

Nano-Photothermolyse:
Eine effiziente Methode zur selektiven Elimination
von Zellen *in vitro* mittels Laser aktivierter
Nanogoldpartikel

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Florian Levold

aus

Bassum

Abgabedatum: 30.11.2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Die Vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Medizin und
Experimentelle Immunologie an dem Universitäts- Klinikum Bonn angefertigt.

- | | |
|--------------|----------------------------|
| 1. Gutachter | Prof. Dr. Percy Knolle |
| 2. Gutachter | Prof. Dr. Waldemar Kolanus |

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.04.2010

Erscheinungsjahr: 2010

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne jede unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Alle von mir verwendeten Hilfsmittel und Quellen sind als solche gekennzeichnet.

(Florian Levold)

Auszüge dieser Arbeit gehen in folgende Publikationen ein:

„Effective elimination of suspension and adherent cells by Light-Induced Nanoparticle-Activated Cell-Selection“ Florian Levold, Franziska Winter, Sebastian Ziewer, Andreas Dolf, Gereon Hüttmann and Elmar Endl
(Manuskript eingereicht)

„Precise light-induced cell elimination mediated by immune-targeted gold nanoparticles“ Florian Levold, Sebastian Ziewer, Frank Jüngerkes, Gereon Hüttmann, Andreas Limmer, Percy Knolle and Elmar Endl
(Nach ‘*presubmission inquiry*’; Manuskript in Bearbeitung)

Daten dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

2006 Posterpräsentation auf der „International Society for Analytical Cytology“, Quebec City, Kanada. Titel: Options for a high speed photodamage cell selection using gold nanoparticles and pulsed laser irradiation

2006 Posterpräsentation auf dem „1st Meeting of Societies of Immunology“, Paris, Frankreich. Titel: Laser-activated nanoparticle-directed Cell-Elimination. A proposed method to interfere with immunological processes on a cellular level

2007 Vortrag auf der „European Conference on Biomedical Optics“, München. Titel: Laser-activated nanoparticle-directed cell elimination

2007 Posterpräsentation auf dem „3. BMBF-Symposium Nanobiotechnologie“, Hannover. Titel: Photonische Techniken zur zellulären Nanochirurgie

2009 Vortrag auf der „European Conference on Biomedical Optics“, München. Titel: “Light-Induced Nanoparticle-Activated Cell-Selection” successful stem cell purging in a preclinical model

2009 Vortrag auf der „2nd European Congress of Immunology“, Berlin. Titel: Precise light-induced cell elimination mediated by immune-targeted gold nanoparticles

2009 Vortrag auf der „19th Annual Conference of the German Society for Cytometry“, Leipzig. Titel: Precise light-induced cell elimination mediated by immunetargeted gold nanoparticles

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
Abbildungsverzeichnis:	III
Tabellenverzeichnis:	V
Verzeichnung der verwendeten Abkürzungen und Symbole:	VI
1 Einleitung	1
1.1 Der Einsatz von Lasern in der Biomedizin.....	1
1.2 Selektive Photothermolyse: Eine Methode zur Beeinflussung von Zellen vermittelt mit Lichtenergie absorbierenden Mikro- oder Nanopartikeln durch Aktivierung mit gepulster Laserbestrahlung	4
1.3 Spezifische Eigenschaften von Nanogoldpartikeln unter der Bestrahlung durch Nanosekunden Laserpulsen mit 532nm Wellenlänge.....	7
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2 Materialien und Methoden.....	10
2.1 Materialien.....	10
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte.....	10
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Reaktionskits.....	11
2.1.4 Verwendete Antikörper, Fluorochromkonjugate und Farbstoffe	12
2.1.5 Verwendete Zelllinien.....	13
2.1.6 Verwendete Mäusestämme	14
2.1.7 Verwendete rekombinante Viren.....	14
2.1.8 Verwendete Software	14
2.2 Methoden	15
2.2.1 Konjugation von Nanogoldpartikeln mit Antikörpern.....	15
2.2.2 Bestrahlungssystem für die Nano-Photothermolyse	17
2.2.3 Herstellung von Zytocentrifugen Präparaten	19
2.2.4 Goldenhance™ Entwicklung von Nanogoldpartikeln auf Zellen	20
2.2.5 Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	21
2.2.6 Isolierung primärer Lymphozyten aus der Milz.....	21
2.2.7 Isolierung primärer Zellen aus dem Knochenmark.....	22
2.2.8 Kultivierung primärer Zellen <i>in vitro</i>	22
2.2.9 Zelllinien und ihre Propagation	22
2.2.10 Markierung von Oberflächenantigenen.....	23
2.2.11 Markierung intrazellulärer Antigene	23
2.2.12 Zellfärbung mit CFSE zur Zellmarkierung und Zellproliferationsmessung.....	24
2.2.13 Lebend / tot Färbung mit BCECF und Hoechst33258.....	25
2.2.14 Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen	26
2.2.15 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest.....	26
2.2.16 Applikation <i>in vivo</i>	28
2.2.17 Ganzkörper gamma Bestrahlung mit anschließender Transplantation.....	28
2.2.18 Statistische Analyse.....	29

	Seite
3 Ergebnisse	30
3.1 Nano-Photothermolyse: Eine selektive Methode zur Elimination von Zellen <i>in vitro</i> mittels Laser aktivierter Nanogoldpartikel	30
3.1.1 Selektive Anbindung von Immunogold-Konjugaten an Zellen.....	30
3.1.2 Effiziente Elimination von Suspensionszellen.....	32
3.1.3 Selektive Elimination von Suspensionszellen in Mischkultur	38
3.1.4 Selektive Elimination von adhärennten Zellen	41
3.2 Einfluss physikalischer Parameter auf die Eliminationseffizienz	42
3.2.1 Einfluss von Partikelgröße, Partikelanzahl und Laserleistung auf die Effektivität der Zellelimination.....	43
3.2.2 Abstandsabhängigkeit zwischen Goldpartikel und Zellmembran auf die Effizienz der Nano-Photothermolyse.....	45
3.3 Nebenwirkungen der Nano-Photothermolyse auf aufgereinigte primäre Zellen	47
3.3.1 Die Aufreinigung primärer Zellen mittels Nano-Photothermolyse hat keinen Einfluss auf deren Vitalität.....	48
3.3.2 Die Aufreinigung primärer Zellen durch Nano-Photothermolyse zeigt keine Beeinflussung deren immunologischen Integrität	50
3.4 Effektive und nebenwirkungsfreie Aufreinigung von Tumorzellen aus Knochenmark mittels Nano-Photothermolyse für die Stammzelltransplantation	54
3.4.1 Der Einfluss der Aufreinigung mittels Nano-Photothermolyse auf die Rekonstitution von Blutzellen nach Stammzelltransplantation	55
3.4.2 Der Einfluss der Nano-Photothermolyse auf die immunologische Integrität nach Stammzelltransplantation	58
3.4.3 Erfolgreiche Elimination von Tumorzellen aus Knochenmarkzellen	60
4 Diskussion	64
4.1 Nano-Photothermolyse eine selektive Methode zur Elimination von Zellen <i>in vitro</i>	64
4.2 Einfluss physikalischer Parameter auf die Eliminationseffizienz der Nano-Photothermolyse	68
4.3 Nebenwirkungsfreie Aufreinigung primärer Zellen	72
4.4 Effektive und nebenwirkungsfreie Elimination von Tumorzellen aus Knochenmarkzellen für die Stammzelltransplantation	73
5 Zusammenfassung	78
6 Literaturverzeichnis	79

Abbildungsverzeichnis:

	Seite
Abb. 1 Absorptionsspektren von Wasser (H ₂ O), Melanin und Hämoglobin (HbO ₂) nach Boulnois (1986).....	8
Abb. 2.1 Am IMMEI realisiertes Setup für die Nano-Photothermolyse.....	18
Abb. 2.2 Mechanismus der metallischen Gold Deposition durch Autometallographie unter der Verwendung von Goldenhance™.....	20
Abb. 3.1 Nachweis der Selektivität von Immunogold Partikeln auf Zellen über den konjugierten Antikörper mittels Durchflusszytometrie.....	31
Abb. 3.2 Detektion von Nanogoldpartikeln nach Goldenhance™ Entwicklung auf Zellen mittels Durchlichtmikroskopie.....	32
Abb. 3.3 Elimination von Zellen in Suspension mittels Nano-Photothermolyse.....	34
Abb. 3.4 Effektive Elimination von Zellen in Suspension mit zellspezifischem Immunogold.....	35
Abb. 3.5 Ermittlung der Eliminationseffizienz mittels eines “limited dilution”- Assays.....	37
Abb 3.6 Selektive Elimination einer B-Zell Line in Suspension aus einer Ko-Kultur.....	39
Abb. 3.7 Selektive Elimination von CD8+ Zellen aus murinen Milzzellen in Suspension.....	40
Abb 3.8 Selektive Elimination einer Zelllinie aus einer adhärennten Ko-Kultur.....	42
Abb. 3.9 Einfluss der physikalischen Parameter Partikelgröße, Partikelanzahl und Laserenergie auf die Eliminationseffizienz.....	44
Abb. 3.10 Abstandsabhängigkeit auf die Eliminationseffizienz.....	46
Abb. 3.11 Elimination von B-Zellen aus murinen Milzzellen.....	49
Abb. 3.12 CFSE Profile von stimulierten und unstimulierten murinen CD8+ T-Zellen nach Elimination von B-Zellen aus Milzzellen.....	51
Abb. 3.13 Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 von stimulierten und unstimulierten murinen CD8+ T-Zellen nach Elimination der B-Zellen aus Milzzellen.....	53
Abb. 3.14 Zytokinproduktion von stimulierten und unstimulierten murinen Zellen nach Elimination der B-Zellen aus Milzzellen.....	54
Abb. 3.15 Analyse der weißen Blutzellen von Spender-, Empfänger- und durch Knochenmarktransplantation rekonstituierter Mäuse.....	56
Abb. 3.16 Rekonstitution weißer Blutzellen nach Stammzelltransplantation.....	57
Abb. 3.17 Antigen spezifische <i>in vivo</i> Zytotoxizität.....	59

	Seite
Abb. 3.18 Überlebenskurven von Mäusen transplantiert mit Knochenmark mit CD4+ Tumorzellen BO17.10 bzw. aufgereinigt mittels Nano-Phothermolyse.	60
Abb. 3.19 Überlebenskurven von Mäusen transplantiert mit Knochenmark mit B-Zellen Lymphom Tumorzellen LB27.4 bzw. aufgereinigt mittels Nano-Photothermolyse.....	62
Abb. 4.1 Prinzip der Nano-Photothermolyse.....	65
Abb.4.2 Versuchverlaufsschema des zwei-stufigen Protokolls der LANTCET Methode (aus Lapotko <i>et al.</i> 2006a).....	70

Tabellenverzeichnis:

	Seite
Tabelle 2.1 Eingesetzte Antikörper	12
Tabelle 2.2 Eigenschaften der eingesetzten Fluorochrome	13
Tabelle 2.3 Eigenschaften der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe	13
Tabelle 2.4 Eigenschaften von Immunogold Partikel nach Aurion	16

Verzeichnung der verwendeten Abkürzungen und Symbole:

A	
#	Anzahl
α	anti-, alpha
Abb.	Abbildung
Alexa	Alexa Fluor® Fluoreszenzfarbstoff
AM	Acetoxymethyl Ester
APC	Allophycocyanin
ATCC	(‘American Type Culture Collection’)
Au	Gold (‘Aurion’)
B	
β	beta
BCECF	Bis-Carboxyethyl-Carboxyfluorescein
BSA	Rinderserumalbumin (‘ <i>bovine serum albumine</i> ’)
bzw.	beziehungsweise
C	
C (°C)	Celsius (Grad Celsius)
CALI	Chromophor-assistierte Laserinaktivierung
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen (‘ <i>cluster of differentiation</i> ’)
CFDaSE	Succinimidyloxycarbonyl-Diacetylfluorescein-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester
cw	Dauerstrich (‘ <i>continuous wave</i> ’)
D	
D	Dalton (1D = $1,6601 \times 10^{-27}$ kg)
d. h.	das heißt
DMEM	‘ <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> ’
DNA	Desoxyribonukleinsäure (‘ <i>desoxyribonucleic acid</i> ’)
E	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere (‘ <i>et alteres</i> ’)
F	
f	Femto- (10^{-15})
FACS	Durchflusszytometrie (‘ <i>fluorescence activated cell sorting</i> ’)
FCS	Fötale Kälberserum (‘ <i>foatale calf serum</i> ’)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	
g	Gramm, Erdbeschleunigung ($9,81\text{m/s}^2$)
ggf.	gegebenenfalls

H	
h	Stunde (<i>'hora'</i>)
HET	Haus für experimentelle Therapie
I	
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin -2
IMMEI	Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
J	
J	Joule
K	
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
KM	Knochenmark
L	
l	Liter
LANTCET	(„ <i>laser-activated nano-thermolysis as cell elimination technology</i> “)
Laser	(<i>'Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation'</i>)
M	
μ	Mikro- (10^{-6})
m	Meter, Milli- (10^{-3})
M	Molar
MHC	Haupthistinkompatibilitätskomplex (<i>'major histocompatibility complex'</i>)
min	Minute
MW	Molekulargewicht (<i>'molecular weight'</i>)
N	
n	Nano- (10^{-9})
nAu	Nanogoldpartikel
nd	Neodym
NIR	nahe Infrarotes Licht (<i>'near infra red'</i>)
ns	nicht signifikant
O	
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin, Hühnereiweiß

P	
p	Piko- (10^{-12})
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>'phosphate buffered saline'</i>)
PDT	Photodynamische Therapie
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration (<i>'potentia hydrogenii'</i>)
Q	
Q-switch	Güteschalter zur Erzeugung von kurzen Laserpulsen
R	
RAG	(<i>'Recombination - Activating Gene'</i>)
RPMI	Rosswell Park Memorial Insitute
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde
S8L	s. SIINFEKL
s.o.	siehe oben
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>'standard error of the mean'</i>)
SIINFEKL	OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid
T	
TBI	Ganzkörperbestrahlung (<i>'total body irradiation'</i>)
TEM ₀₀	homogene gaußsche Intensitätsverteilung des Laserstrahles
TZR	T – Zellrezeptor
tet	Tetramer
U	
U	internationale Enzymeinheit (<i>'unit'</i>)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
V	
v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
W	
W	Watt
Y	
YAG	Yttrium Aluminium Granat
Z	
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Der Einsatz von Lasern in der Biomedizin

Der Begriff Laser, aus dem Englischen „Light amplification by stimulated emission of radiation“ wurde 1957 von Gordon Gould geprägt und bedeutet „Lichtverstärkung durch stimulierte Emission“. Schon 1917 beschrieb Albert Einstein im Rahmen seiner Quantentheorie die Idee der „stimulierten Emission“ als Umkehrung der Absorption. Dabei stimuliert ein einzelnes Photon ein bereits angeregtes Atom und überträgt ihm seine Eigenschaften, wie Frequenz, Phase, Polarisation und Ausbreitungsrichtung, sodass weitere identische Photonen emittiert werden. Das daraus resultierende kohärente Licht bildet die Grundlage für die Lasertechnologie.

Im Jahre 1960 konnte der erste Laser, ein Rubin-Festkörperlaser von Theodore Maiman realisiert werden. Generell wird zwischen kontinuierlichem Laserlicht aus Dauerstrich-Lasern (englisch: continuous-wave, cw-laser) und pulsierender Laserstrahlung aus gepulsten Lasern unterschieden. Die neusten gepulsten Laser ermöglichen Laserpulse im Piko- und Attosekundenbereich mit Repetitionszeiten bis in den kHz Bereich. Die gängigsten Laser gehören zu den Gaslasern, Farbstofflasern oder wie in dieser Arbeit verwendeten Festkörperlasern. Je nach Art und Konfiguration des Lasers kann ultraviolettes Licht (UV) mit Wellenlängen von 1 nm bis 380 nm, sichtbares Licht 380 nm bis 780 nm, Nahes Infrarotes Licht (NIR) 780 nm bis 1400 nm, bis zum fernen infraroten Licht 1400 nm bis 1 mm emittiert werden (Silvast, 1991).

In heutiger Zeit werden Laser in vielen Bereichen des Lebens, wie beispielsweise in der Materialbearbeitung, Messtechnik und Datentechnik eingesetzt. Zudem ist der Einsatz von Lasern in den Naturwissenschaften für Fluoreszenzanregung, Spektroskopie, Zwei-Photonen-Mikroskopie usw. nicht mehr wegzudenken. Aber auch in der Medizin findet der Laser in der Diagnostik, Therapie und Chirurgie vielfältigen Einsatz.

In dieser Arbeit soll nun auf die Verwendung des Lasers zum Eingreifen in biologische Prozesse und für die Manipulation von Zellen besonders eingegangen werden.

Erste Versuche zur Inaktivierung von Zellorganellen bzw. Zellen mit Hilfe von Licht wurden schon vor der Erfindung des Lasers beschrieben (Tschachotin, 1912). Bei dieser so genannten Strahlenstrichmethode wurde UV-Licht aus einer konventionellen Lampe mit Hilfe eines Mikroskopobjektives auf wenige Mikrometer fokussiert eingesetzt. Durch das Fokussieren des Lichtes wird die Lichtenergie auf einen begrenzten Punkt räumlich gebündelt, wodurch es zu thermischen Effekten von Proteindenaturierung bis zur Bildung von Mikrometer großen Gasblasen durch das Erhitzen des Mediums kommt (Vogel & Venugopalan, 2003).

In der Folge wurde die Mikrochirurgie mit fokussiertem Licht zur Untersuchung der Funktion bestimmter Organellen und Zellareale durch gezielte Inaktivierung oder Zerstörung verwendet (Bessis & Normarski, 1960). Mit der Entwicklung der Lasertechnologie konnten die Einsatzmöglichkeiten der kontaktlosen subzellulären Mikrochirurgie erweitert werden, da sich das Laserlicht, wegen seiner kohärenten Eigenschaften, viel einfacher und präziser fokussieren lässt (Bessis et al., 1962) und somit ohne Beeinflussung der transparenten Zellmembran oder -wand auf intrazelluläre Zielstrukturen kontrolliert gerichtet werden kann (Amy & Storb, 1965; Weber & Greulich, 1992; Greulich & Pilarczyk, 1998). Die Mikrochirurgie mit fokussierten Lasern wurde in Folge zum Fusionieren von Zellen (Sato et al., 1992; Schütze & Clement-Sengewald, 1994), für das Schneiden von DNA (König et al., 2001) oder auch zur Gentransfektion durch gezielte temporäre Öffnung der Zellmembran eingesetzt (Tsukakoshi et al., 1984; Tirlapur & König, 2002).

Jedoch ist das Anwendungsspektrum der Laser-Mikrochirurgie auf Grund zweier Faktoren limitiert. Zum einen ist die Fokussierung von Laserlicht wegen der Beugungsbegrenzung von sichtbarem Licht auf eine Fokusgröße von ca. 500 nm begrenzt und zum anderen kann der Laser immer nur auf eine Zelle bzw. Zielstruktur fokussiert werden, welche zuvor mikroskopisch identifiziert und angesteuert werden muss (Ponelies et al., 1994; Schütze et al., 1997; Vogel et al., 2005). Dieses setzt voraus, dass die Zielstruktur bzw. Zielzelle ggf. zur Erkennung spezifisch angefärbt werden muss. Zudem ist ein gleichzeitiges manipulieren mehrerer Zellen mit dieser Methode nicht möglich und aus diesem Grunde für eine medizinische Anwendung an mehreren Millionen Zellen nicht geeignet.

Eine zweite Strategie, mit Hilfe von Laserlicht gezielt Zellen oder zelluläre Strukturen zu beeinflussen, beruht auf dem Einsatz von Absorbern, welche die eingebrachte Lichtenergie eines in diesem Falle unfokussierten Lasers um einige Größenordnungen stärker, als deren Umgebung absorbiert. Als Absorber können dabei zum einen Chromophore (Jay, 1988; Jori & Spikes, 1990) oder zum anderen stark absorbierende Partikel (Anderson & Parrish, 1983; Hüttmann & Birngruber, 1999; Pitsillides et al., 2003) dienen.

Die verwendeten Chromophore, zumeist Fluoreszenzfarbstoffe, sind photochemisch aktive Stoffe, welche exogen eingebracht werden. Bei Bestrahlung dieser Chromophore mit einer entsprechenden Wellenlänge wird die Lichtenergie absorbiert. Bei überschreiten einer bestimmten Energieschwelle zerfällt dabei der Farbstoff unter Bildung von hoch reaktiven und zytotoxischen freien Radikalen oder Singulett Sauerstoff (Foote, 1976; Weishaupt et al., 1976; Fuchs & Thiele, 1998). Diese Wirkungsweise wird u.a. bei der Methode „Chromophor-assistierte Laserinaktivierung“ (CALI) für die gezielte Inaktivierung von Proteinen oder der Elimination von Zellen genutzt (Jay, 1988; Liao et al., 1994; Chang et al., 1995; Jay & Sakurai, 1999; Buchstaller & Jay, 2000; Beck et al., 2002). Eine klinische Anwendung, welche auf dem Wirkmechanismus der laseraktivierten Chromophoren bzw. Photosensibilisatoren beruht, ist die Photodynamische Therapie (PDT) (Henderson & Dougherty, 1992; Dougherty et al., 1998; Dougherty, 2002). Dabei akkumulieren die verabreichten Photosensibilisatoren in den Zielstrukturen, wie Tumorzellen oder neovaskulärem Gewebe und wirken bei Bestrahlung toxisch auf die umliegenden Zellen (Jori & Spikes, 1990; Dougherty, 2002). Die PDT findet Einsatz in der Onkologie zur Behandlung von Tumoren (Hsi et al., 1999; Dolmans et al., 2003; Chen et al., 2005), in der Dermatologie zur Elimination verschiedener Hautkrebsformen (Anderson et al., 1989; Anderson, 2000; Gold, 2007) und in der Augenheilkunde zur Therapie von Gefäßneubildungen unter der Netzhaut (chorioidalen Neovaskularisationen) z.B. bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) (Schmidt et al., 1992; Schmidt-Erfurth & Hasan, 2000; Bressler et al., 2002; Tatar et al., 2007).

Bei den Laserenergie absorbierenden Partikeln kann es sich um endogene Partikel, wie Melanosomen z.B. in retinalen pigmentierten Endothelzellen (Roider et al.,

1993; Brinkmann et al., 2000) oder Hämoglobin z.B. bei Feuermalen (Neumann et al., 1992; Landthaler et al., 1995), aber auch um exogen zugeführte Partikel verschiedener Materialien und Formen handeln (Jori & Spikes, 1990; Hüttmann & Birngruber, 1999; Hirsch et al., 2003; Chen et al., 2005; Loo et al., 2005; Huff et al., 2007).

Da die Wirkungsweise, der in dieser Arbeit untersuchten Methode, der Nano-Photothermolyse auch auf dem Prinzip der Laserenergie Absorption durch exogen zugeführten Partikeln beruht, soll hierauf im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

1.2 Selektive Photothermolyse: Eine Methode zur Beeinflussung von Zellen vermittelt mit Lichtenergie absorbierenden Mikro- oder Nanopartikeln durch Aktivierung mit gepulster Laserbestrahlung

Der Begriff der „selektiven Photothermolyse“ wurde 1983 von Anderson und Parrish geprägt. Die Wirkungsweise beruht darauf, dass Partikel die Lichtenergie eines unfokussierten Lasers absorbieren und in Wärmeenergie umwandeln. Um eine Selektivität zu gewährleisten, müssen die Partikel für die eingebrachte Lichtenergie mit definierter Wellenlänge eine um Größenordnungen höhere Absorption als die Umgebung aufweisen (Jori & Spikes, 1988; Hüttmann & Birngruber, 1999).

Erste Untersuchungen unter Einsatz von Mikrometer großen Melanin- oder Eisenpartikeln unter Mikrosekunden Laserpulsen zeigten, dass mit dieser Methode Zellen eliminiert werden konnten (Lin & Kelly, 1998; Lin & Kelly, 1999; Pitsillides et al., 2003). Jedoch war eine hohe Selektivität nicht gegeben, da der Schadensbereich um die Partikel herum mehrere Mikrometer betrug (Hüttmann et al., 2001; Pitsillides et al., 2003).

Um den Kollateralschaden zu minimieren, folglich die Selektivität der Methode zu erhöhen, wurde der Einsatz von kleineren Partikeln im Nanometerbereich und die Verwendung kürzerer Laserpulslängen im Nano- oder Pikosekundenbereich diskutiert und eingesetzt (Hüttmann et al., 2001; Pitsillides et al., 2003). Hierdurch kann der Effekt der Photothermolyse auf wenige Nanometer um die eingesetzten Partikel herum begrenzt werden (Hüttmann et al., 2001; Pitsillides et al., 2003). Auf

die dafür verantwortlichen speziellen physikalischen Eigenschaften von Nanopartikeln soll im nächsten Kapitel gesondert eingegangen werden.

Durch die Nanopartikel vermittelte Photothermolyse unter Verwendung von Nano- oder Pikosekunden Laserpulsen können behandelte Zellen entweder zeitweise permeabilisiert (Yao et al., 2005) oder dauerhaft eliminiert werden, d.h. den sofortigen Zelltod, also Nekrose erleiden (Pitsillides et al., 2003; Zharov et al., 2005; Yao et al., 2005; Lapotko et al., 2006a & 2006b). Eine apoptotische Wirkung konnte nicht festgestellt werden (Pitsillides et al., 2003).

Die Partikel vermittelte Photothermolyse hat gegenüber der Verwendung von fokussierten Lasern den Vorteil, dass die Präzision der Wirkung maßgeblich durch die Größe der verwendeten Partikel bestimmt wird und somit bei Verwendung von Nanopartikeln und entsprechend kurzen Laserpulslängen die Wirkung auf wenige Nanometer um die eingesetzten Partikel begrenzt werden kann (Hüttmann & Birngruber, 1999; Pitsillides et al., 2003). Ein weiterer Vorteil der selektiven Photothermolyse ist, dass bei dem Einsatz von aufgeweiteten Laserstrahlen eine große Anzahl von Zellen gleichzeitig behandelt werden kann (Hüttmann & Birngruber, 1999).

Einige bis heute veröffentlichte Arbeiten über die Nanogoldpartikel vermittelte Photothermolyse, auch „selektive Nano-Photothermolyse“ genannt (Zharov et al., 2005), konnten zeigen, dass mit Nanogoldpartikeln in Größen von 10 nm bis 40 nm und Bestrahlung mit Nano- oder Pikosekunden Laserpulsen Zellen gezielt eliminiert werden konnten (Pitsillides et al., 2003; Zharov et al., 2005; Yao et al., 2005; Letfullin et al., 2006; Lapotko et al., 2006a & 2006b). Eine Grundvoraussetzung für eine selektive Elimination von Zellen ist dabei die selektive Anbindung der eingesetzten Partikel an die Zielzellen. Um dieses zu gewährleisten, wurde die Verwendung von Partikeln vorgeschlagen, welche mit Antikörpern konjugiert sind und darüber selektiv an die Zielzellen binden können (Hüttmann & Birngruber, 1999; Pitsillides et al., 2003; Loo et al., 2004 & 2005).

Um eine effektive Elimination zu gewährleisten, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Pitsillides et al. benötigten eine Bestrahlung mit 500 Laserpulsen (Pitsillides et al., 2003). Lapotko et al. verwendeten in ihrer vorgestellten LANTCET Methode (englisch: „laser-activated nano-thermolysis as cell elimination technology“) eine

zweistufige Strategie, wobei die Nanopartikel zuerst an die Zellen binden und in einem zweiten Schritt von den Zellen aufgenommen werden, wodurch es zu einer Clusterbildung kommt, was eine höhere Energieabsorption gewährleisten soll (Lapotko et al., 2006a & 2006b). Gemeinsam haben diese Arbeiten zur selektiven Photothermolyse von Zellen mit Nanogoldpartikeln, dass Formulierungen von Partikeln eingesetzt wurden, welche nicht direkt an die Antigene auf den Zellen binden konnten. Die Partikel waren mit einem sekundären Antikörper konjugiert, welcher einen primären Antikörper auf den Zellen erkannte und daran selektiv binden konnte.

Die selektive Nanopartikel Photothermolyse konnte bisher nur an einzelnen Zellen (Lapotko et al., 2006), an Zellen einzelner Zelllinien (Yao et al., 2005) oder wenigen tausend primären Zellen (Pitsillides et al., 2003) gezeigt werden.

Es wurde zwar diskutiert, ob diese Methode zum Aufreinigen von Stammzellpräparaten zur anschließenden Transplantation nach Chemotherapie von Blutkrebspatienten einzusetzen sei (Zharov et al., 2005; Lapotko et al., 2006). Jedoch sind die Erkenntnisse über die Effektivität und Selektivität dieser Methode bei der Behandlung von primären Zellen rar. Über eine Untersuchung der Vitalität der behandelten Zellen bis zu 24 Stunden nach der Laserbestrahlung gingen bisherige Untersuchungen nicht hinaus (Pitsillides et al., 2003). Über mögliche Langzeitnebeneffekte der selektiven Nano-Photothermolyse auf die behandelten Zellen, welche über die unmittelbare Vitalität hinausgeht, ist folglich bisher nichts bekannt.

Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit entsprechende Ziele formuliert (Kap. 1.4), um mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit den Einsatz einer Nanopartikel vermittelten Photothermolyse in der biomedizinischen Forschung und klinischen Therapie, wie z.B. der Aufreinigung von autologen hämatopoetischen Stammzellen durch selektive Elimination von verunreinigenden Tumorzellen für eine anschließende Transplantation abschätzen zu können.

1.3 Spezifische Eigenschaften von Nanogoldpartikeln unter der Bestrahlung durch Nanosekunden Laserpulsen mit 532nm Wellenlänge.

