

Aus dem Institut der Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Targeting von Tumorzellen durch oberflächenmodifizierte
Erythrozyten – *in vitro* Studie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mira Irene Müller

aus Krün

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. H. Bäuml
 2. Priv.-Doz. Dr. med. G. Pecher
 3. Prof. Dr. med. G. Pöhlmann

Datum der Promotion: 19.03.2010

Meinen Eltern

Danksagung

Ich danke meinen Eltern, Wilhelmina Klasen und Dietmar Müller-Elmau, für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und ihre liebevolle Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Hans Bäumler für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und große Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Dr. rer. nat. Radostina Georgieva und Dr. -Ing. Ziyad Abdallah danke ich für ihr unermüdliches persönliches Engagement, die freundliche Unterstützung bei den Experimenten sowie für die Hilfestellungen während der schriftlichen Ausarbeitung.

Mein weiterer Dank gilt all meinen lieben Kolleginnen und Kollegen im Labor, besonders Axel Steffen, Angelika Müller und Nadine Sternberg, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mit denen ich viele nette Stunden verbringen durfte.

Mein Dank gilt auch meinen Freundinnen Iris Neff und Daniela Imhoff für ihre Hilfe bei dem Erstellen der Grafiken.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Geschwistern Tara und David Müller für ihre unverzichtbare moralische Unterstützung bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
A/B-Erythrozyten	avidinierte biotinylierte Erythrozyten
B-Erythrozyten	biotinylierte Erythrozyten
B-IgG	biotinyliertes Immunglobulin G
CD	cluster of differentiation, Oberflächenmerkmale von Zellen
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
d	Tage
Da	Dalton
DAF	decay-accelerating factor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
engl.	Englisch
Ep-CAM	epithelial cell adhesion molecule, epithelspezifisches Antigen
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
F_{Median}	Median der Fluoreszenzintensität
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
HDL	high-density lipoprotein
HeNe1 Laser	Helium Neon Laser
HSA	Humanes Serum Albumin
Ig	Immunglobulin
K_a	Bindungskonstante
KCl	Kaliumchlorid
M	Mol
mab	mouse monoclonal antibody, monoklonaler Mausantikörper
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
mPEG	methoxy-Polyethylenglykol
MW	Mittelwert

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NK	Negativkontrolle
PAGGS-M	Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Natriumchlorid, Mannitol
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PI	Probidiumiodid
PIGPA.C	Na ⁺ Phosphat/ Inosin/ Glukose/ Na ⁺ Pyruvat/ Adenin-Lösung
rel. E.	relative Einheiten
RES	Retikuloendotheliales System
RPMI 1640 Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium, Zellkulturmedium
rSTABW	robuste Standardabweichung
rVK	robuster Variationskoeffizient
SAG-M	Natriumchlorid, Adenin, Glukose, Mannitol
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-[biotinamido] hexanoat
Tab.	Tabelle
V _H	Variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpermoleküls
V _L	Variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpermoleküls
w/v	weight/volume, Gewicht/Volumen
X _i	einzelne Messwerte
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Widmung.....	I
Danksagung.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Krebs und dessen herkömmliche Therapiekonzepte.....	1
1.2 Drug-Targeting.....	2
1.3 Erythrozyten als Drug-Carrier.....	3
1.3.1 Vorteile.....	3
1.3.2 Nachteile.....	6
1.3.3 Gezieltes Targeting durch Immunoerythrozyten.....	7
1.4 Aufgabenstellung.....	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien.....	11
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	12
2.1.3 Verwendete Antikörper.....	12
2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Biotinylierung von IgG.....	14
2.2.2 Erythrozytengewinnung.....	15
2.2.3 Biotinylierung der Erythrozyten.....	15
2.2.4 Avidinierung der Erythrozyten.....	16
2.2.5 Antikörperankopplung an die Erythrozytenoberfläche.....	17
2.2.6 Beladung der IgG-gekoppelten Erythrozyten mit FITC-Dextran.....	18

2.2.7	PEGylierung der Erythrozyten	19
2.2.8	Phagozytoseassay	20
2.2.9	Zellkultur	21
2.2.9.1	Verwendete Zellen	21
2.2.9.2	Zellkulturbedingungen	22
2.2.10	Durchflusszytometrie	22
2.2.11	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	25
2.2.12	Bestimmung des Zeta Potentials	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Ankopplung von IgG an die Erythrozytenoberfläche	28
3.1.1	Optimierung der Biotinkonzentration	28
3.1.2	Optimierung der Avidinkonzentration	33
3.1.3	IgG-gekoppelte Erythrozyten	38
3.2	Ankopplung des Tumorantikörpers an die Erythrozyten	39
3.3	Beladung der IgG-gekoppelten Erythrozyten mit FITC-Dextran	40
3.4	PEGylierung der Erythrozyten	42
3.4.1	PEGylierung	42
3.4.2	Effekt der PEGylierung auf den gekoppelten Antikörper	45
3.4.3	Phagozytoseassay	46
3.5	Targeting von Tumorzellen durch die modifizierten Erythrozyten <i>in vitro</i>	48
3.5.1	Nicht-PEGylierte Tumor-Antikörper gekoppelte Erythrozyten	49
3.5.2	PEGylierte Tumor-Antikörper gekoppelte Erythrozyten	52
4	Diskussion	54
4.1	Ankopplung von Antikörpern an die Erythrozytenoberfläche	54
4.1.1	Einfluss der Biotin- und Avidinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten	55
4.1.2	IgG-Ankopplung bei verschiedenen Biotin- und Avidinkonzentrationen	59

4.1.3	Stabilität der Ankopplung von IgG an die Erythrozyten	60
4.2	Beladung der IgG-gekoppelten Erythrozyten mit FITC-Dextran.....	62
4.3	PEGylierung der modifizierten Erythrozyten zur Herabsetzung ihrer Immunogenität	64
4.3.1	Verfügbarkeit der gekoppelten Antikörper nach der PEGylierung.....	66
4.3.2	Immunogenität der modifizierten Erythrozyten im Phagozytoseassay	66
4.4	Targeting der Tumorzellen durch die modifizierten Erythrozyten <i>in vitro</i>	68
4.5	Schlussfolgerung	70
5	Zusammenfassung	72
6	Literaturverzeichnis.....	74
	Lebenslauf.....	83
	Erklärung.....	84

1 Einleitung

1.1 Krebs und dessen herkömmliche Therapiekonzepte

In der westlichen Welt nehmen bösartige Tumoren in der Todesursachenstatistik hinter Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems den zweiten Platz ein. Somit stellt Krebs dort die zweithäufigste Todesursache dar [1]. Man muss davon ausgehen, dass ungefähr jeder dritte Deutsche im Laufe seines Lebens an einer Krebserkrankung erkrankt [2]. Da Krebs in vielen Fällen eine Erkrankung des Alters ist und die Lebenserwartung weiterhin zunimmt, ist damit zu rechnen, dass auch die Bedeutung der Onkologie in Zukunft weiter wachsen wird.

In den letzten 30 Jahren wurden die „klassischen“ Therapiekonzepte der Krebsbehandlung stetig verbessert. Dazu zählt die operative, die Strahlen- und die Chemotherapie. Diesen etablierten Verfahren sind aber immer noch Grenzen gesetzt. Obwohl in der chirurgischen und radiologischen Therapie in den letzten Jahren aufgrund technischer Neuerungen große Fortschritte erzielt werden konnten, bleibt ihr Einsatzgebiet auf regionale Tumoren beschränkt. In den meisten Fällen ist jedoch die Metastasierung für den tödlichen Ausgang einer Krebserkrankung verantwortlich. Diese vollzieht sich vor allem über das Blutgefäßsystem, in welches Tumorzellen sowohl direkt durch Überwindung der Basalmembran und der extrazellulären Matrixkomponente als auch indirekt über das Lymphgefäßsystem eindringen können. Von den Systemflüssigkeiten werden die Krebszellen dann in andere, oft auch weit entfernte Körperregionen transportiert. Zwar sind die malignen Zellen im Blutgefäßsystem Interaktionen mit Blutkomponenten und dem Immunsystem ausgesetzt, dennoch kann es einigen wenigen Zellen gelingen, sich in engen Kapillargefäßen abzusetzen und von dort in extravaskuläre Gewebeschichten vorzudringen [3, 4].

Die Chemotherapie erreicht eine systemische Behandlung des Patienten, wodurch neben dem Primärtumor auch Metastasen erfasst werden. Die Chemotherapie in der Krebsbehandlung geht davon aus, dass vor allem die schnell wachsenden Krebszellen und nicht die gesunden Körperzellen von den Medikamenten zerstört werden. Um eine signifikante oder auch vollständige Regression des Tumorgewebes zu erreichen, müssen aber oft hohe Dosen an Chemotherapeutika verabreicht werden. Dies führt aufgrund der starken Toxizität der Medikamente vor allem im gesunden, schnell proliferierenden Gewebe zu erheblichen Schäden, die therapielimitierend sein können [5].

Die Entwicklung von systemischen Therapiestrategien, die eine spezifischere Unterscheidung zwischen malignen und gesunden Zellen ermöglichen, stellt demnach ein bedeutendes Ziel der modernen Krebsforschung dar.

1.2 Drug-Targeting

Das Drug-Targeting bietet einen hoffnungsvollen Lösungsansatz für eine optimierte systemische Therapie. Unter Drug-Targeting versteht man den gezielten Transport von Medikamenten zum Zielgewebe mittels eines geeigneten Trägers (engl. Carrier). In den letzten Jahren hat die Forschung auf diesem Gebiet große Fortschritte erzielt. Es wurden eine ganze Reihe molekularer, zellulärer und synthetischer Carrier entwickelt. Durch den gezielten Transport wird die Verteilung des Wirkstoffes im Körper günstig beeinflusst, so dass sich in den Zielzellen beziehungsweise im Zielgewebe höhere Wirkstoffkonzentrationen vorfinden als in nicht-spezifischem Gewebe. Hierdurch soll das Nebenwirkungsprofil von Medikamenten optimiert und deren therapeutische Effektivität erhöht werden [6, 7]. Ein idealer Drug-Carrier sollte folgende Eigenschaften erfüllen:

- a) hohe therapeutische Effektivität bei minimaler Dosierung
- b) keine oder wenig Nebenwirkungen
- c) lokalisierte beziehungsweise zielgerichtete Wirkung
- d) biologischer Abbau
- e) keine Immunogenität
- f) leichter Herstellungsprozess/ unkomplizierte Handhabung

Die Herstellung eines idealen Carriers ist bisher noch nicht gelungen. Die geläufigsten Carrier-Systeme beinhalten Antikörper, Liposomen, Nanopartikel oder zelluläre Carrier wie zum Beispiel Erythrozyten. Die nachstehende Tabelle 1 zeigt eine Auswahl möglicher Carrier für Zytostatika.

Tabelle 1: Auswahl möglicher Carrier für Zytostatika.

Carrier	Assoziierte Medikamente
<u>Makromoleküle</u>	
<i>Immunglobuline</i>	Adriamycin, Chlorambucil, Daunomycin, Methotrexat [8] Calicheamicin, Maytansinoid, Auristatin, Doxorubicin, CC-1065 Analoga [9]
<u>Zellen</u>	
<i>Erythrozyten</i>	Actinomycin D, Adriamycin, Bleomycin, Carboplatin, Daunomycin, Etoposid, Methotrexat [10]
<i>Neutrophile Granulozyten</i>	Doxorubicin [11]
<u>Synthetische Systeme</u>	
<i>Liposomen</i>	Doxorubicin, Daunorubicin [7]
<i>Nanopartikel</i>	Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel [12]

1.3 Erythrozyten als Drug-Carrier

1.3.1 Vorteile

Unter den vielen verschiedenen Carriern, welche für das gezielte Drug-Targeting eingesetzt werden können, erfüllen vor allem die Erythrozyten einige für die klinische Applikation wünschenswerte Kriterien. Dies wird deutlich, wenn man sich die biochemischen und morphologischen Besonderheiten des Erythrozyten vor Augen führt.

Die Erythrozyten bilden mit 99 % den größten Anteil an den zellulären Blutbestandteilen. Frauen haben durchschnittlich $4,8 \cdot 10^{12}$ und Männer $5,3 \cdot 10^{12}$ Erythrozyten pro Liter Blut [13]. Diese Zellen sind somit im Überfluss vorhanden. Ihre Gewinnung ist kostengünstiger und einfacher als die Herstellung von synthetischen Carriern.

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten besteht im Sauerstofftransport von der Lunge in das Gewebe. Hierfür sind sie optimal ausgestattet. Erythrozyten sind kernlose, bikonkave Zellen. Sie haben die Form einer von beiden Seiten eingedellten Scheibe (Abb. 1), mit einem mittleren Durchmesser von $7,5 \mu\text{m}$, einer Dicke von etwa $2 \mu\text{m}$ am Rand, einem mittleren Volumen von $80\text{-}98 \mu\text{m}^3$ und einer Oberfläche von $140 \mu\text{m}^2$ [13]. Durch die bikonkave Form wird die gute Verformbarkeit der Erythrozyten gewährleistet. Dies ist für ihre Flexibilität in engen Kapillaren und die Blutviskosität wichtig. Außerdem entsteht durch die besondere Form ein großes Oberfläche- zu Volumen-Verhältnis, welches für den Sauer-

Einleitung

stofftransport von Bedeutung ist. Aus diesen morphologischen Voraussetzungen ergibt sich der besondere Vorteil ihrer hohen Beladungskapazität. Bereits eine kleine Menge an Zellen, kann eine große Menge an Wirkstoff aufnehmen. So lässt sich schon mit einem begrenzten Erythrozytenvolumen eine hinreichende Konzentration des jeweiligen Medikamentes im Organismus erreichen [14].

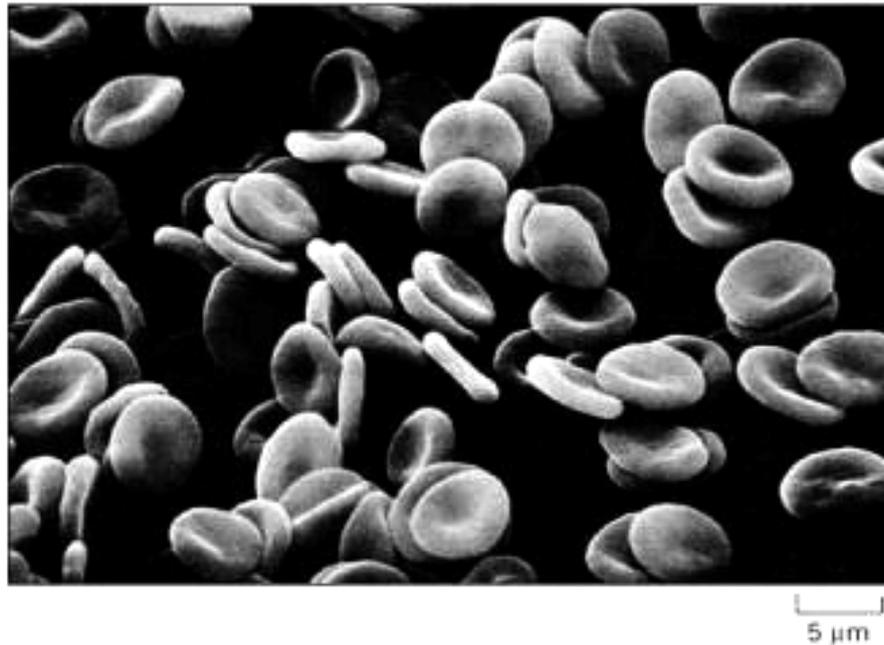


Abbildung 1: Erythrozyten aufgenommen mit einem Elektronenmikroskop [15].

Die Erythrozytenmembran ist aus Lipiden zusammengesetzt, die in einer doppelschichtigen Lage angeordnet sind, wodurch eine hydrophile Außenseite und ein hydrophobes Inneres entstehen. Diese biochemische Zusammensetzung garantiert die mechanische Flexibilität der Membran [16]. In der Lipiddoppelschicht befinden sich integrale, transmembranäre und amphiphile Proteine, die sich durch laterale Diffusion in der Membran bewegen können oder durch nicht-kovalente Bindungen mit peripheren Proteinen in der Membran immobilisiert sind (Abb. 2). Insgesamt besteht die Erythrozytenmembran zu 19,5 % aus Wasser, zu 35,1 %, aus Lipiden, zu 39,6 % aus Proteinen und zu 5,8 % aus Kohlenhydraten [17].

Ein weiterer Vorteil der Erythrozyten als Carrier im Vergleich zu anderen Carriern besteht in ihrer hohen Biokompatibilität und Stabilität, was durch die Verwendung von autologen Erythrozyten noch verstärkt wird [14]. Liposomen werden normalerweise sofort nach der intravenösen Injektion von Plasmaproteinen, unter anderem Albumin und Lipoproteinen, bedeckt. Manche dieser Proteine, zum Beispiel das high-density Lipoprotein (HDL), kön-

nen Phospholipide aus der Lipiddoppelschicht der Liposomen entfernen und dadurch zu deren Destabilisierung führen. Dieser Vorgang kann bewirken, dass die Medikamente frühzeitig aus den Liposomen austreten [18].

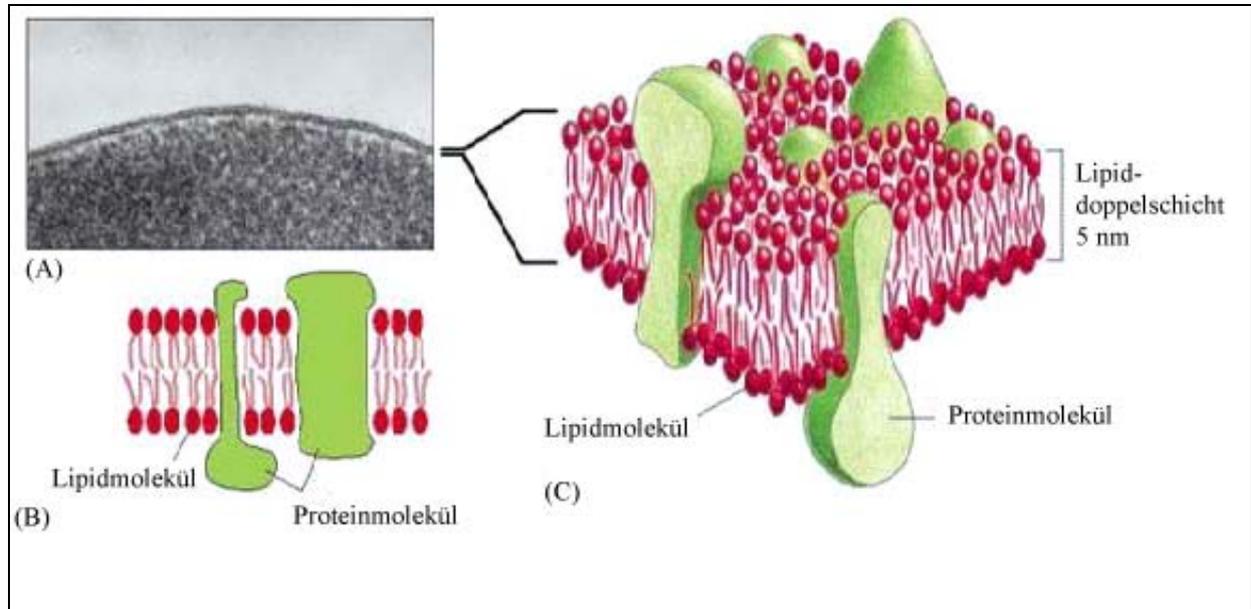


Abbildung 2: Drei Ansichten einer Zellmembran. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Plasmamembran (Erythrozyt). (B und C) Diese Zeichnungen zeigen zwei- beziehungsweise dreidimensionale Ansichten einer Zellmembran (verändert nach [15]).

Im Inneren des Erythrozyten befindet sich Hämoglobin, welches für die Bindung und den Transport des Sauerstoffs verantwortlich ist. Durch die hohe Konzentration dieses eisenreichen Moleküls, welches jeweils vier Sauerstoffatome bindet [13], lassen sich Erythrozyten durch Zentrifugation leicht von den anderen Zellen des Blutes trennen. Hieraus ergibt sich unter anderem auch deren leichte Handhabung.

Erythrozyten entwickeln sich ständig neu aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (Abb. 3). Dieser Vorgang, die Erythropoese, wird durch das renale Hormon Erythropoetin gesteuert. Während die Erythrozyten die verschiedenen Vorläuferstadien durchlaufen, verlieren sie ihren Zellkern, erlangen ihre scheibenartige Form und beginnen Hämoglobin zu bilden. Die durchschnittliche Überlebenszeit normaler Erythrozyten im peripheren Blut beträgt 120 Tage [16]. Unter optimalen Beladungsbedingungen können Carrier-Erythrozyten die Überlebenszeit von normalen Erythrozyten erreichen [19]. Durch die lange Überlebenszeit können die Erythrozyten als Medikamentenreservoir genutzt werden, aus dem eine verzögerte Freisetzung des Wirkstoffes in den Blutkreislauf erfolgt [20]. Da es sich im Gegensatz zu synthetischen Carriern bei den Erythrozyten um lebende Zellen

Einleitung

handelt, können sie darüber hinaus auch als Bioreaktoren wirken und mit Hilfe ihrer enzymatischen Ausstattung eingekapselte Prodrugs nach und nach in deren wirksame Form umwandeln [10].

Der Abbau von gealterten und beschädigten Erythrozyten vollzieht sich hauptsächlich in der Milz. Morphologisch veränderte Erythrozyten bleiben in den Milztrabekeln hängen und werden zerstört. Eine wichtige Rolle für den Abbau von Erythrozyten spielen außerdem die Makrophagen des Retikulo-Endothelialen-Systems (RES). Einmal im RES gefangen, werden die Erythrozyten von lysosomalen Enzymen attackiert und ihre Zellmembran zerstört [21]. Zum RES zählen peritoneale Makrophagen, Kupfer-Stern-Zellen der Leber, alveolare Makrophagen der Lunge und periphere Monozyten des Blutes [22]. Carrier-Erythrozyten sind vollständig biologisch abbaubar und hinterlassen keine toxischen Produkte [14].

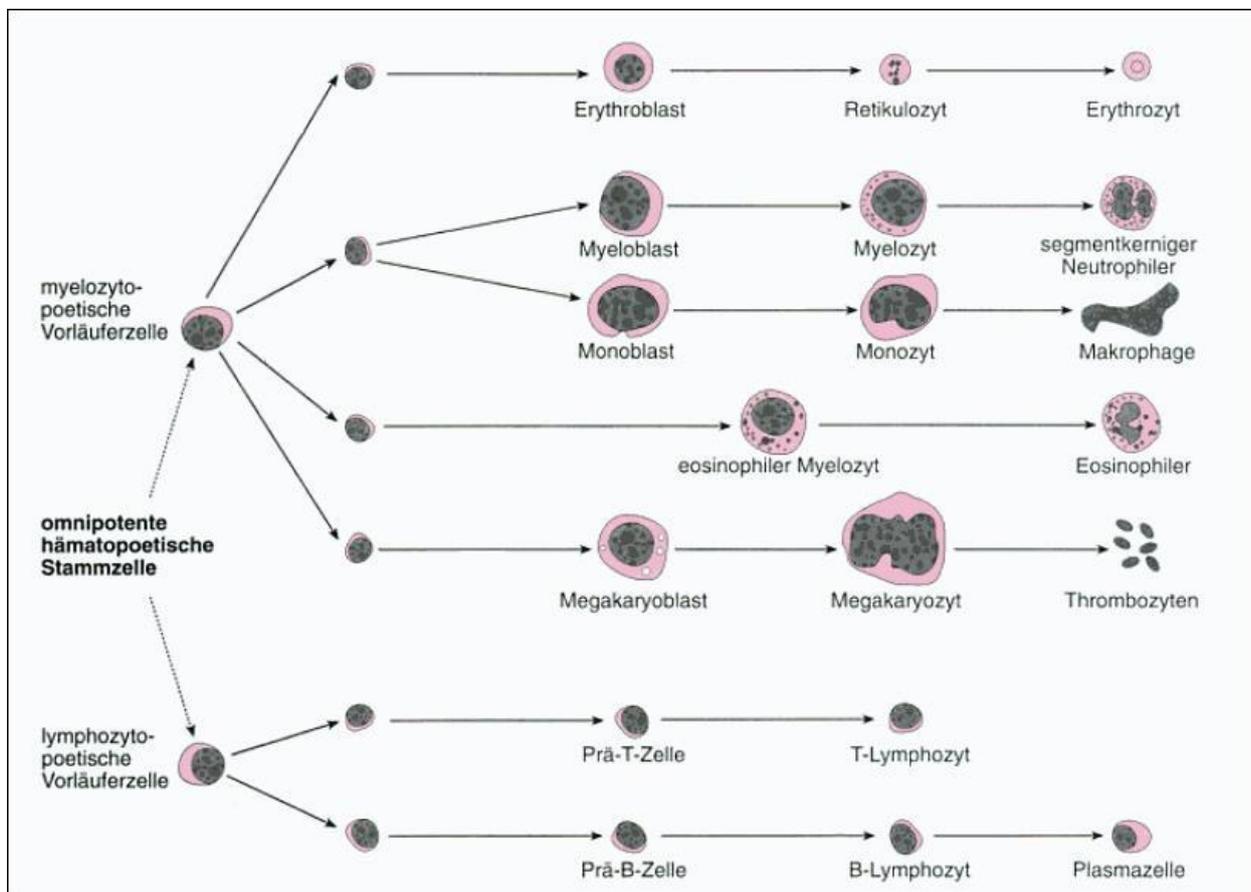


Abbildung 3: Schema der Hämatopoese (verändert nach [23]).

1.3.2 Nachteile

Die Anwendung der Erythrozyten als Drug-Carrier bringt auch einige Nachteile mit sich. Das größte Hindernis in der Anwendung natürlicher Zellen besteht darin, dass sie durch die

Zellen des RES zerstört werden, wenn ihre Oberfläche verändert wurde. Hierdurch wird ihre Anwendung als Drug-Carrier limitiert [24].

Außerdem treten bestimmte eingekapselte Substanzen zu schnell wieder aus dem Erythrozyten aus oder verändern dessen Physiologie. Daher eignet sich diese Zelle nicht für die Einkapselung jeder Substanz [10].

Da Erythrozyten Carrier biologischen Ursprungs sind, ergibt sich neben einer größeren Variabilität und verminderten Standardisierung in deren Präparation, auch ein Problem mit der Aufbewahrung und somit der Haltbarkeit. Nicht zu vergessen ist die Tatsache, dass Blut potentiell infektiös ist, weswegen immer größte Vorsicht bei dessen Handhabung geboten ist [10].

1.3.3 Gezieltes Targeting durch Immunoerythrozyten

Um ein gezieltes Targeting von Zellen beziehungsweise Gewebe mit den Carrier-Erythrozyten zu erreichen, kann man deren Oberfläche mit spezifischen Antikörpern koppeln. Es entsteht ein sogenannter Immunoerythrozyt.

Antikörper, beziehungsweise Immunglobuline (Ig), sind Moleküle, die von ausdifferenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen produziert und sezerniert werden. Sie stehen im Dienste des Immunsystems. Ihre Aufgabe ist es, Pathogene im Organismus zu binden und deren Zerstörung zu erleichtern. Die Struktur, die von einem Antikörper erkannt wird, nennt man Antigen determinante oder Epitop, dies entspricht meist nur einer kleinen Region auf der Oberfläche eines großen Moleküls. Die Bindung zwischen Epitop und Antigenbindungsstelle des Antikörpers kommt durch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen zustande. Die Spezifität und Affinität dieser Bindung wird durch Aminosäureseitenketten der antigenbindenden Region bestimmt, die mit dem Antigen in Kontakt treten [22].

Die Grundstruktur eines Antikörpermoleküls ähnelt schematisch dem Buchstaben Y, wobei es aus zwei identischen Paaren von schweren (MG 50-70 kDa) und leichten (MG 25 kDa) Polypeptidketten aufgebaut ist, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die aminoterminalen variablen V-Domänen der schweren und leichten Ketten bilden zusammen die variable Region des Antikörpers und verleihen ihm die Fähigkeit, ein spezifisches Antigen zu binden. Diese Region variiert stark zwischen verschiedenen Antikörpern. Die übrigen Domänen sind in den Immunglobulinketten desselben Isotyps dagegen konstant. Der

Einleitung

konstante Teil der schweren Ketten bestimmt die Antikörperklasse und Effektorfunktion des Antikörpers. Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau eines Antikörpermoleküls.

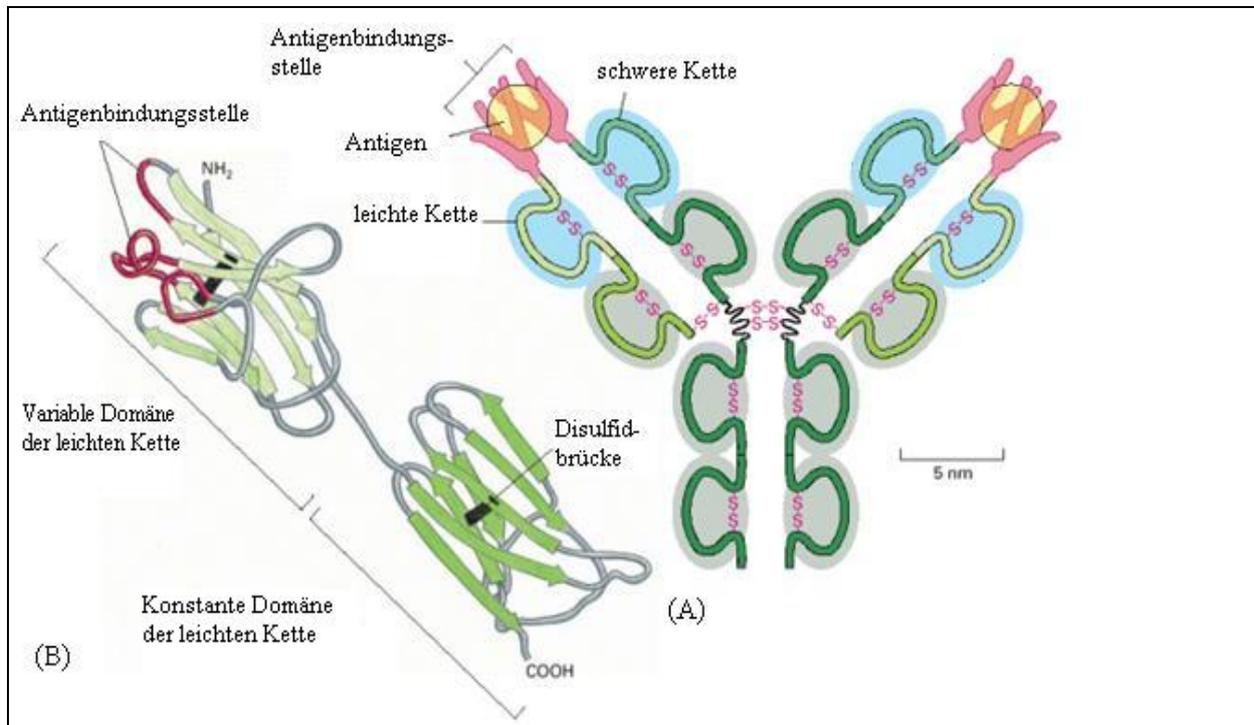


Abbildung 4: (A) Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls. Ein Antikörpermolekül hat eine Y-Form und zwei identische Antigenbindungsstellen, eine an jedem Arm des Y. Das Protein ist aus 4 Polypeptid-Ketten zusammengesetzt (2 identischen schweren und 2 identischen leichten Ketten), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette wird aus verschiedenen Domänen gebildet, die hier *blau* und *grau* gekennzeichnet sind. Die Antigenbindungsstelle befindet sich dort, wo die variable Domäne der schweren Kette (V_H) und die variable Domäne der leichten Kette (V_L) nah zusammen liegen. (B) Dieses Schleifenmodell einer leichten Kette zeigt die Teile der V_L Domäne in *rot*, die am nächsten mit der Antigenbindungsstelle verbunden sind (verändert nach [15]).

