergleichbare Mengen des Proteins gekoppelt werden, obwohl unterschiedliche Mengen des Proteins (250 µg und 100 µg) eingesetzt wurden. Eine Reduktion der Teilchenanzahl um den Faktor fünf führte zu ungefähr einer Verdreifachung der gebundenen Proteinmenge. Des Weiteren konnte die hohe unspezifische Adsorptions des humanen IgGs an die Partikel bestätigt werden. Die Kopplungsausbeute der unspezifischen Bindung liegt im gleichen Bereich, wie die der kovalenten Kopplung. Eine Ursache, warum die Bindung des humanen IgGs an die Partikeloberfläche in einem vergleichbaren Ausmaß stattgefunden hat, könnte eine zu geringe Aktivierung der Partikeloberfläche sein. Liegen nur wenig aktivierte Gruppen zur Kopplung vor, könnte die unspezifische Adsorption diesen Anteil überdecken.

Eine stärkere Oxidation der Hülle wie auch verschiedene Kopplungsansätze mit unterschiedlichen Protein/Partikel Verhältnissen führten zu Instabilitäten. Die Partikel agglomerierten und fielen schließlich aus.

Bei der Kopplung des Anti-hCD4-Antikörpers wurden 100 µg des radioaktiv markierten Antikörper mit den CF-III-Citrat-Partikel (100 µl) inkubiert.

Tab. 16: Kopplung von humanem IgG an CF-II-Partikel: Radioaktivität in % und gekoppelte Proteinmenge in µg, 2 Proben je Eluat.

eingesetzte Menge Eisen in 100 µl Puffer	**Eluat** **Radioaktivität** in % **und Antikörpermenge** in µg	**Kopplungsausmaß** **Protein** µg/µg **Metall**
aktivierte MNP		
0,95 µmol Fe	1,1-1,2	0,04
nicht aktivierte MNP		
0,6 µmol Fe	1,4-1,5	0,08 - 0,09

Die in Tabelle 16 dargestellten Ergebnisse zeigen eine sehr geringe Kopplungsausbeute.

Daher wurde eine weitere Kopplung des Anti-hCD4-Antikörpers mit der fünffachen Menge an CF-II-Citrat-Partikeln und der gleichen Menge radioaktiv markiertem Antikörper unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Das Kopplungsausmaß wurde berechnet und ist in Tabelle 17 wiedergegeben.

Tab. 17: Kopplung von Anti-hCD4-Antikörpern an CF-II-Partikel: Radioaktivität in % und gekoppelte Proteinmenge in µg.

eingesetzte Menge Eisen in 500 µl Puffer	**Eluat** **Radioaktivität** in % **und Antikörpermenge** in µg	**Kopplungsausmaß** **Protein** µg/µg **Metall**
aktivierte MNP		
1,94 µmol Fe	1,9	0,034
nicht aktivierte MNP		
1,94 µmol Fe	1,7	0,031

Da die MNP-Protein-Konjugate in Zellversuchen (s. Abschn. 9) angewendet werden sollten, wurde ihre Stabilität in verschiedenen Medien magnetrelaxometrisch untersucht. Die Partikel waren in heparinisiertem Vollblut, Plasma und PBS stabil, dagegen in Zellmedien instabil.

Da auch bei diesen Kopplungen immer wieder Partikelaggregationen zu beobachten waren, wurde mit Hilfe einer BSA-Titrationsreihe der Einfluss verschiedener Proteinkonzentrationen auf die Stabilität des Kopplungsproduktes untersucht. Es wurde BSA anstelle der Antikörper ausgewählt, da es in einem größerem Maßstab bezogen werden kann. Des Weiteren wurden die Cobaltferrit-BSA-Partikel für die Biotinylierungsreaktionen verwendet.

Kopplung von BSA

Die Kopplung von BSA wird am Beispiel der CF-II-Partikel wie in Abschnitt 10.8.1 beschrieben vorgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt, wobei es sich bei den Proben wiederum um die oxidierten Partikel handelt. Die Kontrollen zeigen die unspezifische Bindung des Proteins an die unveränderte Oberfläche der Partikel.

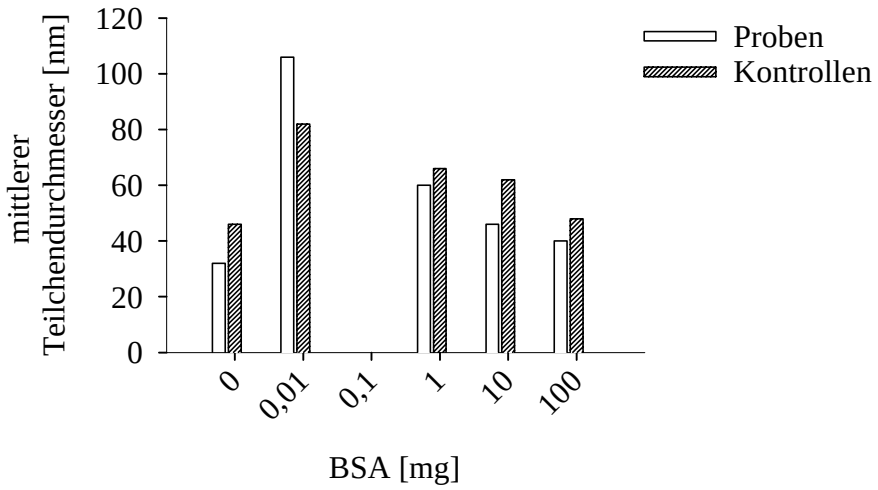


Abb. 33: Mittlerer Teilchendurchmesser der CF-II-Partikel nach 2 h Inkubation mit unterschiedlichen Mengen BSA (MW ± SD, n = 6).

Es ist deutlich zu sehen, dass das Kopplungsprodukt stark von dem verwendeten Konzentrationsverhältnis abhängig ist. Die Zugabe von 0,01 mg BSA führten zu einem starken Anwachsen der Partikelgröße. Bei 0,1 mg BSA aggregierten die MNP so stark, dass eine Messung nicht möglich war. Erst oberhalb von 1 mg Protein entstanden stabile Produkte, wobei die Partikelgröße mit zunehmender BSA-Konzentration abnahm. Dies konnte durch wiederholte Versuche bestätigt werden.

Kopplung von Biotin

Es wurde versucht, die Partikel direkt mit unterschiedlichen Biotinylierungsreagenzien zu modifizieren. Bei den meisten Kopplungsversuchen konnte nicht festgestellt werden, ob die Biotinylierung gelungen war, da die Prüfung der Bindungsfähigkeit kein eindeutiges Ergebnis lieferte. Die kovalente Kopplung von BSA und anschließende Kopplung von Biotin-Sulfo-N-Hydroxysuccinimidester (Protokoll, s. Abschn. 10.15) führte jedoch zu funktionsfähigen Partikeln (s. Abschn. 5).

Kopplung von Avidin-Derivaten

Die Kopplung der Avidin-Derivate (Streptavidin und Neutravidin) wurde wie bei den bisher beschriebenen Kopplungsreaktionen durchgeführt. Es konnten stabile Partikel hergestellt werden, jedoch konnte bei der Durchführung von Aggregationsassays keine spezifische Bindungsfähigkeit festgestellt werden.

4.3 Herstellung der Dextran-Eisenoxid-Sonden

Aufgrund der bei den Kopplungsreaktionen mit den CF-Partikeln beobachteten Stabilitätsproblemen und der nicht funktionierenden Avidin-CF-Sonden wurde eine dritte Partikelart für die Sondenherstellung verwendet: Dextran-stabilisierte Eisenoxidpartikel. Die Herstellung der Antikörper-Sonden erfolgte über das Biotin-Avidin-System, um die Variabilität der Sonde zu erhöhen und gleichzeitig die Probenpräparation zu vereinfachen. Die Partikel wurden sowohl biotinyliert wie auch mit Streptavidin gekoppelt. Die Streptavidin-EO-Partikel wurden entweder direkt als Sonde verwendet oder anschließend mit biotinylierten Antikörpern inkubiert, um magnetisch markierte Antikörper zu gewinnen. Es wird zuerst die Biotinylierung, dann die Streptavidin-Kopplung und anschließend die Antikörper-Kopplung beschrieben.

Herstellung der Biotin-EO-Sonde

Die Biotinylierung der EO-Partikel wurde über die Periodat Oxidation der Hülle, die Kopplung von BSA und anschließende Kopplung von aktiviertem Biotin durchgeführt (s. Abschn. 10.8.2). Die Bindungsfähigkeit wurde mit einem Aggregationsassay überprüft (s. Abschn. 5).

Herstellung der Streptavidin-Eisenoxid-Sonde

Des Weiteren wurde Streptavidin mittels der Periodat Methode an die Dextran-EO-Partikel gekoppelt (s. Abschn. 10.8.2). Die einzelnen Schritte zur Herstellung der Sonde sind schematisch in Abbildung 34 dargestellt und werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

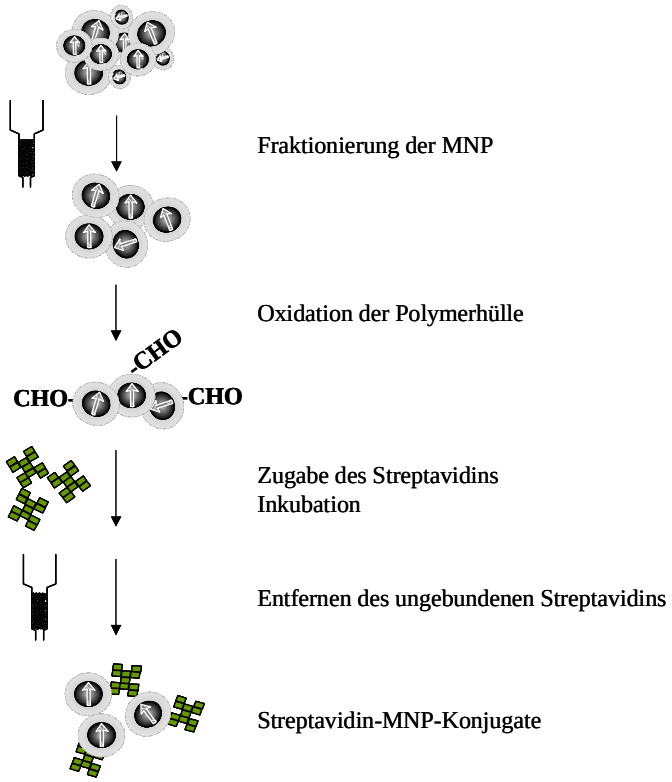


Abb. 34: Schematische Darstellung der Verfahrensschritte zur Synthese der Streptavidin-EO-Sonde.

Von den Zwischenprodukten und den gereinigten Streptavidin-Partikeln wurden die Teilchengröße, die Relaxationszeit und der Eisengehalt bestimmt.

Reproduzierbarkeit der Vorreinigung

Die Reproduzierbarkeit der magnetischen Reinigung bei 50 mT wurde untersucht, indem fünf EO-Proben (500 µmol Eisen) in je 2 ml Citratpuffer über eine VS^+-Säule fraktioniert wurden. Die Veränderung des mittleren Teilchendurchmessers und des Eisengehalts sind in Abbildung 35 dargestellt.

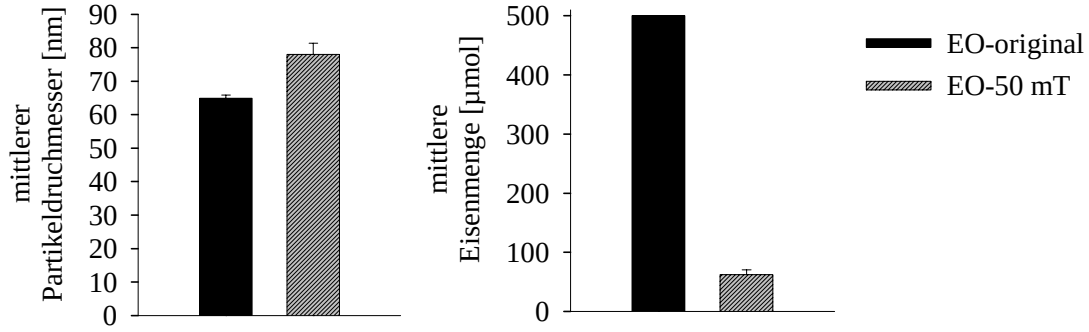


Abb. 35: Mittlere Teilchengröße und Eisenkonzentration (MW ± SD, n = 5) vor und nach der Reinigung der EO-Partikel bei 50 mT.

Der Reinigungsschritt wies eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Die Eisenkonzentration der Eluate lag bei 62 ± 8 µmol/ml. Dies entspricht 12,4 % der eingesetzten Eisenmenge. Der

mittlere hydrodynamische Teilchendurchmesser stieg von 65 ± 8 nm auf 78 ± 3 nm. Die Nachweisgrenze der bei 50 mT gereinigten Partikel lag bei den MRX-Messungen bei den flüssigen Proben um 0,003 mmol Eisen/L und bei den gefriergetrockneten Proben um 0,001 mmol Eisen/L. Das entspricht einer absoluten Konzentration von 0,45 nmol bzw. 0,15 nmol Eisen (Probenvolumen von 150 µl).

Bestimmung des Kopplungsausmaßes

Zur Bestimmung des Kopplungsausmaßes wurde Streptavidin radioaktiv markiert (s. Anhang). Das Protein wurde nach Vorschrift an die EO-Partikel gekoppelt: Durch die Bestimmung der Aktivität der Proben vor der Reinigung sowie die der Waschlösungen und Eluate nach der magnetischen Reinigung, konnte die Kopplungsrate quantifiziert werden. Um auch das Ausmaß an unspezifisch gebundenem Protein bestimmen zu können, wurde ein Teil der Probe mit einem nichtionischen Tensid (10 min mit 1 % Tween 20) inkubiert [89]. Das adsorbierte Protein sollte durch den Zusatz des Tensid desorbieren und so zu einer reduzierten Radioaktivität des Eluats führen. Die Proben wurden gereinigt und die Aktivitäten entsprechend vermessen.

Der mittlere Eisengehalt der gereinigten EO-Sonde betrug 5,5 mmol/l. Das entspricht wiederum 40 % der eingesetzten Eisenmenge. Die Kopplungsausbeute lag bei 3,2-4,1 %. Das entspricht 48–62 µg Streptavidin/2,75 µmol Eisen oder 0,3–0,4 µg Streptavidin/µg Eisen. Die Teilchengröße lag nach der Säulenreinigung bei 78–80 nm (s. Abb. 36). Die Relaxationszeit der bei 50 mT gereinigten Probe lag bei 0,6 ms. Durch die Kopplung der Partikel mit Streptavidin erhöhte sie sich auf 2,1 ms (s. Abb. 37).

Eine unspezifische Adsorption des Proteins konnte nicht festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die unspezifische Bindung des Streptavidins an die Partikel zu vernachlässigen und der beobachtete Aktivitätsverlust der Sonden auf die Alterung und nicht auf eine Desorption des Proteins zurückzuführen ist.

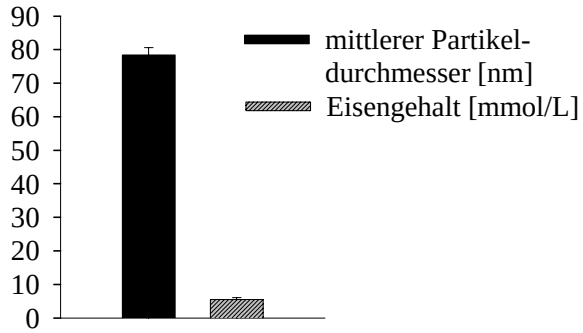


Abb. 36: Mittlere Teilchengröße (MW ± SD, n = 6) und Eisengehalt der magnetisch gereinigten Streptavidin-EO-Sonde.

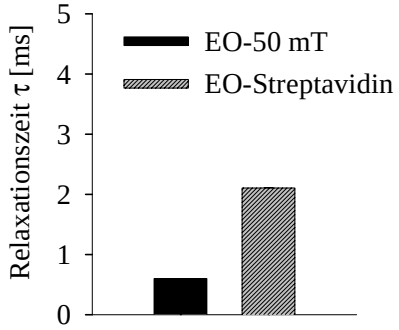


Abb. 37: Relaxationszeit (einfach exponentielle Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 420 µs- 100 ms) der bei 50 mT gereinigten EO-Partikel und der gereinigten Streptavidin-EO-Sonde.

Stabilität der Sonde

Die Stabilität der Sonde wurde in verschiedenen Reaktionsmedien und in Vollblut untersucht. Die Veränderung Relaxationszeit wurde magnetrelaxometrisch und die Teilchengrößenzunahme mittels PCS bestimmt. Eine Instabilität der Partikel in einem der Medien würde sich durch eine Agglomeration, also einer Partikelgrößenzunahme zeigen. Wie in Abschnitt 2.3 bereits erklärt wurde, ist die Relaxationszeit ein Maß für die Brown-Relaxation und somit auch für die hydrodynamische Größe der Partikel. Eine Zunahme der Relaxationszeit entspricht daher einer Zunahme der Teilchengröße.

Die Streptavidin-Partikel wurden mit den angegebenen Medien über einen Zeitraum von 4 Tagen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass bis auf das verwendete Zellkulturmedium keine der untersuchten Medien die Stabilität der Sonde beeinträchtigten. Die Relaxationszeiten und Teilchengrößen sind in Abbildung 38 dargestellt.

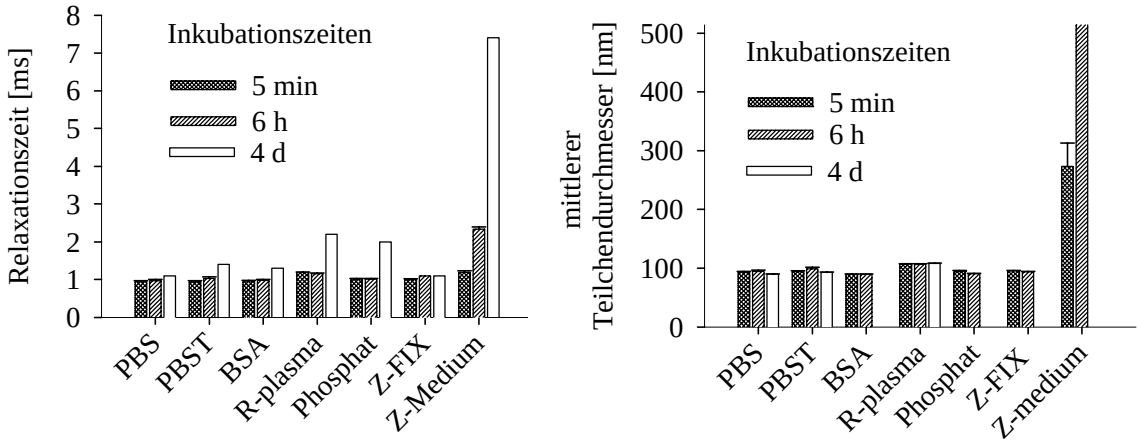


Abb. 38: Relaxationszeit (ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 420 µs – 100 ms) und mittlere Teilchengröße (MW ± SD, n = 36) der Streptavidin-EO-Partikel in den angegebenen Medien: BSA (1 % BSA in PBS), R-Plasma (Rinderplasma), Phosphat (10mM Phosphatpuffer, pH 7,4), Z-FIX (CellFix™), Z-Medium (Zellmedium).

Die Stabilität der Streptavidin-EO-Partikel in Vollblut zeigt Abbildung 39. Es konnte eine leicht erhöhte Relaxationszeit im Vergleich zu PBS festgestellt werden. Um sicherzustellen, dass es sich nicht um eine Agglomeration der Partikel aufgrund einer Inkompatibilität mit dem Blut handelt, wurde dieses mit BSA-Puffer verdünnt. Die Relaxationszeit der Partikel in verdünntem Blut lag nicht nennenswert oberhalb der Relaxationszeit in normalem Puffer. Die erhöhte Relaxationszeit kann daher wahrscheinlich größtenteils auf die 3,5–4,5fach [90] höhere Viskosität des Blutes zurückgeführt werden. Bei einer Partikelagglomeration wurde außerdem im Allgemeinen eine kontinuierliche Zunahme der Relaxationszeit über den Inkubationszeitraum beobachtet.

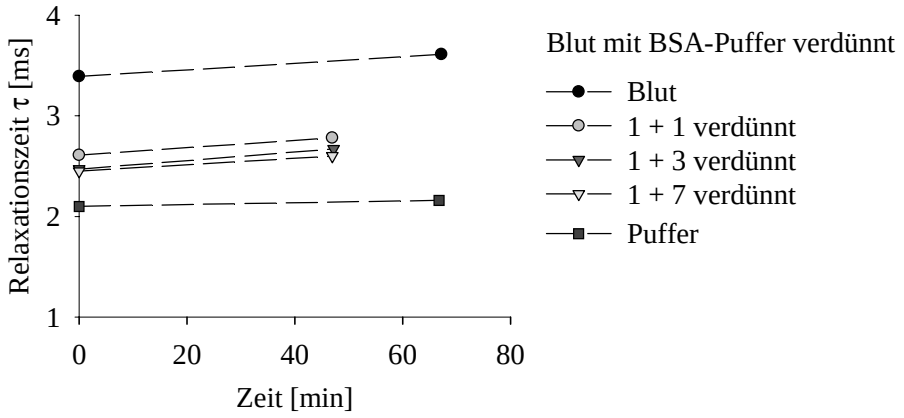


Abb. 39: Relaxationszeit (ermittelt aus einer einfach exponentiellen Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 420 µs – 100 ms) der Streptavidin-EO-Sonde in Blut bzw. mit BSA-Puffer verdünntem Blut.

Die Streptavidin-EO-Sonde konnte reproduzierbar in einer für die MRX notwendigen Partikelgröße und Stabilität hergestellt werden. Die Bindungsfähigkeit konnte mittels Aggregationsassays (s. Abschn. 5) bestätigt werden. Daher wurden diese Partikel für die Herstellung der Antikörper-EO-Sonden verwendet.

4.4 Herstellung der Antikörper-Eisenoxid-Sonden

Die Kopplung von spezifischen Antikörpern an die Eisenoxidpartikel erfolgte über das Biotin-Avidin-System und ist schematisch in Abbildung 40 dargestellt.

Es wurden verschiedene biotinylierte Antikörper an die Streptavidin-EO-Sonde gebunden: Biotinylierte Maus Anti-human-IgG-, Maus Anti-hCD4- und Kaninchen anti-α1-DSPA-Antikörper. Sie werden im Folgenden als spezifische Antikörper bezeichnet. Als Kontrollantikörper für die unspezifische Bindung dienten die entsprechenden biotinylierten Isotypantikörper, d.h. Antikörper der gleichen Spezies und Subklasse. Sie werden als Isotypkontrolle bezeichnet.

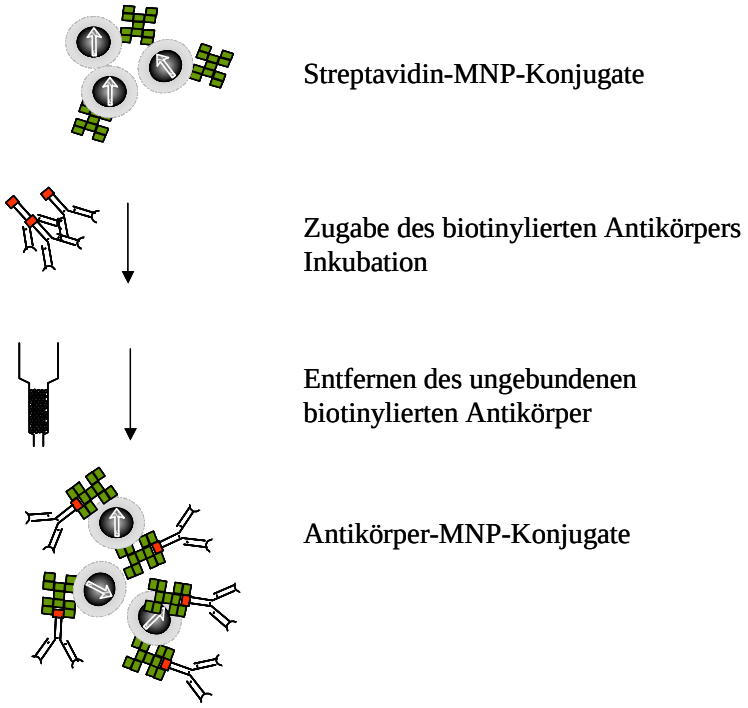
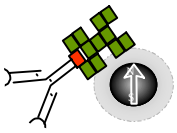


Abb. 40: Schematische Darstellung der Verfahrensschritte zur Synthese der Antikörper-EO-Sonde unter Verwendung des Biotin-Avidin-Systems.

Die als Sonden eingesetzten Streptavidin- und Antikörper-Biotin-Streptavidin-EO-Partikel (Antikörper-EO-Partikel) werden den aus den Schemazeichnungen bekannten Symbolen zugeordnet und vereinfachend auch als kurze und lange Sonde bezeichnet.

Tab. 18: Symbole und Bezeichnungen der Sonden.

Bezeichnung	**Streptavidin-EO-Partikel kurze Sonde**	**Antikörper-EO-Partikel lange Sonde**
Symbole		

Da die Herstellung der Antikörper-Sonden von starken Aggregationen bzw. Quervernetzungen durch die mehrfach biotinylierten Antikörper begleitet wurde, musste das optimale Konzentrationsverhältnis der Streptavidin-Sonde zu den verwendeten Antikörpern für jeden Antikörper austitriert werden. Da für MRX-Messungen nur 150 µl Probenvolumen benötigt werden, wurde die Titration magnetrelaxometrisch durchgeführt und die Relaxationszeiten der Proben bestimmt. Die Ergebnisse der Titration sind am Beispiel einiger biotinylierter Antikörper in Abbildung 41 dargestellt.

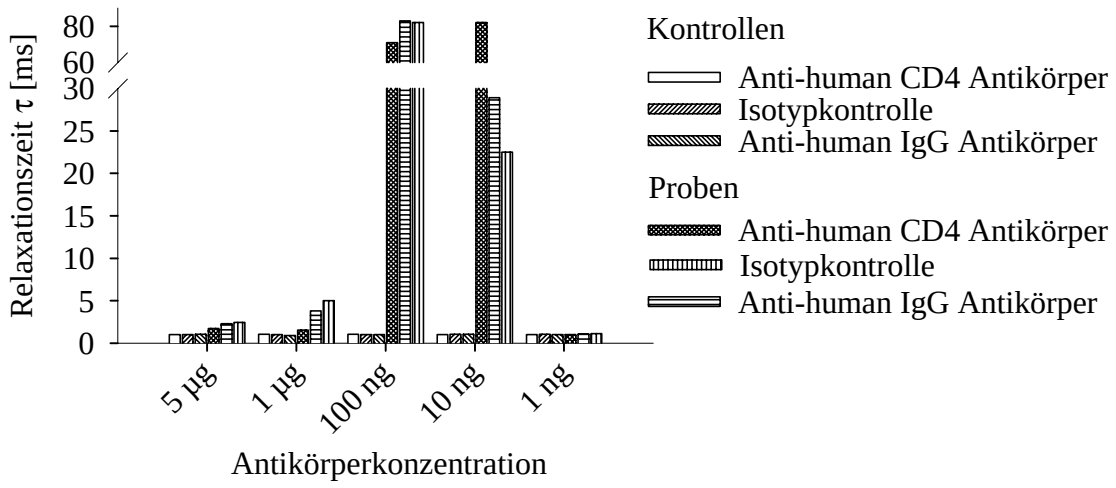


Abb. 41: Relaxationszeit der titrierten Antikörper-EO-Sonden (einfach exponentielle Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 420 µs-100 ms).

Wie Abbildung 41 zu entnehmen ist, müssen die biotinylierten Antikörper im Bereich von mehr als 1 µg (bezogen auf die verwendete Menge Streptavidin-Sonde) eingesetzt werden, um eine Aggregation der Partikel zu verhindern. Bei 1 ng Antikörper liegt ein Überschuss an kurzen Sonden vor, so dass auch hier noch keine Aggregation zu beobachten ist. Die Streptavidin-Sonde ist bei dieser geringen Konzentration an Antikörpern jedoch noch nicht vollständig mit Antikörpern belegt, wie an der Aggregationsreaktion mit einer 10-100fach höheren Menge an Antikörpern zu erkennen ist. Der Grund für die unterschiedlich starke Aggregation der Streptavidin-Partikel mit den Antikörpern bei gleicher Konzentration liegt wahrscheinlich an einem unterschiedlich starken Biotinylierungsgrad der Antikörper. Allein der anti-α1-DSPA-Antikörper zeigte keine Aggregation. Hierbei handelt es sich um den von der Schering AG hergestellten und auch dort biotinylierten Antikörper, der wahrscheinlich einen wesentlich geringeren Biotinylierungsgrad aufwies.

Bei den Kontrollproben wurde die Sonde vorher mit freiem Biotin versetzt, so dass alle spezifischen Bindungsstellen abgesättigt wurden. Es konnte keine Veränderung der Relaxationszeit beobachtet werden, wodurch die Spezifität der Bindung gezeigt werden konnte.

Als Ergebnis dieser Untersuchung wurden die Konjugate in einem größeren Maßstab wie folgt hergestellt: Es wurden jeweils 100 µg der oben genannten Antikörper mit BSA-Puffer auf jeweils 4 ml verdünnt und 500 µl der Streptavidin-EO-Sonde (verdünnt auf 2 ml) in 100 µl Schritten tropfenweise zu der Antikörper-Lösung gegeben. Nach 1-2 h Inkubation bei 4°C wurden 100 µl D-Biotin hinzugefügt, um die Reaktion zu beenden, d.h. die Biotin-Bindungsstellen zu sättigen und die Biotin-Streptavidin-Bindung zu stabilisieren [91].

Reinigung der Antikörper-EO-Sonde

Entsprechend wurde mit einem erheblichen Überschuss an Antikörpern gearbeitet, der nach einer bestimmten Inkubationszeit durch eine erneute magnetische Reinigung bei 60 mT entfernt wurde. Dies konnte nur mit großen Schwierigkeiten und unter dem Verlust großer Substanzmengen durchgeführt werden. Um die Verluste bei der magnetischen Reinigung gering zu halten, wurden die Reinigungsbedingungen jeweils empirisch ermittelt. Die Auswirkungen verschiedener Puffer mit verschiedenen pH-Werten, Ionenstärken sowie der Zusatz unterschiedlicher BSA-Konzentrationen zur Stabilisierung und Reduktion der unspezifischen Bindung an die Säulen wurde untersucht. Die Teilchenqualität wurde zunächst immer anhand der Partikelgröße und der Relaxationszeit beurteilt. Es wurde herausgefunden, dass die höchste Teilchenausbeute sowie eine gute Teilchenqualität durch die Reinigung der Antikörper-Sonden mit einem Puffer geringer Ionenkonzentration, einem hohen pH-Wert und ohne Proteinzusatz erreicht werden konnte. Zur Reinigung wurden daher ein 10 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 und pH 9,0 verwendet. Die hier verwendeten Proteine sind bei diesen pH-Werten negativ geladen, wodurch die unspezifische Adsorption des Proteins an das Säulenmaterial verringert werden sollte.

Charakterisierung der EO-Sonden

Die gereinigte Antikörper-EO-Sonde wurde bzgl. ihrer Teilchengröße und ihrer Relaxationszeit charakterisiert. Des Weiteren wurde der Eisengehalt der Proben bestimmt, um sie für MRX-Messungen in einer definierten Konzentration einsetzen zu können. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 42, 43 und 44 wiedergegeben.

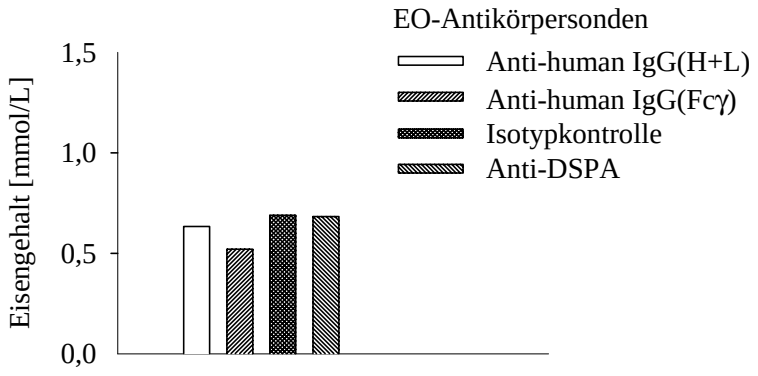
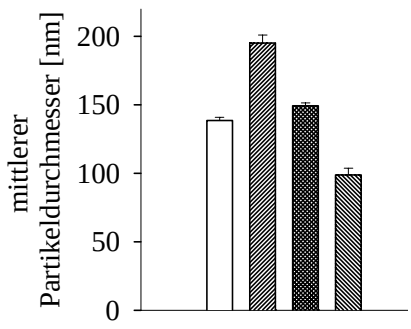


Abb. 42: Eisengehalt verschiedener Antikörper-EO-Sonden.

Der geringe Eisengehalt ist auf einen hohen Verlust der Partikel auf der magnetischen Säule zurückzuführen.



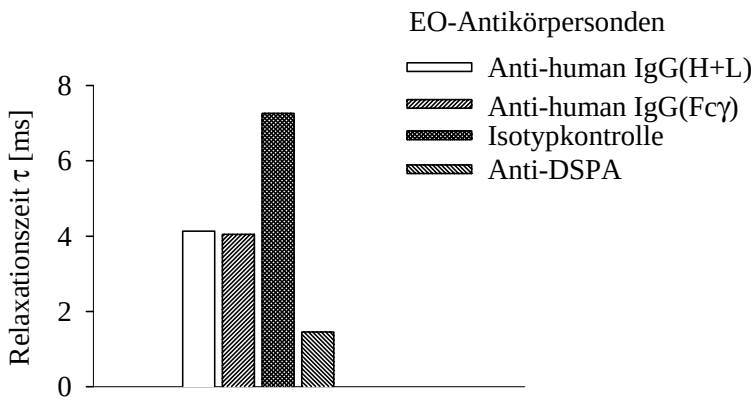


Abb. 43: Mittlerer Teilchendurchmesser (MW ± SD, n = 6) der Antikörper-EO-Sonden.

Abb. 44: Relaxationszeiten der Antikörper-EO-Sonden (einfach exponentielle Kurvenanpassung, Auswerteintervall: 420 µs - 100 ms).

Die unterschiedliche und starke Größenzunahme der verlängerten Sonden ist auf unterschiedlich starke Aggregationen bei der Herstellung und auf den Reinigungsschritt zurückzuführen. Die Brown-Relaxationszeiten der Sonden schwanken zwischen 1,5 und 7 ms. Relaxationszeiten von länger als ca. 5 ms deuten auf eine Aggregation der Sonde hin. Dieser Parameter ist insbesondere für Flüssigphasenassays wichtig und gibt Aufschluss über den hydrodynamischen Durchmesser der Sonde. Dass diese in dem hier gezeigten Fall nicht übereinstimmen, liegt an dem Zeitabstand von mehr als 3 Wochen zwischen der Messung der Teilchengröße mit der PCS und der MRX-Messung. Die Instabilität der Kontrollsonde war visuell allerdings nicht zu erkennen.

4.5 Diskussion

Wie in der Einleitung beschrieben, werden von zahlreichen Arbeitsgruppen spezifisch bindende MNP als spezifische Kontrastmittel für die MRT-Forschung hergestellt. Einige Kopplungsmethoden sollen kurz vorgestellt und in Hinblick auf die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren verglichen werden.

Die unspezifische Bindung ist die direkteste Methode zur Herstellung von Protein-Nanopartikel-Komplexen. Die magnetischen Nanopartikel werden mit einer Proteinlösung inkubiert und die Bindung der Proteine auf der Partikeloberfläche erfolgt durch Van der Waals Wechselwirkungen [16]. Bei der Inkubation im Ultraschallbad konnten Cerdan et al. [13] 1-2 Antikörpermoleküle an jeweils ein Partikel binden. Weissleder et al. [16] konnten auf diese Weise Antimyosin-markierte magnetische Nanopartikel herstellen.

Des Weiteren kann eine direkte Aktivierung der Oberfläche von Magnetnanopartikeln z.B. mit Hilfe der Periodat- oder Carbodiimid-Methode mit einem geringen Zeit- und

Materialaufwand durchgeführt werden. Voraussetzung ist das Vorkommen oxidierbarer Polymere oder aktivierbarer Carboxylgruppen auf dem Oberflächenmaterial. Shen et al. [63] konnten mit der Periodat-Methode durchschnittlich zwei Streptavidin-Moleküle pro Nanopartikel koppeln. Remsen et al. [92] verwendeten diese Methode um Antikörper direkt zu koppeln. Es konnten durchschnittlich 12 Antikörper-Moleküle pro Nanopartikel gebunden werden.

Häufig werden auch reaktive Gruppen in das Hüllmaterial eingeführt, die dann mit den funktionalen Molekülen kovalente Bindungen eingehen. Josephson et al. [93] beschreiben die Einführung des heterobifunktionellen Reagenzes N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP) zur Aktivierung von Aminofunktionen der Magnetitoberfläche. Das Kernpeptid des human immunodeficiency virus 1 (HIV 1) konnte so an die Oberfläche der magnetischen Nanopartikel gekoppelt werden. Dekker [94] beschreibt eine Dreischrittmethode zur Bindung des Enzyms Lactase an die Oberfläche von magnetischen Nanopartikeln. Die Oberfläche der Magnetite wurde mit Polyethylenimin belegt, mit Hilfe von Glutaraldehyd quervernetzt und anschließend über die Aldehydgruppen kovalent mit den Aminofunktionen des Enzyms gebunden.

Weitere heterobifunktionelle Quervernetzer, die ohne aufwendige chemische Syntheseschritte verschiedene Moleküle oder Targets miteinander verbinden können, stellen z.B. Antikörper dar. Es handelt sich nicht um kovalente, aber dennoch hochspezifische und hochaffine Bindungen. Cao et al. [95] beschreiben die Verwendung von bispezifischen Antikörpern. Bispezifische Antikörper weisen zwei unterschiedliche antigenbindende Stellen auf, wodurch sie zur Vernetzung von Tumorzellen mit der gewünschten Markierung, die an der zweiten Bindungsstelle des Antikörpers gebunden vorliegt, eingesetzt werden können. Die Markierung kann der Diagnostik oder der Therapie dienen, z.B. durch die Verwendung von radioaktiven Markern, von Chemotherapeutika oder Enzymen, die dann Prodrugs am Ort der Bindung in das Therapeutikum umwandeln können.

Weit verbreitet ist ferner das Biotin-Avidin-System, das in diesem Kapitel genauer beschrieben wurde [78]. 1968 beschreibt Green bereits die Verwendung von [^{14}C]Biotin für Untersuchungen der Kinetik der Avidin-Biotin-Reaktion und für Immunoassays [79]. Shen et al. [63] konnten z.B. an Streptavidin-Partikel je zwei Moleküle biotinylierten Sekretins binden und deren spezifische Bindungsfähigkeit in einem kompetitiven Pancreas-Acinar-Zell-Assay beweisen.

Die Oberflächenmodifikationen der MNP wurde in dieser Arbeit sowohl kovalent mit der Periodat-Methode, wie auch über das Biotin-Avidin-System vorgenommen. Bei den Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikeln wurde die Carbodiimid-Methode zur direkten Kopplung von Antikörpern eingesetzt. Die Kopplungsprodukte erwiesen sich jedoch als nicht stabil. Es konnten mittels der Periodat-Methode Cobaltferrit-Antikörper-Konjugate hergestellt werden, wobei nicht geklärt werden konnte, ob vielleicht allein die unspezifische Bindung der Proteine an die Partikeloberfläche beobachtet wurde. Sie zeigten außerdem eine den Oleoylsarcosinpartikeln entsprechende mangelhafte Stabilität und Bindungsfähigkeit.
An die Cobaltferrit- und Dextran-Eisenoxidpartikel wurden des Weiteren verschiedene Antikörper über das Biotin-Avidin-System gekoppelt. Die Probenpräparation konnte so erheblich vereinfacht werden. Die Streptavidin-MNP-Komplexe konnten als Grundbaustein eingesetzt werden, um verschiedenste Antikörper gekoppelte CF- und EO-Sonden herzustellen, da unzählige biotinylierte Antikörper auf dem Markt zu erhalten sind. Die Kopplungsprotokolle wurden empirisch optimiert. Es zeigte sich, dass nur die Streptavidin-EO-Partikel bindungsfähig waren und das Einhalten des empirisch ermittelten Protokolls zu dem gewünschten Produkt führte, hingegen die leichten Variationen des Protokolls schnell zu Instabilitäten der Sonden führten.