Gustav Mie berechnete 1908 die Absorptionseigenschaften von sphärischen kolloidalen Nanogoldpartikeln. Dabei handelt es sich um kugelförmige aus Goldatomen bestehende Partikel in Nanometergröße, welche sich in Lösung befinden.

Diese Partikel haben besondere optische Eigenschaften, da die Elektronen in den Nanogoldpartikeln zu kollektiven Schwingungen angeregt werden können, weshalb die Partikelausmaße deutlich kleiner als die anregende Wellenlänge sind. Wie alle kolloidalen Nanogoldpartikel, welche kleiner als 100 nm sind, weisen die in dieser Arbeit verwendeten 15 nm oder 25 nm Goldpartikel ein spezifisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von ca. 530 nm auf (Radt, 2002; Pitsillides et al., 2003). Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit zur Anregung der Nanogoldpartikel ein Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm eingesetzt.

Auf Grund der Bestrahlung von Nanogoldpartikeln mit Nanosekunden Laserpulsen kommt es zu einer kurzzeitigen Erhitzung der Partikel um bis zu 1000 Kelvin (Hüttman & Birngruber, 1999; Radt, 2002; Plech et al., 2005; Yao et al., 2005). Durch den kurzzeitigen Energieeintrag in die Nanopartikel kann die Wärmeabgabe an die Umgebung minimiert werden, was als „thermal confinement“ bezeichnet wird (Anderson & Parrish, 1983). Die Abgabe der Wärmeenergie bleibt dabei auf wenige Nanometer um die Partikel herum begrenzt und vollzieht sich innerhalb nur weniger Nanosekunden (Hüttmann et al., 2001; Plech et al., 2005). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass auf Grund der sehr schnell ablaufenden thermischen Prozesse nicht zu einer vollständigen Verdampfung des Mediums bzw. Gasblasenbildung um die Partikel herum kommt, sondern so genannte Kavitationsblasen entstehen (Lin & Kelly, 1998; Lin et al., 1999; Vogel & Venugopalan, 2003; Pitsillides et al., 2003; Lapotko et al., 2006). Diese Kavitationsblasen ermöglichen einen räumlich eng begrenzten Schaden, da dieser mechanisch durch sehr hohe Druckunterschiede und nicht thermisch vermittelt wird (Lin et al., 1999; Radt, 2002; Vogel & Venugopalan 2003; Pitsillides et al., 2003). Käme es zu einer vollständigen Verdampfung des Mediums um die bestrahlten Nanopartikel, würden sich Gasblasen ausbilden. Eine Gasblasenbildung würde den Schädigungsbereich auf mehrere Mikrometer um den

Partikel herum ausweiten und somit zu einem ausgeprägten Kollateralschaden, in diesem Fall zu einer unspezifischen Elimination der umliegenden Zellen führen (Radt, 2002; Pitsillides et al., 2003).

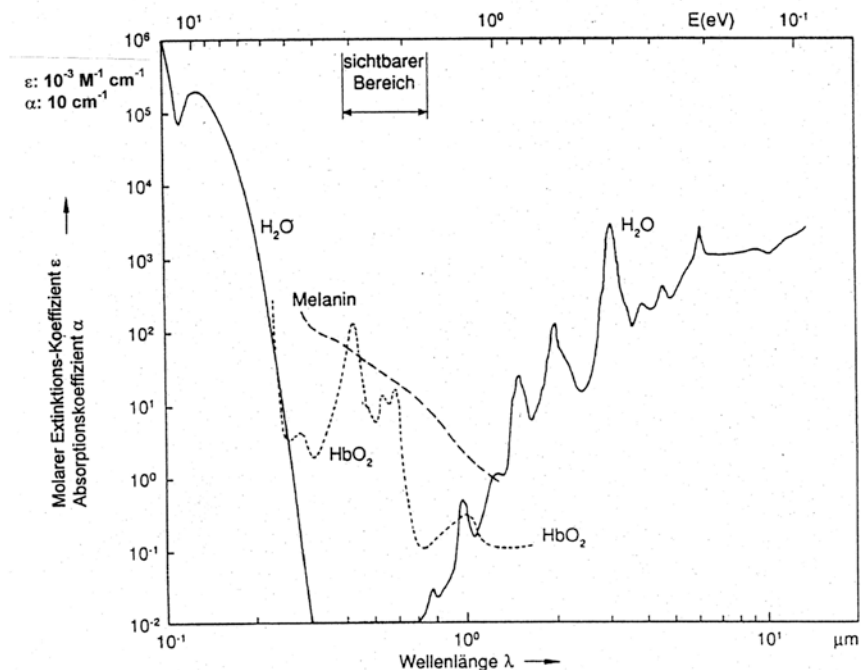


Abb. 1 Absorptionsspektren von Wasser (H_2O), Melanin und Hämoglobin (HbO_2) nach Boulnois (1986). Dargestellt als Extinktions- bzw. Absorptionskoeffizienten in Abhängigkeit zur Wellenlänge.

Eine direkte Erwärmung von nicht pigmentierten Zellen durch Nano- oder Pikosekunden Laserpulsen erfolgt nicht, da die Dauer der eingebrachten Laserenergie zu kurz ist, um von ihnen absorbiert zu werden. Zudem weisen Wasser, so wie auch unpigmentierte Zellen, wie in Abbildung 1 gezeigt, bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm eine nur sehr geringe Absorption auf (Boulnois et al., 1986; Weissleder & Ntziachristos, 2003; Vogel & Venugopalan 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Vor Beginn dieser Arbeit wiesen erste Publikationen darauf hin, dass eine gezielte Zellelimination durch Ankopplung von Nanogoldpartikeln an Zellen und anschließende Bestrahlung mit kurzen Laserpulsen mittels Nano-Photothermolyse Zellen effizient und selektiv sein könnte (Radt, 2002; Pitsillides et al., 2003). Aussagekräftige Untersuchungen über die Effizienz und Selektivität bei der Aufreinigung von primären Zellen und über mögliche Nebenwirkungen auf die aufgereinigten Zellen waren und sind bis heute nicht bekannt. Dadurch ist eine Einschätzung schwierig, ob eine Methode, welche auf dem Prinzip der Nano-Photothermolyse beruht, zum Aufreinigen von Zellen für klinische Anwendungen bzw. Therapien einsetzbar sein könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Bestrahlungsplattform für die Nano-Photothermolyse zu verwirklichen. Nach ersten Bestrahlungsversuchen an Zelllinien, sollten geeignete Parameter für eine effektive und selektive Elimination von Zellen gefunden werden. Diese Parameter sollten an primären Zellen verifiziert und im Weiteren untersucht werden, um mögliche Nebenwirkungen der Aufreinigung auf primäre Zellen abschätzen zu können. Abschließend sollte im murinen Modell die Aufreinigung von Stammzellen mittels Nano-Photothermolyse vor einer Transplantation in myeloablativ behandelten Mäusen durchgeführt und untersucht werden.

Anhand dieser Daten sollte es möglich sein, zu einer Einschätzung, über einen möglichen Einsatz der Nano-Photothermolyse in einer medizinischen Therapie zu kommen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaagen	‘U4100 – OD2.2’ und ‘MC BA 100’ (Sartorius, Göttingen)
Bestrahlungsgerät, Gamma	Biobeam 2000 (MCP STS-GmbH, Braunschweig)
Brutschränke	Hera Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Durchflusszytometer	LSRII (Becton Dickinson, Heidelberg)
Energiekopf-Detektor	UP19K (genetec, Quebec, Kanada)
Energiemonitor	SOLO P/E (genetec, Quebec, Kanada)
Kamera	F-View (Olympus SIS, Hamburg)
Kreuztisch, motorisiert	ScanIM 112x74 IX (Maerzhaeuser, Wetzlar)
Laser	Diva II von Thales, Nd:YAG 532nm (Soliton Laser und Messtechnik GmbH, Gilching)
Mikroskope	CKX-31, IX-71 und IX-81(Olympus, Planegg)
Küvette, Quarzglas	10 mm Suprasil (Hellma, Müllheim)
pH – Meter	pH 523 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim)
Quarzglasplatte	96 well (Hellma, Müllheim)
Reinstwasseranlage	Nanopure Dimond (Barnstead, Dubuque, USA)
Spektralphotometer	Ultrospec 3000 UV (Amersham Pharmacia, Freiburg)
Werkbank, steril	Hera safe (Heraeus Instruments, Hanau)
Zählkammer	Neubauer ‘improved’ (Brand, Wertheim)
Zellsortierer	FACS Diva (BD Bioscience, Heidelberg)
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R (Heraeus Instruments, Hanau) Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hanau)
Zytozentrifuge	Cytospin 4 (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA)

Alle weiteren Labormaterialien wurden über die Firmen neoLab (Heidelberg), VWR (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21x 26 mm (Menzel, Heidelberg)
Filterkarten	für Zytozentrifuge (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA)

Gewebekulturschalen	94/16 mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Objektträger	Superfrost (Menzel-Gläser, über neoLab, Heidelberg)
pH – Indikatorstäbchen	pH 7-14,0 (Merck, Darmstadt)
Siebe, Nylon-	Cell Strainer 40 µm (Becton Dickonson, Heidelberg)
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ² (Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturplatten	6-, 24, 48, 96- Loch (Nunc, Wiesbaden)

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien wurden über die Firmen Roth (Karlsruhe), neoLab (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Reaktionskits

Avertin (222 Tribromethanol 97 %)	Sigma, Deisenhofen
BCECF;-AM (MW=556,5; 820,7)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Bovines Serum Albumin, Rinderserum (BSA)	Serva, Heidelberg
CFSE / CFDaSE (MW = 557,47 bzw. 460,4)	Molecular Probes, Leiden, Niederlanden
Cytometric Bead Array Flex Set	BD Bioscience
Dimethylsulfoxid (DMSO) (MW = 78,13)	Merck, Darmstadt
DMEM – Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
Ethanol, absolut (MW = 46,07)	Riedel-de Haën, Seelze
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (MW = 372,2)	Gerbu, Gaiberg
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Glutamin, L- (200 mM) (MW = 146,1)	Gibco BRL, Karlsruhe
GoldSol 15 nm und 25 nm	Aurion, Wageningen Niederlande
Goldenhance™	Nanoprobes, Yaphank USA
Heparin	Merck, Damrstadt
Hoechst 33258 Bisbenzimid (MW= 533,88)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol (MW = 60,1)	Merck, Damrstadt
Kaliumcarbonat K ₂ CO ₃ (MW = 138,20)	Merck, Darmstadt
Lymphozytenpräparationsmedium 1077	PAA, Cölbe
Mercaptoethanol, β- (MW = 78,13)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid (MW = 65,01)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid NaCl (MW = 58,44)	Merck, Darmstadt

Ovalbumin, Grad VII	Sigma, Deisenhofen
OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid SIINFEKEL, 80 % HPLC rein	Pineda, Berlin
Paraformaldehyd PFA	Riedel de Haen
PBS ('Phosphate buffered saline'): ohne Ca ₂₊ und Mg ₂₊	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000 U/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Pharm Lyse™, BD- (FACS- Erythrozytenlyse)	BD Bioscience
RPMI 1640 – Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
SIINFEKL, siehe OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid	
Streptomycin (10.000 µg/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau, 0,4% (MW = 960,8)	Biochrom, Berlin
Trypsin/ EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe

2.1.4 Verwendete Antikörper, Fluorochromkonjugate und Farbstoffe

Die eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2.1 angegeben.

Tabelle 2.1 Eingesetzte Antikörper

Antigen	Isotyp	Klon	Bemerkung	Quelle
B220	IgG2a, Ratte	RA3-6B2	= CD45R	BD
CD3 ε	IgG2b, Ratte	145-2C11		BD
CD4	IgG2b, Ratte	GK1.5		BD
CD8a	IgG2a, Ratte	53-6.7		BD
CD11c	IgG1, Hamster	HL3		BD
CD16	IgG2b, Ratte	2.4G2		BD
CD19	IgG2a, Ratte	ID3		BD
CD45.1	IgG2a, Maus	A20	= Ly5.2	BD
CD45.2	IgG2a, Maus	104	= Ly5.1	BD
Goat α rat	IgG (H+L)		Sekundärantikörper	MP
Ki-67	IgG1, Maus	MIB-1	Intrazelluläres Antigen	DAKO
NK1.1	IgG2a, Ratte	PK136		BD
S8L-Tet			H2K ^b -SIINFEKL Tetramere	ProImmune
Vα2 TZR	IgG2a, Ratte	B20.1		BD
Vβ5 TZR	IgG1, Maus	MR9-4		BD

Die in Tabelle 2.1 angegebenen Antikörper wurden unkonjugiert zur Konjugation von Nanogoldpartikeln zur Herstellung von Immunogold verwendet oder mit unterschiedlichen Fluorochromen (Tab. 2.2) konjugiert eingesetzt.

Tabelle 2.2 Eigenschaften der eingesetzten Fluorochrome

Fluorochrome	Extinktion max.	Emission max	Anregung	Filtersatz
Alexa Fluor® 488	495 nm	519 nm	488 nm	530 / 30 nm
Alexa Fluor® 647	650 nm	668 nm	633 nm	660 / 20 nm
Alexa Fluor® 700	702 nm	723 nm	633 nm	712 / 10 nm
APC	650 nm	660 nm	633 nm	660 / 20 nm
FITC	494 nm	518 nm	488 nm	530 / 30 nm
PE	480 nm	578 nm	488 nm	585 / 42 nm
PerCP-Cy5.5	488 nm	695 nm	488 nm	695 / 40 nm
PE-Cy7	480 nm	780 nm	488 nm	780 / 60 nm

Die zur Zellfärbung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3 Eigenschaften der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Extinktion max.	Emission max	Anregung	Filtersatz
BCECF	503 nm	528 nm	488 nm	530 / 30 nm
CFSE	494 nm	515 nm	488 nm	530 / 30 nm
Hoechst33258	345 nm	483 nm	405 nm	440 / 40 nm

2.1.5 Verwendete Zelllinien

LB27.4 B-Zellhybridom; exprimiert H2K^{b+d} auf der Zelloberfläche (Kappler et al., 1982)

3T3 Fibroblasten Zelllinie

BO17.10 CD4+ T-Zelllinie; exprimiert H2K^b auf der Zelloberfläche

2.1.6 Verwendete Mäusestämme

Wildtyp

C57BL/6N	Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotypen H2k ^b (Charles River, Sulzbach; Versuchstierhaltung IMMEI)
B6D2F1	Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotypen H2k ^{b+d} (Charles River, Sulzbach; Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn)
CD45.1	Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotypen H2k ^{b+d} (Charles River, Sulzbach; Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn)

Transgene Linien

OT I- Rag ^{-/-} x C57BL/6N	CD8+ T- Zelltransgene Mauslinie gekreuzt mit C57BL/6N. Die CD8+ T-Zellen exprimieren den v β 2/ v α 5- TZR und erkennen das OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid SIINFEKEL präsentiert auf H2K ^b (Versuchstierhaltung IMMEI und HET, Bonn)
-------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.1.7 Verwendete rekombinante Viren

Die verwendeten Adenoviren wurden freundlicherweise von A. Limmer, IMMEI Uniklinikum Bonn, zur Verfügung gestellt.

AdOVA	rekombinanter Adenovirus Typ 5, der das Antigen Ovalbumin (OVA) unter dem CMV Promotor exprimiert
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------

2.1.8 Verwendete Software

Cell-R, Version 2 .6	Olympus SIS, Planegg
FCAP Array™, Version 1.0	BD Bioscience, Heidelberg
FlowJo, Version 8.4.2	Tree star, Otten Schweiz
Photoshop, Version 7.0.1	Adobe Systems, München
Prism, Version 4.0c	GraphPad Software, La Jolla USA
WinPos, Version 1.100	ITK, Lahnau

2.2 Methoden

2.2.1 Konjugation von Nanogoldpartikeln mit Antikörpern

Zur Herstellung von Immunogold Partikeln wurden die Ratte-anti-Maus IgG Antikörper B220 (CD45R), CD4 und CD8 an kolloidale Goldpartikel mit den Größen 15 nm und 25 nm konjugiert. Da die verwendeten Nanogoldpartikel in Lösung geladen sind, können Proteine, so auch Antikörper mit ihren geladenen Gruppen direkt an die Partikel binden. Dieses sollte in einem Puffer mit einem pH Wert nahe bzw. leicht über dem isoelektrischen Punkt des Proteins geschehen, um die Konformation und damit die Funktionsfähigkeit des Proteins bei der Bindung nicht zu verändern und das Protein zu denaturieren (Roth, 1996).

Für jede Konjugation wurde die optimale Proteinkonzentration bestimmt, damit eine ausreichende Beladung von Antikörpern auf der Partikeloberfläche gewährleistet wurde, welche eine feste Bindung eingehen konnten. Bei der Verwendung von zu viel Antikörper je Partikel verringern sich die Bindungskräfte und das Immunogold wird instabil.

Die erfolgreiche Bindung von Proteinen an die Goldpartikel konnte optisch kontrolliert werden, indem die Elektrolytkonzentration durch Zugabe von z.B. NaCl erhöht wurde, woraufhin unkonjugierte Goldpartikel Aggregate bilden, deren Absorption sich ins rote verschiebt, es also zu einem Farbumschlag der Nanogoldlösung von rot zu blau kommt.

Eine Trennung konjugierter Partikeln von unkonjugierten Partikeln und dem Überstand wurde durch Zentrifugation in einem Rundboden-Zentrifugationsgefäß erreicht. Unbeladene Goldpartikel aggregieren dabei am Rand des Gefäßes, wohingegen die erfolgreich konjugierten Partikel als weiches, rotes Pellet am Boden des Gefäßes zu finden sind.

Die Bestimmung der erhaltenden Partikelkonzentration ermöglichten die Angaben in der Tabelle 2.1 aus dem Datenblatt der GoldSol Lösungen von Aurion. Darin sind u.a. die Konzentrationen von 15 und 25 nm Goldpartikellösungen mit der Optischen Dichte (OD) von 1 bei der Wellenlänge der maximalen Absorption von 520 nm angegeben.

Tabelle 2.4 Eigenschaften von Immunogold Partikeln nach Aurion.

Partikel Durchmesser	# Au Atome / Partikel	MWt. (daltons)	# Partikel /ml (OD _{520nm} = 1)	# Antikörper / Partikel
15 nm	100 x 10 ³	20 x 10 ⁶	1,5 x 10¹²	25 - 40
25 nm	470 x 10 ³	92 x 10 ⁶	3,3 x 10¹¹	115 - 180

(# = Anzahl)

Material: Aurion GoldSol 15 nm oder Aurion GoldSol 25 nm, unkonjugierte IgG Antikörper, pH Messstäbchen (pH 7,0 – 14,0), 96-well-Mikrotiterplatte mit Rundboden, 50 ml Reaktionsgefäß, 2 ml Rundboden Reaktionsgefäße, Tischzentrifuge „Biofuge fresco“, UV-Küvette, Photometer

Lösungen: K₂CO₃-Lösung (0,5M), 10 % NaCl-Lösung, 10 % BSA/ PBS

Methoden:

Einstellen des optimalen pH-Wertes der Goldlösung: Der isoelektrische Punkt der eingesetzten Maus-anti-Ratte IgG Antikörper liegt zwischen 8 und 8,5. Folglich wurde der pH-Wert, der auf Raumtemperatur gebrachten Goldlösung, durch die Zugabe von K₂CO₃-Lösung (ca. 150 µl auf 11 ml GoldSol) von 7,0 - 7,6 auf 8,5 - 9,0 eingestellt. Der pH-Wert wurde mittels pH-Stäbchen überprüft. Die Verwendung von pH-Metern mit einer Messelektrode ist nicht empfehlenswert, da die geladenen Goldpartikel in der Lösung mit der Elektrode reagieren.

Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration: In einer 96-well-Mikrotiterplatte wurde eine Verdünnungsreihe mit einer absteigenden Antikörperkonzentration mit 5 µg bis 0,078 µg in 50 µl GoldSol Lösung bei Raumtemperatur hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min wurden je Probe 20 µl einer 10 % NaCl-Lösung zugegeben. Die Verdünnung mit der geringsten Proteinkonzentration ohne erkennbaren Farbumschlag wurde als optimale Proteinkonzentration für die Nanogoldpartikel Konjugation gewählt. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Antikörpern war eine Proteinkonzentration von 6 bis 25 µg/ml, in der Regel jedoch 12,5 µg/ml GoldSol optimal.

Konjugation: Zur pH-Wert eingestellten GoldSol Lösung wurde die vorher bestimmte Menge Antikörper gegeben und für 5 min bei mehrmaligem durchmischen durch leichtes Schütteln inkubiert. Durch Zugabe einer 10 %

BSA/PBS-Lösung bis zum Erreichen einer 1 % BSA/GoldSol-Lösung wurde die Konjugation gestoppt und damit auch mögliche freie Bindungsstellen an den Partikeln abgesättigt.

Je ein Milliliter dieser Lösung wurde in 2 ml Reaktionsgefäße mit Rundboden gegeben und für 45 min bei 15 nm Partikeln bzw. für 30 min bei 25 nm Partikeln bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die entstandenen weichen Pellets vom Boden der Reaktionsgefäße wurden gesammelt und vereinigt.

Bestimmung der Partikelkonzentration: Die optische Dichte der erhaltenen Immunogoldlösung wurde bei der Wellenlänge von 520 nm am Photometer bestimmt. Hieraus lässt sich die Partikelkonzentration des hergestellten Immunogoldes mit Hilfe der angegebenen optischen Eigenschaften, welche in Tabelle 2.1 angegeben sind, berechnen.

für 15 nm Partikel: Konzentration = $OD_{520} \times 1,5 \times 10^{12}$ Partikel /ml

für 25 nm Partikel: Konzentration = $OD_{520} \times 3,3 \times 10^{11}$ Partikel /ml

2.2.2 Bestrahlungssystem für die Nano-Photothermolyse

Die hier untersuchte Methode der Nano-Photothermolyse wurde zuerst im Laserzentrum Lübeck durch Benno Radt in seiner 2002 eingereichten Dissertation beschrieben. Nach seinen Angaben und mit Hilfe von Dr. Gereon Hüttmann (BMO, Lübeck) wurde am IMMEI der verwendete Bestrahlungsaufbau verwirklicht.

Material: 96 well Quarzglasplatte, Diva II Nd:YAG Laser, Mikroskop IX-81 mit motorisiertem Kreuztisch, Energiemesskopf mit Detektor, Umlenkspiegel, Optische Bank

Lösungen: Immunogold, PBS

Aufbau: Die Bestrahlung der Zellen für LANCE wurde mit einem Diva II Laser durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Dioden gepumpten Nd:YAG-Laser, welcher durch Frequenzverdoppelung eine Wellenlänge von 532 nm besitzt. Die maximal gelieferte Pulsenergie beträgt 6,25 mJ/Puls bei einer zeitlichen Länge der einzelnen Pulse von 11 ns und einer Wiederholungsrate von 20 Hz. Die Pulsform ist

maximaler Energiedichte überlagern, um einen gleichmäßigen Energieeintrag auf die Zellen zu gewährleisten.

Methode: Je Ansatz wurden 1×10^6 Zellen in 50 μl in ein well der 96 well Quarzglasplatte zu 50 μl Immunogold Lösung, wenn nichts anderes angegeben mit 2×10^4 Partikel je Zielzelle, hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Sollten die zu behandelten Zellen anschließend kultiviert werden, wurde die 96 well Quarzplatte mit einer Glasplatte abgedeckt.

Der Laserstrahl wurde mit Hilfe der Umlenkspiegel so justiert, dass dieser auf der optischen Achse des Mikroskops verlief. Nun konnte die Platte mit den Proben auf dem Kreuztisch platziert und die Bestrahlung der Zellen durchgeführt werden.

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen aus der Platte mit 100 μl PBS gespült und konnten weiterverarbeitet werden.

2.2.3 Herstellung von Zytozentrifugen Präparaten

Mit Hilfe der Zytozentrifuge lassen sich Zellen aus Suspensionen gleichmäßig als Zellmonolayer bei Erhalt der Zellintegrität auf einen Objektträger bringen. Diese werden dann auf dem Objektträger fixiert und können anschließend auf die gewünschte Weise behandelt, wie z.B. gefärbt, werden. Anschließend ermöglicht diese Methode die Analyse, der ehemals in Suspension vorliegenden Zellen mit lichtmikroskopischen oder fluoreszenzmikroskopischen Methoden.

Material: beschichtete Objektträger (Superfrost), Zytozentrifugenträger, Probenkammern und Filterkarten, Cytospin® 4 Zytozentrifuge (Thermo Shandon)

Lösungen: 10 % BSA/ PBS, 4 % PFA, PBS

Methode: Die Zytozentrifugenträger, Objektträger, Filterkarten und Probenkammern wurden zusammengebaut und in die Zytozentrifuge eingehängt. Je 5×10^4 Zellen wurden in 150 μl 10 % BSA/ PBS resuspendiert, in die Probenkammern eingebracht und bei 800 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger liegend mit einem Tropfen 4 % PFA für 10 min fixiert, in Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.4 Goldenhance™ Entwicklung von Nanogoldpartikeln auf Zellen

Um die verwendeten Nanogoldpartikel im Lichtmikroskop nachweisen zu können, mussten diese zuvor mit Goldenhance™ entwickelt werden, da sie mit Größen von 15 nm bzw. 25 nm unterhalb der mikroskopischen Auflösungsgrenze liegen. Das zugrunde liegende Prinzip der Autometallografie ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

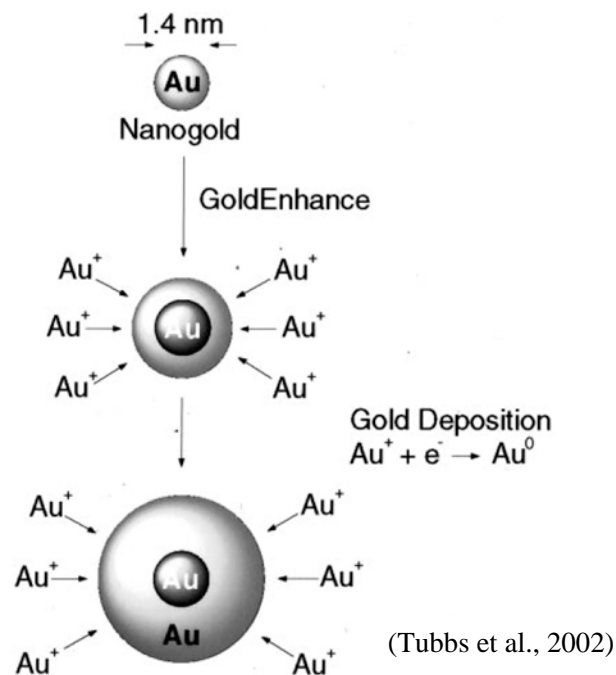


Abb. 2.2 Mechanismus der metallischen Gold Deposition durch Autometallografie unter der Verwendung von Goldenhance™. Gold Ionen in Lösung werden katalytisch an die Nanogoldpartikel als metallisches Gold (Au^0) gebracht. Die Partikelgröße nimmt mit der Entwicklungszeit zu. Kürzere Zeiten werden für die Elektronenmikroskopie, längere Zeiten für die Lichtmikroskopie und Blots verwendet (aus Tubbs et al., 2002).

Lösungen: PBS, GOLDENHANCE™ Lösungen, Reinstwasser,

PBS-Gelatine Puffer (NaCl [0,5 M]; Gelatine [0,1 %]; Tween 20 [0,05 %])

Methode: Die zu entwickelnden Zytozentrifugen-Präparate auf Objektträgern wurden zweimal mit PBS und einmal mit PBS-Gelatine Puffer für 5 min und abschließend zweimal mit Reinstwasser für 10 min gewaschen. Die vier GoldEnhance™ Lösungen A (Entwickler), B (Aktivator), C (Initiator) und D (Puffer) wurden zu gleichen Volumenanteilen gemischt. Zuerst wurden Lösungen A und B zusammengegeben, gut gemischt und für 5 min stehen gelassen. Anschließend wurden Lösungen C und D zugefügt. Pro Objektträger wurden 40 μl von der

zubereiteten GoldEnhance™-Lösung auf die Probe gegeben und für 15 min inkubieren lassen. Die Entwicklung wurde durch Spülen mit ausreichend Reinstwasser gestoppt.

2.2.5 Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Material: IX-71 inverses Mikroskop (Olympus), analySIS Software, Adobe Photoshop

Methode: Durchlichtaufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen wurden am inversen Mikroskop IX-71 durch die Verwendung einer s/w Kamera und der cell-R Software aufgenommen. Die farbliche Zuordnung der Fluoreszenzkanäle und die Überlagerung der Aufnahmen wurde mit der Software Photoshop durchgeführt. Der Maßstab der Aufnahmen ist als Messbalken in den ausgegebenen Bildern eingezeichnet.

2.2.6 Isolierung primärer Lymphozyten aus der Milz

Material: Sezierbesteck, 40 µm Zellsieb, 10 ml Einmalspritzen, 120 mm Einmalkanülen, 50 ml und 15 ml Reaktionsgefäße, Tischzentrifuge „Multifuge“

Lösungen: PBS, Lymphozyten Separationsmedium

Methode: Die Milz wurde nach Öffnung des Bauchraumes, von Fettgewebe und Blutgefäßen befreit, entnommen und in ein mit PBS gefülltes Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Milz unter Verwendung eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb gestrichen und mit 10 ml PBS gespült. Von der Zellsuspension wurden je 5 ml in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 ml Lymphozyten Separationsmedium unterschichtet. Bei Raumtemperatur und abgeschalteter Rotorbremse erfolgte die Zentrifugation bei 950 g für 15 min. Anschließend wurde der klare Überstand abgesaugt und die Zellen in der weißen Zwischenphase in einem 50 ml Gefäß gesammelt, auf 50 ml mit PBS aufgefüllt, ein definiertes Volumen für die Zellzahlbestimmung abgenommen und nochmals bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, so dass die Milzlymphozyten im Pellet vorlagen.