Die fünf wichtigsten Immunglobulin-Klassen sind IgM, IgA, IgE, IgD und IgG [22]. Diese verschiedenen Isotypen sind so ausgelegt, dass sie in unterschiedlichen Regionen des Körpers ihre Funktion erfüllen können. IgM-Moleküle bilden Pentamere und werden bei einer Infektion als erstes gebildet. Sie finden sich vor allem im Blut und sind besonders starke Aktivatoren des Komplementsystems. IgA-Moleküle bilden Dimere und sind die häufigsten Antikörper in Sekreten, besonders in den Schleimdrüsen des Darmes und des Bronchialsystems. IgA wirkt hauptsächlich als neutralisierender Antikörper an Körperoberflächen. IgE liegt als Monomer vor und findet sich vor allem auf der Zelloberfläche von Mastzellen. Eine Antigenbindung führt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus diesen Zellen. Der häufigste Isotyp im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten ist das IgG, welches im-

Einleitung

mer als Monomer vorliegt. Es opsoniert effizient Pathogene für die Aufnahme durch Phagozyten und aktiviert das Komplementsystem [22]. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper vom Isotyp IgG verwendet.

Die Motivation zur Entwicklung von Immunoerythrozyten ist deren Anwendung *in vivo* als Therapeutika zur spezifischen Bindung an Zielantigene, welche dem Blutkreislauf zugänglich sind. Zwei verschiedene therapeutische Anwendungsgebiete wurden bisher in Betracht gezogen. Zum einen könnten Erythrozyten Medikamente zu intravaskulären Zielen, wie zum Beispiel glatten Muskelzellen der Gefäßwand bei Gefäßschäden [25], Thromben [26, 27] und Endothelzellen [28, 29] transportieren, zum anderen ist es denkbar, Immunoerythrozyten zu verwenden, um bestimmte schädliche Substanzen aus dem Blutstrom zu eliminieren [30]. Wie weiter oben im Text bereits erwähnt, ist die Haupttodesursache bei einer Krebserkrankung die Metastasierung, welche in den meisten Fällen über das Blutgefäßsystem des Körpers stattfindet [3]. Es wäre von großer therapeutischer Bedeutung zirkulierende Krebszellen im Kreislauf gezielt zu zerstören, um das Risiko der Ausbildung von Metastasen zu vermindern und dabei den Organismus vor schweren Nebenwirkungen einer zytostatischen Therapie zu schützen. Um ein gezieltes Targeting zirkulierender Krebszellen im Blutgefäßsystem durch die Carrier-Erythrozyten zu erreichen, können die Erythrozyten mit spezifischen Krebsantikörpern gekoppelt werden.

Da die Membranoberfläche der Erythrozyten durch die Beladungsprozedur und das Anbringen von Antikörpermolekülen verändert wird, muss davon ausgegangen werden, dass diese modifizierten Zellen vorzeitig vom körpereigenen Immunsystem zerstört werden. Für therapeutische Zwecke ist es aber notwendig eine ausreichend lange Überlebensdauer der Immunoerythrozyten im Blutkreislauf zu erreichen, damit sie sich an die Zielzellen binden und mit ihnen interagieren können.

Hierfür ist es wichtig native, das heißt chemisch nicht stabilisierte Erythrozyten mit dem entsprechenden Antikörper zu koppeln. Durch eine chemische Fixierung der Erythrozyten können diese zwar stabilisiert und für lange Zeit haltbar gemacht werden, zugleich führt die Fixierung aber auch zu einer besonders schnellen Sequestrierung durch das RES, da sich zum einen ihre Membran nicht mehr verformen kann und sie zum anderen sehr anfällig werden für die Opsonierung durch Komplementfaktoren und autologes IgG, was zu einer verstärkten C3b- und Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose durch Makrophagen des RES führt [31-34]. Die Aktivierung des Komplementsystems führt außerdem zur Hämolyse der Erythrozyten, zur Bildung von den proinflammatorischen Peptiden C3a und C5a und

zum Anhaften der Erythrozyten nicht nur an kernhaltige Zellen wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothel, sondern auch an Komponenten der extrazellulären Matrix. Zusätzlich können Aggregate der fixierten und somit starren Erythrozyten die Lungenkapillaren mechanisch embolisieren [35]. Um dies alles möglichst zu vermeiden, sollen in der vorliegenden Arbeit native Erythrozyten mit einem monoklonalen Antikörper gekoppelt werden. Nach der Antikörperankopplung soll außerdem das Molekül Polyethylenglykol (PEG) an die Erythrozyten gebunden werden. In der Literatur ist beschrieben, dass die kovalente Bindung von Polyethylenglykol an Erythrozyten dazu führt, dass Antigene auf deren Oberfläche abgedeckt werden. Die PEGylierung war ursprünglich dazu gedacht, alle Blutgruppenantigene auf der Erythrozytenoberfläche abzudecken, um universale Spendererythrozyten für die Bluttransfusion zu entwickeln [36]. In der vorliegenden Arbeit sollen durch die PEGylierung Immunoerythrozyten entstehen, die nicht vorzeitig von den Zellen des RES abgebaut werden und somit das Potential besitzen lange im Blutkreislauf zu zirkulieren.

1.4 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Ankopplung monoklonaler Tumor-spezifischer Antikörper an native Erythrozyten mittels der Moleküle Biotin und Avidin. Die optimalen Bedingungen dieser Ankopplung werden charakterisiert, das heißt es sind die Biotin- beziehungsweise Avidinkonzentrationen zu bestimmen, bei denen eine optimale Ankopplung des Tumoran-tikörpers an die Erythrozytenoberfläche erreicht wird. Außerdem soll *in vitro* überprüft werden, ob eine PEGylierung die Immunogenität der Immunoerythrozyten herabsetzt und sie somit vor der Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten schützen kann. Es soll untersucht werden, ob ein Targeting der Tumorzellen durch die Immunoerythrozyten *in vitro* erfolgreich ist. Da die Erythrozyten später als Drug-Carrier verwendet werden sollen, sind sie mit einer Modellsubstanz, in diesem Fall FITC-Dextran zu beladen.

Der Nachweis der Kopplung von Antikörpern an die Erythrozytenoberfläche sowie ihre Beladung mit FITC-Dextran und das Targeting der Tumorzellen durch die Immunoerythrozyten soll mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laserscanningmikroskopie erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

- **Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)**

Als isotonische Pufferlösung wurde Dulbecco's phosphate buffered saline 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Phosphat, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , pH 7,4 (Sigma-Aldrich AG, Steinheim, Deutschland) verwendet. Der pH-Wert wurde, wenn erforderlich, mit 1 M NaOH auf 8 eingestellt.

- **0,2 % HSA** (Humanes Serum Albumin, Sigma-Aldrich)/ **1,5 M MES** (2-[N-Morpholino] ethansulfonsäure, Sigma-Aldrich), pH 7,4, wurde in isotonischer Konzentration als Lagerpuffer für die IgG-gekoppelten Erythrozyten verwendet.

- **Boratpuffer pH 9**: 50 mM Borax (Sigma-Aldrich) und 20 mM Borsäure (Merck). Im Boratpuffer wurde die PEGylierung der Erythrozyten durchgeführt.

- **PIGPA.C**: 100 mM Na^+ Phosphat, 100 mM Inosin, 100 mM Glukose, 100 mM Na^+ Pyruvat und 5 mM Adenin, 12% w/v NaCl, pH 7,4 [37]. PIGPA.C wurde zum Schließen der geöffneten Membranporen der Erythrozyten nach Durchführung der hypotonen Hämolyse verwendet.

- **RPMI 1640 Medium** (BioChrom AG, Berlin, Deutschland): Zellkulturmedium.

Für die Herstellung der Lösungen wurde deionisiertes Wasser (Deionat aus einer mehrstufigen Anlage bestehend aus Kiesfilter, Ionenaustauscher, Umkehrosiose und Sterilfilter mit einer Leitfähigkeit von 0,05 $\mu\text{S}/\text{cm}$) verwendet.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Für die Versuche wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Substanzen verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Substanzen und Herstellerangaben.

Substanz	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Borax (Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methoxy-Polyethylenglykol 5 kDa (mPEG), aktiviert mit Zyanurchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin	BioChrom AG, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	BioChrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10 mg/ml)	BioChrom AG, Berlin, Deutschland
EZ-Link TM Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Rockfort, USA
ImmunoPure [®] Avidin	Pierce, Rockfort, USA
ImmunoPure [®] Avidin FITC konjugiert	Pierce, Rockfort, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Verwendete Antikörper

Für die Experimente wurden die in Tabelle 3 angegebenen Antikörper verwendet. Die Verwendung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Der monoklonale Maus Antikörper Ep-CAM Ab-2 (Klon AUA1) ist gegen das epithel-spezifische Antigen (Ep-CAM) gerichtet, welches auf der baso-lateralen Zelloberfläche der meisten einfachen Epithelien und einer großen Mehrzahl der Karzinome exprimiert wird [38].

Tabelle 3: Verwendete Antikörper.

Antigen	Wirt/Klon/Isotyp	Form/ Konzentration	Hersteller
-----	Rind, polyklonal, IgG (Plasma-Antikörper vom Rind)	Gelöst, 1 mg/ml,	antibodies-online GmbH, Aachen, Deutschland
IgG-Rind	Ziege, polyklonal, IgG	FITC-konjugiert, lyophilisiert, 1 mg/ml	Immunotech, Marseille, Frankreich
Ep-CAM - Mensch	Maus, monoklonal, IgG	Gelöst, 200 µg/ml	Lab-Vision Corporation, Fermont, USA
IgG-Maus	Ziege, polyklonal, IgG	FITC konjugiert, lyophilisiert, 1 mg/ml	Immunotech, Marseille, Frankreich

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 4 werden die genutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Versuche aufgeführt.

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie Herstellerangaben.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Labofuge 400	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Biofuge primo R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
CLSM Meta 4	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
BD FACSCanto™ flow cytometer	BD BioSciences, San Jose, USA
Zetasizer Nano	Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland
Explorer Feinwaage	Ohaus, Pine Brook, USA
CO ₂ -Inkubator CB 210 APT.Line	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Sterilwerkbank Thermo HS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Mikroporfilter (Microcon 0,5 ml) Porengröße 50 kD	Millipore, Massachusetts, USA
Phagozytoseassay, Phagotest®	Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland
Objektträger, ibidi µ-Slides 8 well	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Biotinylierung von IgG

Die Ankopplung von IgG an die äußere Erythrozytenmembran erfolgte über die Moleküle Biotin und Avidin, die aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften in der Biomedizin eine breite Anwendung als einfaches und spezifisches Vernetzungsmittel finden [39].

Biotin ist ein Vitamin (MG 244 Da), das als Co-Faktor der Carboxylasen fungiert [40]. Sulfo-NHS-LC-Biotin (Sulfosuccinimidyl-6-[biotinamido] hexanoat) reagiert mit ϵ -amino-Gruppen des Lysins unter Bildung einer Amid-Bindung. Lysin kommt in den meisten Proteinen häufig vor und nimmt in diesen charakteristischerweise eine exponierte Position ein. Darüber hinaus hat die Modifikation der Lysinreste keinen nennenswerten Effekt auf die Interaktion zwischen dem Antikörper und seinem Substrat, da diese normalerweise nicht direkt an den Bindungsvorgängen beteiligt sind [41].

Durch seine geringe Größe beeinflusst Biotin die Eigenschaften eines Makromoleküls nach Bindung in der Regel nicht. Die Anwendung des Sulfo-NHS-LC-Biotins (MG 556,59 Da; Pierce, Rockford, USA) hat sich für Makromoleküle (z.B. Glykoproteine) als vorteilhaft gezeigt. Hierbei wird durch eine zusätzliche Kette mit 6 Kohlenstoffmolekülen (Hexanoat-Spacer, 22,4 Å) das Auftreten einer sterischen Hinderung reduziert. Gleichzeitig wird das Biotin auf der Proteinoberfläche stärker exponiert und ist damit leichter zugänglich für eine Bindung mit Avidin (s. 2.2.4) [39]. Die Bindung von Biotin an primäre Amine der Proteine erfolgt über die aktivierte Gruppe (Sulfo-NHS) eines N-Hydroxysuccinimid-Esters (Abb. 5). Die Biotinylierung wird in einem schwach alkalischen pH-Bereich von 7-9 durchgeführt, da der NHS-Ester mit der deprotonierten Form des primärenamins reagiert. Das Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde zur Minimierung des Reaktionsverlustes erst unmittelbar vor Gebrauch gelöst, da in wässrigen Lösungen die Hydrolyse-reaktion des NHS-Esters als Konkurrenzreaktion zur Aminierung abläuft [41].

Für die Vorversuche wurde polyklonales IgG vom Rind biotinyliert. Für die Hauptversuche wurde monoklonales IgG von der Maus mit der Spezifität gegen Ep-CAM biotinyliert.

Um eine optimale Biotinylierung zu erhalten, wurde das Biotin im Verhältnis zum Antikörper in einem 25- bis 30-fachen molaren Überschuss zugegeben. Es wurde eine 6,6 μ M Stammlösung für das IgG in PBS (pH 8) und eine 1,79 mM Stammlösung für Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS (pH 8) angesetzt. Für die Biotinylierung wurden 200 μ l der IgG-

Stammlösung mit 20 μl der Biotin-Stammlösung versetzt. Die Biotinylierung wurde demnach bei einer Endkonzentration von 6 μM für IgG und 163 μM für Biotin durchgeführt. Nach Zugabe des Biotins zu der IgG-Lösung wurde unter mäßigem Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Biotin wurde anschließend mittels Mikroporfilter (Millipore, San Diego, USA) mit einer Porengröße von 50 kDa entfernt. Dazu wurde der Biotinylierungsansatz in den Mikroporfilter überführt und für 5 min bei 3500 g zentrifugiert. Zum Waschen des Antikörpers wurde 500 μl PBS in den Mikroporfilter pipettiert und weitere 5 min bei 3500 g zentrifugiert. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Waschvorgangs wurde das biotinylierte IgG (B-IgG) auf ein Volumen von 200 μl bei einer Konzentration von 6,6 μM eingengt, mit 0,1 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

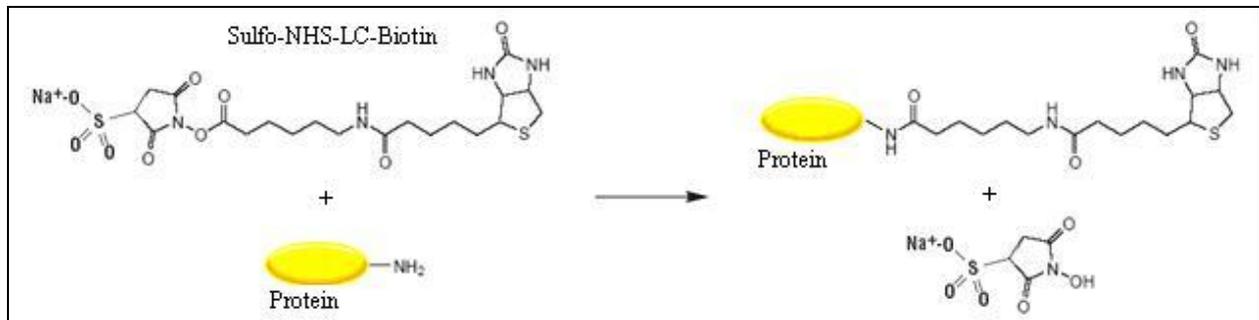


Abbildung 5: Reaktion von Sulfo-NHS-LC-Biotin mit einem primären Amin [42].

2.2.2 Erythrozytengewinnung

Das Blut wurde von der Blutbank Charité zur Verfügung gestellt. Die schriftliche Zustimmung der Spender lag vor. Das Vollblut wurde mit EDTA antikoaguliert und bei 20 °C abzentrifugiert (2500 g, 5 min) und das Plasma sowie der buffy coat abgenommen. Es erfolgte dreimaliges Waschen der Erythrozyten mit isotoner ($\pi = 300$ mosm) PBS pH 8.

2.2.3 Biotinylierung der Erythrozyten

10 ml EDTA-Blut wurden bei 2000 g 10 min zentrifugiert. Plasma und buffy coat wurden entfernt. Daraufhin wurde die Probe drei Mal mit PBS pH 8 gewaschen. Wie schon bei der Biotinylierung der Antikörper unter 2.2.1 beschrieben, wurde die Reaktion in einem schwach alkalischen pH-Bereich von 7-9 durchgeführt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde eine Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 10 % in PBS pH 8 ange-

setzt. Die Biotinylierung wurde bei 0,08 mM, 0,17 mM, 0,89 mM beziehungsweise 1,79 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin durchgeführt. Die Proben wurden gut gemischt und bei Raumtemperatur unter mäßigem Schütteln für 30 min inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Sulfo-NHS-LC-Biotin durch dreimaliges Waschen mit PBS pH 8 entfernt. Mit den biotinylierten Erythrozyten (B-Erythrozyten) wurde eine Suspension mit einem Hämatokrit von 10 % angesetzt.

2.2.4 Avidinierung der Erythrozyten

Das Hühnereiweiß Avidin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 67 kDa, das aus vier identischen Untereinheiten aus jeweils 128 Aminosäuren besteht. Es besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Die nicht-kovalente Bindung zwischen Avidin und Biotin besitzt die höchste bisher bekannte Affinität zwischen einem Protein und einem Liganden ($K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$) und ist in etwa 10^3 - 10^6 Mal stärker als die Interaktion zwischen einem Liganden und seinem spezifischen Antikörper [39]. Die Bindung zwischen Biotin und Avidin erfolgt über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen [43].

Zur Avidinierung wurden jeweils 100 μl gepackte B-Erythrozyten in ein Falconröhrchen gegeben und in 5 ml PBS pH 8 resuspendiert. Die B-Erythrozyten wurden mit vier verschiedenen Avidinkonzentrationen versetzt. Hierfür wurden Avidinlösungen mit Konzentrationen von 3,7 μM , 7,5 μM , 14,9 μM beziehungsweise 37,3 μM Avidin in PBS pH 8 angesetzt. Von diesen Lösungen wurden jeweils 200 μl zu der B-Erythrozytensuspension dazugegeben. Die Avidinierung fand also bei einer Endkonzentration von 0,14 μM , 0,28 μM , 0,56 μM beziehungsweise 1,41 μM Avidin in einem Gesamtvolumen von 5,3 ml statt. Die Proben wurden gut gemischt und unter mäßigem Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde freies Avidin durch dreimaliges Waschen mit PBS pH 8 entfernt. Dieser Vorgang wurde für die Versuche, in denen die Erythrozyten mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden, in gleicher Weise mit FITC-Avidin durchgeführt.

2.2.5 Antikörperankopplung an die Erythrozytenoberfläche

Die Optimierungsversuche wurden mit einem Modellantikörper der IgG-Klasse (Spezies Rind) durchgeführt, da der später verwendete monoklonale Tumorantikörper Ep-CAM Ab-2 (Klon AUA1) ebenfalls der IgG-Klasse (Spezies Maus) angehört.

Die Antikörper-Ankopplung erfolgte bei dem Modellantikörper und bei dem Tumorkörper nach demselben Prinzip (Abb. 6). 100 µl biotinylierte und avidinierte Erythrozyten (A/B-Erythrozyten) gelöst in 5 ml PBS pH 8 wurden mit 0,04 µM B-IgG-Lösung versetzt und für 30 min unter mäßigem Schütteln inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS pH 8, um freie Antikörper zu entfernen. Die beladenen Erythrozyten wurden in 5 ml 0,2 % HSA/ 1,5 M MES pH 7,4 resuspendiert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Die Qualitätskontrolle der Ankopplung erfolgte durchflusszytometrisch anhand eines FITC-konjugierten sekundären Ziege anti-IgG-Rind-Antikörpers gegen den Modellantikörper beziehungsweise mit einem FITC-konjugierten sekundären Ziege anti-IgG-Maus-Antikörper gegen den Tumorkörper (Abb. 6). Hierzu wurden 10 µl der Probe und 5 µl des sekundären Antikörpers (1 mg/ml) in 50 µl PBS pH 8 gegeben und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Probe in 500 µl PBS pH 8 resuspendiert und am Durchflusszytometer untersucht. Als Negativkontrolle wurden A/B-Erythrozyten ohne IgG mit demselben sekundären Antikörper inkubiert, um eine Kreuzreaktion zwischen dem sekundären Antikörper und den Erythrozyten, beziehungsweise Biotin und Avidin auszuschließen.

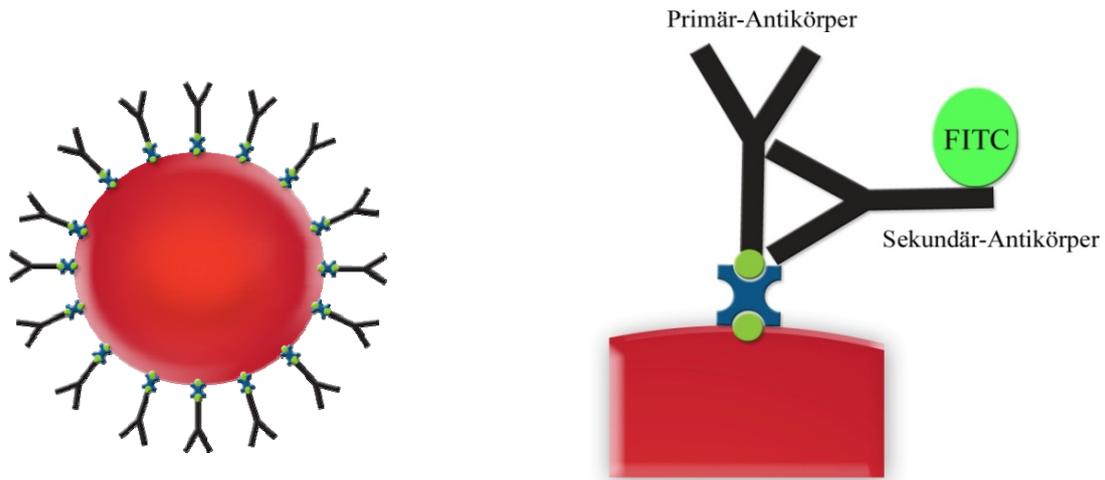


Abbildung 6: Links: Schema eines Immunoerythrozyten. Spezifische Antikörper (schwarzes Y) werden über eine Biotin (grüne Kugel)/ Avidin (blaues Kreuz) -Brücke an die Erythrozytenoberfläche angekoppelt. Rechts: Ausschnitt eines Immunoerythrozyten. Der FITC-konjugierte Sekundär-Antikörper (FITC anti-IgG) bindet an den Primär-Antikörper (IgG). Das FITC-Signal lässt sich mit dem Durchflusszytometer analysieren.

2.2.6 Beladung der IgG-gekoppelten Erythrozyten mit FITC-Dextran

Für die Beladung der IgG-gekoppelten Erythrozyten mit der Modells substanz FITC-Dextran wurde ein auf der hypotonen Hämolyse beruhendes Verfahren, die sogenannte Verdünnungsmethode (engl. dilutional method) in abgewandelter Form nach Brähler *et al.* [44] angewandt (Abb. 7). Das Prinzip der hypotonen Hämolyse basiert auf der Tatsache, dass Erythrozyten, die in eine hypotone Lösung gegeben werden, anschwellen und ihre Membranpermeabilität durch die Ausbildung von großen Poren (Durchmesser: 200 - 500 Å) deutlich zunimmt. Durch Erhöhen der Salzkonzentration ist es möglich, diese Poren wieder zu schließen. Die Erythrozyten nehmen ihre ursprüngliche bikonkave Form wieder ein [37].

Es wurden 10 ml EDTA-Vollblut mit 2000 g für 10 min zentrifugiert und anschließend drei Mal mit PBS pH 8 gewaschen. Zu 1 ml gewaschenem Sediment wurden 300 µl PBS pH 8 und 300 µl FITC-Dextran (5 mg / 100 µl) mit einem Molekulargewicht von 77.000 Da gegeben. Die Proben wurden gut gemischt. Zum Öffnen der Poren der Erythrozytenmembran wurden nun 1500 µl kaltes *aqua dest.* dazugegeben, die Proben erneut gut gemischt und für eine Stunde unter mäßi-

gem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Zur Wiederherstellung einer isotonen Osmolarität wurden anschließend 51 µl PIGPA.C dazugegeben (100 mM Na⁺Phosphat, 100 mM Inosin, 100 mM Glukose, 100 mM Na⁺Pyruvat und 5 mM Adenin, 12% w/v NaCl, pH 7,4). Die Proben wurden gut gemischt und bei 37 °C im Wasserbad für eine weitere Stunde inkubiert, so dass sich die Poren der Erythrozytenmembranen wieder schließen konnten. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben drei Mal mit PBS pH 8 gewaschen (800 g, 15 min). Die Beladung der Erythrozyten mit FITC-Dextran wurde mit dem Durchflusszytometer und dem konfokalen Lasermikroskop kontrolliert.

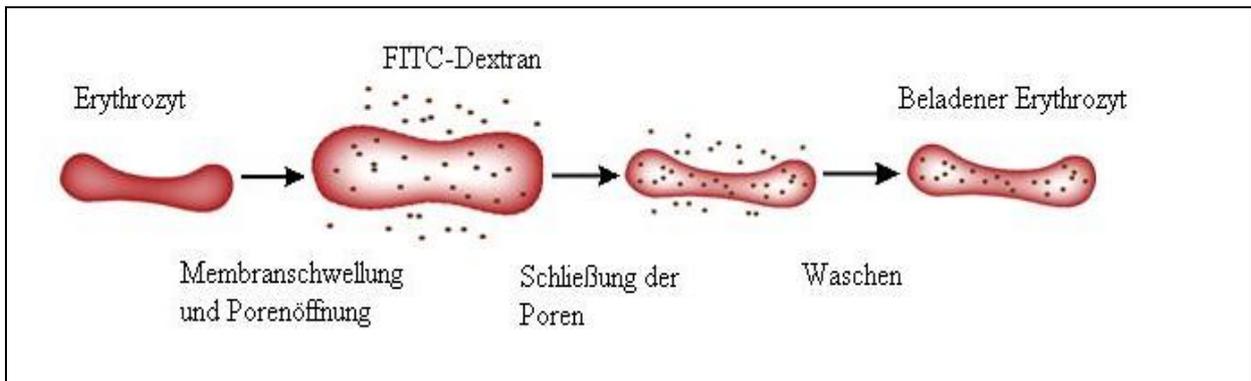


Abbildung 7: Schema der Beladungsprozedur von Erythrozyten mit FITC-Dextran über das Verfahren der hypotonen Hämolyse.

2.2.7 PEGylierung der Erythrozyten

PEG (Polyethylenglykol) ist ein nicht-ionischer Polyether mit der Grundstruktur $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, der in vielen verschiedenen Molekulargewichten (10^1 - $8 \cdot 10^6$ g/mol) und Konfigurationen (linear, verzweigt, sternförmig) vorhanden ist. PEG-Moleküle sind nicht geladen. Durch ihre Fähigkeit drei Wassermoleküle pro Ethylen-oxid-Einheit zu binden, sind sie wasserlöslich und bilden in wässriger Lösung eine große Hydratschicht um sich aus. Gebunden an die Erythrozytenoberfläche entsteht somit ein Schild aus Wasser, das Antigene auf der Erythrozytenoberfläche abdeckt [45] (Abb. 8). Ursprünglich war die PEGylierung dazu gedacht, alle Blutgruppenantigene auf der Erythrozytenoberfläche abzudecken, um universale Spendererythrozyten für die Bluttransfusion zu entwickeln [36]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit methoxy-Polyethylenglykol (mPEG) 5 kDa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), welches mit Zyanurchlorid aktiviert war, gearbeitet. Es bindet kovalent an ϵ -amino-Gruppen des Lysins an der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran unter Ausbildung einer Amidbindung [45].

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob eine PEGylierung die Antikörper-gekoppelten Erythrozyten vor der Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten *in vitro* schützen kann (s. 2.2.8).

Die PEGylierung von IgG-gekoppelten Erythrozyten erfolgte in abgewandelter Weise nach einem Protokoll von Scott *et al.* [46].

200 mg mPEG 5 kDa, konjugiert mit Zyanurchlorid wurden in 10 ml Boratpuffer pH 9 kurz vor Zugabe von 500 μ l Erythrozytensediment gelöst. Die PEGylierung wurde bei einer Endkonzentration von 3,8 mM für mPEG durchgeführt. Die Zellen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in dem Puffer inkubiert und anschließend drei Mal mit PBS pH 8 gewaschen. Zur pH-Kontrolle wurden IgG-gekoppelte Erythrozyten in Boratpuffer pH 9 ohne die Zugabe von mPEG inkubiert. Als Qualitätskontrolle wurde das Zeta Potential gemessen (s. 2.2.12).