4.6 Zusammenfassung

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene spezifisch bindende magnetische Sonden hergestellt. Die Stärke-Cobaltferritpartikel konnten mit Hilfe der Periodat-Methode erfolgreich mit humanem IgG, einem Anti-hCD4-Antikörper und BSA gekoppelt werden. Des Weiteren war eine Biotinylierung der BSA-CF-Partikel möglich. Die Kopplungsausbeute lag bei der kovalenten Kopplung des humanen IgGs bei 0,7-1,6 µg Antikörper/µg Metall und bei 0,7–1,9 µg Antikörper/µg Metall. Bei der Kopplung des Anti-hCD4-Antikörpers konnten insgesamt 0,03-0,04 µg Antikörper/µg Metall nach der Periodat-Oxidation der Partikel und 0,03-0,09 µg Antikörper/µg Metall durch die unspezifische Adsorption der Antikörper an die Partikeloberfläche gebunden werden. Zusätzlich war insgesamt eine starke Adsorptionsneigung der Proteine an die Partikel und das Säulenmaterial festzustellen.
Die Dextran-Eisenoxidpartikel wurden mit Biotin mit Streptavidin und über das Biotin-Avidin-System mit verschiedenen biotinylierten Antikörpern gekoppelt. Eine reproduzierbare Kopplung von Streptavidin an die Partikel konnte etabliert werden. Die Streptavidin-Sonden zeigten im Durchschnitt eine mittlere Teilchengröße von 78 nm und einen Eisengehalt von 5-6 mmol/L. Die Bestimmung des Kopplungsausmaßes ergab

0,3–0,4 µg Streptavidin/µg Eisen. Es konnte keine unspezifische Adsorption des Proteins an die Partikel festgestellt werden. Die Stabilität der Sonde wurde durch Zellmedien und Rinderplasma beeinträchtigt. In allen weiteren relevanten Medien sowie im Blut waren die Partikel stabil.

Zur Herstellung der Antikörper-Eisenoxid-Sonde wurde das Verhältnis der Antikörperkonzentration zur Konzentration der Streptavidin-Sonde austitriert. Es konnte festgestellt werden, dass alle untersuchten Antikörper in hohen Konzentrationen eingesetzt werden mussten, um starke Agglomerationen der Partikel zu verhindern. Die Teilchengrößen schwankten zwischen 100-200 nm und der Eisengehalt lag im Allgemeinen unterhalb von 0,6 mmol/L. Es wurde ermittelt, dass für die Reinigung der Antikörper-Sonden eine geringe Ionenkonzentration sowie ein pH-Wert oberhalb von pH 7,4 vorteilhaft sind.

Aufgrund der mangelhaften Stabilität und Bindungsfähigkeit der Cobaltferrit-Konjugate wurden für die Bindungsassays die hier vorgestellten Streptavidin- und Antikörper-Eisenoxid-Sonden verwendet.

5 Bindungsfähigkeit magnetischer Sonden

Zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit der hergestellten Streptavidin-, Biotin- und Antikörper-Nanopartikel-Konjugate wurden zunächst Aggregationsassays entwickelt, die in homogener Phase mit der Magnetrelaxometrie und der PCS durchgeführt wurden. Die Untersuchung der spezifischen Bindung an eine feste Phase erfolgte mit Hilfe der etablierten Methode: Surface Plasmon Resonance Spektroskopy (SPR).

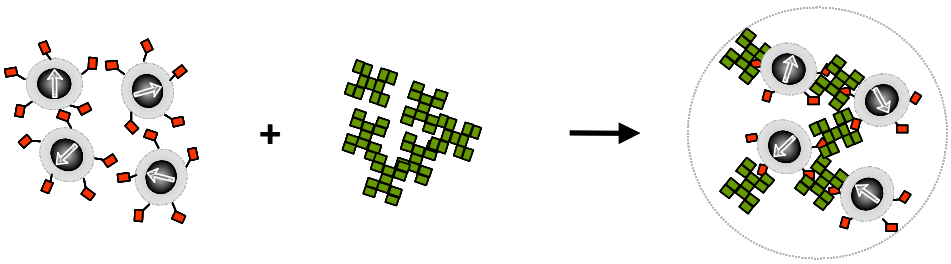
Um die Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie für Reaktionen in Vollblut zu überprüfen, wurden des Weiteren Aggregationsassays auch in Vollblut durchgeführt und die Bindungsreaktion magnetrelaxometrisch verfolgt.

5.1 Aggregationsassays

Die Biotin- und Streptavidin-Sonden wurden in flüssiger Phase mit unterschiedlichen Mengen des entsprechenden Bindungspartners versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde magnetrelaxometrisch und wenn möglich als Vergleich auch mit der Photonenkorrelations-spektroskopie verfolgt. Die Reaktionspartner sind im Abschnitt 10.15 genauer beschrieben.

5.1.1 Aggregationsassays mit Biotin-Sonden

Zur Kontrolle der Bindungsfähigkeit der biotinylierten Sonden wurden zuerst Aggregationsassays mit Avidin bzw. Neutravidin in flüssiger Phase (in Puffer und Vollblut) durchgeführt. Durch die vier Bindungsstellen des Avidins für Biotin sollte die Avidinzugabe zu Quervernetzungen der mehrfach biotinylierten Sonde führen. Der Reaktionsverlauf der Bindung wurde beobachtet. Um die Spezifität der Bindung zu beweisen, wurde als Kontrolle entweder das Avidin im Vorfeld mit freiem Biotin gesättigt oder freies Biotin im Sinne einer Konkurrenzreaktion zu der biotinylierten Sonde gegeben. In Abbildung 45 ist die Reaktion schematisch wiedergegeben.



Biotin-MNP „Avidin“ MNP-Protein-Aggregat

Abb. 45: Reaktion der biotinylierten-MNP mit "Avidin" (Avidin, Strept-, Neutr-, Extravidin).

Bindungsreaktion der biotinylierten Cobaltferritpartikel

Die Bindungsfähigkeit der biotinylierten Cobaltferritpartikel wird am Beispiel der Biotin-CF-III-Partikel (s. Abschn. 4.2) dargestellt. Die biotinylierte CF-Sonde (CF-BSA-Biotin) sowie die Kontrollsonde (CF-BSA) wurden mit Avidin versetzt und die Bindungsreaktion beobachtet. Die Bindungsreaktion wurde für die magnetrelaxometrische Messung in antikoaguliertem Vollblut (Citrat) durchgeführt. Die Sonden wurden über einen Zeitraum von 5,5 h mit Avidin versetzt. Abbildung 46 zeigt die Veränderung der Relaxationsamplitude als Funktion der Avidinzugabe.

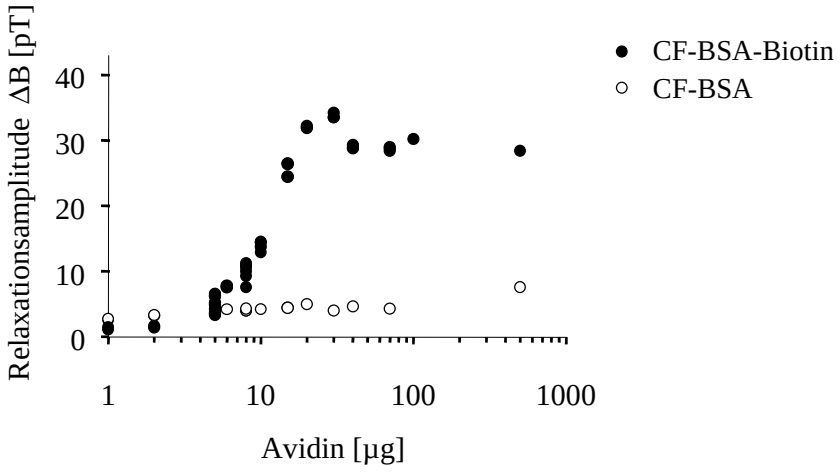


Abb. 46: MRX-Aggregationsassay: Relaxationsamplitude (Zeitbereich 10-500 ms) der biotinylierten CF-BSA-Biotin- und CF-BSA-Sonde (je 100 µl) nach der Zugabe von Avidin (500 µg) in 100 µl antikoaguliertem Vollblut.

Die gleiche Reaktion wurde mit der PCS in BSA-Puffer (0,1 % BSA/PBS) durchgeführt, da PCS-Messungen in Vollblut wegen der partikulären Blutbestandteile und der starken Lichtabsorption des Blutes nicht möglich sind. Die Sonden wurden entsprechend mit Avidin versetzt und die Änderung der Teilchengröße über einen Zeitraum von 1,5 Stunden beobachtet (s. Abb. 47).

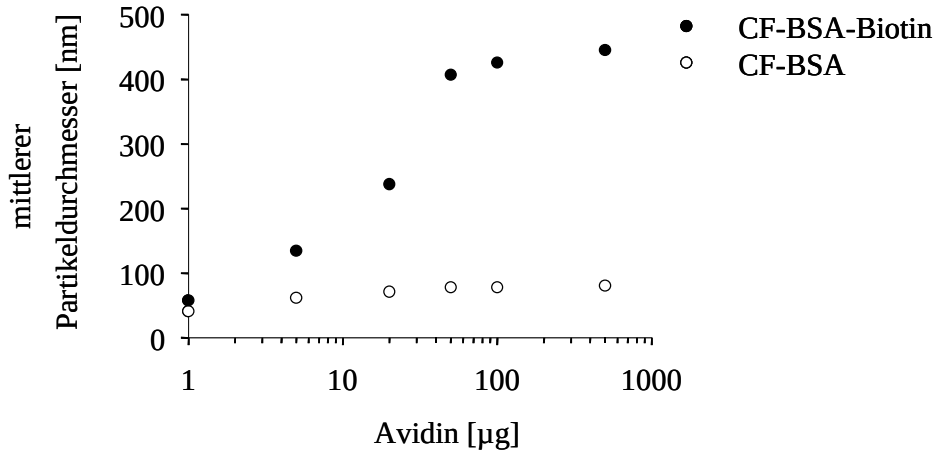


Abb. 47: PCS-Aggregationsassay: Mittlerer Partikeldurchmesser der biotinylierten CF-BSA-Biotin- und CF-BSA-Sonde (200 µl) nach der Zugabe von Avidin (500 µg) in BSA-Puffer (900 µl).

Bindungsreaktion der biotinylierten Eisenoxidpartikeln

Die gleiche Aggregationsreaktion wurde auch mit der biotinylierten EO-Sonde in BSA-Puffer durchgeführt. In den Abbildungen 48 und 49 sind die Veränderungen der Relaxationsamplitude und –zeit der Bindungsreaktion nach der Zugabe von Neutravidin dargestellt. In diesem Fall wurde zur Kontrolle der Bindungsspezifität mit freiem Biotin gesättigtes Neutravidin eingesetzt.

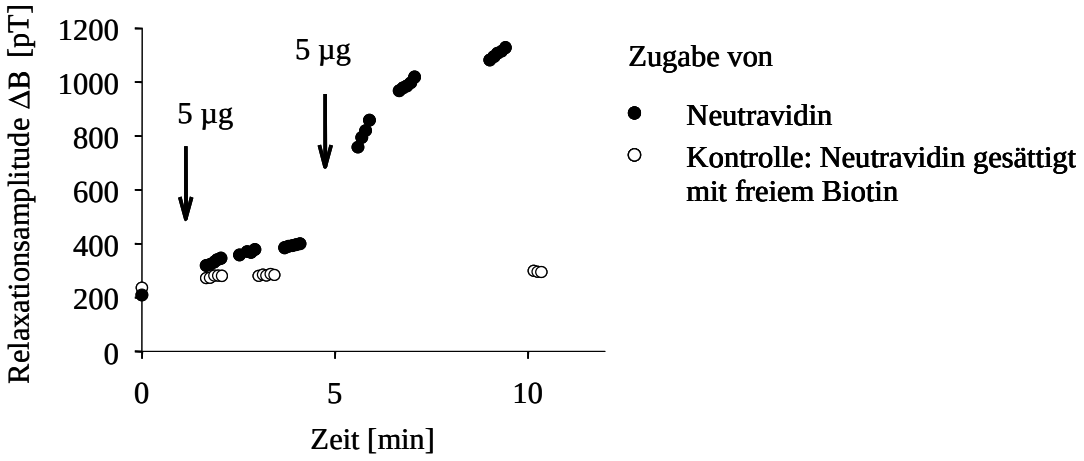


Abb. 48: MRX-Aggregationsassay: Relaxationsamplitude der biotinylierten EO-Sonde (100 nmol) vor und nach der Zugabe von Neutravidin in BSA-Puffer, ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung (Auswerteintervall: 600 µs – 100 ms).

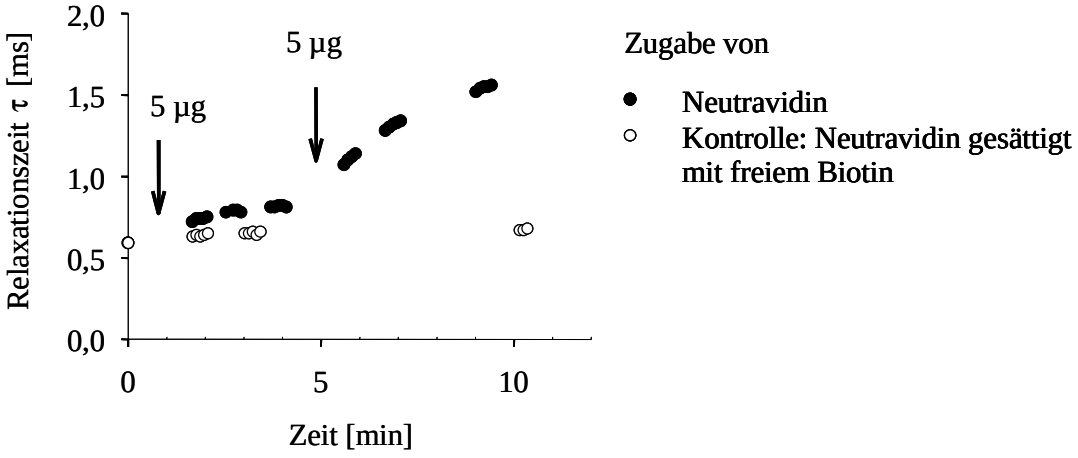


Abb. 49: MRX-Aggregationsassay: Relaxationszeit der biotinylierten EO-Sonde (100 nmol) vor und nach der Zugabe von Neutravidin in BSA-Puffer, ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung (Auswerteintervall: 600 µs – 100 ms).

Die biotinylierten CF- und EO-Sonden zeigen beide eine affine und spezifische Bindungsfähigkeit im Vergleich zu den Kontrollen. Daher konnte sowohl bewiesen werden, dass bindungsfähige Sonden hergestellt wurden und mit der Magnetrelaxometrie Bindungsreaktionen in Vollblut untersucht werden können. Durch die Zugabe des quervernetzenden Proteins kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Relaxationszeit, die

mit der Zunahme der Partikelgröße einhergeht. Auch die Relaxationsamplitude steigt durch die Aggregation der Partikel deutlich an. Es besteht eine eindeutige Abhängigkeit des Aggregationsausmaßes von der zugesetzten Menge an quervernetzendem Protein.

5.1.2 Aggregationsassays mit Streptavidin-Sonden

Die Bindungsfähigkeit der Neutravidin- und Streptavidin-CF- sowie der Streptavidin-EO-Partikel wurde entsprechend mit mehrfach biotinyliertem BSA (BSA-Biotin) durchgeführt. Durch die vier Bindungsstellen des Streptavidins für Biotin sollte (auch hier) die Zugabe eines mehrfach biotinylierten Proteins zu einer Quervernetzung der Sonde führen. Die Abbildung 50 verdeutlicht wiederum den Aggregationsassay schematisch.

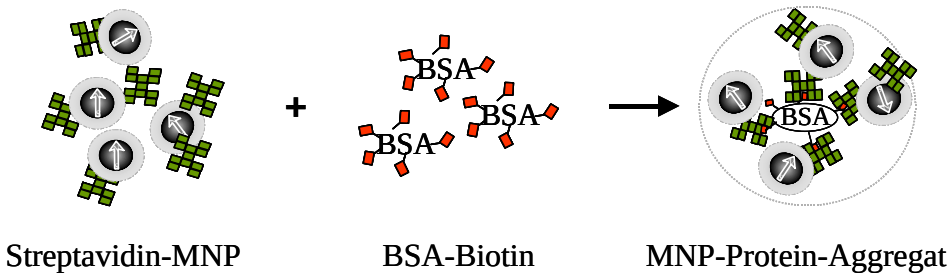


Abb. 50: Reaktion der Streptavidin-MNP mit BSA-Biotin.

Bindungsreaktion der mit Avidin gekoppelten Cobaltferritpartikeln

Bei der Untersuchung der Bindungsfähigkeit einer Vielzahl von Cobaltferrit-Avidin-Sonden konnte keine Aggregation, bzw. keine Erhöhung der Relaxationszeiten nach der Zugabe von BSA-Biotin beobachtet werden. Daher wurde angenommen, dass keine Reaktion zwischen den Reaktionspartnern stattgefunden hat. Wie in Abschnitt 4 dargestellt, wurden daraufhin keine weiteren Kopplungen mit den Cobaltferritpartikeln vorgenommen, sondern der Schwerpunkt auf die Herstellung der Eisenoxidsonden gelegt.

Bindungsreaktion der mit Streptavidin gekoppelten Eisenoxidpartikeln

Die Bindungsfähigkeit der Streptavidin-EO-Partikel wurde für jede Charge mit mehrfach biotinyliertem BSA in BSA-Puffer untersucht und vor der Verwendung als Sonde stets erneut überprüft. Da die Sonde später auch bei *Ex vivo*-Versuchen mit Vollblut und *In vivo*-Untersuchungen eingesetzt werden sollte, wurde ihre Funktionsfähigkeit auch in Vollblut überprüft. Des Weiteren wurden Messungen mit biotinylierten Latexbeads, die eine feste Phase simulieren sollten, durchgeführt.

Abhängigkeit der Bindungsreaktion von der zugesetzten Proteinmenge

Die Abhängigkeit der Reaktion von der zugesetzten Menge an Protein wurde durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen des quervernetzenden Proteins zur Sonde untersucht. Die Reaktionsintensität und -geschwindigkeit wurden beobachtet. Als Kontrolle wurde die Sonde mit einem 1000fachen Überschuss an freiem Biotin (1 µg) im Vergleich zu dem biotinylierten Protein (bezogen auf den Biotinylierungsgrad) versetzt. Die Bindungsstellen des Streptavidins sollten dadurch nahezu vollständig besetzt und eine spezifische Reaktion mit dem BSA-Biotin blockiert werden. 46 nmol Streptavidin-EO-Sonde wurden für die magnetrelaxometrischen Messungen mit 0,2 ng, 2 ng und 20 ng BSA-Biotin versetzt. Die Kontrollproben wurden mit der jeweils höchsten Menge BSA-Biotin versetzt. Dargestellt sind die Relaxationszeiten (Abb. 51) und -amplituden (Abb. 52) der Proben.

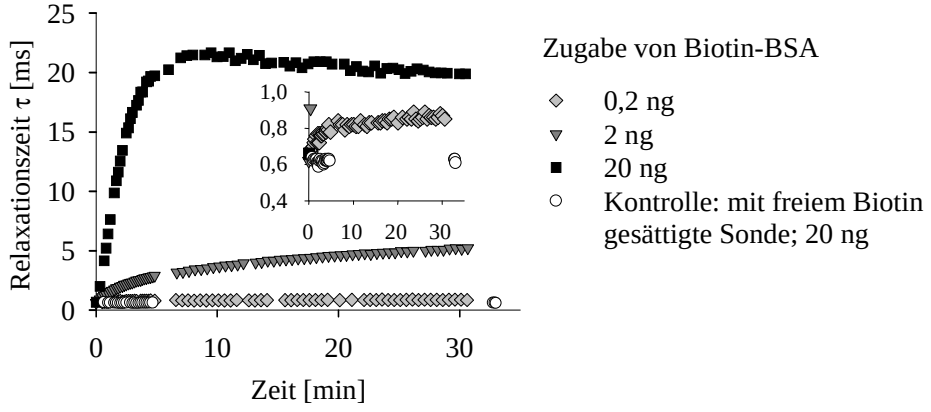


Abb. 51: MRX-Aggregationsassay: Relaxationszeit der Streptavidin-EO-Sonde nach Zugabe von mehrfach biotinyliertem BSA in BSA-Puffer, ermittelt aus einer einfach exponentiellen Kurvenanpassung (Auswerteintervall: 420 µs–100 ms). Der Ausschnitt zeigt eine vergrößerte Darstellung des Reaktionsverlaufs für die Zugabe von 0,2 ng Biotin-BSA.

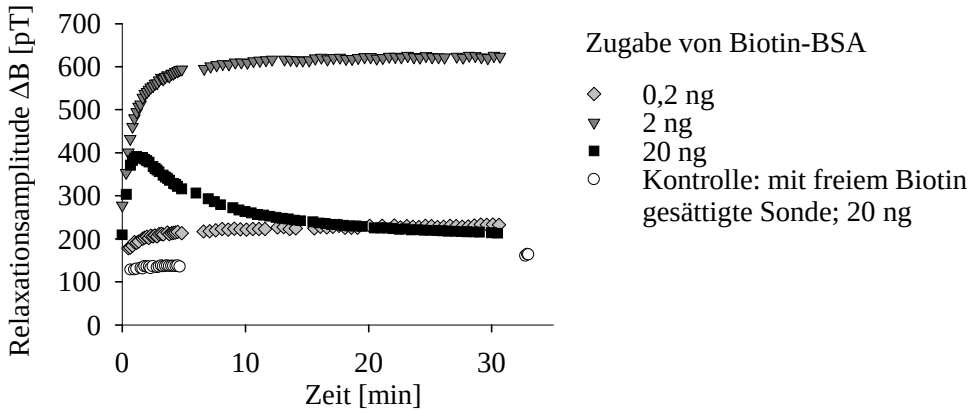


Abb. 52: MRX-Aggregationsassay: Relaxationsamplitude der Streptavidin-EO-Sonde nach Zugabe von mehrfach biotinyliertem BSA in BSA-Puffer, ermittelt aus einer einfach exponentiellen Kurvenanpassung (Auswerteintervall: 420 µs–100 ms).

Die PCS-Messungen wurden stets mit dem 10fachen Volumen durchgeführt, so dass hier 460 nmol Sonde mit 2 ng, 20 ng und 200 ng BSA-Biotin versetzt wurden. Die Kontrollproben wurden entsprechend mit der jeweils höchsten Menge BSA-Biotin versetzt. In Abbildung 53 sind die mittleren Teilchendurchmesser wiedergegeben.

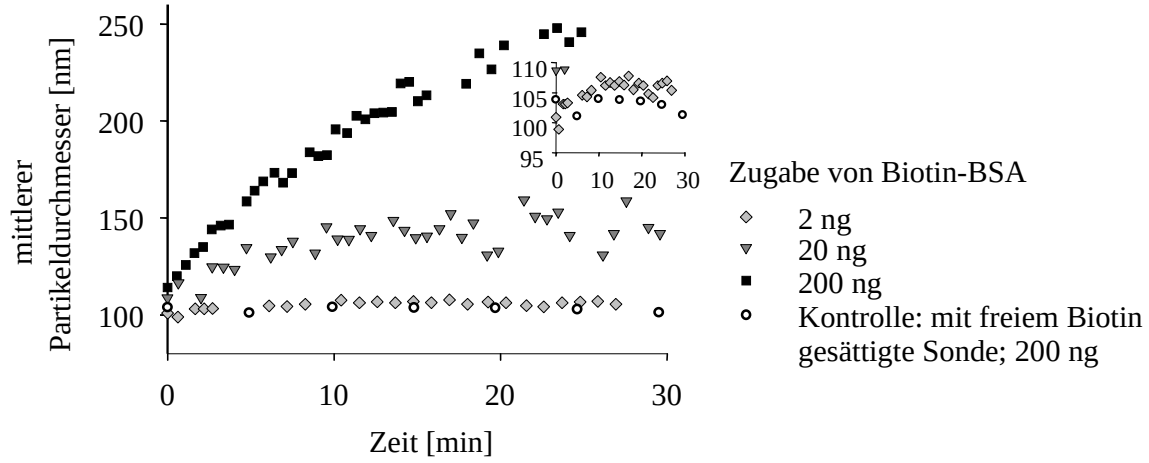


Abb. 53: PCS-Aggregationsassay: Mittlerer Partikeldurchmesser der Streptavidin-EO-Sonde nach Zugabe von mehrfach biotinyliertem BSA in BSA-Puffer (Einzelmessungen). Der Ausschnitt zeigt eine vergrößerte Darstellung des Verlaufs für die Zugabe von 2 ng BSA-Biotin.

Auch bei diesen Aggregationsassays konnte eine spezifische Aggregation der Sonde beobachtet werden. Die Stärke und Geschwindigkeit der Reaktion war auch hier von der zugesetzten Menge Protein abhängig. Die Beobachtungen konnten mit PCS-Messungen bestätigt und die Spezifität der Reaktion durch das Blockieren der spezifischen Bindungsstellen des Streptavidins mit freiem Biotin nachgewiesen werden.

Bindungsfähigkeit in Vollblut

Um die Bindungsfähigkeit der Streptavidin-EO-Partikel in Vollblut zu untersuchen und gleichzeitig die Auswirkung des Reaktionsmediums auf die Reaktionsgeschwindigkeit und das -ausmaß zu bestimmen, wurde eine im Konzentrationsverhältnis identische Aggregationsreaktion in Vollblut und in BSA-Puffer durchgeführt.

Die Streptavidin-EO-Partikel wurden in BSA-Puffer und Vollblut vorgelegt und drei Proben gleicher BSA-Biotin-Konzentrationen hinzugefügt. Das mit Citrat versetzte Vollblut wurde wegen seiner hohen Viskosität 1:1 mit PBS verdünnt verwendet. Die Abbildungen 54 zeigen die Veränderungen der Relaxationszeitkonstante in BSA-Puffer und in verdünntem Blut über einen Zeitraum von 3 h.

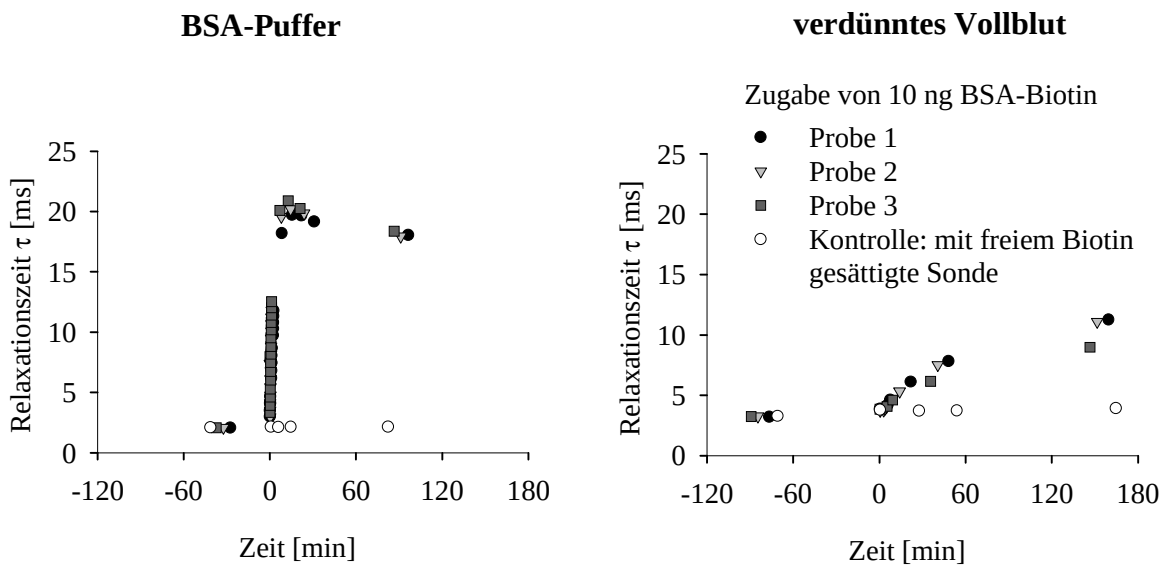


Abb. 54: MRX-Aggregationsassay: Relaxationszeit der Streptavidin-EO-Sonde (25 nmol) nach der Zugabe von mehrfach biotinyliertem BSA in BSA-Puffer und Vollblut, ermittelt aus einer einfach exponentiellen Kurvenanpassung (Auswerteintervall: 420 µs – 100 ms).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Reaktion in Vollblut im Vergleich zum BSA-Puffer als Reaktionsmedium langsamer verläuft und zu einer geringeren Aggregation führt. Die verringerte Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich wahrscheinlich auf die erhöhte Viskosität des Blutes im Vergleich zum Puffer zurückführen, die bereits an der etwas höheren Relaxationszeit vor Proteinzugabe zu erkennen ist. Das reduzierte Ausmaß der Reaktion ist dagegen womöglich auf die Biotinkonzentration im Blut (s. Abschn. 10.15) zurückzuführen, wodurch einige Bindungsstellen des Streptavidins bereits mit Biotin besetzt sein sollten und somit eine starke Quervernetzung verhindert wird.

Reaktion mit den biotinylierten Latexbeads

Des Weiteren wurden Bindungsreaktionen mit den biotinylierten Latexbeads durchgeführt. Sie sollten einerseits die Reaktion der Sonde mit Partikeln einer definierten Größe zeigen und andererseits eine feste Phase im Sinne beispielsweise einer Zelle simulieren. Die Inkubation der Streptavidin-EO-Sonde mit den genannten biotinylierten Latexbeads (1 µm, 0,2 µm, 0,04 µm) führte jedoch zu keiner erkennbaren Reaktion. Die Annahme, dass eine Reaktion zu beobachten sein sollte, hatte sich durch Versuche mit der in Abschnitt 8 vorgestellten magnetooptischen Relaxationsmethode erhärtet, da hier Veränderungen des Relaxationsverhaltens der Streptavidin-Sonde durch eine Bindung an die Latexbeads zu beobachten waren. Wie diese Beobachtung zu interpretieren ist, wird bei der Diskussion der Zellversuche (Abschn. 9) erörtert.

5.2 Surface Plasmon Resonance Spektroskopy

Zur Überprüfung der spezifischen Bindungsfähigkeit der Streptavidin- und Antikörper-EO-Partikel an eine feste Phase wurden Versuche mit der Surface Plasmon Resonance Spektroskopy (SPR; Oberflächen Plasmonen Resonanzspektroskopie) durchgeführt. Eine Liste der verwendeten Antigene humanes IgG und Maus-IgG befindet sich in Abschnitt 10.15.

Die SPR ist eine optische Methode zur Beobachtung von makromolekularen Interaktionen in Echtzeit. Sie kann zur Bestimmung der Bindungsspezifität, der Kinetik und der Affinität von Analyten zu ihren Liganden verwendet werden. Die Interaktion der Liganden mit ihren Analyten findet unter ständigem Flüssigkeitsfluss statt, wobei eine Komponente an eine feste Phase gebunden vorliegt. Die andere Komponente bindet während sie im Flüssigkeitsstrom vorbeifließt. Die Methode ist in Abschnitt 10.10 genauer beschrieben. Der verwendete Sensorchip ist ein mit Carboxymethyldextran modifizierter CM5 Chip. Das Verfahren arbeitet ohne Markierung, da die Detektion der Bindung auf einer Chipoberfläche unabhängig von der Natur der gebundenen Komponenten ist. Die Konzentration der gebundenen Liganden und Analyte wird anhand einer Massenzunahme bestimmt.

5.2.1 Bindung der Antikörper- und Streptavidin-Eisenoxid-Sonden

Das nachzuweisende Antigen, humanes IgG, und das Kontrollantigen, Maus Immunglobulin G (mIgG), wurden bei pH 5,0 und 6,0 kovalent an je zwei Spuren (jeder Chip hat 4 Spuren) der Oberfläche des Chips gekoppelt. Die geeigneten Kopplungsbedingungen wurden vorher durch die Bestimmung der passiven Adsorption der Proteine an die Chipoberfläche bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Die anschließende Kopplung der Proteine fand über die mit einer EDC/NHS-Ester-Mischung aktivierten Carboxylgruppen statt. Zur Deaktivierung verbliebener reaktiver Ester wurde eine 1 M Ethanolaminhydrochlorid-Lösung (pH 8,5) verwendet. Die Kopplung der Antigene führte zu einer Massenzunahme von 275 RU (= 275 pg).

Zuerst wurde die Bindungsfähigkeit der für die Sondenherstellung verwendeten biotinylierten Antikörper (Maus Anti-human-IgG und Maus IgG) mit Hilfe des humanen-IgG-Chips überprüft und anschließend die spezifische Bindungsfähigkeit der Streptavidin-EO-Sonde an den biotinylierten Anti-human-IgG-Antikörper überprüft. Mit dem gleichen Chip wurde des Weiteren die spezifische Bindungsfähigkeit der Anti-human-IgG-EO-

Sonde im Vergleich zur Kontrollsonde untersucht. Die spezifische Bindung des biotinylierten Antikörpers, Anti-human-IgG, an seinen Liganden, humanes IgG, wurde zuerst direkt ohne magnetische Nanopartikel bestimmt und ist in Abbildung 55 dargestellt. Die Kurven zeigen die spezifische Bindung an humanes IgG abzüglich der unspezifischen Bindung an das Kontrollantigen.

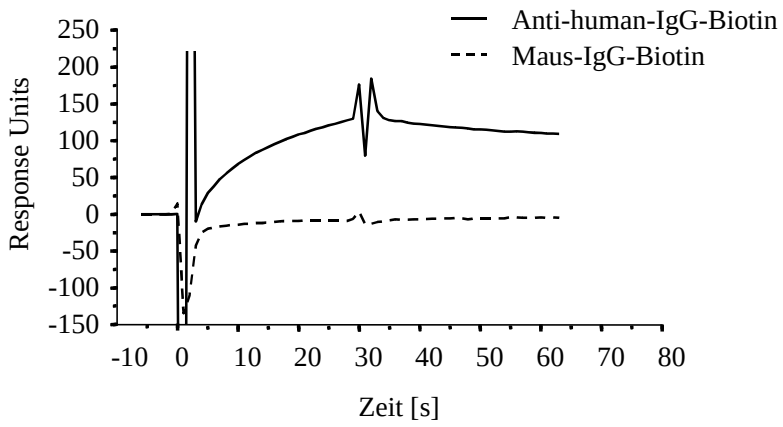


Abb. 55: Bindung des spezifischen Antikörpers Anti-human-IgG-Biotin im Vergleich zur Isotypkontrolle Maus-IgG-Biotin.

Die Veränderungen des Resonanzsignals zu Beginn und zum Ende des Proteinpulses liegen an den unterschiedlichen Refraktionsindices der Proben- und Waschpuffer. Die spezifische Bindung des Anti-human-IgG-Antikörpers konnte durch die Zunahme um 125 RUs detektiert werden.

Die mit den Antigenen hIgG und mIgG gekoppelte und um die eben genannten biotinylierten Antikörper verlängerte Chipoberfläche wurde im nächsten Schritt mit der Streptavidin-Sonde inkubiert. 1 nmol/10 µl Sonde wurde über 30 s auf den Chip gegeben. In Abbildung 56 ist der Reaktionsverlauf dargestellt.

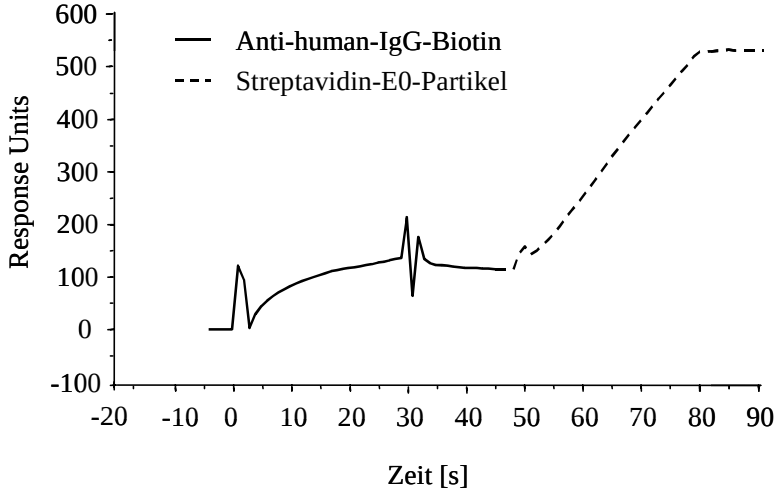


Abb. 56: Bindung des spezifischen Antikörpers (Anti-human-IgG-Biotin) und der Streptavidin-EO-Sonde.

Die spezifische Bindungsfähigkeit der Streptavidin-Sonde zeigte sich in der Zunahme der Masse um 425 Response Units.

Die spezifische Bindungsfähigkeit der hergestellten Antikörper-Sonde (Maus Anti-human-IgG-EO-Partikel) im Vergleich zur Kontrollsonde ist in Abbildung 57 dargestellt. Zwei Chargen der Kontrollsonde (Injektion 1 und 2) und eine spezifische Sonde, die dreimal hintereinander injiziert wurde, wurden untersucht. Alle drei Sonden wurden in einer Konzentration von 1 ng/10 µl inkubiert

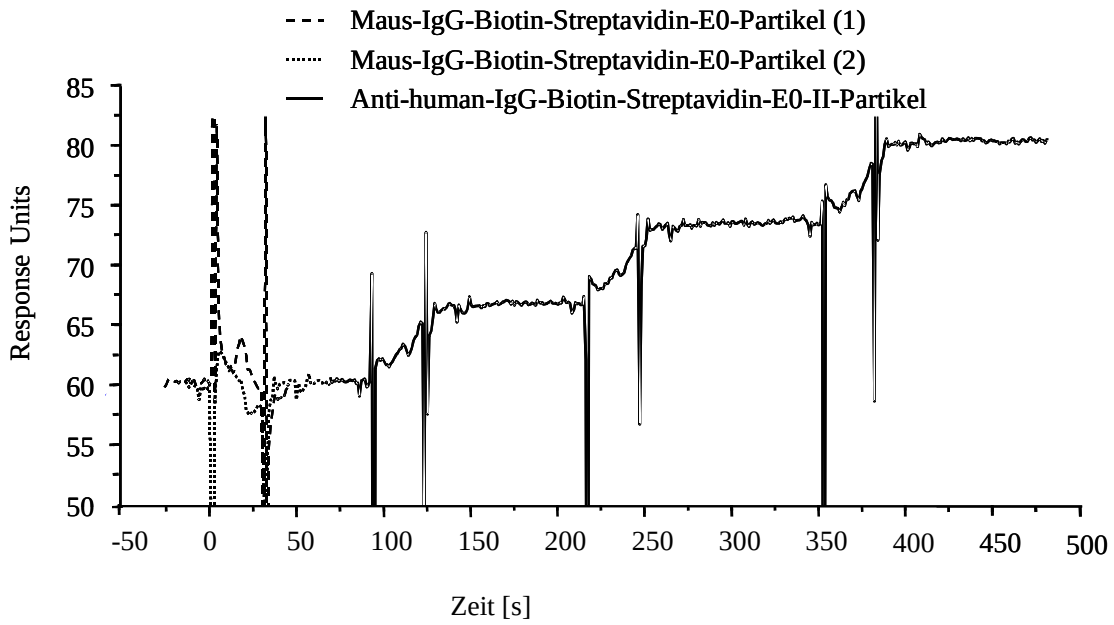


Abb. 57: Bindung der Kontrollsonde: Maus-IgG-EO-Partikel und der spezifisch bindenden Sonde: Anti-human-IgG-EO-Partikel.

Die unspezifische Bindung der Kontrollsonde ist deutlich direkt nach ihrer Zugabe und durch die anschließende Dissoziation beim Spülvorgang zu erkennen. Die Kurven wurden übereinandergelegt. Bei der Bindung der Anti-human-IgG-Sonde handelt es sich dagegen um eine spezifische Bindung, die nicht durch Spülen wieder dissoziiert. Durch die Inkubation von jeweils 1 nmol Sonde ließ sich eine Massenzunahme von ca. 15 RU detektieren.

Die spezifische Bindungsfähigkeit der Cobaltferrit-Sonden wurde mit der SPR Spektroskopie nicht untersucht, da diese Partikel zu diesem Zeitpunkt nicht mehr verwendet wurden.

5.3 Diskussion

Die Aggregationsassays wurden einerseits verwendet, um die spezifische Bindungsfähigkeit der hergestellten Sonden zu bestimmen, konnten andererseits aber gleichzeitig

zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit der neuen Methode herangezogen werden. Bei den Assays konnte eine deutliche Abhängigkeit der Relaxationszeit von dem Ausmaß der Bindungsreaktionen beobachtet werden. So führte die Zugabe von 0,2 ng BSA-Biotin zu der Streptavidin-EO-Sonde (s. Abb. 51) zu einem leichten Anstieg der Zeitkonstante von 0,6 ms auf 0,9 ms. Die Zugabe von höheren Mengen des quervernetzenden Proteins führten zu einem wesentlich schnelleren und ausgeprägteren Anstieg der Zeitkonstante von bis zu 23 ms bei 20 ng BSA-Biotin. Der Anstieg der Brown-Relaxationszeit, also Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit beruhte eindeutig auf der Aggregation der Sonde, die sich bei der 20 ng Probe durch das Auftreten eines Néel-Relaxationssignals manifestierte. Die zunächst homogene Probe zeigte nach der Reaktion mit der höchsten BSA-Biotin Menge eine Sedimentation, wodurch die gleichzeitig abnehmende Relaxationsamplitude (s. Abb. 52) zu erklären ist. Insgesamt konnte die Bindungsfähigkeit der Sonde magnetrelaxometrisch und mit der PCS nachgewiesen werden. Diese stabile und bindungsfähige Sonde wurde für spezifische Bindungsreaktionen in flüssiger und fester Phase in der Magnetrelaxometrie und zur Herstellung der Antikörper-Sonden verwendet.