2.2.7 Isolierung primärer Zellen aus dem Knochenmark

Material: Sezierbesteck, Petrischale, 40 µm Zellsieb, 10 ml Einmalspritzen, Einmalkanülen, 50 ml Reaktionsgefäße, Tischzentrifuge „Multifuge“

Lösungen: PBS

Methode: Die Hinterbeine wurden von Sehnen und Muskeln befreit aus der geöffneten Maus heraus präpariert und in eine Petrischale mit PBS überführt. Die Knochen wurden unter- und oberhalb der Gelenke durchtrennt. Mit einer Kanüle wurde das Knochenmark mit PBS aus den Knochen herausgespült und anschließend bis zum Erreichen einer Einzelzellsuspension resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb filtriert und die Zellzahl bestimmt.

2.2.8 Kultivierung primärer Zellen *in vitro*

Material: Zellkulturplatten (24 oder 96-well)

Lösungen: Milz- und Knochenmarkzellen Medium: RPMI 1640, 10 % (v/v) FCS, 10⁵U Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol

Methode: Zur Ermittlung der Klonierungseffizienz wurden die angegebenen Zellen auf 1 × 10⁵ Knochenmarkzellen in 200 µl Medium in 96 well Zellkulturplatten ausgesät. Das Wachstum der Tumorzellen wurde über den Farbumschlag des Mediums in einem Zeitraum von 14 Tagen ermittelt.

Zur Stimulation von Milzzellen wurden 5 × 10⁵ Milzzellen in einem Milliliter Medium mit oder ohne 1mg/ml Ovalbumin in 48 well Zellkulturplatten ausgesät.

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂ Begasung und 95 % Luftfeuchte kultiviert.

2.2.9 Zelllinien und ihre Propagation

Material: 75 cm² Zellkulturflaschen

Lösungen: LB27.4 Medium (RPMI 1640, 10% (v/v) FCS (Hitzeinaktiviert), 10⁵ Units Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin, 2 mM L-Glutamin), 3T3 Medium

(DMEM, 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 10^5 U Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin, 2mM L-Glutamin), Trypsin- EDTA, PBS

Methode: Die Maus B-Zelllinie LB27.4 wächst als Mischung aus Suspensions- und adhären Zellen. Die Maus Fibroblasten Zelllinie 3T3 wächst ausschließlich als adhären Zelle. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz zwischen 70 % bis 90 % für Versuche verwendet oder passagiert. Die adhären Zellen wurden zunächst mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin- EDTA inkubiert und abgelöst. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen mit 1×10^3 Zellen pro cm^2 ausgesät.

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO_2 Begasung und 95 % Luftfeuchte kultiviert.

2.2.10 Markierung von Oberflächenantigenen

Zur Analyse einzelner Zellpopulationen in Suspension mittels eines Durchflusszytometers wurden die Zellen mit Fluorochromen konjugierten Antikörpern markiert. Das an Zellen gebundene Immunogold wurde mit Fluorochromen konjugierten Sekundärantikörpern, gerichtet gegen den unkonjugierten Primärantikörper an den Nanogoldpartikel markiert.

Material: Durchflusszytometer (LSR II), FACS-Einmalröhrchen (Polypropylen-12/75 mm), Tischzentrifuge „Multifuge“

Lösungen: PBS

Methode: Jeweils 1×10^6 Zellen in 50 μl PBS wurden zur Färbung in FACS-Einmalröhrchen überführt. Die Antikörper wurden in zuvor titrierter Konzentration in einem Volumen von 50 μl zugegeben. Die Färbung erfolgte für 15 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen (5 min, 300 g, 4 °C). Zur Analyse am LSR II Durchflusszytometer wurden die Zellen in 500 μl resuspendiert.

2.2.11 Markierung intrazellulärer Antigene

Zur Markierung intrazellulärer Antigene müssen die zu untersuchenden Zellen fixiert und anschließend ihre Zellmembran permeabilisiert werden, damit die Fluorochrom konjugierten Antikörper in die Zellen eindringen können.

Material: Durchflusszytometer (LSR II), FACS-Einmalröhrchen (Polypropylen-12/75 mm), Tischzentrifuge „Multifuge“

Lösungen: 4 % Paraformaldehyd PFA/ PBS Fixierlösung, 0,25 % TritonX-100/ PBS, 0,5 % BSA/ PBS Waschpuffer

Methoden: 1×10^6 Zellen in 500 μ l PBS resuspendiert wurden mit 500 μ l PFA-Fixierlösung gut durchmischt und für 30 min bei 4 °C fixieren lassen. Anschließend wurde 1 ml Waschpuffer hinzugegeben, die Zellen abzentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C), die Fixierlösung verworfen und die Zellen in 0,5 ml 0,25 % 4 °C kalter TritonX-100 Lösung resuspendiert. Nach fünf minütiger Permeabilisierung auf Eis wurden 1,5 ml Waschpuffer zugegeben und die Zellen bei 4 °C für 5 min mit 300 g abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes konnten die Zellen intrazellulär, entsprechend dem Protokoll zur Färbung von Oberflächenantigenen (Kap. 2.2.10), gefärbt werden.

2.2.12 Zellfärbung mit CFSE zur Zellmarkierung und Zellproliferationsmessung

Zur Unterscheidung von adhärenenten Zellen in einer Mischkultur wurde eine Zelllinie vor der Mischung mit 5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (CFDaSE) gefärbt. Dieser farblose Stoff diffundiert frei in Zellen und wird in intakten Zellen durch Esterasen in fluoreszentes 5-(and-6)-Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE; Extinktion max. 496 nm; Emission max. 512 nm) und Acetatreste gespalten. Das CFSE ist schwer Zellmembran gängig und hoch reaktiv, deshalb bleibt es in intakten Zellen und kann dort als 5-(and-6)-Carboxyfluorescein (CF) kovalent an bestimmte intrazelluläre Proteine binden.

Da sich der Farbstoff bei der Teilung von zuvor gefärbten Zellen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, kann damit auch die Proliferation von Zellen von dem Zeitpunkt der Färbung bis zur Messung am Durchflußzytometer bestimmt werden (Hasbold, 1999).

Material: 37 °C Wärmeschrank, 50 ml Reaktionsgefäß, Tischzentrifuge „Multifuge“

Lösungen: PBS, 5(6)-(N-Succinimidylloxycarbonyl)-3',6',0,0'-diacetylfluorescein-5(6)-Carboxyfluorescein diacetate, N-succinimidyl ester- (CFDaSE) [10 mM], FCS

Methode: Die zu färbenden Zellen wurden einmal mit reichlich PBS gewaschen und maximal 20×10^6 Zellen in 10 ml 37 °C warmen PBS resuspendiert. Dazu wurde 37 °C 2 μ M CFDaSE /PBS (2 μ l CFDaSE [10 mM] + 10 ml PBS) zugegeben und für 15 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Färbung durch Zugabe von 2 ml FCS gestoppt und mit reichlich PBS gewaschen (10 min, 350 g, 20 °C).

Die Analyse der Zellproliferation gemessen am Durchflusszytometer erfolgte mit der FlowJo Software durch die Verwendung der Proliferationsfunktion.

2.2.13 Lebend / tot Färbung mit BCECF und Hoechst33258

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen mittels Durchflusszytometrie ermöglicht die Färbung mit BCECF und Propidiumjodid (Barnett & Evans, 1986; Kolber *et al.*, 1988). Da in dieser Arbeit ein Durchflusszytometer mit einem dritten violetten Laser zum Einsatz kam, konnte statt des Propidiumjodid der UV Farbstoff Hoechst33258 eingesetzt werden.

Der Stoff BCECF-AM ist frei membrangängig und kann somit frei in intakte Zellen diffundieren. Nach dem Abspalten der Acetoxymethyl Gruppen, durch die in intakten Zellen vorhandenen Esterasen, entsteht der fluoreszente Stoff BCECF, der nicht mehr durch intakte Zellmembranen aus der lebenden Zelle heraus diffundieren kann (Leeder *et al.*, 1989). Bei Hoechst33258 handelt es sich um einen DNA Farbstoff, der nur in Zellen eindringen kann, wenn diese keine intakte und funktionelle Zellmembran mehr besitzen und folglich tot sind (Latt & Stetten, 1976).

Material: Tischzentrifuge „Multifuge“

Lösungen: 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF, AM) [1 mg/ml], 2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl) benzimidazole trihydrochloride (Bisbenzimidazole H 33258 oder Hoechst33258) [10 mg/ml], PBS

Methoden: Nach der Behandlung wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml PBS mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BCECF-AM bei 37 °C für 30 min lichtgeschützt gefärbt und anschließend mit 2 ml PBS gewaschen (5 min, 300 g, 20 °C). Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen in 0,5 ml PBS mit 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst33258 resuspendiert und für 15 min inkubiert.

2.2.14 Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen

Zur Quantifizierung von Proteinen bzw. Zytokinen in Zellkulturüberständen wurde der Multiplex-Bead-Assay (CBA) von der Firma BD Bioscience angewandt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sich gleichzeitig mehrere Zytokine in Überständen messen lassen.

Das CBA-Flex-Kit enthält verschiedene Polystyrolpartikel, die mit Antikörper gegen das jeweilige Zytokin konjugiert sind. Die Partikel unterscheiden sich in ihrer Autofluoreszenz und können dadurch gemeinsam gemessen und anschließend getrennt ausgewertet werden können. Die Partikel wurden mit Zellkulturüberständen inkubiert und binden die Zytokine spezifisch an den jeweiligen Partikeln. Anschließend werden, die an den Partikeln gebundenen Proteine, mittels eines mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten „Sandwich“-Antikörpers detektiert.

Im Durchflusszytometer ist es nun einerseits möglich, die verschiedenen Partikel anhand ihrer Autofluoreszenz den jeweiligen Zytokinen zuzuordnen; andererseits korreliert die Intensität des Fluorochromes des gebundenen Antikörpers mit der Menge an gebundenem Protein. Mittels einer Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration können nun die in der Probe enthaltene Proteinmenge in einem Konzentrationsbereich von ca. 10-5000 pg/ml quantifiziert werden. Die Auswertung erfolgte mittels der mitgelieferten „FCAP Array™ Software“.

2.2.15 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Zur Ermittlung der Antigen spezifischen Zytotoxizität *in vivo* wurden die zu untersuchenden Mäuse mit einem OVA Antigen exprimierenden Adenovirus (AdOVA) *i.v.* infiziert. Die Immunisierungsphase betrug sechs Tage. Anschließend wurden syngene Mausmilzzellen als sog. Targetzellen mit dem OVA Klasse 1 Peptid

SIINFEKEL beladen und einer hohen Konzentration von CFSE gefärbt. Als Kontrolle wurden gleiche Milzzellen ohne Antigen mit einer geringen Konzentration von CFSE gefärbt. Diese beiden Zelltypen wurden anschließend 1:1 gemischt und *i.v.* in die immunisierten Mäuse injiziert. Nach vier Stunden wurden Milzzellen aus den Mäusen entnommen, dissoziiert und durchflußzytometrisch analysiert. Aus dem Verhältnis der Lyse von den mit Antigen beladenen Target-Zellen zu den Kontrollzellen, lässt sich die Antigen Spezifische *in vivo* Toxizität berechnen.

Material: OVA Antigen exprimierende Adenoviren (AdOVA), syngene Milzzellen, 1 ml Einmalspritzen, Einmalkanülen,

Lösungen: PBS, 5(6)-(N-Succinimidylloxycarbonyl)-3',6',0,0'-diacetylfluorescein-5(6)-Carboxyfluorescein diacetate, N-succinimidyl ester- (CFDaSE) [10 mM], FCS, SIINFEKL Peptid

Methode: Sechs Tage nach der Immunisierung der Mäuse mit 1×10^7 pfu AdOVA durch *i.v.* Injektion wurde der Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Eine Suspension aus syngenem Milzzellen wurde in zwei gleiche Ansätze geteilt. Der eine Teil der Zellen (Target-Zellen) wurde mit $2 \mu\text{M}$ des OVA Peptides SIINFEKL beladen (30 min, 37°C) und mit einer hohen Konzentration CFDaSE ($1 \mu\text{M}$) markiert. Der zweite Teil diente als interne Kontrolle (Kontrollzellen) und wurde deshalb nicht mit Antigen beladen und mit einer niedrigen Konzentration CFDaSE ($0,1 \mu\text{M}$) markiert. Anschließend wurden die Zellen 1:1 gemischt und 1×10^7 Zellen in die immunisierten Mäuse und in naive Mäuse *i.v.* injiziert. Vier Stunden später wurden Milzzellen aus den Mäusen präpariert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Antigen spezifische Lyse der injizierten Zellen wurde mit der Software „FlowJo“ und „Prism“ nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Zytotoxizität [\%]} = 100 - \frac{\frac{CFSE^{\text{hoch}}}{CFSE^{\text{niedrig}} \text{ immunisierte Tiere}}{\frac{CFSE^{\text{hoch}}}{CFSE^{\text{niedrig}} \text{ naive Tiere}}}}$$

2.2.16 Applikation *in vivo*

Material: 1 ml Einmalspritze, Injektionsnadeln (0,4 μm)

Lösungen: PBS

Methode: Alle Applikationen von Zellen oder von Adenoviren erfolgten intravenös (i.v.) in die Schwanzvene. Das Volumen der Applikation in PBS war in jedem Fall maximal 200 μl .

2.2.17 Ganzkörper gamma Bestrahlung mit anschließender Transplantation

Vor der Transplantation von Stammzellen, in diesem Falle von Knochenmarkzellen, müssen die zu behandelnden Mäuse eine letale Dosis von Gamma Strahlung aus einer radioaktiven Strahlungsquelle erhalten. Letal bedeutet in diesem Falle, dass alle teilungsfähigen Zellen durch die Gamma Strahlung soweit geschädigt werden, dass diese nicht mehr proliferieren. Sollten mit Gamma Strahlung behandelte Mäuse nicht innerhalb von wenigen Tagen Stammzellen transplantiert bekommen, würden sie sterben.

Material: 1 ml Einmalspritze, Injektionsnadeln, Gamma Bestrahlungsgerät, Rotlicht

Lösungen: Avertin-Lösung (2,5 % in PBS), PBS,

Methode: Für die letale Ganzkörperbestrahlung (TBI) wurden die Mäuse mit je 125 μl Avertin-Lösung *i.p.* betäubt. Anschließend wurden sie in einer Bestrahlungsanlage mit einer einmaligen Dosis von 9 Gy (Dauer 4:17 Minuten) Gamma Strahlung (Strahlungsart CS^{137} 69TBq) myeloablativ bestrahlt. Nach dem Bestrahlen wurden die Mäuse bis zum Erwachen mit Rotlicht warm gehalten, um ein Auskühlen der Tiere zu verhindern, da die Narkotisierung mit Avertin auch die Temperaturregulierung blockiert. 24 Stunden nach der Ganzkörperbestrahlung wurden den Mäusen 5×10^6 behandelte oder unbehandelte Knochenmarkzellen von syngen Mäusen transplantiert. Dieses erfolgte i.v. in die Schwanzvene in PBS mit einem Gesamtvolumen von 200 μl .

Da Auf Grund der Gamma Bestrahlung mit anschließender Transplantation sterben stets einige Tiere in den ersten vier Tagen nach der Bestrahlung, daher wurden in den

Überlebenskurven nur solche Tiere aufgenommen, welche fünf Tage nach der Transplantation noch lebten.

2.2.18 Statistische Analyse

Die Fehlerabweichungen wurden mit der Analysefunktion der „Prism“ Software (Version 4.0c) ermittelt und als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige ungepaarte t- Test verwendet. Die Berechnung der Signifikanz der Überlebenskurven erfolgte mit Hilfe des *logrank*- Tests.

Signifikanznomenklatur:

Nicht signifikant (ns):	$p > 0,05$
Signifikant (*):	$p = 0,01 - 0,05$
Sehr Signifikant (**):	$p = 0,001 - 0,01$
Hoch Signifikant (***):	$p < 0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Nano-Photothermolyse: Eine selektive Methode zur Elimination von Zellen *in vitro* mittels Laser aktivierter Nanogoldpartikel

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die Methode der Nano-Photothermolyse unter Verwendung von Laser aktivierten kolloidalen Nanogoldpartikeln eine geeignete Methode zur selektiven Elimination von Zellen sein kann. Dieses wurde zunächst an murinen Zelllinien in Suspension, in einer Mischkultur verschiedener Zelllinien und an einer Mischkultur von adhären wachsenden Zellen in *in vitro* Systemen untersucht.

3.1.1 Selektive Anbindung von Immunogold-Konjugaten an Zellen

Nach den physikalischen Grundlagen, auf dem die Methode der Nano-Photothermolyse beruht, können nur solche Zellen eliminiert werden, welche eine ausreichende Anzahl an Lichtenergie absorbierenden Nanogoldpartikel auf der Zellmembran gebunden oder aufgenommen haben (Kap. 1.3). Demnach wird die Selektivität dieser Methode über die spezifische Bindung der verwendeten Immunogoldkonjugate an den zu eliminierenden Zellen bzw. Zielzellen vermittelt. Die Bindung der Nanogoldpartikel an die Zellen erfolgt über die auf den Partikeln konjugierten monoklonalen Antikörper (Kap. 2.2.1). In dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerziell erwerbliche monoklonale IgG Antikörper als Zielfindungsproteine auf die Nanogoldpartikel konjugiert. Die Spezifitäten dieser monoklonalen Antikörper sind bekannt und beschrieben. Jedoch musste überprüft werden, ob die Spezifität der Antikörper nach der Konjugation auf Nanogoldpartikeln erhalten geblieben ist. Folglich wurde in dieser Arbeit zunächst die Spezifität der selbst konjugierten Immunogold Partikel untersucht.

Die in dieser Arbeit verwendeten kolloidalen Nanogoldpartikel haben einen Durchmesser von 15 nm oder 25 nm und können wegen ihrer geringen Größe weder einzeln in Lösung noch direkt nach der Bindung an Zellen im Durchflusszytometer detektiert werden. Jedoch lässt sich ein an die Partikel konjugierter Ratte-anti-Maus IgG1 Erstantikörper mit einem sekundären Ziege-anti-Ratte Antikörper gegen den Ratte Fc-Teil des Erstantikörpers markieren. Dieses ermöglichte dadurch eine

indirekte Detektion, der an den Zellen gebundenen Immunogold Partikel mit einem Fluoreszenz markierten Zweitantikörper mittels Durchflusszytometrie. Abbildung 3.1 zeigt beispielhaft den Nachweis von CD8+Nanogoldpartikeln, die an murine Zellen einer Milzzellsuspension gebunden haben.

Um die spezifische Bindung der verwendeten CD8+Immunogold Partikel zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem fluoreszenzmarkiertem direkt erkennenden Erstantikörper gegen CD8+ T-Zellen, welche hier die Zielzellen des Immunogoldes darstellen, inkubiert. Die Dot Plot Analyse (Abb. 3.1 rechts) zeigt eine deutlich abgegrenzte doppelpositive Population, während einzelpositive Zellen nicht detektiert werden konnten. Daraus wurde geschlossen, dass an alle CD8+ T-Zellen das eingesetzte CD8+Immunogold gebunden hatte und eine unspezifische Bindung nicht zu detektieren war.

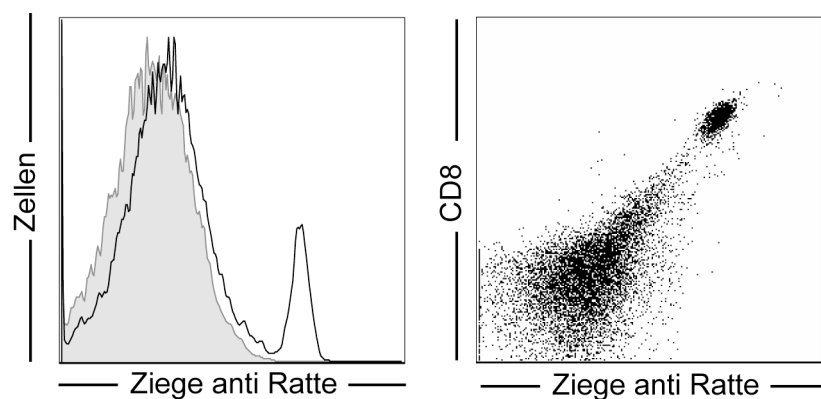


Abb. 3.1 Nachweis der Selektivität von Immunogold Nanopartikeln auf Zellen über den konjugierten Antikörper mittels Durchflusszytometrie. Murine Milzzellen wurden mit CD8+Nanogoldpartikeln inkubiert und die Goldpartikel anschließend auf den Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen (grau/ gefüllt: Sekundärantikörper Kontrolle; schwarz: mit Ratte-anti-Maus konjugiertes Immunogold auf Milzzellen). Die CD8+ Zellen wurden zur Identifizierung und zur Überprüfung der Spezifität des Immunogoldes mit einem direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt.

Mit Größen von 15 nm oder 25 nm im Durchmesser liegen die in dieser Arbeit verwendeten Nanogoldpartikel unter der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie und können somit nicht direkt lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe von Goldenhance™, welches auf der vom Ausbelichten von Schwarz-Weiß Fotos bekannten Methode der Silberverstärkung bzw. Silberentwicklung beruht,

können die Nanogoldpartikel jedoch um ein vielfaches vergrößert werden, was den Nachweis mit Hilfe der Lichtmikroskopie ermöglicht (Kap. 2.2.4).

In einer murinen Fibroblasten Zelllinie 3T3 (Abb 3.2 a) und einer murinen B-Zelllinie LB27.4 (Abb 3.2 b) konnten nach Inkubation mit B220+Immunogold Partikeln, welche spezifisch an die LB27.4 Zellen binden sollten und anschließender Goldenhance™ Entwicklung auf Cytospin Präparaten Nanogoldpartikel auf den Zellen nachgewiesen werden. Bei zunehmender Anzahl von Immunogold Partikeln sind vermehrt Nanogoldpartikel an den Zellen detektierbar. Wobei nur eine geringe Anzahl Partikel unspezifisch an die Fibroblastenzellen (Abb 3.2 a) gebunden hatte und im größeren Maße die Immunogold Partikel spezifisch auf den B-Zelllinie (Abb 3.2 b) zu detektieren waren.

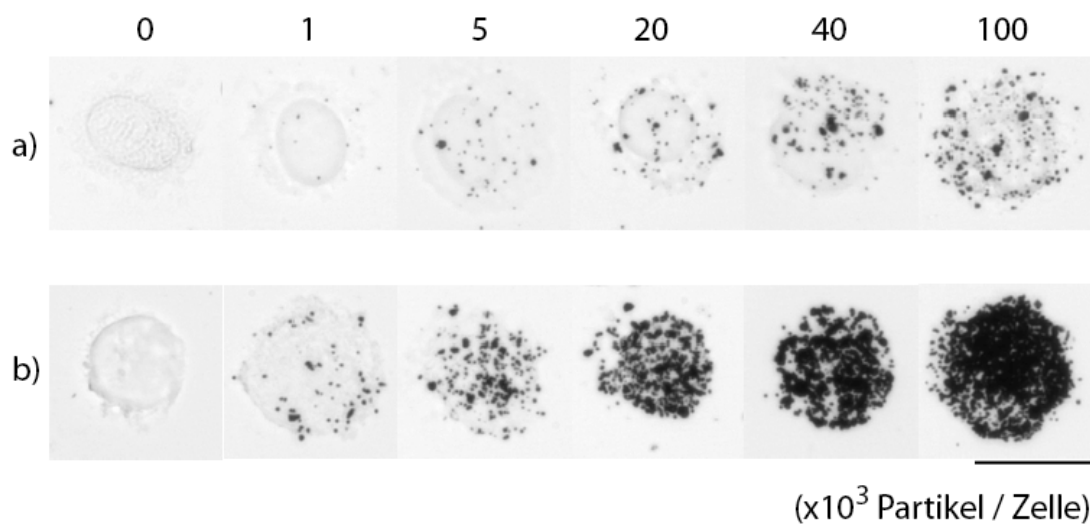


Abb. 3.2 Detektion von Nanogoldpartikeln nach Goldenhance™ Entwicklung auf Zellen mittels Durchlichtmikroskopie. Zellen aus einer murinen Zellkultur aus a) 3T3 (Fibroblasten) und b) LB27.4 (B-Zellen) Zellen wurden mit einer aufsteigenden Anzahl von 0 bis 100×10^3 Partikel pro Zelle von B220+Nanogoldpartikel, spezifisch für die B-Zellen, für 30 min inkubiert, auf einen Objektträger mittels Cytospin-Zentrifuge aufgebracht und anschließend mit Goldenhance™ entwickelt (Messbalken entspricht 20 μm).

3.1.2 Effiziente Elimination von Suspensionszellen

Ein Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich mit der Methode der Nano-Photothermolyse Zellen gezielt und effizient eliminieren lassen. In Kapitel 3.1.1

konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Nanogoldpartikel spezifischen über Antikörperbindung an die Zielzellen gebracht werden konnten. Nun sollte gezeigt werden, dass die verwendeten Laser Parameter geeignet waren, Zellen effizient und selektiv zu eliminieren.

Die gezielte Elimination von Zellen unter Verwendung von Nanogoldpartikeln und Laserbestrahlung wurde zunächst an einer murinen Zelllinie durchgeführt. Die hierfür verwendete B-Zelllinie LB27.4 bietet gegenüber primären Zellen den Vorteil, dass diese Zellen leicht kultivierbar sind und ihre Eigenschaften bei der Verwendung von Zellen aus verschiedenen Passagen konstant bleiben. Zudem sind bestimmte Eigenschaften, wie Antigenexpression, Wachstum und Vitalität der Zelllinien in der Regel bereits eingehend in der Literatur beschrieben. Die Zellen der Zelllinie LB27.4 tragen das Antigen B220, auch als CD45R bekannt, auf der Zelloberfläche und können darüber, durch den Einsatz von B220+Immunogold, mit Nanopartikeln beladen werden. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.2 für die Nano-Photothermolyse-Behandlung mit gepulster Laserstrahlung bestrahlt.

Der Effekt der Nano-Photothermolyse von Zellen beruht auf der Entstehung von Kavitationsblasen um die Nanogoldpartikel, welche an den Zellen haften (Hüttmann et al., 2001). Die direkte Folge ist die unmittelbare Schädigung der Zelle durch die Zerstörung der Integrität der Zellmembran, wodurch es zur Nekrose, also zum plötzlichen Zelltod, kommt. Um zu kontrollieren, ob die Elimination von Zellen erfolgreich war, wurden die toten und lebenden Zellen vor und nach der Nano-Photothermolyse Behandlung gefärbt und konnten so mittels Durchflusszytometrie unterschieden werden.

Die Inkubation von Zellen mit Bis-Carboxyethyl-Carboxyfluorescein-acetoxymethyl-ester (BCECF-AM) führt in lebenden Zellen zu einer enzymatischen Umwandlung in den Fluoreszenzfarbstoff Bis-Carboxyethyl-Carboxyfluorescein (BCECF). In Ergänzung erlaubt die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H 33258 (Hoechst 33258) die Detektion von toten Zellen. Der kombinierte Einsatz dieser beiden Reagenzien ermöglicht eine eindeutige Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen (Abb. 3.3). Lebende Zellen sind BCECF positiv und Hoechst 33258 negativ (Region 1). Im Gegensatz dazu sind tote Zellen BCECF negativ und Hoechst 33258 positiv (Region 2).

Vor der Inkubation mit Immunogoldkonjugaten und anschließender Laserbestrahlung (Kap. 2.2.2) fanden sich in der Zellkultur überwiegend lebende Zellen und nur wenige tote Zellen (Abb. 3.3 links). Nach der Behandlung ließen sich jedoch keine lebenden Zellen mehr detektieren. Folglich konnten mit der hier angewendeten Nano-Photothermolyse erfolgreich und hoch effizient Zellen eliminiert werden.

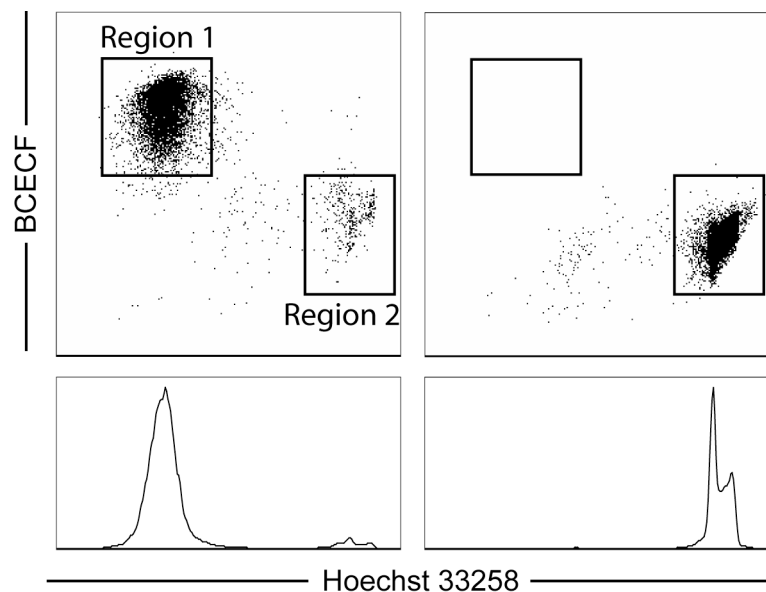


Abb. 3.3 Elimination von Zellen in Suspension mittels Nano-Photothermolyse. Die B220 positiven Zellen der B-Zell Lymphoma Zelllinie LB27.4 wurden mit B220+Nanogoldpartikeln inkubiert, und anschließend mittels Laser bestrahlt. Zur Unterscheidung von vitalen und toten Zellen vor (unbehandelt) und nach der Nano-Photothermolyse-Behandlung (behandelt) wurden die Zellen mit BCECF und Hoechst 33258 gefärbt. Die lebenden Zellen sind ausschließlich BCECF positive (Region 1), wohingegen die toten Zellen Hoechst 33258 positiv sind (Region 2).

