

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
– Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften –  
Abteilung für Immunologie und Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

---

**Untersuchungen zur  
Inaktivierung von Zellen und Proteinen  
mit Hilfe optischer Absorber**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

Vorgelegt von  
Ramtin Rahmanzadeh  
aus Bonn

Lübeck, 2006



---

# Inhaltsverzeichnis

## 1. EINLEITUNG

1.1	Optische Verfahren zur Untersuchung biologischer Systeme.....	1
1.2	Zellchirurgie mit Goldnanopartikeln.....	4
1.3	Photochemisch vermittelte Effekte von Absorbern.....	6
1.4	Das Ki-67-Protein.....	10
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	14

## 2. MATERIAL UND METHODEN

<b>2.1. Standardpuffer und Lösungen.....</b>	<b>15</b>
--	-----------

<b>2.2. Zelllinien und Zellkultur.....</b>	<b>15</b>
--	-----------

2.2.1.	Zelllinien
2.2.2.	Kulturmedien und Lösungen
2.2.3.	Kulturbedingungen
2.2.4.	Bestimmung der Zellzahl
2.2.5.	Langfristige Lagerung von Zellen
2.2.6.	Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten
2.2.7.	Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut
2.2.8.	Isolierung humaner Lymphozyten durch Elutriation
2.2.9.	Mikroinjektion von HEp-2 Zellen

<b>2.3. Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>19</b>
---	-----------

2.3.1.	Verwendete Antikörper
2.3.2.	Konjugation von Antikörpern mit Goldnanopartikeln
2.3.3.	Markierung von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen
2.3.4.	Quantifizierung der Antikörper-Fluorochrom-Konjugation
2.3.5.	Herstellung von Zelllysat
2.3.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)
2.3.7.	Westernblot und Immunfärbung der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

<b>2.4. Färbemethoden für Zellen und Proteine.....</b>	<b>25</b>
--	-----------

2.4.1.	Markierung von Zellen für die Durchflußzytometrie
2.4.2.	Pulsmarkierung der RNA-Synthese
2.4.3.	Immunfluoreszenzfärbung
2.4.4.	Nachweis der Antikörper-Goldkonjugate mittels Peroxidase(PO)-Färbung
2.4.5.	Silberfärbung zum Nachweis der Lokalisation der Goldnanopartikel
2.4.6.	Vitalitätsfärbung mittels PI und BCECF

---

<b>2.5. Methoden der Nanopartikel- und CALI- Zellmanipulation.....</b>	<b>29</b>
2.5.1. Lasersysteme	
2.5.2. Inkubation der Zellen mit Goldnanopartikeln	
2.5.3. Nanosekundenpuls-Laserbestrahlung von Zellen	
2.5.4. Durchführung der CALI-Experimente	
<b>3. ERGEBNISSE</b>	
<b>3.1. Selektive Zellschädigung durch Laserinaktivierung</b>	
3.1.1 Selektive Zellschädigung mit Hilfe von Nanopartikel-assistierter Laserinaktivierung (NALI).....	34
3.1.2 Versuche zur selektiven Zellschädigung mit Hilfe von Chromophor- assistierter Laserinaktivierung (CALI).....	44
<b>3.2 Zellmembran-Permeabilisierung mit Hilfe von Goldnanopartikeln.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Proteininaktivierung mit Hilfe von Nanopartikel-assistierter Laserinaktivierung (NALI)</b>	
3.3.1 Proteininaktivierung <i>in vitro</i> .....	50
3.3.2 Proteininaktivierung in lebenden Zellen.....	54
<b>3.4 Proteininaktivierung mit Hilfe von Chromophor-assistierter Laserinaktivierung (CALI)</b>	
3.4.1 Proteininaktivierung <i>in vitro</i> .....	58
3.4.2 Proteininaktivierung in lebenden Zellen.....	61
<b>4 DISKUSSION</b>	
4.1 Wirkung von NALI auf Proteine <i>in vitro</i> .....	70
4.2 Selektive Zellschädigung mit Hilfe von NALI.....	72
4.3 Inaktivierung intrazellulärer Proteine mit Hilfe von NALI.....	75
4.4 CALI-induzierte Quervernetzung von Proteinen.....	76
4.5 Wirkung von CALI auf Zellen.....	79
4.6 CALI des Ki-67-Proteins – methodische Aspekte.....	80
4.7 CALI des Ki-67-Proteins – Schlussfolgerungen für die physiologische Rolle von pKi-67.....	83