Die Bestimmung der spezifischen Bindung der Antikörper und Sonden war mit der SPR möglich. Die Schnelligkeit der Messungen und das geringe Probenvolumen von 20 µl stellen einen großen Vorteil gegenüber der PCS mit 1 ml Probenvolumen dar. Eine Umrechnung in die tatsächlich gebundene Menge Sonde wurde hier nicht vorgenommen, da die Annahme von Sternberg et al. [96], dass jedes gebundene Molekül in gleicher Weise zur Zunahme der Response Units führt, für die MNP nicht überprüft wurde. Das Ausmaß der Veränderung des Refraktionsindex durch die Bindung eines Magnetnanopartikels muss mit der Veränderung, die die Bindung eines Antikörpers verursacht, nicht identisch sein. Es wäre allerdings interessant, das Verhältnis des Resonanz-Signals zur tatsächlich gebundenen Menge Sonde, wie auch zum Bindungsverhalten der magnetischen Sonden bei verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten in einer weiterführenden Arbeit zu untersuchen. Die Methode wurde in dieser Arbeit jedoch ausschließlich für die Bestimmung der spezifischen Bindungsfähigkeit der hergestellten Sonden verwendet.

5.4 Zusammenfassung

Insgesamt konnte die spezifische Bindungsfähigkeit der verschiedenen biotinylierten Cobaltferrit- und Eisenoxid-Sonden durch Aggregationreaktionen mit Avidin bzw. Neutravidin und die der Streptavidin-EO-Sonden durch Aggregationreaktionen mit BSA-Biotin eindeutig bewiesen werden. Eine Reaktion in Vollblut ist trotz des freien Biotins im

Blut möglich, wenn auch nicht so ausgeprägt. Die stabile und bindungsfähige Streptavidin-Sonde wurde im weiteren Verlauf der Arbeit für spezifische Bindungsreaktionen in flüssiger und fester Phase in der Magnetrelaxometrie und zur Herstellung der Antikörper-Sonden verwendet.
Die Reaktion der Streptavidin-EO-Sonde mit biotinylierten Latexbeads, die die Reaktion der Sonde mit Partikeln in einer definierten Größe zeigen sollte, führte dagegen zu keiner erkennbaren Reaktion. Die Aggregationsassays zeigten nicht nur die Bindungsfähigkeit der hergestellten Sonden, sondern auch die Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie sowohl für die Online-Beobachtung von Reaktionen im Sekundenbereich als auch die Abhängigkeit der Zeitkonstanten und der Amplitude von der Stärke der Reaktion. Bei der Durchführung von immunologisch relevanten Flüssigphasenassays (s. Abschn. 7) konnten die hier gewonnenen Informationen über die Abhängigkeit der Relaxationszeit und -amplitude von der Menge an zugesetztem Reaktionspartner angewendet werden.

Bei den mit der Surface Plasmon Resonance Spektroskopy durchgeführten Untersuchungen konnte die spezifische Bindungsfähigkeit des biotinylierten Anti-human-IgG Antikörpers im Vergleich zur Kontrolle bestätigt werden. Die Funktionsfähigkeit der Antikörper- und der Streptavidin-Sonden konnte demnach auch mittels der SPR bestätigt werden.

6 Festphasenassays

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie als ein neues diagnostisches Verfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Festphasenassays mit magnetischen Nanopartikeln als Signalgeber entwickelt. Es sollte gezeigt werden, dass mit dieser Methode magnetische Festphasenassays reproduzierbar durchgeführt werden können. Um auch die Sensitivität der MRX für mögliche *In vitro*-Anwendungen zu überprüfen, wurden die magnetischen Relaxationsimmunoassays (MARIAs) mit einem etablierten Verfahren, dem ELISA (Enzymimmunoassay), verglichen. In Hinblick auf die *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie war die Untersuchung zur spezifischen Detektion der gebundenen Sonde in Anwesenheit der ungebundenen Sonde von besonderem Interesse, da dies die Grundvoraussetzung für eine spezifische Detektion der gebundenen magnetischen Nanopartikel *in vivo* darstellt. Dafür wurden die magnetischen Festphasenassays ungewaschen vermessen, d.h. ohne den Anteil der ungebundenen, überschüssigen Sonde aus den Proben zu entfernen.

Antigene

Als Antigene wurden humanes IgG und DSPA verwendet. Tabelle 19 zeigt die für die beiden Antigene verwendeten Symbole. Das humane IgG wird in Abschnitt 10.15 beschrieben und die Eigenschaften des DSPA werden hier entsprechend vorgestellt.

Tab. 19: Symbole für die Antigene humanes IgG und DSPA.

Antigene	Symbole
Humanes IgG (hIgG)	
DSPA	

DSPA steht für Desmodus rotundus (Vampir Fledermaus) Plasminogen aktivierender Faktor und stellt ein neues potentes Fibrinolytikum zur Therapie eines akuten Herzinfarktes dar. Bisher werden routinemäßig Thrombolytika, wie Streptokinase, urokinase-ähnliche und auch gewebe-ähnliche Plasminogen Aktivatoren eingesetzt. Sie weisen allerdings alle gewisse Nachteile bzgl. der Pharmakologie und Pharmakokinetik auf und zeigen zusätzlich lebensgefährliche Nebenwirkungen. Auf der Suche nach einem besseren Fibrinolytikum wurden vier Plasminogen aktivierende Faktoren (DSPAα_1, α_2, β, γ) aus dem Speichel einer Vampirfledermaus isoliert, kloniert und expremiert [97, 98]. DSPAα_1 wies das beste pharmakologische Profil auf und wurde daher weiterentwickelt. An einem Ratten-Lungenembolie-Modell wurde die Effektivität und

Spezifität des DSPAα_1 getestet. Es konnte eine relativ lange Plasmahalbwertszeit, wie auch eine hohe Fibrinspezifität festgestellt werden. Hildebrand et al. [99] entwickelten zur Bestimmung von DSPAα_1 (im weiteren Verlauf nur DSPA genannt) in Plasma einen ELISA, der eine Nachweisgrenze von 5 ng/ml aufwies. Das Antigen und die verwendeten Antikörper sind im Anhang aufgelistet.

Festphasenassays

Bei der Etablierung eines Festphasenassays gibt es verschiedenste Assaydesigns, die abhängig von dem nachzuweisendem Antigen ausgewählt werden sollten. Für das humane IgG wurde ein direkter Assay entwickelt. Zur Bestimmung des DSPAs wurde in Anlehnung an den publizierten ELISA [99] ein Sandwich-Immunoassay durchgeführt.

Der *direkte Assay* besteht aus zwei bis drei Schritten. Die feste Phase wird direkt mit dem nachzuweisenden Antigen beschichtet. Es adsorbiert passiv an der Plastikoberfläche (coating) und durch einen anschließenden Waschschritt wird überschüssiges Material entfernt. Im zweiten Schritt wird der markierte (Enyzm, MNP) Detektionsantikörper (Sonde) mit dem Antigen inkubiert. Wird ein biotinylierter Detektionsantikörper verwendet, muss ein markiertes Avidin-Derivat (Sonde) als dritter Schritt angeschlossen werden. Die Messung des ELISAs erfolgt spektrophotometrisch, die des MARIAs magnetrelaxometrisch. Abbildung 58 zeigt die beiden Assayvarianten des direkten Assays schematisch.

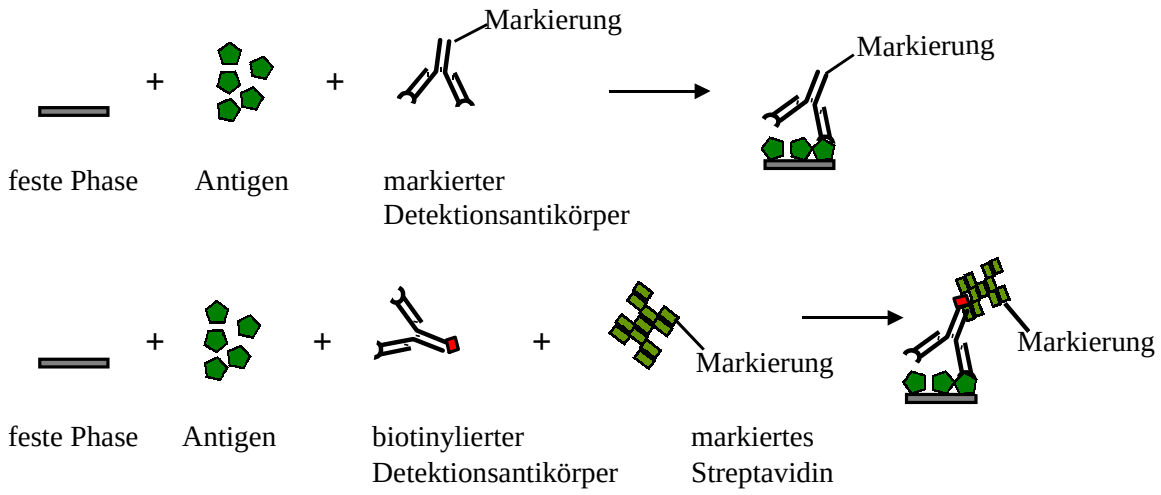


Abb. 58: Schematische Darstellung eines direkten Assays.

Der *Sandwich-Assay* besteht aus drei bis vier Schritten. Im ersten Schritt wird ein Fangantikörper auf die feste Phase gebracht. Das Antigen folgt in der gewünschten oder unbekannten Konzentration, welches dann mit einem markierten Detektionsantikörper

direkt nachgewiesen wird. Auch hier können biotinylierte Detektionsantikörper verwendet werden, die dann wiederum mit einem markierten Avidin-Derivat nachgewiesen werden müssen.

Die Fang- und Detektionsantikörper können bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern identisch sein. Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern müssen sie von verschiedenen Klonen gebildet werden und gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtet sein. Prinzipiell können Antikörper gleicher und unterschiedlicher Spezies verwendet werden, wobei Antikörper gleicher Spezies meistens vorzuziehen sind, um unspezifische Bindungsreaktionen zu verringern. In Abbildung 59 sind die beschriebenen Varianten des Sandwich-Assays schematisch dargestellt.

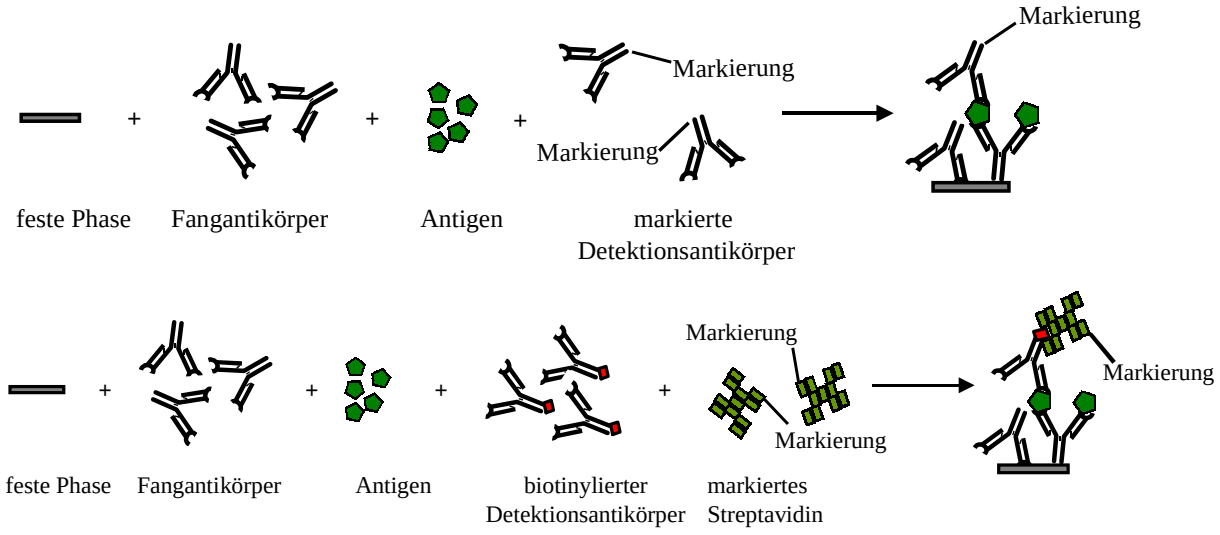


Abb. 59: Schematische Darstellung eines Sandwich-Assays.

Verwendete Signalgeber

Als Sonde wurden bei den ELISAs Streptavidin-Meerretich Peroxidase (Streptavidin-POD) und mit Meerrettich Peroxidase (POD) markierte Antikörper eingesetzt. Bei den MARIAs wurden zwei verschiedene Sonden verwendet, die kurze- (Streptavidin-EO-Partikel) und die lange Sonde (Antikörper-EO-Partikel), siehe auch Abschnitt 4.

Die magnetischen Sonden wurden bereits ausführlich beschrieben. Das für den ELISA verwendete Enzym, Meerrettich Peroxidase, hat ein Molekulargewicht von 40 kDa und zeichnet sich durch eine hohe Stabilität und eine hohe Wechselzahl aus. POD katalysiert unter Zusatz von Hydrogenperoxiden die Oxidation verschiedener Substrate zu farbigen Produkten. Die Intensität des Farbumschlags wird spektroskopisch detektiert und ist im linearen Bereich der Enzymkinetik direkt proportional zu der Konzentration des Antigens.

6.1 Bestimmung von humanem Immunglobulin G

Der direkte Festphasenassay zur Bestimmung von humanem IgG wurde als MARIA und ELISA parallel nach dem gleichen Protokoll (s. Kapitel X, Abschn. 10.11.1) hergestellt. Beide Assays sind schematisch in Abbildung 60 dargestellt. Das genaue Protokoll ist im Anhang beschrieben.

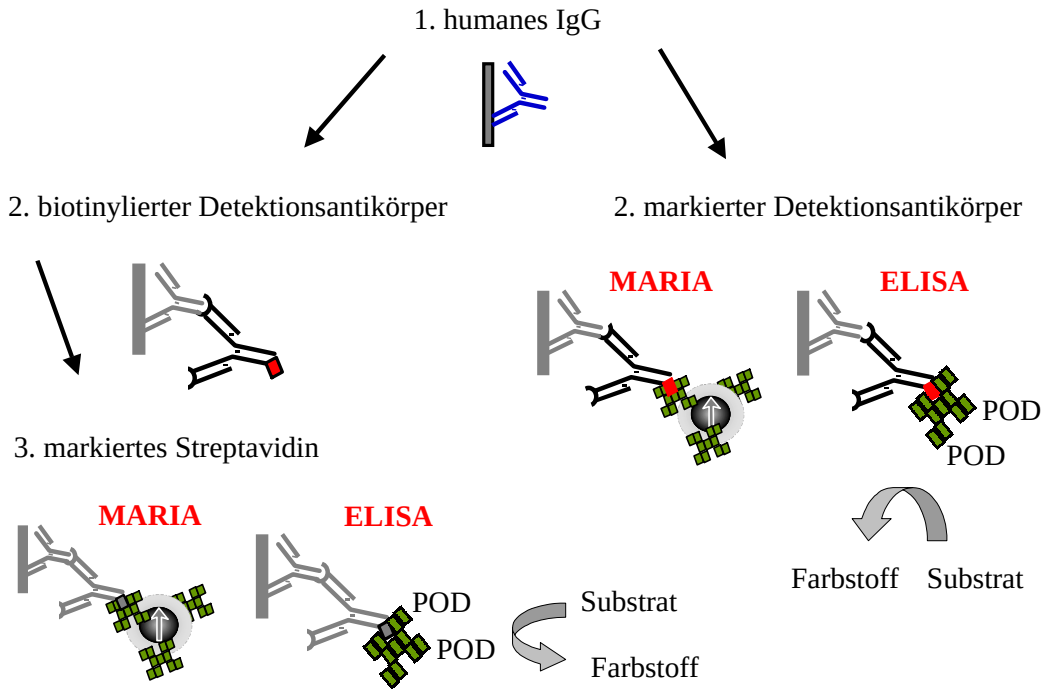


Abb. 60: Schematische Darstellung des direkten Assays zur Bestimmung von humanem IgG (POD = Meerrettich Peroxidase).

Der MARIA wurde mit dem MRX-Messgerät flüssig, d.h. in Anwesenheit des Überschusses an magnetischer Sonde gemessen und im Zeitintervall von 20-481 ms ausgewertet. Die Auswertung der Relaxationssignale erfolgte durch eine Kurvenanpassung an das in Abschnitt 2.3.3 vorgestellte Relaxationsmodell. Bei dem ELISA wurde zusätzlich der nicht gebundene Anteil der Sonde mit einem weiteren Waschschritt entfernt.

Die hier dargestellten Versuche zeigen Standardkurven für das zu bestimmende Antigen. Da mit dieser Methode keine absoluten sondern relative Werte angegeben werden, müssen die Standardkurven auch später bei der Bestimmung von Probe unbekannter Konzentration stets durchgeführt werden. Durch eine entsprechende Kurvenanpassung wird dann zwischen der optischen Dichte bzw. der Relaxationsamplitude und dem Wert des Analyten extrapoliert. Da die Güte eines solchen Assays von der Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Standardkurve abhängt, lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Etablierung einer reproduzierbaren Standardkurve für den neuen Assaytyp MARIA.

Streptavidin-Sonden

Der Assay wurde wie beschrieben mit dem biotinylierten Detektionsantikörper durchgeführt. Für den ELISA wurde Peroxidase-markiertes Streptavidin und für den MARIA die entsprechende kurze Sonde verwendet. Abbildung 61 zeigt den Kurvenverlauf des MARIAs, Abbildung 62 den Verlauf des ELISAs.

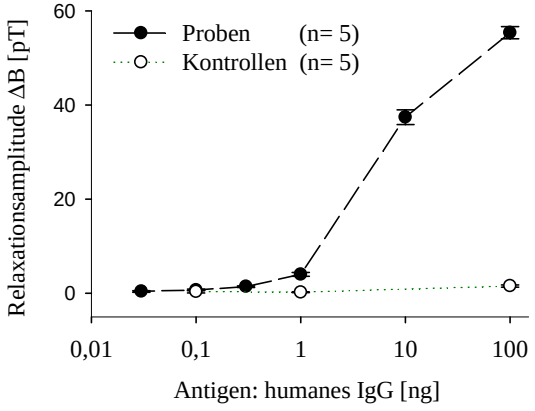


Abb. 61: MARIA: Nachweis von humanem IgG; Sonde: Streptavidin-EO-Partikel.

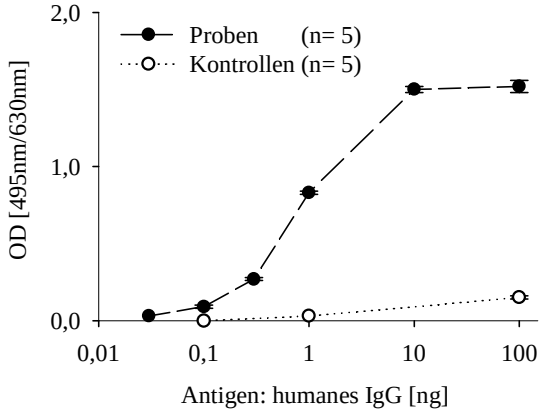
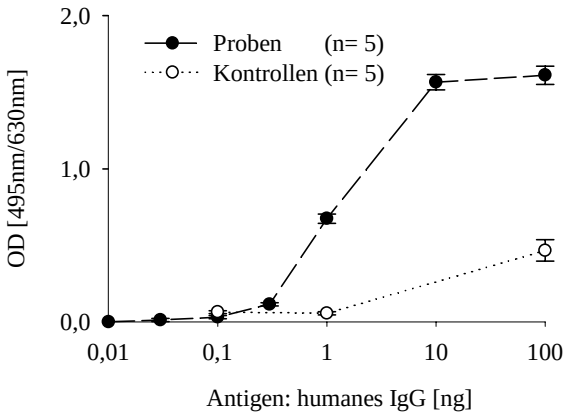


Abb. 62: ELISA: Nachweis von humanem IgG; Sonde: Streptavidin-POD.

Der Bestimmungsbereich des MARIAs liegt zwischen 0,5 ng und 100 ng. Die Nachweisgrenze des ELISAs liegt dagegen bei 0,1 ng. Die Kurve des ELISAs hat einen für Immunoassays typischen sigmoiden Verlauf. Bei 10 ng flacht die Kurve im Gegensatz zu der des MARIAs stark ab, was auf Sättigungserscheinungen zurückzuführen ist.

Wegen des unterschiedlichen Bestimmungsbereichs wurde die Abhängigkeit dieses Kurvenverlaufs von der Messmethode bzw. dem signalgebenden Molekül untersucht. Der vermessene MARIA wurde unter der Annahme, dass die verwendete kurze Sonde trotz der Bindung an den biotinylierten Antikörper weitere Bindungsstellen für Biotin aufweisen sollte, mit einem Überschuss an Enzym-markiertem Biotin versetzt. Der Assay wurde wie für den ELISA beschrieben weiterentwickelt und die optische Dichte vermessen. Das Ergebnis dieses MARIA-ELISAs ist in Abbildung 63 dargestellt.



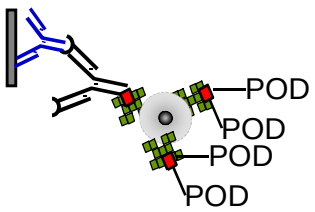


Abb. 63: ELISA: Nachweis von humanem IgG; Sonden: Streptavidin-EO-Partikel + Biotin-POD.

Die Graphik (Abb. 63) zeigt einen veränderten Kurvenverlauf. Der Bestimmungsbereich des Assays als MARIA lag bei 0,5–100 ng, als ELISA hat sich die untere Nachweisgrenze nicht verändert, der Bestimmungsbereich zeigt jedoch bei 10 ng eine Sättigung. Des Weiteren ist eine starke unspezifische Bindung bei 100 ng zu erkennen. Der Assay hat daher insgesamt einen schlechteren Bestimmungsbereich. Die Sättigungserscheinung bei 10 ng zeigt, dass in diesem Bereich ähnlich viel Enzym-markiertes Biotin an die magnetische Sonde binden konnte, obwohl die magnetrelaxometrischen Messungen in diesem Bereich noch deutlich zu differenzierende Signale aufwiesen. Die freien Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins waren anscheinend schlecht zugänglich, was auch die reduzierte Nachweisempfindlichkeit des magnetischen MARIAs erklären könnte.

Antikörper-Sonden

Der zweite Assay wurde mit den Enzym- und magnetisch-markierten Anti-human-IgG(Fcγ)-Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper wurden wie in Abschnitt 4 beschrieben über das Biotin an die Streptavidin-EO-Partikel gekoppelt.

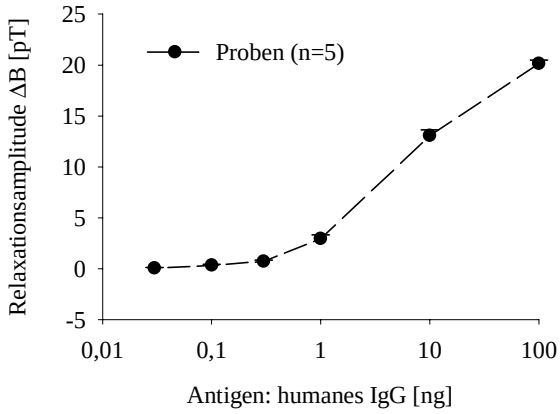


Abb. 64: MARIA: Nachweis von humanem IgG; Sonde: Anti-human-IgG-EO-Partikel.

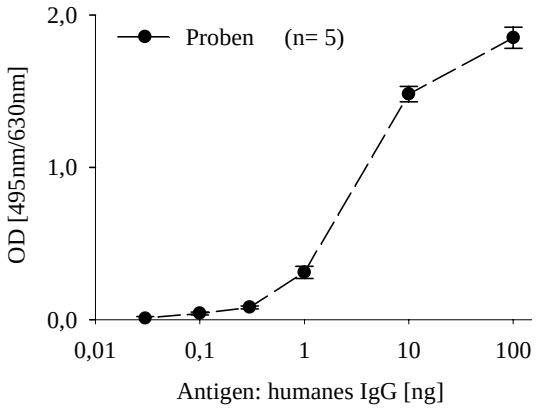


Abb. 65: ELISA: Nachweis von humanem IgG: Sonde: Anti-human-IgG-POD.

Abbildung 64 zeigt den Kurvenverlauf des MARIAs und Abbildung 65 den des ELISAs. Die Bestimmungsbereiche beider Assays haben sich gegenüber der Verwendung von den Streptavidin-Sonden verändert. Der Bestimmungsbereich des MARIAs liegt jetzt im Bereich von 1–100 ng hIgG, der des ELISAs beginnt bei 0,5 und reicht bis 100 ng hIgG, wobei ab 10 ng eine leichte Sättigung zu erkennen ist. Beide Assays zeigen insgesamt im Vergleich zur Verwendung von Streptavidin-Sonden eine geringere Nachweisgrenze.

Um eine Erhöhung der Nachweisgrenze bzw. auch der Reduktion der unspezifischen Bindung zu erreichen, werden häufig Antikörper-Fragmente, sogenannte $F(ab)_2$-Fragmente, eingesetzt. Antikörper können durch eine enzymatische Behandlung in ein $F(ab)_2$-Fragment und einen Fc-Fragment geteilt werden. (s. Abb. 66).

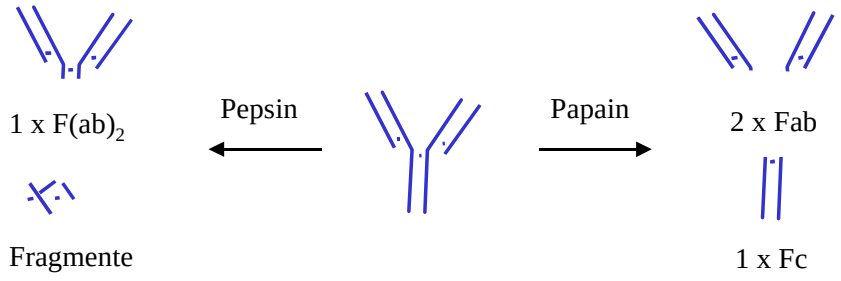


Abb. 66: Verdau von Antikörpern mit Papain und Pepsin.

Die monovalenten Fab und bivalenten $F(ab)_2$-Fragmente bilden den antigen-bindenden Bereich des Antikörpers. Die Fc-Region ist für die Effektorfunktion verantwortlich und wird häufig für die unspezifische Bindung der Antikörper verantwortlich gemacht. Des Weiteren sollte eine mögliche sterische Hinderung reduziert werden [100]. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Verwendung von $F(ab)_2$-Fragmenten zu einer Verbesserung der Empfindlichkeit bzw. Nachweisgrenze führt.

Streptavidin-Sonden und biotinylierte $F(ab)_2$-Fragmente

Diese dritte Variation wurde im Prinzip wie der oben beschriebene Assay durchgeführt. Verändert wurde allein der Detektionsantikörper. Es wurden das biotinylierte $F(ab)_2$-Fragment des Antiköpers eingesetzt. Der Kurvenverlauf des MARIAs und der des ELISAs sind in den Abbildungen 67 und 68 dargestellt.

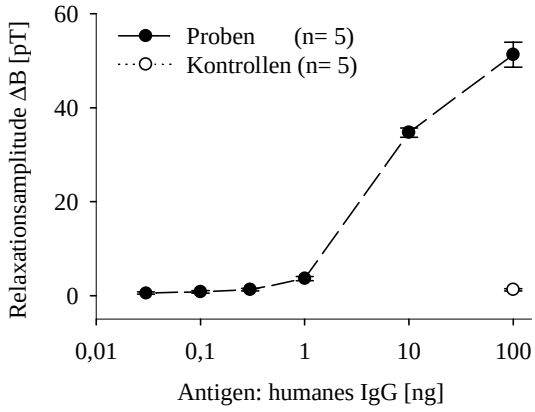


Abb. 67: MARIA: Nachweis von humanem IgG; Sonde: Streptavidin-EO-Partikel.

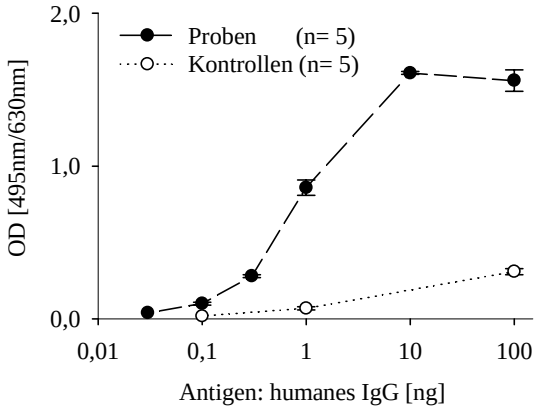


Abb. 68: ELISA: Nachweis von humanem IgG; Sonde: Streptavidin-POD.

Die magnetrelaxometrische Bestimmung des MARIAs zeigt einen unveränderten Bestimmungsbereich von 0,5–100 ng, der des ELISAs erstreckt sich unverändert von 0,1-10 ng. Auch bei dieser Assayvariante wurde untersucht, wie sich der Kurvenverlauf des MARIAs durch die Zugabe von Enzym-markiertem Biotin auswirkt. Abbildung 69 zeigt das Ergebnis der spektroskopischen Messung dieses verlängerten Assays.

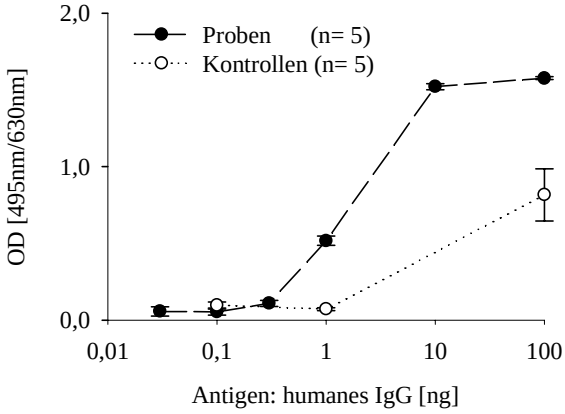


Abb. 69: ELISA: Nachweis von humanem IgG; Sonden: Streptavidin-EO-Partikel + Biotin-POD.

Der lineare Bereich des MARIAs hat sich wiederum verschoben und liegt bei ca. 0,5–10 ng hIgG. Ab 10 ng tritt auch bei dieser Assayvariante eine deutliche Sättigung ein, die bei der magnetrelaxometrischen Messung nicht zu beobachten war. Durch die Verlängerung des Assays war wiederum eine drastische Erhöhung der unspezifischen Bindung im Bereich von 100 ng zu beobachten. Dies könnte auf die Qualität der magnetischen Sonde zurückzuführen sein.

Um zu untersuchen, ob die direkt magnetisch-markierten $F(ab)_2$-Fragmente zu einer Verbesserung der Nachweisgrenzen führen, wurde auch diese Assayvariante untersucht.

Da jedoch keine Enzym-markierten $F(ab)_2$-Fragmente zur Verfügung standen, wurde dies nur für die magnetisch-markierten $F(ab)_2$-Fragmente untersucht.

$F(ab)_2$- Fragment-Sonden

Die Durchführung der vierten Assayvariante erfolgte wie bisher, wobei anstelle des markierten Detektionsantikörpers das magnetisch-markierte Anti-human-IgG(Fcγ)-$F(ab)_2$-Fragment verwendet wurde. Das Ergebnis des MARIAs ist in Abbildung 70 dargestellt.

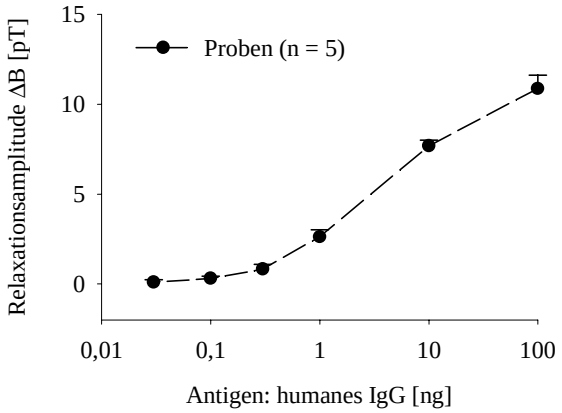


Abb. 70: MARIA: Nachweis von humanem IgG; Sonde: Anti-human-IgG-$F(ab)_2$-EO-Partikel

Der Bestimmungsbereich des MARIAs liegt hier wieder im Bereich von 1 ng bis 100 ng humanem IgG. Auch durch diese Assayvarianten konnte keine Erniedrigung der Nachweisgrenze erzielt werden.

Um auszuschließen, dass diese Beobachtungen auf das gewählte Design des Assays zurückzuführen sind, wurde ein zweiter Assay mit einem veränderten Assaydesign durchgeführt.

6.2 Bestimmung von DSPA

Es wurde der von der Schering AG etablierte symmetrische Sandwich-ELISA für das Antigen DSPA zunächst nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Symmetrisch bedeutet, dass der gleiche polyklonale Antikörper sowohl als Fang- als auch als Detektionsantikörper eingesetzt wurde. Das Protokoll wurde anschließend verändert und es wurde untersucht, ob eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit für den MARIA erreicht werden konnte. Der ELISA und der MARIA wurden auch hier stets parallel durchgeführt, um tagesabhängige Schwankungen oder Fehler bei der Bewertung der Assays berücksichtigen zu können. Abbildung 70 zeigt die beiden Assayvarianten des Sandwich-Assays schematisch. Das genaue Protokoll ist in Abschnitt 10.11.2 beschrieben.

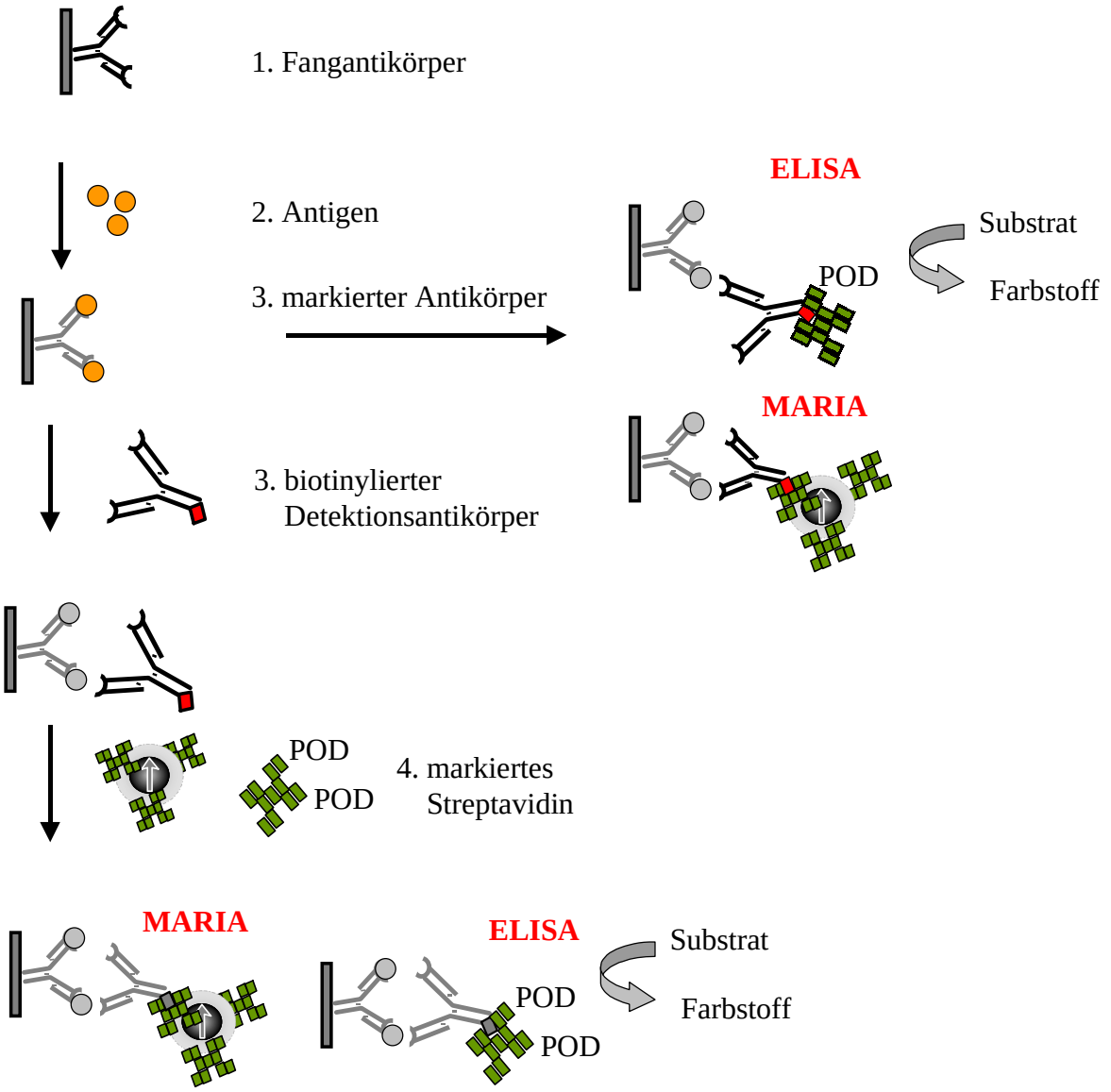


Abb. 71: Schematische Darstellung des Sandwich-Assays zur Bestimmung von DSPA (POD = Meerrettich Peroxidase).

Der MARIA wurde mit dem MRX-Messgerät im Zeitintervall zwischen 20 ms bis 481 ms flüssig vermessen. Die quantitative Auswertung der Relaxationssignale erfolgte durch eine Kurvenanpassung an das in Abschnitt 2.3.3 beschriebene Relaxationsmodell. Bei dem ELISA wurde wie bereits beschrieben vorgegangen.

ELISA

In Abbildung 72 ist der ELISA bei dem Enzym-markiertes Streptavidin eingesetzt wurde dargestellt und in Abbildung 73 der ELISA bei dem der Enzym-markierte Anti-DSPA-Antikörper verwendet wurde.

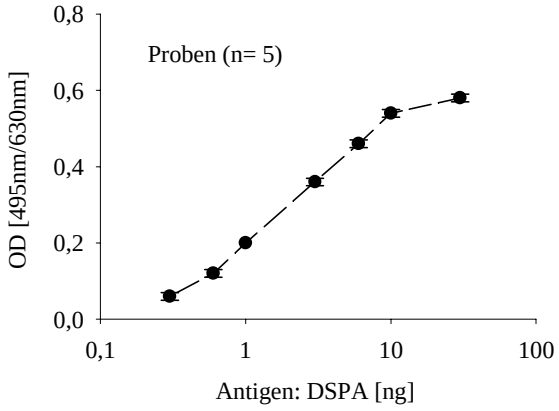


Abb. 72: ELISA: Nachweis von DSPA; Sonde: Streptavidin-POD.

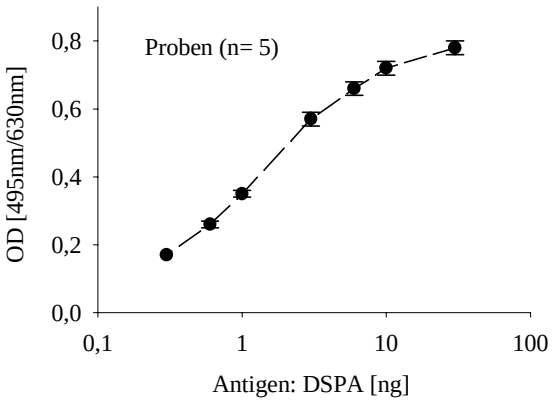


Abb. 73: ELISA: Nachweis von DSPA; Sonde: Anti-DSPA-Antikörper-POD.

Beide Assays zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf und einen Bestimmungsbereich von 0,3–30 ng. In dieser Qualität wurde der Assay übernommen und konnte auch über den Versuchszeitraum aufrechterhalten werden.

MARIA

Der MARIA wurde sowohl mit der kurzen Sonde als auch mit der langen Sonde durchgeführt.

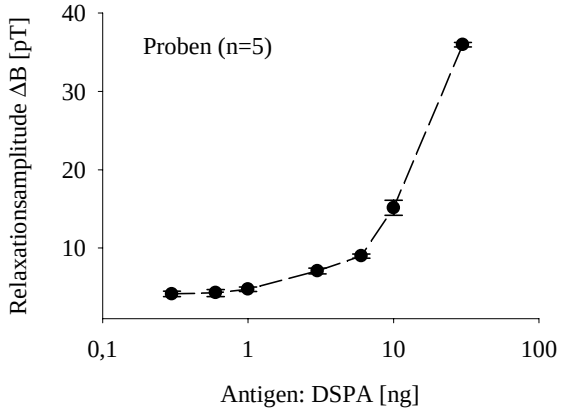


Abb. 74: MARIA: Nachweis von DSPA; Sonde: Streptavidin-EO-Partikel.

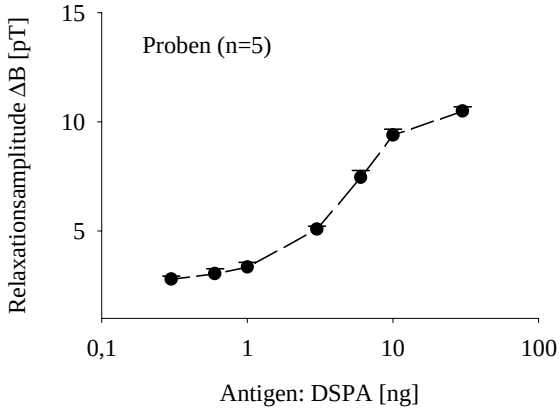


Abb. 75: MARIA: Nachweis von DSPA; Sonde: Anti-DSPA-Antikörper-EO-Partikel.