Die Effizienz der zellspezifischen Elimination mit der Methode der Nano-Photothermolyse hängt nach der Theorie von einer ausreichenden Anzahl gebundener Nanogoldpartikel auf der Zielzelle ab. Jedoch ist zu vermuten, dass das eingesetzte Immunogold auch unspezifisch an Zellen binden kann, wenn es im Übermaß eingesetzt wird. Um dieses zu untersuchen wurde eine Titration mit einer aufsteigenden Anzahl von eingesetzten Immunogold Partikeln vorgenommen. Dabei wurden Immunogold Partikel eingesetzt, welche spezifisch für die Zellen waren, um zu untersuchen wie viel Partikel pro Zelle eingesetzt werden mussten, um eine gute Eliminationseffizienz zu erreichen. Parallel dazu wurde Immunogold eingesetzt, welches nicht spezifisch für die Zellen war und folglich nicht an die Zellen binden sollte. Somit wäre eine Elimination dieser Zellen mittels Nano-Photothermolyse auf

eine unspezifische Bindung dieser Partikel an die Zellen zurückzuführen. Des Weiteren sollte in diesem Versuch geklärt werden, ob die alleinige Inkubation der Zellen mit spezifischen Immunogold ohne die Laserbestrahlung zu einer Beeinflussung der Vitalität der Zellen kommt.

Um dieses zu untersuchen, wurden Zellen der B-Zell-Lymphoma Zelllinie LB27.4, welche für den Oberflächenmarker B220 positiv und CD4 negativ sind, verwendet. Die Zellen wurden mit 1×10^2 bis 5×10^4 Partikel je Zelle mit zellspezifischen B220+Immunogold (nAu) oder zellunspezifischen CD4+Immunogold (us nAu) inkubiert (Abb. 3.4). Die Bestimmung der Partikelzahl erfolgte über die optische Dichte der Immunogoldlösung (Kap. 2.2.1).

Anschließend wurden die Zellen mit nanosekunden Laserpulsen bestrahlt. Um die Effizienz der Nano-Photothermolyse-Behandlung zu ermitteln, wurde die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, wie in Abbildung 3.3 gezeigt, vorgenommen.

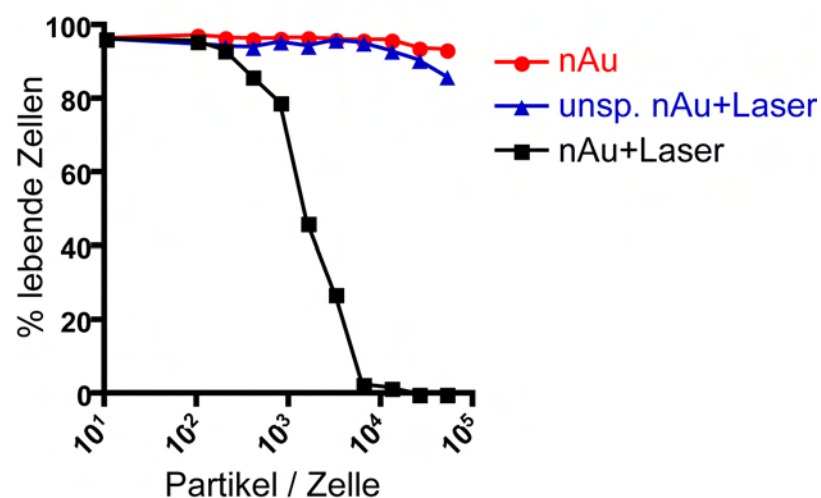


Abb. 3.4 Effektive Elimination von Zellen in Suspension mit zellspezifischem Immunogold. Die B220 positiven Zellen der B-Zell Lymphoma Zelllinie LB27.4 wurden mit variierter Anzahl von zellspezifischen B220+Nanogoldpartikel inkubiert (rote Linie) und anschließend mittels Nano-Photothermolyse eliminiert (schwarze Linie), oder mit zellunspezifischen CD4+Nanogoldpartikeln inkubiert und anschließend mit dem DIVA II Laser bestrahlt (blaue Linie). Die Ergebnisse der Behandlungen sind hier als lebende Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der eingesetzten Partikel dargestellt.

Der Anteil der lebenden Zellen in allen Ansätzen betrug vor der Behandlung $> 95\%$ (Abb. 3.4). Bei dem Einsatz von $6,25 \times 10^3$ zellspezifischem Immunogold Partikeln

je Zelle für die Eliminierung (nAu+Laser) sank der Anteil von lebenden Zellen nach der Nano-Photothermolysen-Behandlung unter 3 %, wohingegen die Vitalität der Zellen in den Kontrollgruppen nicht beeinträchtigt war. Bei Erhöhung der Partikelzahl auf $2,5 \times 10^4$ spezifischen Partikeln (nAu) pro Zelle wurden nach der Bestrahlung weniger als 0,05 % vitale Zellen detektiert, während in den anderen beiden Ansätzen bei gleicher Partikelzahl der Anteil der vitalen Zellen über 90 % blieb.

Bei dem Einsatz von mehr als $2,5 \times 10^4$ unspezifischen Immunogold (us nAu+Laser) fiel der Anteil an lebenden Zellen zunehmend ab, was eine zunehmende unspezifische Elimination von Zellen durch die Nano-Photothermolysen bedeutet.

Die Inkubation mit dem spezifischen Immunogold ohne Laserbestrahlung (nAu) zeigte hingegen auch bei Erhöhung der Partikelzahl keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Effizienz der Elimination von Zellen durch Nano-Photothermolysen in großem Maße von der Anzahl der eingesetzten Partikel je Zelle abhängig war. Dieses Phänomen wurde in Abschnitt 3.2 näher untersucht. Es zeigte sich darüber hinaus, dass es zu unspezifischer Photothermolysen von Zellen kam, je mehr Partikel je Zelle eingesetzt wurden. Auf das Ausmaß der Nebeneffekte der Nano-Photothermolysen auf die Nicht-Ziel-Zellen wird in Abschnitt 3.3 im Detail eingegangen.

Als optimale Konzentration für eine erfolgreiche und selektive Elimination von Zellen mittels der Nano-Photothermolysen wurde nach den Ergebnissen in Abbildung 3.4 der Einsatz von 2×10^4 Partikeln je Zielzelle definiert, da mit dieser Dosis eine Elimination von über 99 % bei nur geringer unspezifischer Elimination erreicht wurde. Diese ermittelte Partikelanzahl je Zielzelle ist in den weiteren Versuchen eingesetzt worden.

Die Effizienz der Nano-Photothermolysen kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie allerdings nur annähernd bestimmt werden, da diese im Auflösungsvermögen von Populationen kleiner als 0,1 % der Gesamtpopulation limitiert ist. Deshalb wurde im Folgenden eine weitere Methode herangezogen, um die Effizienz der Nano-Photothermolysen-Behandlung zu ermitteln.

Um eine klare Aussage über die Effizienz der Nano-Photothermolysen-Methode treffen zu können, wurde ein „limited dilution“-Assay angewandt. Bei diesem Assay wird eine definierte Anzahl von Zellen auf einen Zellrasen von nicht wachstumsfähigen Zellen ausgesät. In den Ansätzen, in denen ein Zellwachstum zu detektieren ist, wurde folglich mindestens eine lebende und teilungsfähige Zelle ausgesät, welche sich vermehrt hatte, also geklont wurde. Im Umkehrschluss befanden sich in den Ansätzen, in denen keine Zellvermehrung zu erkennen ist, auch keine lebenden und teilungsfähigen Zellen.

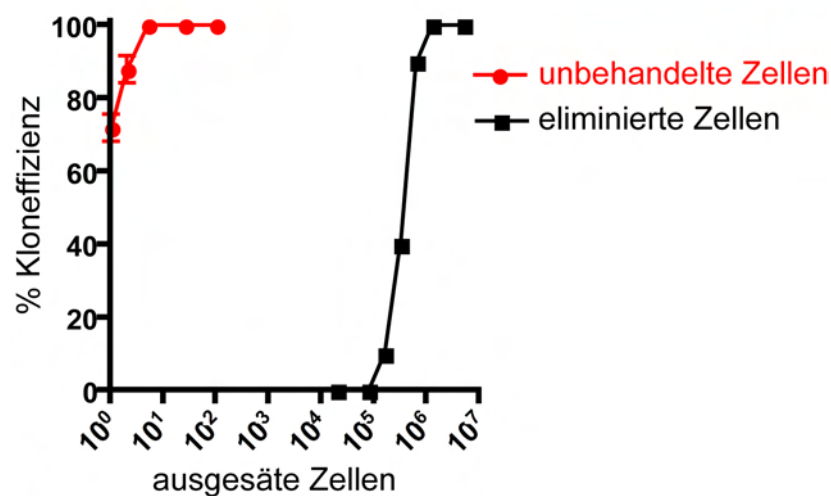


Abb. 3.5 Ermittlung der Eliminationseffizienz mittels eines „limited dilution“-Assays. Unbehandelte Zellen der Zelllinie LB27.4 wurden mittels Zellsortierer (rote Kurve) oder durch Nano-Photothermolysen eliminierten Zellen (schwarze Kurve) wurden zur weiteren Klonierung auf „Feeder-Zellen“ ausgesät und die Klonierungseffizienz nach 14 Tagen ermittelt.

Es wurden lebende Zellen der LB27.4 Zelllinie mit Hilfe eines FACS DIVA®-Zellsortierers in 96-Loch-Platten in definierter aufsteigender Anzahl zur Klonierung auf so genannte „Feeder-Zellen“, welche aus dem Knochenmark syngener Mäusen stammten, gelegt (Abb. 3.5 rote Kurve). Wurden mehr als zwei unbehandelte lebende Zellen je Well abgelegt, betrug die Klonierungseffizienz 100 %, was bedeutet, dass in allen Ansätzen mit mehr als zwei LB27.4 Zellen eine Zellvermehrung der LB27.4 Zellen stattfand. Wurde jeweils nur eine lebende Zelle in jedes Well sortiert, betrug die Klonierungseffizienz 70 %, weil sich in sieben von zehn Ansätzen die einzelnen LB27.4 Zellen teilen konnten.

Wurden nun mit Nano-Photothermolyse eliminierte Zellen dieser Zelllinie in definierter aufsteigender Anzahl zur Klonierung auf gleiche „Feeder-Zellen“ ausgesät, dann wuchsen in allen Ansätzen LB27.4 Zellen hoch, wenn $1,25 \times 10^6$ oder mehr behandelte Zellen ausgesät wurden (Abb. 3.5 schwarze Kurve).

Durch die Verschiebung dieser beiden Klonierungseffizienz-Kurven auf der x-Achse lässt sich eine Verringerung der Klonierbarkeit und somit der Vitalität der durch Nano-Photothermolyse eliminierten Zellen, im Gegensatz zu den nicht behandelten Zellen, um den Faktor $3,125 \times 10^5$ ermitteln. Somit musste das $3,125 \times 10^5$ fache an Nano-Photothermolyse behandelten Zellen ausgesät werden, um mindestens lebende Zelle zu erhalten. Umgerechnet entspricht dieses Ergebnis einer Eliminationseffizienz von über 99,999 % und bedeutet, dass im Durchschnitt ca. drei von einer Millionen Zellen die Elimination mittels Nano-Photothermolyse überlebt hatten und die Fähigkeit behielten sich durch Proliferation zu vermehren.

3.1.3 Selektive Elimination von Suspensionszellen in Mischkultur

Im nächsten Schritt wurde die Selektivität der Elimination von Zellen durch Nano-Photothermolyse untersucht, um das Potenzial dieser Methode für spätere Anwendungen zu beurteilen.

Zur selektiven Elimination von Zellen in Suspensionen wurde eine Mischkultur von der B-Zelllinie LB27.4 und der Fibroblasten Zelllinie 3T3 in dem Verhältnis 1:1 hergestellt. Diese Zellen wurden anschließend mit B220+Immunogold inkubiert. Bei dem B220+Immunogold handelte es sich um Nanogoldpartikel mit einem Durchmesser von 15 nm, welche mit dem monoklonalen Antikörper B220, auch als CD45R bekannt, konjugiert wurden und folglich spezifisch an die LB27.4 Zellen und nicht an die 3T3 Zellen binden sollten (vgl. Abb. 3.2). Die Inkubation des Immunogoldes mit den Zellen erfolgte direkt in der 96-well-Quarzglasplatte, in welcher die anschließende Laser Bestrahlung mit nanosekunden Pulsen durchgeführt wurde.

Um die LB27.4 Zielzellen mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren, wurden die durch Nano-Photothermolyse behandelten Zellen nach der Bestrahlung mit einem fluoreszenzmarkierten CD19+Antikörper, spezifisch für die LB27.4 Zellen, gefärbt.

Die toten Zellen konnten durch eine Färbung mit Hoechst 33258 identifiziert werden (Abb. 3.6).

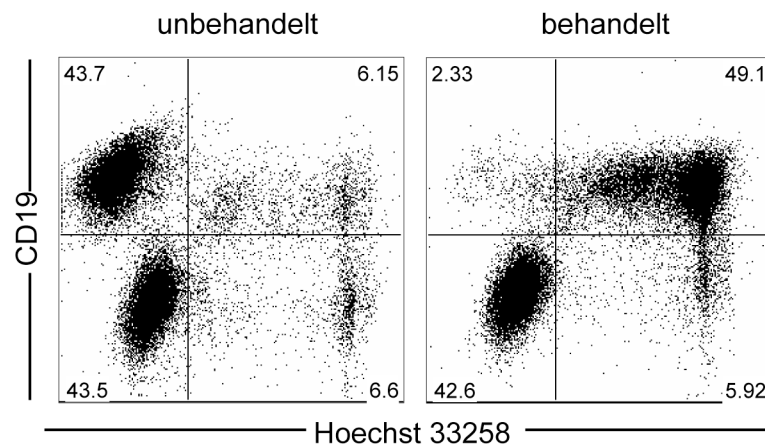


Abb 3.6 Selektive Elimination einer B-Zell Line in Suspension aus einer Ko-Kultur. LB27.4 Zellen wurden in einer Ko-Kultur mit 3T3 mit B220+Nanogoldpartikeln inkubiert, und mit Laser bestrahlt. Zur Detektion der Zielzellen wurden die LB27.4 nach der Nano-Photothermolyse Behandlung mit einem Antikörper markiert. Die toten Zellen wurden mit Hilfe von Hoechst 33258 identifiziert.

In der unbehandelten Kontrolle konnten von beiden Zelllinien dieser Mischkultur zwischen 6 % und 7 % Hoechst 33258 positive, folglich tote Zellen detektiert werden (Abb. 3.6 links). Nach der Behandlung konnten ca. 2 % lebende LB27.4 Zellen nachgewiesen werden. Auf die Vitalität der 3T3 Zellen hatte die Nano-Photothermolyse mit B220+Immunogold jedoch keinen Einfluss, wie vor der Behandlung waren auch danach ca. 6 % der 3T3 Zellen tot (Abb. 3.6 rechts).

Folglich war die Zellelimination durch Nano-Photothermolyse für die Zielzellen in einer Mischkultur spezifisch, ohne einen negativen Effekt auf die Vitalität der Nichtziel-Zellen zu haben. Die Spezifität der Methode unter Verwendung von Immunogoldkonjugaten mit monoklonalen Antikörpern ist somit gezeigt.

Das eigentliche Ziel der Anwendung der Methode der Nano-Photothermolyse besteht darin, eine effiziente und selektive Methode zur Aufreinigung von Primärzellen zur Verfügung zu stellen. Daher soll nach der Demonstration der Selektivität und Effizienz an Zelllinien im Weiteren die Wirkung auf Primärzellen untersucht werden.

Dazu wurden aus murinen Milzen Einzelzellsuspensionen generiert. Aus diesen Milzzellen, welche verschiedene primäre Zellentypen enthielten, sollten selektiv die CD8⁺ T-Zellen mittels Nano-Photothermolysen eliminiert werden. Dazu wurden murine Milzzellen nach der Isolierung mit CD8-Immungold inkubiert und anschließend bestrahlt. Dabei wurden je 10⁶ Zellen in 100µl Medium bestrahlt (Kap. 2.2.2). Anschließend wurden die CD8⁺ Zellen mit einem biotinylierten αCD8⁺ Antikörper und Streptavidin Alexa 647 markiert. Die toten Zellen wurden mit Hoechst 33258 gefärbt.

In Abbildung 3.7 ist die selektive Elimination von primären Zellen beispielhaft an CD8⁺ Zellen aus einer murinen Milzzellsuspension gezeigt.

Die durchflusszytometrische Messung ergab, dass in der isolierten unbehandelten Milzzellsuspension ca. 20 % tote Zellen, darunter 1,6 % CD8⁺ Zellen und 17,9 % andere Zellen vorhanden waren (Abb. 3.7 links). Nach der CD8⁺ spezifischen Nano-Photothermolysen-Behandlung wurden 6 % tote CD8⁺, jedoch nur noch 0,1 % lebende CD8⁺ Zellen detektiert (Abb. 3.7 rechts). Dieses bedeutet eine Reduktion der lebenden CD8⁺ Zellen von 4,41 % auf 0,1 % der Gesamtzellzahl, also um ca. 98 % bezogen auf die CD8⁺ Zellen.

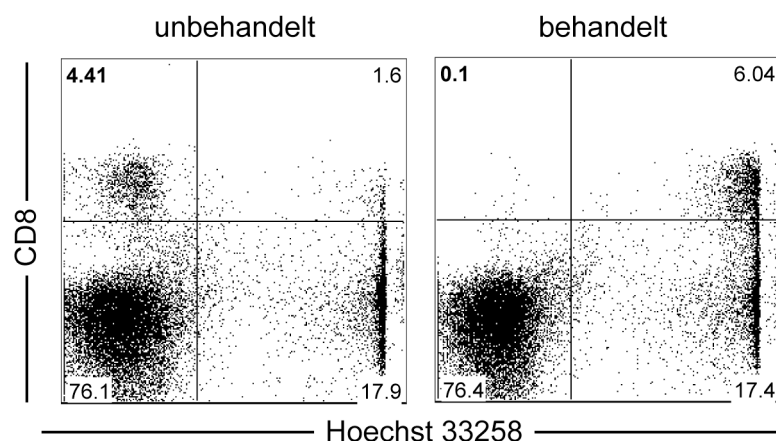


Abb. 3.7 Selektive Elimination von CD8⁺ Zellen aus murinen Milzzellen in Suspension. Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen (unbehandelt) wurden mit CD8-Immungold inkubiert und anschließend bestrahlt (behandelt). CD8⁺ Zellen wurden zur Detektion mit einem biotinylierten αCD8 Antikörper und Streptavidin Alexa Fluor 647 markiert. Die toten Zellen wurden mit Hoechst 33258 gefärbt.

Der Anteil von lebenden und toten CD8 negativen Zellen (hier Nicht-Ziel-Zellen) blieb vor und nach der erfolgreichen Elimination der CD8⁺-Zellen, auf dem gleichen

Niveau. Folglich hatte die Nano-Photothermolyse Behandlung keinen Einfluss auf die Vitalität der CD8 negativen Nicht-Ziel-Zellen.

Daraus wurde geschlossen, dass die Nano-Photothermolyse in hohem Maße selektiv die anvisierten primären CD8⁺ Zellen aus den murinen Milzzellen eliminieren konnte.

3.1.4 Selektive Elimination von adhärennten Zellen

Neben der selektiven Elimination von Zellen, die in einer Suspension vorlagen, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die Nano-Photothermolyse auch als Methode zur Aufreinigung von adhärennten Zellen zu entwickeln.

Um die Eignung der Nano-Photothermolyse zur effizienten und selektiven Elimination von adhärennten Zellen zu untersuchen, wurden Ko-Kulturen von zwei verschiedenen murinen Zelllinien, den LB27.4 und 3T3, angesetzt (vgl. Abb. 3.6). Zur Unterscheidung der beiden Zelllinien wurden die 3T3 Zellen mit dem Farbstoff CFSE markiert. Anschließend wurden die 3T3 Zellen im Verhältnis 1:1 mit ungefärbten LB27.4 Zellen gemischt und auf Chamberslides ausgesät. Nachdem den Zellen 20 h Zeit zur Adhäsion gegeben war, wurden die Zellen, die sich im Überstand befanden, entfernt, während die adhärennten Zellen einen Zellrasen von ca. 40 % Konfluenz gebildet hatten. Diese Co-Kultur wurde mit B220+Immunogold, spezifisch für die LB27.4 Zellen, inkubiert und anschließend bestrahlt. Vor der Anfertigung von mikroskopischen Aufnahmen wurde Hoechst 33258 zur Detektion der toten Zellen hinzugefügt.

Abbildung 3.8 zeigt die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen von den CFSE positiven 3T3 Zellen (grün), den Hoechst 33258 positiven toten Zellen (rot) und der Durchlichtaufnahme vor (links) und nach (rechts) der Bestrahlung. Aufgrund der Färbung der 3T3 Zellen mit CFSE können diese von LB27.4 durch ihre Fluoreszenz im grünen Kanal eindeutig unterschieden werden. Vor der Bestrahlung wurden nur wenige Hoechst 33258, also tote Zellen in der Mischkultur, detektiert. Nach der Nano-Photothermolyse-Behandlung mit B220+Immunogold, die spezifisch die LB27.4 eliminieren sollte, erscheinen alle CFSE negativen Zellen Hoechst 33258 positiv. Alle in dieser Aufnahme gezeigten Zielzellen wurden also mit der Nano-

Photothermolyse erfolgreich eliminiert. Auf die Vitalität der CFSE positiven Nicht-Ziel-Zellen hatte die Nano-Photothermolyse-Behandlung von adhärennten Zellen keinen erkennbaren Einfluss.

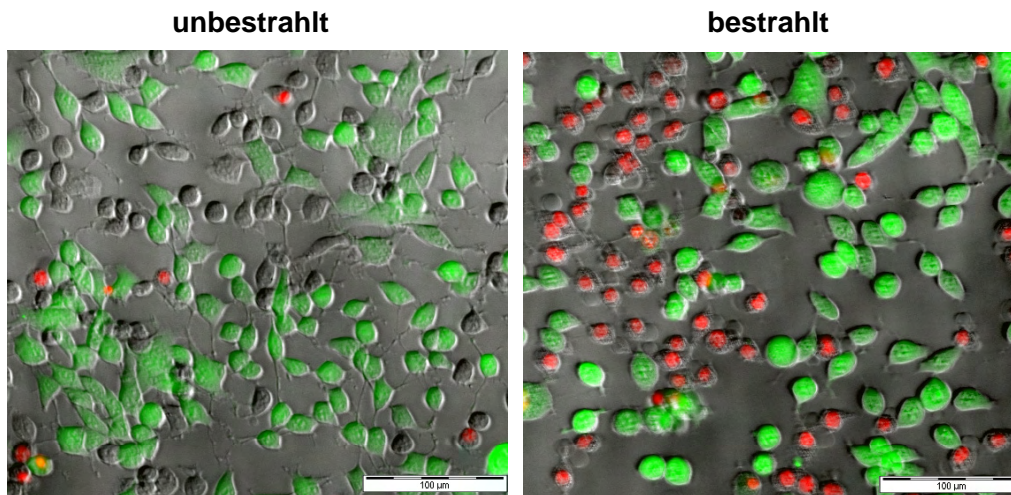


Abb 3.8 Selektive Elimination einer Zelllinie aus einer adhärennten Ko-Kultur. Zur Unterscheidung der beiden Zelllinien wurden die 3T3 Zellen vor dem Mischen mit LB27.4 und dem Aussähen mit CFSE gefärbt. Die LB27.4 Zellen wurden nach dem Anwachsen der Ko-Kultur mit B220+Immunogold mit Nano-Photothermolyse eliminiert. Die toten Zellen wurden mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Bilder zeigen die Überlagerungen von mikroskopischen Durchlichtaufnahmen und den Fluoreszenzaufnahmen von CFSE positive 3T3 Zellen (grün) und Hoechst 33258 (rot) exemplarisch einer unbestrahlten und einer bestrahlten Probe.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Methode der Nano-Photothermolyse auch für die Aufreinigung von adhärennt wachsenden Zellen eine effiziente und selektive Methode sein kann.

3.2 Einfluss physikalischer Parameter auf die Eliminationseffizienz

Da das Prinzip der Schädigung von Zellen durch die Nano-Photothermolyse auf das physikalische Ereignis der Bildung von Kavitationsblasen um die Nanogoldpartikel nach Kurzzeit-Puls-Laserbestrahlung beruht, wird die Eliminationseffizienz der Nano-Photothermolyse zwangsläufig von physikalischen Parametern beeinflusst. In Abbildung 3.4 wurde bereits gezeigt, dass die Anzahl der zu den Zellen gegebenen Nanogoldpartikel einen maßgeblichen Einfluss auf die Eliminationseffizienz haben kann. Zu erwarten ist zudem, dass die Partikelgröße aufgrund der größenspezifischen optischen Eigenschaften von Nanopartikeln einen Einfluss hat. Außerdem wird die

eingebraachte Laserenergie eine bestimmte Stärke übersteigen müssen, um Kavitationseffekte auslösen zu können. Ein weiterer Parameter ist mutmaßlich die Distanz zwischen den Nanopartikeln und der Zellmembran, da die Kavitationseffekte auf wenige Nanometer um die Nanogoldpartikel begrenzt sind.

3.2.1 Einfluss von Partikelgröße, Partikelanzahl und Laserleistung auf die Effektivität der Zellelimination

Im ersten Versuch sollte der Einfluss der Partikelgröße, Partikelanzahl und der Laserleistung auf die Effizienz der Zellelimination durch die Nano-Photothermolyse gezeigt werden. Dabei sollte die Eliminationseffizienz für zwei verschiedene Größen von Nanopartikeln ermittelt werden. Wobei verschiedene definierte Anzahlen von Partikeln pro Zellen und verschiedene festgesetzte Laserenergien eingesetzt worden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit ist der Einfluss der Größe und Anzahl der verwendeten Nanogoldpartikel und der Laserenergie für die Zelllinie LB27.4 mit B220+Immunogold ermittelt worden. Dabei wurden zwischen $1,5 \times 10^3$ bis 1×10^5 kolloidale Nanogoldpartikel mit einem Durchmesser von 15 nm oder $0,3 \times 10^3$ bis $2,5 \times 10^4$ kolloidale Nanogoldpartikel mit einem Durchmesser von 25 nm eingesetzt. Die zur Bestrahlung verwendete Laserenergie wurde in 25 mW Schritten von 0 mW bis 125 mW eingestellt.

In Abbildung 3.9 a) sind die Ergebnisse für die Nano-Photothermolyse mit 15 nm Nanogoldpartikeln gezeigt. Zum Erreichen einer Eliminationseffizienz von über 99 % wurden bei der höchsten Laserenergie von 125 mW mindestens $2,5 \times 10^4$ Partikel pro Zelle benötigt. Bei Verdoppelung der Partikelanzahl pro Zelle auf 5×10^4 konnte die gleiche Eliminationseffizienz auch für niedrigere Laserenergien bis 75 mW erzielt werden. Mit der Laserbestrahlung von 25 mW konnten jedoch nur eine ineffiziente Photothermolyse von maximal 55 % der Zellen erreicht werden.

Bei der Verwendung von größeren Nanogoldpartikeln mit einer Größe von 25 nm konnten vergleichbare Eliminationseffizienzen mit deutlich weniger Partikeln erzielt werden (Abb. 3.9 b). Für eine Photothermolyse über 99 % der Zellen wurden bei höchster Laserenergie $2,5 \times 10^3$ Partikel pro Zelle und bei 75 mW Laserenergie

1×10^4 Partikel pro Zelle eingesetzt. Wie bei der Verwendung der 15 nm Goldpartikel konnten mit 25 mW Laserenergie keine zufrieden stellenden Eliminationseffizienzen erreicht werden.