---

<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	86
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	101
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	103
<b>SUMMARY</b> .....	105
<b>DANKSAGUNGEN</b> .....	107
<b>LEBENS LAUF</b> .....	108
<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b> .....	109

# 1 Einleitung

## 1.1 Optische Verfahren zur Untersuchung biologischer Systeme

Erkenntnisse über wichtige Strukturen und Funktionen von Lebewesen sind in der Biologie oft mit Unterstützung aus Nachbarwissenschaften wie etwa der Physik oder der Chemie zustande gekommen. Die Physik lieferte dabei vor allem neue Untersuchungsmethoden. So ermöglichte erst die Erfindung des Lichtmikroskops im 17. Jh. die Beobachtung der kleinsten lebensfähigen Einheiten, der Zellen. Dies führte rasch zu neuen Erkenntnissen über den Aufbau lebender Organismen. Andere bildgebende Verfahren wie Röntgenstrukturanalyse, Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie vertieften das Bild über den inneren Aufbau der Zellen bis hin zur Auflösung einzelner Moleküle. Während früher jedoch die Darstellung von Strukturen im Vordergrund stand, bot sich später immer mehr die Möglichkeit mit optischen Verfahren direkt in biologische Prozesse eingreifen zu können. Einer der ersten Versuche, Zellen bzw. Zellorganellen mit Hilfe von Licht zu inaktivieren, wurde von Tschachotin 1912 durchgeführt, der Licht einer Magnesium-Entladungslampe mit einer Wellenlänge von 280 nm durch ein Mikroskopobjektiv auf einen Spot von 5  $\mu\text{m}$  fokussierte (Tschachotin, 1912). Mit dieser von ihm als *Strahlenstichmethode* bezeichneten Technik konnten Zellkerne oder andere Zellorganellen inaktiviert werden. Diese Art der Bestrahlung mit konventionellen Lichtquellen wurde bis in die 50er Jahre des letzten Jahrhunderts durch Bessis und Nomarski optimiert und es konnten Auflösungen im Sub-Mikrometerbereich erzielt werden (Bessis und Nomarski, 1960; Moreno *et al.*, 1969). Aufgrund schlechter Fokussierbarkeit von konventionellen Lichtquellen und damit begrenzten Bestrahlungsstärken wurde die praktische Anwendung jedoch durch lange Bestrahlungszeiten behindert. Vor allem die Erfindung des Lasers um 1960 hat dieser Entwicklung neuen Vorschub gegeben. Der Begriff Laser wurde 1957 von Gordon Gould geprägt und bezeichnet die Lichtverstärkung durch angeregte Strahlungsaussendung (**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation). Aufgrund

der besonderen Eigenschaften von Laserstrahlen ergeben sich vielfältige Möglichkeiten für biologische Applikationen. Das intensive, monochromatische Licht eines Lasers kann angesichts seiner hohen räumlichen Kohärenz stark fokussiert werden (Prasad, 2003). Erste Versuche zur Inaktivierung von Mitochondrien wurden um 1965 mit Hilfe eines Rubinlasers durchgeführt, dessen 500  $\mu$ s lange Pulse auf 5  $\mu$ m Strahldurchmesser fokussiert wurden (Amy und Storb, 1965). Eine Verbesserung der Strahlqualität und vor allem weitere Verkürzungen der Pulsdauer in den ps- und fs-Bereich ermöglichten eine feinere Lokalisation der Effekte (Vogel *et al.*, 2005). So gelang es, mit Hilfe von Laserstrahlung einzelne Chromosomen zu schneiden (Berns *et al.*, 1981; Liang *et al.*, 1993; König *et al.*, 2001), Zellen zu fusionieren (Sato *et al.*, 1992; Schütze und Clement-Sengewald, 1994) oder die äußere Membran von Eizellen für die *in vitro*-Fertilisation zu öffnen (Mantoudis *et al.*, 2001). Ebenso ist die Permeabilisierung von Zellmembranen zur Gentransfektion oder zur Einbringung anderer Substanzen in Zellen von großem Interesse (Tsukakoshi *et al.*, 1984; Tao *et al.*, 1987; Tirlapur und König, 2002).