Beide Assays (Abb. 74 umd Abb. 75) zeigen eine geringere Empfindlichkeit als die ELISAs. Bei der Verwendung der Streptavidin-Sonde lag die Nachweisgrenze um 3 ng. Die Kurve zeigt ab 6 ng einen steilen linearen Bereich ohne dass bei höheren Konzentrationen eine Sättigung zu beobachten war. Eine Verlängerung des Bestimmungsbereichs zu höheren Konzentrationen scheint daher möglich. Bei der

Verwendung der Antikörper-gekoppelten Sonde verbesserte sich die Nachweisgrenze auf 1 ng. Die Kurve zeigt einen typischen sigmoiden Verlauf. Die Sättigung tritt ab 10 ng ein.
In Analogie zu den “human-IgG”-MARIAs konnte auch bei allen “DSPA”-MARIAs keine Verbesserung der Empfindlichkeit bzw. Nachweisgrenze oder der Dynamik des Bestimmungsbereichs im Vergleich zu den ELISAs nachgewiesen werden.

6.3 Diskussion

Es konnte festgestellt werden, dass sowohl humanes IgG mit dem direkten Assay und DSPA mit dem Sandwich-Assays mittels magnetischer Relaxationsimmunoassays und Enzymimmunoassays bestimmt werden können. Durch die verschiedenen Sonden-Varianten (Streptavidin- und Antikörper- bzw. $F(ab)_2$-Fragment-Sonden) ergaben sich leicht unterschiedliche Kurvenverläufe bei den MARIAs und ELISAs, jedoch erreichten die MARIAs nicht ganz die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Enzymimmunoassays. Da beide Assays gleichzeitig hergestellt wurden und sich nur im letzten Schritt - durch Zugabe verschiedener Sonden - unterschieden, ist die höhere Standardabweichung der Einzelwerte und der veränderte Kurvenverlauf der MARIAs im Vergleich zu den ELISAs auf die eingesetzten Sonden zurückzuführen. Obwohl die Sonden nach dem Standardprotokoll hergestellt wurden und visuell homogen aussahen, zeigen die dargestellten Assays sowie deren Reproduktion, dass die einzelnen Partikel in ihrer Bindungsfähigkeit variierten. Im Verlauf der Arbeit konnte außerdem eine starke Abhängigkeit des Kurvenverlaufs der MARIAs, wie auch der Dynamik des Bestimmungsbereichs, von dem Alter der Sonde festgestellt werden. Daher wurden die hier verwendeten Sonden am gleichen Tag hergestellt.

Die magnetischen Antikörper-Sonden hätten durch eine erhöhte Avidität (da mehr als ein Antikörper pro Sonde gebunden vorliegen kann, im Vergleich zu den Enzym-markierten Antikörpern, bei denen mehrere Enzymmoleküle pro Antikörpermolekül vorliegen) zu einer höheren Empfindlichkeit führen können (Steilheit der Kurve). Es zeigte sich allerdings, dass gerade die Streptavidin-Partikel bessere Resultate aufwiesen. Der Bestimmungsbereich der MAIRAs war bei bei der Verwendung der Streptavidin-Sonde möglicherweise breiter als der des ELISAs. Der Kurvenverlauf wurde jedoch für höhere Konzentrationen nicht überprüft.
Bei dem Vergleich der MARIAs mit den ELISAs muss man allerdings bedenken, dass hier ein neuentwickelter Assay an einem etablierten und seit über 30 Jahren optimierten Verfahren [101] gemessen wird. Die oben vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der sich

noch in der Entwicklung befindende magnetische Relaxationsimmunoassay generell als neues *in vitro* diagnostisches Verfahren mit einem hohen Potential beurteilt werden kann.

Der Relaxationsimmunoassay hat gegenüber den bekannten Assayverfahren einige Vorteile aufzuweisen: eine einfachere Handhabung, durch das Einsparen eines Waschschrittes und die Möglichkeit eine vom Zeitpunkt der Herstellung des Assays unabhängige magnetische Messung durchführen zu können. Die Assays können auch eingefroren und später vermessen werden, da das Relaxationssignal sich durch das Einfrieren nicht verändert.
Eine bessere Anpassung der festen Phase, der Inkubationsbedingungen, der Inkubationsvolumina sowie auch eine weitere Optimierung der Kopplungschemie bei der Sondenherstellung würden zu einer Erhöhung der Sensitivität beitragen. Des Weiteren könnte der magnetische Relaxationsimmunoassay oder entsprechend Immunoassays, die auf der Messung der Remanenz von magnetischen Nanopartikeln beruhen, durch eine Optimierung der magnetischen Nanopartikel nochmals um vieles sensitiver werden. Eine Berechnung der theoretisch möglichen Nachweisgrenze wurde von Kötitz et al. beispielhaft für remanente magnetische Nanopartikel vorgenommen [102].

Wie bereits in der Einleitung der Arbeit diskutiert, ist in Hinblick auf die *In vivo*-Anwendung der Magnetrelaxometrie besonders die Spezifität der Signaldetektion von Interesse. Man erhofft sich, durch die Möglichkeit der spezifischen Detektion der gebundenen Sonde in Anwesenheit der ungebundenen Sonde, bekannte Hintergrundprobleme durch im Körper zirkulierender Signalgeber vermeiden zu können.
Anhand der durchgeführten Festphasenassays konnte gezeigt werden, dass mit der MRX die gebundenen magnetischen Nanopartikel selektiv in Anwesenheit von ungebundenen Nanopartikeln detektiert werden können. Die prinzipielle Voraussetzung für eine *In vivo*-Anwendung der Methode konnte damit bewiesen werden.

6.4 Zusammenfassung

Es wurden zwei verschiedene magnetische Festphasenassays entwickelt: Ein direkter Assay zum Nachweis von humanem IgG und ein Sandwich-Assay zum Nachweis von DSPA. Bei beiden Assays wurden die verwendeten Sonden variiert, um den Einfluss ihrer Größe sowie Avidität auf den Kurvenverlauf zu untersuchen. Zur Detektion von humanem IgG wurden sowohl Enzym- und magnetisch-markierte Streptavidin-Sonden mit biotinylierten Detektionsantikörpern und $F(ab)_2$-Fragmenten als auch direkt Enzym- und

magnetisch-markierte Antikörper und magnetisch-markierte $F(ab)_2$-Fragmente eingesetzt. Die MARIAs wurden “flüssig”, d.h. in Anwesenheit der ungebundenen Sonde vermessen. Bei der Verwendung der Streptavidin-Sonden lag der Bestimmungsbereich des ELISAs bei 0,1-10 ng und der des MARIAs bei 0,5 ng bis 100 ng. Die Nachweisgrenze des MARIAs lag etwas höher, dagegen zeigte ihr Bestimmungsbereich eine größere Dynamik, da bei 100 ng war noch keine Sättigungserscheinung zu beobachten.
Wegen des unterschiedlichen Bestimmungsbereichs wurde die Abhängigkeit dieses Kurvenverlaufs von der Messmethode bzw. dem signalgebenden Molekül untersucht. Der vermessene MARIA wurde mit einem Überschuss an Enzym-markiertem Biotin versetzt, als ELISA weiterentwickelt und spektroskopisch vermessen. Der Bestimmungsbereich des MARIA-Assays als ELISA hat sich reduziert auf 0,5–10 ng. Hier trat wie beim ELISA eine Sättigung ein. Des Weiteren hatte sich die unspezifische Bindung deutlich erhöht. Die Verwendung von biotinylierten $F(ab)_2$-Fragmenten zeigte keinerlei Veränderung der Kurvenverläufe im Vergleich zu den ganzen Antikörpern.
Bei der Verwendung der Enzym- und magnetisch-markierten Antikörper-Sonden hat sich der Bestimmungsbereich des MARIAs verschoben und lag bei 1–100 ng hIgG, der des ELISA lag bei 0,5-100 ng hIgG. Beide Assays zeigten insgesamt eine geringere Nachweisgrenze und das magnetisch markierte $F(ab)_2$-Fragment zeigte wiederum keine deutliche Veränderung des Kurvenverlaufs.

Der DSPA-Sandwich-Assay wurde als ELISA von der Schering AG übernommen. Es wurden wiederum ein biotinylierter Detektionsantikörper mit markiertem Streptavidin als Sonde mit direkt markierten Antikörpern als Sonde verglichen. Beide Assayvarianten zeigten als ELISA einen ähnlichen Kurvenverlauf und einen Bestimmungsbereich von 0,3–30 ng. Beide MARIA-Assays zeigen eine geringere Empfindlichkeit als die der ELISAs. Bei der Verwendung der Streptavidin-Sonde konnte eine Nachweisgrenze um 3 ng erreicht werden, bei der Verwendung der Antikörper-Sonde verbesserte sich die Nachweisgrenze auf 1 ng.

Anhand dieser Festphasen-MARIAs konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Magnetrelaxometrie um ein neues, sensitives *in vitro* diagnostisches Verfahren zum Nachweis von Analyten an einer festen Phase eignet und in seiner Empfindlichkeit nur leicht unterhalb der des etablierten Enzym-Immunoassay-Verfahrens liegt.

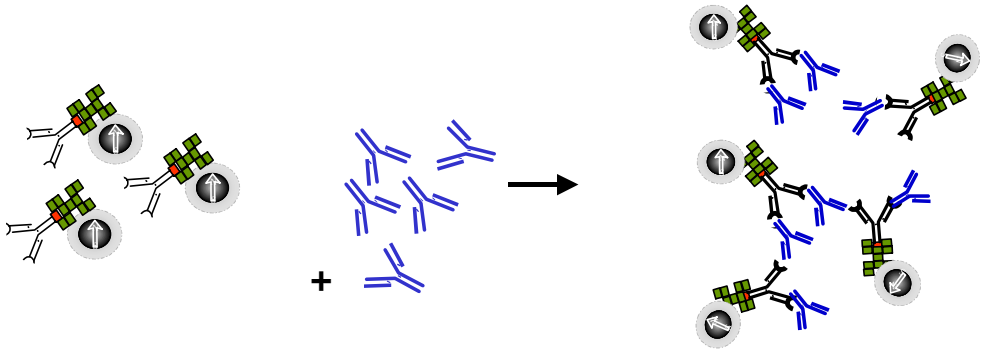
Des weiteren konnte die Voraussetzung für die *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie durch die spezifische Detektion der gebundenen Signalgeber in Anwesenheit der ungebundenen Signalgeber bewiesen werden.

7 Flüssigphasenassays

Neben der Etablierung der Festphasen-MARIAs wurde untersucht, ob sich die Magnetrelaxometrie auch zur Durchführung von homogenen Flüssigphasenassays eignet. Die in Abschnitt 5 dargestellten Aggregationsassays zeigten, dass die Reaktion der Streptavidin-EO-Partikel mit dem mehrfach biotinylierten BSA konzentrations- und zeitabhängig beobachtet werden konnte. Daher entwickelte sich der Gedanke, dass die Detektion verschiedener Analyte in flüssiger Phase mit der Magnetrelaxometrie möglich sein sollte. Da die Aggregationsassays auch in Vollblut durchgeführt werden konnten, sollte des Weiteren eine Detektion von Analyten in Vollblut möglich sein. Die Bestimmung von Antigenen bzw. Antikörpern wäre ohne Probenaufbereitung erstmals direkt im Blut möglich.

Es wurden erste Veruche mit den aus Abschnitt 6 bekannten Modellanalyten, humanes IgG und DSPA durchgeführt, um die Machbarkeit der homogenen Assays zu zeigen. Die Bindungsreaktionen wurden daher in Puffer durchgeführt.

Als spezifische Sonden dienten die spezifischen Antikörper-EO-Sonden und als Kontrolle die mit der Isotypkontrolle gekoppelten magnetischen Nanopartikel. Die Sonden wurden in den jeweiligen Untersuchungen vorgelegt und das Antigen in den angegebenen Konzentrationsbereichen hinzugefügt. Die Abbildung 76 zeigt die Reaktion schematisch am Beispiel von humanem IgG. Es wurde angenommen, dass eine von der Antigenkonzentration abhängige Agglomeration der magnetischen Sonden messbar sein sollte.



Antikörper-MNP

Zugabe unterschiedlicher Mengen des Antigens

Bildung von Agglomeraten verschiedener Größen

Abb. 76: Schematische Darstellung der Aggregation als Ursache für die bei den Flüssigphasenassays gemessenen Signale am Beispiel des humanen IgGs.

7.1 Bestimmung von humanem IgG

Zur Bestimmung von humanem IgG wurden zwei verschiedene biotinylierte Anti-human-IgG-Antikörper an die Streptavidin-EO-Partikel gekoppelt: Der eine richtet sich gegen den Fc-Teil, der zweite gegen die leichten und schweren (H+L) Ketten des humanen IgGs.

Die Anti-human-IgG(H+L)-EO-Sonde wurde vorgelegt, das Antigen in den angegebenen Konzentrationen zu der Probe gegeben und direkt nach der Zugabe und 3 h später vermessen. Abbildung 77 zeigt die prozentuale Änderung der Relaxationszeiten der einzelnen Proben.

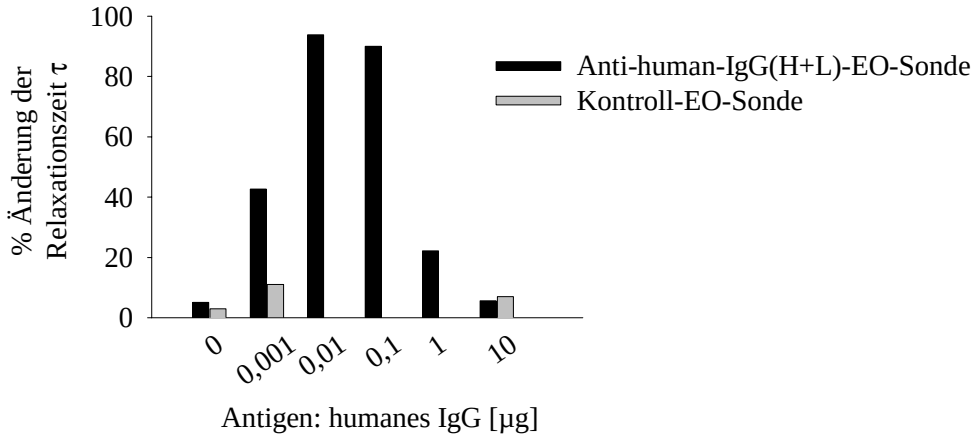


Abb. 77: MRX-Flüssigphasenassay: Prozentuale Änderung der Relaxationszeit der Sonden (5 nmol Fe) 3 h nach der Zugabe des Antigens im Vergleich zur 0 ng Probe zum Zeitpunkg 0 h, ermittelt aus einer einfach exponentiellen Kurvenanpassung (Auswerteintervall: 420 µs - 100 ms).

Die Anti-human-IgG(Fcγ)-EO-Sonde wurde vorgelegt und mit den angegebenen Konzentrationen des Antigens versetzt. Die Proben wurden direkt nach der Zugabe und 2,5 h später vermessen. In Abbildung 78 ist die prozentuale Änderung der Relaxationszeiten wiedergegeben.

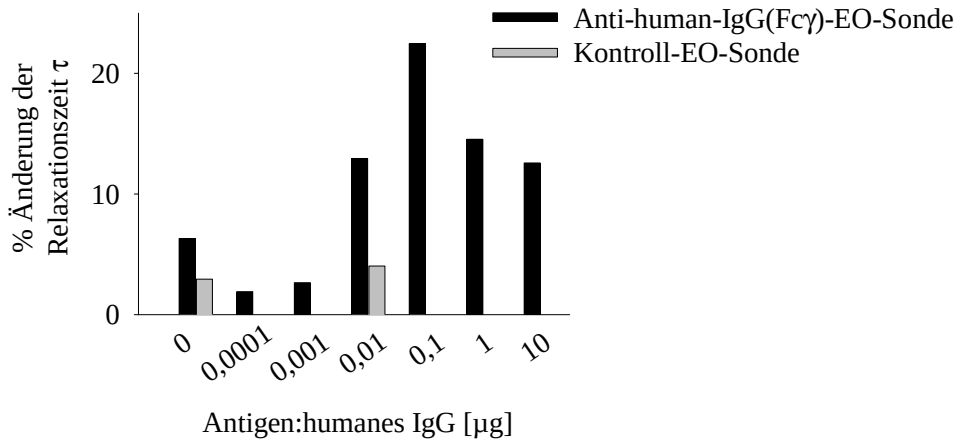


Abb. 78: MRX-Flüssigphasenassay: Prozentuale Änderung der Relaxationszeit der Sonden (5 nmol Fe) 2,5 h nach der Zugabe des Antigens im Vergleich zur 0 ng Probe zum Zeitpunkg 0 h, ermittelt aus einer einfach exponentiellen Kurvenanpassung (Auswerteintervall: 420 µs - 100 ms).

Die in den Abbildungen dargestellten prozentualen Änderungen der Relaxationszeiten der Sonden als Funktion der zugesetzten Antigenmenge zeigen einen für Antigen-Antikörper-Reaktionen typischen Verlauf. Liegt einer der beiden Reaktionspartner in einem starken Überschuss vor, kommt es nicht zu einer Quervernetzung der Sonde. Liegt z.B. das Antigen im Überschuss vor, sind genügend Antigenmoleküle vorhanden, um alle Bindungsstellen der Antikörper-Sonden mit unterschiedlichen Antigenen zu sättigen, was zu einer geringen Volumenzunahme der Sonde führt. Entspricht das Verhältnis der Reaktionspartner einem kritischen Wert, kommt es zu einer verstärkten Agglomeration aufgrund von Quervernetzungen der Nanopartikel durch Mehrfachbindungen.

Die stärkste Agglomeration der Sonde konnte bei der gegen die leichten und schweren Ketten gerichteten Antikörper-EO-Sonde bei 10-100 ng und bei der gegen den Fc-Teil gerichteten Antikörper-EO-Sonde bei 1 ng beobachtet werden. Bei den Kontrollsonden wurde ebenfalls eine Veränderung der Teilchengröße beobachtet. Dies zeigt die unspezifische Reaktion des Antigens mit der Sonde. Bei den Kontrollproben wurden nur einzelne Konzentrationen bestimmt, da der Probenaufwand sehr groß war und eine punktuelle Überprüfung der unspezifischen Bindung als ausreichend betrachtet wurde. Die Versuche konnten mehrfach wiederholt bzw. bestätigt werden. Die Aussagen konnten, wie der Abbildung 79 zu entnehmen ist, durch entsprechende Bindungsuntersuchungen mit der PCS bestätigt werden.

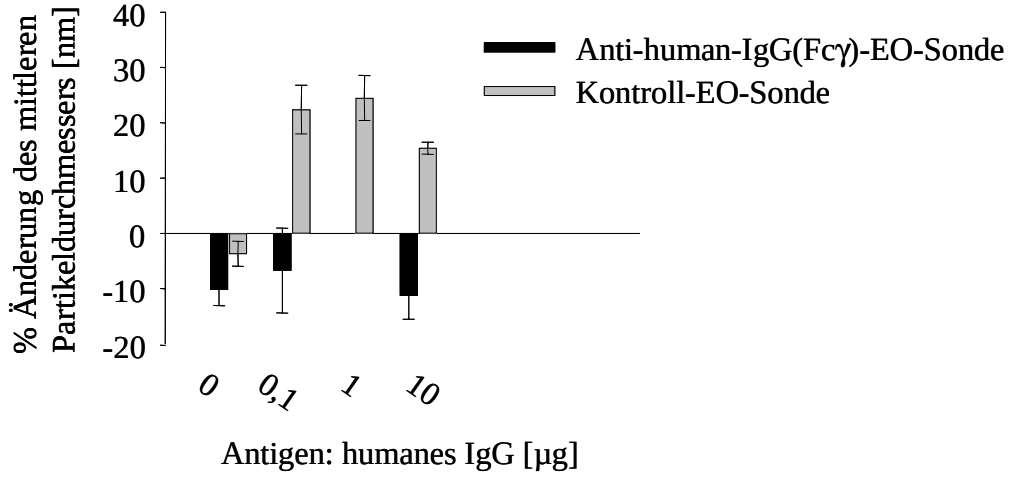


Abb. 79: PCS-Flüssigphasenassay: Prozentuale Änderung des mittleren Partikeldurchmesser der Sonden (1 µmol Fe) 2 h nach der Zugabe des Antigens im Vergleich zur 0 ng Probe zum Zeitpunkg 0 h (MW ± SD, n = 6 Messungen).

7.2 Bestimmung von DSPA

Des Weiteren wurde untersucht, ob DSPA in einem homogenen Assay bestimmt werden kann. Als Sonde wurden Anti-DSPA-EO-Partikel vorgelegt und die entsprechenden

Mengen des Antigens hinzugefügt. Die Proben wurden sofort und nach 3 h magnetrelaxometrisch vermessen.

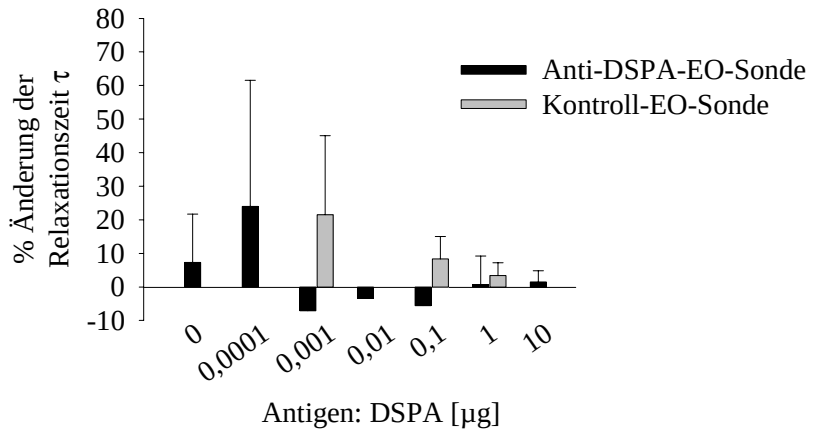


Abb. 80: MRX-Flüssigphasenassay: Prozentuale Änderung der Relaxationszeit der Sonden (10 nmol Fe) nach 0 h und 3 h nach der Zugabe von DSPA, ermittelt aus einer einfach exponentiellen Kurvenanpassung (Auswerteintervall 420 µs - 100 ms).

Es ist deutlich zu erkennen (Abb. 80), dass keine konzentrationsabhängigen Veränderungen der Relaxationszeiten zu beobachten waren.

7.3 Diskussion

Die homogenen Flüssigphasenassays zeigten bei der Bestimmung von humanem IgG eine konzentrationsabhängige Agglomeration der Sonde. Bei der Reaktion der Antikörper mit ihrem Antigen entstehen sogenannte Präzipitationskurven, allerdings nur in einem engen Konzentrationsbereich [100]. Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, gibt es immer einen Punkt der maximalen Agglomeration, wobei dieser von dem verwendeten Antikörper wie auch dem Konzentrationsverhältnis der Sonde zu dem Antigen abhängig ist.

Das DSPA konnte so nicht bestimmt werden. Die Ursache für das Ausbleiben einer Teilchengrößenveränderung ist nicht bekannt, jedoch werden verschiedene Ursachen angenommen. Ein Grund für das Ausbleiben einer messbaren Agglomeration der Anti-DSPA-Sonde könnte das geringe Molekulargewicht des DSPAs (40 kDa) im Vergleich zu dem des humanen IgGs (150 kDa) darstellen. Das DSPA ist also deutlich kleiner als das humane IgG. Des Weiteren kann das Antigen auch in einem falschen Konzentrationsbereich eingesetzt worden sein. Dass der polyklonale Anti-DSPA-Antikörper allerdings mindestens zum gleichzeitigen Nachweis von zwei Epitopen des Antigens herangezogen werden kann, konnte anhand der durchgeführten Festphasen-Sandwichassays (s. Abschn. 6) bewiesen werden. Die Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie zur Bestimmung von Analyten in flüssiger Phase konnte demnach in zwei Fällen bestätigt werden.

Die Bindungsreaktionen konnten durch PCS-Messungen bestätigen werden, jedoch zeigen diese stets starke Standardabweichungen. Die Standardabweichungen sind zum Teil auf die Inhomogenität der Sonden, aber insbesondere auf den Proteinzusatz (Pufferbestandteile, Antigenzusatz) zurückzuführen, der als partikulärer Bestandteil mit gemessen und bei der Berechnung des mittleren Partikeldurchmessers mit einbezogen wird. Die Magnetrelaxometrie ist zur Durchführung von homogenen Assays besser geeignet, da diese Methode von der Zugabe von höhermolekularen Bestandteilen zu den Proben unabhängig ist, solange die Viskosität der Lösung unverändert bleibt.

Die größte Schwierigkeit bei den Flüssigphasenassays liegt in der Inhomogenität der Sonden. Unterschiedliche Antikörper-Sonden zeigen immer unterschiedliche Relaxationszeiten, bedingt durch die unterschiedlich starke Agglomeration der Sonden bei der Herstellung (s. Abschn. 4). Zusätzlich führt die Inhomogenität auch zu unterschiedlichen Relaxationszeiten bei jeder einzelnen Probe, so dass die Veränderung der Zeitkonstanten dieser Sonden über die Zeit am Besten mit der Relaxationszeit der jeweiligen Probe vor der Zugabe des nachzuweisenden Antigens bestimmt wird. In der Abbildung 78 ist z.B. deutlich zu erkennen, dass sich sogar die Relaxationszeit der “0 ng-Sonde” über den Zeitraum von 2,5 h verändert. Eine Verbesserung der Homogenität der Antikörper-Sonden würde daher, wie bei den Festphasenassays, zu einer erheblichen Verbesserung der Assays führen.

7.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Magnetrelaxometrie sich auch zur Durchführung von homogenen Flüssigphasenassays eignet. Es wurden spezifische Bindungsreaktionen in flüssiger Phase durchgeführt. Die Bestimmung unterschiedlicher Mengen humanen IgGs (0,1 ng - 10 µg) war mit zwei unterschiedlichen Sonden (Anti-human-IgG(H+L)-, und Anti-human-IgG(Fcγ)-EO-Sonde) möglich. Es wurde eine konzentrationsabhängige Veränderung der Relaxationszeiten der Anti-human-IgG-Sonden beobachtet. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt und das Ergebnis konnte wiederholt bestätigt werden. Der Nachweis von DSPA (0,1 ng - 10 µg) war dagegen nicht möglich.
Die Verwendung der Magnetrelaxometrie zur direkten Detektion von Analyten in Vollblut sollte daher möglich sein, überstieg jedoch den Rahmen dieser Arbeit.

8 Magnetooptische Relaxationsmessungen

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Bindungsreaktionen mit magnetischen Nanopartikeln wurde im Laufe dieser Arbeit entwickelt [103]. Sie beruht auf der Messung der Relaxation der Doppelbrechung von Ferrofluiden nach Abschalten eines äußeren Magnetfeldes und stellt für die Beobachtung von Reaktionen i*n vitro* eine mögliche Alternative zu der Magnetrelaxometrie dar.

Die Messungen wurden mit den für die magnetischen Relaxationsmessungen hergestellten Streptavidin- und Antikörper-gekoppelten Eisenoxidpartikeln, im Labor der Group Ferrofluide (Prof. C. Bacri) der Universität Paris 7 (Université P. & M. Curie), durchgeführt. Bacri et al. [104] stellten bereits 1986 die Verwendung der Doppelbrechung magnetischer Nanopartikel zur Bestimmung der Partikelgröße und Verteilung vor.

8.1 Methode

Gemessen wird die Doppelbrechung Δn_0 eines Ferrofluids in einem äußeren Magnetfeld. Sie ist abhängig von der Anisotropie der Magnetnanopartikel. Wird das Ferrofluid in ein äußeres Magnetfeld gebracht, richten sich die Partikel bevorzugt in Richtung des Feldes aus und das Medium wird dadurch doppelbrechend. Dieses Phänomen wird als Cotton-Mouton-Effekt bezeichnet. Für eine verdünnte transparente monodisperse Probe gilt für die Doppelbrechung:

$$\Delta n_0(D) = \Delta n_s \left(\left(\frac{kT}{\mu H}\right) ctnh\left(\frac{\mu H}{kT}\right) + 3\left(\frac{kT}{\mu H}\right)^2 \right) \qquad \text{Gl. (12),}$$

wobei D den Partikeldurchmesser, k die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, μ das permanente magnetische Moment, H das Magnetfeld, und Δn_s die Sättigungs-doppelbrechung angibt, wenn alle Partikel im Feld ausgerichtet sind [104]. Ohne äußeres Magnetfeld sind die Partikel statistisch orientiert. Das Ferrofluid ist dann isotrop und daher nicht doppelbrechend.

Bacri et al. zeigten [104], dass die Doppelbrechung allein auf frei bewegliche Partikel zurückzuführen ist. Dafür wurden Magnetnanopartikel in eine Gelmatrix eingebettet und aufmagnetisiert. Es konnte die Magnetisierung, jedoch keine Doppelbrechung beobachtet werden. Dies bewies, dass unbewegliche Partikel nicht zur Doppelbrechung beitragen und dass die Doppelbrechung dielektrischer und nicht magnetischer Natur ist.

Da es sich bei der Rotation des gesamten Teilchens in einer Trägerflüssigkeit um die Brown-Relaxation handelt, hängt die Relaxation der Doppelbrechung nach Gl. (6) von dem

Volumen der Teilchen, der Viskosität und der Temperatur des Mediums ab. Aus den Relaxationskurven der Doppelbrechung können Aussagen über die hydrodynamische Teilchengröße und die Größenverteilung der Partikel gemacht werden [105]. Da den magnetooptischen Relaxationsmessungen der gleiche Relaxationsmechanismus wie den magnetischen Relaxationsmessungen zugrunde liegt, konnten für beide Verfahren die gleichen Magnetnanopartikel verwendet werden.

Aufbau und Messung

Der Aufbau für die magnetooptischen Relaxationsmessungen umfasst eine optische Bank, auf der ein Laser, ein Polarisator, eine Magnetisierungsspule in die eine Küvette mit der flüssigen Probe gebracht werden kann, ein Analysator und ein Detektor angeordnet sind. Die Abbildung 81 zeigt den Aufbau dieser Messapparatur.

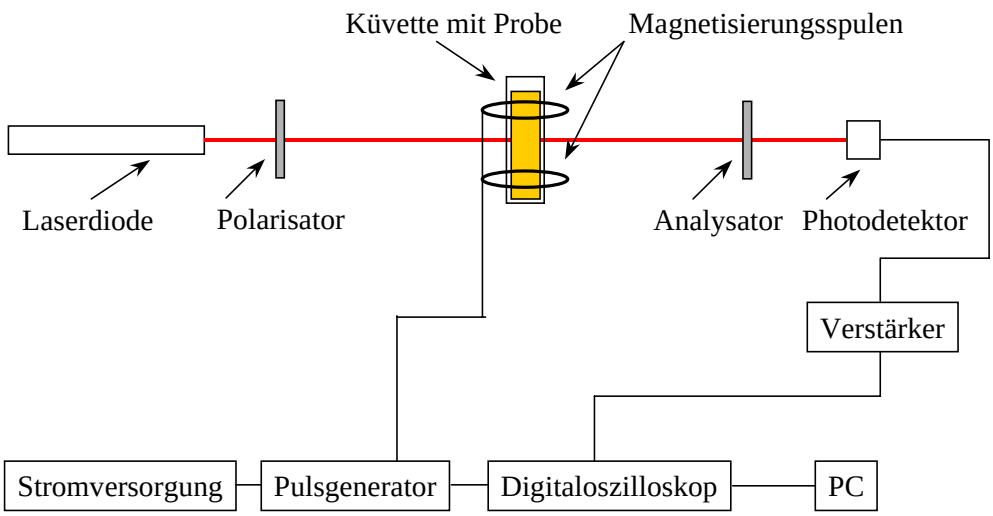


Abb. 81: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Messung der transienten magnetischen Doppelbrechung.

Die Magnetisierungsspule wird über eine Stromversorgung und einen Pulsgenerator angesteuert und das erhaltene Messsignal einem PC zur Auswertung zugeführt. Die verwendeten Küvetten (Hellma) bestanden aus Spezialglas mit einem Höchstvolumen von 1,0 ml.

Doppelbrechende Ferrofluide drehen die Polarisationsebene des Laserstrahls beim Durchgang durch die Probe. Die Bestimmung dieser Drehung erfolgt anschließend durch die Intensitätsmessung nach gekreuzten Polarisatoren. Bei der Messung einer Probe wird diese in der Küvette über einen definierten Zeitraum aufmagnetisiert und die

Doppelbrechung bzw. die Relaxation der Doppelbrechung nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes gemessen.

Im Vergleich zur magnetischen Relaxationsmessung liegt hier eine Entkopplung von magnetischer Anregung und optischer Messung vor, wodurch eine kontinuierliche Messung auch während der Magnetisierung der Probe möglich sein sollte.

Relaxationssignal

Das Relaxationssignal der Proben wurde während und nach der Magnetisierung der Proben aufgenommen. Abbildung 82 zeigt den zeitlichen Verlauf des Magnetpulses und das entsprechende Relaxationssignal einer Probe.

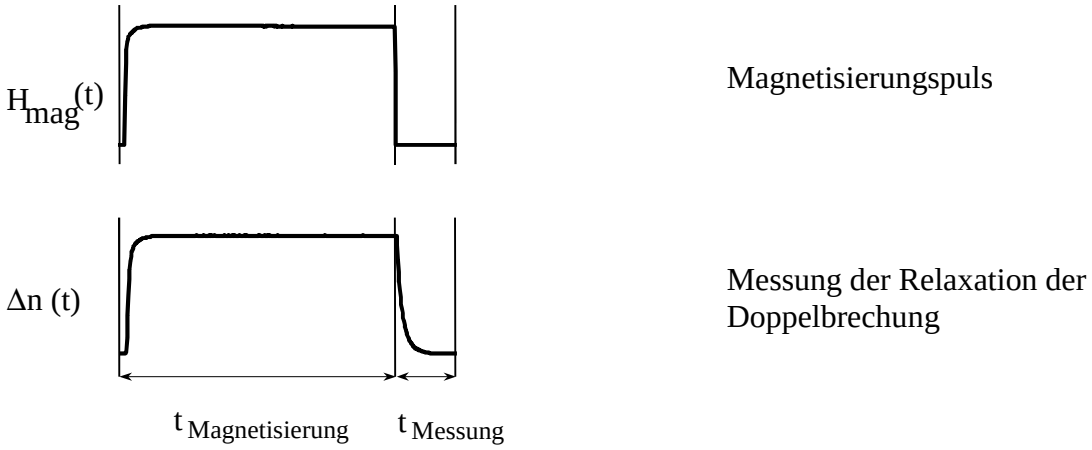


Abb. 82: Zeitlicher Verlauf des Magnetpulses und das zugehörige Relaxationssignal einer Ferrofluidprobe.

Das Signal wurde durch Kurvenanpassung mit verschiedenen Modellen (einfach- und doppelt-exponentieller Zerfall, s. Abschn. 2.3.3) ausgewertet. Wie bei den magnetischen Relaxationsmessungen wurden die Zeitkonstante und die Amplitude als Parameter für die Charakterisierung der Proben verwendet. Die Relaxationsamplitude ist ein Maß für die Anzahl der Nanopartikel in der Probe und die Relaxationszeit ist ein Maß für die Partikelgröße, d.h. je größer die Zeitkonstante, desto größer sind die detektierten Partikel. Dies gilt jedoch nur, solange die Magnetnanopartikel noch nach dem Brown-Mechanismus relaxieren.

Für die Untersuchungen wurden die magnetischen Eisenoxidpartikel verwendet. Nach der Bestimmung der Detektionsgrenze wurden Bindungsstudien mit den spezifisch bindenden Streptavidin- und Antikörper-gekoppelten Nanopartikeln in flüssiger Phase durchgeführt. Als Medien dienten Wasser, PBS und BSA-Puffer.

Bei allen Messungen wurde das folgende Schema eingehalten. Die Aufmagnetisierung der Probe erfolgte wiederholt über 2 ms mit einem Magnetpuls von 10 mT. Die Pause zwischen den Magnetpulsen betrug 20 ms. Die Relaxation der Doppelbrechung wurde

nach Abschalten des Feldes in der 20 ms Pause gemessen und zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses über 256 Messungen gemittelt. Das Probenvolumen betrug 1 ml.

8.2 Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des verwendeten Ferrofluids wurde eine Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 10^{-1}–10^{-6} mol Fe/L vermessen. Das Hintergrundsignal wurde mit einer Kontrollprobe (Wasser) bestimmt und ist in Abbildung 83 dargestellt.

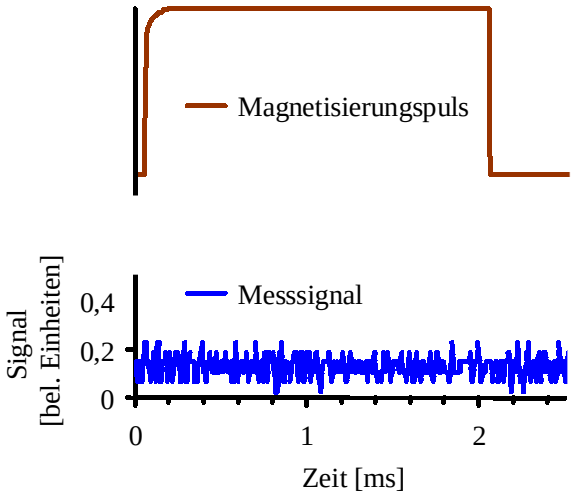


Abb. 83: Relaxationssignal von destilliertem Wasser.

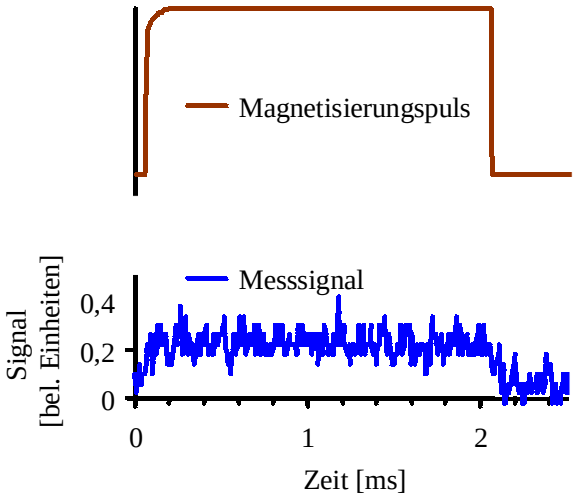


Abb. 84: Relaxationssignal der Probe mit einer Konzentration von 10^{-5} mol Fe/L.

Das destillierte Wasser zeigt kein Relaxationssignal. Die Nachweisgrenze des Ferrofluids liegt wie in Abbildung 84 gezeigt bei 10^{-5} mol Fe/L. In einem Probenvolumen von 1 ml sind bei dieser Konzentration 10 nmol Fe enthalten. Unter der Annahme, dass nur das im Laserstrahl befindliche Volumen von ca. 2 x 2 x 10 mm (40 µl) zum Signal beiträgt, ergibt sich damit eine Nachweisempfindlichkeit von 0,4 nmol Fe.

Bei allen Versuchen betrug das Probenvolumen 1 ml. Als Reaktionsmedium wurde BSA-Puffer verwendet.

8.3 Aggregationsassay

Bei den ersten Versuchen zur Detektion biologischer Bindungsreaktionen wurden Aggregationsassays mit der Streptavidin-Eisenoxid-Sonde durchgeführt, wobei wieder BSA-Biotin als quervernetzendes Agens diente. Die Veränderung des Relaxationssignals wurde in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Protein beobachtet.

Die Streptavidin-EO-Partikel wurden mit den angegebenen Mengen BSA-Biotin versetzt und die Relaxation der Doppelbrechung über einen Zeitraum von 30 min gemessen. Als Kontrolle diente eine mit Biotin (1 µg) gesättigte Sonde, bei der keine spezifische Reaktion mit dem Protein stattfinden konnte. In Abbildung 85 ist die Relaxationszeit vor und zu mehreren Zeitpunkten nach der Zugabe von BSA-Biotin dargestellt.

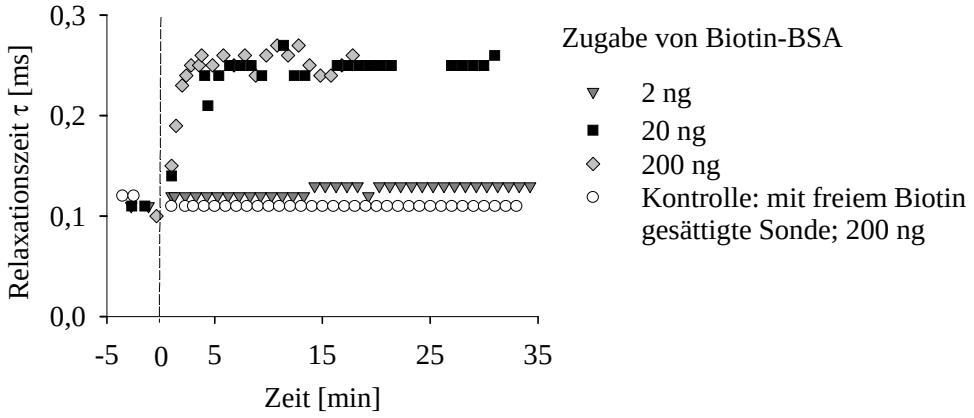


Abb. 85: Aggregationsassay: Relaxationszeit vor und nach der Zugabe von BSA-Biotin zu der magnetischen Sonde (Streptavidin-EO-Partikel, 490 nmol Fe) in BSA-Puffer, ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung.