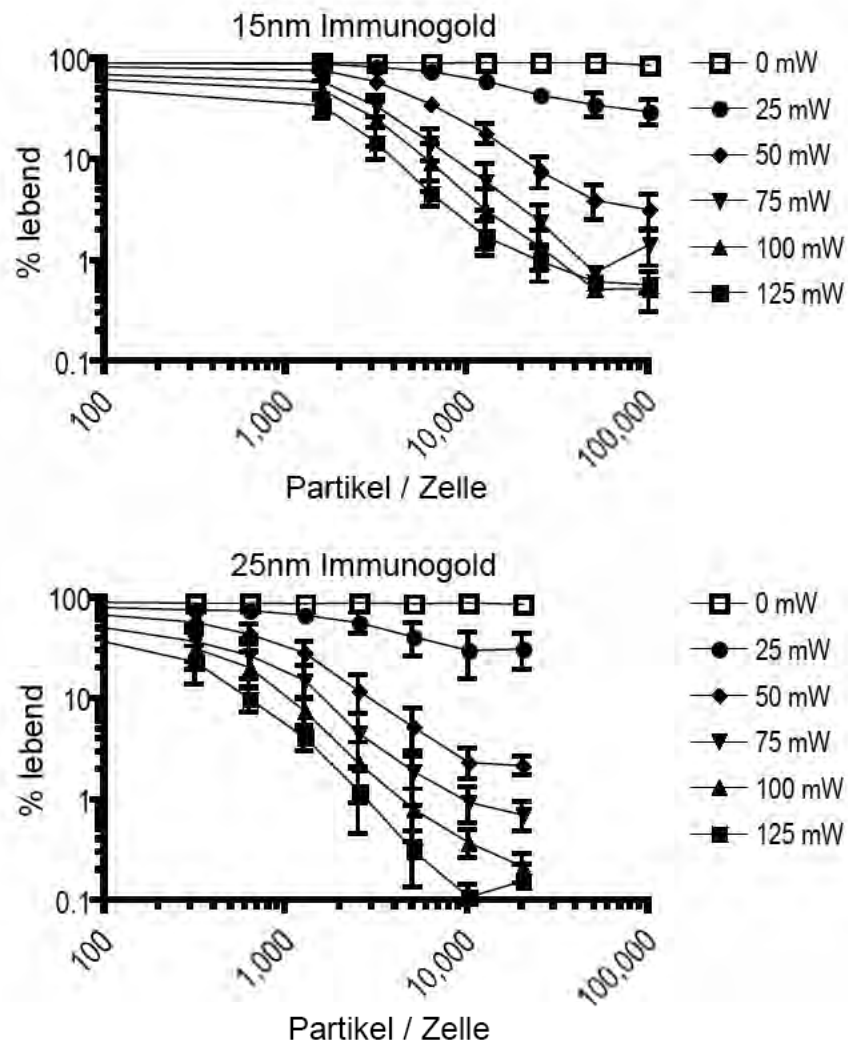


Abb. 3.9 Einfluss der physikalischen Parameter Partikelgröße, Partikelanzahl und Laserenergie auf die Eliminationseffizienz. Die Zelllinie LB27.4 wurde mit B220+Immunogold und Laserbestrahlung eliminiert. In diesem Versuch wurden 15 nm (a) und 25 nm (b) große Goldpartikel verwendet, zudem wurde die Anzahl der zugegebenen Partikel und die verwendete Laserenergie (mW) variiert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass bei Wahl der 25 nm Goldpartikeln für die Nano-Photothermolyse bei hohen Laserenergien 10× weniger und bei niedrigen Energien 5× weniger Partikel pro Zelle für die gleiche Eliminationseffizienz verglichen mit den kleineren 15 nm Goldpartikeln benötigt wurde. Zudem war eine Laserenergie

von über 50 mW erforderlich, um ein befriedigendes Ergebnis mittels Nano-Photothermolyse zu erreichen.

Der Einfluss der betrachteten Parameter Partikelgröße, Partikelanzahl und Laserenergie auf die Effektivität der Nano-Photothermolyse konnte mit diesem Versuch aufgezeigt werden. Es wird deutlich, dass diese Parameter nicht getrennt betrachtet werden können, sondern für eine effektive Elimination alle Parameter aufeinander abgestimmt werden müssen.

3.2.2 Abstandsabhängigkeit zwischen Nanogoldpartikeln und Zellmembran auf die Effizienz der Nano-Photothermolyse

Im Unterschied zur LANTCET („laser-activated nano-thermolysis as cell elimination technology“) Methode (Lapotko et al., 2006), bei der die Nanogoldpartikel über einen primären und einen sekundären Antikörper an die Zellen gebracht werden, werden in dieser Arbeit die Nanogoldpartikel direkt über einen primären Antikörper an die Zellen gekoppelt. Zudem diskutierten Lapotko et al., dass in einem Zweischrittverfahren eine Clusterbildung von Nanogoldpartikeln nach Aufnahme in die Zelle für eine effiziente Nano-Photothermolyse notwendig sei.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der selektiven und effizienten Elimination verschiedener Zelltypen mittels Nano-Photothermolyse waren auch bei einer Inkubation der Zellen mit den Immunogold Partikeln bei 4 °C verifizierbar (Daten nicht gezeigt). Somit wurde eine Aufnahme der Partikel durch die Zellen ausgeschlossen.

Um eine mögliche Abstandsabhängigkeit zwischen Goldpartikel und Zellmembran auf die Eliminationseffizienz der Nano-Photothermolyse zu untersuchen, wurden im Vergleich zu dem direkt gebundenen Immunogold auch Versuche mit einem Zweitantikörper indirekt gebundenen Nanogoldpartikeln durchgeführt. Über einen IgG Antikörper direkt gebundene Immunogold Partikel haben, je nach Lage des Antikörpers auf dem Goldpartikel, einen Abstand von 10 nm bis 15 nm zum Bindungsprotein auf der Zielzelle. Bei der Verwendung eines zweiten Antikörpers erhöht sich der Abstand auf das Doppelte.

In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse der Nano-Photothermolyse mit 15 nm B220+Immunogold auf LB27.4 Zellen gezeigt. Abbildung 3.10 b) stellt Daten von Zellen dar, die zunächst mit dem α B220 Primärantikörper inkubiert wurden und anschließend mit Immunogold, welches mit einem Sekundärantikörper (anti-Ratte IgG; spezifisch für den verwendeten Primärantikörper) konjugiert war.

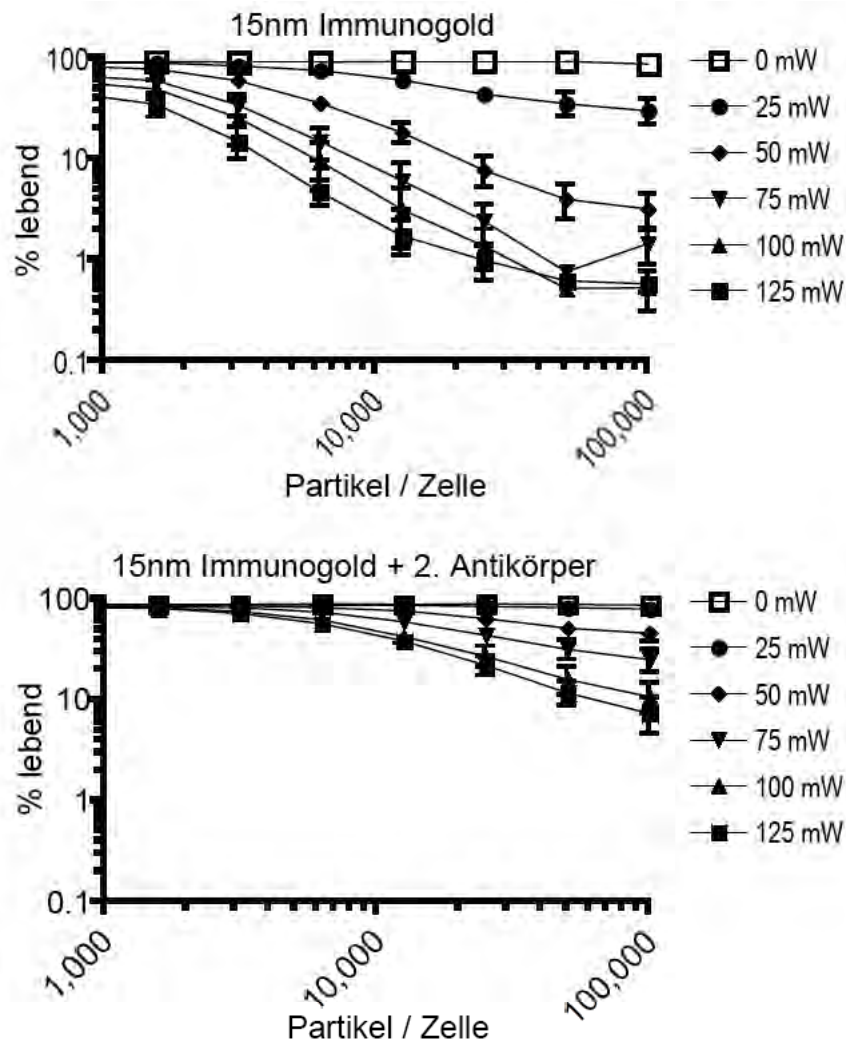


Abb. 3.10 Abstandsabhängigkeit auf die Eliminationseffizienz. Die Zelllinie LB27.4 wurde mit B220+Immunogold und Laserbestrahlung eliminiert. In diesem Versuch wurden die 15 nm Goldpartikel über einen (a) oder über zwei (b) Antikörper an die Zielzellen gebunden, zudem wurde die Anzahl der zugegebenen Partikel und die verwendete Laser Energie (mW) variiert.

Mit der Erhöhung des Abstandes zwischen Zellmembran und Goldpartikel um einen zweiten Antikörper nahm die Eliminationseffizienz stark ab (Abb. 3.10 b). Es konnte mit der höchsten Laserenergie von 125 mW und der maximalen Partikelanzahl von 100.000 Partikeln pro Zelle keine Effizienz von über 90 % Elimination der Zellen

erreicht werden. Verglichen mit den Ergebnissen des direkt konjugierten B220+Immunogoldes (Abb. 3.10 a), mussten mit der indirekten Strategie ca. 20fach mehr Partikel pro Zelle eingesetzt werden, um vergleichbare Eliminationseffizienzen bei gleicher Laserenergie zu erhalten (Abb. 3.10 a & b).

Ein maßgeblicher Einfluss der Anbindung der Nanogoldpartikel an die Zellen und somit des Abstandes zwischen Nanogoldpartikel und Zellmembran auf die Eliminationseffizienz der Nano-Photothermolyse konnte somit gezeigt werden. Eine Erhöhung des Abstandes um einen zweiten Antikörper zwischen den Nanogoldpartikeln und der Zellmembran führt dazu, dass mit den verwendeten 15 nm Goldpartikel keine befriedigende Eliminationseffizienz der Zellen erreicht werden kann.

3.3 Nebenwirkungen der Nano-Photothermolyse auf aufgereinigte primäre Zellen

Mit der Hoechst 33258 Färbung und anschließender Analyse der mit Nano-Photothermolyse behandelten Zellen mittels Durchflusszytometrie lassen sich nur Aussagen über die Vitalität der eliminierten Zellen bzw. nicht eliminierten Zellen treffen. Eine Aussage über mögliche darüber hinaus gehende Nebenwirkungen auf die aufgereinigten Zellen ist allerdings mit dieser Methode nicht möglich. Da die Methode der Nano-Photothermolyse für einen möglichen klinischen Einsatz zum Aufreinigen von in der Therapie einzusetzenden Zellen entwickelt werden soll, muss sichergestellt werden, dass die aufgereinigten Zellen keinen Schaden erlitten haben und immunologisch intakt geblieben sind, d.h. ihre zellspezifischen Aufgaben im Organismus weiterhin uneingeschränkt erfüllen können.

Um die immunologische Funktionsfähigkeit der aufgereinigten Zellen nach Nano-Photothermolyse-Behandlung zu untersuchen, wurde mit Milzzellen transgener Mäuse gearbeitet. Aus Milzzellen von OT-1/B6 Mäusen unter Verwendung von B220+Immunogold sollten selektiv die B-Zellen eliminiert werden. Anschließend wurde der Effekt auf eine Population der Nicht-Zielzellen den CD8⁺ T-Zellen studiert. Die OT-1/B6 transgenen Mäuse besitzen CD8⁺ T-Zellen mit einem T-Zell-Rezeptor, welche zu ca. 99 % eine Spezifität für das Klasse 1 Peptid SIINFEKL des Modelantigens Ovalbumin (OVA) aufweisen. Diese OVA-spezifischen T-Zellen sind

in der Lage, das auf MHC Klasse I Moleküle (H2K^b) präsentierte SIINFEKL Peptid zu erkennen und daraufhin aktiviert zu werden und eine Immunantwort zu generieren. Diese Aktivierung und die Immunantwort äußern sich in der Sekretion von bestimmten Zytokinen, wie IL-2 und IFN γ , sowie einer Proliferation der stimulierten T-Zellen.

In diesen Versuchen wurde auch der Einfluss der Laserbestrahlung auf die Zellen ohne Immunogold und der Einfluss der Inkubation mit dem Immunogold ohne anschließende Laserbestrahlung untersucht.

3.3.1 Die Aufreinigung primärer Zellen mittels Nano-Photothermolyse hat keinen Einfluss auf deren Vitalität

Zunächst sollte die Effizienz der selektiven Elimination von primären Zellen mit der Nano-Photothermolyse aus Milzzellen gezeigt werden. Dabei sollten besonders die Nebenwirkungen auf die Vitalität der aufgereinigten Zellen betrachtet werden. Zudem sollte der Einfluss der Inkubation mit dem Immunogold alleine und der Laserbestrahlung alleine auf die zu behandelten Zellen untersucht werden.

Milzzellen aus OT-1/B6 Mäusen wurden nach der Isolierung mit B220+Immunogold inkubiert und die B-Zellen, welche ca. 40 bis 60 % der Zellen in der Milz ausmachen, mit Nano-Photothermolyse eliminiert. Zur anschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurden die B-Zellen mit einem CD19 Antikörper, die zu untersuchenden T-Zellen mit einem CD8 Antikörper markiert. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte über die Identifizierung der toten Zellen mit Hoechst 33258.

Ein repräsentatives Ergebnis der Elimination der B220+ Zellen aus einer Milzzellen-Suspension mittels Nano-Photothermolyse ist in Abbildung 3.11 dargestellt. In Abbildung 3.11 a) ist die Auswertungs-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse gezeigt. Aus den Lymphozyten wurden die Ziel-Zellen, CD19 positive Zellen in Region 1 und die Nicht-Ziel-Zellen, CD8 positive T-Zellen in Region 2, betrachtet.

In Abbildung 3.11 b) sind die Ergebnisse des Versuchs als Histogramme dargestellt, welche die Färbung mit Hoechst 33258 zeigen. Im Vergleich zu den unbehandelten

Zellen (Kontrolle) hatte die Bestrahlung mit dem Laser alleine keinen detektierbaren Einfluss auf die Vitalität, weder auf die Zielzellen in Region 1, noch auf die Nicht-Ziel-Zellen in Region 2. Einen Einfluss der Inkubation mit den B220+Immunogold Partikel alleine auf die Vitalität aller Zellen konnte auch nicht ermittelt werden.

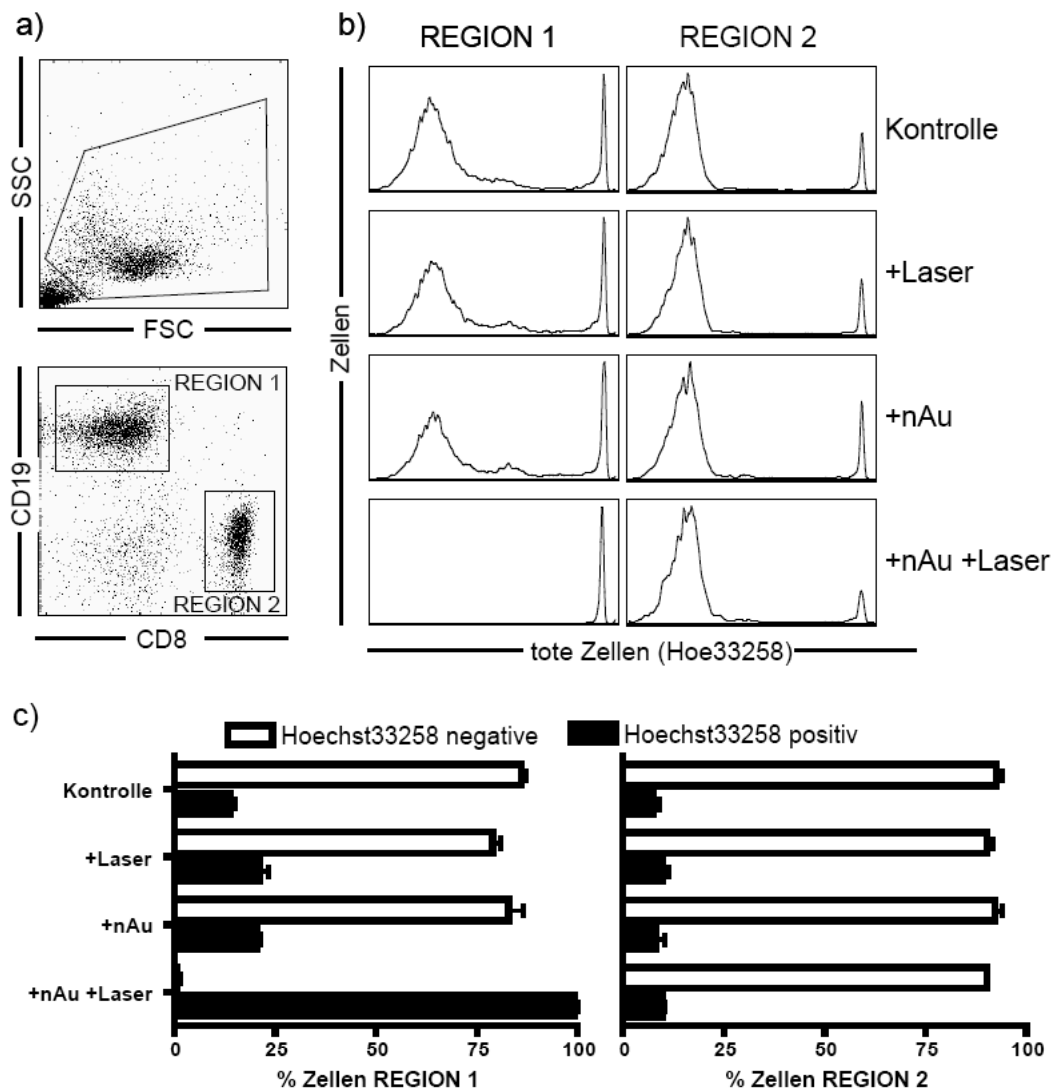


Abb. 3.11 Elimination von B-Zellen aus murinen Milzzellen. Die murinen Milzzellen wurden in den vier Ansätzen wie in der Abbildung angegeben unterschiedlich behandelt: «Kontrolle» unbehandelt; «+nAu» nur mit B220+Immunogold inkubiert; «+Laser» nur mit dem Laser bestrahlt; «nAu+Laser» Zellen wurden mit B220+Immunogold mittels Laserbestrahlung eliminiert. a) Die B-Zellen wurden zur Differenzierung von den Nicht-Ziel-Zellen mit α CD19 Antikörper markiert. b) Die toten Zellen wurden mit Hoechst 33258 gefärbt. c) Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuche.

Die Kombination beider Behandlungen, also die Elimination der B-Zellen mittels Nano-Photothermolyse war bezüglich der Zellelimination sehr effektiv, da in dieser

Gruppe über 99% Zielzellen in Region 1 nach der Nano-Photothermolyse Behandlung Hoechst 33258 positiv waren. Eine Veränderung des Hoechst 33258 Histogramms der CD8⁺ T-Zellen in Region 2, trotz der erfolgreichen Elimination der B-Zellen im gleichen Ansatz war dagegen nicht festzustellen. Somit hatte die Elimination der B-Zellen in dieser Milzzellsuspension keinen nachweisbaren Einfluss auf die Vitalität der Nicht-Ziel-Zellen und war folglich im hohen Maße selektiv.

3.3.2 Die Aufreinigung primärer Zellen durch Nano-Photothermolyse zeigt keine Beeinflussung deren immunologischen Integrität

Nach der effektiven und selektiven Elimination von B220⁺ B-Zellen aus einer Milzzellsuspension von OT-I/B6 Mäusen *in vitro* mittels Nano-Photothermolyse konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung keinen Einfluss auf die Vitalität der CD8⁺ Zellen hatte (Kap. 3.3.1). Im Weiteren sollte nun der Einfluss der Elimination der B-Zellen mittels Nano-Photothermolyse auf die immunologische Funktionsfähigkeit der CD8⁺ Zellen untersucht werden. Dafür wurden zu den verschiedenen Ansätzen das Modellantigen Ovalbumin (OVA) gegeben. Anschließend wurden die Zellen für drei Tage im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte die Untersuchung der Zellen auf T-Zell-Aktivierung und Antigen spezifischen Immunantwort.

Damit die OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen das OVA Peptid SIINFEKL erkennen können, muss das Ovalbumin von Antigen präsentierenden Zellen kreuzpräsentiert werden. Zur Kreuzpräsentation gehören die Aufnahme und das anschließende Prozessieren des Antigens, das Beladen der MHC Klasse I Moleküle mit den aus dem Antigen stammenden Peptiden und das Präsentieren der Peptid beladenen MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche. CD8⁺ T-Zellen erkennen ihr spezifisches Peptid auf den MHC-Molekülen und binden mit dem spezifischen T-Zellrezeptor. Erhalten die T-Zellen von der Antigen präsentierenden Zelle ein zweites Signal über ein kostimulatorisches Protein, wie z.B. B7.1 oder B7.2, dann wird die T-Zelle aktiviert. Die aktivierten CD8⁺ T-Zellen produzieren und sezernieren das Zytokin IL-2, werden dadurch selbst zur Proliferation angeregt und produzieren Interferon- γ

(IFN γ) und setzen dieses frei. Diese Zeichen der Aktivierung lassen sich *in vitro* nachweisen.

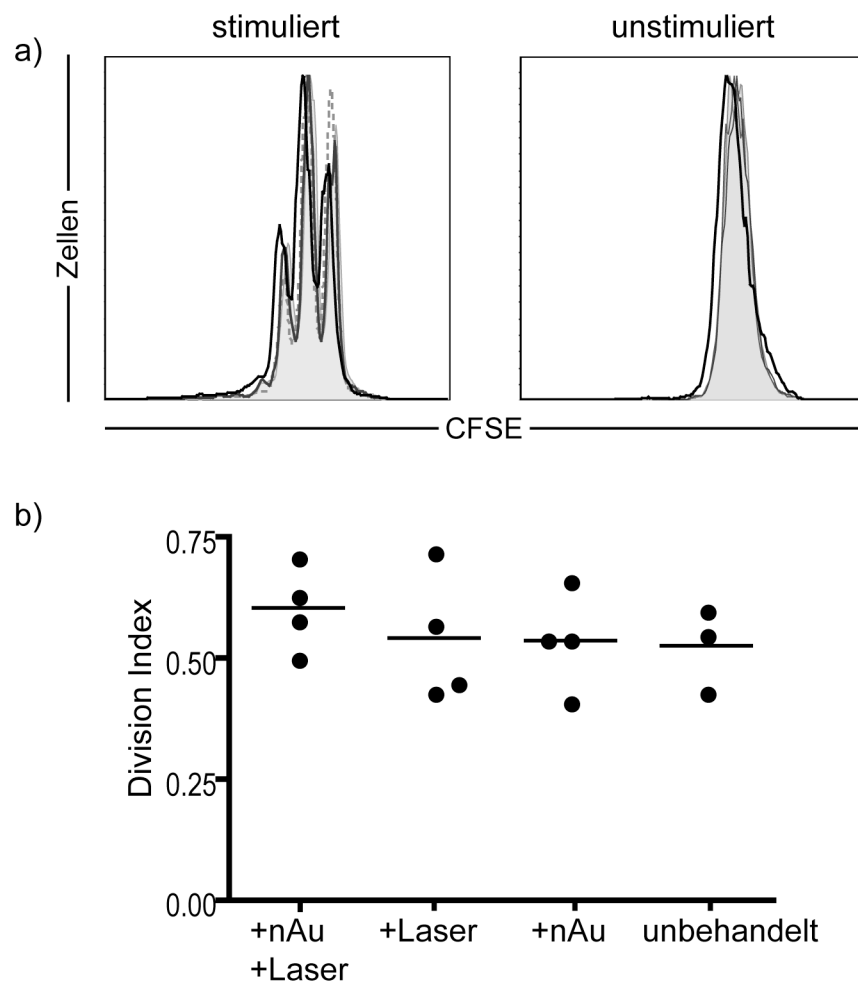


Abb. 3.12 CFSE Profile von stimulierten und unstimulierten murinen CD8+ T-Zellen nach Elimination der B-Zellen aus Milzzellen. Nach der Elimination der B-Zellen aus OTI-I/B6 Milzzellen wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und das Modellantigen Ovalbumin zugegeben. Drei Tage nach der Stimulation wurde das CFSE Profil der CD8+ T-Zellen mit der Durchflusszytometrie gemessen (grau/gefüllt= unbehandelt; schwarz= +nAu+Laser; dunkel grau= +Laser; mittel grau= +nAu) und der Division Index der CD8+ T-Zellen bestimmt.

Um die Proliferation der T-Zellen zu analysieren, wurden die Milzzellen nach der Nano-Photothermolyse-Behandlung und vor der Zugabe von OVA und der Kultivierung für drei Tage mit CFSE gefärbt. In Abbildung 3.12 a) sind typisches CFSE Profile für Ovalbumin stimulierte und unstimulierte CD8+ T-Zellen nach drei Tagen gezeigt. Die Aktivierung von CFSE markierten T-Zellen infolge Antigen Stimulation führt zur Expansion dieser Zellen, die sich in der wiederholten Zellteilung äußert, bei welcher die umgesetzte Menge CFSE auf die Tochterzellen

gleichmäßig verteilt wird. Diese Zellteilungen sind daher mit Hilfe des Farbstoffes nachvollziehbar (Abb. 3.12 a links). Im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen verharren die T-Zellen, die keine Aktivierung durch Antigenpräsentation erfahren haben, in ihrem Zustand und ihre ursprüngliche CFSE Konzentration bleibt nahezu konstant (Abb. 3.12 a rechts).

In diesem Versuch wurde nicht nur der Einfluss der Elimination von B-Zellen aus murinen Milzzellen mittels Nano-Photothermolyse auf die immunologische Integrität der T-Zellen untersucht. Neben den unbehandelten Kontrollzellen (unbehandelt) wurden auch Proben untersucht, welche nur mit Laser bestrahlt wurden (+Laser), oder Proben, welche ausschließlich mit dem eingesetzten Immunogold Partikeln inkubiert wurden (+nAu) (Abb. 3.12).

Die unstimulierten T-Zellen zeigten kein Teilungsmuster und haben folglich nicht proliferiert (Abb. 3.12 a rechts). Die mit Antigen stimulierten CD8⁺ T-Zellen in den verschiedenen Ansätzen zeigten nahezu identische CFSE Proliferationsmuster (Abb. 3.12 a links). Die Kalkulation des „Division Index“ (Durchschnitt der Teilungsschritte aller in der Ausgangspopulation befindlichen Zellen) mittels Proliferationsanalyse durch die „FlowJo“ Software ergab für alle Ansätze Division Indizes zwischen 0,5 und 0,6 (Abb. 3.12 b). Der statistische Vergleich der Division Indizes ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen in den verschiedenen Ansätzen.

Folglich haben die T-Zellen in der Milzzellsuspension aus dem die B-Zellen zuvor mit der Nano-Photothermolyse eliminiert wurden, im gleichen Maße proliferiert wie in den Kontrollansätzen. Die Laserbestrahlung und die Inkubation mit B220+Immunogold Partikeln hatten folgerichtig auch keinen Einfluss auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen.

Zusätzlich wurden die T-Zellen auf ihre intrazelluläre Expression des mit Zellproliferation assoziierten Proteins Ki-67 (Gerdes et al., 1984) untersucht (Abb. 3.13). In den unstimulierten Ansätzen wurden 3 bis 5 % Ki-67 positive T-Zellen nachgewiesen. In den stimulierten Ansätzen waren dagegen 15 bis 20 % T-Zellen Ki-67 positiv, die Analyse der Ergebnisse ergab keine signifikanten Unterschiede innerhalb der mit OVA stimulierten bzw. innerhalb der unstimulierten Gruppen.

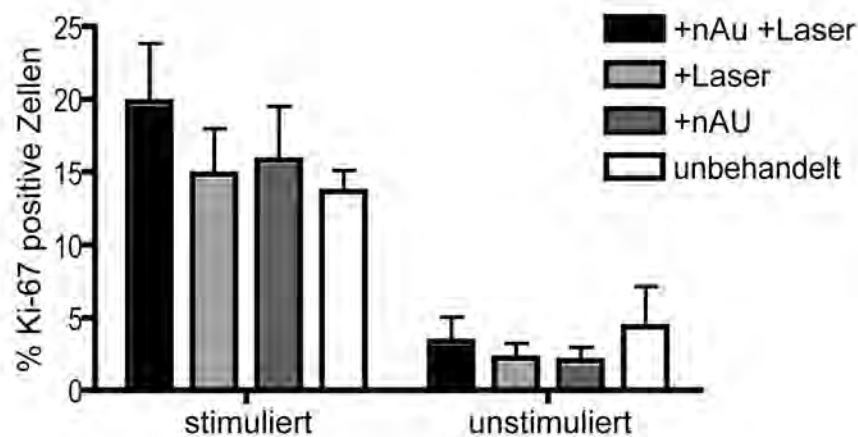


Abb. 3.13 Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 von stimulierten und unstimulierten murinen CD8+ T-Zellen nach Elimination der B-Zellen aus Milzzellen. Nach der Elimination der B-Zellen aus OTI-I/B6 Milzzellen wurden die Zellen drei Tage mit dem Modellantigen Ovalbumin stimuliert. Anschließend wurden die Proben mit Antikörpern gegen CD8+ T-Zellen und gegen das Protein Ki-67 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Elimination der B-Zellen aus einer Milzzellsuspension mittels Nano-Photothermolyse keinen Einfluss auf die Proliferation der aufgereinigten und mit Antigen stimulierten CD8+ T-Zellen hatte.

Um zusätzlich zur Proliferation weitere Parameter der T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurden die Überstände der angesetzten Milzzell-Kulturen von OVA stimulierten Zellen auf die Konzentration der Zytokine IL-2 und IFN γ am dritten Tag hin untersucht (Abb. 3.14). In den Überständen der unstimulierten Ansätze konnten weder IL-2 noch IFN γ nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in den verschiedenen stimulierten Ansätzen IL-2 detektiert. Dabei wiesen die einzelnen Gruppen nur geringfügige Unterschiede in der Menge auf (460-560 pg/ml). Ähnliche Befunde wurden für IFN γ erhoben, wobei mit 2200-3200 pg/ml deutlich mehr IFN γ detektiert wurde.