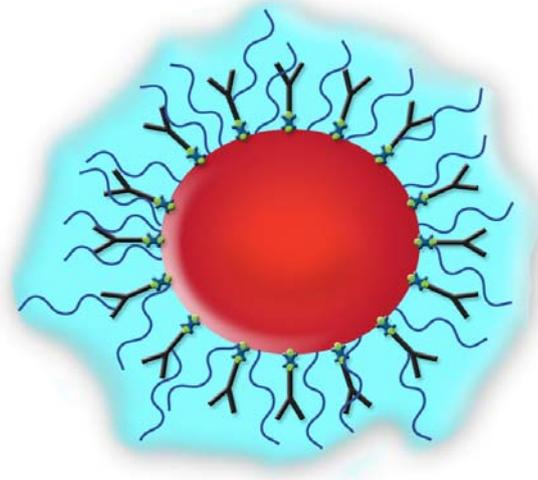


Abbildung 8: Schema eines PEGylierten Immunoerythrozyten. Das Molekül mPEG wird durch die blaue geschlängelte Linie und die Hydratschicht durch die hellblaue Farbe dargestellt.

2.2.8 Phagozytoseassay

Zur Bestimmung der Phagozytenaktivität wurde ein Phagozytoseassay (Phagotest[®], Orpegen Pharma Heidelberg, Deutschland) benutzt, welcher eine FITC-opsonierte *E.coli*-Suspension, Quenclösung, DNA-Färbelösung, Lyse-Lösung und Instamed-Salze für die Waschlösung enthält. Der Phagozytoseassay findet in der Labormedizin Anwendung bei

der *in vitro* Bestimmung der quantitativen Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten im Vollblut.

In der vorliegenden Arbeit diente er zur Kontrolle, ob die PEGylierung die IgG-gekoppelten Erythrozyten vor der Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten schützen kann. Sowohl für die Testansätze als auch für die Kontrollansätze wurde frisches heparinisieretes Vollblut vom Menschen mit den modifizierten autologen Erythrozyten im Verhältnis 5:1 gemischt. Während der Testansatz im Wasserbad für 60 min bei 37,0 °C inkubiert, blieb die Kontrolle auf Eis stehen. Um die Phagozytose zu stoppen wurden die Proben des Testansatzes zeitgleich auf Eis gestellt. Die Zugabe von Quenchlösung löschte die Fluoreszenz von nicht aufgenommenen FITC-Partikeln. Es schlossen sich zwei Waschungen mit der isotonen Waschlösung an (5 min, 250 g, 4 °C). Mittels Lyse-Lösung wurden die Erythrozyten bei zeitgleicher Fixierung der Leukozyten lysiert. Zur Beseitigung von Zellresten wurden die Ansätze zwei Mal mit der isotonen Waschlösung gewaschen (5 min, 250 g, 4 °C) und der Überstand dekantiert. Nach der zweiten Waschung wurden 100 µl der DNS-Färbelösung Probidiumiodid (PI) zur Färbung der Leukozyten-DNS zur Probe hinzugegeben. PI gelangt durch die Kernmembran und lagert sich dort an die DNS an, wobei ein starkes Fluoreszenzsignal nach Anregung mit visuellem Licht der Wellenlänge 543 nm und einer Emissionsmaximierung bei 580 nm entsteht. Innerhalb von 60 min erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

2.2.9 Zellkultur

2.2.9.1 Verwendete Zellen

Für die Versuche wurden Mammakarzinom-Zellen der Zelllinie T47D verwendet (Abb. 9). Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Possinger, Klinik für Hämatologie/ Onkologie der Charité-Universitätsmedizin zur Verfügung gestellt.

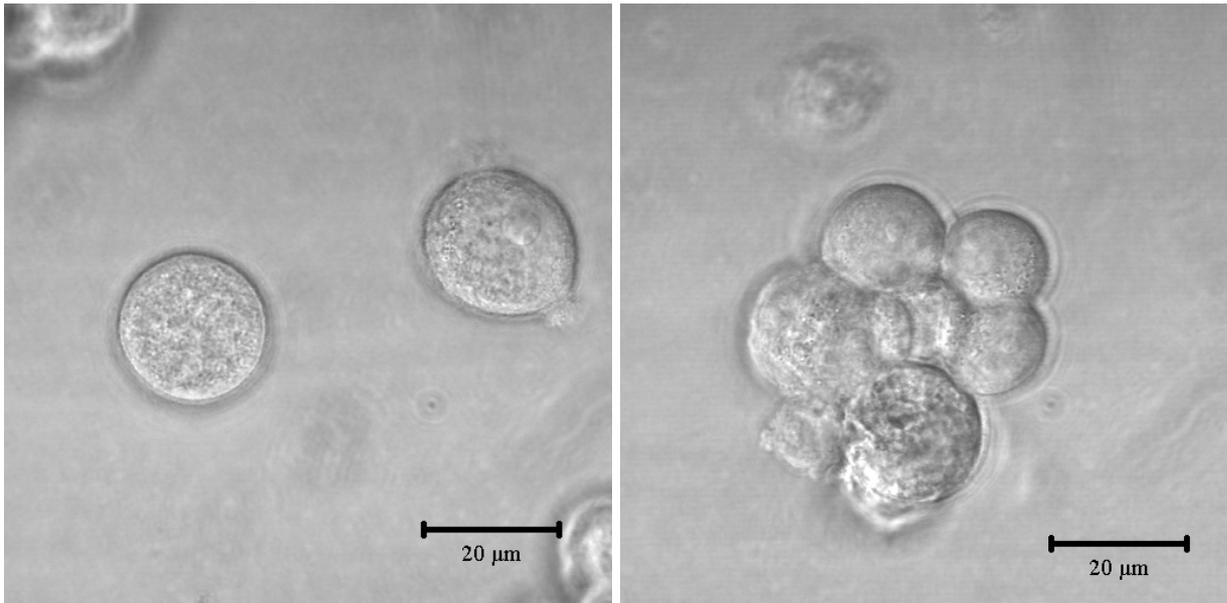


Abbildung 9: CLSM-Aufnahmen. Links: Zwei einzelne Mammakarzinom-Zellen der Zelllinie T47D. Rechts: Verband aus 5 Mammakarzinom-Zellen der Zelllinie T47D. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

2.2.9.2 Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und bei 95 % Luftfeuchtigkeit in RPMI 1640 (BioChrom, Berlin, Deutschland) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (BioChrom, Berlin, Deutschland).

2.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension. Sie erlaubt die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität und mehrerer verschiedener Fluoreszenzsignale. Abbildung 10 zeigt die schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers.

Das Messprinzip des Durchflusszytometers (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) besteht darin, dass die zu messenden Zellen umgeben von einem Hüllstrom durch eine Küvette gedrückt werden. Der Hüllstrom dient einerseits der Beschleunigung der Zellen, andererseits der Auflösung von Aggregaten. Dieser Vorgang wird hydro-dynamische Fokussierung genannt. Der dabei entstehende Strom aus einzelnen Zellen passiert in der Küvette einen monochromatischen Laserstrahl, der jede Zelle einzeln erfasst. Trifft der Laserstrahl auf eine passierende Zelle, so entsteht Streulicht. Dieses Streulicht wird von Detektoren

mindestens zweier Kategorien registriert, dem Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC). Das Vorwärtsstreulichtsignal ist vornehmlich von der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht mehrheitlich von der Granularität der jeweiligen Zelle abhängig. Zusätzlich können mehrere Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlängen simultan registriert werden. Das Durchflusszytometer misst in Kanälen unterschiedlicher Empfindlichkeit und kann dadurch das Fluoreszenzsignal quantifizieren. Da es keine mitgeführten Standardeinheiten für die Fluoreszenzintensität gibt, werden relative Einheiten [rel. E.] angegeben. Als Standard galt die Fluoreszenzintensität von IgG-gekoppelten Erythrozyten. Es wurde stets unter den gleichen Einstellungen gemessen.

In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer zur Detektion der Antikörper auf der Oberfläche von Erythrozyten verwendet. Dies erfolgte mit Hilfe von sekundären Antikörpern, die mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert waren.

Gemessen wurde am BD FACSCanto™ flow cytometer (BD BioSciences, San Jose, USA). Die Software FCS Express Version 3 Research Edition wertete die gemessenen Signale aus. Die Messprozedur beginnt, indem die gemessenen Signale der Zellen in einem doppelt logarithmischen Diagramm (SSC gegen FSC) dargestellt werden (Abb. 11). In diesem Diagramm kann man bestimmte Bereiche definieren (gaten) und dadurch verhindern, dass Verunreinigungen oder Zelltrümmer in die Analyse eingehen [47].

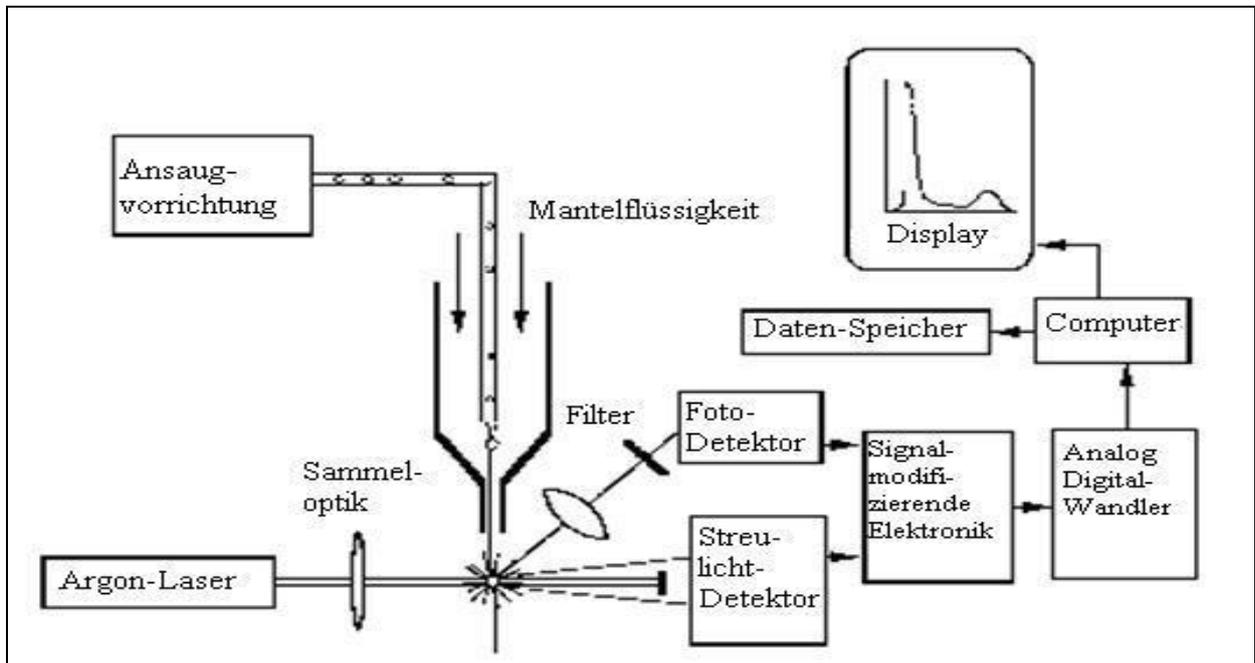
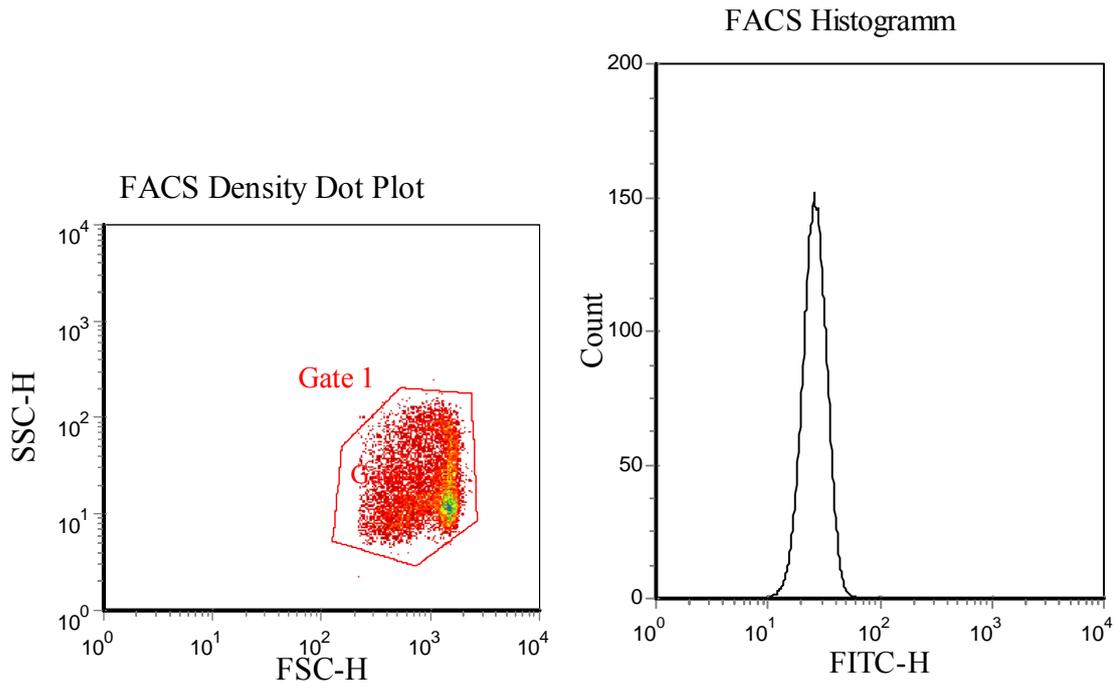


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers (verändert nach [48]).



Histo gram	Parameter	# of Events	% of gated cells	Median	Geometric Mean	Arithmetic Mean	CV
1	FITC-H	10000	100,0	26,18	26,03	27,12	95,4

Abbildung 11: Darstellungsoptionen der Software FCS Express Version 3 Research Edition. Oben links: Density Dot Plot von IgG-gekoppelten Erythrozyten, Darstellung der gemessenen SSC/FSC-Streulichtwerte. Oben rechts: Histogramm der Fluoreszenzintensität sekundärer FITC-konjugierter anti-IgG Antikörper auf der Oberfläche von IgG-gekoppelten Erythrozyten. Unten: Statistische Auswertung des FITC-Signals aus dem Histogramm.

FACS-Rohdaten enthalten oft weit außerhalb liegende Ereignisse und der Versuch all diese Ereignisse systematisch durch das Setzen von Gates auszuschließen ist nicht praktikabel, deshalb wurde zur Datenauswertung robuste Statistik angewendet [49]. Robuste Statistik ist resistenter gegenüber statistischen Einflüssen von außerhalb liegenden Ereignissen in einer Probe. Das robuste Äquivalent zum arithmetischen Mittelwert ist der Median. Die robuste Standardabweichung (rSTABW) errechnet sich wie folgt aus dem Median und den einzelnen Messwerten (X_i):

$$rSTABW = (\text{Median von } \{|X_i - \text{Median}_x|\}) * 1,4826$$

Der Wert 1,4826 ist eine Konstante, die die robusten Werte an das Äquivalent einer Population mit Normalverteilung angleicht.

2.2.12 Bestimmung des Zeta Potentials

Biologische Membranen besitzen aufgrund ihres molekularen Aufbaus anionische und kationische Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen den entsprechenden Objekten im Allgemeinen eine negative Überschussladung verleihen. Diese Überschussladung wird durch entgegengesetzt geladene Ionen (Gegenionen) elektrisch neutralisiert. Der Bereich aus Oberflächenladungen und Gegenionen, in welchem der elektrische Potentialabfall erfolgt, wird als elektrische Doppelschicht bezeichnet. Wird die geladene Oberfläche relativ zur Elektrolytlösung bewegt, so wird der an der Gleitebene (Hydrodynamische Scherebene) auftretende Potentialabfall als Zeta Potential definiert [51] (Abb.13), welches zur Charakterisierung der Oberflächenladung der Zellen herangezogen wird.

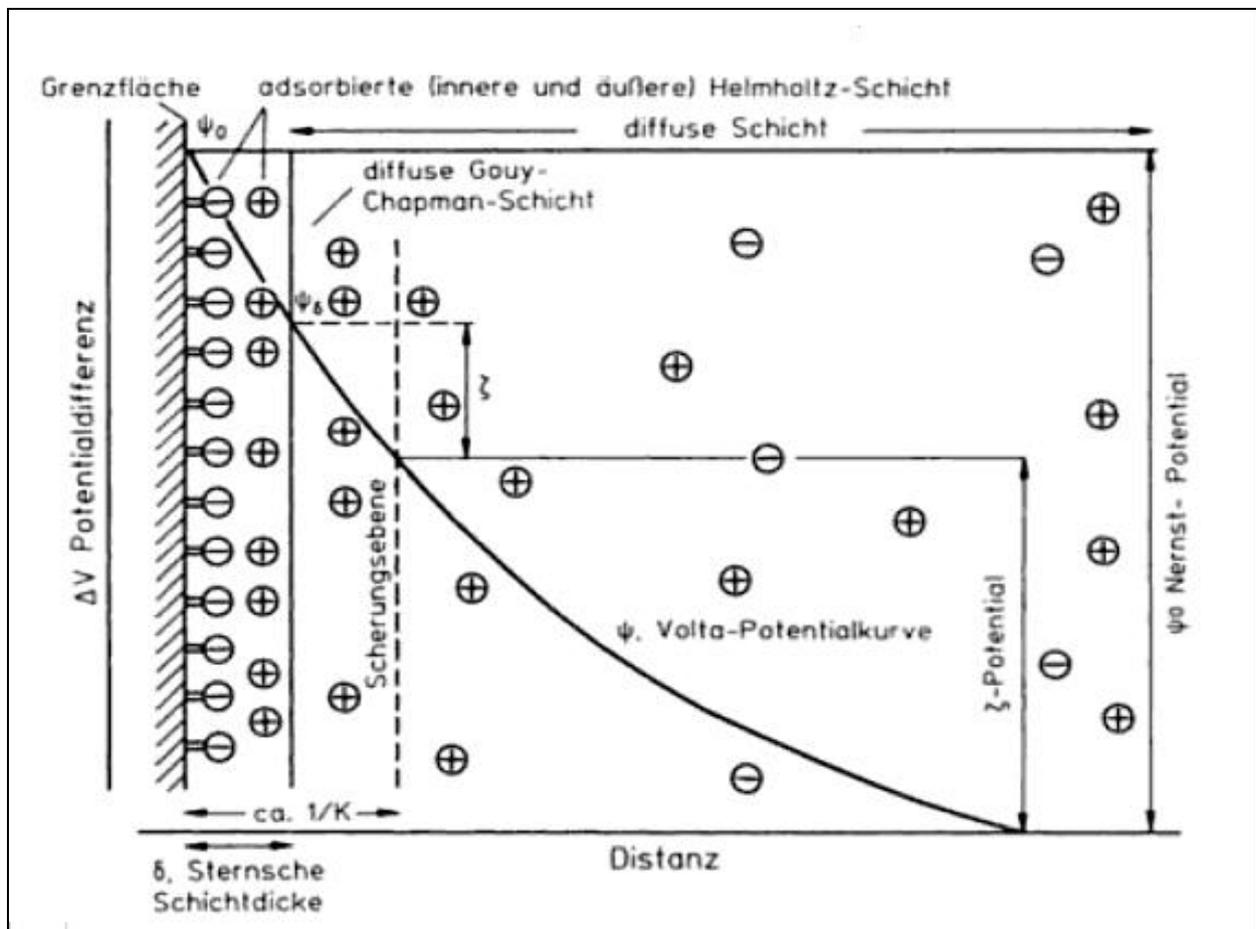


Abbildung 13: Grenzflächenpotentiale. ψ_0 Nernst-Potential = elektrochemisches Potential, ψ_δ Potential der Helmholtz-Doppelschicht, ξ Zeta-Potential = Potential der Scherebene = elektrokinetisches Potential, δ Schichtdicke der Stern-Schicht, $1/\kappa$ Maß für die diffuse Gouy-Chapman-Schicht, κ = Debye-Hückel-Länge [52].

Material und Methoden

In dieser Arbeit diente die gemessene Änderung des Zeta Potentials dem Nachweis der erfolgreichen PEGylierung. Durch die stark hydrierten Seitenketten des PEG-Moleküls verschiebt sich die Gleitebene und somit wird der Wert des Zeta Potentials verändert. Die Messungen wurden an einem Zetasizer Nano 3000 (Malvern, Herrenberg, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 1 μ l Sediment nativer Erythrozyten, PEGylierter Erythrozyten, IgG-gekoppelter Erythrozyten beziehungsweise PEGylierter IgG-gekoppelter Erythrozyten in 1 ml 300 mOsm Saccharose-Lösung resuspendiert und das Zetapotential der Proben gemessen. Die Leitfähigkeit der 300 mOsm Saccharoselösung betrug im Mittel $0,039 \text{ mS/cm} \pm 0,014$. Zur Eichung des Gerätes wurde ein Zetastandard der Firma Malvern mit einem Zeta Potential von -50 mV verwendet.

3 Ergebnisse

Zunächst werden die Ergebnisse der IgG-Ankopplung an die Erythrozytenoberfläche abhängig von der Verwendung unterschiedlicher Biotin- beziehungsweise Avidinkonzentrationen beschrieben. Anschließend wird die Stabilität des gekoppelten Antikörpers über mehrere Tage untersucht. Die Ergebnisse der Beladungsversuche mit FITC-Dextran sowie die Ergebnisse der PEGylierung der Erythrozyten werden aufgeführt. Zuletzt wird gezeigt, ob die modifizierten Erythrozyten dazu in der Lage sind, die Mammakarzinom-Zellen der Zelllinie T47D *in vitro* spezifisch zu binden.

3.1 Ankopplung von IgG an die Erythrozytenoberfläche

Die Ankopplung von IgG an die Oberfläche nativer Erythrozyten erfolgte mit Hilfe der Moleküle Biotin und Avidin. Hierfür wurden die optimalen Biotin- beziehungsweise Avidinkonzentrationen bestimmt. Alle Optimierungsversuche wurden zunächst mit einem Modellantikörper der IgG-Klasse (Spezies Rind) durchgeführt, da der später verwendete Tumorantikörper Ep-CAM Ab-2 (Klon AUA-1) ebenfalls der IgG-Klasse angehört.

3.1.1 Optimierung der Biotinkonzentration

Die Biotinylierung der Erythrozyten wurde nach dem Protokoll wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden Biotinkonzentrationen im Bereich von 0,08 mM bis 1,79 mM bei zunächst gleichbleibender Avidinkonzentration verwendet. Das Ziel war die Bestimmung der Biotinkonzentration, welche eine optimale Ankopplung von IgG an die Oberfläche der Erythrozyten ermöglicht. Gleichzeitig sollte eine Quervernetzung zwischen den verschiedenen Biotin/Avidin-Komplexen und somit eine Agglutination der Erythrozyten möglichst vermieden werden.

Die Morphologie der Erythrozyten sollte sich durch die Biotinylierung möglichst nicht verändern. Die Biotinylierung wurde mit 0,08 mM, 0,17 mM, 0,89 mM beziehungsweise 1,79 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin in einer Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 10 % durchgeführt. Die Morphologie der Erythrozyten wurde mittels CLSM beurteilt. Beispiele für den Einfluss der Biotinkonzentration auf die Erythrozytenmorphologie sind in

Ergebnisse

Abbildung 14 dargestellt. Um den Einfluss der Biotinkonzentration zumindest semiquantitativ zu erfassen, wurde der prozentuale Anteil der Erythrozyten in den verschiedenen Proben bestimmt (Tab. 5). Nach Inkubation mit 0,08 mM beziehungsweise 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin wurden jeweils weniger als 3 % Erythrozyten gezählt. In den Proben, welche mit 0,89 mM beziehungsweise 1,79 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert wurden, nahm die Tendenz zur Ausbildung von Agglutinaten um mehr als das Zehnfache im Vergleich mit den niedrigen Biotinkonzentrationen zu.

Anschließend wurden jeweils 100 μ l B-Erythrozyten der 0,08 mM, 0,17 mM und 0,89 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Proben mit 200 μ l einer 0,28 μ M Avidin versetzt. Die A/B-Erythrozyten wurden mit 0,04 μ M B-IgG gekoppelt. Da sich in der 1,79 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe zu einem erheblichen Teil Erythrozyten ausgebildet hatten, wurde diese Probe nicht mehr mit IgG gekoppelt. Zur Überprüfung, ob IgG erfolgreich an die Erythrozytenoberfläche angekoppelt wurde, erfolgte die Inkubation der Proben mit dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper Ziege anti-IgG-Rind. Dieser sekundäre Antikörper bindet an das IgG, welches an die Erythrozytenoberfläche gekoppelt ist. Die fluoreszierenden Zellen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Pro Probe wurden 10.000 Ereignisse gemessen. Zur Charakterisierung des Fluoreszenzsignals wurde der Median der Fluoreszenzintensität (F_{Median}) in relativen Einheiten [rel. E.] und die robuste Standardabweichung (rSTABW) als Maß für die Streuung der Werte benutzt. Der F_{Median} der Fluoreszenzintensität war bei der 0,08 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe am niedrigsten, stieg bei der 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe deutlich an und fiel bei der 0,89 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe wieder ab (Tab. 6). Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Ein repräsentatives Histogramm der Fluoreszenzintensität der 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe zeigt Abbildung 15. In dem Dotplot der Abbildung 16 ist die Fluoreszenzintensität in Bezug auf das Vorwärtsstreulicht (FSC) dieser Erythrozyten dargestellt. Die Erythrozyten zeigten eine gleichmäßige Fluoreszenzintensität, bei einer leichten Variabilität des Vorwärtsstreulichtes.

Ergebnisse

Tabelle 5: Optimierung der Biotinkonzentration. Anteil an Echinozyten in Prozent an den mit 0,08 mM, 0,17 mM, 0,89 mM beziehungsweise 1,79 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin (in einer Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 10 %) biotinylierten Erythrozyten. Angegeben sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen und die Standardabweichung. Ausgezählt wurden jeweils $n = 3 \cdot 80$ Zellen.

Biotinkonzentration [mM]	0,08	0,17	0,89	1,79
Anteil Echinozyten [%] \pm STABW	$2,36 \pm 1,17$	$2,26 \pm 1,32$	$29,20 \pm 3,00$	$58,06 \pm 6,27$

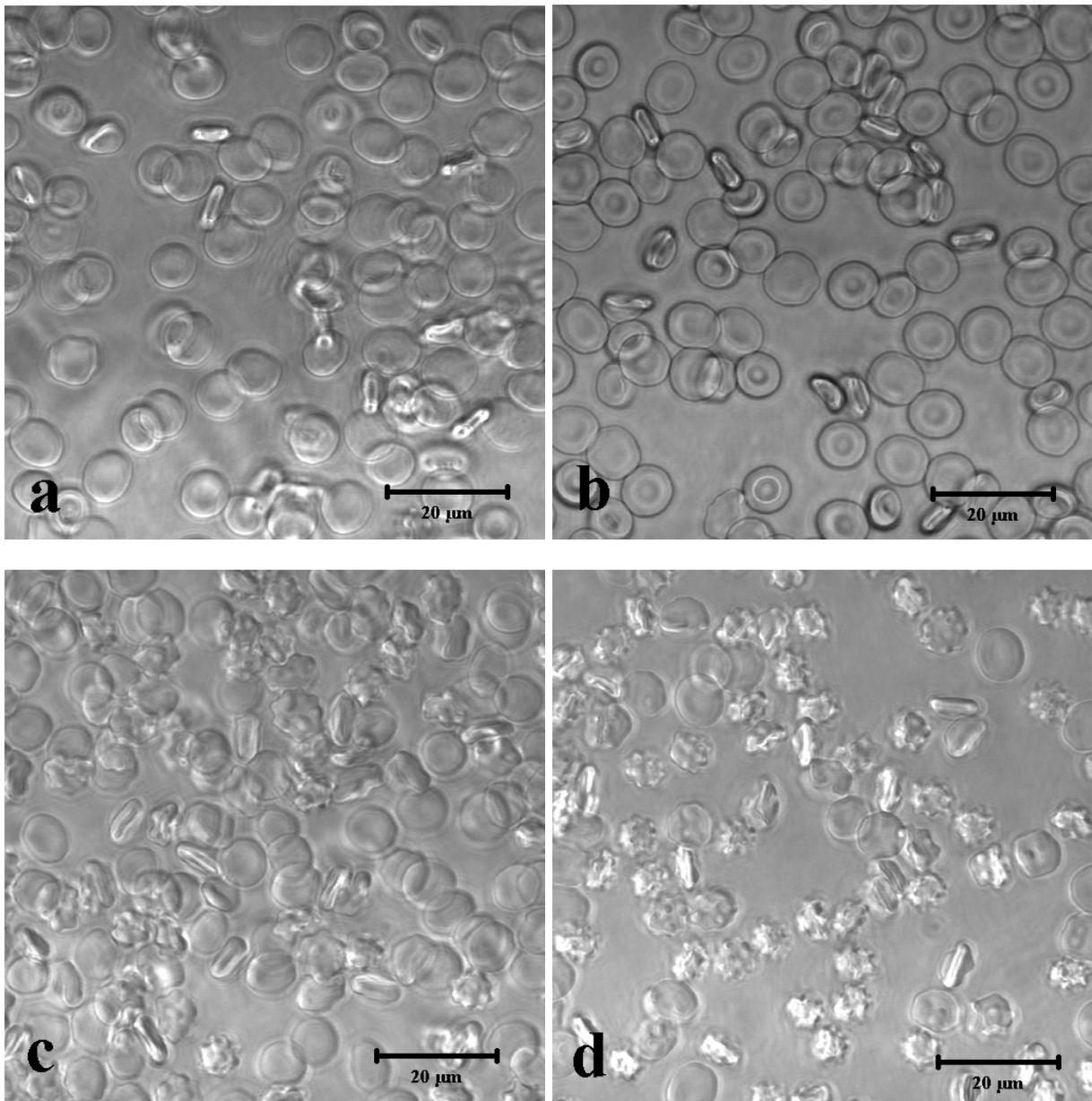


Abbildung 14: CLSM Aufnahmen. Erythrozyten biotinyliert mit 0,08 mM (a), 0,17 mM (b), 0,89 mM (c) und 1,79 mM (d) Sulfo-NHS-LC-Biotin in Erythrozytensuspension (Hämatokrit 10 %). Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

Ergebnisse

Tabelle 6: Der Median (n = 3) der Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers Ziege anti-IgG-Rind, gebunden an IgG auf der Oberfläche von B-Erythrozyten, die mit 0,08 mM, 0,17 mM beziehungsweise 0,89 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert wurden. Die Avidinkonzentration betrug hierbei konstant 0,28 μ M. Als Maß für die Streuung der Werte ist die robuste Standardabweichung angegeben.