Schon die Zugabe von 2 ng BSA-Biotin führte über den Beobachtungszeitraum zu einer nennbaren Zunahme der Relaxationszeit, also der Teilchengröße. Bei der Zugabe von 20 ng und 200 ng kam es zu einem sehr schnellen Anstieg der Relaxationszeit, wobei die 200 ng Probe bereits nach 2,5 min und die 20 ng Probe nach 5 min eine Sättigung aufwiesen. Die unveränderte Relaxationszeit der Kontrollprobe bestätigt die Spezifität der beobachteten Reaktion.

Die in Abbildung 86 dargestellte Relaxationsamplitude zeigt bei einer Reaktion der Streptavidin-Partikel mit BSA-Biotin dagegen einen abweichenden Kurvenverlauf. Die Reaktion der Sonde mit dem quervernetzenden Protein führt zu einer Abnahme der Amplitude.

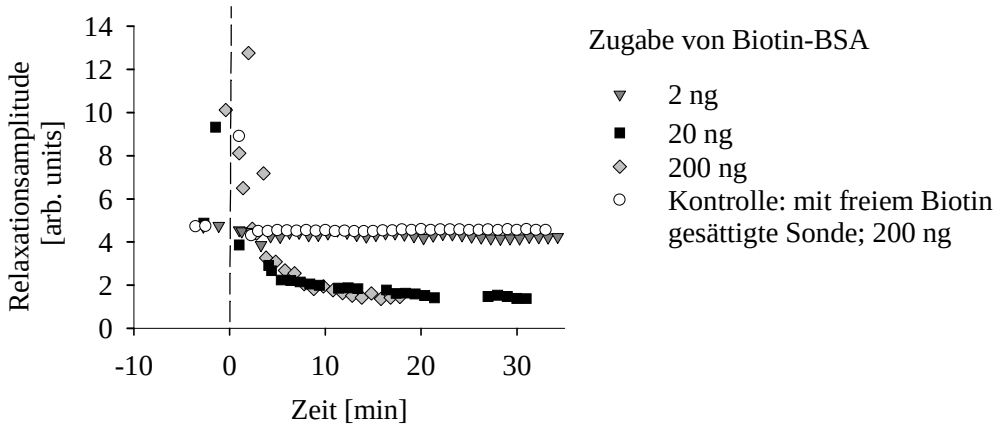


Abb. 86: Aggregationsassay: Relaxationsamplitude vor und nach der Zugabe von BSA-Biotin zu der magnetischen Sonde (Streptavidin-EO-Partikel, 490 nmol Fe) in BSA-Puffer, ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung.

8.4 Reaktion mit den biotinylierten Latexbeads

Die Bindungsfähigkeit der gleichen Sonde wurde auch mit biotinylierten Latexbeads (s. Abschn. 10.15) mit einem Durchmesser von 1 µm, 200 nm und 40 nm untersucht. Als Probe diente die kurze Sonde, für die Kontrollen wurde diese wiederum mit freiem Biotin gesättigt. Die Sonde wurde vorgelegt und vermessen. Anschließend wurden zunächst 1 x 10^6 Beads zu der Probe gegeben, die Probe vermessen und nach weiteren 5 min zusätzlich 9 x 10^6 Beads (insgesamt 1 x 10^7) zugegeben und erneut gemessen. Die Abbildung 87 zeigt die Relaxationszeiten der Sonde vor und nach Zugabe der Beads.

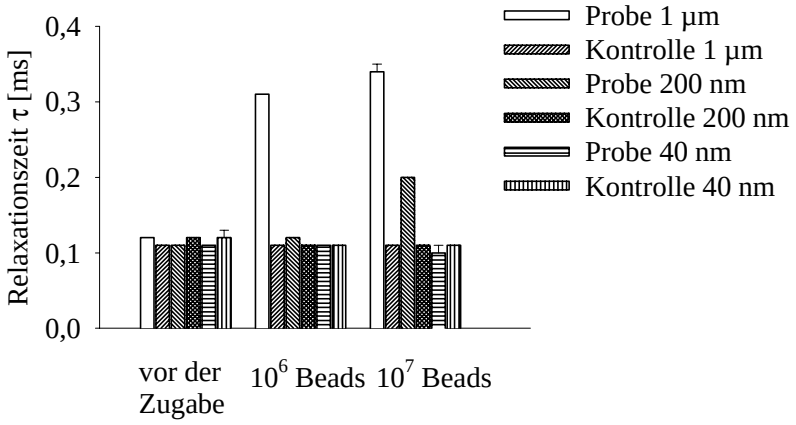


Abb. 87: Relaxationszeit vor und nach der Zugabe der Beads zu der magnetischen Sonde (Streptavidin-EO-Partikel, 490 nmol Fe), ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung (MW ± SD, n = 2).

Bei der Verwendung der Beads mit einem Durchmesser von 1 µm konnte eine deutliche Zunahme der Relaxationszeit beobachtet werden. Die weitere Zugabe von 1 x 10^8 Beads führten zu einer weiteren geringfügigen Zunahme der Relaxationszeit der Sonde. Bei den

200 nm Beads führte erst die Zugabe von 10^7 Beads zu einer erkennbaren Veränderung der Relaxationszeit. Sowohl bei den 1 µm Beads als auch den 200 nm Beads ging die Zunahme der Relaxationszeit mit einer deutlichen Abnahme der Amplitude einher. Die Zugabe der 40 nm Beads führte dagegen zu keiner signifikanten Änderung der Relaxationszeit und -amplitude.

8.5 Bestimmung von verschiedenen Antigenen in flüssiger Phase

Nachdem mit den vorangehenden Experimenten gezeigt werden konnte, dass sich diese neue Methode zur Bestimmung von Bindungsreaktionen eignet, wurden, entsprechend der magnetrelaxometrischen Flüssigphasenassays (s. Abschnitt 7), Versuche mit Antikörper-gekoppelten magnetischen Nanopartikeln zur Bestimmung von immunologisch relevanten Antigenen (humanes IgG und DSPA) durchgeführt.

Nachweis von humanem Immunglobulin G

Die lange Anti-human-IgG-EO-Sonde wurde vorgelegt und unterschiedliche Mengen des humanen IgGs zugegeben. Die Relaxationszeit wurde vor der Zugabe und während der Inkubation der Sonde mit dem Antigen bestimmt. Analog zu den obigen Messungen wurden die Parameter Relaxationsamplitude und –zeit in Abhängigkeit von der Zugabe des Antigens ermittelt.

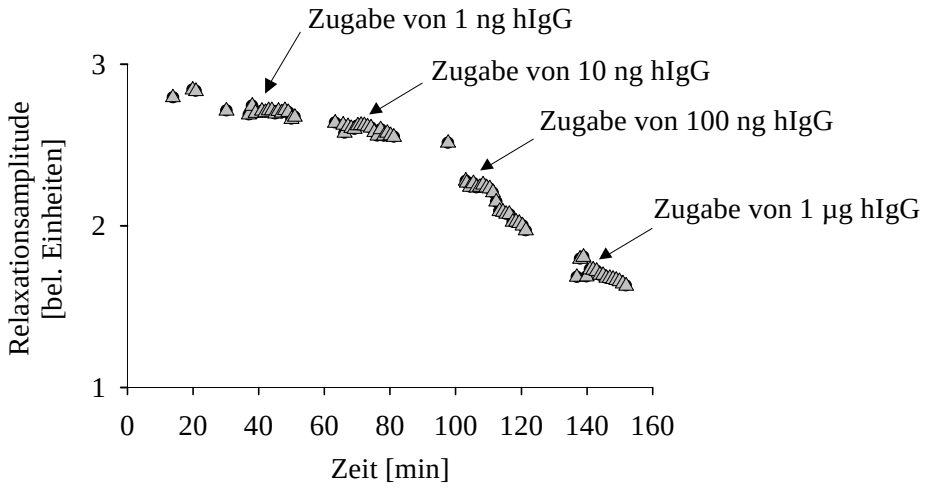


Abb. 88: Relaxationsamplitude vor und nach der Zugabe des humanen IgGs zu der magnetischen Sonde (Anti-human-IgG(H+L)-EO-Partikel, 100 nmol Fe) ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung.

Abbildung 88 zeigt, dass bereits durch die Zugabe von 1 ng Antigen eine nachweisbare Agglomeration der Partikel zu beobachten ist, die sich in einer Abnahme der Relaxations-amplitude äußert.

Ein weiterer Assay wurde mit der langen Sonde (Anti-human-IgG(H+L)-EO-Partikel) durchgeführt. In diesem Fall wurde das Antigen nicht in steigender Konzentration zugegeben, sondern eine Probe für jede Konzentration hergestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit und das Ausmaß der Bindung wurden wie bisher bestimmt. Abbildung 89 zeigt die prozentuale Änderung Relaxationszeit.

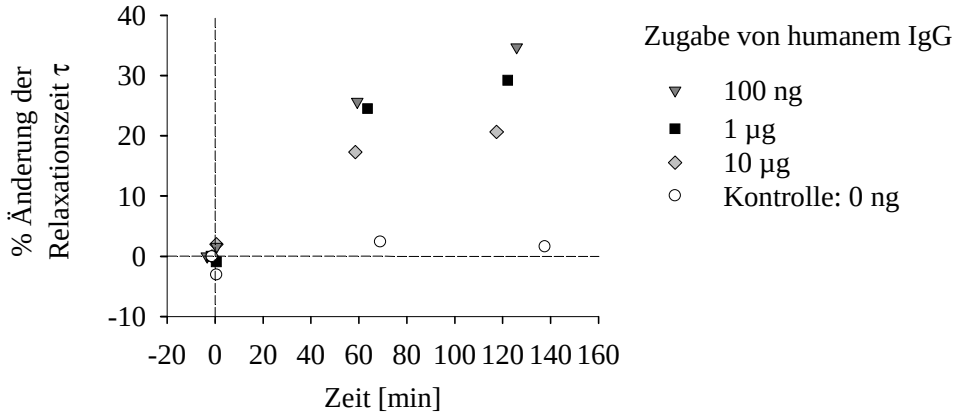


Abb. 89: Relaxationszeit vor und nach der Zugabe des humanen IgGs zu der magnetischen Sonde (Anti-human-IgG(H+L)-EO-Partikel, 100 nmol Fe) ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung.

Durch die Bindung des Antigens kommt es wieder zu einer Relaxationszeitveränderung der Sonde. Dieser Effekt ist jedoch nicht monoton abhängig von der Menge an humanem IgG. Die stärkste Veränderung wurde bei der Zugabe von 100 ng beobachtet. Die stabilen Messsignale der Kontrollen bestätigen die Spezifität der beobachteten Bindung.

Bestimmung von DSPA

Die Bestimmung von DSPA erfolgte wie die Bestimmung des hIgGs. Die lange Sonde (Anti-DSPA-EO) wurde vorgelegt und es wurde DSPA bzw. humanes IgG als Kontrolle zugegeben. Abbildung 90 zeigt die Veränderung der Relaxationszeit.

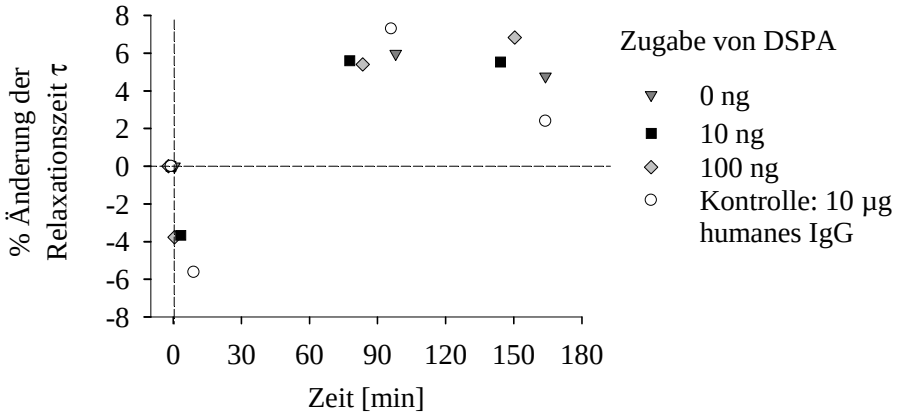


Abb. 90: Relaxationszeit vor und nach der Zugabe von DSPA zu der magnetischen Sonde (Anti-DSPA-EO-Partikel, 100 nmol Fe), ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung.

Bei allen Proben ist zunächst eine deutliche Abnahme der Relaxationszeit direkt nach der Zugabe des Antigens zu erkennen. Nach ca. 90 min erfolgt dann eine deutliche Zunahme der Relaxationszeit bei allen Konzentrationen sowie der Kontrolle. Es konnte daher auch mit dieser Methode, wie auch schon bei den MRX-Messungen, DSPA mit einem homogenen Flüssigphasenasassay nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Bestimmung eines biotinylierten Primers

Des Weiteren wurde versucht, einen biotinylierten Primer (1000 Da) mit dieser neuen Methode nachzuweisen. 490 nmol der kurzen Sonde wurden vorgelegt, vermessen und Primer in steigender Menge von 1 ng bis 1 µg zugegeben. Abbildung 91 zeigt den Verlauf der Reaktion.

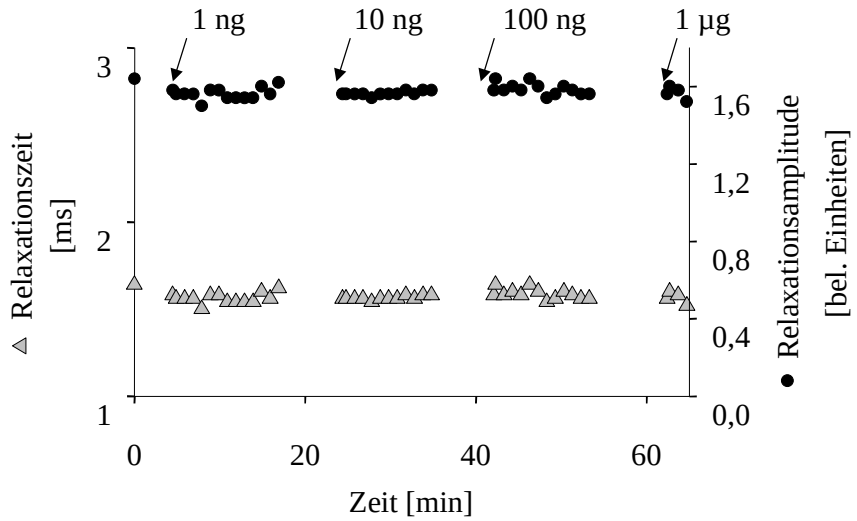


Abb. 91: Relaxationszeit vor und nach der Zugabe des biotinylierten Primers zu der magnetischen Sonde (Streptavidin-EO-Partikel, 490 nmol Fe), ermittelt durch eine einfach exponentielle Kurvenanpassung.

Es konnte keine Veränderung der Relaxationszeit oder –amplitude festgestellt werden.

8.6 Diskussion

Bei den magnetooptischen Relaxationsmessungen liegt im Vergleich zu den magnetischen Relaxationsmessungen eine Entkopplung der magnetischen Anregung und der optischen Messung vor, wodurch eine kontinuierliche Messung auch während der Magnetisierung der Probe möglich ist. Hieraus ergeben sich viele Vorteile: Es gibt keine Totzeit, die bei den magnetischen Relaxationsmessungen noch bei 250 µs liegt, und es gibt kein instabiles Leersignal, das bei den MRX-Messungen alle 30 min gemessen werden musste und zur korrekten Kompensation der Daten herangezogen wurde. Des Weiteren ist bei der Messung der optischen Relaxation der Probe eine magnetische Schirmung unnötig.

Gegenüber der PCS werden bei der magnetooptischen Messung selektiv die Magnetnanopartikel bestimmt. Hochmolekulare Pufferbestandteile (wie z.B. Proteine), die PCS-Messungen erheblich beeinflussen können, stören die optischen Relaxations-messungen nicht, solange sie nicht zu einer verstärkten Absorption des Lichtes führen.
Die bei den Aggregationsassays beobachtete Zunahme der Relaxationszeit in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an quervernetzendem BSA-Biotin korreliert mit den magnetrelaxometrischen Messergebnissen. Bei der Relaxationsamplitude wurde jedoch im Gegensatz zu den MRX-Messungen eine Abnahme der Amplitude festgestellt. Da die Amplitude ein Maß für die MNP in dem gemessenen Zeitfenster darstellt, muss angenommen werden, dass infolge der Größenzunahme der Partikel, diese nicht mehr im Zeitfenster der Messung erfasst werden können. Das bedeutet, dass die Agglomeration so stark ist, dass die Partikel nicht mehr nach Brown, sondern nach Néel relaxieren. Der Néel-Anteil wird mit dieser Methode nicht erfasst. Der Unterschied der Relaxationszeiten bzw. –amplituden ist jedoch zwischen 20 ng und 200 ng sehr gering und daher sind die beiden Konzentrationen schwerer voneinander zu trennen als bei den MRX-Messungen.

Bei den durchgeführten Flüssigphasenassays zeigte die Bindungsreaktion der magnetischen Anti-human-IgG-Sonde mit dem humanen IgG den typischen Verlauf einer Präzipitationskurve [100]. Dagegen konnte die Reaktion des DSPAs wie auch des biotinylierten Primers mit der entsprechenden Sonde nicht detektiert werden. Die Ursache für das Ausbleiben einer Teilchengrößenveränderung ist nicht bekannt. Für das DSPA wurden einige mögliche Gründe in Abschnitt 7.3 bereits diskutiert. Beim Primer kann das Ausbleiben von messbaren Veränderungen entsprechend auf die Größe oder den gewählten Konzentrationsbereich zurückgeführt werden.
Der Reaktionsverlauf der konzentrations- und zeitabhängigen Bindungsreaktionen konnte empfindlich bestimmt werden, jedoch war mit der MRX zwischen den einzelnen Konzentrationen des Antigens eine besser Differenzierung möglich. Die aus den optischen Relaxationsmessungen ermittelten Zeitkonstanten waren in der Tendenz den MRX-Messungen gleich, jedoch systematisch kleiner. Dies lässt sich durch die nicht vorhandene Totzeit erklären, da durch die sofortige Messung der Relaxation nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes zusätzlich die kleinen Magnetnanopartikel, die innerhalb der ersten 250 µs relaxieren, erfasst werden. Die mittlere Relaxationszeit reduziert sich entsprechend.

Es wäre weiterhin denkbar, mit dieser Methode auch Festphasenassays durchzuführen. Als feste Phase könnte im ersten Schritt, ohne die Apparatur verändern zu müssen, die

Küvettenwand verwendet werden. Der Inkubation des Fangantikörpers und des Antigens würde die Zugabe der Sonde (Detektionsantikörper gebunden an die Magnetnanopartikel) folgen. Die Bindung der Sonde könnte dann optisch durch die Abnahme der Relaxationsamplitude verfolgt werden, da die magnetischen Nanopartikel durch die Bindung dem Detektionsvolumen entzogen werden würden. Die gebundenen Partikel, die sich an der Wandung der Küvette und damit partiell im Laserstrahl befinden, sollten, da sie nach Néel relaxieren, keine Störsignale erzeugen.

8.7 Zusammenfassung

Die Magnetoopische Detektionsmethode wurde im Verlauf dieser Arbeit als weiteres *in vitro* diagnostisches Verfahren entwickelt. Mit diesem Verfahren wird die Relaxation der Doppelbrechung magnetischer Nanopartikel gemessen, die als Maß für die Reorientierung der magnetischen Nanopartikel in einer Probe nach Abschalten eines äußeren Magnetfeldes steht.

Die Nachweisgrenze des verwendeten Messplatzes liegt für die untersuchten Magnetnanopartikel bei 10^{-5} mol Eisen/L. Dies entspricht einer tatsächlich nachgewiesenen Menge von 0,4 nmol Eisen. Die Nachweisempfindlichkeit liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die der Magnetrelaxometrie. Die Kontrollprobe zeigte kein Relaxationssignal, wodurch sich bestätigte, dass diese Methode kein Hintergrund- oder Leersignal aufweist.

Die Verwendbarkeit der Methode zur Detektion von spezifischen Bindungsreaktionen konnte zunächst an einem Aggregationsassay mit BSA-Biotin und der Streptavidin-Eisenoxid-Sonde nachgewiesen werden. Die Bindungsreaktion zeigte einen konzentrations- und zeitabhängigen Verlauf. Die Detektion von humanem IgG zeigte einen Bestimmungsbereich von 100 ng – 10 µg, bezogen auf die eingesetzte Menge Sonde. DSPA sowie der biotinylierte Primer konnten dagegen nicht nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass auch mit dieser Methode Bindungsreaktionen in flüssiger Phase konzentrationsabhängig bestimmt werden können.

9 Zellversuche

Eine weitere Überprüfung der *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie sollte mit Hilfe von Zellexperimenten durchgeführt werden, da diese den ersten Schritt zur Beobachtung von Bindungsreaktionen an lebenden Membranen bzw. Oberflächen darstellen. Der Versuch sollte gleichzeitig die Detektion von gebundenen MNP an Blutzellen *in vivo* mimen, um Eigenschaften dieser Bindung für weiterführende Experiment zu untersuchen. Aufgrund der Größe der Zellen (um 10 µm) sollten diese als feste, unbewegliche Phase betrachtet werden können, so dass angenommen wurde, dass durch die Bindung der magnetischen Partikel an die Oberfläche der Zellen eine Néel-Relaxation messbar sein sollte.

Die ersten denkbaren *In vivo*-Experimente am Tier wären die Gewinnung und magnetische Markierung von Blutzellen und die anschließende Reinjektion dieser Zellen ins Tier, um sie dort magnetrelaxometrisch zu verfolgen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Injektion der spezifischen Sonden und die Beobachtung der Bindung an ihr Zelltarget *in vivo*.

Als Modell wurden $CD4^+$-Zellen verwendet, die magnetisch-markiert und magnetrelaxometrisch vermessen werden sollten. Dafür wurden frische Lymphozyten aus Vollblut isoliert und um von Blutspenden unabhängig zu sein, auch die CD4 positive Zelllinie, U 937, verwendet. Als Markierung wurden sowohl magnetische Anti-human-CD4-Sonden als auch Streptavidin-Sonden mit biotinylierten Antikörpern verwendet. Die Eigenschaften des CD4-Oberflächenantigens (T4, Leu3a, OKT4) auf Lymphozyten und der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie wurden bereits von verschiedenen Gruppen ausführlich untersucht und ist im Abschnitt 10.15 genauer beschrieben.

Zur Charakterisierung der Zellen sowie Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Antikörper wurden die Oberflächenantigene der verwendeten Zellen Fluoreszenz-markiert und mit dem FACS (Fluorescence activated cell sorter, Durchflußzytometrie) analysiert. Bei einer FACS-Analyse werden unterschiedliche Zellpopulationen einer Probe anhand ihrer Größe, ihrer Granularität und ihrer Fluoreszenz identifiziert. Die gemessene Fluoreszenz erlaubt die Zuordnung zu einem bestimmten Oberflächenantigen. Die genannten Parameter werden simultan gemessen, so dass Zellen gleicher Morphologie über Mehrfarben-fluoreszenzmessungen differenziert werden können. B-, T- und NK-Zellen haben z.B. eine

fast identische Morphologie, unterscheiden sich jedoch in ihren Oberflächenantigenen, wodurch sie durch die Verwendung von spezifischen fluoreszenz-markierten Antikörper

unterschieden werden können. Das Prinzip von FACS-Messungen, die Auswertung und die Darstellung der Daten sind im Abschnitt 10.13.3 beschrieben.

9.1 Charakterisierung der U 937-Zelllinie

Zunächst wurde die U 937-Zelllinie charakterisiert und die zu verwendenden Antikörper und -konzentrationen sowie die Versuchsbedingungen untersucht. Es konnte mit Hilfe von FACS-Analysen nachgewiesen werden, dass U 937 die Oberflächenantigene CD4 (T-Helferzellen) und CD14 (Monozyten) expremiert, jedoch nicht CD3 (T-Lymphozyten), CD19 (B-Zellproliferation), CD8 (zytotoxische T-Zellen), CD45 (Leukozyten), CD16 und CD56 (Neutrale Killerzellen). Des Weiteren wurde die Bindungsfähigkeit verschiedener Anti-hCD4-Antikörper untersucht, um anschließend für alle Versuche den gleichen biotinylierten Maus-IgG_1-Anti-hCD4-Antikörper und als Isotypkontrolle einen unspezifischen biotinylierten Maus-IgG_1-Antikörper (s. Abschn. 10.15) einsetzen zu können. Die optimalen Konzentrationen des ausgewählten biotinylierten Anti-hCD4-Antikörpers und des mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Fluoreszenz-markierten Extravidins wurden austitriert. Das Ergebnis der FACS-Messung ist in Abbildung 92 wiedergegeben.

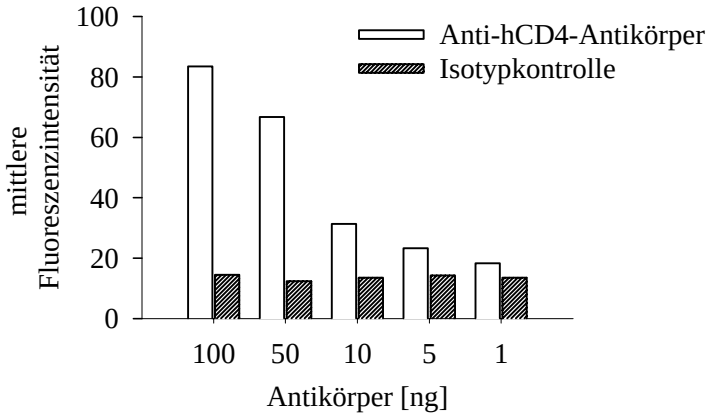


Abb. 92: Titration der Antikörperkonzentration für die U 937-Zelllinie. Dargestellt ist der Median der mittleren Fluoreszenzintensität (FL-1) als Funktion der Antikörperkonzentration.

Die Zellproben, die mit dem Anti-hCD4-Antikörper inkubiert wurden, zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der zugesetzten Menge an Antikörpern (s. Abb. 92). Die Kontrollproben zeigen dagegen eine von der eingesetzten Antikörperkonzentration unabhängige Fluoreszenz mit einem Mittelwert von 13,7 ± 0,8 (n = 5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich hier vielleicht nur um die Bindung des Extravidin-FITC handelt, da dieses in einer gleichbleibenden Konzentration eingesetzt

wurde. In den weiteren Versuchen wurden 100 ng Antikörper 0,5 µl Extravidin-FITC verwendet.

Bindungsfähigkeit der Antikörper an fixierte Zellen

Da die Zellen für die magnetrelaxometrischen Versuche einige Stunden gelagert werden mussten, wurde untersucht, ob auch fixierte Zellen für die Bindungsstudien verwendet werden können. Um ein schlechtes Bindungsverhalten aufgrund von möglichen Oberflächenveränderungen durch die Lagerung ausschließen zu können, wurden Zellproben mit CellFIX oder Glutaraldehyd 15 min bei 0°C fixiert und dann - wie bisher - mit den Antikörpern und Extravidin-FITC markiert und anschließend mittels FACS vermessen. In der Literatur gilt Glutaraldehyd als ein fixierendes Agens, bei dem die Zellmorphologie im Allgemeinen gut erhalten bleibt.

Der Median der Fluoreszenz der nicht fixierten Zellen wurde auf 4-5 eingestellt und alle Zellproben mit der gleichen Geräteeinstellung vermessen. Bei den mit Glutaraldehyd fixierten Zellen konnte keine Fluoreszenz und daher keine Bindung der Fluoreszenz-markierten Antikörper an die Zellen detektiert werden. Der Median der Fluoreszenz der mit CellFIX fixierten Zellen lag für den spezifischen Antikörper vor der Fixierung bei 181 und zeigte nach der Fixierung eine etwas geringere mittlere Fluoreszenz von 71. Das Ausbleiben der Fluoreszenz nach der Glutaraldehyd-Fixierung lässt sich auf eine zu starke Veränderung der Morphologie des Epitopes durch das Glutaraldehyd zurückführen. Bei der CellFIX-Fixierung konnte eine reduzierte, jedoch ausreichende Bindung des Antikörpers bestimmt werden. Die Fixierung der Zellen wurde daher immer mit CellFIX vorgenommen.

Bindungsfähigkeit der Streptavidin-Sonden an mit einem biotinylierten Antikörper markierte und bei 0°C gelagerte Zellen

Da magnetrelaxometrische Bindungsstudien mit der Streptavidin-EO-Sonde durchgeführt werden sollten, wurde des Weiteren überprüft, ob die Lagerung von bereits mit biotinylierten Antikörpern markierten Zellen über einen Tag möglich ist, ohne dass es beispielsweise zu einer Internalisierung oder Abwerfen (shedding) der Antikörper kommt. Dafür wurden Zellproben mit dem biotinylierten Anti-hCD4-Antikörper markiert, über einen Zeitraum von 7 h kühl gelagert und anschließend mit Extravidin-FITC Fluoreszenz-markiert. Es wurden je vier Zellproben mit dem biotinylierten Anti-hCD4-Antikörper, mit dem biotinylierten Kontrollantikörper und ohne Antikörper hergestellt. Um einen direkten Vergleich der Bindungsfähigkeit des Extravidins zu erhalten, wurde die Hälfte der Proben

sofort Fluoreszenz-markiert. Die zweite Hälfte der Proben wurde entsprechend nach 7 h Lagerung bei 0-4°C markiert. Abbildung 93 zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der Proben.

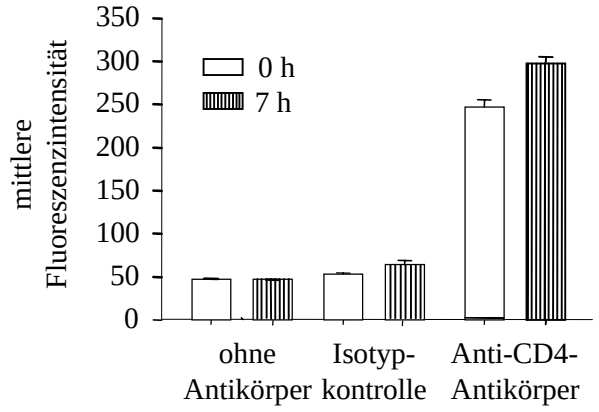


Abb. 93: Bindungsfähigkeit des Extravidin-FITC (FL-1) an mit biotinylierten Antikörpern markierte, nicht fixierte Zellen, sofort und nach 7 h Lagerung bei 0-4°C, (MW ± SD, n = 2).

Die nicht markierten Zellen wurden auf eine grüne Fluoreszenz mit einem Median von ca. 50 eingestellt. Die mittlere Fluoreszenz der Proben ist nach 7 h nur leicht reduziert im Vergleich zu den gleich (0 h) Fluoreszenz markierten Zellen. Die Zellen konnten daher ohne Fixierung über einen Zeitraum von 7 h bei 0°C für magnetrelaxometrische Bindungs-studien eingesetzt werden.

9.2 Bindungsfähigkeit der hergestellten magnetischen Sonden

Die Bindungsfähigkeit der hergestellten Anti-human-CD4-CF-III- und -EO-Sonden an das CD4-Oberflächenantigen sowie die Bindungsfähigkeit der Streptavidin-EO-Sonden an die mit dem biotinylierten Anti-hCD4-Antikörper markierten Zellen wurde sowohl für die $CD4^+$-T-Lymphozyten als auch die U 937-Zelllinie überprüft.

Die Lymphozyten wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (s. Abschn. 10.13.1) aus Vollblut gewonnenen und die $CD4^+$-Zellen magnetisch markiert. Aus dem heterogenen Zellgemisch wurden durch eine magnetische Zellseparation die $CD4^+$-Zellen isoliert. Als Vergleichssonden wurden stets Nanopartikel der Firma Miltenyi Biotec eingesetzt. Eine Liste der Nanopartikel befindet sich im Anhang. Die magnetische Zellseparation, auch "High gradient magnetic cell separation" (HGMS) genannt, stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Gewinnung einer spezifischen Zellpopulation aus einem heterogenen Zellgemisch dar, mit der auch Zellen geringer Konzentration mit hoher Reinheit gewonnen werden können. Das Prinzip der Methode beruht auf der Gewinnung von magnetisch-markierten Zellen innerhalb eines starken Magnetfeldes (s. Abschn. 10.13.2).

Um anschließend die Reinheit der gewonnenen Zellpopulation bestimmen zu können, wurden die Zellen gleichzeitig Fluoreszenz-markiert. Die Markierung der Lymphozyten erfolgte mit der Zweifarbenfluoreszenz (Anti-hCD4-Phycoerythrin (PE, Rot)-Antikörper, Anti-CD3-Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Grün)-Antikörper). Mit Hilfe einer FACS-Analyse konnten die T-Helferzellen anhand ihrer Oberflächenantigene ($CD3^{+}/CD4^{+)}$ identifiziert werden.

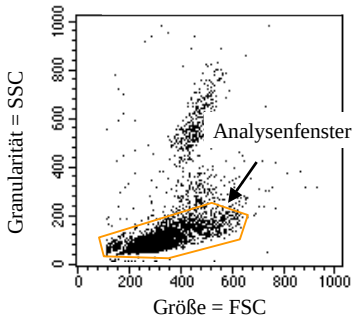
Von der U 937-Zelllinie wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der an die Zellen gebundenen magnetischen Nanopartikel angefertigt, da fast alle Zellen die gewünschten Oberflächenantigene tragen und somit für eine magnetische Separation die Negativkontrolle fehlen würde.

9.2.1 Isolierung von $CD4^{+}$-Lymphozyten aus Vollblut

Wie bereits kurz erläutert, wurden zunächst die Lymphozyten aus Vollblut mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, mit den Anti-hCD4-Sonden magnetisch-markiert und dann mit den CD3-FITC/CD4-PE-Antikörpern Fluoreszenz-markiert. Anschließend wurden die $CD4^{+}$-T-Helferzellen durch eine magnetische Zellseparation isoliert. Die Reinheit der gewonnenen Zellpopulation wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt. Es wurden die magnetisch-markierten Anti-hCD4-Antikörper (Anti-hCD4-CF-III-Sonde, s. Abschn. 4) und zum Vergleich die von der Firma Miltenyi hergestellte Anti-hCD4-Sonde (Anti-hCD4-Miltenyi, Miltenyi-Sonde) eingesetzt (s. Abschn. 10.13.2, Versuchsbedingungen).

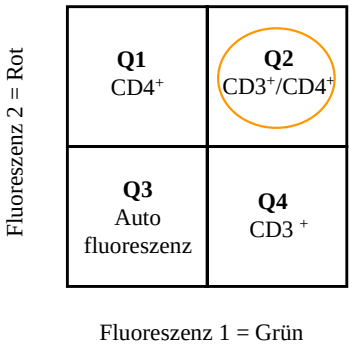
FACS-Analysen

Die Ausgangspopulationen sowie die Zellen der Waschlösungen und der Eluate wurden am FACS vermessen. Das Ergebnis der Lymphozytenseparation mit der Anti-hCD4-CF-Sonde im Vergleich zur Miltenyi-Sonde ist in Abbildung 94 dargestellt.

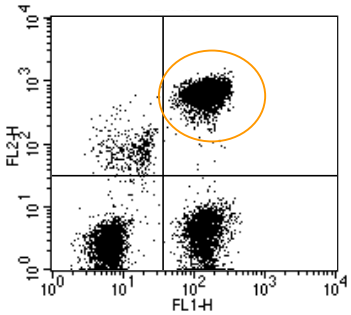


90 % der Zellen befinden sich im Analysenfenster

Ausgangsmaterial: Mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Zellpopulation.



Quadrantenanalyse

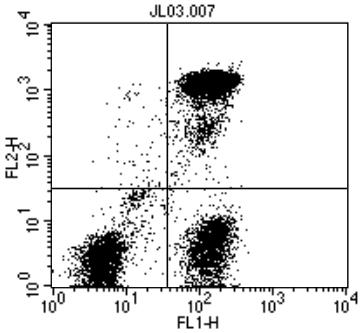


Q1: 4,4 % Q2: 46 %
Q3: 26 % Q4: 24 %

Ausgangsmaterial: Zellen des Analysenfensters im Fluoreszenz-Dot Plot aufgetragen.

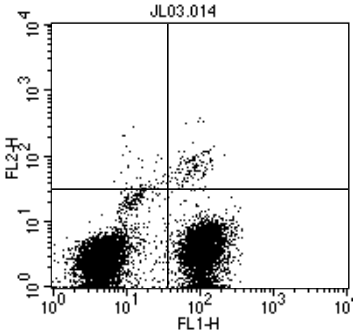
Waschfraktion

Isotypkontrolle



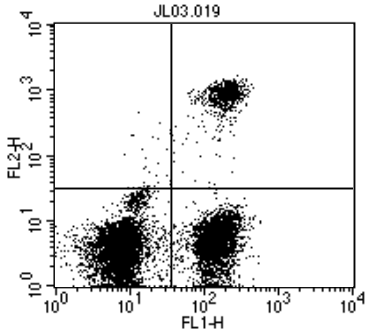
Q1 : 1 % Q2 : 48 %
Q3 : 27 % Q4 : 24 %

Anti-hCD4-Miltenyi-Sonde



Q1 : 0,6 % Q2 : 1,4 %
Q3 : 53 % Q4 : 45 %

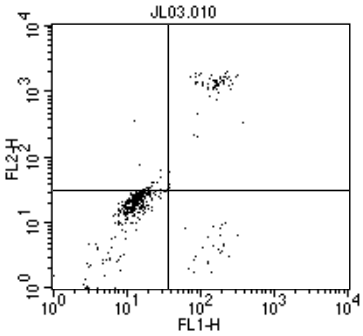
Anti-hCD4-CF-III-Sonde



Q1 : 0,4 % Q2 : 10 %
Q3 : 57 % Q4 : 34 %

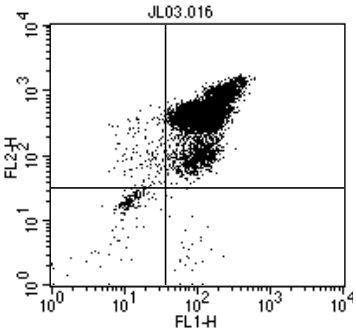
Eluate

Isotypkontrolle



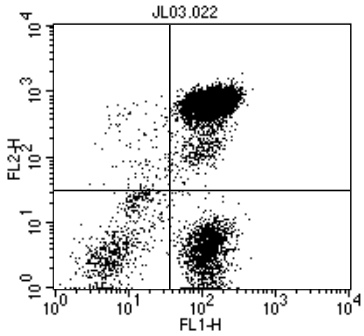
Q1 : 5,7 % Q2 : 12,5 %
Q3 : 77 % Q4 : 5 %

Anti-hCD4-Miltenyi-Sonde



Q1 : 7,8 % Q2 : 96 %
Q3 : 2,1 % Q4 : 0,4 %

Anti-hCD4-CF-III-Sonde



Q1 : 1,5 % Q2 : 73 %
Q3 : 8,1 % Q4 : 18 %

Abb. 94: FACS-Analyse der magnetisch separierten Lymphozyten. Quadrantenanalysen der Waschlösungen und Eluate, Sonden: Anti-hCD4-CF-II- und der Anti-hCD4-Miltenyi-Partikel.

Die Quadrantenanalysen zeigen, dass eine Anreicherung der $CD3^+/CD4^+$ Zellen sowohl unter dem Einsatz der Milteny-, wie auch der CF-Sonde stattgefunden hat. Die Bindungsfähigkeit der Anti-hCD4-CF-III-Sonde konnte damit bewiesen werden. Die isolierte Zellenpopulation wies jedoch bei der Verwendung der Miltenyi-Markierung im Vergleich zu der selbst hergestellten Sonde eine höhere Reinheit auf.

In einem weiteren Versuch wurde die Bindungsfähigkeit der Streptavidin-EO-Sonde mit Hilfe einer magnetischen Separation von $CD4^+$-Lymphozyten ermittelt. Hierzu wurden erneut Lymphozyten mit der Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen, mit dem biotinylierten Anti-hCD4-Antikörper inkubiert und nach einem Waschschritt mit der Streptavidin-EO-Sonde versetzt. Nach der CD3/CD4-Fluoreszenzmarkierung wurden die Zellen gewaschen, magnetisch gereinigt und mit dem FACS vermessen (s. Abschn. 10.13.2, Versuchsbedingungen). Abbildung 95 zeigt das Ergebnis der magnetischen Separation in Form einer Quadrantenanalyse.