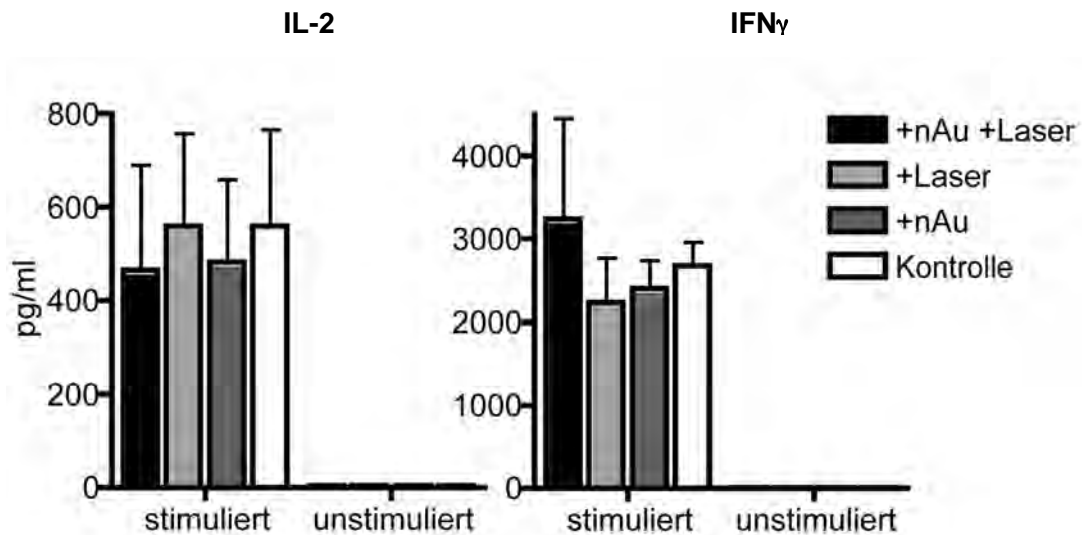


Abb. 3.14 Zytokinproduktion von stimulierten und unstimulierten murinen Zellen nach Elimination der B-Zellen aus Milzzellen. Nach der Elimination der B-Zellen aus OTI-I/B6 Milzzellen wurden die Zellen drei Tage mit dem Modellantigen Ovalbumin stimuliert. Anschließend wurde der Gehalt von den Zytokinen IL-2 und Interferon- γ (IFN γ) in den Überständen der Proben mittels CBA (cytometric bead array) bestimmt.

Aus den gezeigten Daten kann gefolgert werden, dass die Elimination der B-Zellen aus der Milzzellsuspension mittels Nano-Photothermolyse *in vitro* weder die immunologischen Funktionsfähigkeiten der Antigen präsentierenden Zellen noch der CD8⁺ T-Zellen negativ beeinflusste.

3.4 Effektive und nebenswirkungsfreie Elimination von Tumorzellen aus Knochenmark mittels Nano-Photothermolyse für die Stammzelltransplantation

Um das Potenzial der Methode der Nano-Photothermolyse als eine effektive und nebeneffektfreie Methode für eine mögliche klinische Anwendung zu demonstrieren, wurde die Aufreinigung von Tumorzellen enthaltenden Stammzellen für die anschließende Transplantation nach Chemotherapie bzw. Strahlentherapie im Mausmodell nachgestellt.

Das Ziel dieser Experimente bestand darin, nachzuweisen, ob die selektive Elimination von Tumorzellen, die das Knochenmark eines Spenders verunreinigen mittels Nano-Photothermolyse erfolgreich sein kann. Dieses soll das Risiko minimieren, dass vitale Tumorzellen aus dem transplantierten Knochenmark expandieren und den Empfänger des Knochenmarkes besiedeln. Zudem soll gezeigt

werden, dass die Aufreinigung des Knochenmarkes mit der Methode der Nano-Photothermolyse keinen negativen Einfluss auf das Anwachsen des transplantierten Knochenmarkes, auf die Rekonstitution der Blutzellen und auf die Rekonstitution des Immunsystems, also die Fähigkeit für komplexe Immunreaktionen, hat.

3.4.1 Der Einfluss der Aufreinigung mittels Nano-Photothermolyse auf die Rekonstitution von Blutzellen nach Stammzelltransplantation

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Elimination von Tumorzellen aus Knochenmarkzellen *in vitro* mit Nano-Photothermolyse vor der Transplantation in tumorfreie und Knochenmark depletierte Mäuse einen Einfluss auf die anschließende Rekonstitution der Blutzellen hat.

Hierfür wurden Empfängermäuse mit einer myeloablativer Dosis Gamma-Strahlung bestrahlt und einen Tag später *i.v.* durch die Gabe von frisch präparierten Knochenmarkzellen von syngenem Spendermäusen rekonstituiert. Um zu gewährleisten, dass die Gamma Bestrahlung der Empfängermäuse wirkungsvoll letal war und die Rekonstitution allein von dem transplantierten Knochenmark herrührte, wurden als Empfänger- und Spendermäuse zwei unterschiedliche Mauslinien gewählt, deren Zellen sich durch die exklusive Expression der Spenderzellen eines bestimmten Oberflächenantigens eindeutig unterscheiden lassen. Zudem waren die beiden verwendeten Mauslinien syngen, beide H-2k^b bzw. H-2k^{b+d}, um eine mögliche Abstoßungsreaktion zu vermeiden.

Als Empfängermäuse wurden C57BL/6 Mäuse gewählt, deren Zellen wie in Abbildung 3.15 gezeigt, den Zelloberflächenmarker CD45.1 nicht exprimieren und folglich CD45.1 negativ sind. Als Spendermäuse wurden CD45.1+ Mäuse eingesetzt, deren Zellen für den Zelloberflächenmarker CD45.1 positiv sind. Die durchflusszytometrische Analyse 40 Tage nach der Transplantation der CD45.1+ Knochenmarkszellen ergab, dass die Blutzellen der transplantierten Mäuse, sowie die Zellen der Spendermäuse CD45.1 positiv waren. Folglich stammen die nun gefundenen Blutzellen von den CD45.1+ Spenderknochenmarkszellen ab, welche das letal bestrahlte Knochenmark der Empfängermäuse neu besiedeln und somit ersetzt haben und nun die Aufgabe der Bildung neuer Zellen erfolgreich übernommen haben.

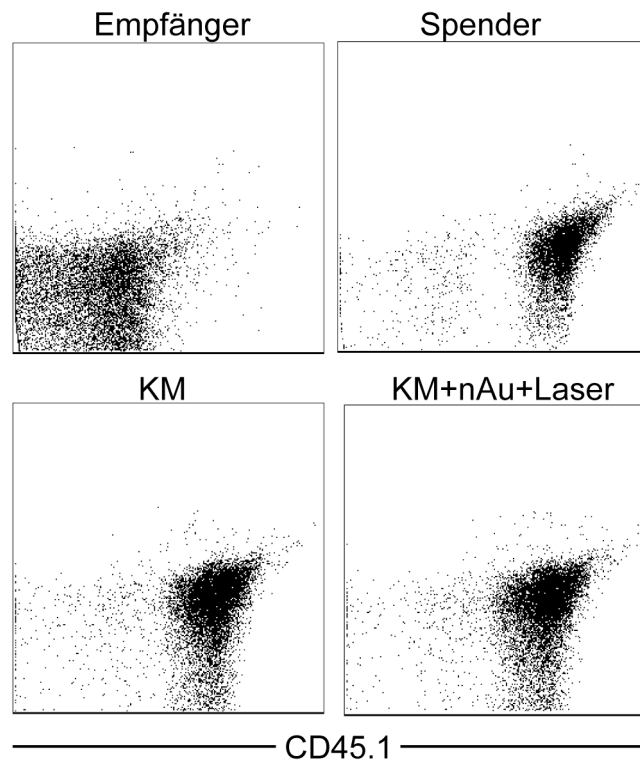


Abb. 3.15 Analyse der weißen Blutzellen von Spender-, Empfänger- und durch Knochenmarktransplantation rekonstituierter Mäuse. Durchflusszytometrische Dot Plot Analyse des Zellenoberflächenmarkers CD45.1 auf weißen Blutzellen von einer C57BL/6 Empfänger Maus (Empfänger), von einer CD45.1+ Spender Maus (Spender), einer Knochenmark transplantierten Maus (KM) und einer transplantierten Maus mit aufgereinigtem Knochenmark (KM+nAu+Laser) 40 Tage nach Transplantation und vorhergehender letalen Gamma Bestrahlung.

Um den Einfluss der Nano-Photothermolyse auf die Rekonstitution der Blutzellen nach der Transplantation zu untersuchen wurden drei Gruppen von Mäusen mit unterschiedlich behandelten bzw. unbehandelten Knochenmark von Spendermäusen nach myeloablativer Gamma Bestrahlung rekonstituiert. Eine Gruppe wurde mit 5×10^6 unbehandelten Knochenmarkzellen rekonstituiert, im Weiteren als KM bezeichnet. Die zweite Gruppe wurde mit 5×10^6 Knochenmarkzellen, vermengt mit 1×10^6 Tumorzellen rekonstituiert, als KM+Tumor bezeichnet. Als Tumorzellen wurden hier Zellen der murinen CD4+ T-Zelllinie BO17.10 verwendet, welche H-2k^b und somit zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen syngen zu den verwendeten Mauslinien ist. Die dritte Gruppe, als KM+nAu+Laser bezeichnet, erhielt mit Nano-Photothermolyse aufgereinigtes Knochenmarkzellen. Wie in der zweiten Gruppe wurden 5×10^6 Knochenmarkzellen mit 1×10^6 CD4+ Tumorzellen versetzt, zudem aber anschließend mittels Nano-Photothermolyse unter der

Verwendung von 2×10^{10} CD4+ Immunogold (2×10^4 Nanopartikel pro Tumorzelle) aufgereinigt.

Nach der Elimination der CD4+ Zellen im Knochenmark-Tumor-Gemisch wurde konsequenterweise kein Waschschriff unternommen und folglich die eingesetzten Immunogold Partikel, die eliminierten CD4+ Zellen und die nicht eliminierten Knochenmarkzellen zusammen in die Empfängermaus transplantiert. Somit konnte gleichzeitig untersucht werden, ob die Gabe von 2×10^{10} CD4+ Immunogold während der Transplantation einen Einfluss auf die Rekonstitution der Blutzellen hatte.

Zum Nachweis der erfolgreichen Rekonstitution, der mit Knochenmark transplantierten Mäuse, wurde diesen nach 40 Tagen Blut aus der Schwanzvene entnommen und ein Blutbild erstellt. Dafür wurden die Blutproben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD16+ Zellen, CD19+ Zellen, CD3+ Zellen, CD4+ Zellen und CD8+ Zellen gefärbt und mit der Durchflussszytometrie analysiert (Abb. 3.16).

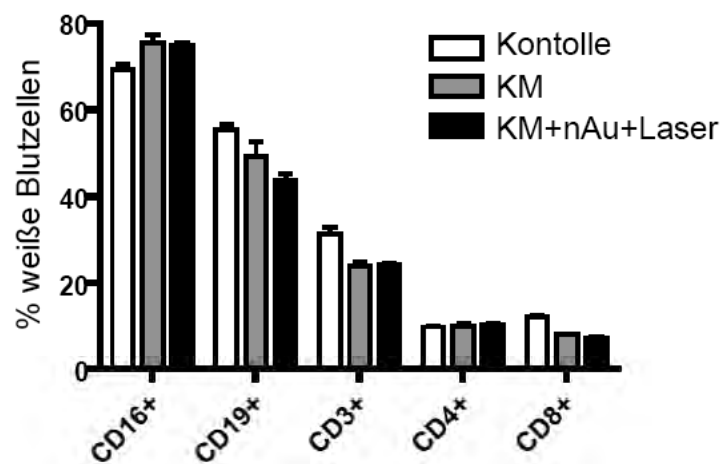


Abb. 3.16 Rekonstitution weißer Blutzellen nach Stammzelltransplantation. 40 Tage nach der Rekonstitution mit Spenderknochenmark (KM), mit Tumorzellen enthaltenden Spenderknochenmark (KM+Tumor) und mit Nano-Photothermolyse aufgereinigten Spenderknochenmark (KM+nAu+Laser) wurden ausgewählte Zellpopulationen der weißen Blutzellen in Prozent von der gesamten Population aller weißen Blutzellen mittels Durchflussszytometrie analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte C57BL/6 Mäuse (Kontrolle).

Die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Zellpopulationen sind als prozentualer Anteil an den gesamten weißen Blutzellen in Abbildung 3.16 aufgetragen. Als Kontrolle wurde Blut von unbehandelten C57BL/6 Mäusen (Kontrolle) analysiert, um einen Vergleich mit einem normalen Blutbild von Mäusen zu ermöglichen.

Es konnten keine signifikanten Abweichungen in den prozentualen Anteilen der untersuchten Zellpopulation im Blut zwischen den verglichenen behandelten Mausgruppen festgestellt werden. Die gefundenen Abweichungen zum Blutbild der Kontrollmäuse sind ebenfalls nicht signifikant. Somit kann die Rekonstruktion der Blutzellen nach myeloablativer Gamma Bestrahlung und anschließender Transplantation von Knochenmarkzellen in allen Gruppen als erfolgreich bezeichnet werden. Dieses beinhaltet auch, dass die Elimination der Tumorzellen aus dem Knochenmark vor der Transplantation mit Nano-Photothermolyse und die gleichzeitige Injektion der verwendeten 2×10^{10} Nanogoldpartikel keinen negativen Einfluss auf die Rekonstitution der Blutzellen bzw. des Blutbildes hatte.

3.4.2 Der Einfluss der Nano-Photothermolyse auf die immunologische Integrität nach Stammzelltransplantation

Ziel der abschließenden Untersuchungen war es, auszuschließen, dass die Aufreinigung von Knochenmark mittels Nano-Photothermolyse für die anschließende Transplantation einen Einfluss auf die spätere immunologische Integrität der behandelten Mäuse nach Knochenmark und Blut-Repopulation hatte. Es sollte gezeigt werden, dass die behandelten Mäuse nach einer Immunisierung, im gleichen Maße, verglichen mit unbehandelten Mäusen, zu einer Antigen spezifischen zytotoxischen T-Zellantwort fähig waren.

Um dieses zu untersuchen, wurden die überlebenden Mäuse, aus dem in Abbildung 3.16 und 3.18 gezeigten Versuch immunisiert und die T-Zellantwort mit Hilfe eines *in vivo* Zytotoxizitätstest analysiert. Bei diesem Test wird untersucht, ob die sich auf Grund einer Immunisierung gebildeten antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen in unverändertem Maße in der Lage sind, ihre immunologische Aufgabe zu erfüllen, indem sie Zellen lysieren, welche das spezifische Antigen exprimieren.

Die Mäuse wurden mit einem rekombinanten Adenoviruskonstrukt, welches das Modellantigen Ovalbumin exprimiert (AdOVA) intravenös infiziert. Sechs Tage nach der Infektion wurde der *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurden syngene Mausmilzzellen als so genannte Target-Zellen mit dem OVA Klasse 1 Peptid SIINFEKEL beladen und einer hohen Konzentration von CFDaSE gefärbt. Als Kontrolle wurden gleiche Milzzellen ohne Antigen mit einer geringen Konzentration von CFDaSE gefärbt. Diese beiden Zelltypen wurden anschließend 1:1 gemischt und *i.v.* in die immunisierten Mäuse gegeben. Nach 4 Stunden wurden Milzzellen aus den Mäusen dissoziiert und durchflusszytometrisch analysiert. Aus dem Verhältnis der Lyse von Antigen beladenen Target-Zellen zu den Kontrollzellen, lässt sich die antigenspezifische *in vivo* Toxizität berechnen (Abb. 3.17).

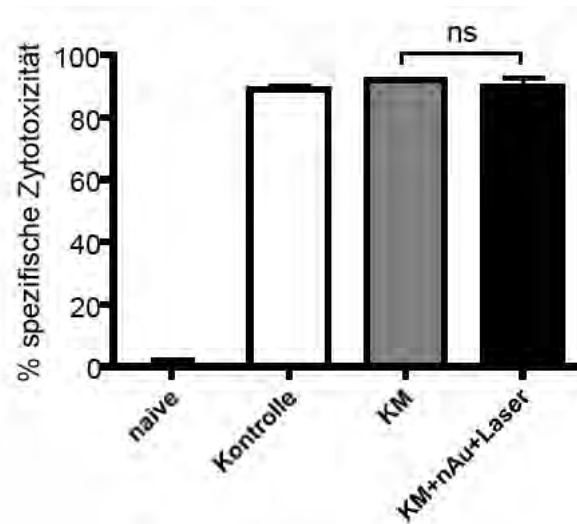


Abb. 3.17 Antigen spezifische *in vivo* Zytotoxizität. Überlebende Mäuse (Kap. 3.4.1 & 3.4.3) wurden am Tag 90 nach Knochenmarktransplantation mit OVA exprimierenden Adenovirus infiziert. Sechs Tage später wurden CFSE^{hoch} gefärbte und OVA Peptid beladene Target-Zellen und CFSE^{niedrig} gefärbte unbeladene Kontrollzellen *i.v.* im Verhältnis 1:1 gespritzt. Die SIINFEKL Peptid spezifische Zytotoxizität wurde nach 4 Stunden durchflusszytometrisch quantifiziert durch das Verhältnis von Antigen spezifischer und Antigen unspezifischer Zelllyse *in vivo* in der Milz. Spezifische Zytotoxizität [%] = $100 - ((CFSE^{hoch} / CFSE^{niedrig})_{\text{der immunisierten Tiere}} / (CFSE^{hoch} / CFSE^{niedrig})_{\text{von naiven Tieren}})$.

Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse der gleichen Mauslinie und des gleichen Alters. Die als naive bezeichneten Mäuse wurden nicht mit AdOVA immunisiert, folglich war keine spezifische Zytotoxizität bei diesen Mäusen nachzuweisen. In allen immunisierten Mausgruppen zeigte sich hingegen eine hohe spezifische

Zytotoxizität zwischen 88 % und 96 % (Abb. 3.17). Die Unterschiede zwischen den einzelnen immunisierten Mausgruppen waren nicht signifikant.

Das Ergebnis dieses spezifischen *in vivo* Zytotoxizitätstest zeigt, dass die immunologische Integrität, weder durch die Gamma Bestrahlung und anschließender Knochenmarktransplantation, noch durch die Aufreinigung des Knochenmarks durch die Nano-Photothermolyse, beeinträchtigt worden ist.

3.4.3 Erfolgreiche Elimination von Tumorzellen aus Knochenmarkzellen

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit bestand darin, zu zeigen, dass die Elimination von Tumorzellen aus zu transplantierenden Knochenmark mit der Nano-Photothermolyse-Methode in dem Maße effektiv sein kann, um ein Anwachsen von Tumorzellen in den Empfängermäusen zu verhindern. Um dieses zu untersuchen, wurden die Mäuse über 90 Tage nach der Transplantation unter ständiger Beobachtung gehalten. Die Überlebensraten wurden protokolliert und sind in der Abbildung 3.18 als Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt.

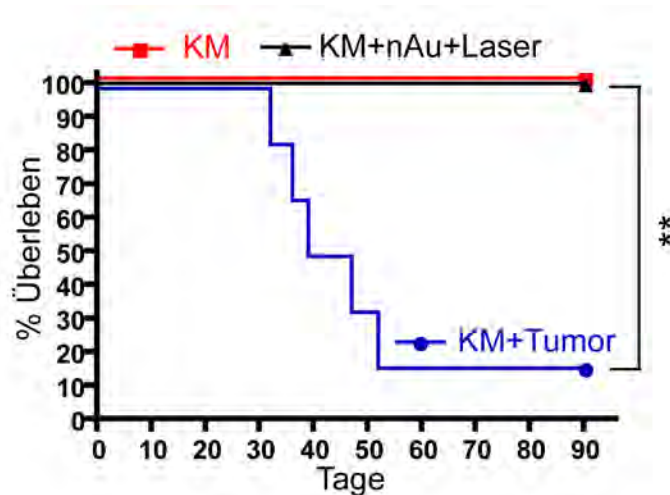


Abb. 3.18 Überlebenskurven von Mäusen transplantiert mit Knochenmark mit CD4+ Tumorzellen BO17.10 bzw. aufgereinigt mittels Nano-Photothermolyse. Überlebenskurven von Gamma bestrahlten und nachträglich mit Spender-Knochenmark (KM; n=3), mit CD4+ BO17.10 Tumorzellen versetzten Spender-Knochenmark (KM+Tumor; n=6) und mit Nano-Photothermolyse aufgereinigten BO17.10 Tumorzellen enthaltenden Spender-Knochenmark (KM+nAu+Laser; n=5) transplantierten Mäuse bis Tag 90 nach der Transplantation ($p^{**} = 0,0029$).

Sämtliche Mäuse, welche als tot protokolliert wurden, zeigten Lähmungserscheinungen an beiden Hinterpfoten und wurden konsequenterweise getötet. Zur Überprüfung, ob proliferierende Tumorzellen die Lähmungserscheinungen der Tiere hervorgerufen hatten, wurden Zellen aus dem Knochenmark, der Milz und aus dem Blut der Tiere in Medium ausgesät und über 14 Tage kultiviert. In allen Ansätzen mit ausgesätem Knochenmark der erkrankten Tiere konnten proliferierende CD4⁺ Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieses ließ den Schluss zu, dass das Wachstum der transplantierten Tumorzellen für die Erkrankung der Empfängertiere maßgeblich war.

Von den sechs Mäusen, welche Knochenmark mit lebenden Tumorzellen transplantiert bekommen hatten (KM+Tumor), starben fünf in den ersten 52 Tagen aufgrund des Tumorwachstums (Abb. 3.18). Bei der sechsten Maus konnte im Untersuchungszeitraum kein Zeichen von Lähmung erkannt werden und die Analyse des Knochenmarks nach Beendigung des Versuchs zeigte, dass diese Maus tumorfrei geblieben war.

Die drei Mäuse, welche unbehandeltes Knochenmark transplantiert bekommen hatten (KM), zeigten erwartungsgemäß kein Anzeichen von Tumorwachstum. Auch die Mäuse, welche das mittels Nano-Photothermolyse aufgereinigtes Knochenmark transplantiert bekamen (KM+nAu+Laser), überlebten die Untersuchungszeit und zeigten keine Anzeichen von Lähmungen oder andere äußerliche Anzeichen von Veränderungen. Nach Beendigung des Versuches konnten zudem in ihrem Knochenmark keine Tumorzellen nachgewiesen werden, sodass sie als tumorfrei bezeichnet werden können. Somit hat die Aufreinigung des Knochenmarkes durch die Elimination von Tumorzellen mittels Nano-Photothermolyse zu einem 100 % Überleben der Tiere geführt. Statistisch sind die Unterschiede der Überlebenskurven zwischen den Mäusen transplantiert mit Tumor versetztem Knochenmark und aufgereinigtem Knochenmark sehr signifikant ($p=0,0029$).

In einem abgewandelten System wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. B6D2F1 Empfänger Mäuse wurden nach einer myeloablativer Ganzkörper Gamma Bestrahlung mit Knochenmark von syngenen Spendern rekonstituiert, welches mit Tumorzellen der B-Zell-Lymphom Linie LB27.4 gemischt war (Abb. 3.19). Wie im vorigen Versuch wurden in einer Gruppe die Tumorzellen aus dem Knochenmark

vor der Transplantation mittels Nano-Photothermolyse eliminiert. Als Kontrolle wurden Empfängeräuse mit tumorfreiem Knochenmark rekonstituiert.

Es zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Überlebenskurven wie bei dem Versuch mit T-Zell-Tumorzellen (Abb. 3.18). Während der ersten 58 Tage mussten vier der sechs Tiere, welche mit lebenden Tumorzellen versetztes Knochenmark transplantiert bekamen, aufgrund von Lähmungserscheinungen getötet werden (Abb. 3.19). In ihnen wurden proliferierende Tumorzellen im Knochenmark und in der Milz gefunden.

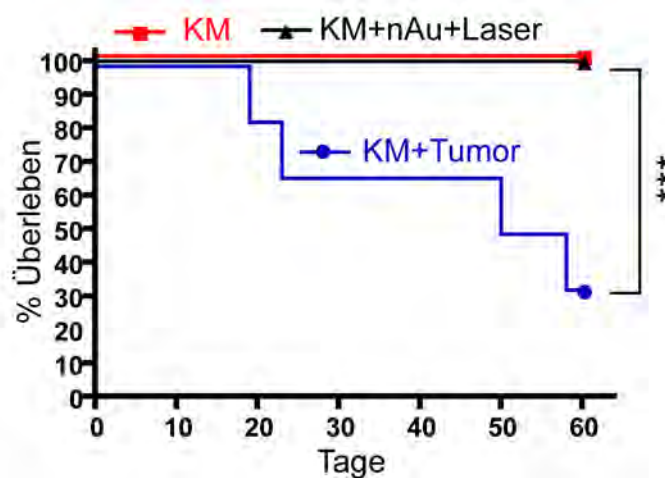


Abb. 3.19 Überlebenskurven von Mäusen transplantiert mit Knochenmark mit B-Zellen Lymphom Tumorzellen LB27.4 bzw. aufgereinigt mittels Nano-Photothermolyse. Überlebenskurven von Gamma bestrahlten und nachträglich mit Spender Knochenmark (KM; n=9), mit CD4+ Tumorzellen beigemischten Spender Knochenmark (KM+Tumor; n=6) und mit Nano-Photothermolyse aufgereinigten Spender Knochenmark (KM+nAu+Laser; n=9) transplantierten Mäusen bis Tag 90 nach der Transplantation ($p^{***}=0,0003$).

Die Aufreinigung des Knochenmarkes durch Nano-Photothermolyse war auch in diesem Versuch erfolgreich, da alle neun Mäuse, welche aufgereinigtes Knochenmark transplantiert bekamen, über den Versuchszeitraum überlebten. Der statistische Unterschied der Überlebenskurven zwischen den Mäusen in der Tumorgruppe und den Mäusen der anderen beiden Gruppen ist hoch signifikant ($p=0,0003$).

Zur Kontrolle, ob die Überlebenden Mäuse tumorfrei geblieben waren, wurden nach Beendigung des Versuchs Knochenmark- und Milzzellen aller Mäuse dissoziiert und in Medium ausgesät. Nach 14 Tagen konnten in keinem Ansatz proliferierende

Tumorzellen nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die am Ende des Versuchs lebenden Mäuse tumorfrei waren.

Beide Versuche zeigten, dass Mäuse, welche mittels Nano-Photothermolyse aufgereinigtes Knochenmark transplantiert bekamen, nicht von Tumorzellen besiedelt wurden. Die Methode der Nano-Photothermolyse war demzufolge in der Aufreinigung von Tumor enthaltenden Knochenmark sehr effektiv und konnte die behandelten Tiere zu 100 % vor einer Tumordinvasion schützen.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, zur Einschätzung des Potenzials einer Methode für mögliche klinische Anwendungen beizutragen, welche auf dem Prinzip der Nanopartikel vermittelten selektiven Photothermolyse beruht (Anderson & Parrish, 1983; Pitsillides et al., 2003). Hierfür wurde zunächst am IMMEI am Uniklinikum Bonn eine Plattform zur Bestrahlung von Zellen verwirklicht (Kap. 2.2.2) und wichtige Parameter für eine selektive und effektive Elimination von Zellen bestimmt (Kap. 3.2). Die in dieser Arbeit untersuchte Methode zur selektiven Photothermolyse weicht zwar in einigen maßgeblichen Punkten von den in den letzten Jahren beschriebenden Methoden ab, welche auf das gleiche Prinzip beruhen, jedoch bleibt die Nano-Photothermolyse die Grundlage aller Untersuchungen.

Die Untersuchungen ergaben, dass mit Hilfe der Nano-Photothermolyse eine hohe Selektivität und Effektivität in der Elimination von adhärent wachsenden Zellen oder Suspensionszellen *in vitro* gegeben ist (Kap. 3.1). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Elimination von Zellen mittels Nano-Photothermolyse keinen negativen Einfluss auf die immunologische Integrität der aufgereinigten Zellen hatte (Kap. 3.2). Die Elimination von Tumorzellen aus Knochenmark zur Transplantation nach myeloablativer Ganzkörper-Gamma-Bestrahlung von Mäusen erwies sich als erfolgreich, da mit dieser Methode alle behandelten Mäuse vor einer Invasion von Tumorzellen bewahrt werden konnten (Kap. 3.3). Hinsichtlich der Repopulation der Blutzellen und der Generierung einer Antigen spezifischen Immunantwort zeigten die behandelten Mäuse keine Nebeneffekte. Zudem wurde in keinem Versuch eine toxische Wirkung durch die eingesetzten Nanogoldpartikel auf Zellen festgestellt.

4.1 Nano-Photothermolyse eine selektive Methode zur Elimination von Zellen *in vitro*

Die Methode der Nano-Photothermolyse beruht, wie in Abbildung 4.1 dargestellt, auf dem Prinzip der Nanopartikel vermittelten und Laser aktivierten selektiven Photothermolyse von Zellen. Dabei werden die zu eliminierenden Zellen zunächst mit stark Licht absorbierenden Partikeln markiert bzw. beladen und anschließend mit gepulstem Laserlicht, welches von den Nanogoldpartikeln absorbiert wird, bestrahlt (Anderson & Parrish, 1983). Dadurch kommt es zu thermisch induzierten, räumlich

eng begrenzten Kavitationsblasen um die Partikeln herum (Hüttmann et al., 2001; Pitsillides et al., 2003), wodurch die Integrität der Zellmembran der beladenen Zellen dauerhaft zerstört werden kann, was zu einem plötzlichen Zelltod durch Nekrose führt (Pitsillides et al., 2003; Yao et al., 2005; Lapotko et al., 2006; Letfullin et al., 2006).