Biotinkonzentration [mM]	Median der Fluoreszenz [rel. E.]	rSTABW
Negativkontrolle	1	$\pm 0,05$
0,08	24,9	$\pm 5,9$
0,17	39,2	$\pm 8,9$
0,89	30,5	$\pm 9,66$

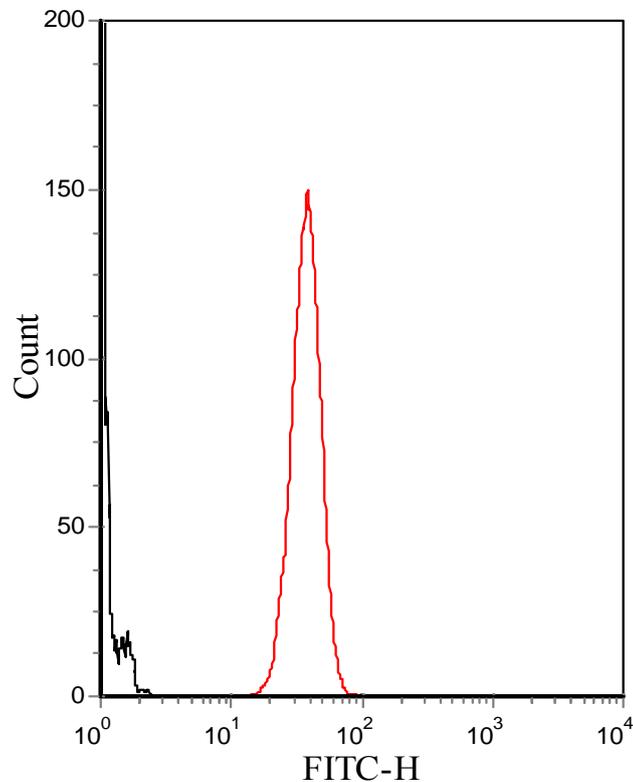


Abbildung 15: FACS-Histogramm der Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers Ziege anti-IgG-Rind, gebunden an IgG auf der Erythrozytenoberfläche von Erythrozyten, die mit 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert wurden (roter Graph); Negativkontrolle (schwarzer Graph).

Ergebnisse

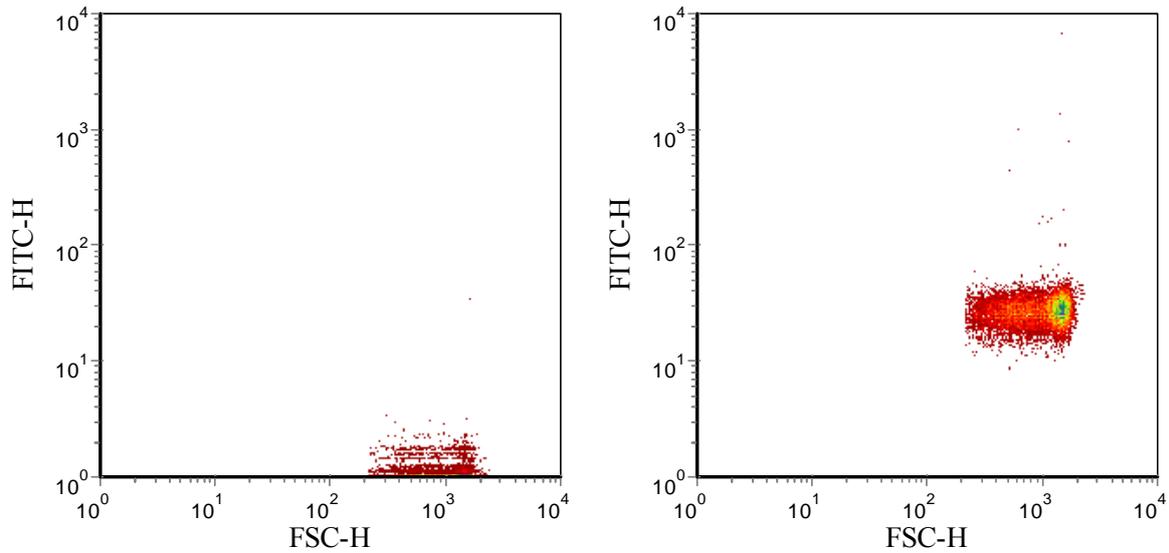


Abbildung 16: FACS-Dotplots der Fluoreszenzintensität bezogen auf die Vorwärtsstreuung. Links: Negativkontrolle. Rechts: Erythrozyten der 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe.

Um gleichzeitig den Einfluss der Biotinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten und die Fluoreszenzintensität beurteilen zu können, wurde ein Score mit folgender Formel berechnet:

$$(\text{rSTABW} / F_{\text{Median}}) * \text{Echinozyten} [\%]$$

Für die Erythrozyten, welche mit 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert wurden, ergab sich mit 0,4 Punkten der niedrigste Score und somit der beste Wert (Abb. 17). Der Anteil an Echinozyten war in dieser Probe gering, während gleichzeitig die stärkste Fluoreszenzintensität gemessen wurde, was mit der größten Menge an gekoppletem IgG auf der Erythrozytenoberfläche korreliert.

Ergebnisse

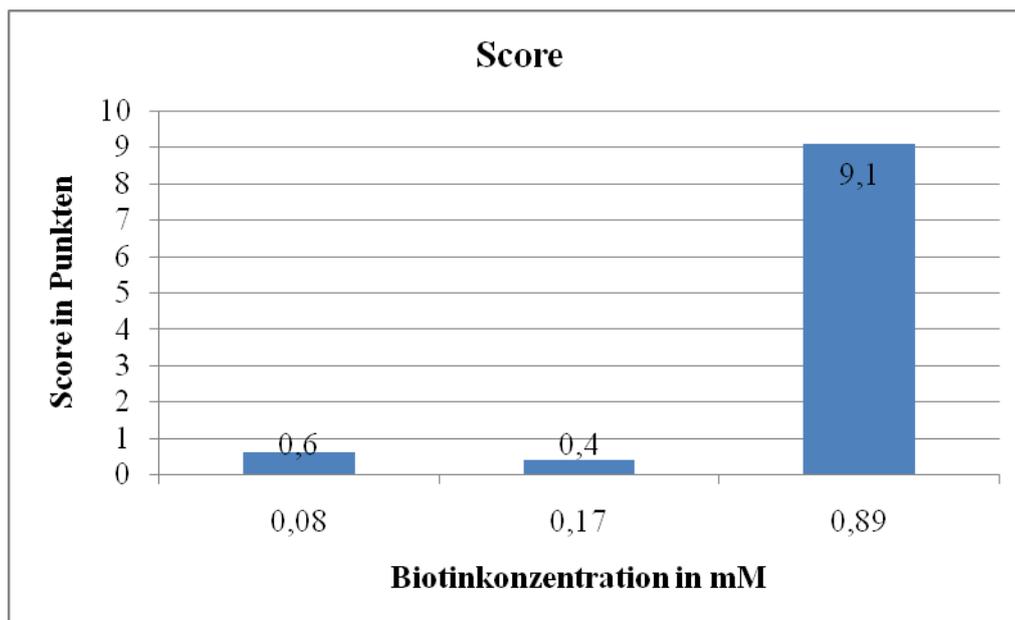


Abbildung 17: Score zur Zusammenführung des Einflusses der Biotinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten sowie die Intensität des Fluoreszenzsignals. Der Score berechnet sich aus der Formel: $(rSTABW / F_{Median}) * \text{Echinozyten} [\%]$.

3.1.2 Optimierung der Avidinkonzentration

Als Nächstes wurde die optimale Konzentration an Avidin bestimmt, das heißt die Avidinkonzentration bei der eine optimale Ankopplung von B-IgG an die Erythrozytenoberfläche stattfindet und gleichzeitig sowohl die Agglutination als auch morphologische Veränderungen der Erythrozyten am geringsten sind. 100 µl gepackte B-Erythrozyten, die bei einer Sulfo-NHS-LC-Biotin-Konzentration von 0,17 mM biotinyliert wurden, resuspendiert in 5 ml PBS pH 8, wurden wie unter 2.2.4 beschrieben, mit verschiedenen Avidinkonzentrationen gemischt. Die Morphologie der Erythrozyten wurde mittels CLSM beurteilt. Beispiele für den Einfluss der Avidinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten sind in Abbildung 18 a-d dargestellt. Bei einer Avidin-Endkonzentration von 0,14 µM beziehungsweise 0,28 µM fanden sich nur wenige Echinozyten. Bei einer Avidin-Endkonzentration von 0,56 µM nahm der Anteil an Echinozyten geringfügig zu. In der Probe, welche eine Avidin-Endkonzentration von 1,41 µM hatte, betrug der Anteil an Echinozyten um 30 %. Außerdem bildeten sich hier zum Teil deutliche Agglutinate aus. In Tabelle 7 ist der prozentuale Anteil der Echinozyten in den einzelnen Proben dargestellt. Parallel wurde der gleiche Versuch auch mit FITC-

Ergebnisse

Avidin durchgeführt. In Abbildung 19 sind FITC-Avidin-markierte Erythrozyten dargestellt, die mit 0,28 μM FITC-Avidin modifiziert wurden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden jeweils 100 μl der verschiedenen A/B-Erythrozyten in 5 ml PBS pH 8 resuspendiert und mit 0,04 μM B-IgG inkubiert. Die Erythrozyten, welche mit 1,41 μM Avidin versetzt worden sind, wurden aufgrund ihrer starken Tendenz zur der Ausbildung von Agglutinaten nicht mit IgG gekoppelt. Zur Überprüfung, ob IgG erfolgreich an die Erythrozytenoberfläche angekoppelt wurde, erfolgte wieder die Inkubation der Proben mit dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper Ziege anti-IgG-Rind. Der F_{Median} der Fluoreszenzintensität und die rSTABW dienten zur Charakterisierung des Fluoreszenzsignals. Es kam zu keiner signifikanten Veränderung der Werte unter Verwendung der verschiedenen Avidinkonzentrationen (Tab. 8). Abbildung 20 zeigt ein repräsentatives Histogramm der Fluoreszenzintensität und einen Dotplot des Vorwärtsstreulichtes und des Seitwärtsstreulichtes der 0,28 μM Avidin-Probe.

Um gleichzeitig den Einfluss der Avidinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten und die Fluoreszenzintensität beurteilen zu können, wurde wie zuvor bei den verschiedenen Biotinkonzentrationen ein Score mit folgender Formel berechnet:

$$(\text{rSTABW} / F_{\text{Median}}) * \text{Echinozyten} [\%]$$

Für das optimierte Protokoll wurde bei einer Avidin-Endkonzentration von 0,28 μM gearbeitet. Bei dieser Avidinkonzentration ergab sich mit 2,4 Punkten der niedrigste Score und somit der beste Wert (Abb. 21). Es wurde ein deutliches Fluoreszenzsignal entsprechend einer guten IgG-Ankopplung erreicht, gleichzeitig war die Tendenz zur Ausbildung von Echinozyten nur gering vorhanden.

Tabelle 7: Optimierung der Avidinkonzentration. Anteil von Echinozyten in Prozent in den Proben, die mit 0,14 μM , 0,28 μM , 0,56 μM beziehungsweise 1,41 μM Avidin modifiziert wurden. Abgebildet sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen und die Standardabweichung. Es wurden jeweils $n = 3*80$ Zellen ausgezählt.

Avidinkonzentration [μM]	0,14	0,28	0,56	1,41
Anteil Echinozyten[%] \pm STABW	10,89 \pm 2,94	10,73 \pm 2,45	13,13 \pm 3,62	30,23 \pm 4,89

Ergebnisse

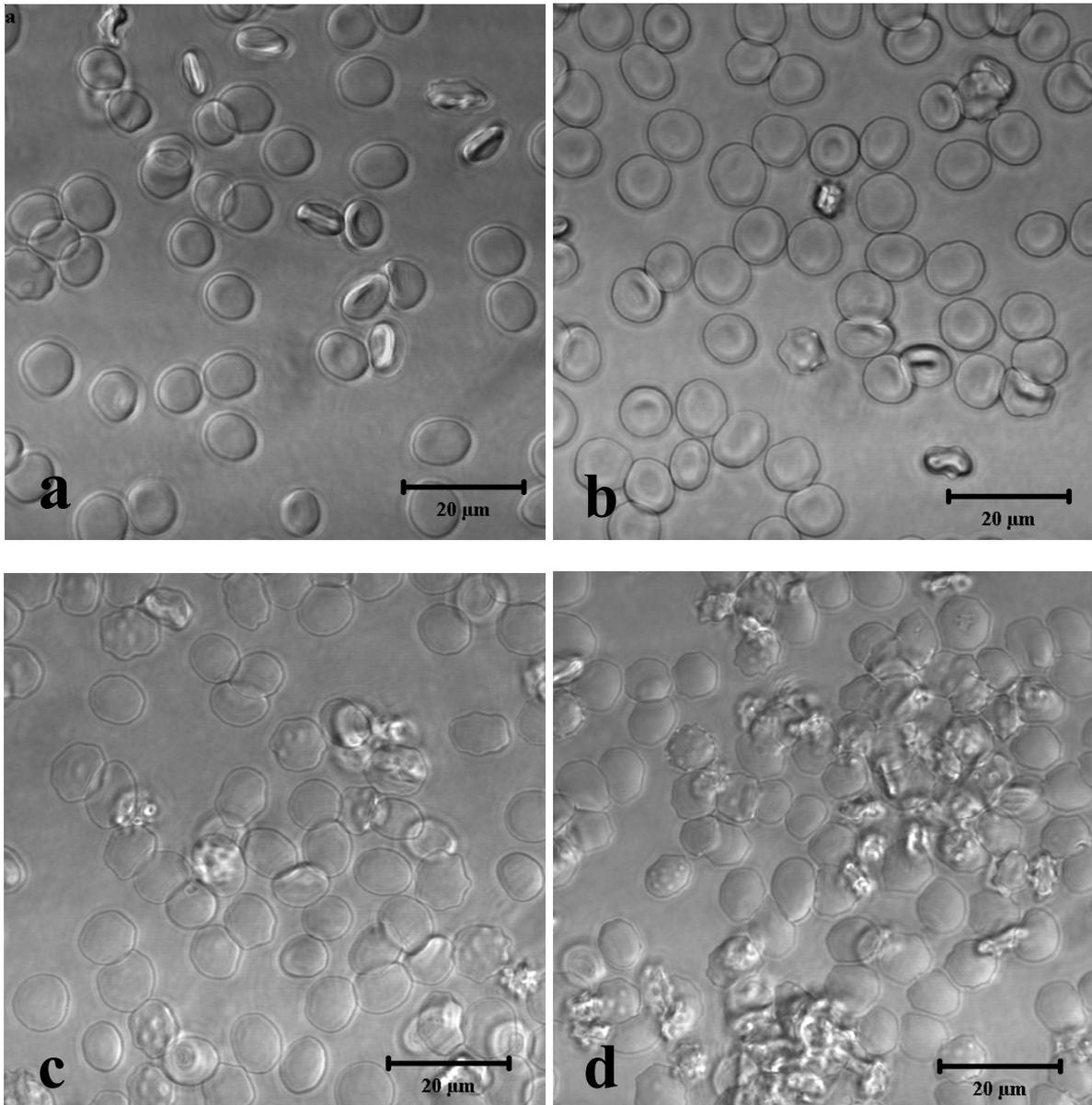


Abbildung 18: CLSM Aufnahmen. B-Erythrozyten, die mit einer Avidin-Endkonzentration von 0,14 μM (a), 0,8 μM (b), 0,56 μM (c) und 1,41 μM (d) modifiziert wurden. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm).

Ergebnisse

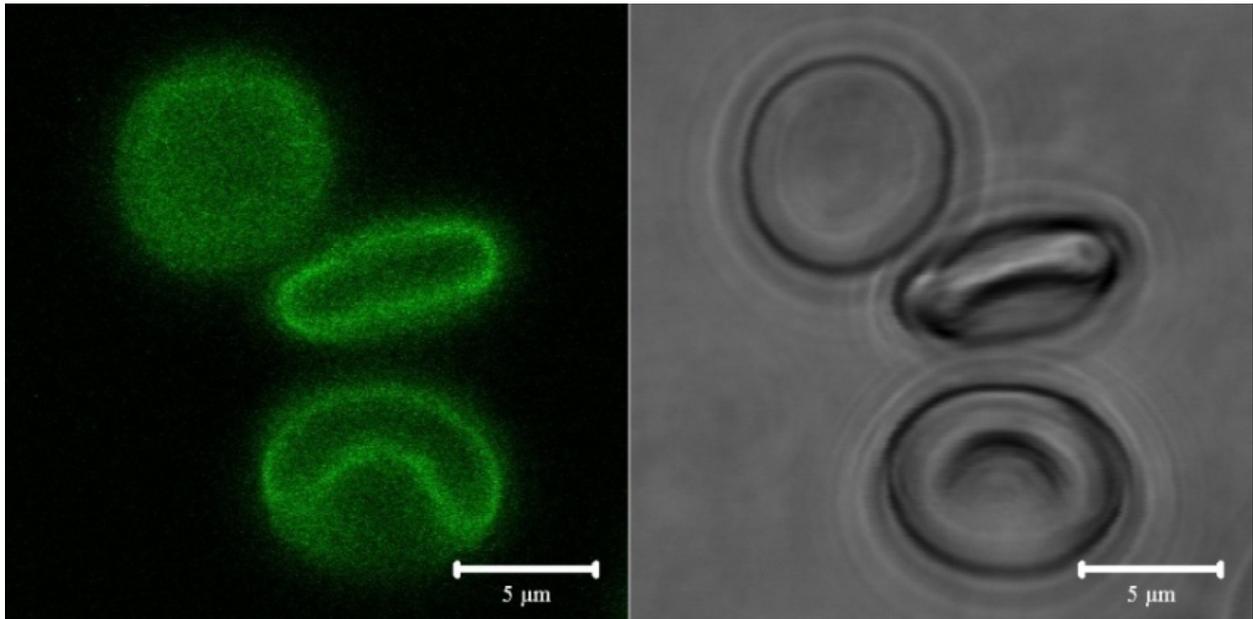


Abbildung 19: CLSM-Aufnahme. Erythrozyten, die mit 0,28 µM FITC-Avidin markiert wurden. Im linken Bild ist der FITC-Kanal abgebildet, im rechten Bild der Durchlicht-Kanal. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm).

Tabelle 8: Der Median ($n = 3$) der Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers Ziege anti-IgG-Rind, gebunden an IgG auf der Oberfläche von B-Erythrozyten, die mit 0,14 µM, 0,28 µM beziehungsweise 0,56 µM Avidin versetzt wurden. Die Konzentration des Sulfo-NHS-LC-Biotin betrug konstant 0,17 mM. Als Maß für die Streuung der Werte ist die robuste Standardabweichung angegeben.

Avidinkonzentration [µM]	Median der Fluoreszenz [rel. E.]	rSTABW
Negativkontrolle	1,01	± 0,14
0,14	27,30	± 6,81
0,28	27,56	± 6,04
0,56	28,01	± 7,39

Ergebnisse

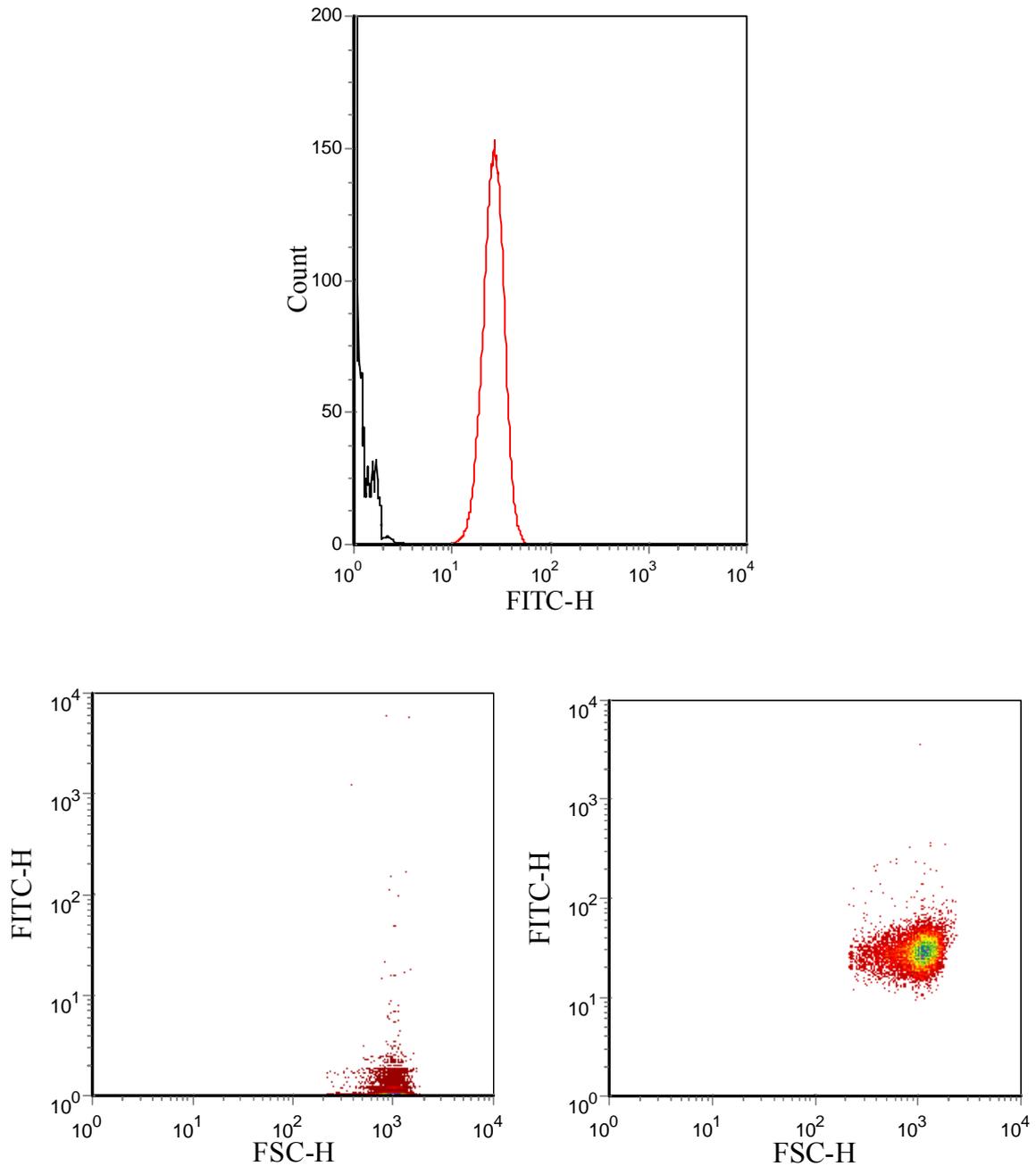


Abbildung 20: Oben: FACS-Histogramm der Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers Ziege anti-IgG-Rind, gebunden an IgG auf der Oberfläche von B-Erythrozyten, die mit 0,28 μM Avidin modifiziert wurden. Hierbei war die Sulfo-NHS-LC-Biotin-Konzentration konstant bei 0,17 mM. Unten links Dotplot der Fluoreszenzintensität bezogen auf das Vorwärtsstreulicht (FSC) von nativen Erythrozyten (Negativkontrolle). Rechts unten: Dotplot der Fluoreszenzintensität bezogen auf die Vorwärtsstreuung von IgG-gekoppelten Erythrozyten, die mit 0,28 μM Avidin modifiziert wurden.

Ergebnisse

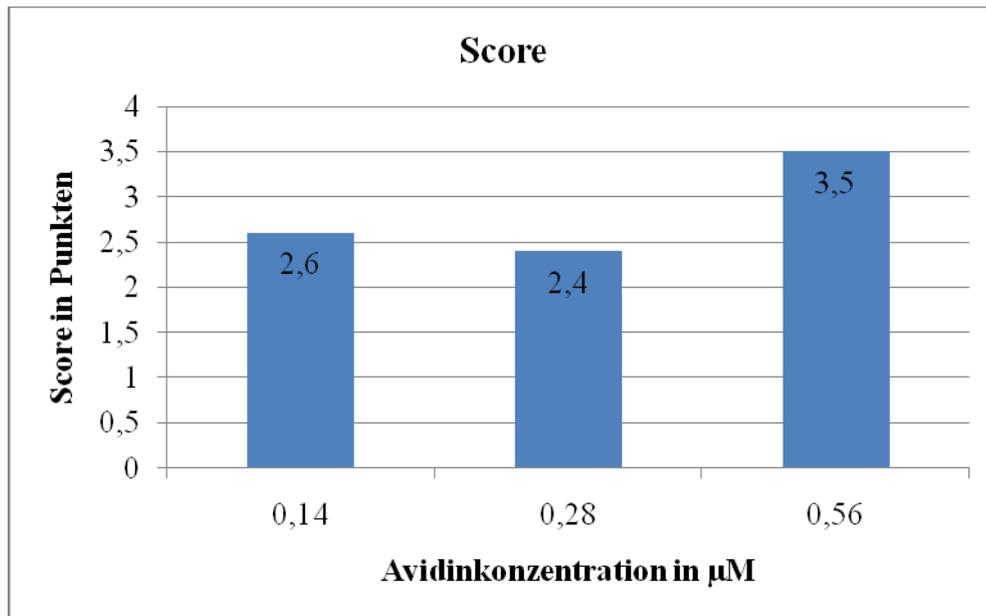


Abbildung 21: Score um den Einfluss der Avidinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten und die Fluoreszenzintensität zusammenzuführen. Der Score berechnet sich aus der Formel: $(rSTABW / F_{Median}) * Echinozyten [\%]$.

3.1.3 IgG-gekoppelte Erythrozyten

Nach Optimierung der Biotin- und Avidinkonzentrationen wurden die IgG-gekoppelten Erythrozyten erneut mittels CLSM auf ihre Morphologie hin untersucht. Abbildung 22 zeigt ein repräsentatives Bild von Erythrozyten, die nach dem optimierten Protokoll mit IgG gekoppelt wurden. Die Erythrozyten behielten auch nach der Ankopplung von IgG ihre natürliche bikonkave Form bei.

Ergebnisse

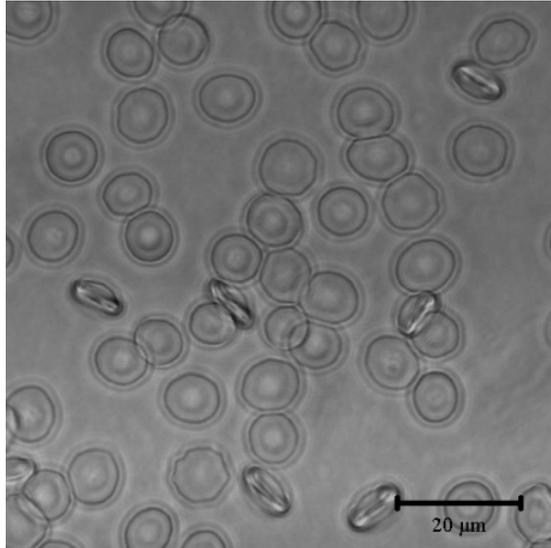


Abbildung 22: CLSM-Aufnahme (Durchlicht). Erythrozyten, die nach dem optimierten Protokoll mit IgG gekoppelt wurden. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

3.2 Ankopplung des Tumorantikörpers an die Erythrozyten

Nach Optimierung der Ankopplungsmethode mit dem IgG-Modellantikörper vom Rind, wurde der monoklonale anti-Epitheliale-Antikörper Ep-CAM Ab-2 (Klon AUA-1, Spezies Maus) wie im Protokoll unter 2.2.5 beschrieben, an die Erythrozyten gekoppelt. Zum Nachweis des gebundenen Tumorantikörpers auf der Oberfläche der Erythrozyten, wurde der FITC-konjugierte sekundäre Antikörper Ziege anti-IgG-Maus verwendet. Die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers wurde durchflusszytometrisch detektiert. Die modifizierten Erythrozyten wurden 15 Tage lang auf die Stabilität ihrer Antikörperankopplung hin überprüft. Über diesen Zeitraum wurden die Zellen (Volumenkonzentration von 10 %) in 0,2 % HSA/ 1,5 M MES pH 7,4 bei 4°C gelagert. Das Gesamtvolumen der Probe betrug 1 ml. An Tag 0, 5, 10, 12 und 15 wurden jeweils 50 µl der Probe entnommen, mit PBS pH 8 gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten im Durchflusszytometer untersucht. In Tabelle 9 sind der F_{Median} der Fluoreszenzintensität und der robuste Variationskoeffizient der einzelnen Messungen angegeben. Der F_{Median} der Fluoreszenzintensität nahm von Tag 0 auf Tag 5 geringfügig ab. Bis zu Tag 12 verhielten sich die Werte stabil. Am Tag 15 kam es zu einem starken Abfall der Werte. Es wurde außerdem beobachtet, dass der Überstand der Probe im Verlauf der Zeit hämolytischer wurde, was auf den Zerfall der Erythrozyten hinweist.

Tabelle 9: Median der Fluoreszenzintensität und robuster Variationskoeffizient der Fluoreszenz des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers Ziege anti-IgG-Maus, gebunden an den Tumor-Antikörper auf der Erythrozytenoberfläche an Tag 0, 5, 10, 12 und 15 nach der Ankopplung.

Zeit [d]	Median der Fluoreszenz [rel. E.]	Robuster Variationskoeffizient
Negativkontrolle	1,0	0
0	27,14	0,60
5	23,93	0,61
10	23,93	0,73
12	23,93	0,69
15	2,86	0,78

3.3 Beladung der IgG-gekoppelten Erythrozyten mit FITC-Dextran

Zur Beladung des Zellinneren der IgG-gekoppelten Erythrozyten wurde FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 77 kDa als Modellsubstanz verwendet. Es eignete sich als Modellsubstanz, da es nicht toxisch ist und auch nicht passiv in die Zellen diffundieren kann. Es lässt sich zudem gut mit dem CLSM und dem Durchflusszytometer analysieren. Die Beladung erfolgte nach dem unter 2.2.6 beschriebenen Protokoll.

Bei über 90 % der Erythrozyten wurde eine Fluoreszenzintensität mit einem F_{Median} von mehr als 10^3 rel. E. erreicht. Native Erythrozyten dienten als Negativkontrolle und zeigten eine geringe Autofluoreszenz mit einer Fluoreszenzintensität bei einem F_{Median} von 2,21 rel. E. 99,89 % dieser Zellen besaßen eine Autofluoreszenz von weniger als 10 rel. E. Ein repräsentatives Histogramm der Fluoreszenzintensität und einen Dotplot der Fluoreszenzintensität bezogen auf das Vorwärtsstreulicht zeigt Abbildung 23. Die homogene Beladung wird auch in den CLSM-Aufnahmen (Abb. 24) deutlich.