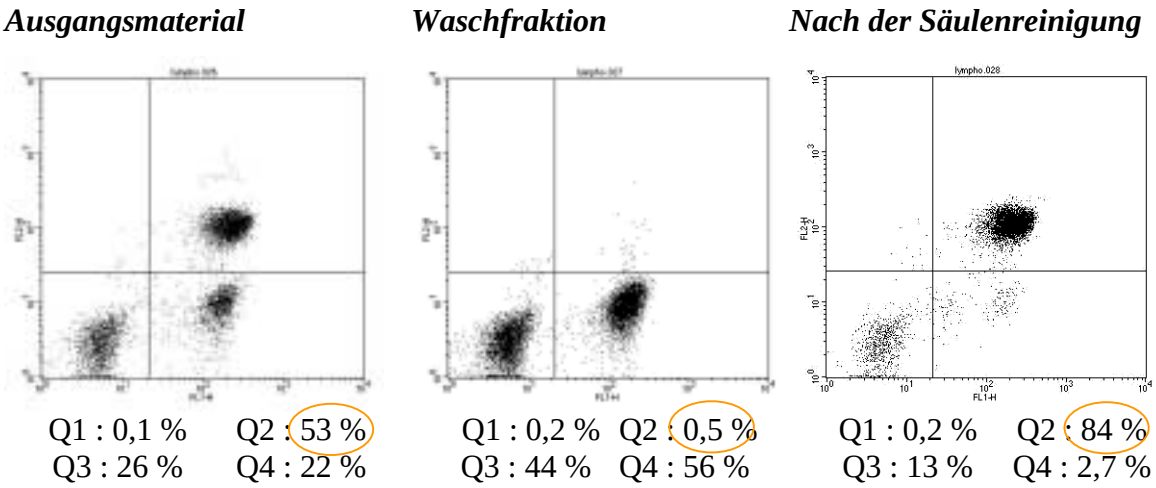


Abb. 95: FACS-Analyse der magnetischen Separation von Lymphozyten mit der Streptavidin-EO-Sonde.

Eine magnetische Separation mit der Streptavidin-EO-Sonde führte ebenso zu einer Anreicherung der CD3/CD4 positiven Zellen in einer Reinheit von 84 %.

9.2.2 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen

Um die Bindung der Streptavidin-EO-Sonde an die U 937-Zellen zu zeigen, wurden elektronenmikroskopische Bilder erstellt. Zwei Zellproben wurden mit dem spezifischen biotinylierten Anti-hCD4-Antikörper sowie der Isotypkontrolle inkubiert und anschließend mit den Streptavidin-EO-Partikeln markiert. Eine dritte Zellprobe wurde ohne Markierung vorbereitet. Die Zellen wurden fixiert, in Agar eingebettet und anschließend die Lipidmembran durch eine Osmiumoxid schwarz angefärbt. Daran schloss sich eine

Uranylacetatblockkontrastierung an. Zur Entwässerung der Zellen wurde sie einer steigenden Alkoholreihe ausgesetzt und im letzten Schritt in Epon (Harz) eingebettet. Aus diesem Zell-Epon-Block wurden die Mikrotomschnitte und eine Schnittkontrastierung mit Bleiacetat vorgenommen. Das genaue Protokoll ist im Abschnitt 10.14.1 angegeben. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme der mit den Anti-hCD4-Antikörpern inkubierten und magnetisch markierten Zellen ist in Abbildung 96, eine Vergrößerung des markierten Bereichs III in Abbildung 97 dargestellt.

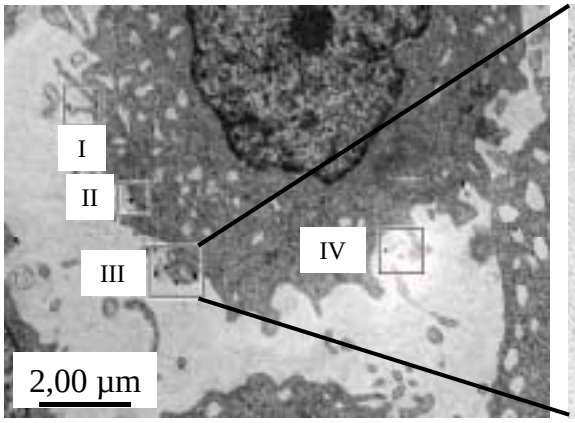


Abb. 96: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit den biotinylierten Anti-hCD4-Antikörpern und den Streptavidin-EO-Partikeln markierten U 937 Zellen.

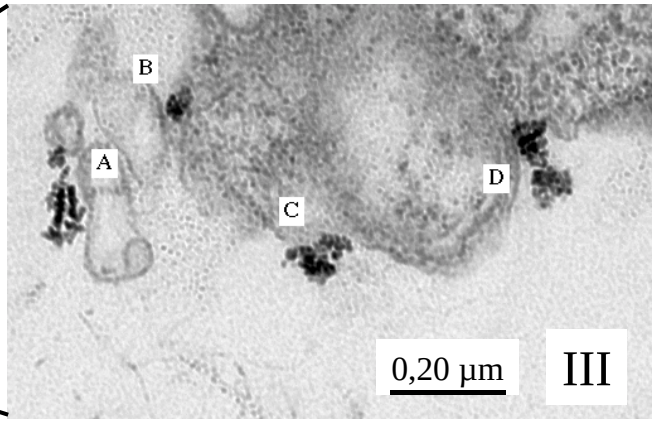


Abb. 97: Vergrößerung des Bereiches III des linken Bildes. An der Zellwand befinden sich in den markierten Bereichen: A, B, C, D aggregierte magnetische Nanopartikel.

Die Bilder zeigen Magnetnanopartikel-Aggregate auf der Zelloberfläche der Zelllinie U 937. Auf den Kontrollzellen konnten ebenso Aggregate gefunden werden, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß. Dies lässt sich durch eine unspezifische Bindung der Partikel auf der Zelloberfläche gut erklären.

9.3 Magnetrelaxometrische Messungen

Magnetrelaxometrische Messungen wurden mit den magnetisch dotierten Zellen nach einer magnetischen Zellseparation und direkt während der Inkubation der Sonden mit den Zellen vorgenommen. Es wurden Versuche mit den Anti-hCD4-CF- und -EO-Sonden sowie den Streptavidin-EO-Partikeln mit frischen Lymphozyten und auch mit fixierten und nicht fixierten U 937-Zellen durchgeführt.

Wie bereits kurz dargelegt, wurde angenommen, dass die Bindung der magnetischen Sonden zu einem detektierbaren bindungsspezifischen Néel-Signal führen sollte. Die ungebundene Sonde zeigte ausschließlich ein Brown-Signal.

Die mit den Anti-hCD4-Miltenyi-, und CF-III-Sonden markierten und magnetisch separierten Proben (Abschn. 9.2.1) wurden unverdünnt magnetrelaxometrisch vermessen. Die flüssigen Proben zeigten jedoch kein Néel-Signal, so dass die Zellproben gefriergetrocknet wurden, um zu untersuchen, ob die Nanopartikelkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. Die gefriergetrockneten Proben zeigten ebenso kein Néel-Signal, obwohl die magnetische Separation eindeutig funktioniert hatte. Es wurde angenommen, dass die MNP aus verschiedenen Gründen (s. Diskussion) bei der magnetischen Zellseparation auf der Säule hängen geblieben sein könnten.

Daher wurden beim nächsten Versuch U 937 Zellproben mit den biotinylierten Antikörpern dotiert und um die Bindung direkt verfolgen zu können, die Streptavidin-EO-Sonde kurz vor der MRX-Messung zu den Zellen gegeben. Es wurde sowohl die Konzentration der Sonde wie auch der Zellen variiert. In allen Fällen konnte eine Brown-Relaxation der frei beweglichen Sonde aber wiederum keine Néel-Relaxation von an die Zellen gebundener Partikel beobachtet werden.

9.4 Diskussion

Die magnetische Zellseparation ist abhängig von der Stärke der magnetischen Markierung, die wiederum direkt abhängig von der Antigenexpression bzw. -dichte auf den zu gewinnenden Zellen ist. Je höher der Expressionsgrad ist, desto stärker ist die Markierung der Zellen und desto eher werden sie bei gleicher Feldstärke im Magnetfeld zurückgehalten. Es werden z.B. ca. 500-5000 magnetische Nanopartikel der Firma Miltenyi pro Zelle benötigt, um sie im Magnetfeld festhalten zu können [106]. Monozyten und dendritische Zellen expremieren, wie die T-Helferzellen, das CD4-Oberflächenantigen. Da die Expressionsstärke bei diesen Zellen jedoch wesentlich geringer als bei den T-Helferzellen ist, kommt es bei der Gewinnung der CD4+-T-Zellen aus Vollblut nur zu einer leichten Verunreinigung mit diesen Zellen. Durch eine Variation der Partikel- zur Zellzahl kann auch hier optimiert werden. Je stärker das Label und je höher das Feld gewählt wird, desto mehr Zellen werden zurückgehalten [107].

Die Effektivität der Reinigung ist außerdem abhängig von der Art des Ferrofluids, insbesondere der Größe der Partikel. Je größer sie sind, desto weniger werden benötigt, um die Zellen im Magnetfeld zurückzuhalten.

Der hier beobachtete Unterschied in der Reinheit der magnetisch separierten Zellen lässt sich einerseits durch die verschiedenen Antikörper-Klone (Miltenyi: Klon: SK3; Biosource: Klon: BF5) erklären, da jeder Klon einen anderen Bereich des Antigens erkennt

und dadurch eine Zelle stärker oder weniger stark markieren kann, wie auch durch eine möglicherweise reduzierte Bindungsaffinität der selbst hergestellten Sonde.

Warum trotz zahlreicher Versuche, bei denen sowohl die Zellzahl als auch die Partikelzahl variiert wurden, mit der Magnetrelaxometrie keine Néel-Signale detektiert werden konnten, ist unklar. In Abbildung 98 ist dargestellt, dass eine 10 µm große Zelle, ein so großes Volumen besitzt, dass sie als feste, unbewegliche Phase betrachtet werden kann, an der die gebundenen MNP nur noch mittels des Néel-Mechanismus relaxieren können.

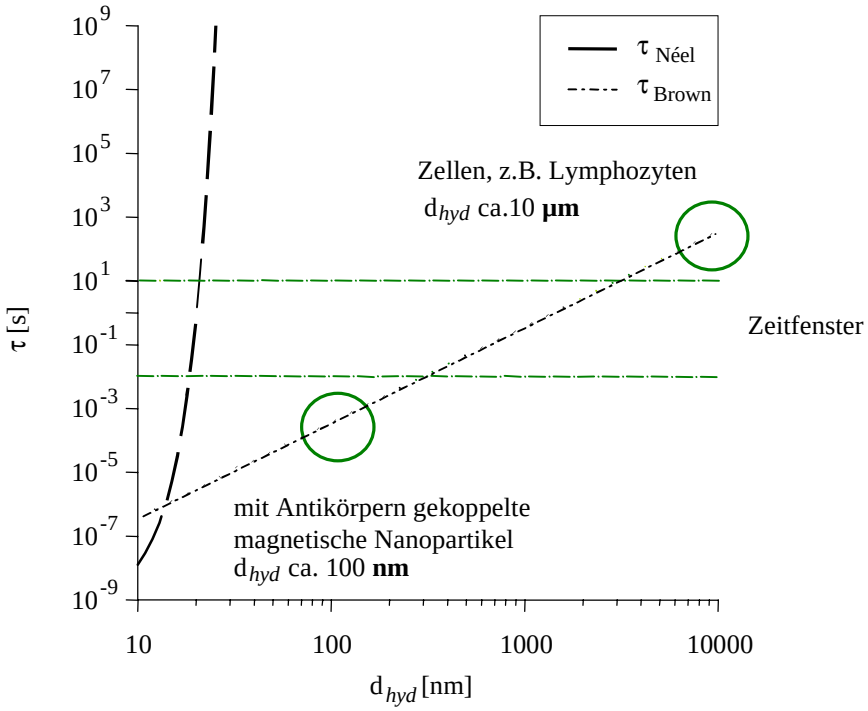


Abb. 98: Abhängigkeit der Néel (τ_N)- und Brown (τ_B)-Relaxationzeiten von dem Kern- sowie dem hydrodynamischen Durchmesser der Partikel und Zellen (Annahmen: T = 298 K, K = 20 kJ/m^3, $\eta_0 = 10^{-3}$ Pa*s, $\tau_0 = 10^{-9}$).

Es erscheint daher am wahrscheinlichsten, dass die Markierung der Zellen zwar ausreichte, um eine magnetische Separation durchzuführen, nicht jedoch, um mit der Magnetrelaxometrie detektiert werden zu können. Diese These wird gestützt durch die Zellversuche, bei denen die Bindung der MNP an die Zellen direkt verfolgt wurde, da hier ebenso kein Néel-Signal zu detektieren war. Das die MNP durch die magnetische Reinigung von der Zelloberfläche entfernt wurden, ist möglich, obwohl viele Firmen, die Beads für eine magnetische Zellseparation anbieten, auch "detach a bead" Antikörper offerieren, durch die die MNP nach der Separation von den Zelloberflächenantigenen entfernt werden sollen. Für einen Verlust der Partikel auf der Säule spricht jedoch, dass bei jeder magnetischen Reinigung der Nanopartikel ein Verlust um bis zu 50 % beobachtet wurde (s. Abschn. 4). Dies kann sowohl auf eine unspezifische Adsorption der MNP an

das Säulenmaterial oder auf den Verschluss der einzelnen Kugelzwischenräume zurückgeführt werden. Da hier nur sehr wenige MNP eingesetzt wurden (im Verhältnis zu der Menge, die bei den magnetischen Reinigungsprozessen zur Herstellung der Sonden verwendet wurden), würde sich ein Verlust der Partikel durch eine unspezifische Adsorption an die Säulenwände noch stärker auswirken. Des Weiteren wurden die zu isolierenden Zellen nach dem Waschschritt unter starkem Druck durch weitere Flüssigkeit und mit Hilfe eines Kolbens aus der Säule gedrückt. Dies könnte dazu geführt haben, dass die Zellen zwar wiedergewonnen wurden, die im Verhältnis kleinen magnetischen Nanopartikel jedoch in der Säule verblieben, da die Affinität der Antikörper zu den Zelloberflächenantigenen geringer war als die mechanische Kraft, die durch das Durchdrücken weiterer Flüssigkeitsmengen durch das Säulenbett ausgeübt wurden.

Auch für die U 937-Zellen konnte durch die elektronenmikroskopischen Bilder gezeigt werden, dass die spezifische magnetische Markierung der Zellen funktioniert hat. Daher ist es wahrscheinlich, dass die gebundene Menge magnetischer Nanopartikel unterhalb der Nachweisgrenze des MRX-Messsystems lag.

9.5 Zusammenfassung

Die Bindungsfähigkeit der hergestellten Anti-hCD4-CF-III- und -EO-Sonden konnte erfolgreich durch eine magnetische Separation von Lymphozyten bewiesen werden. Bei der U 937-Zelllinie wurde die Bindung der Streptavidin-EO-Sonde elektronen-mikroskopisch dokumentiert. Die magnetrelaxometrischen Messungen fielen sowohl bei den Lymphozyten als auch bei der Zelllinie negativ aus. Es wurden magnetisch separierte Zellen vermessen und auch untersucht, ob die Bindung der Sonden an die Zellen direkt verfolgt werden kann. Beide Methoden wurden mehrfach wiederholt. Es konnte jedoch kein bindungsspezifisches Néel-Signal detektiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die gebundene Menge an magnetischen Nanopartikeln unterhalb der Nachweisgrenze des Messgeräts lag.

10 Material und Methoden

10.1 Atom-Emissions-Spektroskopie zur Stoffmengenbestimmung

Die Atom-Emissions-Spektroskopie (AES) dient der quantitativen Elementaranalyse und wurde zur Bestimmung des Eisen- und Cobaltgehaltes der magnetischen Nanopartikel verwendet. Eine wässrige Lösung der zu analysierenden Substanz wird mit Hilfe von induktiv gekoppeltem Plasma angeregt. Das Plasma, ein in einem elektromagnetischen Hochfrequenzfeld ionisiertes Gas und liefert eine ausreichend hohe Energie (6.000-10.000 K), um die Dissoziation der Moleküle der nachzuweisenden Substanz zu bewirken und die Atome anzuregen. Die angeregten Atome emittieren Licht des entsprechenden Emissionsspektrums. Die Intensität der Lichtemission der angeregten Atome bei der gegebenen Wellenlänge sollte direkt proportional der Konzentration der beteiligten Atome bzw. der Probe sein. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Spezifität, eine hohe Empfindlichkeit (Fe: 0,002 ppm) und einen linearen Messbereich über 4 Dekaden aus. Die Methode wurde zur Eisengehaltsbestimmung der Proben verwendet [108]. Das verwendete Gerät ist in Tabelle 20 näher beschrieben.

Probenvorbereitung

Die Proben (10-200 µl) wurden in 800 µl konzentrierter Salpetersäure und 200 µl 35 % Wasserstoffperoxid unter Erhitzen aufgelöst und nach einer 1:10 Verdünnung mit Wasser vermessen. Das Probenvolumen betrug mindestens 5 ml. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert verwendet. Die Konzentration der Probe wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{xppm \cdot f}{1000} = x\,mg/ml$$

x ppm: ICP-Wert in ppm

f: Verdünnungsfaktor Gl. (13)

$$\frac{x\,mg/ml}{Molekulargewicht\ g/mol} * 1000 = x\ mmol/L$$

Mr (Fe): 55,847

Mr: (Co): 58,93 Gl. (14)

Tab. 20: Geräteparameter des Inductively Coupled Plasma Atomemissionsspektroskopy (ICP-AES) Modell minitorch 3410 (ARL)

Geräteparameter	Leistung	350 ± 2 Watt
	Zerstäuber	MDSN (Multi Dissolved Solvent Nebulizer, ARL)
	Plasmagas	99,998 % Argon
	Trägergas	Stickstoff
	Probenfluss	2,5 ml/min
Messparameter	λ Eisen	273, 93 nm

10.2 Photonenkorrelationsspektroskopie zur Partikelgrößenbestimmung

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein dynamisches Streulichtverfahren zur Bestimmung von hydrodynamischen Teilchengrößen in Dispersionen im Bereich von 5 nm bis 5 µm. Die dispergierten Teilchen bewegen sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung des Dispersionsmediums. Das einfallende Licht wird an den Partikeln gestreut, wobei es durch die Bewegung der Teilchen zu zeitabhängigen Schwankungen der Intensität des gestreuten Laserlichts kommt. Das Streulicht ist abhängig von der Teilchengröße, der Wellenlänge des einfallenden Laserlichts, dem Winkel, der zwischen dem einfallenden und gemessenen gestreuten Licht liegt, der Form der Teilchen und den physikalischen Eigenschaften des dispergierten Stoffes sowie dem Dispersionsmedium (Dichte, Brechungsindex) [109]. Durch Interferenzerscheinungen (Verstärkung oder Auslöschung) kommt es zu Intensitätsschwankungen. Diese Intensitätsschwankungen werden winkelabhängig gemessen und die sogenannte Autokorrelationsfunktion wird mit Hilfe eines Korrelators berechnet. Eine theoretische Korrelationsfunktion $g(\tau)$ wird an diese gemessene Autokorrelationsfunktion angepasst. Als Messergebnis erhält man den mittleren Teilchendurchmesser der Dispersion sowie die Polydispersität, die die Abweichung zwischen der Autokorrelationsfunktion und der angepassten Korrelationsfunktion $g(\tau)$ darstellt und als Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung herangezogen wird. Die Geschwindigkeit der Teilchen wird durch den Diffusionskoeffizienten D bestimmt. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 15) läßt sich unter Annahme kugelförmiger Teilchen daraus der Radius bzw. der Durchmesser der Partikel bestimmen.

$$r = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta * D} \qquad \text{Gl. (15)}$$

k = Boltzmannkonstante
T = absolute Temperatur
η = dynamische Viskosität

Die Messungen wurden an einem Zetaziser der Firma Malvern Instruments unter den in Tabelle 21 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tab. 21: Geräteparameter des Zetasizers 3000 für PCS-Messungen

Hersteller	Malvern Instuments Ltd.	
Gerät I	**Malvern Zetaziser 3000**	
Geräteparameter	Messwinkel	90°
	Blende	400
Lichtquelle	Argon-Laser	630 nm
	Leistung	1 W
Messparameter	Messtemperatur	25°C
	Küvetten: Polystyrol, 10 x 10 x 48 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Produktnr. 67.754
Auswertung	Analyseverfahren, Intensitätsgewichtet	Contin

10.3 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wurde stets mit 10 % Mannit als Gerüstbildner durchgeführt. Die Proben wurden bei –80°C eingefroren und anschließend in der vorgekühlten Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT2, Hereaus Deutschland) über 14 h getrocknet.

10.4 Iodierung von Proteinen

Die Iodierung von Proteinen ist eine weit verbreitete Markierungsmethode in der Proteinchemie, die das Beobachten von biochemischen Reaktionen möglich macht. In dieser Arbeit wurde sie verwendet, um das Ausmaß der Kopplung von Proteinen an magnetische Nanopartikel quantifizieren zu können. Als radioaktive Markierung wurde ^{125}I verwendet. Es ist ein γ-Strahler, mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 60 d. Der Energiegehalt der Teilchen beträgt 0,027-0,035 MeV. Die spezifische Aktivität des Iods beträgt 2191 Ci/mMol.

Bei der Iodierung von Proteinen werden vor allem die Aminosäuren Tyrosin und Histidin iodiert. Dabei wird Na^+ $^{125}I^-$ mit Hilfe eines Oxidationsmittels zu I^+ oxidiert und greift anschließend elektrophil die genannten Aminosäuren an. Als Oxidationsmittel wurde Iodogen verwendet. Der Mechanismus der Iodierung und die Iodierungsmethode mit Iodogen als Oxidationsmethode sind in der Literatur ausführlich beschrieben worden [110]. Nach der Iodierung des Proteins muss das freie ^{125}Iod von der Probe getrennt werden. Hierfür wird üblicherweise die Gelfiltration verwendet. Anschließend wird die Radioaktivität und der Proteingehalt der gereinigten Probe bestimmt und das Ausmaß der Iodierung berechnet. Abbildung 99 zeigt eine typische Elutionskurve mit zwei deutlichen Peaks, die bei der Reinigung einer iodierten Substanz (erster Peak) von dem überschüssigen freien radioaktiven Material (zweiter Peak) gewonnen wird. Dargestellt ist

in diesem Fall die Aktivität der einzelnen Fraktionen des radioaktiv markierten Maus-Anti-Human-CD4-Antikörpers und des freien radioaktiven Materials.

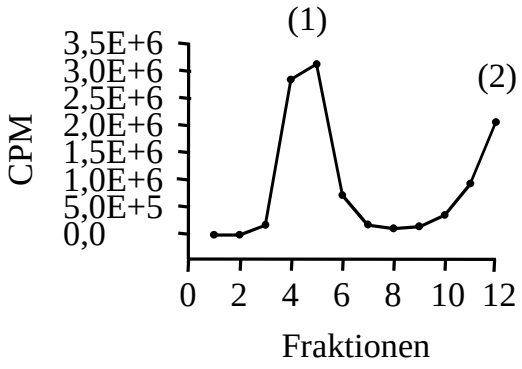


Abb. 99: Typische Elutionskurve der Trennung einer radioaktiv markierten Substanz (1) von dem überschüssigen radioaktiven Material (2).
Cpm (Impulse pro minute).

Bilanzierung: $$\frac{\text{Aktivität der Proteinfraktionen x 100\%}}{\text{Summe der Gesamtaktivität}} = \text{\% Einbau} \qquad \text{Gl. (16)}$$

Jodierungsausbeute = Zählrate im Protein/eingesetzte Zählrate x 100 = x % Gl. (17)

Spezifische Aktivität = $$\frac{\text{Aktivität des Proteins}}{\text{Gewicht des Proteins µg}} = Bq/\mu g \qquad \text{Gl. (18)}$$

Herstellung iodierter Proteine mit Iodogen

11 µl Puffer (0,5 M Na_2HPO_4, pH 9) wurden in einem Iodogen-Gefäß (Reaktionsgefäß, dessen Oberfläche mit einem Iodogen-Film beschichtet ist) vorgelegt und 10 µg/10 µl des zu iodierenden Proteins sowie 10 µl $Na^{125}I$ (50 µM, 1 mCi) hinzugefügt. Die Reaktionszeit betrug ca. 5 min bei Raumtemperatur, ca. 10 min auf Eis. Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl Phosphatpuffers (0,05 M, pH 7,4) und das Überführen der Reaktionslösung auf eine PD 10 Säule (Abschn. 10.5). Das ungebundene Iod wurde abgetrennt und die Proteinlösung in 500 µl-Schritten mit PBS eluiert. Die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden an einem Gammacounter gemessen. Die Fraktionen höchster Aktivität wurden zusammengegeben und wurden als Tracer verwendet. Die Geräteparameter des eingesetzten Gammacounters sind in Tabelle 22 angegeben.

Tab. 22: Geräteparameter des verwendeten Gammacounters

Gerät	Gammacounter	1282 CompuGamma CS
Firma		Pharmacia, LKB Wallac,
Geräteparameter	Detektor	3ll x 3ll NaI(Tl) Kristall, Aluminiumumhüllt
	Energiebereich	10 – 2 000 keV
Messparameter		1–4 min, 25 °C
Software		Pharmacia RIA Program package 1282-114

10.5 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ist ein Verfahren zur Trennung von Proteinen oder anderen Molekülen nach ihrer Größe, basierend auf einem sterischen Ausschluss-mechanismus. Die stationäre Phase, ein von Hohlräumen durchzogenes Gel, ist mit dem entsprechenden Lösungsmittel equilibriert. Die Moleküle der aufgegebenen Probe trennen sich nach abnehmendem Molekulargewicht. Kleine Moleküle, wie Salze, werden abhängig von der Zeit, in der sie sich in den Gelporen aufhalten, retardiert. Moleküle, deren Stoke`scher Radius größer als der Porendurchmesser sind, können nicht in das Gel diffundieren und werden sozusagen ausgeschlossen. Sie befinden sich im Ausschlußvolumen und erscheinen daher zuerst im Eluat [110].

Die verwendeten Säulen sind mit Sephadex-G25 Medium gefüllte Säulen zum einmaligen Gebrauch (PD 10, NAP 10, NAP™5, s. Abschn. 10.15). Sephadex ist ein wasserunlösliches quervernetztes Polydextran-Gel mit einer definierten Porengröße zur Trennung von Proteinen > 50 kDa und Salzen < 5 kDa. Die Säulen unterscheiden sich ausschließlich im Aufgabe- und Elutionsvolumen und wurden der Vorschrift entsprechend verwendet.

10.6 Magnetrelaxometrische Messung magnetischer Nanopartikel

Stärke-Cobaltferritpartikel

Als Probengefäße dienten Polystyrolröhrchen. Die Proben wurden direkt unter dem Kryostaten in einem Abstand von 40 nm befestigt und vermessen. Die Aufmagnetisierungsdauer betrug 1 s, die Stromstärke 180 mA und die Messdauer 1s.

Dextran-Eisenoxidpartikel

Die Messungen wurden mit dem experimentellen Aufbau und unter den angegebenen Bedingungen des Abschnitts 2.3.2 durchgeführt.

10.7 Magnetische Fraktionierung

Das Prinzip der magnetischen Fraktionierung beruht auf der Trennung der Teilchen nach dem magnetischen Moment, das nach Gl. 18 mit der 3. Potenz von der Kerngröße abhängt

$$m = N \cdot M_s \cdot \frac{4\pi}{3}\left(\frac{d_{Kern}}{2}\right)^3$$

m: magnetisches Moment
N: Anzahl der Nanopartikel
M_S: Sättigungsmagnetisierung
d_{Kern}: Kerndurchmesser

Gl. (18) [102].

Um magnetische Nanopartikel nach ihrem magnetischen Moment und somit indirekt auch nach ihrer Größe trennen zu können, sind starke magnetische Feldkräfte notwendig, die

von Elektromagneten in der Regel nur mit erheblichem Aufwand erzeugt werden können. Daher wurden für die Fraktionierungen sogenannte magnetische Säulen (XS^+, VS^+-Säulen, (s. Abschn. 10.15)) verwendet, die mit Eisenkugeln gefüllt sind, mit deren Hilfe starke lokale Feldgradienten erzeugt werden können [81]. Die magnetischen Nanopartikel werden in Abhängigkeit von der angelegten Feldstärke und dem hydrostatischen Flüssigkeitsdruck auf der Säule festgehalten. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, der zur magnetischen Fraktionierung von Ferrofluiden und für die magnetische Zellseparation (s. Abschn. 10.13.2) verwendet wurde, ist in Abbildung 100 wiedergegeben.

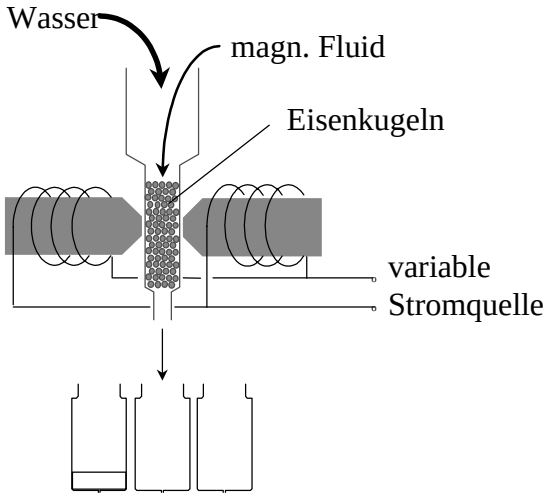


Abb. 100: Schematische Darstellung des Aufbaus zur magnetischen Fraktionierung.

Durchführung

Der in dieser Arbeit verwendete Elektromagnet konnte Magnetfelder mit maximal 2 T (s. Abschn. 10.15) erzeugen. Die magnetischen Säulen wurden zwischen die Polschuhe eines Magneten gespannt und das zu fraktionierende Material bei angelegtem Magnetfeld auf die Säule gegeben. Durch schrittweise Reduktion des äußeren Feldes können so Partikelfraktionen zunehmender Teilchengröße (zunehmendes magnetisches Moment) gewonnen werden. Bei jedem Schritt wurde gespült bis der Durchfluss nahezu farblos erschien. Dabei wurden alle Partikel von der Säule gewaschen, die ein zu geringes Moment aufwiesen, um bei der gegebenen Feldstärke zurückgehalten werden zu können. Die Versuchsbedingungen (Feldstärke, Säulen, Puffer) wurden für jedes Experiment beziehungsweise Ferrofluid empirisch ermittelt und werden bei den entsprechenden Versuchen angegeben. Zur Charakterisierung der Fraktionen wurden der Eisengehalt und die hydrodynamischen Teilchengrößen bestimmt sowie magnetrelaxometrische Messungen durchgeführt. Bei den MRX-Messungen war vor allem die Néel-Amplitude in Abhängigkeit von der Eisenmenge von Interesse.

10.8 Herstellung der Sonden

10.8.1 Herstellung der Stärke-Cobaltferrit-Sonden

Die Partikel wurden im Allgemeinen vor der Verwendung über 10-24 h zur Desaggregation mit Citratpuffer inkubiert (s. Abschn. 10.15) und anschließend CF-X-Citrat genannt. Die magnetische Reinigung der MNP erfolgte, solange nicht anders erwähnt, bei 200 mT mit einer XS^+-Säule. Das Eluat wurde stets geteilt. Die eine Hälfte wurde mit Periodat aktiviert, während die zweite Hälfte zur Kontrolle der unspezifischen Adsorption des Proteins diente.

Kopplung von humanem IgG

Beim ersten Versuch wurden 10 ml CF-II-Citrat-Partikel mit 20 ml Citratpuffer magnetisch gereinigt. Das Eluat betrug 10 ml und wurde in zwei Ansätze geteilt, wobei die eine Hälfte (Probe) mit 8 mg $NaIO_4$ versetzt und 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert wurde. Um die Oxidationsreaktion zu beenden und das überschüssige Oxidationsmittel zu entfernen, wurde erneut eine magnetische Reinigung mit Citratpuffer vorgenommen. Der Kontrollansatz wurde, um beide Ansätze gleich zu behandeln, entsprechend gereinigt.

500 µl (ca. 2,5 µM Metall) und 50 µl (ca. 0,25 µM Metall) der Probe und der Kontrolle wurden mit 250 µg Protein versetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml (Citratpuffer). Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur kam es zu Trübungen in der Partikelsuspension. Durch die Zugabe von 1 ml BSA-Puffer (0,1 % BSA-PBS) klarten sich die Proben auf. Die Reinigung erfolgte erneut über eine Magnetsäule. Aus Stabilitätsgründen wurde BSA-Puffer verwendet. 300 µl der Proben wurden auf die Säule gegeben, 7 x mit 500 µl Puffer gewaschen und mit 8 x 500 µl eluiert. Die Waschlösungen und die einzelnen Eluate wurden einzeln vermessen und anschließend vereint.

Die Kopplungsausbeute wurde Der Eisengehalt wurde, wenn es sich um radioaktive Proben handelte nicht mit der AES bestimmt, sondern wie folgt berechnet: Beispiel:

Ausgangskonzentration der MNP:	~ 2,5 µmol $CoFe_2O_4$/500 µl.
Menge Metall in Gramm:	~ 142 µg $CoFe_2O_4$
erfahrungsgemäß 50 % Teilchenverlust auf der Säule:	~ 71 µg $CoFe_2O_4$ in der Probe

Kopplung von Anti-hCD4-Antikörpern

<u>Kopplung 1</u>: Bei der Kopplung des Anti-hCD4-Antikörpers an CF-III-Citrat-Partikeln wurden 100 µl Teilchen (Probe: 9,5 mmol/L, Kontrolle: 6 mmol/L) mit 100 µg radioaktiv

markiertem Anti-hCD4-Antikörper und 15mM Dimethylaminoboran in Phosphatpuffer pH 7,0 inkubiert. Der Eisengehalt der oxidierten Probe und des Kontrollansatzes sind nicht identisch, da dieser aus zeitlichen Gründen erst nach der Sondenherstellung bestimmt werden konnte. Im Abstand von 15 min wurde kurz geschüttelt und nach 2 h Reaktionszeit 100 µl 10 % BSA-Lösung in PBS zur Stabilisierung hinzugefügt. Anschließend wurden die Ansätze bei 350 mT mit einer VS^+-Säule gereinigt. Als Elutionspuffer wurde EDTA-BSA-Puffer (PBS/0,5 % BSA/2 mM EDTA) verwendet.

Kopplung 2: Eine weitere Kopplung des Anti-hCD4-Antikörpers wurde mit 500 µl CF-II-Citrat-Partikeln und 100 µg radioaktiv markiertem Antikörper unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Ausgangskonzentration der MNP lag bei 3,88 mmol Metall/L. Dies entspricht 1,94 µmol Metall/500 µl. Bezogen auf die Menge Metall in Gramm sind das ~ 111 g $CoFe_2O_4$. Das Kopplungsausmaß wurde wie beschrieben berechnet.

Kopplung von BSA

Die Kopplung von BSA wurde am Beispiel der CF-II-Partikel vorgenommen. 2 ml CF-II-Citrat wurden magnetisch gereinigt und mit 6 ml Citratpuffer eluiert. Der Ansatz wurde geteilt und 3 ml mit 5 mg Periodat versetzt und bei Raumtemperatur 30 min geschüttelt. Der oxidierte Ansatz wurde anschließend magnetisch gereinigt. Die Ansätze wurden erneut jeweils in 5 Proben geteilt und die Verdünnung der oxidierten Probe berücksichtigt, indem ein größeres Volumen eingesetzt wurde. Es wurden 100 mg, 10 mg, 1 mg, 100 µg, und 10 µg BSA hinzugefügt. Das Endvolumen der Lösungen betrug 2 ml. Nach 2 h Inkubation wurden die Teilchengrößen der Proben und Kontrollen bestimmt.

Kopplung von Biotin

Kopplung von BSA: 3,5 ml CF-III-Citrat wurden 40 min bei 4°C mit 9 mg Periodat oxidiert und über eine magnetische VS^+-Säule gereinigt. 1,5 ml der Probe wurden mit 1 g BSA, Dimethylaminoboran (15 mM Endkonzentration) versetzt und 2 h inkubiert. Die Probe wurde mit EDTA-Puffer magnetisch gereinigt.

Kopplung von Biotin: Die so hergestellte Probe wurde geteilt. Ein Teil wurde als Kontrollsonde aufgehoben, der zweite Teil biotinyliert. 1 ml der Probe wurden mit 1 ml Phosphatpuffer (pH 8) und 2 mg Biotin-succinimidylester (in DMF) versetzt und 40 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert.

Stabilitätsuntersuchung

3 ml Medium wurden vorgelegt und 40 µl MNP unverdünnt hinzugefügt, gemischt und nach 2 h Inkubationszeit bei RT mit der PCS vermessen.

10.8.2 Herstellung der Dextran-Eisenoxid-Sonden

Kopplung von Biotin

Eine Biotinylierung der EO-Partikel wurde über die Periodat-Oxidation der Hülle, die Kopplung von BSA und anschließende Umsetzung mit aktiviertem Biotin durchgeführt. 5 ml EO-Partikel wurden mit 5 mg Periodat versetzt und 40 min bei 4°C oxidiert. Nach einer Reinigung über eine PD 10-Säulen wurden die Partikel 2 h bei 4°C mit 50 mg BSA inkubiert. Der Überschuss des Proteins wurde über eine magnetische Säulenreinigung bei 200 mT entfernt und die Probe gleichzeitig in Phosphatpuffer (50 mM pH 9,0) umgepuffert. 5 mg Biotin-succinimidylester (in 100 µl DMF) wurden hinzugefügt, 2 h inkubiert und anschließend erneut magnetisch gereinigt.

Kopplung von Streptavidin

Vor der Kopplung mit biologischen Komponenten wurden die MNP (500 µmol Eisen/ 500 µl) bei 50 mT über eine magnetische VS^+-Säule mit Citratpuffer gereinigt. Es wurden 2 ml Eluat gewonnen. Dieser Schritt diente einerseits der Erhöhung des spezifischen Relaxationssignals, andererseits dem Entfernen des freien Dextrans und möglicher Verunreinigungen durch die Synthese der Partikel.

Die Kopplung des Streptavidins erfolgte ebenfalls mittels der Periodat Methode. Die Dextranhülle wurde bei pH 5,0 mit 15 mg Periodat in Citratpuffer 40 min bei 4°C oxidiert und anschließend über eine PD 10 Säule von dem überschüssigen Kopplungsreagenz befreit und gleichzeitig in Phosphatpuffer (10 mM pH 7,0) umgepuffert.

2-3 ml der oxidierten und gereinigten Partikel wurden mit 2 mg Streptavidin versetzt und nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 4°C das Reduktionsmittel (Dimethylaminoboran, 15 mM Endkonzentration) hinzugefügt. Nach weiteren 2 h bei 4°C erfolgte die Zugabe von 100 µl 0,5 M Ethanolamin, um verbliebene Aldehydgruppen zu verschließen. Nach einer Inkubation über 14-18 h wurde das überschüssige Streptavidin mit Hilfe einer weiteren magnetischen Reinigung mit Phosphatpuffer bei 55 mT entfernt. Um die Langzeitstabilität der Partikel zu erhöhen wurde die gereinigte Sonde erneut mit 0,1 % BSA /PBS/NaN_3 umgepuffert.

Bestimmung des Kopplungsausmaßes

Zur Bestimmung des Kopplungsausmaßes wurde Streptavidin radioaktiv markiert. Das Protein wurde nach Vorschrift an die EO-Partikel gekoppelt: Der oxidierte Kopplungsansatz wurde geteilt und 3 x 1,5 ml langsam zu je 1,5 mg Streptavidin hinzugefügt. Die Proben wurden nach einer Inkubationszeit von 16-18 h magnetisch gereinigt, wobei jeder Ansatz erneut in 3 x 500 µl geteilt wurde. Durch die Bestimmung der Aktivität der Proben vor der Reinigung sowie die der Waschlösungen (3 ml) und Eluate (500 µl) nach der magnetischen Reinigung konnte die Kopplungsrate quantifiziert werden.

Stabilitätsuntersuchung

Für die MRX-Messungen wurden 1 µl der Streptavidin-EO-Partikel (16 nmol Eisen) in 150 µl Probenvolumen eingesetzt und für die PCS-Messungen 50 µl Partikel (775 nmol Eisen) in 1 ml Gesamtvolumen. Der Puffer wurde vorgelegt und die Teilchen hinzugefügt. Für die Stabilitätsuntersuchung in Vollblut wurden 5 µl der Streptavidin-EO-Partikel mit 145 µl Vollblut inkubiert.

Kopplung von Antikörpern

Als Reaktionsmedium diente zur Reduktion unspezifischer Bindungen BSA-Puffer. Die biotinylierten Antikörper (Anti-human-IgG, Anti-hCD4, und Maus IgG als Kontrolle) wurden im Konzentrationsbereich von 1 ng bis 5 µg in 140 µl Puffer vorgelegt und 30 nmol Streptavidin-Partikel in 10 µl hinzupipettiert. Die Proben wurden sofort und nach einer Inkubationszeit von 1,5–2 h magnetrelaxometrisch vermessen und die Relaxationszeit bestimmt.