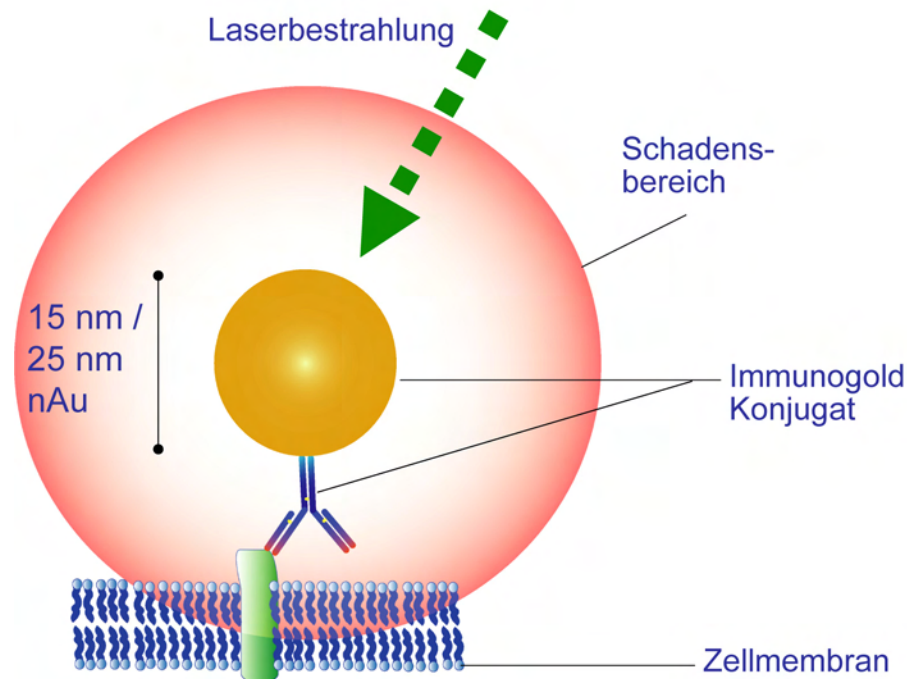


Abb. 4.1 Prinzip der Nano-Photothermolyse. Immunogoldkonjugate, mit Antikörpern konjugierte Nanogoldpartikel, werden mit Zellen inkubiert und binden selektiv an den Zielzellen. Bei der anschließende Bestrahlung mit kurzen Laserpulsen kommt es zu einer Umwandlung von Lichtenergie zu thermischer Energie durch die absorbierenden Partikel. Dadurch bildet sich eine Kavitationsblase um die Partikel, welche die beladenden Zellen mechanisch schädigt, wodurch es zum plötzlichen Zelltod der Zelle kommen kann.

Um eine effektive und selektive Elimination mittels der Nano-Photothermolyse zu gewährleisten, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein:

Die Effektivität der Nano-Photothermolyse wird durch die Eigenschaften der verwendeten Partikel in Kombination zu dem für die Bestrahlung verwendeten Laser bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten sphärischen kolloidalen Nanogoldpartikel mit Größen von 15 nm oder 25 nm weisen eine um Größenordnungen höhere Absorption für Licht mit der Wellenlänge um 530 nm als unpigmentierte Zellen auf (Kap. 1.4). Der eingesetzte Laser mit einer Wellenlänge

von 532 nm mit Nanosekunden Pulslängen ist daher geeignet, ausschließlich die Partikel direkt zu erhitzen, nicht aber das umgebende Medium und die umliegenden Zellen (Yao et al., 2005; Radt, 2002; Lapotko et al., 2006a & b; Letfullin et al., 2006). Jedoch bleibt diese Methode, durch die Verwendung sphärischer kolloidaler Nanogoldpartikel, auf den *in vitro* Einsatz an unpigmentierten Zellen in Abwesenheit von Erythrozyten beschränkt, da diese in dem verwendeten Wellenlängenbereich eine hohe Absorption aufweisen (Boulnois et al., 1986; Weissleder & Ntziachristos, 2003) und dadurch die eingebrachte Lichtenergie des Lasers absorbieren würden.

Die Selektivität der Absorption wird zum einen dadurch gewährleistet, dass die verwendeten Partikel spezifisch an die Zielzellen binden. Dieses konnte verwirklicht werden, indem die Partikel mit zellspezifischen Antikörpern konjugiert wurden (Kap. 2.2.1), welche eine hohe Selektivität für die Zielzellen aufweisen (Kap. 3.1.1). Diese selektive Bindung der Antikörper an die Zielzellen wurde durch das Konjugieren auf die Goldpartikel nicht beeinflusst, sodass die hergestellten Immunogold Konjugate die gleiche Selektivität, wie die eingesetzten Antikörper besaßen (Kap. 3.1.1). Mit dieser Prämisse geht aber auch die Einschränkung einher, dass mittels Nano-Photothermolyse nur Zellen eliminiert werden können, für die ein spezifischer Antikörper verfügbar ist, wobei die Ankopplung von Nanogoldpartikeln an Zellen auch über Peptidsequenzen oder andere Zielfindungsproteine denkbar ist. Die Größe des an die Nanogoldpartikel gekoppelte Proteins kann für die Effektivität der Nano-Photothermolyse eine Rolle spielen, was aber im nächsten Kapitel diskutiert werden soll.

Zum anderen wird die Selektivität der Nano-Photothermolyse dadurch vermittelt, dass die Kombination aus Partikelgröße, Laserpulsdauer und Laserenergie so abgestimmt wird, dass zwar eine effektive Elimination der Zielzellen gewährleistet wird, die räumliche Ausdehnung des Schädigungsbereiches, durch die gebildeten Kavitationsblasen, jedoch so begrenzt bleibt, so dass umliegende Nicht-Ziel-Zellen nicht geschädigt werden (Hüttmann et al., 2001; Vogel & Venugopalan, 2003; Pitsilides et al., 2003; Plech et al., 2005).

Die in dieser Arbeit für die Nano-Photothermolyse gefundenen Parameter (Kap. 3.2.1) sind dazu geeignet, eine hohe Selektivität der Zellelimination (Kap. 3.1.3) ohne detektierbare unerwünschte Nebeneffekte auf die Vitalität der aufgereinigten

Zellen, zu erreichen. Außerdem konnte mittels Nano-Photothermolyse eine hohe Effektivität mit Eliminationsraten von über fünf log-Stufen, also einer Reinheit von über 99,999 % erreicht werden (Kap. 3.1.2). Zur Auflösung dieses hohen Reinheitsgrades der behandelten Zellen musste ein Klonierungsversuch etabliert werden (Kap. 3.1.2), da das Detektionslimit von Durchflusszytometrie und PCR basierten Nachweisstrategien bei vier log-Stufen liegt (Rawstrom et al., 2001; Böttcher et al., 2004). Somit kann mit diesen Methoden im besten Fall eine kontaminierende Zelle unter 10.000 Zellen nachgewiesen werden (Rawstrom et al., 2001; Böttcher et al., 2004; Geens et al., 2007).

Im Gegensatz zu den bis heute publizierten Studien zur selektiven Elimination von Zellen mit Hilfe von Partikel vermittelter Photothermolyse konnte mit der hier vorgestellten Methode der Nano-Photothermolyse eine deutlich höhere Effektivität und Selektivität erreicht werden. Die Untersuchungen der Faktoren, welche für die höhere Effektivität und Selektivität der Methode der Nano-Photothermolyse eine Rolle spielen, sollen im nächsten Kapitel diskutiert werden.

Gegenüber der Verwendung von fokussierter Laserstrahlung zur Beeinflussung bzw. Elimination von Zellen mit der so genannten Lasermikrochirurgie (Ponelies et al., 1994; Schütze et al., 1997; Vogel et al., 2005) hat die Nano-Photothermolyse mehrere Vorteile: Zum einen kann, wie in dieser Arbeit, unter Verwendung von Nanopartikeln und Nanosekunden Laserpulsen der Effekt auf wenige Nanometer gegenüber ca. 500 nm, bzw. der halben Wellenlänge des eingesetzten Lasers, begrenzt werden (Hüttmann et al., 2001; Pitsillides et al., 2003). Zum anderen müssen hier die Zielzellen in einer Mischkultur zur Identifizierung und Ansteuerung mit z.B. Fluoreszenzfarbstoffen nicht sichtbar gemacht werden, sondern die Zielzellen müssen nur mit dem Immunogold selektiv angesteuert werden. Des Weiteren können mit der Nano-Photothermolyse viele Zellen gleichzeitig behandelt werden, wohingegen beim Einsatz eines fokussierten Lasers jede Zelle einzeln angesteuert werden muss. Der in dieser Arbeit verwendete Laser und die gewählten Parameter ermöglichten eine Behandlung von drei Millionen Zellen innerhalb von ca. 40 Sekunden. Für die Aufreinigung größerer Zellzahlen wäre es sinnvoll einen Laser mit höherer Leistung zu verwenden, der entsprechend aufgeweitet werden

kann, sodass mit einem einzelnen Laserpuls viele Millionen Zellen auf einmal aufgereinigt werden könnten. Zudem wäre es denkbar, die Nano-Photothermolyse als Durchlaufverfahren zu etablieren, wobei die Zellen, wie in einem Durchflusszytometer, in einem Mediumstrom an dem Laser vorbei befördert und gleichzeitig bestrahlt werden könnten.

Ein besonderer Vorteil der selektiven Photothermolyse gegenüber vielen anderen Methoden zur Aufreinigung von Zellen konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden. Viele andere Aufreinigungsmethoden wie z.B. die magnetische Zellsortierung mittels MACS-Methode (engl. „*magnetic activated cell sorter*“) oder dem Sortieren von Zellen mittels eines FACS- Gerät (engl. „*fluorescence activated cell sorter*“) können Zellen nur in Einzelzellsuspension aufreinigen. Dem entgegen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mittels der Nano-Photothermolyse neben Zellen in Suspension auch adhärent wachsende Zellen aufgereinigt werden können (Kap. 3.1.4). Diese müssen zur negativen Aufreinigung nicht zuvor in Suspension gebracht werden, sondern können im ahärenten Zustand mit Immunogold inkubiert und bei Verwendung von Kulturgefäßen aus Glas oder anderen nicht Lichtenergie absorbierenden Material, darin bestahlt und anschließend aufgereinigt weiter kultiviert werden. Dieses kann bei einigen primären Zelltypen von Vorteil sein, da diese nach Ablösen von der Kulturschale und der Aufreinigung anschließend nur in verminderter Anzahl wieder anwachsen oder ihre Eigenschaften durch Rauf- oder Runterregulation zellspezifischen Marker verlieren können. Beispiele dafür sind u.a. Endothelzellen, dendritische Zellen oder neuronale Zellen (Metzeau, 1993).

4.2 Einfluss physikalischer Parameter auf die Eliminationseffizienz der Nano-Photothermolyse

Die Nano-Photothermolyse beruht nicht auf chemischen sondern ausschließlich auf physikalischen Wirkungsweisen. Aus diesem Grund wird die Effektivität der Methode überwiegend von physikalischen Parametern bestimmt. Wobei zelltypspezifischen Unterschieden eine geringe Rolle nicht abgesprochen werden kann, sollte bei ausreichender Bindung von Nanogoldpartikeln an den Zellen und

ausreichendem Laserenergieeintrag, jeder Zelltyp mit der Nano-Photothermolyse effizient eliminiert werden können.

In Kapitel 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Partikelgröße, die Anzahl von gebundenen Partikeln an der Zellmembran und die Laserenergie einen Einfluss auf die Effektivität der Nano-Photothermolyse haben. Die Erhaltung einer hohen Eliminationseffizienz konnte auch bei der Verwendung kleinerer Nanogoldpartikel (15 nm statt 25 nm Goldpartikel) durch eine Erhöhung der Partikelanzahl kompensiert werden (Kap. 3.2.1).

Entgegen anderer Untersuchungen zur Nanopartikel vermittelten Photothermolyse (Pitsillides et al., 2003; Lapotko et al., 2006a & 2006b; Letfullin et al., 2006) konnte, mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode, eine hohe Eliminationseffizienz mit Nanogoldpartikeln kleiner als 30 nm, d.h. mit 25 nm und 15 nm Partikeln erzielt werden. Zudem wurde diskutiert, dass eine Anbindung der Nanogoldpartikel an die Zellmembran der Zelle für eine effiziente Elimination von Zellen nicht ausreichend ist, sondern eine Aufnahme und Clusterbildung der Partikel erfolgen müsse (Lapotko et al., 2006a & 2006b). Dieses steht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen und soll im Folgenden diskutiert werden.

Die von Lapotko et al. (2006a) vorgestellte „laser-activated nano-thermolysis as cell elimination technology“ (LANTCET) wird als zweistufige Strategie diskutiert. In der ersten Stufe werden die Nanogoldpartikeln bei 4 °C an die Zellmembran gebunden und im zweiten Schritt durch Inkubation bei 37 °C durch Endozytose durch die Zellen aufgenommen, wobei sich Cluster der Partikel in den Endosomen der Zellen bilden (Abb. 4.2).

Es wurde diskutiert, dass die Kavitationsblasen von einzelnen Nanopartikeln eine zu geringe Ausdehnung haben, um eine letale Schädigung der beladenen Zellen hervorrufen zu können (Lapotko et al., 2006a & 2006b; Letfullin et al., 2006). Erst durch die Endozytose und Clusterbildung der eingesetzten 30 nm Nanogoldpartikel können durch die Laserbestrahlung größere Kavitationsblasen von über 500 nm bis 13 µm entstehen, um Eliminationseffizienzen von über 90 % zu erreichen (Lapotko et al., 2006a & 2006b). Entgegen dieser Beobachtungen konnte in dieser Arbeit

gezeigt werden, dass mittels der Nano-Photothermolysen auch mit kleineren Nanogoldpartikeln mit Größen von 15 nm bzw. 25 nm, ohne Internalisierung und Clusterbildung Zellen effektiv eliminiert werden können (Kap. 3.2.1).

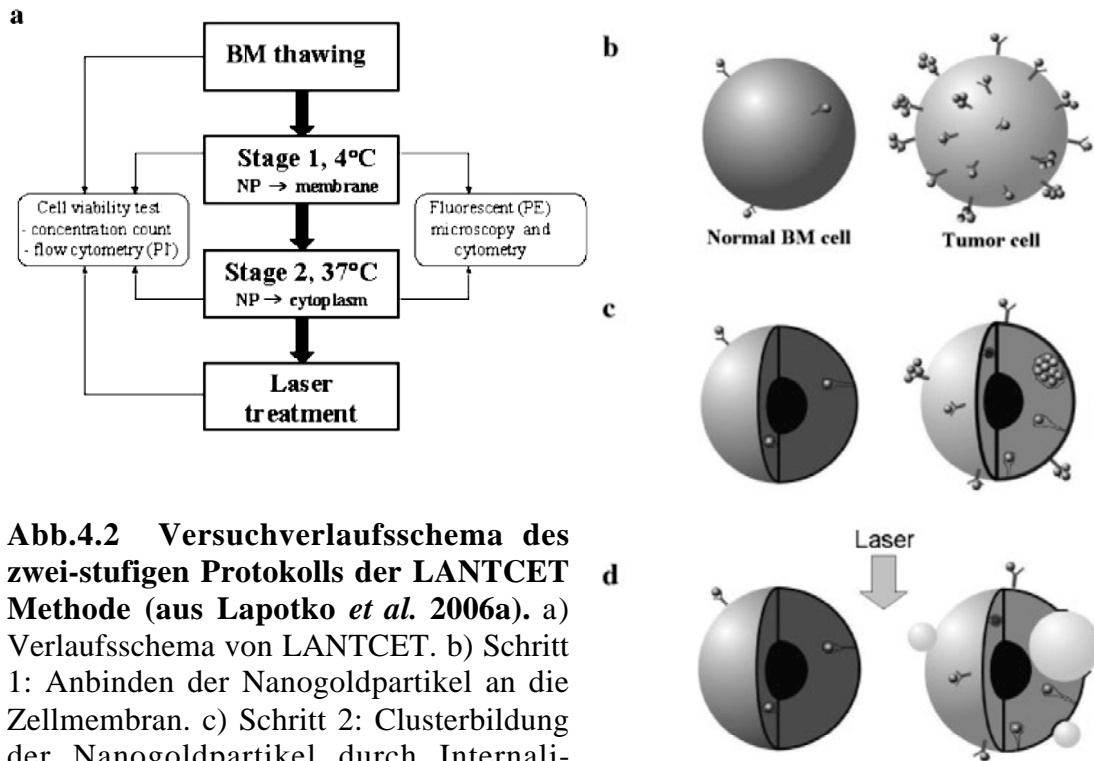


Abb.4.2 Versuchverlaufsschema des zwei-stufigen Protokolls der LANTCET Methode (aus Lapotko *et al.* 2006a). a) Verlaufsschema von LANTCET. b) Schritt 1: Anbinden der Nanogoldpartikel an die Zellmembran. c) Schritt 2: Clusterbildung der Nanogoldpartikel durch Internalisierung. d) Laser vermittelte Schadensbereich und Zell-schädigung.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse legen nahe, dass der Grund für diese verschiedenen Ergebnisse in dem unterschiedlichen Abstand der Nanogoldpartikel zur Zellmembran liegen könnte. LANTCET (Lapotko *et al.*, 2006a & 2006b) und andere Untersuchungen zur Nanopartikel vermittelten Photothermolysen verwendeten Nanogoldpartikel (Pitsillides *et al.*, 2003; Letfullin *et al.*, 2006), die mit einem sekundären Antikörper konjugiert waren. Dieser sekundäre Antikörper war spezifisch für einen primären Antikörper, welcher zuvor mit den Zellen inkubiert wurde. Somit befanden sich zwischen Nanogoldpartikeln und Zellmembran zwei Antikörper. Bei der hier vorgestellten Nano-Photothermolysen Methode würden die Nanogoldpartikel direkt über einen Primären Antikörper an die Zellen gebunden (Kap. 3.1.1), wodurch der Abstand zwischen Partikel und Zellmembran nur einen Antikörper betrug. Die Längsausdehnung eines IgG1 Antikörpers beträgt ca. 15 nm, wobei nicht geklärt werden kann, in welcher Orientierung der einzelne oder der Erst- und Zweitantikörper miteinander binden. Zudem spielt mutmaßlich in diesem Zusammenhang auch die Lage des zu erkennenden Epitops, bzw. die Nähe des

Epitops zur Zellmembran eine Rolle. Festzuhalten bleibt, dass bei der direkten Anbindung von Nanogoldpartikeln an die Zelle über nur einen Antikörper der theoretische Abstand des Partikels zur Zellmembran verringert ist.

In Kapitel 3.2.2 konnte gezeigt werden, dass durch die Verringerung des Abstandes zwischen Partikel und Zelle auch kleinere Nanogoldpartikeln ohne vorherige Clusterbildung der Partikel für eine effektive Elimination geeignet sind. Bei einem Abstand von zwei Antikörpern zwischen Nanogoldpartikeln und Zellmembran mussten sehr viel mehr Partikel je Zelle eingesetzt werden, was aber eine Erhöhung der ungewollten Elimination von Nicht-Ziel-Zellen zur Folge haben kann (Kap. 3.1.1). Zudem zeigte sich, dass eine effiziente Elimination von Zellen auch möglich war, wenn die Endozytose und Clusterbildung der Partikel durch Inkubation der Partikel mit den Zellen bei 4 °C ausgeschlossen wurde (Kap. 3.2.2). Dieses bringt gegenüber LANTCET einige Vorteile mit sich:

Zum einen ist die gesamte Prozedur der in dieser Arbeit gezeigten Nano-Photothermolyse-Behandlung der Zellen kürzer, da die zu behandelten Zellen nur 30 Minuten mit den Nanogoldpartikeln inkubiert werden müssen und anschließend bestrahlt werden können. Bei LANTCET hingegen müssen die Zellen zuerst für 30 Minuten mit dem Primären und anschließend für 30 Minuten bis 120 Minuten mit den Nanogoldpartikeln inkubiert werden (Lapotko et al., 2006a & 2006b).

Zum anderen ist in dem hier angewandten Protokoll (Kap. 2.2.2) nach Zugabe des Immunogoldes kein Waschschrift nötig, wohingegen bei LANTCET nach der Inkubation des Erstantikörpers und nach der Inkubation mit den Nanogoldpartikeln Waschschrift nötig sind. Jeder Waschschrift bedeutet eine weitere Verlängerung der Behandlungszeit, zudem können Zellen verloren gehen und fragile primäre Zellen durch die Zentrifugation geschädigt werden.

Des Weiteren müssen bei LANTCET die Zellen zuerst bei 4 °C und anschließend bei 37 °C inkubiert werden. Dieser Temperaturwechsel kann ebenfalls zu Stress und Schädigung der Zellen, welche aufgereinigt werden sollen, führen. Bei der hier angewendeten Methode hingegen spielt die Temperatur der Inkubation keine Rolle und kann an die Bedürfnisse der Zellen angepasst werden.

Zusammenfassend stellt die in dieser Arbeit untersuchte Methode mit seiner Anbindung der Nanogoldpartikel über einen primären Antikörper in einen Inkubationsschritt, ohne der Notwendigkeit von Waschschrritten, eine Methode zur Aufreinigung von Zellen mittels der Nano-Photothermolyse dar, welche gegenüber den bisher auf die Nanopartikel vermittelte Photothermolyse basierende Technologien in Hinblick auf Selektivität, Effizienz und schonendem Umgang mit den behandelten Zellen im Vorteil ist.

4.3 Nebenwirkungsfreie Aufreinigung primärer Zellen

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob die Aufreinigung von primären Zellen mittels Nano-Photothermolyse ohne unerwünschte Nebenwirkungen für die aufgereinigten Zellen möglich ist.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Vitalität der aufzureinigenden Zellen weder alleine durch die Bestrahlung mit den verwendeten Laserparametern, noch durch die alleinige Inkubation mit den eingesetzten Nanogoldpartikeln beeinträchtigt wurde (Kap. 3.1.4 und 3.3.1). Dieses geht mit Befunden anderer Veröffentlichungen einher, die den Vorteil von Nanogoldpartikeln beschrieben haben, welche für Zellen *in vitro* und für Zellen im Gewebe *in vivo* nicht toxisch sind (O'Neal et al., 2004; Oberdorster et al., 2005).

Außerdem konnte nach der Aufreinigung von primären Zellen keine Beeinträchtigung der Vitalität der Nicht-Ziel-Zellen festgestellt werden (Kap. 3.1.4 und 3.3.1). Diese Zellen waren im gleichen Maße wie unbehandelte Zellen in der Lage, eine komplexe antigenspezifische immunologische Antwort aufgrund einer Stimulation mit einem entsprechenden Antigen zu generieren (Kap. 3.3.2).

In zwei *in vivo* Versuchen, wurden myeloablativ bestrahlten Mäusen syngenes Knochenmark zusammen mit den bei der Aufreinigung der Stammzellen verwendeten Immunogold Partikeln transplantiert (Kap. 3.4). Bei keiner dieser Mäuse zeigte sich eine Beeinträchtigung. Weder die Rekonstituierung des Knochenmarkes und der hämatopoetischen Zellen wurde durch die Nanogoldpartikel gestört (Kap. 3.4.1), noch hatte die Co-Injektion der Partikel einen Einfluss auf das Überleben der Tiere (Kap. 3.4.2). Zudem konnte in einem anschließenden *in vivo*

Zytotoxizitätstest keine Nebenwirkungen auf die untersuchten Mäuse durch die Co-Transplantation der Nanogoldpartikel nachgewiesen werden (Kap. 3.4.3).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der Nano-Photothermolyse neben ihrer hohen Effektivität und Selektivität auch eine nebenwirkungsfrei Methode zur Elimination von Zellen *in vitro* darstellt.

4.4 Effektive und nebenwirkungsfreie Elimination von Tumorzellen aus Knochenmarkzellen für die Stammzelltransplantation

Die Erforschung und Entwicklung neuer Verfahren, welche eine hochreine Elimination von Tumorzellen im Transplantat für die autologe Stammzelltransplantation nach Hochdosis-Chemotherapie gewährleisten ist notwendig, da die derzeitigen klinischen Standardverfahren dieses nicht zur Zufriedenheit leisten können (Corradini et al., 1997; Shimoni & Körbling, 2002; de Lima & Shpall, 2004; Geens et al., 2007).

Gerade bei Leukämien zeigt sich das Problem großer Zahlen von Tumorzellen im Knochenmark, welche bei der Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen auch vermehrt in den Blutkreislauf übertreten (Jacquy et al., 2000). Allgemein tritt das Bewusstsein der Problematik der so genannten „minimal residual disease“, also das Wiederkehren einer Tumorerkrankung aufgrund kleinster Anzahlen von vitalen Tumorzellen, welche die Behandlung überlebt haben, immer stärker in den Fokus wissenschaftlicher Interessen (Vose et al., 2002; Nabhan et al., 2007; Moreno et al., 2006).

Die Stammzellapharese, also die An- und Aufreinigung der CD34 positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen für die Stammzelltherapie wird nach Hochdosis-Chemotherapie über Zellseparationssysteme verwirklicht, welche auf dem Prinzip der magnetischen Separation beruhen. Dabei werden Magnetpartikel eingesetzt, welche über CD34+ Antikörper an die Stammzellen binden und anschließend mittels eines Magneten aus dem hämatopoetischen Zellgemisch separiert werden.

Aufgrund der CD34 positiven Selektion durch die am meisten verwendeten Separatoren CliniMACS®-Zell-Separators und Isolex®-Zell-Separators ist eine Reinheit der Zellen von maximal 98 % zu erzielen, wobei die Ausbeute 50 bis 70 %

beträgt (Paulus et al., 1997; Handgretinger et al., 2002). Die Eliminationseffizienz durch die magnetische Zell-Separation wird je nach Typ des kontaminierenden Lymphoms mit 2,6 bis 5,6 log-Stufen, im Durchschnitt mit 3,9 log-Stufen angegeben (Paulus et al., 1997). Andere Studien weisen eine Reinheit von nur maximal 90 % CD34 positiver Zellen im Transplantat mit einer Verunreinigung durch maligner T-Zellen von 0,06 % bis 0,44 % nach (Watts et al., 2002). Eine aktuelle Vergleichsstudie verschiedener Aufreinigungsverfahren für CD34 positive hämatopoetische Stammzellen mit derzeitig eingesetzten Methoden ergab eine maximale Reinheit von 98 % bei einer Ausbeute von maximal 77 % mit dem MACS System von Miltenyi (Dainiak et al., 2007). Es wurden unterschiedlichste *ex vivo* Aufreinigungsverfahren in den letzten Jahren untersucht, jedoch konnte keine dieser Methoden eine Tumorfreiheit des Transplantats sicherstellen (de Lima & Shpall, 2004).

Da die Stammzellapharese sowohl eine effektive Anreicherung der Stammzellen, als auch eine effektive Elimination der enthaltenden Tumorzellen leisten muss, erscheint eine Kombination aus Anreicherung über positive Selektion mittels Magnetseparation und einer Aufreinigung über eine Methode zu gezielter Elimination von Tumorzellen daher das Mittel der Wahl (Jacquy et al., 2000). Eine alleinige Elimination der Tumorzellen aus den nach Leukaphorese erhaltenden hämatopoetische Zellen ist nicht ausreichend, da um ein schnelles Anwachsen der Stammzellen zu erzielen, ausschließlich CD34 positive Stammzellen transplantiert werden sollten, welche nach Mobilisierung nur maximal 10 % der weißen Blutzellen ausmachen (Peters et al., 1993; Schiller et al., 1995; Kiss et al., 1997).

Für eine effektive Elimination von Tumorzellen in Transplantaten werden und wurden *ex vivo* unter anderen durchflusszytometrische Methoden untersucht. Eine Studie zur Aufreinigung von Keimzellentumorproben mittels einer Kombination aus positiver Anreicherung mit einem MACS-System und einer negativen Aufreinigung mittels FACS-Zellsortierer ergab eine Reduzierung der kontaminierenden Tumorzellen um $2,6 \times 10^3$ auf eine Reinheit von 99,6 % (Geens et al., 2007). In Modelstudien wurde gezeigt, dass mittels positiver und negativer Selektion mit einem FACS-Zellsortierer eine Verringerung von kontaminierenden Tumorzellen um

zwei bis vier log-Stufen erzielt werden konnte, was bedeutet, dass 0,1 % der Tumorzellen reimplantiert würden (Anderson IC et al., 1989; Gross et al., 1995).

Eine derzeit viel diskutierte und untersuchte Methode zur Aufreinigung von hämatopoetischen Stammzellen ist die auf *in vivo* Elimination von B-Zellen bei Patienten mit einem B-Zellen Non-Hodgkin-Lymphom beruhende Immuntherapie unter der Verwendung von Rituxan® (van Heeckeren et al., 2006) oder rituximab (Flohr et al., 2002; Nademanee & Forman, 2006). Diese beiden Arzneimittel bestehen aus chimären monoklonalen Antikörpern und binden an den CD20 Rezeptor auf allen B-Zellen und führen zu einer gezielten Lyse dieser Zellen. Die Ergebnisse der vorhandenen Studien sind viel versprechend, allerdings bleibt diese Methode auf den Einsatz für Krankheiten mit malignen B-Zellen beschränkt. Zudem ist berichtet worden, dass der Einsatz solcher Mittel zu einer verlangsamten Rekonstituierung des Blutes nach der Transplantation und zu erhöhten Infektionsraten führte (Benekli et al., 2003; Hess et al., 2006).