Ergebnisse

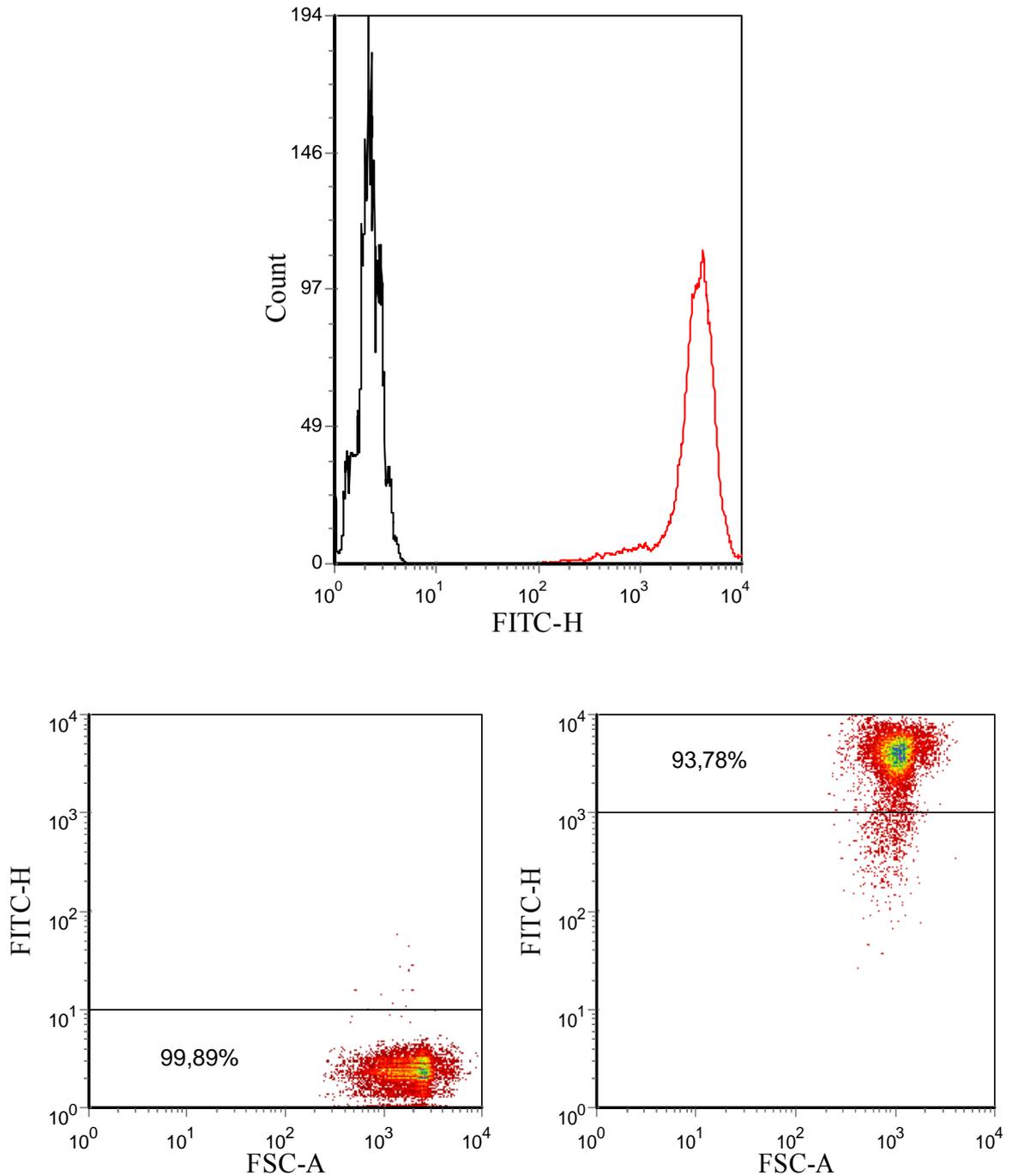


Abbildung 23: Oben: Histogramm der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran (77 kDa) beladenen Erythrozyten (roter Graph) und der Negativkontrolle (schwarzer Graph). Unten links: Dotplot der Fluoreszenzintensität bezogen auf das Vorwärtsstreulicht (FSC) von nativen Erythrozyten (Negativkontrolle). Unten rechts: Dotplot der Fluoreszenzintensität bezogen auf das Vorwärtsstreulicht (FSC) von FITC-Dextran (77 kDa) beladenen Erythrozyten.

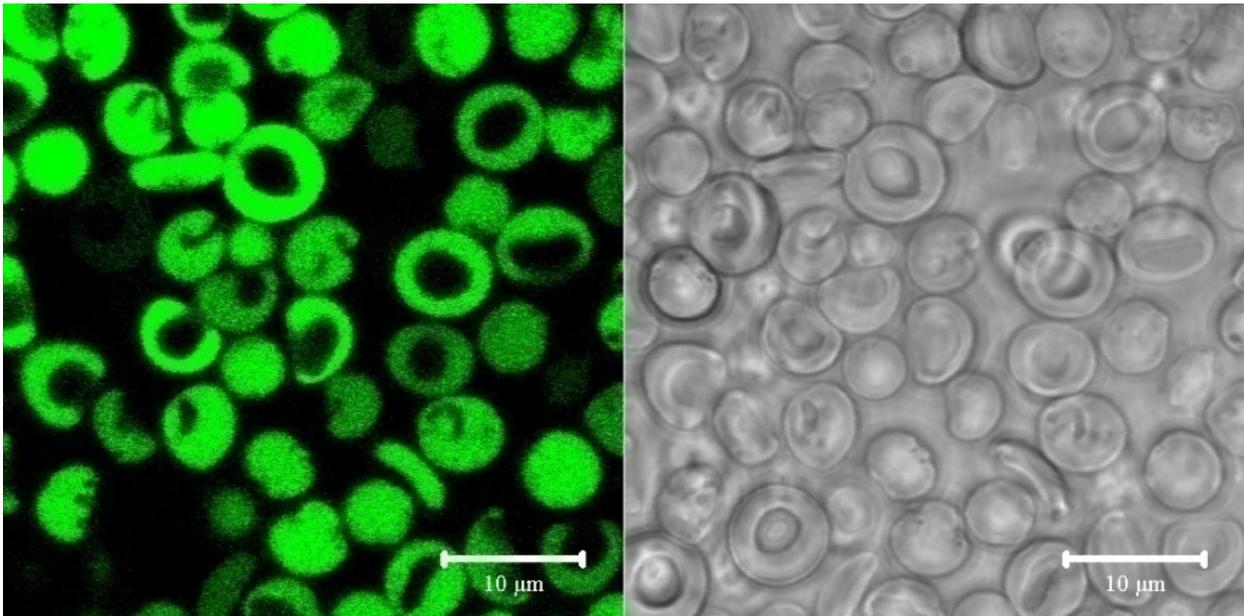


Abbildung 24: CLSM-Bild: Erythrozyten beladen mit FITC-Dextran. Das linke Bild zeigt den FITC-Kanal und das rechte Bild den Durchlicht-Kanal. Aufgenommen mit einem 100 x Öl-immersionsobjektiv nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm).

3.4 PEGylierung der Erythrozyten

Zur Anwendung der Immunoerythrozyten *in vivo* ist es von entscheidender Bedeutung, dass die modifizierten Erythrozyten ausreichend lange im Kreislauf zirkulieren. Es ist zu erwarten, dass die Fremdproteine Avidin und IgG vom Rind beziehungsweise von der Maus, welche an die Oberfläche der Erythrozyten angebracht worden sind, *in vivo* zu einer frühzeitigen Eliminierung dieser modifizierten Erythrozyten durch das RES führen. Um diesen Prozess zu umgehen, sollten die Antigene auf der Erythrozytenoberfläche mit dem Molekül mPEG maskiert werden.

3.4.1 PEGylierung

IgG-gekoppelte Erythrozyten wurden nach dem unter 2.2.7 beschriebenen Protokoll mit mPEG 5 kDa PEGyliert. Das Ergebnis der PEGylierung wurde anhand einer Veränderung im Zeta Potential der jeweiligen Probe überprüft. Es wurde das Zeta Potential von PEGylierten Erythrozyten, IgG-gekoppelten Erythrozyten und PEGylierten IgG-gekoppelten Erythrozyten bestimmt. Als Kontrolle galt das Zeta Potential nativer unbehandelter Erythrozyten. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine deutliche Abnahme des Zeta Potentials der PEGylierten Proben im Vergleich zu den nicht-PEGylierten Proben

Ergebnisse

durch die Maskierung negativer Ladungen des IgG auf der Oberfläche der Erythrozyten durch das mPEG. Die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen sind in Tabelle 10 angegeben. In Abbildung 25 ist die Zeta Potentialänderung in Prozent bezogen auf die Kontrolle dargestellt.

Die Leitfähigkeit der isotonen Saccharose-Lösung betrug für alle Messungen im Mittel $0,039 \text{ mS/cm} \pm 0,014$ bei einem pH-Wert von 7,4. Es wurde bei niedriger Ionenstärke gemessen, weil die Dicke der Debye-Hückel-Länge von der Ionenstärke abhängt. Je weniger Gegenionen vorhanden sind, umso stärker können auch tiefer liegende Ladungen erfasst werden [51]. Aufgrund des Ionengradienten zwischen dem Zellinneren der nativen Erythrozyten und der Saccharoselösung kommt es im Verlauf der Zeit zu einem Ionenausstrom aus den Erythrozyten. Hierdurch steigt die Leitfähigkeit der Saccharoselösung an. Der niedrigste gemessene Wert betrug $0,022 \text{ mS/cm}$ und der höchste Wert $0,062 \text{ mS/cm}$. Die Änderung der Leitfähigkeit der Saccharoselösung hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Zeta Potential der Erythrozyten.

Um den Einfluss von mPEG auf die Morphologie der Erythrozyten zu untersuchen, wurden die Proben gewaschener Erythrozyten jeweils in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde in Boratpufferlösung (pH 9) ohne den Zusatz von mPEG, das andere Aliquot im gleichen Puffer mit Zusatz von mPEG (2 g/dl) für 60 min bei Raumtemperatur unter mäßigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die beiden Aliquots mit dem CLSM untersucht. Unter der PEGylierung bildeten sich zu 31,8 % Echinozyten aus. Die Erythrozyten, welche nur in Boratpuffer pH 9 ohne Zusatz von mPEG inkubiert worden waren, behielten in über 90 % ihre Form bei (Abb. 26).

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung des Zeta Potentials von nativen Erythrozyten, PEGylierten Erythrozyten, IgG gekoppelten Erythrozyten und PEGylierten IgG gekoppelten Erythrozyten (n = 3).

Kontrolle - native Erythrozyten	mPEG Erythrozyten	IgG-Erythrozyten	mPEG IgG-Erythrozyten
- 24,32 mV \pm 5,9	- 13,23 mV \pm 0,5	- 36,13 mV \pm 8,1	- 13,9 mV \pm 7,7

Ergebnisse

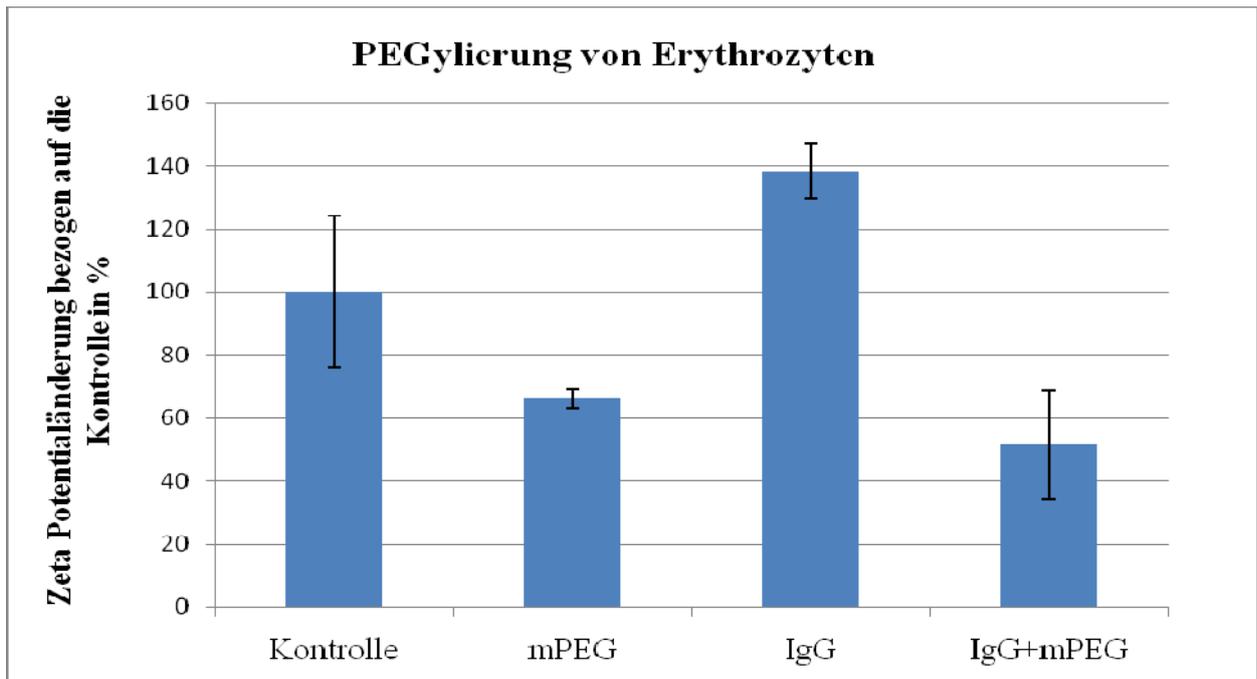


Abbildung 25: Bestimmung des Zeta Potentials von nativen (Kontrolle), PEGylierten (mPEG), IgG-gekoppelten (IgG) und PEGylierten IgG-gekoppelten (IgG+mPEG) Erythrozyten in Saccharoselösung (300 mOsm, pH 7,4). Die Leitfähigkeit der Saccharoselösung betrug im Mittel $0,039 \text{ mS/cm} \pm 0,014$.

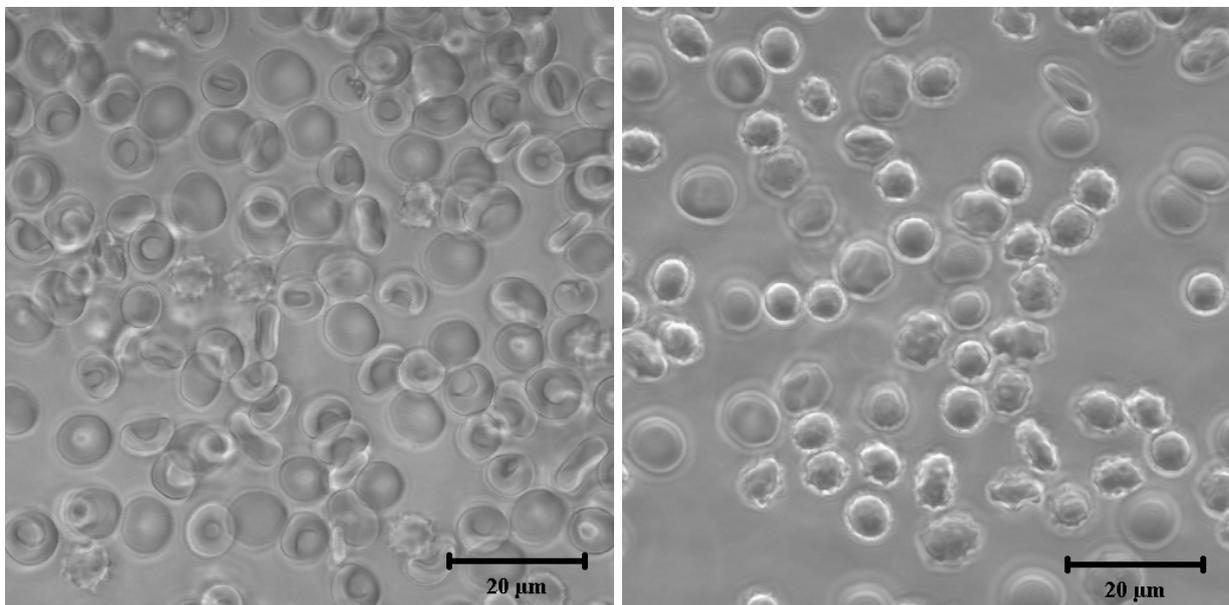


Abbildung 26: CLSM-Aufnahme. PEGylierte Erythrozyten. Linkes Bild: PH-Kontrolle, Erythrozyten nach Inkubation in Boratpuffer pH 9 ohne die Zugabe von mPEG. Rechtes Bild: Positivkontrolle, Erythrozyten nach Inkubation in Boratpuffer pH 9 mit Zugabe von mPEG. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

3.4.2 Effekt der PEGylierung auf den gekoppelten Antikörper

Im Folgenden wurde überprüft, ob die IgG-Moleküle auf der Oberfläche der Erythrozyten trotz der Maskierung durch mPEG noch für den sekundären Antikörper zugänglich waren. Dies galt als Modell, um zu testen, ob die Tumorantikörper trotz PEGylierung noch eine ausreichende Antigenbindungsfähigkeit besitzen würden. Abbildung 27 zeigt ein Histogramm der Fluoreszenzintensität FITC-konjugierter sekundärer anti-IgG-Antikörper gebunden an IgG auf der Oberfläche von Erythrozyten vor und nach der PEGylierung. Auch nach der PEGylierung waren noch ausreichend Bindungsstellen vorhanden. Der F_{Median} der Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers auf der Erythrozytenoberfläche vor der PEGylierung hatte einen Wert von 17,78 rel. E. Nach der PEGylierung betrug der F_{Median} noch 14,46 rel. E. Dies entspricht einer Abnahme von 18,75 %.

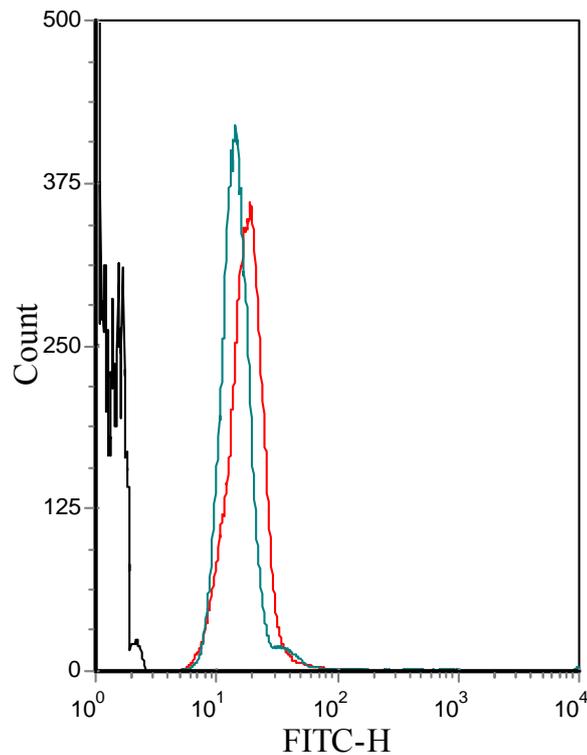


Abbildung 27: Histogramm der Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers Ziege anti-IgG-Rind gebunden an IgG auf der Oberfläche von Erythrozyten vor und nach PEGylierung. Roter Graph: vor PEGylierung. Blauer Graph: nach PEGylierung. Schwarzer Graph: Negativkontrolle.

3.4.3 Phagozytoseassay

Im Phagozytoseassay (s. 2.2.8) wurde überprüft, ob die PEGylierung einen Schutz vor der Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten darstellt. Die Erythrozyten wurden mit FITC-Avidin markiert und wie oben beschrieben mit IgG gekoppelt. Anschließend wurde ein Teil der Probe mit mPEG 5 kDa PEGyliert. 10 μ l ($\sim 1 \cdot 10^8$ Zellen) der IgG-gekoppelten Erythrozyten und 10 μ l der PEGylierten IgG-gekoppelten Erythrozyten wurden in jeweils 50 μ l autologes heparinisieretes Vollblut gegeben und 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Leukozyten fixiert und deren DNA mit Probidiumiodid (PI) gefärbt. Die Ereignisse, bei denen durchflusszytometrisch gleichzeitig ein FITC- und ein PI-Signal detektiert werden konnte, entsprachen den Zellen, die FITC-markierte Erythrozyten phagozytiert hatten. Die Ereignisse, bei denen nur ein PI-Signal detektiert wurde, entsprachen Phagozyten, die keine Erythrozyten phagozytiert hatten. Granulozyten und Monozyten wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe (Vorwärtsstreulicht) und unterschiedlichen Dichte (Seitwärtsstreulicht) voneinander unterschieden. In Abbildung 28 sind im linken Bild zwei Phagozyten dargestellt, deren Kern mit PI (rot) angefärbt wurde und deren Zytoplasma aufgenommenes FITC-Avidin (grün) von Erythrozyten enthält. Das rechte Bild zeigt zwei Phagozyten der Negativkontrolle, das heißt der Kontrolle, welche auf Eis stehen blieb. Es zeigte sich, dass die PEGylierten IgG-gekoppelten Erythrozyten sowohl von den Monozyten als auch von den Granulozyten deutlich stärker phagozytiert wurden, als die nicht-PEGylierten IgG-gekoppelten Erythrozyten (Abb. 29). Um auszuschließen, dass das FITC-Avidin selbst die Phagozytoseaktivität der Monozyten und Granulozyten beeinflusst hat, wurde außerdem ein Phagozytoseassay durchgeführt, bei dem die IgG-Erythrozyten nicht von außen mittels FITC-Avidin, sondern von innen mit FITC-Dextran markiert wurden. Auch hier wurden die PEGylierten IgG-Erythrozyten stärker phagozytiert, als die nicht PEGylierten IgG-Erythrozyten, insgesamt allerdings in geringerem Maße als die PEGylierten IgG-Erythrozyten, die mittels FITC-Avidin markiert wurden (Abb. 30).

Ergebnisse

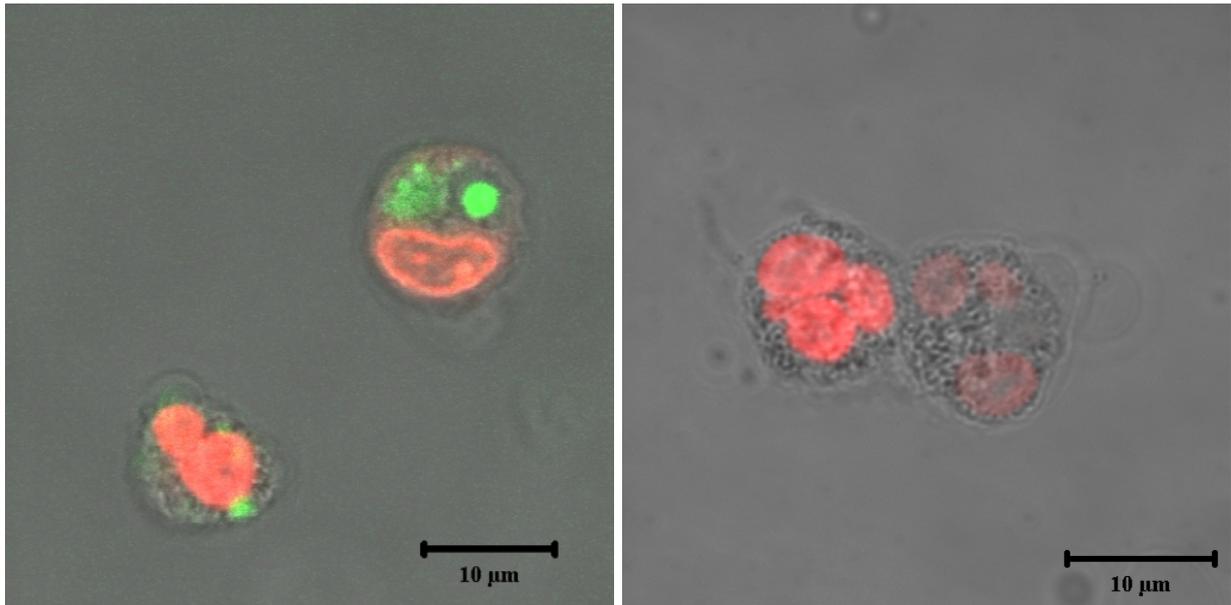


Abbildung 28: CLSM Aufnahmen. Links: Zwei Phagozyten, die mit FITC-Avidin (grün) markierte IgG-Erythrozyten phagozytiert haben. Der Zellkern der Phagozyten wurde mit PI (rot) gefärbt. Rechts: Zwei Phagozyten aus der Kontrolle. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm) und einem HeNe1-Laser (543 nm).

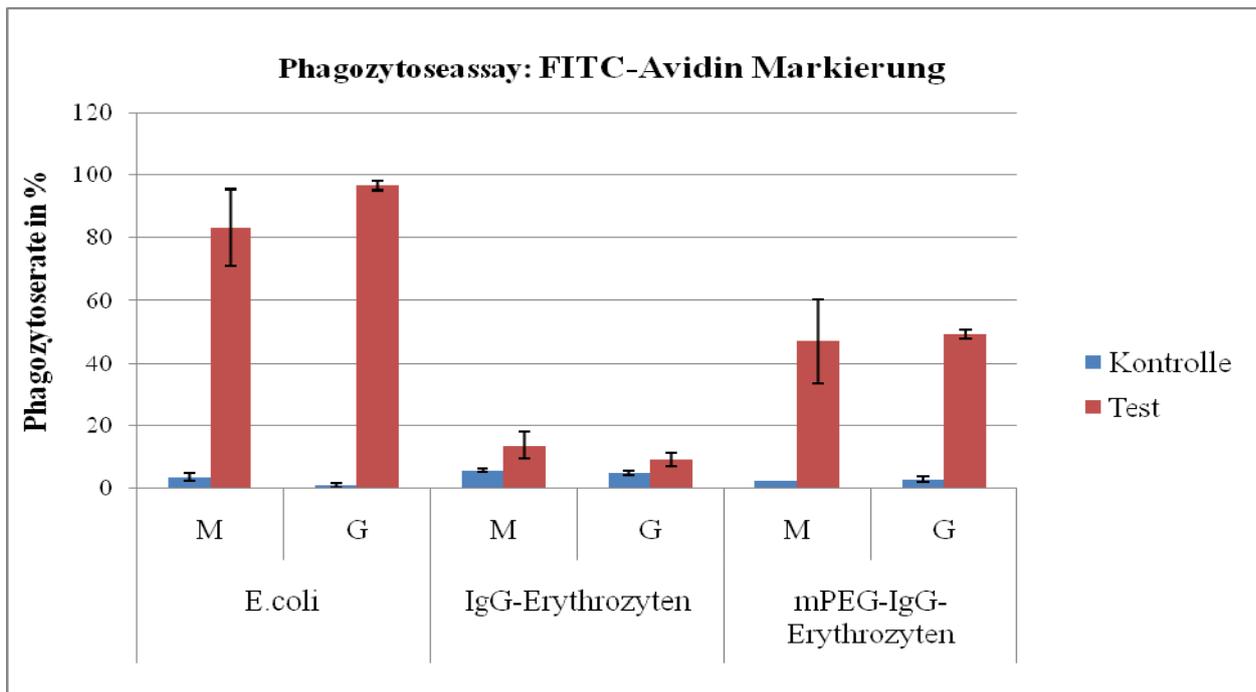


Abbildung 29: Phagozytoseassay (n = 3): Phagozytoseaktivität von Monozyten (M) und Granulozyten (G) in Prozent in Bezug auf IgG-Erythrozyten, nicht-PEGyliert (IgG-Erythrozyten) und PEGyliert (mPEG-IgG-Erythrozyten). Die Erythrozyten wurden mit FITC-Avidin markiert. Als Kontrolle diente jeweils die bei 0 °C inkubierte Probe. Aufgetragen ist außerdem die Testkontrolle mit *E.coli*.

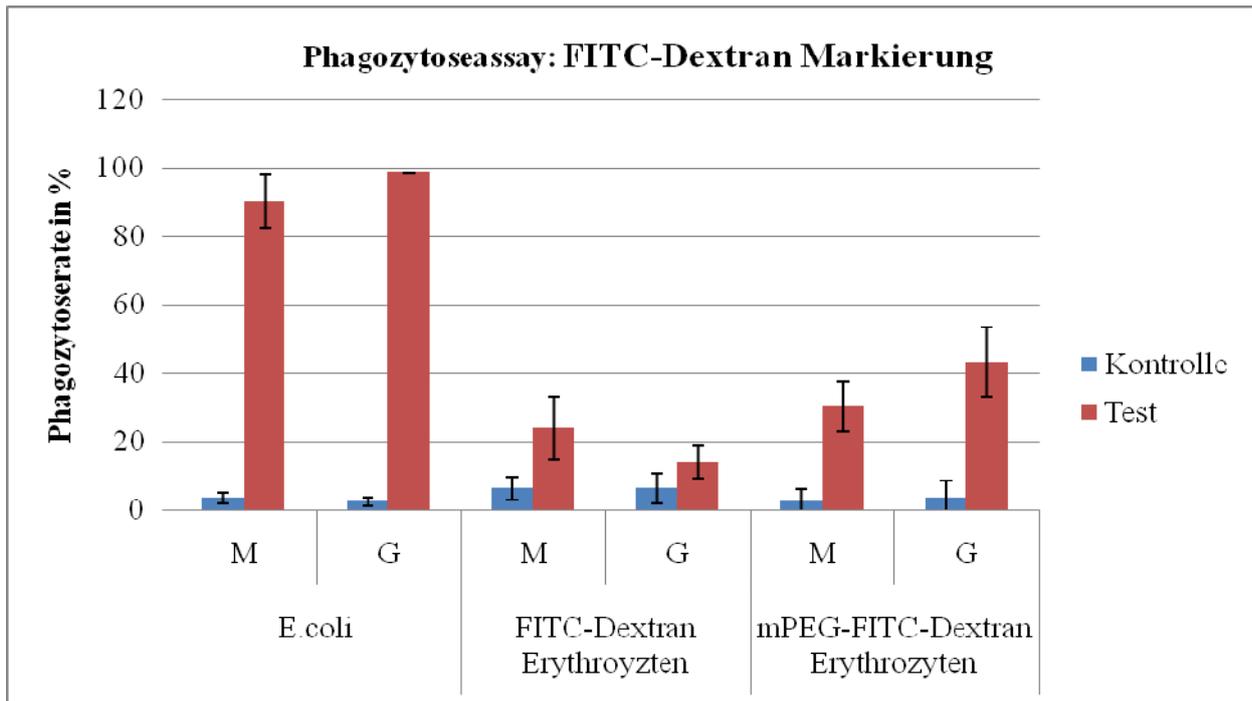


Abbildung 30: Phagozytoseassay (n = 3): Phagozytoseaktivität von Monozyten (M) und Granulozyten (G) in Prozent in Bezug auf IgG-Erythrozyten, nicht-PEGyliert (FITC-Dextran-Erythrozyten) und PEGyliert (mPEG-FITC-Dextran-Erythrozyten). Die Erythrozyten wurden zur Markierung mit FITC-Dextran (77 kDa) beladen. Aufgetragen ist außerdem die Testkontrolle mit *E.coli*.