10.9 Aggregationsassays

Die verwendete Sonde wurde vorgelegt und die angegebenen Mengen des quervernetzenden Proteins hinzugefügt. Die genauen Angaben zu dem eingesetzten Volumen, bzw. Konzentrationen sind wegen der Übersichtlichkeit in der Bildunterschrift angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die MRX-Messungen in 150 µl und die

PCS-Messungen in 1,5 ml Probenvolumen durchgeführt. Die Sonde wurde immer in einer der Signalstärke angepassten Menge verwendet, innerhalb eines Versuches jedoch konstant gehalten.

10.10 BIAcore Messungen

Die Surface Plasmon Resonance Spektroskopy (SPR) ist eine optische Methode zur Beobachtung von makromolekularen Interaktionen in Echtzeit. Es ist eine weit verbreitete Methode in der Biophysik sowie in biochemischen und pharmazeutischen Laboren. Die SPR kann zur Bestimmung der Bindungsspezifität, der Kinetik und der Affinität von Analyten zu ihrem Liganden verwendet werden. Die Konzentration der gebundenen Liganden und Analyte wird anhand ihrer Masse bestimmt, wobei die Detektionsgrenze bei 1 pg/mm^2 liegt und das Molekulargewicht der zu bestimmenden Analyten bei 150 g/mol bis 10^6 g/mol liegen kann [111].

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde ein **BIA**core™ 2000 verwendet, wobei BIA für „Biomolecular Interaction Analysis“ steht. Es handelt sich um ein geschlossenes System, bei dem die Interaktion der Liganden mit ihren Analyten unter ständigem Flüssigkeitsfluss stattfindet. Eine Komponente liegt an eine feste Phase gebunden vor, die andere bindet während sie im Flüssigkeitsstrom vorbeifließt. Der verwendete Sensorchip ist ein mit Gold beschichteter Glasobjektträger, dessen meist chemisch modifizierte Oberfläche als eine Seitenwand integriert in der Flusskammer vorliegt. Bei der Messung wird Licht in einem keilförmigen Lichtstrahl, der in einem festgelegten Winkel, dem Plasmon Resonanz Winkel, reflektiert wird, auf der Goldoberfläche fokussiert. Durch die Bindung eines Moleküls kommt es zu einer Veränderung des Refraktionsindex und dadurch zu einer Verschiebung des Reflektionswinkels, ausgedrückt in RU (response units). Dargestellt wird dies in sogenannten Sensogrammen. Die Geschwindigkeit dieser Verschiebung wird zur Bestimmung der Zeitkonstanten der Bindung verwendet und das Ausmaß kann in die gebundene Masse umgerechnet werden. Sternberg et al. [96] führten radioaktive Untersuchungen zur Bindungskapazität durch und versuchten zusätzlich das Signal mit der gebundenen Menge Protein zu korrelieren. Die Bindungskapazität der Sensoroberfläche liegt demnach bei 50 ng Protein pro mm^2, 1ng/mm^2 Protein entsprechen 1000 RU. Die Berechnung der Menge gebundenen Proteins geht auf die Annahme zurück, dass alle Proteine den gleichen Refraktionsindex haben, wobei das nur für eine Auswahl an Proteinen überprüft wurde.

Das Verfahren arbeitet ohne Markierung, da die Detektion der Bindung auf der Chipoberfläche unabhängig von der Natur der gebundenen Komponenten ist. Laut Hersteller können Interaktionen zwischen Proteinen, Proteinkonjugaten, Nukleinsäuren, Lipidmizellen oder sogar größeren Objekten wie Zellen gemessen werden.

Für die Messungen werden zuerst die Liganden oder Targets kovalent an die Chipoberfläche gebunden. Die Sensorchips verfügen über vier Flusskammern die einzeln angesteuert werden können. Die optimalen Kopplungsbedingungen müssen für die Proteine jeweils neu bestimmt werden; Anhaltspunkte und Vorgehensweisen sind in der Literatur allerdings zahlreich zu finden [112-115]. Prinzipiell wird mit Puffern geringer Ionenstärke und bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes des zu koppelnden Proteins gearbeitet.

Auswertung

Jede Bindung auf der Chipoberfläche bewirkt eine Veränderung des SPR-Signals und wird als Funktion der Zeit in einem sogenannten Sensogramm dargestellt (s. Abb. 101).

Die Bindung einer Komponente auf der Chipoberfläche führt zu einer Zunahme der Response Units. Das Ausmaß der RUs korreliert direkt mit der gebundenen Menge Protein und ist abhängig von der gewählten Kontaktzeit des Proteins mit der Sensoroberfläche. Die Steilheit der Kurve ist ein Maß für die Affinität der Bindung. Nach Beendigung der Probenzufuhr dissoziiert das Molekül entsprechend seiner Dissoziationskonstanten wieder, da die Messung unter ständigem Fluss stattfindet.

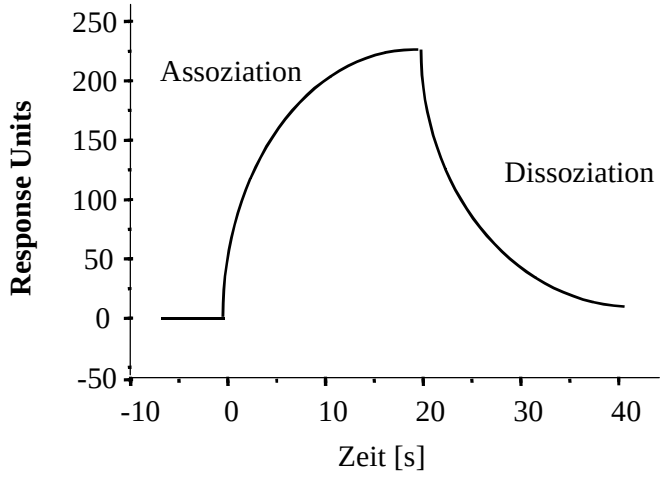


Abb. 101: Schematische Darstellung eines Sensogramms.

Versuchsbedingungen

Alle Versuche wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das Probenvolumen betrug jeweils 10 µl. Als Injektionsgeschwindigkeit wurde 20 µl/min (Quickinjekt) gewählt, wodurch die Kontaktzeit der Probe mit der Chipoberfläche 30 s betrug. Nach diesen 30 s wurde der Waschpuffer (HBS-EP) über den Chip gegeben, wodurch es im Allgemeinen zu einer Dissoziation des Analyten von seinem Liganden kommt. Reichte

dieser Puffer nicht aus, um den Analyten zu entfernen, wurde die Chipoberfläche hintereinander mit drei Puffern: Glycin pH 2,5/0,1 M, Tris-Puffer pH 9,5/0,1 M und Glycin pH 1,5/0,01 M beschickt.

Tab. 23: Geräteparameter

Firma	Biacore® AB, Uppsala, Schweden
Gerät	Biacore® 2000
Auswerteprogramm	BIAevaluation Version 3.0
Spülflüssigkeit	Waschpuffer HBS-EP

10.11 Festphasenassays

Grundlage aller Immunoassays ist die große Spezifität von Ligand-Rezeptorreaktionen bei denen einer der Verbindungen markiert wird, mit dem jeweiligen zu detektierenden Molekül. Eine Übersicht über Immunoassayverfahren gibt [101].

10.11.1 Bestimmung von humanem IgG

Als feste Phase dienten 96-Well-Mikrotiterplatten. Das Probenvolumen betrug 50 µl. Die feste Phase wurde mit dem nachzuweisenden Antigen im Konzentrationsbereich 0,05 ng bis 100 ng beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert (Coating). Alle weiteren Inkubationsschritte wurden 1,5 h bei 37°C vorgenommen. Um unspezifische Bindungen des Antigens sowie des Detektionsantikörpers an die Platte zu reduzieren (Blocking) erfolgte vor der Zugabe des Detektionsantikörpers ein Inkubationsschritt mit 0,1 % BSA in PBST. Je nach Assayvariante wurde die Zugabe des Detektionsantikörpers wie folgt variiert:

a. Der Enzym- oder magnetisch-markierte Detektionsantikörper wurde im Überschuss zugegeben (in diesem Fall 100 ng des POD-Anti-human-IgG(Fcγ)-Antikörpers und 50 µl EO-Anti-human-IgG(Fcγ)-Antikörpers)
b. Der biotinylierte Detektionsantikörper wurde im Überschuss zugegeben (100 ng des biotinylierten Anti-human-IgG(Fcγ)-Antikörpers). Hier erfolgte nach den entsprechenden Waschschritten anschließend die Zugabe der Streptavidin-Sonden, Enzym-markiert (1:3000 verdünnt) für den ELISA und magnetisch-markiert (1:30 verdünnt) für den MARIA.

Der MARIA konnte direkt vermessen werden. Vor der Messung des ELISAs wurde das Enzym mit Substrat inkubiert und nach erfolgter Farbentwicklung mit 2N Schwefelsäure

abgestoppt und die optische Dichte spektroskopisch bestimmt. Als Substrat wurde in dieser Arbeit das Enzym O-Phenylendiamin (OPD) und H_2O_2 in Citratphosphatpuffer verwendet.

10.11.2 Bestimmung von DSPA

Als feste Phase dienten 96-Well-Mikrotiterplatten. Das Probenvolumen betrug 50 µl. Im Gegensatz zum direkten Assay wurde die feste Phase hier mit einer einheitlichen Konzentration des Fangantikörpers (500 ng) beschichtet. Es wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden 1,5 h bei 37°C vorgenommen. Die Platte wurde mit 0,1 % BSA in PBST geblockt und mit PBST gewaschen. Es folgte die Zugabe des Antigens, DSPA, in einer Konzentrationsreihe von 30–0,3 ng. Nach einem weiteren Waschschritt folgte im vierten Schritt die Zugabe des markierten Detektionsantikörpers (Anti-DSPA-) im Überschuss. Dieser Schritt wurde wie beim hIgG-Assay variiert:

a. Der Enzym- bzw. magnetisch-markierte Detektionsantikörper wurde im Überschuss zugegeben (ELISA: 1:5000, MARIA unverdünnt).
c. Der biotinylierte Detektionsantikörper wurde im Überschuss zugegeben (1:3000 verdünnt). Hier erfolgte nach den entsprechenden Waschschritten anschließend die Zugabe der Streptavidin-Sonden, Enzym-markiert (1:10 000 verdünnt) für den ELISA und magnetisch-markiert (1:30 verdünnt) für den MARIA.

Der MARIA konnte direkt vermessen werden. Vor der Messung des ELISAs wurde das Enzym mit Substrat inkubiert und nach erfolgter Farbentwicklung mit 2N Schwefelsäure abgestoppt und die optische Dichte spektroskopisch bestimmt. Als Substrat wurde in dieser Arbeit das Enzym O-Phenylendiamin (OPD) und H_2O_2 in Citratphosphatpuffer verwendet. Der Elisareader und die Messbedingungen sind in Tabelle 24 beschrieben.

Tab. 24: Geräteliste

Gerät	ELISA-Reader Elx808, UltraMicroplate Reader
Firma	Biotic Intruments
Messbedingungen: Bestimmung der optischen Dichte bei	495 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm
Nunc 96-Well-Platten	Maxisorp™ Break Appart 439454
Nunc 12-Kanal-Waschvorrichtung	Nunc Immuno™ Wasch 12 Produktnr. 455492
Nunc Plastikversiegelung	236269, 41785
Deckel: Conical Plug, 8 mm	5405SB-08, 43609096CSP2

10.12 Flüssigphasenassays

Den Flüssigphasenassays liegt die Reaktion von Antikörpern mit ihrem Antigen in einer homogenen Phase zugrunde. Es entstehen in einem engen Konzentrationsbereich sogenannte Präzipitationskurven, die einen Punkt der maximalen Agglomeration aufweisen. Dieser Punkt ist von dem verwendeten Antikörper wie auch dem Konzentrationsverhältnis der Sonde zu dem Antigen abhängig.

Bei den Flüssigphasenassays wurden die EO-Sonden vorgelegt und die im Ergebnisteil angegebenen Antigenkonzentrationen hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrugen 2,5-3 h. Die Versuche wurden in BSA-Puffer durchgeführt. Das Probenvolumen betrug bei den MRX-Messungen 150 µl und bei den PCS-Messungen 1500 µl.

10.13 Zellbiologische Methoden

Die Zellen der U937- Zelllinie wurde in dem empfohlenen Medium bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert. Alle Arbeiten, die die Kultivierung oder Gewinnung von Zellen betrafen, wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt [116].

Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zählung der Zellen erfolgte mit dem Hämozytometer nach Zugabe von Trypan-Blau. 100 µl der zu zählenden Zellen wurden mit 100 µl 0,4 %iger Trypan-Blau-Lösung vermischt und nach maximal 5 min Inkubationsdauer unter dem Mikroskop gezählt. Der Farbstoff färbt allein die Zellkerne toter Zellen an. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die nicht gefärbten Zellen gezählt. Es wurden jeweils 8 Quadrate der Zählkammer gezählt und ausgewertet. Die Zellzahl berechnet sich wie folgt:

Hämozytometer: Fläche:1 mm x 1 mm = 1 mm^2

Höhe: 0,1mm $\rightarrow$ Volumen: 0,1mm^3 = 0,1 µl über jedem Quadrat

$$\frac{gezählteZellen}{8} * Verdünnungsfaktor * 10^4 = Zellzahl / ml \qquad \text{Gl. (19)}$$

10.13.1 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenseparation ist ein in der medizinischen Diagnostik übliches Verfahren zur Gewinnung von bestimmten Zellpopulationen aus einem Zellgemisch. Sie beruht auf der beschleunigten Sedimentation in einem Dichtegradienten [117] und wurde in dieser Arbeit zur Gewinnung von Lymphozyten aus Vollblut verwendet. Die Sedimentation von Zellen in einer Flüssigkeit ist abhängig von dem Zellradius, der Zelldichte und der Dichte

sowie Viskosität des Suspensionsmediums. Sie kann allgemein mit Gl. 20 beschrieben werden.

$$\mu = \frac{2r^2(d - d_0)G}{9\eta}$$

r = Zellradius
d = Zelldichte
d_0 = Dichte des Mediums
η = Viskosität des Mediums
G = Sedimentations- oder Zentrifugalkraft [118]

Gl. (20)

In dieser Arbeit wurde Ficoll-Paque (Handelsname für ein hochmolekulares Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin) in einer Konzentration von 5,6 % (w/v) als Dichtegradient verwendet. Die Dichte der Lösung betrug 1,077 g/ml. Die zu trennenden Zellen, werden auf den Gradienten geschichtet und nach Vorschrift zentrifugiert. Während der Zentrifugation bewegen sich die Zellen durch den Gradienten bis zu dem Bereich gleicher Dichte. Es kommt zu einer Phasentrennung, wobei in diesem Fall vier Banden entstehen. Von oben nach unten betrachtet bestehen sie aus einer Pufferschicht bzw. Plasmaschicht mit der geringsten Dichte, einer opaque-weißlichen Bande, der Interphase, die die Lymphozyten, Monozyten sowie Thrombozyten enthält, der restlichen Ficoll-Schicht und am Röhrchenboden der Schicht, die aus Erythrozyten, Granulozyten und Fibroblasten besteht. Die Erythrozyten und die Granulozyten vertragen die osmotischen Verhältnisse nicht, aggregieren und sinken während der Zentrifugation durch die Ficoll-Schicht auf den Boden des Röhrchens.

Durchführung

Die Lymphozyten wurden aus frischem, antikoaguliertem Blut (Citrat- oder Heparin-Blut) mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Das Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und 5 min bei 1500 rpm gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, das Blut in Puffer oder Medium resuspendiert und 4 ml dieser Zellsuspension auf 4 ml Ficoll-Paque geschichtet. Die Trennung der Blutbestandteile nach ihrer Dichte erfolgte durch Zentrifugation bei 1500 rpm ohne Bremse für 30 min. Die Plasmaschicht wurde vorsichtig entfernt, die Bande mit den Lymphozyten abgenommen, in ein Röhrchen überführt, zweimal mit PNB-Puffer gewaschen, gezählt und gleich weiter verwendet.

10.13.2 Magnetische Zellseparation

Das Prinzip der magnetischen Zellseparation beruht auf der Gewinnung von magnetisch markierten Zellen aufgrund von starken Feldkräften, die innerhalb eines Magneten auf diese Zellen wirken. Klinische Anwendung findet diese Separationsmethode z.B. bei der Gewinnung von Stammzellen ($CD34^+$) aus Patientenblut [119], die nach einer

Chemotherapie dem Patienten reinjiziert werden können. Die magnetische Separation wird z.B. auch zur Gewinnung von hochreiner DNA (Desoxyribonukleinsäure), mRNA (messenger Ribonukleinsäure) und Bakterien angewendet, wobei für viele Anwendungen bereits spezifisch markierte magnetische Nano- und Mikropartikel von verschiedenen Herstellern zu beziehen sind [120].

Die spezifische magnetische Markierung einer Zellpopulation aus einem heterogenen Zellgemisch erfolgt mit Antikörper-gekoppelten magnetischen Nanopartikeln, die gegen bestimmte Oberflächenantigene auf den Zelloberflächen gerichtet sind. Die Trennung der markierten von den nicht markierten Zellen erfolgt in mit Eisenkugeln gefüllten Säulen, die auch bei der magnetischen Fraktionierung magnetischer Nanopartikel (Abschn. 10.7) verwendet wurden und im Abschnitt 10.15 beschrieben werden. Innerhalb des Magnetfeldes entsteht durch die Eisenkugeln, die das Magnetfeld verstärken, ein Hochgradientenfeld [81]. Die Kraft, die auf die magnetisch markierten Zellen wirkt, kann wie folgt beschrieben werden:

$$F_m = \Delta\chi * V grad\left(\frac{B^2}{2\mu_0}\right) \qquad \text{Gl. (21).}$$

F_m: Kraft des Magnetfeldes
V: Volumen des markierten Objektes
$\Delta\chi$: Volumensuszeptibilität der markierten Zelle relativ zum Medium [81]

$grad\left(\frac{B^2}{2\mu_0}\right)$: magnetischer Feldgradient mit der magnetischen Feldkonstanten μ_0 [121]

Die ausgeübte Kraft hängt von der Volumensuszeptibilität der Zelle relativ zum Medium, dem Volumen der Zelle und insbesondere von dem magnetischen Feldgradienten ab. Der Versuchsaufbau ist in Abschnitt 10.7 beschrieben.

Versuchsbedingungen

Die Markierung der Zellsuspension erfolgte in Anlehnung an die Vorschriften von Becton Dickinson für die Immuntypisierung von humanem Blut (Simultest™) und von Miltenyi Biotec zur magnetischen Markierung von Zellen. Prinzipiell wurden alle Inkubationen möglichst kurz (5-15 min) und bei 4°C durchgeführt, um die Stoffwechselaktivität der Zellen und dadurch Oberflächenmodulationen gering zu halten. Überschüssige Reagenzien wurden stets durch zweifaches Waschen mit 2 ml Puffer entfernt.

Zur Gewinnung der $CD4^+$-T-Helferzellen aus dieser Lymphozyten-Mischpopulation wurden die Zellen zunächst mit den spezifischen Sonden magnetisch und anschließend mit der Zweifarben-Immunfluoreszenz Fluoreszenz-markiert. Zentrifugiert wurde stets 5 min bei 500 g.

Es wurden 5 x 10^5 – 1 x 10^6 Zellen pelletiert und zweimal mit 2 ml 1 %BSA/PNB-Puffer gewaschen. Zur Senkung der nicht spezifischen Bindung der Antikörper an die Zellen wurden die Proben in 100 µl 1 %BSA/PNB resuspendieren und 15 min bei 4°C inkubiert.

a. Verwendung biotinylierter Anti-CD4- und der Kontrollantikörper:

100 ng der biotinylierten Antikörper wurden hinzugefügt und 15 min bei 4°C inkubiert. Gewaschen wurden die Zellproben erneut zweimal mit 2 ml 0,1 %BSA/PNB und im Anschluss die magnetische Streptavidin-Sonde hinzugefügt (5 µl). Die Sonde wurde 10 min bei 4°C inkubiert und ohne einen weiteren Waschschritt 20 µl der Becton-Dickinson-CD3/CD4-Färbung hinzugefügt und erneut 10 min bei 4°C inkubiert.

b. Verwendung der Anti-hCD4-CF- und -Miltenyi-Sonde:

Es wurden 200 µl der magnetischen Anti-hCD4-CF-Sonde und 20 µl der Anti-hCD4-Miltenyi-Sonde zu den Zellen gegeben und 10 min bei 4°C inkubiert. Für die Fluoreszenzfärbung wurden 20 µl der Becton-Dickinson-CD3/CD4-Färbung zu den Proben hingefügt und erneut 10 min bei 4°C inkubiert.

Die Zellproben wurden zweimal 2 ml CellWASH gewaschen und in Zellen 500 µl CellFIX fixiert. Die Proben wurden geteilt und mit der einen Hälfte die magnetische Separation durchgeführt. Die zweite Hälfte wurde verwendet, um das Ausgangsmaterial mittels FACS-Messungen zu charakterisieren.

Die magnetische Separation wurde bei 0,6 mT mit einer ms^+-Säule durchgeführt. Die Zellen wurden im Magnetfeld auf die Säule gegeben. Durch Spülen mit 6 ml EDTA-Puffer wurden die nicht markierten Zellen entfernt und außerhalb des Magnetfeldes anschließend die markierten Zellen mit 1 ml EDTA-Puffer gewonnen. Das Eluat und die Waschlösungen wurden zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellproben in 500 µl CellFIX fixiert. Die Eluate und Waschlösungen wurden ebenso am FACS vermessen.

10.13.3 FACS-Messungen

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) ist ein optisches Messsystem, das ein gleichzeitiges Messen mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter von jeweils einer einzelnen Zelle ermöglicht.

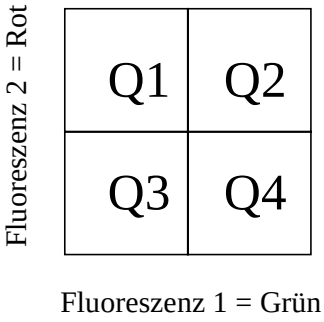
Bei der FACS-Analyse werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln am gemeinsamen Fokus von Anregungslicht (Argon-Laser 488 nm) und Nachweisoptik vorbei

geführt und die jeweilige Größe, Granularität sowie Fluoreszenzmarkierung beim Durchtritt durch den Laserstrahl bestimmt. Die Größe jeder einzelnen Zelle wird durch das gemessene Vorwärtsstreulicht (FSC: forward scatter) und die Granularität durch das Seitwärtsstreulicht (SSC: sideward scatter) in einem 90°-Winkel des einfallenden Lichtstrahls bestimmt. Die Durchflusszytometrie bestimmt keine Absolut- sondern Relativwerte. Die Zählung und Messung der Zellen erfolgt nach einem individuell festgelegten Schwellenwert für das Vorwärtsstreulicht. Es wird eine benutzerdefinierte Zellzahl unabhängig vom Volumen vermessen. Eine Bestimmung der Quantenausbeute der Fluoreszenz kann durch die Verwendung von Standards vorgenommen werden, jedoch stand in dieser Arbeit die Bestimmung der Fluoreszenz einer Probe im Vergleich zu einer Kontrollprobe im Vordergrund. Da hierbei Geräteeinstellungen für die Messungen eines Versuches fest eingestellt wurden, ist der direkte Vergleich der Fluoreszenz der Proben mit der der Kontrollen möglich. Angegeben wird der Median der mittleren Fluoreszenzintensität.

Auswertung

Die gemessenen Zellen werden in Histogrammen und Dot Plots dargestellt. Die Histogramme werden nur für die Darstellung der Häufigkeitsverteilung (Zellzahl als Funktion der Fluoreszenz) verwendet, die Dot Plots werden dagegen sowohl für die Darstellung der Morphologie (Größe und Granularität) als auch der Fluoreszenzen der untersuchten Zellen eingesetzt. Für die morphologische Zuordnung der Zellen werden die beiden Lichtstreuparameter (FSC, SSC) gegeneinander aufgetragen. Die interessierende Zellpopulation wird in diesem SSC/FSC-Dot Plot durch ein Analysefenster (Gatebildung) bestmöglich von anderen Zellpopulationen in der Probe abgetrennt. Die Definition eines Analysenfensters ermöglicht eine selektive Betrachtung der Zellen innerhalb des Fensters. Bei allen Fluoreszenzdarstellungen und Statistiken werden nur die Zellen im Analysenfenster gezeigt und für Berechnungen verwendet. Bei der Auswertung gilt dann 100 % = alle Zellen im Fenster. Zur Bestimmung der zu den eingegrenzten Zellen gehörenden Fluoreszenz werden in einem Histogramm die Fluoreszenzintensitäten der Zellen dargestellt und der Median berechnet. Das Auswerteprinzip der Zweifarben-Immunfluoreszenz ist die Quadrantenanalyse eines Dot Plots. Die Grafik wird durch einen Marker in vier Felder unterteilt (Q1-Q4, s. Abb. 102). Mit Hilfe der Isotypkontrolle (Autofluoreszenz), wird die unspezifische Fluoreszenz festgelegt (Q3). Anschließend werden Bewertungsgrenzen zwischen negativ und positiv für die verwendeten

Fluoreszenzen definiert und der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Feldern berechnet. Das Messgerät ist in Tabelle 25 beschrieben.



Q1 = nur rote Fluoreszenz in %
Q2 = rote und grüne Fluoreszenz in %
Q3 = nur grüne Fluoreszenz in %
Q4 = Autofluoreszenz, oder nicht gefärbte Zellen in %.

Abb. 102: Dot Plot Quadrantenanalyse

Tab. 25: Geräteparameter des FACS-Gerätes

Gerät	Durchflusszytometer BDIS® Fluoreszenz activated cell sorter (FACS)
Firma	Becton Dickinson, Heidelberg
Geräteparameter	Anregungsquelle: Argonionen-Laser 488 nm Leistung: 15 mW
Messeinheit	FACScan
Flüssigkeitssystem	Trägerflüssigkeitsbehälter, Auffangbehälter, Zufuhr der Zellen
Optik des Anregungslichts, Detektionsoptik, Signalverarbeitung Computer zur Speicherung und Auswertung der Messung	
Auswerteprogramm	CellQuest®
Trägerflüssigkeit: FACS Flow	Produktnr.: 342003, Ch.B. 1187
Spülflüssigkeit: FACS Rinse	Produktnr.: 340346, Ch.B.: 108

Floureszenzmarkierung von Zellen

Zentrifugiert wurden die Proben stets 5 min bei 500 g. 5 x 10^5 – 1 x 10^6 Zellen wurden pelletiert und zweimal mit 2 ml 1 %BSA/PNB gewaschen. Zur Senkung der nicht spezifischen Bindung der Antikörper an die Zellen wurden diese mit 100 µl 1 %BSA/PNB 15 min bei 4°C inkubiert. Je nach Markierungstechnik wurden zwei Wege verfolgt: Die Verwendung von biotinylierten Antikörper und Fluoreszenz-markiertem Extravidin oder die direkte Fluoreszenz-Markierung mit einem markierten Antikörper.

Bei der Verwendung eines biotinylierter Antikörper wurden 100 ng des Antikörpers zu den Zellproben gegeben, 15 min bei 4°C inkubiert, die Zellen zweimal mit 2 ml 0,1 %BSA/PNB gewaschen und 1 µl Extravidin-FITC hinzugefügt. Es wurde 10 min bei 4°C inkubiert.

Bei der Verwendung des Floureszenz-markierten Antikörpers wurden 20 µl der Becton-Dickinson-CD3/CD4-Färbung hinzugefügt und erneut 10 min bei 4°C inkubiert.

Fixiert wurden die Proben jeweils mit 500 µl CellFIX, nachdem sie zunächst zweimal mit 2 ml CellWASH gewaschen wurden. Die Zellen wurden anschließend mittels FACS vermessen.

10.14 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde als Verfahren zur Darstellung der Kerngrößen und -formen der magnetischen Nanopartikel verwendet.
Im Elektronenmikroskop werden Objekte mittels gebündelter, durch elektrische Hochspannung stark beschleunigter Elektronen im Hochvakuum abgebildet. Die Auflösung ist hier nicht, wie beim Lichtmikroskop, durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts begrenzt, wodurch sich eine 10 bis 1000mal größere Auflösung als beim Lichtmikroskop ergibt. Die Wellenlänge der Elektronen hängt nach de Broglie von deren Impuls p und der kinetischen Energie E_{kin} ab und liegt bei einer Wellenlänge von 0,004 nm. Bei 200 keV Spannung ergibt sich eine Punktauflösung von 92 nm [122]. Die Geräteparameter des verwendeten Elektronenmikroskops sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tab. 26: Geräteparameter des Elektronenmikroskops.

Gerät	JEOL JEM-1210
Anregungsspannung	120 kV
Linienauflösung	0,20 nm
Punktauflösung	0,34 nm
Kathode	CeB6
Detektoren der ASID-Rastereinheit	SEI und TEI, LINK OXFORD-EDX System mit S-ATW Si(Li)Detektor (Auflösung 136 eV)
Bildgebung	GATAN-MultiScanCamera mit GATAN-Software DigitalMicrograph 2.5
Kohlefilm auf 3,05 nm Cu-Netzchen, 400 mesh, weitmaschig	Plano, Wetzler S-147-4 oder S 160-4

10.14.1 Probenpräparation für elektronenmikroskopische Aufnahmen

Präparation der magnetischen Nanopartikel

Bei der Präparation der magnetischen Nanopartikel handelt es sich um eine wässrige Suspension der Teilchen. Die Suspension wurde auf mit Kohle-Trägerfilme beschichtete Grids aufgetragen und an der Luft getrocknet.

Herstellung der Zellpräparate

Bei der Zellpräparation wurde eine Harzeinbettung vorgenommen. Es wurden drei Proben hergestellt. Zwei Zellproben wurden mit magnetischen Nanopartikeln und eine ohne Markierung hergestellt. Zentrifugiert wurde stets 5 min bei 500 g. Die Zellproben (je 1 x 10^6 Zellen) wurden pelletiert. Dies ergab ein ca. 2 mm hohes Pellet in einer Eppendorftube. Die Proben wurden zweimal mit 2 ml PNB gewaschen und in 100 µl PNB 15 min bei 4°C inkubiert. Den Proben wurden 100 ng biotinylierte Antikörper hinzugefügt

Probe I: ohne Antikörper, um das Aussehen der Zellen vergleichen zu können

Probe II: Maus-IgG_1 Anti-hCD4-Antikörper-Biotin

Probe III: Maus IgG_1-Antikörper-Biotin

und es wurde weitere 15 min bei 4 C inkubiert: Die Zellproben wurden zweimal mit 2 ml BSA-Puffer gewaschen und in 100 µl PNB aufgenommen. Die Zugabe der magnetischen Markierung wurde wie folgt durchgeführt:

Proben II, III: 5 µl Streptavidin-Eisenoxidpartikel

Probe I: keine Partikelzugabe

Es wurde 15 min bei 4°C inkubiert und anschießend zweimal 2 ml mit dem Waschpuffer (WP) gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml GA-Fixativ bei 4°C fixiert, wobei in Zellen in den ersten Stunden ab und zu aufgewirbelt wurden. Nach 18 h Lagerung bei 4°C wurde die Fixierlösung entfernt. Es wurde zweimal mit 1ml WP gewaschen (6000 rpm/ 5 min (Eppendorfzentrifuge 54117 C).

Die Zellen wurden anschließend bei Low-Gelling-Agarose eingebettet. Das Agar wurde bei 68°C verflüssigt, auf 37°C temperiert, die Proben mit dem Agar gemischt und auf Eis gelliert. Die Agarblöcke wurden zerschnitten und zweimal mit 1 ml WP gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellproben mit einer Osmiumlösung (2 % OsO4-Fixativ) 2 h nachfixiert und erneut zweimal wie beschrieben gewaschen. Es folgte eine Uranylacetat (0,5 %) Blockkontrastierung, die erneut über 2 h durchgeführt wurde. Das überschüssige Reagenz wurde durch zweimaliges Waschen entfernt

Vor der Harzeinbettung wurden die Zellproben mit Hilfe einer Ethanolreihe entwässert. Die Einwirkzeit des Ethanols, bzw. des Propylenoxids (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, wasserfreier Ethanol, Propylenoxid : wasserfreier Ethanol 1:1) betrug je 15 min. Anschließend wurde mit wasserfreiem Propylenoxid 18 h inkubiert. Die Probe wurden jeweils zentrifugiert und in der nächsten Konzentration aufgenommen.

Die Infiltration mit Harz erfolgte zuerst mit einem Propylenoxid:Epon-Gemisch (3:1, dann 1:1, dann 1:3, je 90 min) und dann in reinem Epon wiederum über 18 h. Die Zellen wurden

in Gelatinekapseln eingebettet und nach die Polymerisation des Harzes nach Vorschrift des Herstellers über 3 Tage durchgeführt. Von den Proben wurden für die elektronenmikroskopische Untersuchung Ultradünnschnitte angefertigt und eine Schnittkontrastierung mit Bleiacetat durchgeführt.

10.15 Materiallisten

Suspensionszelllinie: U937

Die humane histiozytische Lymphom-Zelllinie, U937, stammt von einem 37-jährigen Kaukasier mit einem generalisierten histozytischen Lymphom. Die Zellen sind monozytischen Ursprungs, 12,5 µm (8,1-16,9 µm) groß, haben ein rundes bis ovales Aussehen und meist einen großen Zellkern. Es handelt sich um eine promonozytische Suspensionszelllinie, die eine Verdopplungszeit von 95 h aufweist, wobei die maximale Zelldichte bei 0,9-1,1 x 10^5Zellen/ml liegt. Die Zellen weisen die Oberflächenantigene: $CD4^+$, $CD13^+$, $CD15^+$ und $CD33^+$ jedoch nicht $CD3^+$, $CD14^+$ und $CD19^+$ auf. CD steht für Cluster of Differentiation. Des Weiteren wurden der $C3^+$-Oberflächenrezeptor (Komplement) und Fc-Rezeptoren gefunden. Es konnten keine Oberflächen-IgGs gefunden oder eine IgG-Sekretion festgestellt werden. Die Zellen zeigten des Weiteren nur eine geringe Phagozytoseaktivität [123].

Lymphozyten

Blut enthält 5 x 10^9 Erythrozyten /ml (7,5 µm), 2,5 x 10^8 Thrombozyten/ml (0,1 µm) und 6-8 x 10^6/ml Leukozyten (12-20 µm). Von den Leukozyten kreisen 5 % im Blut, wobei davon wiederum 60 % neutrophile Granulozyten, 6-7 % Monozyten und 31 % Lymphozyten sind. Von der Gesamtlymphozytenzahl eines Erwachsenen befinden sich wiederum nur ca. 2 % im Blut. Die Lebenszeit beträgt der Lymphozyten beträgt 5-8 Tage. Ihre ungefähre Anzahl im Körper eines Erwachsenen beträgt ca. 500 x 10^9 Zellen, die mit einer durchschnittlichen Wanderungszeit von ca. 30 min einmal am Tag im Blut zirkulieren [124]. Die $CD4^+$-T-Zellen machen 60 % der zirkulierenden Lymphozyten aus.

CD4-Oberflächenantigen

Das CD4-Molekül ist ein T-Zell-Oberflächenantigen. Es ist ein Membranglykoprotein mit einem mittleren Molekulargewicht von 55 kDa und bildet die HIV-Bindungsstelle (HIV: human immunodefiniency virus) [125]. Liegt das CD4-Molekül assoziiert mit MHC-II-Klasse Molekülen auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen vor, kann eine effektive Immunantwort ausgelöst werden.

Die Expressionsstärke von CD4 wird durch viele Stimuli moduliert, wie Mitogene (ConA=concancavalic A, PHA = Phytohemagglutinin gegen TCR, PMA: Phorbolmyristat-acetat u.a.m.) oder eine HIV-Infektion. Dies führt zu einer Herunterregulierung des CD4-Antigens. Eine Studie über den CD4-Umsatz (turnover) in Bezug auf die Halbwertszeit, Endozytose, Degradierung und Neusynthese wurde mit Phorbolester akivierten Lymphozyten und der U937-Zelllinie durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in ruhenden Lymphozyten und U-937-Zellen praktisch keine Internalisierung des CD4-Oberflächenantigens stattfindet [126]. Bei Untersuchungen zur Modulation des Oberflächenantigens wurden sieben verschiedene Anti-CD4-Antikörper verwendet. Bei 37°C fand einer Internalisierung des Antikörper-Antigen-Komplexes statt, bei 4°C nicht. NaN_3 blockiert den Internalisierungsprozess des Rezeptors bei 37°C [127].
Bei der U937-Zelllinie konnte festgestellt werden, dass bei einer Apoptose eine Internalisierung induziert wurde, bei einem nekrotischen Zerfall der Zelle dagegen nicht. Im Gegensatz zu Lymphozyten zeigen T-Zelllinien normalerweise nur eine geringe Oberflächenantigeninternalisierung [128]. Die CD4-Expression wurde infolgedessen vor jedem Versuch sowohl für die Lymphozyten als auch die Zelllinie durch Fluoreszenzmarkierung überprüft.

Substanzen, Puffer und Lösungen sowie weitere Geräte

Die Puffer und Lösungen wurden mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage hergestellt (Milli-Q $_{plus}$, Millipore, Bedford, USA). Dieses Wasser ist unter anderem vollständig entsalzt sowie steril. Die Lagerung der Lösungen erfolgte – sofern nicht anders erwähnt – bei Raumtemperatur. Angegeben sind die Firmen, -sitze, Produktnummern (Produktnr.) und Chargenbezeichnungen (Ch.B.).