Die Anforderungen, welche an eine Methode, die nach einer positiven Anreicherung von Stammzellen zur Elimination von den im Transplantat verbliebenen Tumorzellen eingesetzt werden soll, gestellt werden müssen (Shimoni & Körbling, 2002; de Lima & Shpall, 2004; Geens et al., 2007; Dainiak et al., 2007), sind

eine hochreine Elimination der ungewünschten Zellen im Transplantat, damit keine reimplantierten Tumorzellen zu einem Rezidiv führen können,

eine hohe Ausbeute der zuvor angereicherten hämatopoetischen Stammzellen, also ein geringer Verlust, der zu transplantierenden Stammzellen,

keine unerwünschten Nebenwirkungen, wie eine Störung der Rekonstitution nach Stammzelltransplantation oder eine spätere Beeinträchtigung der rekonstituierten hämatopoetischen Zellen.

Die in dieser Arbeit untersuchte Methode zur selektiven Zellelimination mittels Nano-Photothermolyse scheint geeignet, diese drei Anforderungen zu erfüllen.

Zum einen konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode eine gezielte Reduktion von Zellen um über fünf log-Stufen mit einer Reinheit von über 99,999 % erzielbar ist (Kap. 3.1.2) und damit die Nano-Photothermolyse anderer diskutierten

als TEM_{00} angegeben, die eigene Vermessung bestätigte das Gaussche Profil mit einer Pulsbreite von 0,5 mm bei 80 % maximaler Energiedichte.

Die Energiemessung des Lasers erfolgte mit einem Energiekopf-Detektor und konnte darüber dargestellt und kontrolliert werden. Die Energiemessung wurde vor und nach jeder Bestrahlung von Zellen durchgeführt. Wenn nichts anders angegeben ist, wurden die Zellen mit einer Leistung von 125 mW entsprechend einer Energie von $1,25 \text{ J/cm}^2$ bestrahlt.

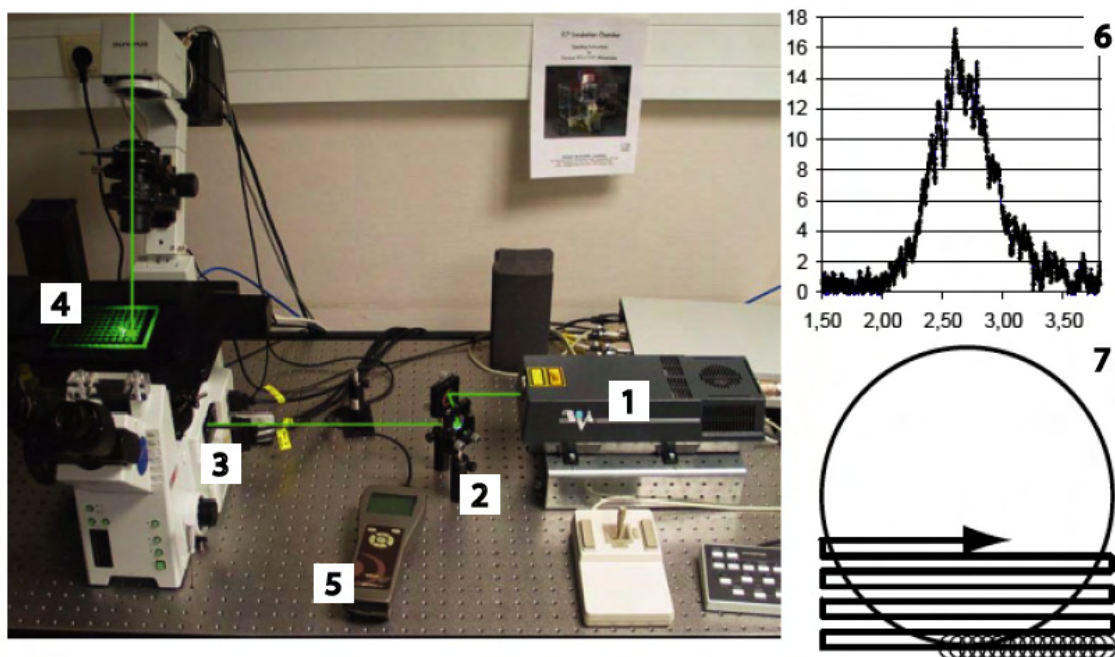


Abb. 2.1 Am IMMEI realisiertes Setup für die Nano-Photothermolyse.
 1) DIVA II Laser, 2) Umlenkspiegel, 3) rechter Seiteneingang vom Mikroskop, 4) Quarzplatte mit Zellen, 5) Energiekopfdetektor, 6) Laserpulsprofil und 7) Scanprofil.

Der Aufbau wurde auf einem erschütterungsgedämpften optischen Tisch realisiert und ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Der Laserstrahl aus dem DIVA II Laser wurde über zwei Umlenkspiegel in den rechten Seiteneingang in ein invertiertes Mikroskop eingekoppelt. Anstatt einer Lupe wurde dieses Mikroskop im Inneren mit einem 45° Umlenkspiegel ausgerüstet, welcher den Laserstrahl nach oben in die Strahlenachse ablenkt. Des Weiteren besitzt das Mikroskop einen motorisierten Kreuztisch, welcher über einen Computer mit der Software WinPos gesteuert werden kann. Somit können die Zellen in Probengefäßen, welche größer als der Laserstrahldurchmesser sind, in einem fest definierten Scanprofil bei der Bestrahlung abgefahren werden (Abb. 2.1). Das Scanprofil ist so berechnet, das sich die einzelnen Pulse bei über 80 %

Aufreinigungsmethoden (s.o.) eine bis drei log-Stufen überlegen sein kann. Zudem konnte in *in vivo* Versuchen mit B-Zell und T-Zell Tumorzellen gezeigt werden, dass alle Mäuse, welche nach myeloablativer Strahlenbehandlung mit Nano-Photothermolyse aufgereinigtes Knochenmark transplantiert bekommen haben, nicht von Tumorzellen besiedelt werden konnten (Kap. 3.4.2), was auf eine erfolgreiche Elimination der den Stammzellen zuvor beigemischten Tumorzellen durch die Nano-Photothermolyse hinweist.

Zum zweiten gehen bei der Behandlung mittels Nano-Photothermolyse keine Zellen verloren, da keine Waschschriffe während oder nach der Elimination der Zellen erfolgen müssen. Zudem ergaben die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, dass die Vitalität aller Zellen erhalten geblieben ist, welche aufgereinigt wurden (Kap. 3.1.3). Folglich ist kein Verlust und somit eine hohe Ausbeute der zu transplantierenden Stammzellen durch die Aufreinigung mit der Nano-Photothermolyse zu erwarten.

Zum dritten zeigten mit der Nano-Photothermolyse aufgereinigte primäre Zellen, keine Beeinflussung in ihrer immunologischen Integrität (Kap. 3.3). Es konnte gezeigt werden, dass die aufgereinigten und transplantierten syngenen Knochenmarkzellen in ihrer Fähigkeit, das Knochenmark zu besiedeln und für eine hämatopoetische Rekonstruktion zu sorgen, nicht beeinflusst gewesen waren (Kap. 3.4.1). Diese rekonstituierten Mäuse wurden mit einem Adenovirus Konstrukt infiziert und zeigten in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest keine Beeinträchtigung in ihrer Fähigkeit zu einer Antigen-spezifischen Immunantwort (Kap. 3.4.3), was darauf schließen lässt, dass die erfolgreiche Elimination von Tumorzellen aus einem Stammzelltransplantat mit der Nano-Photothermolyse keine Nebenwirkungen auf die aufgereinigten Stammzellen hatte.

Abschließend weisen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass die Nano-Photothermolyse als eine Methode für den klinischen Einsatz zur effektiven Aufreinigung von autologen Stammzellen zur Transplantation nach einer Hochdosis-chemotherapie für Patienten mit malignen Erkrankungen vorgeschlagen werden kann. In Kombination mit einer zuvor erfolgten Anreicherung, der zu transplantierenden hämatopoetischen Stammzellen könnte die Methode der Nano-Photothermolyse, durch ihre nebenwirkungsfreie hohe Reinheit und Ausbeute bei der

Elimination von Tumorzellen, einen notwendigen Beitrag zu der Erhöhung der Patientenzahl mit kompletter Remission durch eine erfolgreiche Tumorbehandlung mittels autologer Stammzelltherapie nach einer Hochdosis-Chemotherapie leisten.

Neben der Aufreinigung von autologen hämatopoetischen Stammzellen ergeben sich für die Nano-Photothermolyse aber auch weitere klinische Einsatzgebiete, wie z.B. die Aufreinigung von T-Zellen aus allogenen Stammzellen zur Transplantation, oder die Aufreinigung von undifferenzierten Stammzellen aus einer adulten oder embryonalen Stammzellkultur für die Transplantation.

5 Zusammenfassung

Durch die Ankoppelung von Nanogoldpartikeln mit Größen von 15 nm und 25 nm an Zellen mittels eines IgG Antikörpers und der anschließenden Bestrahlung mit Nanosekunden Laserpulsen mit einer Wellenlängen von 532 nm lassen sich Zellen effektiv und selektiv eliminieren.

Die effektive und selektive Elimination von Zellen mittels Nano-Photothermolyse konnte sowohl für Zellen in einer Suspension, als auch für adhärent wachsende Zellen gezeigt werden. Mit den in dieser Arbeit ermittelten Parametern war es möglich, Zellen mit einer Effizienz von über 99,999 % zu eliminieren bzw. aufzureinigen.

Bei der Nano-Photothermolyse vermittelten Elimination, sind physikalische Größen, wie der Energieeintag, die Partikelgröße, die Partikelanzahl und der Abstand zwischen Nanogoldpartikeln und Zellmembran bzw. die Art der Anbindung der Partikel an die Zelle, wichtige Faktoren für die Eliminationseffizienz.

Die Nano-Photothermolyse ermöglicht eine Aufreinigung primärer Zellen ohne detektierbare Nebenwirkungen und ohne Verlust von Zellen. Die im murinen Modell durchgeführte Aufreinigung von Stammzellen vor der Transplantation in myeloablativ behandelten Mäusen war geeignet, die behandelten Mäuse zu 100% vor einer Tumorinvasion zu bewahren. Dabei konnte keine Beeinträchtigung der Rekonstitutierung von Knochenmark und vom Blut der transplantierten Tiere festgestellt werden. Eine anschließend durchgeführte *in vivo* Untersuchung zur Antigen spezifischen Immunantwort der rekonstituierten Tiere ergab, dass die Aufreinigung der Stammzellen durch Nano-Photothermolyse keine ermittelbaren Nebenwirkungen hatte.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Methode der Nano-Photothermolyse eine geeignete Aufreinigungsmethode für mögliche klinische Anwendungen sein kann, da sie eine hohe Reinheit, eine hohe Ausbeute und eine hohe Sicherheit bzw. Nebenwirkungsfreiheit verspricht.

6 Literaturverzeichnis

- Amy, R.L., & Storb, R. (1965). Selective mitochondrial damage by a ruby laser microbeam: an electron microscopic study. *Science*, 150(697), 756-758.
- Anderson, I.C., Shpall, E.J., Leslie, D.S., Nustad, K., Ugelstad, J., Peters, W.P., & Bast, R.C., Jr. (1989). Elimination of malignant clonogenic breast cancer cells from human bone marrow. *Cancer research*, 49(16), 4659-4664.
- Anderson, R.R. (2000). Lasers in dermatology--a critical update. *The Journal of dermatology*, 27(11), 700-705.
- Anderson, R.R., Margolis, R.J., Watanabe, S., Flotte, T., Hruza, G.J., & Dover, J.S. (1989). Selective photothermolysis of cutaneous pigmentation by Q-switched Nd: YAG laser pulses at 1064, 532, and 355 nm. *The Journal of investigative dermatology*, 93(1), 28-32.
- Anderson, R.R., & Parrish, J.A. (1983). Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*, 220(4596), 524-527.
- Barnett, S.C., & Evans, C.H. (1986). Leukoregulin-increased plasma membrane permeability and associated ionic fluxes. *Cancer research*, 46(6), 2686-2692.
- Beck, S., Sakurai, T., Eustace, B.K., Beste, G., Schier, R., Rudert, F., & Jay, D.G. (2002). Fluorophore-assisted light inactivation: a high-throughput tool for direct target validation of proteins. *Proteomics*, 2(3), 247-255.
- Benekli, M., Hahn, T., Shafi, F., Qureshi, A., Alam, A.R., Czuczman, M.S., Bernstein, Z.P., Chanan-Khan, A.A., Becker, J.L., & McCarthy, P.L. (2003). Effect of rituximab on peripheral blood stem cell mobilization and engraftment kinetics in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Bone marrow transplantation*, 32(2), 139-143.
- Bessis, M., Gires, F., Mayer, G., & Nomarski, G. (1962). Irradiation des organites cellulaires a l'aide d'un Laser a rubis. *C R Acad. Sci.* , 255, 1010-1012.
- Bessis, M. & Normarski, G. (1960). Irradiation ultra-violette des organites cellulaires avec observation continue en contraste de phase. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 8, 777-791
- Böttcher, S., Ritgen, M., Pott, C., Bruggemann, M., Raff, T., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Dreger, P., & Kneba, M. (2004). Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Leukemia*, 18(10), 1637-1645.
- Boulnois, J. (1986). Photophysical processes in recent medical laser developments: A review. *Lasers in Medical Science*, 1(1), 47-66.

- Bressler, N.M., Arnold, J., Benchaboune, M., Blumenkranz, M.S., Fish, G.E., Gragoudas, E.S., Lewis, H., Schmidt-Erfurth, U., Slakter, J.S., Bressler, S.B., Manos, K., Hao, Y., Hayes, L., Koester, J., Reaves, A., & Strong, H.A. (2002). Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration: additional information regarding baseline lesion composition's impact on vision outcomes-TAP report No. 3. *Archives of ophthalmology*, 120(11), 1443-1454.
- Brinkmann, R., Huttmann, G., Rogener, J., Roider, J., Birngruber, R., & Lin, C.P. (2000). Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. *Lasers in surgery and medicine*, 27(5), 451-464.
- Buchstaller, A., & Jay, D.G. (2000). Micro-scale chromophore-assisted laser inactivation of nerve growth cone proteins. *Microscopy research and technique*, 48(2), 97-106.
- Chang, H.Y., Takei, K., Sydor, A.M., Born, T., Rusnak, F., & Jay, D.G. (1995). Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature*, 376(6542), 686-690.
- Chen, W.R., Korbelik, M., Bartels, K.E., Liu, H., Sun, J., & Nordquist, R.E. (2005). Enhancement of laser cancer treatment by a chitosan-derived immunoadjuvant. *Photochemistry and photobiology*, 81(1), 190-195.
- Corradini, P., Astolfi, M., Cherasco, C., Ladetto, M., Voena, C., Caracciolo, D., Pileri, A., & Tarella, C. (1997). Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood*, 89(2), 724-731.
- Dainiak, M.B., Kumar, A., Galaev, I.Y., & Mattiasson, B. (2007). Methods in cell separations. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 106, 1-18.
- de Lima, M., & Shpall, E.J. (2004). Ex-vivo purging of hematopoietic progenitor cells. *Current hematology reports*, 3(4), 257-264.
- Dolmans, D.E., Fukumura, D., & Jain, R.K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews*, 3(5), 380-387.
- Dougherty, T.J. (2002). An update on photodynamic therapy applications. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 20(1), 3-7.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., & Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889-905.
- Einstein, A. (1917). Zur Quantentheorie der Strahlung. *PHYSIKALISCHE ZEITSCHRIFT*, 18, 121-128.

- Flohr, T., Hess, G., Kolbe, K., Gamm, H., Nolte, H., Stanislawski, T., Huber, C., & Derigs, H.G. (2002). Rituximab in vivo purging is safe and effective in combination with CD34-positive selected autologous stem cell transplantation for salvage therapy in B-NHL. *Bone marrow transplantation*, 29(9), 769-775.
- Foote, C. (1976). Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. *Free Radicals in Biology*, II: Edited by WA Pryor. New York, Academic Press(Edited by WA Pryor. New York, Academic Press), 85–133.
- Fuchs, J., & Thiele, J. (1998). The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free radical biology & medicine*, 24(5), 835-847.
- Geens, M., Van de Velde, H., De Block, G., Goossens, E., Van Steirteghem, A., & Tournaye, H. (2007). The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. *Human reproduction*, 22(3), 733-742.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology*, 133(4), 1710-1715.
- Gold, M.H. (2007). Introduction to photodynamic therapy: early experience. *Dermatologic clinics*, 25(1), 1-4.
- Greulich, K.O., & Pilarczyk, G. (1998). Laser tweezers and optical microsurgery in cellular and molecular biology. Working principles and selected applications. *Cellular and molecular biology*, 44(5), 701-710.
- Gross, H.J., Verwer, B., Houck, D., Hoffman, R.A., & Recktenwald, D. (1995). Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10^{-7} . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(2), 537-541.
- Handgretinger, R., Lang, P., Ihm, K., Schumm, M., Geiselhart, A., Koscielniak, E., Hero, B., Klingebiel, T., & Niethammer, D. (2002). Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34(+) progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone marrow transplantation*, 29(9), 731-736.
- Hasbold, J., Gett, A.V., Rush, J.S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J., & Hodgkin, P.D. (1999). Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and cell biology*, 77(6), 516-522.

- Henderson, B.W., & Dougherty, T.J. (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and photobiology*, 55(1), 145-157.
- Hess, G., Flohr, T., Kolbe, K., Bonn, S., Schuler, M., Derigs, H.G., & Huber, C. (2006). Effect of rituximab on the long-term outcome after high-dose therapy for relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of hematology*, 85(11), 769-779.
- Hirsch, L.R., Stafford, R.J., Bankson, J.A., Sershen, S.R., Rivera, B., Price, R.E., Hazle, J.D., Halas, N.J., & West, J.L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13549-13554.
- Hsi, R.A., Rosenthal, D.I., & Glatstein, E. (1999). Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs*, 57(5), 725-734.
- Huettmann, G., & Birngruber, R. (1999). On the possibility of high-precision photothermal microeffects and the measurement of fast thermal denaturation of proteins. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron*, 5(4), 954-962.
- Hüttmann, G., Serbin, J., Radt, B., Lange, B.I., & Birngruber, R. (2001). Model system for investigating laser-induced subcellular microeffects. *Proceedings of SPIE*, 4257, 398-409.
- Huff, T.B., Tong, L., Zhao, Y., Hansen, M.N., Cheng, J.X., & Wei, A. (2007). Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine*, 2(1), 125-132.
- Jacqy, C., Soree, A., Lambert, F., Bosly, A., Ferrant, A., Andre, M., Parma, J., Kentos, A., & Martiat, P. (2000). A quantitative study of peripheral blood stem cell contamination in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: one-half of patients significantly mobilize malignant cells. *British journal of haematology*, 110(3), 631-637.
- Jay, D.G. (1988). Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15), 5454-5458.
- Jay, D.G., & Sakurai, T. (1999). Chromophore-assisted laser inactivation (CALI) to elucidate cellular mechanisms of cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1424(2-3), M39-48.
- Jori, G., & Spikes, J.D. (1990). Photothermal sensitizers: possible use in tumor therapy. *Journal of photochemistry and photobiology*, 6(1-2), 93-101.
- Kappler, J., White, J., Wegmann, D., Mustain, E., & Marrack, P. (1982). Antigen presentation by Ia+ B cell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(11), 3604-3607.

- Kiss, J.E., Rybka, W.B., Winkelstein, A., deMagalhaes-Silverman, M., Lister, J., D'Andrea, P., & Ball, E.D. (1997). Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 19(4), 303-310.
- Kolber, M.A., Quinones, R.R., Gress, R.E., & Henkart, P.A. (1988). Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *Journal of immunological methods*, 108(1-2), 255-264.
- König, K., Riemann, I., & Fritzsche, W. (2001). Nanodissection of human chromosomes with near-infrared femtosecond laser pulses. *Optics letters*, 26(11), 819-821.
- Landthaler, M., Hohenleutner, U., & el-Raheem, T.A. (1995). Laser therapy of childhood haemangiomas. *The British journal of dermatology*, 133(2), 275-281.
- Lapotko, D., Lukianova, E., Potapnev, M., Aleinikova, O., & Oraevsky, A. (2006a). Method of laser activated nano-thermolysis for elimination of tumor cells. *Cancer letters*, 239(1), 36-45.
- Lapotko, D.O., Lukianova, E., & Oraevsky, A.A. (2006b). Selective laser nano-thermolysis of human leukemia cells with microbubbles generated around clusters of gold nanoparticles. *Lasers in surgery and medicine*, 38(6), 631-642.
- Latt, S.A., & Stetten, G. (1976). Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 24(1), 24-33.
- Leeder, J.S., Dosch, H.M., Harper, P.A., Lam, P., & Spielberg, S.P. (1989). Fluorescence-based viability assay for studies of reactive drug intermediates. *Analytical biochemistry*, 177(2), 364-372.
- Letfullin, R.R., Joenathan, C., George, T.F., & Zharov, V.P. (2006). Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer. *Nanomedicine*, 1(4), 473-80.
- Liao, J.C., Roider, J., & Jay, D.G. (1994). Chromophore-assisted laser inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7), 2659-2663.
- Lin, C.P., & Kelly, M.W. (1998). Cavitation and acoustic emission around laser-heated microparticles. *Appl. Phys. Lett.*, 72(22), 2800-2802.
- Lin, C.P., Kelly, M.W., Sibayan, S.A.B., Latina, M.A., & Anderson, R.R. (1999). Selective cell killing by microparticle absorption of pulsed laser radiation. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 5(4), 963-968.

- Loo, C., Lin, A., Hirsch, L., Lee, M.H., Barton, J., Halas, N., West, J., & Drezek, R. (2004). Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technology in cancer research & treatment*, 3(1), 33-40.
- Loo, C., Lowery, A., Halas, N., West, J., & Drezek, R. (2005). Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano letters*, 5(4), 709-711.
- Maiman, T.H. (1960). Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*, 187(4736), 493-494.
- Metezeau, P. (1993). Image and flow cytometry: companion techniques for adherent and non-adherent cell analysis and sorting. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 78(1-2), 129-134.
- Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3), 377-445.
- Moreno, C., Villamor, N., Colomer, D., Esteve, J., Gine, E., Muntanola, A., Campo, E., Bosch, F., & Montserrat, E. (2006). Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(11), 4563-4569.
- Nabhan, C., Coutre, S., & Hillmen, P. (2007). Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia: is it ready for primetime? *British journal of haematology*, 136(3), 379-392.
- Nademanee, A., & Forman, S.J. (2006). Role of hematopoietic stem cell transplantation for advanced-stage diffuse large cell B-cell lymphoma-B. *Seminars in hematology*, 43(4), 240-250.
- Neumann, R.A., Knobler, R.M., Leonhartsberger, H., & Gebhart, W. (1992). Comparative histochemistry of port-wine stains after copper vapor laser (578 nm) and argon laser treatment. *The Journal of investigative dermatology*, 99(2), 160-167.
- O'Neal, D.P., Hirsch, L.R., Halas, N.J., Payne, J.D., & West, J.L. (2004). Photothermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer letters*, 209(2), 171-176.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., & Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823-839.
- Paulus, U., Dreger, P., Viehmann, K., von Neuhoff, N., & Schmitz, N. (1997). Purging peripheral blood progenitor cell grafts from lymphoma cells: quantitative comparison of immunomagnetic CD34+ selection systems. *Stem cells*, 15(4), 297-304.

- Peters, W.P., Rosner, G., Ross, M., Vredenburg, J., Meisenberg, B., Gilbert, C., & Kurtzberg, J. (1993). Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Blood*, 81(7), 1709-1719.
- Pitsillides, C.M., Joe, E.K., Wei, X., Anderson, R.R., & Lin, C.P. (2003). Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophysical journal*, 84(6), 4023-4032.
- Plech, A., Kotaidis, V., Lorenc, M., & Wulff, M. (2005). Thermal dynamics in laser excited metal nanoparticles. *Chemical Physics Letters*, 401(4-6), 565-569.
- Ponielis, N., Scheef, J., Harim, A., Leitz, G., & Greulich, K.O. (1994). Laser micromanipulators for biotechnology and genome research. *Journal of biotechnology*, 35(2-3), 109-120.
- Radt, B. (2002). Inaktivierung von Proteinen und Zellen durch Laserbestrahlung von Mikropartikeln. *Dissertation, Universität Lübeck*.
- Rawstron, A.C., Kennedy, B., Evans, P.A., Davies, F.E., Richards, S.J., Haynes, A.P., Russell, N.H., Hale, G., Morgan, G.J., Jack, A.S., & Hillmen, P. (2001). Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood*, 98(1), 29-35.
- Roider, J., Hillenkamp, F., Flotte, T., & Birngruber, R. (1993). Microphotocoagulation: selective effects of repetitive short laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(18), 8643-8647.
- Roth, J. (1996). The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. *Histochemistry and cell biology*, 106(1), 1-8.
- Sato, S., Higurashi, E., Taguchi, Y., & Inaba, H. (1992). Achievement of Laser Fusion of Biological Cells Using UV Pulsed Dye Laser Beams. *Applied Physics B: Photophysics and Laser Chemistry*, 54, 531-533.
- Schiller, G., Vescio, R., Freytes, C., Spitzer, G., Sahebi, F., Lee, M., Wu, C.H., Cao, J., Lee, J.C., Hong, C.H., & et al. (1995). Transplantation of CD34+ peripheral blood progenitor cells after high-dose chemotherapy for patients with advanced multiple myeloma. *Blood*, 86(1), 390-397.
- Schmidt, U., Birngruber, R., & Hasan, T. (1992). Selective occlusion of ocular neovascularization by photodynamic therapy. *Der Ophthalmologe*, 89(5), 391-394.

- Schmidt-Erfurth, U., & Hasan, T. (2000). Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology*, 45(3), 195-214.
- Schütze, K., Becker, I., Becker, K.F., Thalhammer, S., Stark, R., Heckl, W.M., Bohm, M., & Posl, H. (1997). Cut out or poke in--the key to the world of single genes: laser micromanipulation as a valuable tool on the look-out for the origin of disease. *Genetic analysis*, 14(1), 1-8.
- Schütze, K., & Clement-Sengewald, A. (1994). Catch and move--cut or fuse. *Nature*, 368(6472), 667-669.
- Shimoni, A., & Korbling, M. (2002). Tumor cell contamination in re-infused stem cell autografts: does it have clinical significance? *Critical reviews in oncology/hematology*, 41(2), 241-250.
- Silvast, W.T. (1991). Lasers. In: Encyclopedia of lasers and optical technology, R. A. Meyers (ed), Academic Press, Inc, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego., pp. 209-226.
- Tatar, O., Adam, A., Shinoda, K., Yoeruek, E., Szurman, P., Bopp, S., Eckardt, C., Bartz-Schmidt, K.U., & Grisanti, S. (2007). Influence of verteporfin photodynamic therapy on inflammation in human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. *Retina*, 27(6), 713-723.
- Tirlapur, U.K., & Konig, K. (2002). Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature*, 418(6895), 290-291.
- Tschachotin, S. (1912). Die mikroskopische Strahlenstichmethode eine Zelloperationsmethode. *Biol. Zentralblatt*, 32, 623-630.
- Tsukakoshi, M., Kurata, S., Nomiya, Y., Ikawa, Y., & Kasuya, T. (1984). A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 35(3), 135-140.
- Tubbs, R., Pettay, J., Skacel, M., Powell, R., Stoler, M., Roche, P., & Hainfeld, J. (2002). Gold-facilitated in situ hybridization: a bright-field autometallographic alternative to fluorescence in situ hybridization for detection of Her-2/neu gene amplification. *The American journal of pathology*, 160(5), 1589-1595.
- van Heeckeren, W.J., Vollweiler, J., Fu, P., Cooper, B.W., Meyerson, H., Lazarus, H.M., Simic, A., Laughlin, M.J., Gerson, S.L., & Koc, O.N. (2006). Randomised comparison of two B-cell purging protocols for patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma: in vivo purging with rituximab versus ex vivo purging with CliniMACS CD34 cell enrichment device. *British journal of haematology*, 132(1), 42-55.

- Vogel, A., Noack, J., Hüttmann, G., & Paltauf, G. (2005). Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 81(8), 1015-1047.
- Vogel, A., & Venugopalan, V. (2003). Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chemical reviews*, 103(2), 577-644.
- Vose, J.M., Sharp, G., Chan, W.C., Nichols, C., Loh, K., Inwards, D., Rifkin, R., Bierman, P.J., Lynch, J.C., Weisenburger, D.D., Kessinger, A., & Armitage, J.O. (2002). Autologous transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial evaluating graft source and minimal residual disease. *Journal of clinical oncology*, 20(9), 2344-2352.
- Watts, M.J., Somervaille, T.C., Ings, S.J., Ahmed, F., Khwaja, A., Yong, K., & Linch, D.C. (2002). Variable product purity and functional capacity after CD34 selection: a direct comparison of the CliniMACS (v2.1) and Isolex 300i (v2.5) clinical scale devices. *British journal of haematology*, 118(1), 117-123.
- Weber, G., & Greulich, K.O. (1992). Manipulation of cells, organelles, and genomes by laser microbeam and optical trap. *International review of cytology*, 133, 1-41.
- Weishaupt, K.R., Gomer, C.J., & Dougherty, T.J. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer research*, 36(7 PT 1), 2326-2329.
- Weissleder, R., & Ntziachristos, V. (2003). Shedding light onto live molecular targets. *Nature medicine*, 9(1), 123-128.
- Yao, C., Rahmzadeh, R., Endl, E., Zhang, Z., Gerdes, J., & Huttmann, G. (2005). Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles. *Journal of biomedical optics*, 10(6), 064012.
- Zharov, V.P., Letfullin, R.R., & Galitovskaya, E.N. (2005). Microbubbles-overlapping mode for laser killing of cancer cells with absorbing nanoparticle clusters. *J. Phys. D: Appl. Phys*, 38, 2571-2581.