3.5 Targeting von Tumorzellen durch die modifizierten Erythrozyten *in vitro*

Die mit Tumorantikörper gekoppelten Erythrozyten wurden nun mit den Krebszellen inkubiert, um deren Fähigkeit zu überprüfen, mit diesen spezifisch in Wechselwirkung zu treten (Targeting). Hierfür wurden die Krebszellen direkt nach der Zellernte, gelöst in RPMI, in vertiefte Objektträger (Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) überführt. Danach wurden PEGylierte beziehungsweise nicht-PEGylierte Antikörper gekoppelte Erythrozyten, die mit FITC-Avidin markiert waren, im Überschuss (100:1) dazugegeben. Zur Markierung der Krebszellen wurde PI verwendet. PI dringt nach längerer Inkubation durch die Membran und gelangt in den Zellkern, wo es sich an die DNS bindet, so dass der Kern rot fluoreszieren kann. Die Zellsuspension wurde für 60 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und dann unter dem CLSM beurteilt.

3.5.1 Nicht-PEGylierte Tumor-Antikörper gekoppelte Erythrozyten

Es zeigte sich, dass die nicht-PEGylierten Tumorantikörper-gekoppelten Erythrozyten an die Tumorzellen binden. Repräsentative Bilder sind in den Abbildungen 31 c-f dargestellt. In Abbildung 31 c ist in der Mitte des Bildes eine große Tumorzelle zu sehen, an die sich mehrere Erythrozyten gebunden haben. Abbildung 31 d zeigt eine kleinere Tumorzelle an deren Oberfläche zwei Erythrozyten haften. In Abbildung 31 e ist eine große Tumorzelle abgebildet an deren Oberfläche ebenfalls mehrere Erythrozyten gebunden sind und in Abbildung 31 f ist eine weitere kleine Tumorzelle zu sehen, an der drei Erythrozyten haften. Als Negativkontrolle wurden Erythrozyten, an die unspezifisches IgG (Spezies Rind) gekoppelt war, mit den Tumorzellen inkubiert. Hier kam es zu keiner Bindung zwischen Erythrozyten und Tumorzellen (Abb. 31 a, b).

Ergebnisse

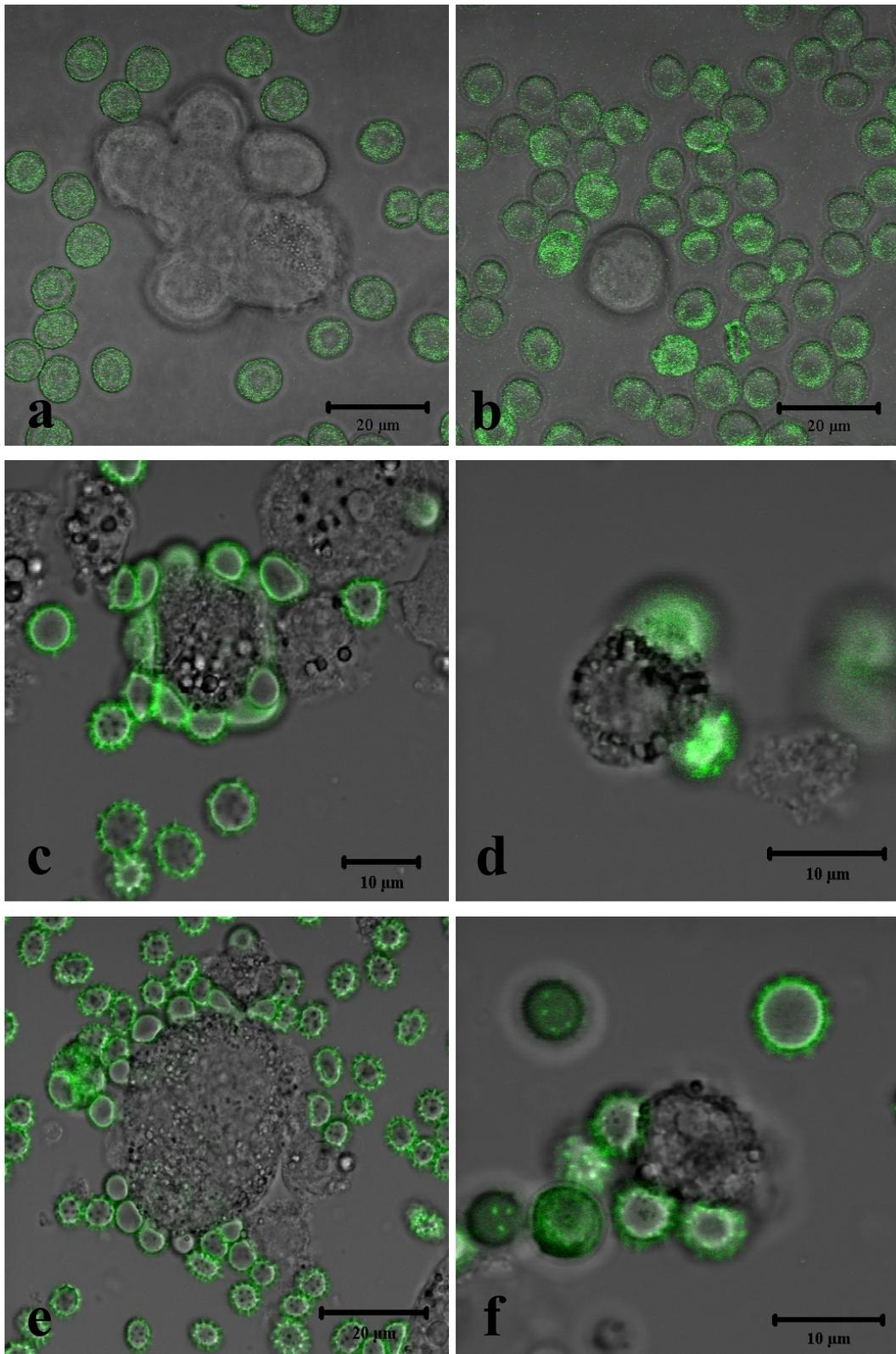


Abbildung 31: CLSM-Aufnahme nach Anregung mit einem Argonlaser (488nm). Nicht-PEGylierte mit Tumorantikörper-gekoppelte Erythrozyten gebunden an Krebszellen (Mammakarzinom-Zellen T47D). Bild a und b zeigen die Negativkontrolle. Hierfür wurden die Erythrozyten mit unspezifischem IgG gekoppelt. Die Erythrozyten wurden mit FITC-Avidin gekennzeichnet. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

Ergebnisse

Die Erythrozyten, welche an die Krebszellen gebunden haben, wurden im weiteren Verlauf von diesen Krebszellen aufgenommen. Dies konnte am intrazellulären FITC-Signal der Krebszellen festgestellt werden. In Abbildung 32 wurde ein repräsentatives Bild in vier verschiedenen Kanälen gezeigt, um das FITC-Signal (grün) und das PI-Signal (rot) sowohl getrennt voneinander als auch gleichzeitig darzustellen. Man sieht eine große Tumorzelle in der Mitte des Bildes. Der Kern dieser Zelle ist deutlich mit PI angefärbt. Außerdem befinden sich mehrere FITC-Avidin markierte Tumorantikörper-gekoppelte Erythrozyten auf dem Bild, von denen einige an der Oberfläche der Tumorzelle haften. Im Inneren der Tumorzelle ist zusätzlich ein starkes FITC-Signal zu erkennen, was auf die Aufnahme der Erythrozyten durch die Tumorzelle zurückzuführen ist.

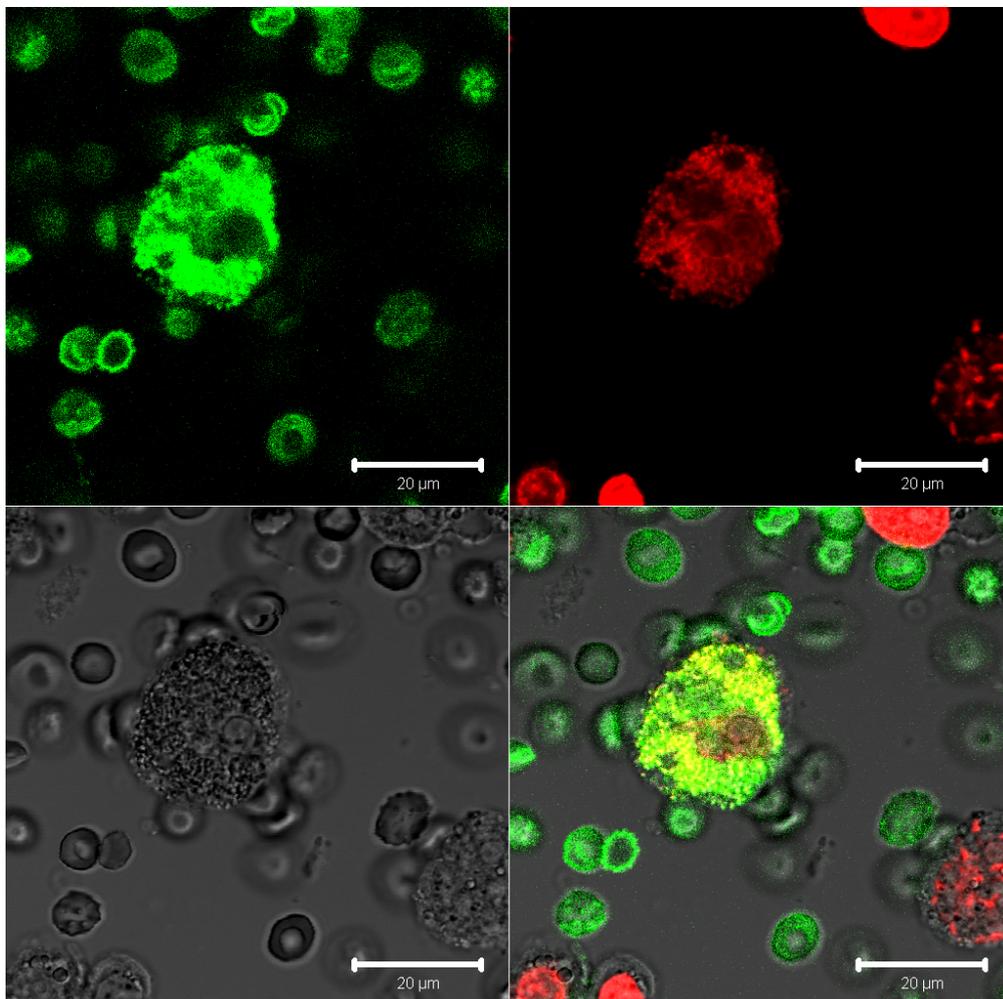


Abbildung 32: CLSM-Aufnahme. Tumorzelle, deren Nucleus mit PI angefärbt ist. Zusätzlich zeigt sich ein FITC-Signal im Zellinneren. Die Tumorzelle ist von Tumorantikörper-gekoppelten Erythrozyten umgeben, die mit FITC-Avidin markiert wurden. Aufteilung des Bildes in einen FITC-Kanal (oben links), einen PI-Kanal (oben rechts), einen Durchlicht-Kanal (unten links) und ein Bild, in dem alle Kanäle gleichzeitig gezeigt werden (unten rechts). Aufgenommen nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm) und einem HeNe1-Laser (543 nm). Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

3.5.2 PEGylierte Tumor-Antikörper gekoppelte Erythrozyten

Der gleiche Versuch wurde auch mit PEGylierten Tumorantikörper-gekoppelten Erythrozyten durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch die PEGylierten Erythrozyten an die Krebszellen binden. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Erythrozyten von den Krebszellen aufgenommen wurden (Abb. 33 c, e). Als Negativkontrolle wurden PEGylierte Erythrozyten, gekoppelt mit unspezifischem IgG (Spezies Rind) mit den Krebszellen inkubiert. Hier kam es zu keiner Bindung von Erythrozyten an die Tumorzellen und auch zu keiner Phagozytose der Erythrozyten durch die Tumorzellen (Abb. 33 a, b).

In Abbildung 30 c ist ein Zellverband aus mehreren Tumorzellen zu sehen. Sowohl eine Zelle am oberen Pol dieses Zellverbandes als auch eine Zelle unten links sind gerade dabei jeweils zwei nebeneinander liegende Erythrozyten aufzunehmen. Abbildung 33 d zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abbildung 33 c. Es ist deutlich zu erkennen, wie die Erythrozyten in die Tumorzelle hineingezogen werden. In Abbildung 33 e ist der gleiche Vorgang dargestellt. Mehrere nebeneinander liegende Tumorzellen sind dabei, Erythrozyten aufzunehmen. Abbildung 33 f zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abbildung 33 e.

Ergebnisse

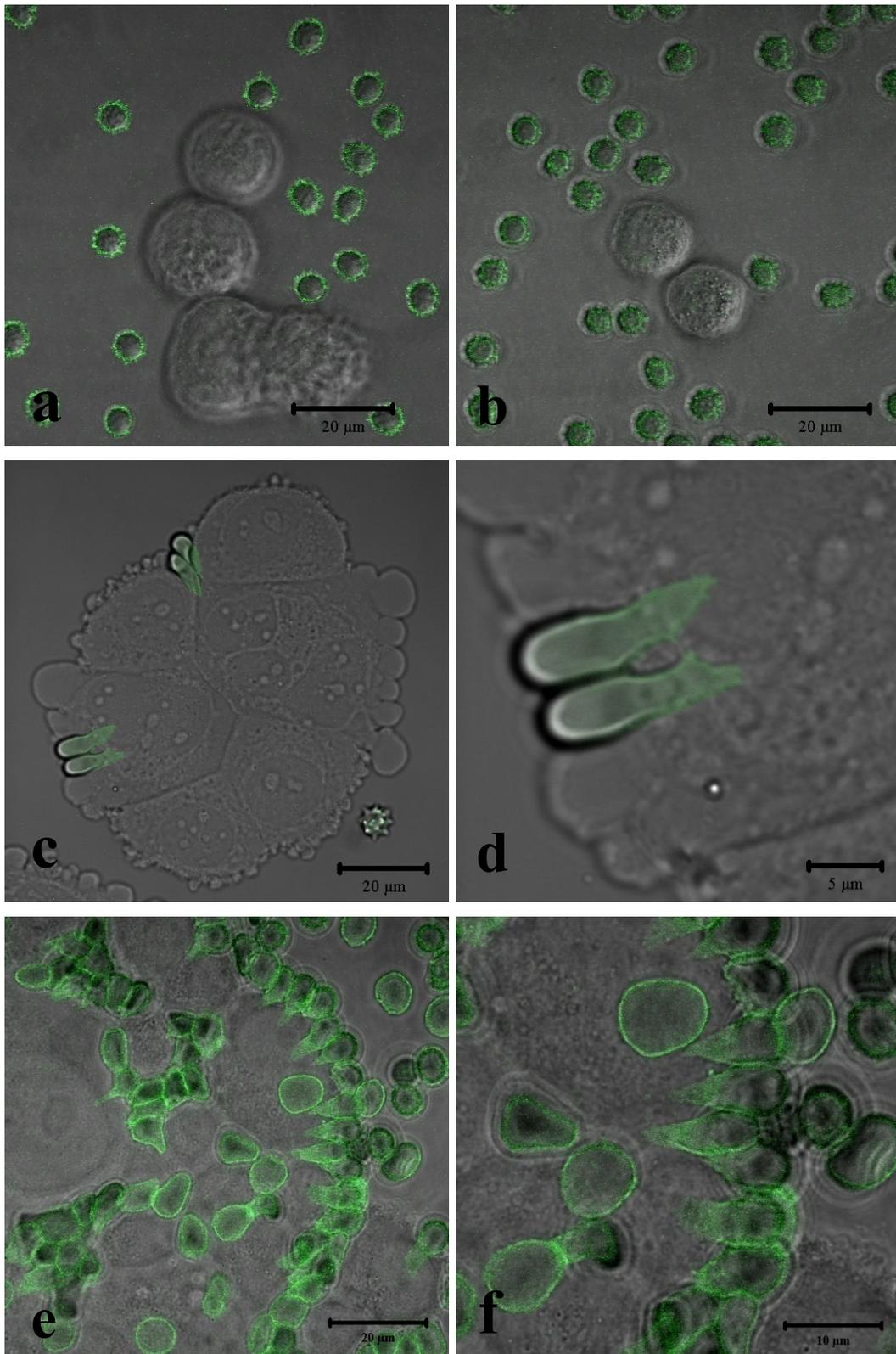


Abbildung 33: CLSM-Aufnahme nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm). PEGylierte Erythrozyten, gekoppelt mit Tumorantikörper. Die Erythrozyten wurden mit FITC-Avidin markiert. Die Krebszellen nehmen die Erythrozyten auf. Bild d zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von Bild c. Bild f zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von Bild e. Bild a und b zeigen Negativkontrollen. Hierfür wurden die Erythrozyten mit unspezifischem IgG gekoppelt und PEGyliert. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv.

4 Diskussion

Den etablierten Therapiekonzepten in der Krebsbehandlung sind trotz bemerkenswerter Fortschritte in den letzten Jahren immer noch Grenzen gesetzt. Während mit der Operativen- und Strahlentherapie vor allem lokoregionale Tumoren behandelt werden, findet die Chemotherapie ihren Einsatz gegen ein metastasiertes Krebsleiden. Die Metastasierung ist in den meisten Fällen für den letalen Ausgang der Krankheit verantwortlich. Leider geht die Chemotherapie oft mit erheblichen Nebenwirkungen einher, die in manchen Fällen auch therapielimitierend sein können. Es ist demnach ein wichtiges Anliegen in der Krebsforschung, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die eine Zerstörung vornehmlich der Krebszellen und nicht der gesunden Zellen des Organismus erreichen. Hierfür bietet sich unter anderem die Anwendung von Drug-Carriern an, in denen die Zytostatika transportiert werden können, um dadurch die gesunden Zellen vor deren toxischer Wirkung zu schützen. Vor allem die Erythrozyten bringen einige für die klinische Applikation wünschenswerte Voraussetzungen als Drug-Carrier mit. Sie sind natürliche Zellen, biokompatibel, nicht-immunogen und haben eine besonders große Beladungskapazität. Um ein gezieltes Targeting mit ihnen zu erreichen, ist es möglich, die Erythrozytenoberfläche mit spezifischen Antikörpern zu koppeln.

4.1 Ankopplung von Antikörpern an die Erythrozytenoberfläche

Die Ankopplung von IgG an die Oberfläche nativer Erythrozyten erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit den Molekülen Sulfo-NHS-LC-Biotin und Avidin. Ziel war zunächst eine Optimierung der Ankopplung des Antikörpers, das heißt die Bindung möglichst vieler Antikörper an die Erythrozytenoberfläche bei gleichzeitig möglichst geringer Beeinflussung der Morphologie der Erythrozyten. Die Ankopplung des IgG-Modellantikörpers wurde hierfür mit unterschiedlichen Sulfo-NHS-LC-Biotin- beziehungsweise Avidinkonzentrationen durchgeführt, um das beste Verhältnis zwischen Biotin- und Avidinkonzentration für die IgG-Ankopplung zu bestimmen.

Es ist bekannt, dass die Morphologie und Verformbarkeit der Erythrozyten eine entscheidende Rolle für deren Überlebensdauer in der Zirkulation besitzt [53]. Die Milz ist die wichtigste Barriere für die Erythrozyten *in vivo*. Morphologisch veränderte Erythrozyten,

deren Verformbarkeit eingeschränkt ist, bleiben in den engen Milztrabekeln hängen und werden von den Zellen des RES zerstört. Es sind eine Reihe von genetischen Krankheiten der Erythrozytenmembran bekannt, die zu einer anormalen Form der Zelle und somit zu deren frühzeitigem Abbau in der Milz führen [54]. Die morphologische Umwandlung der Erythrozyten kann entweder über echinozytische oder stomatozytische Zwischenstufen erfolgen und endet in der gemeinsamen Endform des Sphärozyten (Abb. 34).

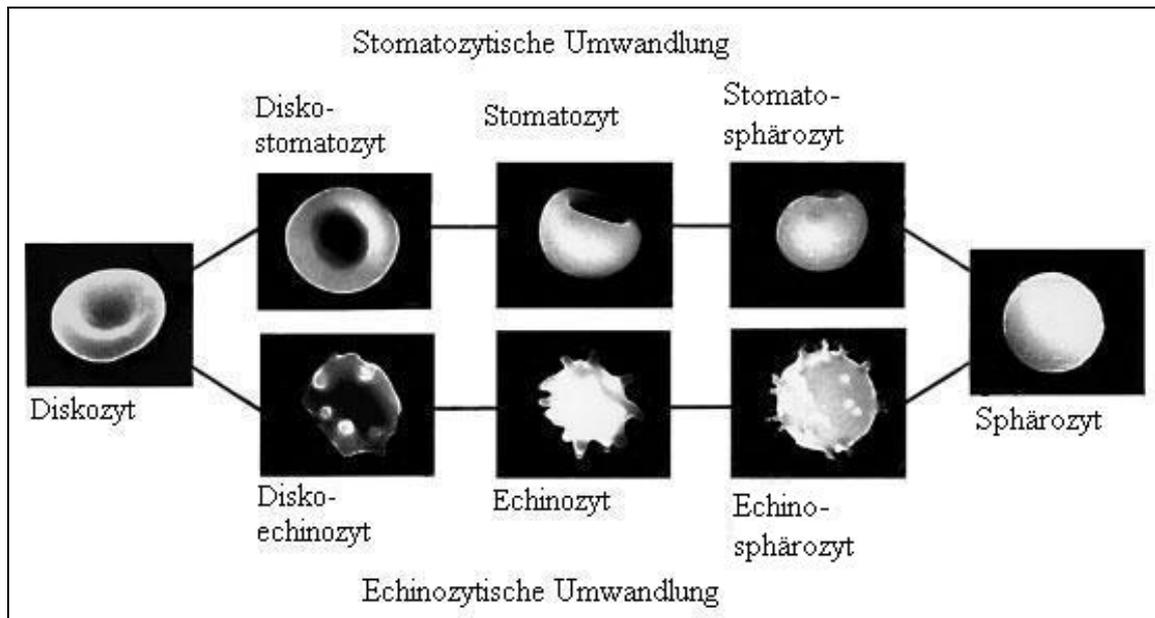


Abbildung 34: Die Umwandlung eines normalen Diskozyten über stomatozytische und echinozytische Zwischenformen zu der gemeinsamen pathologischen Endform eines Sphärozyten (verändert nach [53]).

4.1.1 Einfluss der Biotin- und Avidinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten

Es zeigte sich, dass sich die Morphologie der Erythrozyten durch eine ansteigende Sulfo-NHS-LC-Biotinkonzentration zunehmend änderte. Als Maß für die Formänderung der Erythrozyten wurde der Anteil an Echinozyten in den verschiedenen Proben bestimmt. Erythrozyten, die mit 0,08 mM beziehungsweise 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert wurden, zeigten eine normale Morphologie unter dem Konfokalen Lasermikroskop. Die Proben, welche mit 0,89 mM beziehungsweise 1,79 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert wurden, wiesen jedoch einen großen Teil an Echinozyten auf (s. 3.1.1, Tab. 5). In der Literatur beschriebene Faktoren, die eine Echinozytose verursachen können, sind unter anderem auch ein pH-Wert im alkalischen Bereich, eine Kalium-Depletion, ein Man-

gel an Glukose, amphiphile Medikamente und anionische sowie kationische Detergentien, um nur einige wenige zu nennen [55].

Sulfo-NHS-LC-Biotin reagiert mit ϵ -amino-Gruppen des Lysins von Membranproteinen auf der Oberfläche von den Erythrozyten unter Bildung einer Amid-Bindung [56]. Es ist möglich, dass die Membranstruktur durch eine exzessive Biotinylierung gestört wird, indem das Sulfo-NHS-LC-Biotin mit zu vielen Membranproteinen interagiert und eine Konformationsänderung in diesen Makromolekülen verursacht. Es ist bekannt, dass die Proteine Spectrin und Actin ein anastomosierendes Netzwerk unter der Erythrozytenmembran bilden, welches entscheidend für die Stabilität der Membran ist [57] und mit integralen und transmembranären Membranproteinen wie zum Beispiel Glycophorin und Band 3 in Verbindung steht [58] (Abb. 35). Eine dominante Rolle scheint hier vor allem das transmembranäre Glykoprotein Band 3 zu spielen, welches die Funktion eines Anionenaustauschers innehat und dazu in der Lage ist, Spectrin zu falten und auszuklappen. Diese Funktion kann durch eine Konformationsänderung des Moleküls beeinträchtigt werden, was in der Folge zur Ausbildung von Echinozyten beziehungsweise Stomatozyten führt [55, 59].

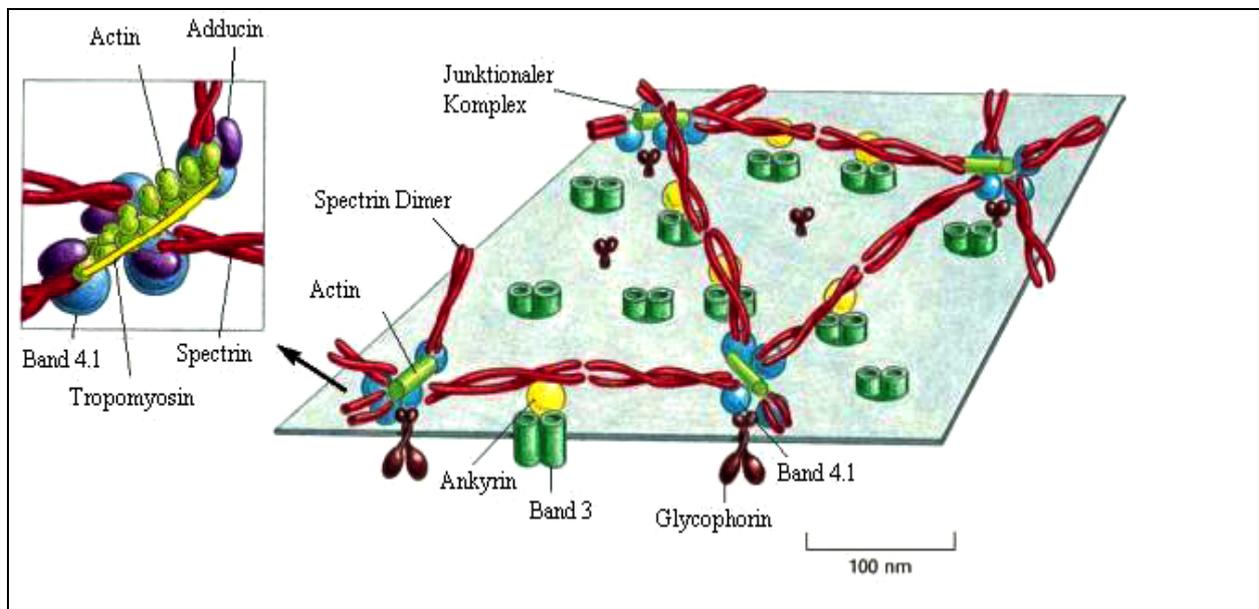


Abbildung 35: Schematische Darstellung des Zytoskeletts eines Erythrozyten. Spectrindimere sind in einem anastomosierenden Netzwerk durch junctionale Komplexe (vergrößert in linkem Kasten) verbunden. Der junctionale Komplex besteht aus Actin, Band 4.1, Adducin und einem Tropomyosin. Das Zytoskelett ist zum einen über die indirekte Bindung eines Spectrintetramers mit Band 3 Proteinen über ein Ankyrinmolekül mit der Membran verbunden und zum anderen über die Bindung eines Band 4.1 Proteins zu einem Band 3 Protein und einem Glycophorin (verändert nach [15]).

Der Einfluss der kovalenten Bindung von Biotin an die Erythrozytenmembran auf die Morphologie der Zellen und deren Verhalten *in vivo*, wurde auch von anderen Forschungsgruppen untersucht. Mishra *et al.* [60] biotinylierten Erythrozyten mit ansteigenden Biotinkonzentrationen, um dadurch ein Leber-Targeting zu erreichen. Es ist bekannt, dass mit Zunahme des Biotinylierungsgrades der Erythrozyten auch das Leber-Targeting zunimmt [56]. Sie biotinylierten allerdings nicht direkt die Erythrozytenmembran, sondern verwendeten succinyliertes Serum Albumin vom Rind als Quervernetzer zwischen Erythrozytenmembran und Biotin. Das succinylierte Albumin diente als ein nicht-nucleophiler Träger für das hydrophobe Biotin. Sie gingen davon aus, dass das Biotin in der Gegenwart von succinyliertem Albumin daran gehindert wird, mit der Membran des Erythrozyten in Interaktion zu treten und dadurch eine Formveränderung dieser Zellen vermieden werden kann. Sie arbeiteten bei einem Hämatokrit von 20 %. Die Erythrozyten wurden bei 37 °C für eine Stunde mit dem Biotin inkubiert. Eine maximale Biotinylierung erreichten sie bei einer Biotinkonzentration von 5 mM. Danach stellten sie keine weitere Zunahme an gebundenen Biotinmolekülen pro Erythrozyt fest. Eine Veränderung der Erythrozytenform wurde nicht beobachtet. Die Stabilität der Erythrozyten nahm bei maximaler Biotinylierung im Vergleich zu nativen Erythrozyten sogar zu. Bestimmt wurde das anhand der Glycerin Lyse Zeit (GLT₅₀), das heißt der Zeit, die vergeht bis 50 % der Erythrozyten in einer standardisierten Glycerinmischung hämolysieren.