Tab. 27: Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Magnetische Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MS/RS+-Säulen	Zwischenkornvolumen ca. 400 µl, 130-041-301
VS+-Säulen	Zwischenkornvolumen ca. 480 µl, 130-042-401
XS+-Säulen	Zwischenkornvolumen ca. 6,2 ml, 130-041-202
weitere Produkte, die als Zubehör mitgeliefert wurden: 3-Wege-Hähne, Spritzen 50 ml,	
Sephadex-Säulen	Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg
PD10	Produktnr.: 17-0851-01 Aufgabevol.: 2,5 ml, Elutionsvol.: 3,5 ml
NAP10	Produktnr.: 17-0854-01 Aufgabevol.: 1,0 ml, Elutionsvol.: 1,5 ml
NAP™5	Produktnr.: 17-0853-01 Aufgabevol.: 0,5 ml, Elutionsvol.: 1,0 ml

Tab. 28: Fortsetzung der Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Magnetische Nanopartikel	
Anti-hCD4-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 130-045-101, NE 9524
Streptavidin-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 130-048-101, NE 9330
Oleoylsarcosin-Eisenoxidpartikel	Mediport Kardiotechnik, Berlin; MF 4
Stärke-Cobaltferritpartikel	Firma Chemicell, Berlin; MC-1, 24, 41, 45, 48/2
Dextran-Eisenoxid-Paritkel	Meito Sangyo, Japan; DDM 128N/1008, 1020, 1031

Tab. 29: Fortsetzung der Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Latexpartikel FluoroSpheres®biotin-labeled microspheres, 1 % solids	Molecular Probes, Niederlande
0,04 µm, yellow-green fluorescent (505/515)	F-8766, 6991-1
0,2 µm, yellow-green fluorescent (505/515)	F-8767, 6972-1
1 µm, non- fluorescent	F-8769, 6987-1
Antikörper	
	Dianova GmbH, Hamburg
Kaninchen IgG-SP-Biotin, Gesamtmolekül, ChromPure	011-060-003, 39890
Maus IgG-SP-Biotin, Gesamtmolekül, ChromPure	015-060-003, 42326
Maus IgG-SP-Biotin, $F(ab)_2$, ChromPure	015-060-006, 44819
Anti-Human CD4-Biotin, Maus, Gesamtmolekül	CBL 494B, 494B108K
Anti-Human CD4, Maus, Gesamtmolekül	CBL 494, 494204G
Anti-human-IgG-SP-Biotin, Maus, Gesamtmolekül (H+L) spezifisch	209-065-082, 41268
Anti-human-IgG-SP-Biotin, Maus, $F(ab)_2$ (H+L) spezifisch	209-066-082, 40977
Anti-human-IgG-SP-Biotin, Maus, Gesamtmolekül Fcγ Fragment spezifisch	209-065-098, 44586
Anti-human-IgG-POD, Maus, $F(ab)_2$ Fcγ Fragment spezifisch	209-066-098, 35749
Anti-human-IgG-SP-POD, Maus, Gesamtmolekül Fcγ Fragment spezifisch	209-035-098, 40945
Anti-human-IgG ohne Markierung, Maus, Gesamtmolekül, Fcγ Fragment spezifisch	209-005-098, 41002
	Pharmingen, Belgien
Maus IgG_1,κ -Biotin, Gesamtmolekül, isotype control	33812X, MO48072
Maus IgG_{2a},κ -Biotin, Gesamtmolekül, isotype control	030226, MO28107
Anti-human-IgG-Biotin, Maus IgG, Gesamtmolekül	34162D, MO 34376

Tab. 30: Fortsetzung der Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Antikörper	
	Pharmingen, Belgien
Maus IgG_1,κ -Biotin, Gesamtmolekül, isotype control	33812X, MO48072
Maus IgG_{2a},κ -Biotin, Gesamtmolekül, isotype control	030226, MO28107
Anti-human-IgG-Biotin, Maus IgG, Gesamtmolekül	34162D, MO 34376
	Becton Dickinson, Heidelberg
Simultest IMK Lymphocyte Kit	340182
Isotypkotrolle-FITC IgG_1	349041
Isotypkotrolle-PE IgG_{2a}	340459
Anti Human CD4-Biotin	347321/7321, 70489
Anti Human CD4-FITC	340133
	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Humanes IgG aus Serum	I-4506, 89F8802, 38H9085
	Schering AG, Berlin [99]
Anti-DSPA, Kaninchen, Gesamtmolekül, affinitätsgereinigt	970274, 14
Anti-DSPA-Biotin, über Zuckergruppen konjugiert, Kaninchen, Gesamtmolekül affinitätsgereinigt	RS 685
Anti-DSPA-POD, Kaninchen, Gesamtmolekül, affinitätsgereinigt	
Puffer und Puffersubstanzen	
Boran-Dimethylamin-komplex	Sigma-Aldrich, Taufkirchen 18,023-8, 03615-027
Bovine Plasma, nonsteril	Juk-Kraeber GmbH 01816001-2, 3109
BSA (Albumin Bovine): Initial fractionation by heat shock Fraktion V 98 %, M_r = 66 kDa, IEP = 5, pro Molekül 30-35 reaktionsfähige Aminogruppen [129]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen A-6918, 19H0650
Biotinyliertes Rinderserumalbumin (BSA-Biotin), lyophilisiertes Pulver, 90 % Albumin, 1 Mol Albumin/ 8-12 Mol Biotin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen B-6043, 17H08905
BSA-Puffer	0,1 % BSA/PBS
0,1 % BSA-Puffer	0,1 %BSA /PBS/0,02 %NaN3
1 % BSA-Puffer	1 %BSA /10 x PBS/0,2 %NaN3
Carboxydextran	Meito Sangyo (Japan)
CellFix™ 1 % Formaldehyd in PBS	Becton Dickinson, Heidelberg 340181
CellWASH™	Becton Dickinson, Heidelberg 349524
Citratpuffer pH 5,0 25 mM Citronensäure, 50 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen P-4809, 16H8923

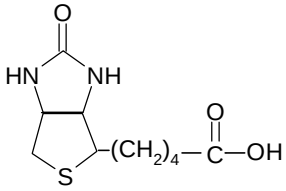
Tab. 31: Fortsetzung der Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Puffer und Puffersubstanzen	
FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg 349202
Coatingpuffer: pH 9,6	15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9,6 (NaOH)
$rDSPA_{\alpha 1}$	Schering AG, Berlin
EDC, (1-Ethyl-3-(3-dmethylaminopropyl) Carbodiimid HCl 98 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen E 7750
EDTA p.A. (Titriplex III, Ethylendinitriloessigsäure Dinatriumsalz- Dihydrat,	Merck, Darmstadt 8418, 616KB 2158618
EDTA 0,5M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen E-7889, 48H8508
EDTA-Puffer	PBS/0,5 % BSA/2mM EDTA
Ethanolamin, C_2H_7NO, auf pH 7,4 einstellen	Aldrich-Suchardt, München 800849, 072435
FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg 349202
FicollPaque Plus Pharmacia	Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg, 17-1441-02
Glutaraldehyd 25 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen G400-4, 0270573
HBS-EP: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0,003 M EDTA, 0,05 % Tween 20	Biacore® AB, Uppsala, Schweden
Jodogen (1,3,4,6-Tetrachloro-3a, 6a-Diphenylglycoluril)	Pierce, Illinois, USA 28600ZZ
KH_2PO4 p.A.	Merck, Darmstadt 4873, 609A95573
D-Mannitol, Reinheit 98 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen M 235-7, 096 15-046
Methoxypolyoxyethylenamin, Mr.: 5000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen M 4147, 60H7205
NaOH granulat	Merck, Darmstadt 1.06467.9010, K25452567829
Natrium Meta-Periodat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen 31 44-8
Natriumazid NaN_3	Merck-Schuchardt, München 822335
Na_2HPO_4 x 2 H_2O p.A.	Merck, Darmstadt 106580, 203K 10937180
NaH_2PO_4 x H_2O p.A.	Merck, Darmstadt 10 6346, 033A 473646
Na_2CO_3	Riedel-de Häen, Taufkirchen 31432, 7337B
$NaHCO_3$	Riedel-de Häen, Taufkirchen 31437

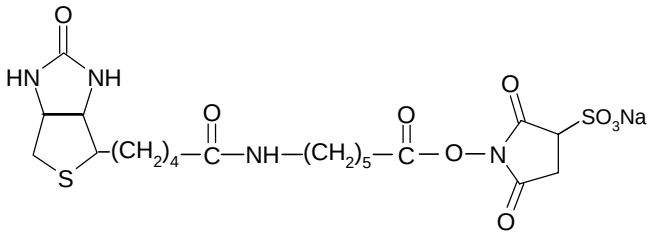
Tab. 32: Fortsetzung der Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Puffer und Puffersubstanzen	
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt 1.06400.5000, K91077500B17
$Na^{125}I$	Amersham Pharmacia Biotec Europe GmbH, Braunschweig IMS.30
o-Phenylendiamine Dihydrochloride Tablets	Sigma-Aldrich, Taufkirchen P-8287, 19H8252
PBS: Phosphate buffered saline pH 7,4 NaCl 120 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l, Phosphat, 10 mmol/l	Sigma-Aldrich, Taufkirchen 1000-3, 59H1129, 29H6039
PBST	PBS + 0,5 g Tween® 20 /1000 ml
Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,4	19 ml Lösung A 81 ml Lösung B 100 ml H_2O
Phosphatpuffer 10 mM, pH 7,4	1: 10 Verdünnung der 100mM-Lösung
Phosphatpuffer 10 mM, pH 9	Titration der Lösung B mit NaOH
Phosphatpuffer Stammlösungen:	Lösung A: 0,2M NaH_2PO_4 Lösung B: 0,2M Na_2HPO_4
PNB-Puffer	1 %BSA/PBS/0,01 % NaN_3
Biotinylierter Primer: DNA aq, Länge: 20 mer, Sequenz: 5′3′, 10 OD = 51,5 mol,	TIB MOLBIOL, Berlin 137961
Rinderplasma	Kraeber GmbH, non-steril 01816001-2, 3109
Serumzusätze: PenStrep; Penicillin-Streptomycin-Neomycin Rinderserum: ca. 10 % (v/v) FKS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen P-3664, 68H2324
Substratpuffer: pH 5,0	s. Citratpuffer
Sulfo-NHS, ((+)-N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure Natriumsalz Hydrat),	Pierce, Illinois, USA 24510ZZ
Titrisol, 1N HCL	Merck, Darmstadt 1.09970, 50100105
Trypanblue sterile 0,4 %	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe 15250-061, 1017865
Tween®20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen 27,434-8, 09925-076
Wasserstoffperoxid 35 %	Merck, Darmstadt 1.08600, K21137500432
Zellmedium: RPMI 1640 Medium with Glutamax-I, 25mM Hepes	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe 72400-021, 3023496

Tab. 33: Fortsetzung der Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Elektronenmikroskopie	
Waschpuffer für die Elektronenmikroskopie (WP)	0,2M Cacodylatpuffer, pH 7,4 + 6mM Hepes, + 50mM NaN_3 + 2mM $CaCl_2$ + 2mM $MgCl_2$
MIX für GA-Fixierung für je eine Probe: 880 µl	100 µl Cacodylatpuffer, pH 7,4, 1µl 1M $CaCl_2$, 1µl $MgCl_2$, 10 µl NaN_3, + Aqua bidest.
GA-Fixativ: 880 µl MIX + 120 µl 25 % GA	Endkonzentration 3 % GA erst unmittelbar vor der Fixierung dazugeben
2 x Waschpuffer 1 (WP1)	0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,4, 2mM $CaCl_2$ -> 1x WP 1
4 % OsO_4-Stammlösung	in Aqua bidest.
2 % OsO_4-Fixativ	1T WP1 + 1T 4 % OsO_4,
2 % Low-Gelling-Agarose	in WP 1
UA-Fixativ	2 % UA in 0,9 % NaCl
Propylenoxid	Merck, Darmstadt
Eponharzmischung	Glycidether 100 der Firma Roth + Zusätze
Avidin-Biotin-System	
Avidin from hen egg white, >78 % Reinheit, IEP = 10, M_r = 66-69 kDa, stabil: bis 85 °C, pH-Bereich 2-13, 8 M Harnsäure [130], Kohlenhydratanteil verantwortlich für starke unspezifische Bindung [131]	Fluka, Taufkirchen 1368, 2965160
Neutravidin ™, nicht glykosyliertes Avidin, IEP = 6,3 M_r = 60 kDa	Pierce, Illinois, USA 31000ZZ, 98042273
Streptavidin: Gewinnung aus der Kulturbrühe von *Streptomyces avidinii*, geringe unspezfische Bindung, kein Kohlenhydratanteil [91], IEP = 5-6, M_r = 60 kDa [130, 132, 133].	Sigma-Aldrich, Taufkirchen S-4762
Streptavidin-POD	Sigma-Aldrich, Taufkirchen S-5512, 98H9170
D-Biotin: Vitamin IEP = 3,5, M_r = 244 kDa, Löslichkeit 0,22 mg/ml in Wasser [130], Blutkonzentration 0,066-0,6 µg/l [80]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen B-4501, 59H1129
	($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) Hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-pentansäure

Tab. 34: Fortsetzung der Substanzliste

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Avidin-Biotin-System	
Biotin-Derivat:[130], 	Pierce, Illinois, USA 21335ZZ Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido) hexanoat

Tab. 35: Liste weiterer Gefäße- und Geräte.

	Firma, Sitz, Produktnr., Ch.B.
Monovette-Kanüle: 20 G x 1 ½ Nr. 2, 0,8 x 38 mm, grün	Sarstedt, Nümbrecht 85.1162, 52960265
Spritzen: Monovette NH4-Herparin, 10-30 I.E./ml Blut, orange Citrat 0,106 vordosiert, 1:10, grün	Sarstedt, Nümbrecht 04.1936.001, 58376189 02.1067.001, 52705077
Präzisions-Küvetten	Helma, Spezialglas, 101-0S, 10 mm
Elektromagnet	45 mm Elektromagnet, Modell 3470 Buckley Systems LTD; GMW Magneticsystems
Software: Magnet control system	Labview ver 4.0
Digitales Teslameter	DTM-1333 Schäfer Gesellschaft, Deutschland
Jahnke & Kunkel, IKA-Labortechnik: Laborschüttler Magnetrührer und Heizplatte Vortexter	 HS 500, 10-300 Hub/min IKAMAG® RCT
Zentrifugen Megafuge 1,0 (Zell) Minifuge RF Tischzentrifuge 5415	 Heraeus Sepatech Heraeus Sepatech Eppendorf, Deutschland
pH-Meter	Modell 763 Multi-calimatic Fa. Knick, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml, Disposable Centrifuge Tubes	Corning, USA 430791
Zentrifugenröhrchen 50 ml	
FACS-Röhrchen: 5 ml Falcon Polypropylen-röhrchen, 12 x 75 mm mit Deckel	Becton Dickinson, Heidelberg 352054

11 Zusammenfassung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das Potential einer neuartigen diagnostischen Methode, der Magnetrelaxometrie, als ein Verfahren zur spezifischen Detektion von Bindungsreaktionen für die *In vivo*-Diagnostik anhand von *In vitro*-Untersuchungen zu überprüfen.

Als Signalgeber werden bei diesem Verfahren superparamagnetische Nanopartikel eingesetzt. In dieser Arbeit wurden superparamagnetische Eisenoxid- und Cobaltferritpartikel verwendet. Untersucht wurden insbesondere ihre Stabilität und spezifische Signalstärke bezogen auf den Metallgehalt der Teilchen. Von den untersuchten Teilchen eigneten sich besonders Dextran-modifizierte Eisenoxidnanopartikel. Durch eine Optimierung mittels magnetischer Fraktionierung konnte eine Nachweisgrenze von 32 pmol Eisen erreicht werden. Es ist allerdings zu erwarten, dass die Empfindlichkeit der Methode durch eine weitere Optimierung der Teilchengrößenverteilung noch wesentlich gesteigert werden kann.

Um die Spezifität des Nachweises von Bindungsreaktionen mit der Magnetrelaxometrie zu untersuchen, wurden spezifisch bindende magnetische Sonden hergestellt. Dazu wurden die Oberflächen der Nanopartikel mit Biotin, Streptavidin und verschiedenen biotinylierten Antikörpern modifiziert. Zunächst wurde die Qualität der hergestellten Sonden bezüglich ihrer signalgebenden Eigenschaften magnetrelaxometrisch und die Teilchengröße mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt sowie die Stabilität in den für *In vivo*- bzw. *In vitro*-Untersuchungen relevanten Medien untersucht.

Die Bindungsfähigkeit der hergestellten Sonden wurde in homogenen und heterogenen Bindungsreaktionen überprüft. Die Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie zeigte sich hier für die Bestimmung von Analyten in flüssiger homogener Phase. Zeitabhängige Bindungsreaktionen können mit dieser Methode im Sekundenbereich kontinuierlich verfolgt werden. Erstmals konnten außerdem Bindungsreaktionen in Vollblut untersucht werden. Die in flüssiger homogener Phase erzielten Ergebnisse konnten mittels PCS-Messungen in Puffer bestätigt werden. Die Bindungsfähigkeit der Sonden an eine feste Phase wurde durch Untersuchungen mit der Surface Plasmon Resonanz Spektroskopie (SPR) gesichert.
Des Weiteren wurden verschiedene magnetische Festphasen-Relaxationsimmunoassays (MARIAs) durchgeführt. In Hinblick auf die *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnet-

relaxometrie war die Untersuchung zur spezifischen Detektion der gebundenen Sonde in Anwesenheit der ungebundenen Sonde von besonderem Interesse, da dies die Grundvoraussetzung für eine spezifische Detektion der gebundenen magnetischen Nanopartikel *in vivo* darstellt. Die Bindungsspezifität der Magnetrelaxometrie konnte hier wieder erfolgreich bestätigt werden.

Hinsichtlich der *In vitro*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie wurden die MARIAs mit Enzym-linked Immunosorbentassays (ELISAs) verglichen. Es konnte für zwei unterschiedliche Antigene unter Verwendung verschiedener Assaydesigns erstmals gezeigt werden, dass magnetische Relaxationsimmunoassays reproduzierbar und mit einer den ELISAs vergleichbaren Empfindlichkeit durchgeführt werden können. Durch eine weitere Optimierung des Assaydesigns bezüglich der magnetischen Nanopartikel und der Methode ließe sich die Empfindlichkeit der MARIAs weiter steigern.

Als ein weiterer Schritt hin zur *In vivo*-Diagnostik wurden mit der Magnetrelaxometrie auch magnetisch markierte Zellen vermessen. Es wurde sowohl die Bindung der Sonden an die Zellen direkt verfolgt als auch magnetisch separierte Zellen untersucht. Allerdings konnte in keinem Fall ein bindungsspezifisches Signal detektiert werden. Da die Bindung der magnetischen Nanopartikel an die Zelloberfläche sowohl elektronenmikroskopisch als auch mittels magnetischer Zellseparationen nachgewiesen werden konnte, ist als Ursache für die fehlenden Signale bei der magnetischen Relaxationsmessung ein zu geringer Markierungsgrad der Zellen anzunehmen.

Während der Arbeit wurde zusätzlich eine weitere *in vitro* diagnostische Methode entwickelt, die auf der Messung der magnetooptischen Relaxation der Doppelbrechung einer Suspension magnetischer Nanopartikel nach Abschalten eines äußeren Magnetfeldes beruht. Es konnte gezeigt werden, dass auch mit dieser Methode Bindungsreaktionen in homogener Phase bestimmt werden können. Das Verfahren zeigte eine mit der Magnetrelaxometrie vergleichbare Sensitivität. Aufgrund des deutlich geringeren messtechnischen Aufwands ist die magnetooptische Messung ein für *In vitro*-Untersuchungen sehr vielversprechendes neuartiges Messverfahren. Im Gegensatz zur Magnetrelaxometrie ist eine *In vivo*-Anwendung der neuen Messtechnik angesichts des optischen Messprinzips allerdings nicht möglich.

Mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Magnetrelaxometrie eine neue sensitive *in vitro* diagnostische Methode zur Durchführung von homogenen und heterogenen Bindungsassays darstellt. Die Bindungsspezifität der Magnetrelaxometrie konnte mehrfach erfolgreich gezeigt werden. Die Magnetrelaxometrie ist nach den vorliegenden Ergebnissen zur Anwendung in der *In vivo*-Diagnostik prinzipiell geeignet und stellt im Anwendungsgebiet der spezifischen Bildgebung eine sehr interessante Alternative zu den etablierten Verfahren, wie der Magnetresonanztomographie und der Immunszintigraphie, dar.

12 Literaturverzeichnis

[1] Pschyrembel Wörterbuch, Radioaktivität, Strahlenwirkung, Strahlenschutz. de Gruyter, Berlin, 1986, S. 17-18.

[2] Pschyrembel Wörterbuch, Radioaktivität, Strahlenwirkung, Strahlenschutz. de Gruyter, Berlin, 1986, S. 55.

[3] K. Ulrich: Wege und Irrwege der Kontrastmittelforschung von Wilhelm C. Röntgen bis heute. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, 1995, S. 1-5.

[4] E. Moser: Radiologie 1895-1995: Entwicklung, Klinische Wertung und Sozioökonomische Bedeutung des Faches am Beispiel der Nuklearmedizin. *Fortschr. Röntgenstr*. **165** (1996) 339-344.

[5] N.P. Alazraki und F.S. Mishkin: Fundamentals of Nuclear Medicine, 2nd Edition, The Society of Nuclear Medicine, New York, 1991.

[6] W. Weitschies: Kontrastmittel für die bildgebende medizinische Diagnostik. In: R.H. Müller, G.E. Hildebrand (Hrsg.), Pharmazeutische Technologie - Moderne Arzneiformen; 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1998, S. 259-292.

[7] M. Kresse: Spezifische Kontrastmittel für die Magnetresonanz-Tomographie: Herstellung und Charakterisierung von superparamagnetischen Transferrin-Dextran- und Transferrin-Chondroitin-Magnetiten. Dissertation, Freie Universität Berlin, 1994.

[8] F-A. Stichnoth: MR-Tomographie Technische Grundlagen und klinische Aspekte. 2. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 1994.

[9] G.L. Wolf: Targeted delivery of imaging agents: An overview. In: Handbook of targeted delivery of imaging agents. V.P. Torchilin (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1995, pp. 4-5.

[10] G.L. Wolf: Targeted delivery of imaging agents: An overview. In: Handbook of targeted delivery of imaging agents. V.P. Torchilin (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1995, pp. 3-31.

[11] T.M. Behr, S. Gratz, P.M. Markus, R.M. Dunn, M. Hufner, A. Schauer, M. Fischer, D.L. Munz, H. Becker und W. Becker: Anti-carcinoembryonic antigen antibodies versus somatostatin analogs in the detection of metastatic medullary thyroid carcinoma. Are carcinoembryonic antigen and somatostatin expressing prognostic factors? *Cancer* **15** (1997) 2436–2457.

[12] I. Loutfi, P.M. Chisholm, D. Bevan, J.P. Lavender: In vivo imaging of rat lymphocytes with an indium 111-labelled anti-T cell monoclonal antibody: A comparison with indium 111-labelled lymphocytes. *Eur. J. Nucl. Med.* **16** (1990) 69-76.

[13] S. Cerdan, H.R. Lötscher, B. Künnecke und J. Seelig: Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents in magnetic resonance imaging of tumors. *Magn. Reson. Med.* **12** (1989) 151-163.

[14] R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, A.S. Lee, L. Johnson und T.J. Brady: Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: An intravenous contrat agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology* **175** (1990) 494-498.

[15] T.T. Shen, R. Weissleder, M. Papisov, A. Bogdanov, Jr. und T.J. Brady: Monocrystallin iron oxides nanocompounds (mion): Physicochemical properties. *Magn. Reson. Med.* **29** (1993) 599-604.

[16] R. Weissleder, A.S. Lee, B.A. Khaw, T. Sheng und T.J. Brady: Antimyosin-labeled monocystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging *Radiology* **182** (1992) 381-385.

[17] L. Josephson, C-H. Tung, A. Moore und R. Weissleder: High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-tat peptide conjugates. *Bioconj. Chem.* **10** (1999) 186-191.

[18] B. Bonnemain: Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: Physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *J. Drug Targeting.* **6** (1998) 167-174.

[19] R. Weissleder, A.S. Lee, A.J. Fischmann, P. Reimer, T. Shen, R. Wilkinson, R.J. Callahan und T.J. Brady: Polyclonal human immunoglobulin G labeled with polymeric iron oxide: Antibody MR imaging. *Radiology* **181** (1991) 245-249.

[20] W. Weitschies, R. Kötitz, T. Bunte und L. Trahms: Determination of relaxing or remanent nanoparticle magnetization provides a novel binding-specific technique for the evaluation of immunoassays. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **7** (1997) 5-8.

[21] W. Weitschies: Pharmazeutisch-technologische Entwicklung von Substanzen und Meß-verfahren zur Detektion biologischer Bindungsreaktionen sowie zur Untersuchung der Gastrointestinalpassage von Arzneiformen. Habilitationssschrift, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1998

[22] Wörterbuch Physik, Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1998, S. 282.

[23] Wörterbuch Physik, Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1998, S. 91.

[24] M. Kresse, D. Pfefferer und R. Lawaczeck: Magnetopharmaka. *Dtsch. Apoth. Ztg*. **33** (1994) 13-25.

[25] D. Berkov: Magnetic fields in condensed matter: General concepts. In: W. Andrä, H. Nowak (Hrsg.), Magnetism in Medicine a Handbook, Wiley-VCH; 1st Edition, Berlin, 1998, pp. 48–50.

[26] Wörterbuch Physik, Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1998, S. 285.

[27] Wörterbuch Physik, Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1998, S. 339.

[28] S. Saini, R.B. Frankel, D.D. Stark und J.T. Ferrucci, Jr.: Magnetism: A primer and review. *Am. J. Roentgenol.* **150** (1988) 735-743.

[29] Wörterbuch Physik, Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1998, S. 80.

[30] T. Sato, C. Kuroda, M. Saito und M. Sugihara: Preparation and magnetic characteristics of ultra-fine spinel ferrites. In: Ferrites Y. Hoshino, S. Iida, M. Sugimoto (Eds.). Proceedings of the International Conference, University of Tokyo Press, Tokyo, 1970, pp. 72-75.

[31] P.W. Selwood: Magnetochemistry. 2nd Edition, Interscience Publishers INC., New York, 1956, p. 38.

[32] R. Kötitz: Untersuchung des Relaxationsverhaltens von magnetischen Nanopartikeln und daraus abgeleitete Anwendung für einen bindungsspezifischen Immunoassay. Dissertation, Freie Universität Berlin, 1997.

[33] P. Langevin: Magnetisme et Theorie des Electrons. *Ann. Chim. Phys*. **8** (1905) 70-127.

[34] C.P. Bean und J.D. Livingston: Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.* **30** (1959) 120S-129S.

[35] J.-C. Bacri, R. Perzynski, D. Salin, V. Cabul und R. Massart: Magnetic colloidal properties of ionic ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **62** (1986) 36-46.

[36] K. Raj und R. Moskowitz: Commercial applications of ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater*. **85** (1990) 233-245.

[37] U. Schwertmann und M.R. Cornwell: Iron oxides in the laboratory. Preparation and characterization. VCH Verlagsgesellschaft, New York, 1991, pp. 10-11.

[38] S.W. Charles: Magnetic Fluids (Ferrofluids). D.L Doormann und D.Fiorani (Eds.), Studies of magnetic properties of fine particles and their relevance to material science, Elvsevier Science Publishers B.V., 1992, pp. 267-276.

[39] F. Tourinho, R. Franch, R. Massart and R. Perzynski: Synthesis and magnetic properties of manganese and cobalt ferrite ferrofluids. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **79** (1989) 128-134.

[40] R.P. Blakemore: Magnetotatic bacteria. *Science* **190** (1975) 377-379.

[41] C. Walcott, J.L. Gould und J.L. Kirschvink: Pigeons have magnets. *Science* **205** (1979) 1027-1029.

[42] J. Zoeger, J.R. Dunn und M. Fuller: Magnetic material in the head of dolphin. *Science* **213** (1981) 892-894.

[43] J.L. Kirschvink, A. Kobayashi-Kirschvink und B.J. Woodford: Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 7683-7687.

[44] U. Schwertmann und M.R. Cornwell: Iron oxides in the laboratory. Preparation and characterization. VCH Verlagsgesellschaft, New York, 1991, p. 111-117.

[45] R.S. Molday und D. Mackenzie: Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labelling and magnetic separation of cells. *J. Immunol. Methods* **52** (1982) 353-367.

[46] R.M. Taylor, B.A. Maher und P.G. Self: Magnetite in soils: I. The synthesis of single-domain and superparamagnetic magnetite. *Clay minerals* **22** (1987) 411-422.

[47] R.F. Ziolo, E.P. Giannelis, B.A. Weinstein, M.P. O´Horo, B.N. Ganguly, V. Mehrotra, M.W. Russel und D.R. Huffman: Matrix-mediated sythesis of nanocrystalline γ-Fe_2O_3: A new optically transparent magnetic material. *Science* **257** (1992) 219-223.

[48] M. Hasegawa und S. Hakukoku, US Patent, 4101435, 1978.

[49] F. Tourinho, R. Franch, R. Massart and R. Perzynski: Synthesis and magnetic properties of manganese and cobalt ferrite ferrofluids. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **79** (1989) 128-134.

[50] R.H. Müller: Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, Band 37 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996.

[51] A. Bogdanov, Jr., R. Weissleder, T.J. Brady, Jr.: Long-circulating blood pool imaging agents. *Adv. Drug Del. Reviews* **16** (1995) 333-348.

[52] R. Weissleder, D.S. Stark, B.L. Engelstad, B.R. Bacon, C.C. Compton, D.L. White, P. Jacobs und J. Lewis: Superparamagnetic iron oxide: Pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol*. **152** 1989 167-173.

[53] S. Benderbous, C. Corot, P. Jacobs und B. Bonnemain: Superparamagnetic agents: Physicochemical characteristics and preclinical imaging evaluation. *Radiology* **3** (1996) 292-294.

[54] S. Benderbous und B. Bonnemain: Superparamagnetic nanoparticles as blood-pool contrast agents. *Radiology* **35** (1995) 248-252.

[55] R.W. Chantrell, S.R. Hoon und B.K. Tanner: Time-dependent magnetization in fine-particle ferromagnetic Systems. *J. Magn. Magn. Mater.* **38** (1983) 133-141.

[56] T.K. Mc Nab, R.A. Fox und J.F. Boyle: Some magnetic properties of magnetite (Fe_2O_3) microcrystals. *J. Appl. Phys.* **39** (1968) 5703-5711.

[57] S.N. Erné, H.D. Hahlbohm, H.J. Scheer, Z. Trontelj: The Berlin magnetically shielded romm (BMSR). Performances: In: S.N. Erné, H.D. Hahlbohm, H. Lübbig (Eds.), Biomagnetism. de Gruyter, Berlin, 1981, pp. 79-87.

[58] W. Andrä, H. Nowak: Magnetism in medicine: A handbook. Wiley-VCH, Berlin, 1998, S. 89.

[59] R. Kötitz, J. Lange, T. Rheinländer, W. Weitschies, W. Semmler, E. Romanus, J. Schambach, L. Warzemann, P. Weber, A. Haller, S. Hartwig, T. Kerberger, S. Knappe, H. Matz und L. Trahms: Supraleitung, Thema: Magnetrelaxometrie (MRX). Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Abschlussbericht, Förderkennzeichen: 13N7005/1, 2000, S. 61.

[60] D.V. Berkov und R. Kötitz: Irreversible relaxation behaviour of a general class of magnetic systems. *J. Phys. Condens. Matter* **8** (1996) 1257-1266.

[61] J. Falbe und M. Regitz: Römpp-Lexikon Chemie, 10. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1997, S. 2249.

[62] H. Rein: Stärke. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **137** (1997) 770 – 778.

[63] T.T. Shen, A. Bogdanov, K. Poss, T.J. Brady und R. Weissleder; Magnetically labeled secretin retains retains receptor affinity to pancreas acinar cells. *Bioconj. Chem.* **7** (1996) 311-316.

[64] s. [59] S. 21.

[65] H. Koch, R. Cantor, D. Drung, S.N. Erné, K.P. Matthies, M. Peters, T. Ryhänen, H.J. Scheer und H.D. Hahlbohm: A 37 channel de SQUID magnetometer system. *IEEE Trans. Magn.* **27** (1991) 2793-2796.

[66] R. Kötitz, P.C. Fannin und L. Trahms: Time domain study of Brownian and Néel relaxation in ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **149** (1995) 42-46.

[67] R. Massart, E. Dubois, V. Cabuil und E. Hasmonay: Preparation and properties of monodisperse magnetic fluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **149** (1995) 1-5.

[68] C.W. Jung und P. Jacobs: Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: Ferrumoxides, ferrumoxtran, ferrumoxsil. *Magn. Res. Imaging* **13** (1995) 661-674.

[69] Y. Jiang, M.E. Miller, M.E. Hansen, M.N. Myers und P.S. Williams: Fractionation and size analysis of magnetic particles using FFF ans SPLITT technologies. *J. Magn. Magn. Mater.* **194** (1999) 53-61.

[70] Th. Rheinländer, R. Kötitz, W. Weitschies, W. Semmler: Different methods for the fractionation of magnetic fluids. *Colloid Polym. Sci*. **278** (2000) 259-263.

[71] T.G. ST. Pierre, S. Sipos, P. Chan, W. Chua-Anusorn, K.R. Bauchspiess und S. Webb: Synthesis of nanoscale iron oxide structures using protein cages and polysaccahride networks. In: C. Hadjipanayis and R.W. Siegel (Eds.), Nanophase Materials, 1994, pp. 49-56.

[72] Persönliche Mitteilung von Dr. Roman Kötitz.

[73] Th. Rheinländer, J. Justiz, A. Haller, R. Kötitz, W. Weitschies und W. Semmler: Dynamic properties of fractions yielded by magnetic fractionation of magnetic fluids. *IEEE Transactions on magnetics* **35** (1999) 4055-4057.

[74] R.F. Borch, M.D. Bernstein und H.D. Durst: The cyanohydridborate anion as a selective Reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* **93** (1971) 2897-2904.

[75] G.E. Means und R.E. Feeney: Reductive alkylation of amino groups in proteins. *Biochemistry* **7** (1968) 2192-1968.

[76] K.F. Geoghegan, J.C. Cabacungan, H.B.F. Dixon und R.E. Feeney: Alternative reducing agents for reductive methylation of amino groups in proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **17** (1981) 345-352.

[77] J.C. Cabacungan, A.I. Ahmed und R.E. Feeney: Amine boranes as alternative reducing agents for reductive alkylation of proteins. *Anal. Biochem.* **124** (1982) 272-278.

[78] M. Wilchek und E.A. Bayer: The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* **171** (1988) 1-32.

[79] N.M. Green: Avidin 1. The use of [^{14}C]biotin for kinetic studies and for assay. *J. Biochem.* **89** (1963) 585-591.

[80] J.O. Nyalala, E. Livaniou, L. Leondiadis, G.P. Evangelatos und D.S. Ithakissios: Indirekt enzyme-linked method for determining biotin in human serum. *J. Immunoassay* **18** (1997) 1-19.

[81] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel und A. Radbruch: High gradient cell separation with MACS. *Cytometry* **11** (1990) 231-238.

[82] T.V. Updyke und G.L. Nicolson: Immunoaffinity isolation of membrane antigens with biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin-agarose. *Methods Enzymol.* **121** (1986) 717-725.

[83] H. Heitzmann und F.M. Richards: Use of the Avidin-Biotin Complex for specific Staining of Biological Membranes in Electron Microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71** (1974) 3537-3541.

[84] D.J. Hnatowich, F. Virizi und M. Rusckowski: Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J. Nucl. Med.* **28** (1987) 1297-1302.

[85] M. Zhang, Z. Yao, H. Sakahara, T. Saga, Y. Nakamoto, N. Sato, S. Zhao, H. Nakada, I. Yamashina und J. Konishi: Effect of administration route and dose of streptavidin of biotin on the tumor uptake of radioactivity in intraperitoneal tumor with multistep targeting. *Nucl. Med. Biol.* **25** (1998) 101-105.

[86] Y. Nakamoto, T. Saga, H. Sakahara, Z. Yao, M. Zhang, N. Sato, S. Zhao, H. Nakada, I. Yamashina und J. Konishi: Three-step tumor imaging with biotinylated monoclonal antibody, streptavidin and [^{111}]In-DTPA-Biotin. *Nucl. Med. Biol.* **25** (1998) 95-99.

[87] D.S. Wilbur, D.K. Hamlin, K.R. Buhler, P.M. Pathare, R.L. Vessella, P.S. Stayton und R. To: Streptavidin in antibody pretargeting. 2. Evaluation of methods for decreasing localization of streptavidin to kidney while retaining its tumor binding capacity. *Bioconj. Chem.* **9** (1998) 322-330.

[88] M. Rusckowski, M. Fogarasi, B. Fritz und D.J. Hnatowich: Effect of endogenous biotin on the applications of streptavidin and biotin in mice. *Nucl. Med. Biol.* **24** (1997) 263-268.

[89] Firmeninformation: General Procedures in Technical Handbook, 2nd Edition, Cell separation and protein purification. Dynal, Norwegen, 1996, p. 122.

[90] Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 255. Auflage, de Gruyter, Berlin, 1986, S. 1790.

[91] T. Sano, M.W. Pandori, C.L. Smith und C.R. Cantor: Tighter subunit association of streptavidin upon Biotin binding. In: M. Uhlén, E. Hornes, O. Olsvik (Eds.), Advances in Biomagnetic Separation, Eato Publishing Co., Natick, 1994, pp. 21-29.

[92] L.G. Remsen, C.I. McCormick, S. Roman-Goldstein, G. Nilaver, R. Weissleder, A. Bogdanov, I. Hellstrom, R.A. Kroll und E.A. Neuwelt: MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocrystalline iron oxide nanoparticles: the potential for noninvasive diagnosis. *Am. J. Neuroradiol.* **17** (1996) 411-418.

[93] L. Josephson, C-H. Tung, A. Moore und R. Weissleder, High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-tat peptide conjugates. *Bioconj Chem.* **10** (1999) 186-191.

[94] R.F.H. Dekker: Immobilization of a lactase onto a mangetic support by covalent attachement to polyethyleneimine-glutaraldehyde-activated magnetite. *Appl. Biochem. Biotech.* **22** (1989) 289-310.

[95] Y. Cao und M.R. Suresh: Bispecific antibodies as novel bioconjugates. *Bioconj. Chem.* **9** (1998) 635-643.

[96] E. Sternberg, B. Perssons, H. Roos und C. Urbaniczky: Quantitative Determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled Proteins. *J. Colloid and Interface Science* **143** (1991) 513-526.

[97] C. Hawkey: Plaminogen activator in the saliva of the vampire bat Desmodus rotundus. *Nature* **211** (1966) 434-435.

[98] T. Petri, G. Langer, P. Bringmann, L. Cashion, S. Shallow, W.-D. Schleuning und P. Donner: Production of vampire bat plasminogen activator DSPAa1 in CHO and insect cells. *J. Biotechnol.* **39** (1995) 75-83.

[99] M. Hildebrand, T. Bunte, P. Bringmann und A. Schutt: Development of an ELISA for the measurement of DSPAα_1 (Desmodus rotundus salivary plasminogen activator) in plasma and application to investigate pharmacokinetics in monkeys. *Fibrinolysis* **9** (1995) 107-111.

[100] E. Liddell, I.Weeks: Antikörper-Techniken. Spektrum Verlag GmbH, Heidelberg, 1996.

[101] J.E. Butler: Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay. CRC Press, 1991.

[102] R. Kötitz, H. Matz, L. Trahms, H. Koch, W. Weitschies, Th. Rheinländer, W. Semmler, T. Bunte: SQUID based remanenz measurements for binding specific immunoassays. *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **7** (1997) 3678-3681.

[103] R. Kötitz, J. Lange, V. Ponsinet, J.-C. Bacri, J. Browaeys und Th. Rheinländer: Verfahren zur Detektion von Bindungsreaktionen mittels Messung der Relaxation der Doppelbrechung magnetischer Nanopartikel. Aktenzeichen DE 199 38 384.7, 1999.

[104] J.-C. Bacri, R. Perzynski, D. Salin, V. Cabul, R und Massart: Magnetic colloidal Properties of ionic ferrofluid. *J. Magn. Magn. Mater.* **62** (1986) 36-46.

[105] J.-C. Bacri, R. Perzynski, D. Salin, J. Servais: Magnetic transient birefringence of ferrofluids: particle size determination. *J. Physique.* **48** (1987) 1385-1391.

[106] Persönliche Information von Herrn Dr. Palm, Firma Miltenyi Biotec.

[107] T.E. Thomas, S.J.R. Abraham, A.J. Otter, E.W. Blackmore und P.M. Lansdorp: High gradient magnetic separation of cells on the basis of expression levels of cell surfaace antigens. *J. Immunol. Methods* **154** (1992) 245-252.

[108] Firmeninformation: Technische Beschreibung: inductively coupled Plasma atom emission spectroscopy, Bausch und Lomb, ARL, 1983.

[109] R.H. Müller und R. Schuhmann: Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Band 37 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996; S. 23-50.

[110] T.G. Cooper: Biochemische Arbeitsmethoden, de Gruyter, Berlin, 1981.

[111] Firmeninformation. BIAtechnology Handbook, Version AB 1998.

[112] S. Löfas, B. Johnsson, K. Tegendal und I. Rönnberg: Dextran modified gold surfaces for suface plasmon resonance sensors: immunoreactivity of immobilized antibodies and antibody-surface interaction studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1** (1993) 83-89.

[113] B. Johnsson, S. Löfas und G. Lindquist: Immobilization of proteins to a carboxy-methyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in suface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem.* **198** (1991) 268-277.

[114] T. Ramsdale, P.R. Andrews, E.C. Nice Verification of the interaction between peptide T and CD4 using surface plasmon resonance. *FEBS 13166* **333 (**1993) 217-222.

[115] B. Johnsson, S. Löfas, G. Lindquist, A. Edström, R. Müller Hillgren und A. Hansson: Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies.
J. Mol. Recogn. **8** (1995) 125-131.

[116] T. Lindl und J. Bauer: Zell- und Gewebekulturen: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.
3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994.

[117] C. Gutierrez, R.A. Bernabe, J. Vega und M. Kreisler: Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J. Immunol. Methods* **29** (1979) 57-63.

[118] A. Boyum, D. Lovhaug, L. Tresland und E.M. Nordlie: Separation of Leucocytes: Improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality.
Scand. J. Immunol. **34** (1991) 697-712.

[119] S. Guth, M. Koster und A. Thiel. Immunomagnetic isolation of subpopulations of CD34+ human hematopoetic progenitor cells using releasable superparamagnetic microbeads.
Exp. Hematol. **23** (1995) 812-120..

[120] M. Uhlén, E. Hornes und O. Olsvik: Advances in biomagnetic separation.
Eato Publishing Co., Natick, 1994.

[121] L. Sun, M. Zborowski, L. Moore und J.J. Chalmers: Continuous, flow-through immunomagnetic cell sorting in a quadrupole field. *Cytometry* **33** (1998) 1469-475.

[122] F. Kohlrausch: Praktische Physik. In: V. Kose, S. Wagner (Hrsg.), 24. Auflage, Teubner Verlag, Stuttgart, 1996, S. 693-700.

[123] C. Sundström und K. Nilsson: Establishment and characterization of a human histocytic lymphoma cell line. *Int. J. Cancer* **17** (1976) 565-577.

[124] J. Westermann und R. Pabst: Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunology Today* **11** (1990) 406-410.

[125] M. Merkenschlager, D. Buck, P.C.L. Beverley und Q.J. Sattentau: Functional epitope analysis of the human CD4 molecule. *J. Immunol.* **145** (1990) 2839-2845.

[126] C.M. Petersen, E.I. Christensen, B.S. Andresen und B.K. Möller: Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphcytes and U-937 cells. *Exp. Cell Res.* **201** (1992) 160-173.

[127] P. Morel, C. Vincent, J. Wijdenes und J.P. Revillard: Internalization and degradation of anti-CD4 monoclonal antibodies bound to human peripheral blood lymphocytes. *Mol. Immunol.* **30** (1993) 649-657.

[128] W. Malorni, R. Rivabene, M.T. Santini, S. Paradisi, F. Iosi und G. Donelli: Down-modulation of CD4 antigen during programmed cell death in U937 cells. *FEBS Lett.* **336** (1993) 335-339.

[129] Firmeninformation: Pierce Handbuch, 1995.

[130] D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. Nielander, S. Morgensen und E. Conklin: Components of avidin-biotin technology. In: Avidin-biotin chemistry A handbook. Pierce Chemical Company, Rockford, 1992, pp. 1-24.

[131] Y. Hiller, J.M. Gershoni, E.A. Bayer und M. Wilchek: Biotin binding to avidin; Oligosaccharide side chain not required for ligand association. *J. Biochem.* **248** (1987) 167-171.

[132] L. Chaiet und F.J. Wolf: The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **106** (1964) 1-5.

[133] N.M Green: Avidin and streptavidin. *Meth. Enzymol* **184** (1990) S. 51-67.