In der vorliegenden Arbeit war es jedoch nicht das Ziel, ein Lebertargeting mit den modifizierten Erythrozyten zu erreichen, sondern Carrier herzustellen, die das Potential haben *in vivo* lange zu zirkulieren. Aus diesem Grund wurden die Zellen bei niedrigeren Konzentrationen biotinyliert. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Sulfo-NHS-LC-Biotinkonzentrationen von 0,08 mM beziehungsweise 0,17 mM auch ohne die Verwendung von Albumin kaum Echinozyten ausbildeten. Als wichtiges Kriterium galt vor allem auch die erfolgreiche Ankopplung des Antikörpers an die Erythrozytenoberfläche. Wie gezeigt werden konnte, war dies auch bei den niedrigen Sulfo-NHS-LC-Biotinkonzentrationen sehr gut möglich (s. unten).

Muzykantov *et al.* [56] zeigten, dass ein hoher Biotinylierungsgrad von Erythrozyten der Ratte, biotinyliert bei einer Biotinkonzentration von 0,7 mM, über eine Aktivierung des Komplementsystems und eine C3b-vermittelte Phagozytose durch Makrophagen zu deren raschen Elimination aus dem Blutkreislauf führt. Erythrozyten, die sie mit nur 0,02 mM Biotin biotinyliert hatten, wiesen hingegen im Vergleich zu nativen Erythrozyten keine

nennenswerten Veränderungen in Bezug auf ihre Biodistribution, ihre Entfernung aus dem Blutkreislauf oder ihre Lyserate auf.

Auch die Avidinkonzentration wurde bei konstanter Biotinkonzentration variiert, um festzustellen, ob die Morphologie der Erythrozyten und die IgG-Ankopplung davon beeinflusst werden. Bei einer Avidinkonzentration von 0,14 μM und 0,28 μM bewahrten etwa 90 % der Erythrozyten ihre diskoidale Form. Bei 0,56 μM Avidin stieg der Anteil der Echinozyten nur geringfügig an. In der Probe, welche mit 1,41 μM Avidin versetzt wurde, bildeten sich bis zu 30 % Echinozyten aus (s. 3.1.2, Tab. 7).

Avidin ist ein Glykoprotein von 67 kDa und besitzt eine hohe positive Ladung. Es ist möglich, dass es zu Wechselwirkungen mit geladenen Membrankomponenten, wie zum Beispiel Sialoglykoproteinen, kommen kann, die relevante Veränderungen in physiochemischen Eigenschaften in Protein- und Lipidbestandteilen der Membran nach sich ziehen können.

Muzykantov *et al.* [61] machten die Beobachtung, dass biotinylierte Erythrozyten nach der zusätzlichen Modifikation mit Avidin durch autologes Serum lysiert wurden. Dieses und weitere Ergebnisse der Gruppe wiesen darauf hin, dass die biotinylierten Erythrozyten durch das polyvalente Binden von Avidin zu Aktivatoren des alternativen Weges des Komplementsystems wurden [61-66]. Dies erklärten sie damit, dass es durch das polyvalente Binden von Avidin an biotinylierte Oberflächen zu einer Verschiebung der Membranproteine kommen kann. Wie bereits weiter oben im Text erwähnt, besitzt Avidin vier Bindungsstellen für Biotin und da Biotin kovalent an Membranproteine gebunden ist, kann es, wenn Avidin gleichzeitig mehrere Biotinmoleküle bindet, zu einer Störung der räumlichen Struktur dieser Membranproteine kommen. Dies kann unter anderem auch zu einer Inaktivierung des Decay-accelerating Faktor (DAF) und von CD59 in der Membran des biotinylierten Erythrozyten führen. Beides sind Inhibitoren der Aktivierung des Komplementsystems [66]. Dieser Vorgang wird durch die zusätzliche Kette mit sechs Kohlenstoffatomen (Hexanoat-Spacer) des Sulfo-NHS-LC-Biotins begünstigt, da die Biotinmoleküle durch diese Verlängerung im Raum beweglicher werden und somit eher dazu in der Lage sind, die vier Biotin-Bindungsstellen eines Avidinmoleküls zu besetzen.

Muzykantov *et al.* [56] erreichten durch die Verwendung von geringen Biotinkonzentrationen eine monovalente Bindung von Avidin. Diese Erythrozyten wurden nicht durch autologes Serum lysiert und zeigten ein gutes Überleben *in vivo*. Hierdurch

wird deutlich, dass das Verhältnis von Biotinkonzentration zu Avidinkonzentration entscheidend für den Erhalt einer intakten Membranstruktur und somit auch für die Herstellung von langzirkulierenden Carrier-Erythrozyten ist. Die positive Ladung von Avidin scheint demgegenüber nur einen untergeordneten Einfluss auf die Membranstruktur zu haben.

4.1.2 IgG-Ankopplung bei verschiedenen Biotin- und Avidinkonzentrationen

Nach Beurteilung ihrer Morphologie wurden die bei unterschiedlichen Biotinkonzentrationen biotinylierten Erythrozyten mit jeweils 0,28 μM Avidin in PBS versetzt und anschließend mit biotinylierten IgG gekoppelt. Aufgrund des hohen Anteils von knapp 60 % an Echinozyten in der 1,79 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe wurden diese Zellen nicht mehr mit Antikörpern beladen. Zum Nachweis des gekoppelten IgG auf der Erythrozytenoberfläche wurde ein FITC-konjugierter sekundärer Antikörper verwendet. Das Fluoreszenzsignal dieses sekundären Antikörpers auf der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität war für die 0,08 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe am niedrigsten. Sie stieg bei der 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe deutlich an und fiel bei der 0,89 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe wieder ab (s. 3.1.1, Tab. 6). Die Zunahme der Fluoreszenzintensität von der 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe in Bezug auf die 0,08 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe lässt sich dadurch erklären, dass bei einem größeren Angebot an Biotinmolekülen auf der Membranoberfläche mehr Avidinmoleküle binden konnten und dadurch auch mehr biotinyliertes IgG angekopelt wurde. Dies wiederum ergibt mehr Bindungsstellen für den FITC-konjugierten sekundären Antikörper und damit ein stärkeres Fluoreszenzsignal. Bei der 0,89 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Probe nahm die Fluoreszenzintensität wieder ab. In dieser Probe betrug der Anteil an Echinozyten im Mittel um die 30 %. Es ist möglich, dass die Ankopplung von IgG durch diese Voraussetzung beeinträchtigt gewesen ist. Darüber hinaus kann es bei höheren Biotinkonzentrationen auch zu einer Sättigung der vier Biotinbindungsstellen des Avidins gekommen sein, also zu einer multivalenten Bindung von Avidin an die biotinylierten Erythrozyten, so dass für den biotinylierten Antikörper kaum noch freie Bindungsstellen zur Verfügung standen.

Muzykantov *et al.* [65] zeigten, dass die Zahl der gebundenen IgG-Moleküle von der verwendeten Biotinkonzentration abhängt. Die meisten IgG-Moleküle konnten bei

Biotinkonzentrationen zwischen 0,1 mM und 1 mM Biotin an die Erythrozyten gekoppelt werden. Bei Biotinkonzentrationen höher als 1 mM war die Anzahl von gekoppelten IgG an die Erythrozyten ungenügend. Dies führten sie ebenfalls auf die multivalente Bindung von Avidin an Biotin zurück. Diese Ergebnisse von Muzykantov konnten in der vorliegenden Arbeit somit prinzipiell bestätigt werden.

Auch der Einfluss verschiedener Avidinkonzentrationen bei konstanter Biotinkonzentration auf die Ankopplung von biotinyliertem IgG wurde untersucht. Hierfür wurden die 0,14 μM , 0,28 μM beziehungsweise 0,56 μM Avidin-Proben mit dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper Ziege anti-IgG-Rind inkubiert. Die 1,41 μM Avidin-Probe wurde aufgrund der Tendenz zur Ausbildung von Agglutinaten nicht weiter berücksichtigt. Die Fluoreszenz wurde anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert. Sie nahm mit steigender Avidinkonzentration geringfügig zu, ein signifikanter Unterschied war jedoch nicht zu vermerken (s. 3.1.2, Tab. 8). Dies könnte sich dadurch erklären, dass der Großteil an zugänglichen Biotinmolekülen auf der Erythrozytenoberfläche bereits bei der niedrigsten Avidinkonzentration durch Avidin besetzt war und somit kein weiteres Avidin gebunden werden konnte. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass nicht mit der maximal einsetzbaren IgG-Konzentration gearbeitet wurde, so dass bei den höheren Avidinkonzentrationen durchaus noch freie Bindungsstellen für IgG vorhanden gewesen sind, hierfür jedoch keine weiteren Bindungspartner zur Verfügung standen.

Um den Einfluss der Biotin- beziehungsweise Avidinkonzentration auf die Morphologie der Erythrozyten und die Stärke der Fluoreszenzintensität zusammenzufassen, wurde unter 3.1.1 ein Score eingeführt, der den Anteil der Echinozyten in der jeweiligen Probe, die Stärke des Fluoreszenzsignals und die robuste Standardabweichung des Fluoreszenzsignals der einzelnen Messungen berücksichtigte. Der niedrigste Score kennzeichnete die beste Kombination aus den verschiedenen Parametern und wurde zum einen für 0,17 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin und zum anderen für 0,28 μM Avidin errechnet.

4.1.3 Stabilität der Ankopplung von IgG an die Erythrozyten

Um die physiologischen Eigenschaften der Erythrozyten so wenig wie möglich zu beeinflussen, wurde die Ankopplung von IgG an deren Oberfläche durchgeführt, ohne die Zellen zuvor chemisch zu fixieren. Die Haltbarkeit der Erythrozyten ist dadurch allerdings begrenzt. Für eine spätere Anwendung der Immunoerythrozyten *in vivo* kann es unter Um-

Diskussion

ständen wichtig sein, dass diese Zellen über einen gewissen Zeitraum *ex vivo* haltbar bleiben und auch die Antikörperbindung über diesen Zeitraum nicht beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der Antikörperbindung über mehrere Tage untersucht.

Nach Optimierung der Ankopplung mit dem IgG-Modellantikörper vom Rind, wurde nun der Tumor-Antikörper an die Erythrozyten gebunden. Die Tumorantikörper-gekoppelten Erythrozyten wurden in 0,2 % HSA/ 1,5 M MES pH 7,4 bei 4 °C gelagert. Nach 5, 10, 12 beziehungsweise 15 Tagen wurde jeweils eine kleine Menge der Probe entnommen und mit einem FITC-konjugierten sekundären Ziege anti-IgG-Maus-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde diese Probe durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich, dass sich die IgG-Ankopplung über 12 Tage stabil verhielt.

Dies erklärt sich durch die hohe Bindungsaffinität zwischen Biotin und Avidin. Wie bereits weiter oben im Text erwähnt, besitzt die nicht-kovalente Bindung zwischen Avidin und Biotin die höchste bisher bekannte Affinität zwischen einem Protein und einem Liganden [39]. Die hohe Stabilität der Antikörperankopplung über die Moleküle Biotin und Avidin wird auch bei der Anwendung von Dynabeads[®] deutlich. Dies sind paramagnetische Polyesterpartikel, die über Biotin und Avidin mit monoklonalen Antikörpern gekoppelt sind und monatelang haltbar bleiben [67]. Das IgG-Molekül selbst ist ebenfalls sehr stabil, da die leichten und schweren Ketten über kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [22].

An Tag 15 nahm die Fluoreszenzintensität gegenüber dem Wert von Tag 12 jedoch um 80 % ab (s. 3.2, Tab. 9). Dies ist dadurch zu erklären, dass der Großteil der Erythrozyten inzwischen hämolysiert war, was bereits an der Färbung des Überstandes erkennbar war.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass nicht die Stabilität der Antikörperbindung, sondern vielmehr die Überlebensdauer der Erythrozyten *ex vivo* den limitierenden Faktor bildet. Bei MES handelt es sich um einen synthetischen Puffer, der weder von Bakterien noch von Eukaryonten verstoffwechselt werden kann [68]. Eine längere Lagerungszeit der modifizierten Erythrozyten ließe sich durch die Verwendung von speziellen Aufbewahrungslösungen für Erythrozytenkonzentrate wie zum Beispiel SAG-M, Adsol oder PAGGS-M erreichen, da sie die für das Überleben der Zellen wichtigen Substrate enthalten [69].

In Hinblick auf die Anwendung der Erythrozyten *in vivo* wäre es allerdings sinnvoller, die autologen Erythrozyten so früh wie möglich nach Modifikation zu retransfundieren, da sich die Zellen dann in ihrem besten Zustand befinden. Es ist bekannt, dass die Lagerung zu

strukturellen und biochemischen Veränderungen der Erythrozyten führt [70-73]. Diese Veränderungen sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass bis zu 25 % der Erythrozyten innerhalb von nur 24 Stunden nach Transfusion aus der Zirkulation verschwinden [74].

Die Lagerung von Zellen bringt außerdem auch immer das Risiko einer Kontamination mit sich [75]. Eine frühzeitige Reinfusion der modifizierten Erythrozyten würde dieses Risiko vermindern.

4.2 Beladung der IgG-gekoppelten Erythrozyten mit FITC-Dextran

Die modifizierten Erythrozyten sollen später als Drug-Carrier für Zytostatika verwendet werden. Ihre hohe Beladungskapazität stellt einen ihrer größten Vorteile gegenüber synthetischen Carriern wie Liposomen dar. Bereits eine kleine Menge an Zellen kann eine große Menge an Medikamenten aufnehmen [10, 76]. Die IgG-gekoppelten Erythrozyten wurden in der vorliegenden Arbeit mit der Modellsubstanz FITC-Dextran (MG 77 kDa) beladen. FITC-Dextran kann nicht passiv in die Zellen diffundieren. Außerdem bietet es den Vorteil, dass es wasserlöslich und nicht toxisch ist. FITC-Dextran beladene Zellen lassen sich sehr gut mit dem Durchflusszytometer und dem CLSM untersuchen. Das CLSM bietet die Möglichkeit morphologische Beobachtungen von einzelnen Zellen durchzuführen. Mit dem Durchflusszytometer kann eine große Anzahl an Zellen in Hinblick auf die Homogenität ihrer Beladung mit der Modellsubstanz analysiert werden. Es ist also möglich Subpopulationen zu unterscheiden, die in unterschiedlichem Maße mit der Modellsubstanz beladen worden sind.

Die Beladung wurde, wie unter 2.2.6 beschrieben, mit dem Verdünnungsverfahren der hypotonen Hämolyse durchgeführt. Bei über 90 % der Erythrozyten wurde eine Fluoreszenzintensität mit einem F_{Median} von mehr als 10^3 rel. E. erreicht, wohingegen der F_{Median} der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle, in diesem Fall native Erythrozyten, nur einen Wert von 2,21 besaß (s. 3.3, Abb. 23), was den Werten der Eigenfluoreszenz der Zellen entspricht. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messungen macht deutlich, dass die Erythrozyten mit dieser Technik homogen mit FITC-Dextran beladen werden können. Dies wird auch durch die CLSM-Aufnahmen bestätigt (s. 3.3, Abb. 24).

Alvarez *et al.* [77] verwendeten ebenfalls eine Methode der hypotonen Hämolyse, die sogenannte Dialysemethode (engl. dialysis method), um Erythrozyten der Ratte und des Men-

Diskussion

schen mit FITC-Dextran (MG 19,6 kDa) zu beladen. Dieses Verfahren unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von dem Verfahren, welches in dieser Arbeit angewendet wurde. So verwendeten sie einen Dialysebeutel in dem die Erythrozyten und das FITC-Dextran enthalten waren. Die Erythrozyten wurden dann für eine Stunde bei 4 °C gegen eine hypotone PBS (80 mOsm/kg) mit zugesetzter Glukose, ATP und Gluthation dialysiert. Anschließend wurden die Poren der Zellen durch Zugabe von PIGPA.C bei 37 °C und während einer Inkubationszeit von 30 min wieder verschlossen.

Sie erhielten eine stark inhomogene Beladung der humanen Erythrozyten mit einer Subpopulation die eine Fluoreszenzintensität mit einem F_{Median} zwischen $5 \cdot 10^2$ bis $7 \cdot 10^3$ rel. E. hatten, zusätzlich zu einer Population mit Werten zwischen $7 \cdot 10^3$ bis $9 \cdot 10^3$ rel. E. Die restlichen Zellen, immer weniger als 40 %, hatten eine niedrige Fluoreszenzintensität mit einem F_{Median} von Werten zwischen 15 und $5 \cdot 10^2$ rel. E. Einerseits wurde zwar für über die Hälfte der Zellen eine hohe Beladung erreicht, andererseits ergaben sich aber bei den übrigen Erythrozyten nur sehr unterschiedliche FITC-Dextran-Konzentrationen. In Anbetracht der Heterogenität der Beladung ist anzunehmen, dass die Erythrozyten in unterschiedlichem Maß für diese Methode der hypotonen Hämolyse empfänglich sind. Scott *et al.* [78] wiesen darauf hin, dass es möglicherweise bei einem bedeutenden Teil der Erythrozyten in dem Dialysebeutel überhaupt nicht zu einer hypotonen Hämolyse kommt.

Rossi *et al.* [37] empfehlen die Verdünnungsmethode der hypotonen Hämolyse für Substanzen mit einem niedrigem Molekulargewicht unter 130 kDa. Die Methode ist schnell und einfach durchzuführen. Allerdings weisen sie auch darauf hin, dass für dieses Verfahren eine hohe Ausgangskonzentration von der einzuschließenden Substanz notwendig ist und im Verhältnis dazu nur ein geringer Prozentsatz in die Erythrozyten aufgenommen wird. Es muss zudem mit einem erheblichen Verlust an intrazellulärem Inhalt, wie erythrozytären Enzymen und Hämoglobin, gerechnet werden. Den höchsten Prozentsatz an eingeschlossenem Substrat geben sie für die Dialysemethode an. Auch berichten sie bei dieser Methode über ein sehr gutes *in vivo* Überleben der beladenen Zellen. Dies erklären sie damit, dass die Abnahme des osmotischen Druckes bei dieser Methode graduell erfolgt und die strukturelle Integrität der Membran hierdurch besser erhalten bleibt. Diese Methode wird empfohlen, wenn eine große Menge an Erythrozyten beladen werden soll.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Verfahren der hypotonen Hämolyse einfach durchzuführende und effektive Beladungsmethoden sind. Ein großer Anteil des gewünschten Medikamentes wird von den Erythrozyten aufgenommen. Die Zellen erholen sich anschlie-

ßend gut von dieser Behandlung und zeigen eine beinahe normale Überlebenszeit sowie beinahe normale hämatologische Parameter [37].

Aus den eigenen Untersuchungen lässt sich folgern, dass das Beladungspotential der Erythrozyten durch deren Oberflächenmodifizierung mit IgG nicht beeinträchtigt wird. Außerdem erweist sich die Durchflusszytometrie für die Evaluation von Zellen, die mittels der hypotonen Hämolyse beladen werden als ein sehr effektives Verfahren, um gleichzeitig sowohl die Ankopplung der Antikörper an die äußere Erythrozytenmembran als auch die Beladung mit Substraten zu quantifizieren. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die zu detektierenden Moleküle fluoreszieren beziehungsweise mit entsprechenden Markern versehen werden können.

4.3 PEGylierung der modifizierten Erythrozyten zur Herabsetzung ihrer Immunogenität

Die modifizierten Erythrozyten sollen sich später *in vivo* ausreichend lange im Blutkreislauf befinden, um dort zirkulierende Krebszellen zu binden. Um sie vor einem frühzeitigen Abbau durch das körpereigene Immunsystem zu schützen, ist es notwendig das Fremdprotein, namentlich IgG und Avidin, auf deren Oberfläche zu maskieren. Hierfür wurde mPEG an die modifizierten Erythrozyten gebunden.

In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass die Modifikation von Proteinen oder Enzymen mit PEG deren Halbwertszeit in der Zirkulation signifikant verlängert und deren Immunogenität reduziert [79-83]. PEG wurde daraufhin auch eingesetzt, um Blutgruppenantigene auf Erythrozyten abzudecken und somit universale Spendererythrozyten zu schaffen [36]. Die PEGylierung führt zu der Ausbildung eines Hydratschildes um die Erythrozyten. Hierdurch werden zum Beispiel Blutgruppenantigene auf deren Oberfläche für große Moleküle wie Antikörper nicht mehr zugänglich und die Interaktion mit Zellen des Immunsystems wird erschwert. Der Austausch von kleinen Molekülen wie Sauerstoff und Glukose wird durch die PEGylierung nicht beeinträchtigt [45].

In der vorliegenden Arbeit wurden die IgG-gekoppelten Erythrozyten PEGyliert, um deren Phagozytose durch Zellen des Immunsystems zu vermeiden.

Zur Überprüfung, ob die PEGylierung der IgG-gekoppelten Erythrozyten erfolgreich war, wurde jeweils vor und nach der PEGylierung das Zeta Potential der Erythrozyten gemes-

sen. In einem relativ konzentrierten ionischem Medium, wie es zum Beispiel physiologische Lösungen sind, wirkt das gebundene PEG auf die elektrokinetische Schicht der Plasmamembranoberfläche, indem es die Menge und die Verteilung von Ionen in der Nähe dieser Oberfläche reduziert [84]. Durch die stark hydrierten Seitenketten des PEG-Moleküls verschiebt sich die hydrodynamische Gleitebene des Erythrozyten nach außen weg von der Membranoberfläche und somit wird der Wert des Zeta Potentials verändert.

Erwartungsgemäß zeigte sich eine deutliche Abnahme des Zeta Potentials der PEGylierten Zellen gegenüber den nicht-PEGylierten Kontrollen (s. 3.4.1, Abb. 25). Das bedeutet, dass negative Ladungen des IgG auf der Oberfläche der Erythrozyten durch das mPEG abgedeckt wurden. Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass die IgG-gekoppelten Erythrozyten erfolgreich PEGyliert worden sind.

Aufnahmen mit dem CLSM zeigten, dass die PEGylierung in 31,8 % der Zellen zur Ausbildung von Echinozyten führte (s. 3.4.1, Abb. 26). Um eine möglichst gute Abdeckung der Fremdproteine auf der Erythrozytenoberfläche zu erreichen und die Zellen damit vor der Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten zu schützen, wurden die Erythrozyten in der vorliegenden Arbeit bei einer relativ hohen Konzentration von 3,8 mM für mPEG inkubiert. Dabei wurde berücksichtigt, dass durch die Proteine Avidin und IgG auf der Erythrozytenoberfläche zusätzliche Bindungsstellen für das mPEG zur Verfügung standen. Scott *et al.* [46] zeigten, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Konzentration von mPEG und der Abnahme der Phagozytose durch Monozyten besteht. Sie PEGylierten unter anderem bei einer Konzentration von bis zu 10 mM.

Hashemi-Najafabadi *et al.* [85] empfahlen für die PEGylierung von nativen Erythrozyten zur Herstellung von universalen Spendererythrozyten eine maximale Konzentration von 3 mM für mPEG (MW 5 kDa), da sich bei höheren Konzentrationen zunehmend Echinozyten ausbildeten.

Aus dem Vergleich der Form der Erythrozyten in Boratpuffer pH 9 mit und ohne Zugabe von mPEG, kann gefolgert werden, dass das mPEG, und nicht der alkalische pH des Puffers, für die Ausbildung der Echinozyten verantwortlich gewesen ist. Die Erythrozyten der Kontrolle, die in Boratpuffer pH 9 ohne die Zugabe von mPEG inkubiert wurden, behielten zu über 90 % ihre diskoide Form. Trotz der zusätzlichen mPEG-Bindungsstellen durch das an der Erythrozytenoberfläche gebundene Avidin und IgG, weisen die Ergebnisse darauf

hin, dass die gewählte Konzentration von 3,8 mM eine zu große Belastung für die Erythrozytenmembran darstellte.

4.3.1 Verfügbarkeit der gekoppelten Antikörper nach der PEGylierung

Einerseits sollte das mPEG Antigene auf der Erythrozytenoberfläche maskieren, andererseits durfte das IgG, welches an die Erythrozytenoberfläche gekoppelt war, seine Antigenbindungseigenschaft durch die PEGylierung nicht einbüßen. Um zu überprüfen, ob die IgG-Moleküle auf der Erythrozytenoberfläche auch nach der PEGylierung noch in ausreichendem Maße zugänglich waren, wurden die PEGylierten IgG-gekoppelten Erythrozyten mit einem FITC-konjugierten sekundären anti-IgG-Antikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle galten IgG-gekoppelte Erythrozyten, die nicht PEGyliert waren.

Es zeigte sich, dass der FITC-konjugierte sekundäre Antikörper auch nach der PEGylierung an das IgG auf der Oberfläche der Erythrozyten binden konnte. Insgesamt kam es im Vergleich zu den nicht-PEGylierten IgG-gekoppelten Erythrozyten zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität um 18,75 % (s. 3.4.2, Abb. 27). Dieses Ergebnis zeigte, dass die IgG-Moleküle auf der Erythrozytenoberfläche trotz der PEGylierung noch für den sekundären Antikörper zugänglich waren. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der primäre Antikörper trotz PEGylierung seine Antigenbindungseigenschaft beibehalten hat.

Dies lässt sich dadurch erklären, dass mPEG kein starres, sondern ein bewegliches Molekül ist. Durch thermische Bewegungen und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Molekülen an der Oberfläche der Membran, kommt es ständig zu Verschiebungen zwischen diesen Molekülen, so dass der sekundäre Antikörper einen Zugang zu dem IgG auf der Erythrozytenoberfläche finden kann.

4.3.2 Immunogenität der modifizierten Erythrozyten im Phagozytoseassay

Der Phagozytoseassay mit autologem Vollblut wurde angewendet, um zu überprüfen, ob die PEGylierung die IgG-gekoppelten Erythrozyten vor der Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten schützen kann. Hierfür war es zunächst notwendig, die modifizierten Erythrozyten sowie die Kontroll-Erythrozyten mit FITC-Avidin zu markieren, um die Proben später mit dem Durchflusszytometer auswerten zu können.

Diskussion

Die PEGylierten Erythrozyten wurden entgegen der Annahme deutlich stärker phagozytiert als die nicht-PEGylierten Erythrozyten. Die Phagozytoseaktivität der Monozyten betrug bei den nicht-PEGylierten Erythrozyten 13,9 %, bei den PEGylierten Erythrozyten hingegen 47 %. Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten lag für die nicht-PEGylierten Erythrozyten bei 9,4 % und für die PEGylierten Erythrozyten bei 49,13 % (s. 3.4.3, Abb. 29).

Um auszuschließen, dass das FITC-Avidin die Phagozytoseaktivität beeinflusst, wurden die Erythrozyten in einem zweiten Ansatz markiert, indem sie innen mit FITC-Dextran beladen wurden. Auch hier zeigte sich die gleiche Tendenz, wenn auch der Unterschied zwischen den nicht-PEGylierten und PEGylierten Erythrozyten weniger ausgeprägt war. Die Phagozytoseaktivität der Monozyten betrug bei den nicht-PEGylierten Erythrozyten 23,39 %, bei den PEGylierten Erythrozyten hingegen 30,25 %. Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten lag für die nicht-PEGylierten Erythrozyten bei 23,93 % und für die PEGylierten Erythrozyten bei 43,15 % (s. 3.4.3, Abb. 30).

Scott *et al* [46] zeigten dagegen, dass sich PEGylierte Erythrozyten vom Schaf, die zuvor mit humanem Serum inkubiert worden waren, gegenüber der Phagozytose durch humane Monozyten des peripheren Blutes in hohem Maße als resistent erwiesen. Die PEGylierung führte hier konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Abnahme der Antigenität der Erythrozyten. Es wurde bei Konzentrationen von 0,1 mM bis 1,6 mM für PEG (5 kDa) in einer Erythrozytensuspension mit einem Hämatokrit von 12 % gearbeitet. In weiteren Versuchen wurde außerdem keine signifikante Abnahme der *in vivo* Überlebenszeit von PEGylierten Erythrozyten der Maus beobachtet, auch nicht nach wiederholter Administration. Bei diesen Ergebnissen sollte berücksichtigt werden, dass verschiedene Spezies auch verschiedene hämorrheologische Eigenschaften besitzen [86], was sich vermutlich auch auf das Ergebnis der PEGylierung auswirken kann.

Wie oben beschrieben, kam es in der vorliegenden Arbeit durch die PEGylierung bei über 30 % der Erythrozyten zur Ausbildung von Echinozyten. Dies deutet darauf hin, dass die Membran der Zellen verändert worden war. Dies wiederum könnte die Zellen zur Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten prädisponieren. Die Phagozytose dient normalerweise der Beseitigung von toten, sterbenden und kranken Zellen sowie von Mikroorganismen durch Phagozyten wie Makrophagen, Dendritische Zellen und Granulozyten [87]. Dies kann durch die Opsonierung mit Antikörpern und die Aufnahme über Fc-Rezeptoren der Phagozyten oder durch die Opsonierung durch das Komplementsystem und die Aufnahme über den C3-Rezeptor der Phagozyten geschehen.

Garratty [88] weist darauf hin, dass bis zu 25 % der normalen Individuen Antikörper gegen PEG haben können. PEG habe demnach antigenetische Eigenschaften und wirkt immunogen. Er stützt sich bei dieser Hypothese auf eigene Ergebnisse sowie auf ähnliche Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen. Armstrong *et al.* [89] zeigten, dass das Vorhandensein von anti-PEG Antikörpern eng mit der raschen Elimination von PEG-ASNase aus der Zirkulation assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit betrug die Phagozytoserate der Monozyten bei nicht-PEGylierten IgG-gekoppelte Erythrozyten nur 13,9 % und die Phagozytoserate der Granulozyten lag sogar noch niedriger bei nur 9,4 %. Für *in vivo* Versuche wären die nicht-PEGylierten Erythrozyten somit besser geeignet als die PEGylierten.

Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Erythrozyten, die bei einer hohen PEG-Konzentration PEGyliert wurden, *in vivo* von den Zellen des RES in Leber und Milz sequestriert werden, da sich bereits *in vitro* eine deutliche Phagozytose dieser Zellen durch Monozyten und Granulozyten nachweisen lässt. Dieser Effekt lässt sich positiv nutzen, wenn eine hohe Dosis des Medikamentes in der Leber oder Milz erwünscht ist. Mögliche klinische Indikationen für ein RES-Targeting sind neben hepatischen Tumoren und Metastasen [90] auch lysosomale Speicherkrankheiten [91], parasitäre Erkrankungen [92], eine Eisenüberladung der Zellen des RES [93], sowie eine HIV-Infektion [94].

4.4 Targeting der Tumorzellen durch die modifizierten Erythrozyten *in vitro*

Nach der Optimierung der Antikörper-Ankopplung an die Erythrozyten mittels IgG vom Rind als Modellantikörper, wurde der monoklonale Maus Antikörper Ep-CAM Ab-2 (Klon AUA1), der gegen das humane epithelspezifische Antigen gerichtet ist, an die Erythrozytenoberfläche gekoppelt. Das epithelspezifische Antigen wird auf der baso-lateralen Zelloberfläche der meisten einfachen Epithelien und einer großen Mehrzahl der Karzinome exprimiert [38]. Die Tumorantikörper-gekoppelten Erythrozyten wurden mit Mammakarzinom-Zellen der Zellreihe T47D inkubiert. Es wurden parallele Ansätze für nicht-PEGylierte und PEGylierte Erythrozyten durchgeführt. Es zeigte sich, dass die modifizierten Erythrozyten an die Krebszellen binden, unabhängig davon, ob sie PEGyliert waren oder nicht. Erythrozyten, die mit unspezifischem IgG gekoppelt waren, zeigten keine Affinität zu den Tumorzellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die gebundenen Eryth-

rozyten von den Krebszellen aufgenommen wurden. Dies war bei den PEGylierten Erythrozyten häufiger zu beobachten als bei den nicht PEGylierten Erythrozyten.

In der Literatur sind phagozytose-ähnliche Eigenschaften von Tumorzellen beschrieben. Die Phagozytoseaktivität kann sich dabei sowohl auf amorphes Material [95] als auch auf apoptotische [95] oder lebendige Zellen [96, 97] beziehen. Früher wurde angenommen, dass Tumorzellen vor allem andere Tumorzellen (Geschwisterzellen) aufnehmen. Es gab jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass der sogenannte Kannibalismus von Tumorzellen auch Zellen anderen Ursprungs, wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Erythrozyten zum Ziel haben kann [96, 98-101]. Der genaue Mechanismus dieses Phänomens war zunächst nicht klar. Lugini *et al.* [99] konnten jedoch zeigen, dass lebendige Lymphozyten von Melanomzellen über eine Sequenz von Ereignissen internalisiert wurden, die mit einem engen Zell-Zell-Kontakt, einer Art „Fusions-ähnlichem“ Vorgang begannen, gefolgt von einer Invagination der Tumorzellmembran und dem Einschluss des Lymphozyten in die Tumorzelle. Morphologisch unterscheidet sich dieser Vorgang somit deutlich von der „herkömmlichen“ Phagozytose professioneller Phagozyten, bei der die phagozytierende Zelle Pseudopodien ausbildet, welche anschließend das zu phagozytierende Objekt umfassen [102]. Lugini *et al.* [99] gingen aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, dass es sich bei dem beobachteten Vorgang um einen zwar einfachen jedoch sehr effizienten „Treibsand“-Mechanismus handeln müsse, dem ein dynamisches Zusammenspiel der Proteine Ezrin, Caveolin-1 und Actin zu Grunde liegt und durch den jedes lebendige oder tote Material, welches die äußere Membran der Tumorzelle berührt, augenblicklich endozytiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Erythrozyten, die mit dem Tumorantikörper gekoppelt waren in die Tumorzellen hineingezogen wurden. Die Ausbildung von Pseudopodien wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Es ist wahrscheinlich, dass es sich um einen ähnlichen Prozess, wie bereits von Lugini beschrieben, gehandelt hat. Erythrozyten, die mit unspezifischem IgG gekoppelt waren, zeigten jedoch keine deutliche Affinität zu den Tumorzellen und wurden auch nicht von diesen aufgenommen. Overholtzer *et al.* [103] weisen daraufhin, dass die spontane Ausbildungsrate von Zell-in-Zell-Strukturen, wie sie bei Kannibalismus oder der Zytophagozytose entstehen können, generell sehr niedrig sind. Sobald jedoch der Kontakt von Wirtszelle und Zielzelle erhöht wird, zum Beispiel durch spezifische Antikörper, kann dadurch auch die Zytophagozytose deutlich provoziert werden.

Bei unseren Untersuchungen wurde auch die Tendenz beobachtet, dass die PEGylierten Tumorantikörper-gekoppelten Erythrozyten öfters von den Tumorzellen aufgenommen wurden, als die nicht-PEGylierten Tumorantikörper-gekoppelten Erythrozyten. Wie unter 3.4.1 beschrieben, kam es durch die PEGylierung verstärkt zur Ausbildung von Echinozyten, das heißt die Membranstruktur der Erythrozyten wurde verändert. Es ist möglich, dass die Erythrozyten durch die Destabilisierung und Veränderung ihrer Membran leichter von den Krebszellen aufgenommen werden konnten. Im Phagozytoseassay zeigte sich bereits die gleiche Tendenz. Die PEGylierten Erythrozyten wurden deutlich stärker von den Monozyten und Granulozyten phagozytiert als die nicht-PEGylierten. Marin-Padilla [101] beobachtete, dass die Zellen eines duktales Mammakarzinoms Erythrozyten phagozytierten. Die Erythrophagozytose war bis dahin vor allem bekannt für Malignome der Zellen des Retikuloendothelialensystems, welche dazu bereits unter gesunden Bedingungen in der Lage sind. Bei Mammakarzinom-Zellen ist die Erklärung jedoch nicht so einfach. Marin-Padilla ging davon aus, dass die Erythrozytenmembran wahrscheinlich in einer Weise geschädigt war, die diese Zellen besonders anfällig für die Phagozytose, selbst durch Zellen epithelialen Ursprungs machte.

4.5 Schlussfolgerung

Das Ziel der Arbeit bestand darin zu untersuchen, inwieweit sich native Erythrozyten so modifizieren lassen, dass sie einerseits spezifisch an Tumorzellen binden und andererseits als Drug-Carrier geeignet sind, Moleküle in diese Zellen zu transportieren. Es gelang Immunoerythrozyten herzustellen, indem monoklonale Tumor-spezifische Antikörper an native Erythrozyten mittels der Moleküle Biotin und Avidin angekoppelt wurden. Die optimalen Bedingungen dieser Ankopplung wurden charakterisiert, das heißt die Biotin- beziehungsweise Avidinkonzentrationen wurden bestimmt, bei denen eine optimale Ankopplung des Tumorantikörpers an die Erythrozytenoberfläche erreicht wird.

Die Tatsache, dass die Antikörper-gekoppelten Erythrozyten an die Krebszellen binden und anschließend von ihnen aufgenommen werden, ist ein viel versprechendes Ergebnis. Es bedeutet, dass die Substanz, welche sich in dem Erythrozyten befindet, gezielt auf die Krebszelle wirken kann und somit das gesunde Gewebe vor den toxischen Nebenwirkungen dieses Medikamentes geschützt wird. Auf diese Weise ist mit einer deutlichen Verbesserung des Nebenwirkungsprofils des verabreichten Medikamentes und einer Steigerung seiner therapeutischen Potenz zu rechnen.

Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit, Tumorzellen *in vitro* mit Antikörper-gekoppelten Erythrozyten spezifisch anzusteuern, wurde somit erreicht.

Außerdem wurde *in vitro* überprüft, ob eine PEGylierung die Immunogenität der Immunoerythrozyten herabsetzt und sie somit vor der Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten schützen kann. Es wurde untersucht, ob ein Targeting der Tumorzellen durch die Immunoerythrozyten *in vitro* auch erfolgreich ist, wenn die Immunoerythrozyten zusätzlich PEGyliert werden.

Im Hinblick auf die Herstellung von lang zirkulierenden IgG-gekoppelten Erythrozyten scheint die PEGylierung, so wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, wahrscheinlich eine wenig geeignete Methode zu sein, da durch die PEGylierung die Membran der Erythrozyten zu stark modifiziert wird. Es kann aber vermutet werden, dass diese Erythrozyten für das Targeting von Zellen des RES besonders geeignet sind, da ihre Aufnahme durch Monozyten und Granulozyten bereits *in vitro* deutlich erhöht war. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass sich über die PEG-Konzentration, die Überlebensdauer der modifizierten Erythrozyten in der Zirkulation beeinflussen lässt.

In künftigen Versuchen sollte untersucht werden, welche Mechanismen dazu führen, dass die Tumorzellen die Immunoerythrozyten aufnehmen und welchen Weg die im Erythrozyten eingekapselten Pharmaka in der Tumorzelle nehmen. Die eingehende Untersuchung der Pharmakokinetik und Wirksamkeit der eingeschlossenen Medikamente wird gegenwärtig in anderen Arbeiten der AG Bäumler durchgeführt. Diese Ergebnisse werden hinsichtlich der *in vivo* Anwendung der Immunoerythrozyten von entscheidender Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

Die Behandlung von Krebs mit Chemotherapeutika bringt viele Nachteile mit sich. Ihre begrenzte Zugänglichkeit zu den Krebszellen, erfordert oft die Gabe von hohen Dosen. Dies führt zu toxischen Wirkungen auch im gesunden Gewebe, da diese Medikamente unspezifisch auf alle schnell proliferierenden Zellen wirken. Bei den Versuchen die Krebstherapie zu verbessern und assoziierte Nebenwirkungen zu reduzieren, wurden sogenannte „drug delivery“-Systeme entwickelt, die Medikamente zum gewünschten Ziel transportieren können. Erythrozyten bringen als Medikamenten-Carrier einige für die klinische Applikation wünschenswerte Kriterien mit. Die Erythrozytenmembran kann über das Verfahren der hypotonen Hämolyse geöffnet und auch wieder verschlossen werden. Auf diese Weise können sie mit einer Vielzahl von Medikamenten beladen werden. Als natürliche Zellen sind Erythrozyten an sich biokompatibel und nicht-immunogen. Dazu besitzen sie eine sehr hohe Beladungskapazität.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, Erythrozyten über die Moleküle Biotin und Avidin mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen das epithelspezifische Antigen zu koppeln, welches auf der baso-lateralen Zelloberfläche der meisten einfachen Epithelien und einer großen Mehrzahl der Karzinome exprimiert wird. Mit Hilfe dieses Antikörpers sollte ein spezifisches Targeting von Mammakarzinom-Zellen (T47D) *in vitro* erreicht werden. Desweiteren wurden die Erythrozyten mit der Modell-Substanz FITC-Dextran beladen, um zu prüfen, ob diese Beladung durch die Membranmodifikation mit Antikörpern gestört wird.

Der Nachweis der Kopplung von Antikörpern an die Erythrozytenoberfläche sowie ihre Beladung mit FITC-Dextran und das Targeting der Tumorzellen durch die Immunoerythrozyten erfolgte mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie und Durchflusszytometrie.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die modifizierten Erythrozyten an die Krebszellen binden und anschließend von diesen aufgenommen werden. Somit ist deutlich, dass Antikörper-gekoppelte Erythrozyten einen möglichen Weg darstellen, Tumorzellen spezifisch anzusteuern.

Um Carrier-Erythrozyten herzustellen, wurden die Erythrozyten zusätzlich mit methoxy-Polyethylenglykol behandelt, welches Antigene auf der Erythrozytenoberfläche abdecken soll. Es stellte sich heraus, dass die PEGylierung mit aus der Literatur bekannten PEG-

Zusammenfassung

Konzentrationen zu einer verstärkten Phagozytose der modifizierten Erythrozyten durch Monozyten und Granulozyten *in vitro* führte. Die PEGylierten Erythrozyten wären dadurch vor allem für ein spezifisches Targeting von Zellen des Retikuloendothelialensystems einsetzbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Mathers, C.D. and Loncar, D., *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*, in *PLoS Med.* 2006. p. e442.
2. Hiddemann, W., Huber, H., and Bartram, C., *Die Onkologie*. 2004, Berlin: Springer.
3. Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C., *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 563-72.
4. Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G., *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 715-727.
5. Skeel, R.T., *Handbook of cancer chemotherapy*. 2007, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
6. Allen, T.M. and Cullis, P.R., *Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream*. *Science*, 2004. **303**: p. 1818-1822.
7. Haley, B. and Frenkel, E., *Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment*. *Urologic Oncology*, 2008. **26**: p. 57-64.
8. Rubens, R.D., *Antibodies as carriers of anticancer agents*. *Cancer Treat Rev*, 1974. **1**: p. 305-312.
9. Lambert, J.M., *Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005. **5**: p. 543-549.
10. Millan, C.G., Marinero, M.C., Castaneda, A.Z., and Lanao, J.M., *Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **95**: p. 27-49.
11. Coyne, C.P., Fenwick, B.W., and Ainsworth, J., *Cytotoxic activity of doxorubicin "loaded" neutrophils against human mammary carcinoma (HTB-19)*. *Biotherapy*, 1997. **10**(2): p. 145-59.
12. Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J.O., *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. **56**: p. 1649-1659.
13. Schmidt, R.F., Lang, F., and Thews, G., *Physiologie Des Menschen* 2005, Heidelberg: Springer.

Literaturverzeichnis

14. Hamidi, M., Zarrin, A., Foroozesh, M., and Mohammadi-Samani, S., *Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals*. J Control Release, 2007. **118**(2): p. 145-60.
15. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., and Roberts, K., *Molecular Biology of the Cell*. 2002: Taylor & Francis Group.
16. Mueller-Eckhardt, C., *Transfusionsmedizin : Grundlagen - Therapie - Methodik*. 2004, Berlin: Springer.
17. Pennell, R.B., *Composition of normal human red cells*. The Red blood Cell, ed. D.M. Surgenor. Vol. 1. 1974, New York: Academic Press. p. 93-146.
18. Tianshun Lian, R.J.Y.H., *Trends and developments in liposome drug delivery systems*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **90**(6): p. 667-680.
19. Bax, B.E., Bain, M.D., Talbot, P.J., Parker-Williams, E.J., and Chalmers, R.A., *Survival of human carrier erythrocytes in vivo*. Clin Sci (Lond), 1999. **96**(2): p. 171-8.
20. Eichler, H.G., Rameis, H., Bauer, K., Korn, A., Bacher, S., and Gasic, S., *Survival of gentamicin-loaded carrier erythrocytes in healthy human volunteers*. Eur J Clin Invest, 1986. **16**(1): p. 39-42.
21. Hillman, R.S. and Finch, C.A., *Red cell manual*. 1996, Philadelphia: F.A. Davis.
22. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M., *Immunologie*. 2002, Heidelberg und Berlin: Spektrum, Akad. Verl.
23. Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., and Zeidler, H., *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. 2006, Stuttgart: Schattauer Verlag.
24. Loegering, D.J., Kaplan, J.E., and Grover, G.J., *Effect of erythrocyte stroma on reticuloendothelial system phagocytic function*. J Lab Clin Med, 1983. **102**(2): p. 231-9.
25. Glukhova, M.A., Domogatsky, S.P., Kabakov, A.E., Muzykantov, V.R., Ornatsky, O.I., Sakharov, D.V., Frid, M.G., and Smirnov, V.N., *Red blood cell targeting to smooth muscle cells*. FEBS Lett, 1986. **198**(1): p. 155-8.
26. Muzykantov, V.R., Sakharov, D.V., Smirnov, M.D., Domogatsky, S.P., and Samokhin, G.P., *Targeting of enzyme immobilized on erythrocyte membrane to collagen-coated surface*. FEBS Lett, 1985. **182**(1): p. 62-6.

Literaturverzeichnis

27. Muzykantov, V.R., Sakharov, D.V., Smirnov, M.D., Samokhin, G.P., and Smirnov, V.N., *Immunotargeting of erythrocyte-bound streptokinase provides local lysis of a fibrin clot*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **884**(2): p. 355-62.
28. Muzykantov, V.R., Sakharov, D.V., and Domogatsky, S.P., *Direct targeting immunoerythrocytes provides local protection of endothelial cells from damage by hydrogen peroxide*. *Am J Pathol*, 1987. **128**: p. 276-285.
29. Rao, P.N., Walsh, T.R., Makowka, L., Liu, T., Demetris, A.J., Rubin, R.S., Snyder, J.T., Mischinger, H.J., and Starzl, T.E., *Inhibition of free radical generation and improved survival by protection of the hepatic microvascular endothelium by targeted erythrocytes in orthotopic rat liver transplantation*. *Transplantation*, 1990. **49**(6): p. 1055-1059.
30. Taylor, R.P., Reist, C.J., Sutherland, W.M., Otto, A., Labuguen, R.H., and Wright, E.L., *In vivo binding and clearance of circulating antigen by bispecific heteropolymer-mediated binding to primate erythrocyte complement receptor*. *J Immunol*, 1992. **148**(8): p. 2462-8.
31. Deloach, J., Peters, S., Pinkard, O., Glew, R., and Ihler, G., *Effect of glutaraldehyde treatment on enzyme-loaded erythrocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1977. **496**(2): p. 507-15.
32. Jordan, J.A., Alvarez, F.J., Lotero, L.A., Olmos, G., Calleja, P., Tejedor, M.C., and Díez, J.C., *Differential induction of macrophage recognition of carrier erythrocytes by treatment with band 3 cross-linkers*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1998. **27 (Pt 2)**: p. 133-7.
33. Jordan, J.A., Alvarez, F.J., Lotero, L.A., Tejedor, M.C., and Díez, J.C., *In vivo behaviour of rat band 3 cross-linked carrier erythrocytes*. *Biochimie*, 1998. **80**(4): p. 325-332.
34. Kawai, M., Gyimesi, E., Szucs, G., and Szegedi, G., *Binding and endocytosis of erythrocytes sensitized with rabbit IgG via Fc gamma receptors of human monocytes*. *Immunology*, 1991. **74**(4): p. 657-60.
35. Muzykantov, V. and Murciano, J.C., *Streptavidin-Mediated Coupling of Therapeutic Proteins to Carrier Erythrocytes*. *Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting*, ed. M. Magnani 2003, New York: Kluwer Academic/ Plenum Press p. 37-67.
36. Lublin, D.M., *Universal RBCs*. *Transfusion*, 2000. **40**(11): p. 1285-9.
37. Rossi, L., Serafini, S., and Magnani, M., *Red Blood Cell Loading: A Selection of Procedures*. *Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting*, ed. M. Magnani. 2003, New York: Kluwer Academic / Plenum Press. p.1-18.

Literaturverzeichnis

38. Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O., *Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule*. J Cell Biol, 1994. **125**(2): p. 437-46.
39. Diamandis, E.P. and Christopoulos, T.K., *The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology*. Clin Chem, 1991. **37**(5): p. 625-36.
40. Löffler, G., *Biochemie und Pathobiochemie*. 2003, Heidelberg: Springer.
41. Bayer, E.A. and Wilchek, M., *Protein biotinylation*. Methods Enzymol, 1990. **184**: p. 138-160.
42. *Pierce, Product Information: EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin Reagents*.
43. Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M., and Sussman, J.L., *Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5076-80.
44. Brähler, M., Georgieva, R., Buske, N., Müller, A., Müller, S., Pinkernelle, J., Teichgraber, U., Voigt, A., and Bäumlner, H., *Magnetite-Loaded Carrier Erythrocytes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging*. Nano Letters, 2006. **6**(11): p. 2505-2509.
45. Fisher, T.C., *PEG-coated red blood cells-simplifying blood transfusion in the new millennium?* Immunohematology, 2000. **16**(1): p. 37-48.
46. Scott, M.D., Murad, K.L., Koumpouras, F., Talbot, M., and Eaton, J.W., *Chemical camouflage of antigenic determinants: Stealth erythrocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(14): p. 7566-7571.
47. *BD Biosciences, FACS Canto Users Guide*.
48. Wheeless, L., *Flow instrumentation and data analysis*. Diagnostic flow cytometry, ed. J. Coon and R. Weinstein. 1991, Baltimore/Hong Kong/London: Williams & Wilkins. p. 17-34.
49. Huber, P., *Robust Statistics*. 2004: Wiley.
50. *Zeiss, LSM510 META Laser Scanning Microscopes Operating Manual*. 2001: Carl Zeiss GmbH.
51. Wolf, H. and Lerche, D., *Biophysik-Praktikum : theoretische Grundlagen, Experimente, Kontrollfragen, Rechenbeispiele*. 1980, Jena: Fischer.

Literaturverzeichnis

52. Nürnberg, E. and Surmann, P., *Methoden*. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, bd. 2. 1991, Berlin; London: Springer.
53. Yawata, Y., *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH.
54. An, X. and Mohandas, N., *Disorders of red cell membrane*. Br J Haematol, 2008. **141**(3): p. 367-75.
55. Wong, P., *Mechanism of Control of Erythrocyte Shape: A Possible Relationship to Band 3*. Journal of Theoretical Biology, 1994. **171**(2): p. 197-205.
56. Muzykantov, V.R., Murciano, J.C., Taylor, R.P., Atochina, E.N., and Herraiez, A., *Regulation of the Complement-Mediated Elimination of Red Blood Cells Modified with Biotin and Streptavidin*. Analytical Biochemistry, 1996. **241**(1): p. 109-119.
57. Nakashima, K. and Beutler, E., *Effect of anti-spectrin antibody and ATP on deformability of resealed erythrocyte membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 3823-5.
58. Bennett, V., *The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1989. **988**(1): p. 107-121.
59. Gimsa, J., *Red cell echinocytogenesis is correlated to the recruitment of external band-3 conformations*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1995. **38**(1): p. 99-103.
60. Mishra, P.R. and Jain, N.K., *Biotinylated methotrexate loaded erythrocytes for enhanced liver uptake. 'A study on the rat'*. Int J Pharm, 2002. **231**(2): p. 145-53.
61. Muzykantov, V.R., Smirnov, M.D., and Samokhin, G.P., *Avidin attachment to biotinylated erythrocytes induces homologous lysis via the alternative pathway of complement*. Blood, 1991. **78**(10): p. 2611-8.
62. Muzykantov, V.R., Smirnov, M.D., and Klibanov, A.L., *Avidin attachment to red blood cells via a phospholipid derivative of biotin provides complement-resistant immunoerythrocytes*. J Immunol Methods, 1993. **158**(2): p. 183-90.
63. Muzykantov, V.R., Smirnov, M.D., and Samokhin, G.P., *Avidin-induced lysis of biotinylated erythrocytes by homologous complement via the alternative pathway depends on avidin's ability of multipoint binding with biotinylated membrane*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1107**(1): p. 119-25.
64. Muzykantov, V.R., Smirnov, M.D., Zaltzman, A.B., and Samokhin, G.P., *Tannin-Mediated Attachment of Avidin Provides Complement-Resistant Immunoerythro-*

Literaturverzeichnis

- cytes That Can Be Lysed in the Presence of Activator of Complement*. Analytical Biochemistry, 1993. **208**(2): p. 338-342.
65. Muzykantov, V.R. and Taylor, R.P., *Attachment of Biotinylated Antibody to Red Blood Cells: Antigen-Binding Capacity of Immunoerythrocytes and Their Susceptibility to Lysis by Complement*. Analytical Biochemistry, 1994. **223**(1): p. 142-148.
66. Zaltzman, A.B., Van den Berg, C.W., Muzykantov, V.R., and Morgan, B.P., *Enhanced complement susceptibility of avidin-biotin-treated human erythrocytes is a consequence of neutralization of the complement regulators CD59 and decay accelerating factor*. Biochem J, 1995. **307** (Pt 3): p. 651-6.
67. *Invitrogen, Product Information: Dynabeads® CD2 Pan T*.
68. Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., and Singh, R.M., *Hydrogen ion buffers for biological research*. Biochemistry, 1966. **5**(2): p. 467-77.
69. Scott, K.L., Lecak, J., and Acker, J.P., *Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future*. Transfusion Medicine Reviews, 2005. **19**(2): p. 127-142.
70. Greenwalt, T.J., *The how and why of exocytic vesicles*. Transfusion, 2006. **46**(1): p. 143-52.
71. Hovav, T., Yedgar, S., Manny, N., and Barshtein, G., *Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage*. Transfusion, 1999. **39**(3): p. 277-81.
72. Kriebardis, A.G., Antonelou, M.H., Stamoulis, K.E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L.H., and Papassideri, I.S., *Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 148-55.
73. Tinmouth, A., Fergusson, D., Yee, I.C., and Hebert, P.C., *Clinical consequences of red cell storage in the critically ill*. Transfusion, 2006. **46**(11): p. 2014-27.
74. Högman, C.F. and Meryman, H.T., *Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion*. Transfusion Medicine Reviews, 1999. **13**(4): p. 275-296.
75. Luban, N.L., *Transfusion safety: Where are we today?* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1054**: p. 325-41.
76. Staedtke, V., Brähler, M., Müller, A., Georgieva, R., Abdallah, Z., Bauer, S., Sternberg, N., Voigt, A., Lemke, A., Keck, C., Möschwitzer, J., and Bäumlner, H., *In vitro inhibition of fungal activity by macrophages mediated sequestration and release of encapsulated Amphotericin B - nanosuspension in red blood cells* Blood, eingereicht 2009.

Literaturverzeichnis

77. Alvarez, F.J., Herraiez, A., and Tejedor, M.C., *Fluorescence analysis of carrier rat and human erythrocytes loaded with FITC-dextran*. Cytometry, 1996. **24**(2): p. 181-9.
78. Scott, M.D., Kuypers, F.A., Butikofer, P., Bookchin, R.M., Ortiz, O.E., and Lubin, B.H., *Effect of osmotic lysis and resealing on red cell structure and function*. J Lab Clin Med, 1990. **115**(4): p. 470-80.
79. Abuchowski, A., McCoy, J.R., Palczuk, N.C., van Es, T., and Davis, F.F., *Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase*. J Biol Chem, 1977. **252**(11): p. 3582-6.
80. Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N.C., and Davis, F.F., *Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol*. J Biol Chem, 1977. **252**(11): p. 3578-81.
81. Greenwald, R.B., Choe, Y.H., McGuire, J., and Conover, C.D., *Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(2): p. 217-50.
82. Hershfield, M.S., *PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years*. Clin Immunol Immunopathol, 1995. **76**(3 Pt 2): p. S228-32.
83. Keating, M.J., Holmes, R., Lerner, S., and Ho, D.H., *L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future*. Leuk Lymphoma, 1993. **10 Suppl**: p. 153-7.
84. Osterberg, E., Bergstrom, K., Holmberg, K., Schuman, T.P., Riggs, J.A., Burns, N.L., Van Alstine, J.M., and Harris, J.M., *Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: comparison to PEG*. J Biomed Mater Res, 1995. **29**(6): p. 741-7.
85. Hashemi-Najafabadi, S., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S.A., Rasaei, M.J., Armstrong, J.K., Moin, M., and Pourpak, Z., *A method to optimize PEG-coating of red blood cells*. Bioconj Chem, 2006. **17**(5): p. 1288-93.
86. Windberger, U., Bartholovitsch, A., Plasenzotti, R., Korak, K.J., and Heinze, G., *Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data*. Exp Physiol, 2003. **88**(3): p. 431-40.
87. Stuart, L.M. and Ezekowitz, R.A.B., *Phagocytosis: Elegant Complexity*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 539-550.
88. Garratty, G., *Progress in modulating the RBC membrane to produce transfusable universal/stealth donor RBCs*. Transfus Med Rev, 2004. **18**(4): p. 245-56.

Literaturverzeichnis

89. Armstrong, J.K., Hempel, G., Koling, S., Chan, L.S., Fisher, T., Meiselman, H.J., and Garratty, G., *Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients*. *Cancer*, 2007. **110**(1): p. 103-111.
90. Zocchi, E., Tonetti, M., Polvani, C., Guida, L., Benatti, U., and De Flora, A., *Encapsulation of doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989. **86**: p. 2040-2044.
91. Bax, B.E., Bain, M.D., Ward, C.P., Fensom, A.H., and Chalmers, R.A., *The entrapment of mannose-terminated glucocerebrosidase (Alglucerase) in human carrier erythrocytes*. *Biochem Soc Trans*, 1996. **24**(3): p. 441S.
92. DeLoach, J.R., *Encapsulation potential of a trypanocidal drug homidium bromide in bovine carrier erythrocytes*. *Res Exp Med (Berl)*, 1985. **185**(5): p. 345-53.
93. Green, R., Lamon, J., and Curran, D., *Clinical trial of desferrioxamine entrapped in red cell ghosts*. *Lancet*, 1980. **2**(8190): p. 327-30.
94. Magnani, M., Rossi, L., Fraternali, A., Casabianca, A., Brandi, G., Benatti, U., and De Flora, A., *Targeting antiviral nucleotide analogues to macrophages*. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(1): p. 133-7.
95. Lugini, L., Lozupone, F., Matarrese, P., Funaro, C., Luciani, F., Malorni, W., Rivoltini, L., Castelli, C., Tinari, A., Piris, A., Parmiani, G., and Fais, S., *Potent Phagocytic Activity Discriminates Metastatic and Primary Human Malignant Melanomas: A Key Role of Ezrin*. *Lab Invest*, 2003. **83**(11): p. 1555-1567.
96. Fais, S., *Cannibalism: A way to feed on metastatic tumors*. *Cancer Letters*, 2007. **258**(2): p. 155-164.
97. Brouwer, M., de Ley, L., Feltkamp, C.A., Elema, J., and Jongsma, A.P., *Serum-dependent "cannibalism" and autodestruction in cultures of human small cell carcinoma of the lung*. *Cancer Res*, 1984. **44**(7): p. 2947-51.
98. Caruso, R.A., Muda, A.O., Bersiga, A., Rigoli, L., and Inferrera, C., *Morphological evidence of neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas*. *Ultrastruct Pathol*, 2002. **26**(5): p. 315-21.
99. Lugini, L., Matarrese, P., Tinari, A., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Gentile, M., Luciani, F., Parmiani, G., Rivoltini, L., Malorni, W., and Fais, S., *Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(7): p. 3629-38.

Literaturverzeichnis

100. Monteagudo, C., Jorda, E., Carda, C., Illueca, C., Peydro, A., and Llombart-Bosch, A., *Erythrophagocytic tumour cells in melanoma and squamous cell carcinoma of the skin*. *Histopathology*, 1997. **31**(4): p. 367-73.
101. Marin-Padilla, M., *Erythrophagocytosis by epithelial cells of a breast carcinoma*. *Cancer*, 1977. **39**(3): p. 1085-1089.
102. Fiorentini, C., Falzano, L., Fabbri, A., Stringaro, A., Logozzi, M., Travaglione, S., Contamin, S., Arancia, G., Malorni, W., and Fais, S., *Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(7): p. 2061-73.
103. Overholtzer, M., Mailleux, A.A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W., Cibas, E.S., and Brugge, J.S., *A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 966-979.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Mira Irene Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Targeting von Tumorzellen durch oberflächenmodifizierte Erythrozyten-*in vitro* Studie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Mira Müller