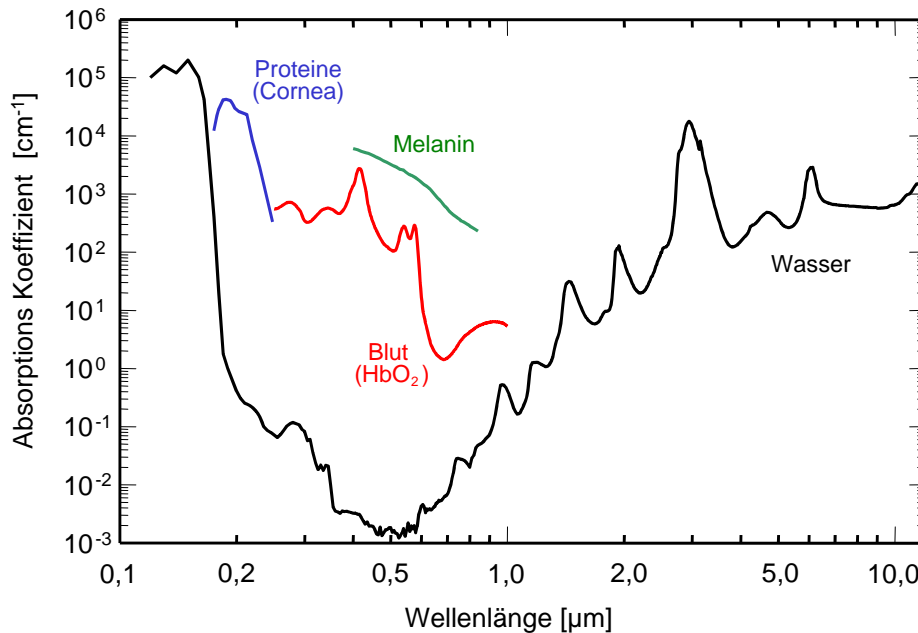
Laser wurden auch zur Isolierung von biologischem Material erfolgreich eingesetzt. Mittels der *Laser-Mikrodissektion* (LMD, Isenberg *et al.*, 1976; Roberts, 2002) können einzelne Zellen oder Gewebeabschnitte aus histologischen Präparaten „kontaktfrei“ herausgeschnitten und einer späteren Untersuchung, wie z. B. mit Hilfe der PCR, zugänglich gemacht werden. Zur Isolierung des ausgeschnittenen Materials haben sich in den letzten Jahren zwei Verfahren, die *Laser Capture Microdissection* (LCM) (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Rekhter und Chen, 2001) und das *Laser Pressure Catapulting* (LPC) etabliert (Schütze und Lahr, 1998). Für die LCM wird das zu isolierende Material durch Laserbestrahlung an eine spezielle Folie geklebt. Das LPC nutzt einen gepulsten UV-Laser, der durch ein Mikroskopobjektiv kurz unter der ausgeschnittenen Fläche fokussiert wird und durch explosionsartigen Materialabtrag der Trägerfolie die Probe in ein Gefäß katapultiert.

Die Präzision einer direkten Interaktion von Laserstrahlung mit biologischem Gewebe ist jedoch aufgrund der beugungsbegrenzten Fokusgröße von sichtbarem Licht, die bei ca. 500 nm liegt, limitiert (Vogel *et al.*, 2005). Einen alternativen Ansatz, mit Licht Effekte auf zellulärer oder sub-zellulärer Ebene zu erreichen, stellt die Verwendung von Absorbern da. Hier wird die Wirkung auf zelluläre Strukturen nicht direkt durch den Laserstrahl, sondern mit Hilfe von Stoffen, die Licht bestimmter Wellenlängen stärker absorbieren als ihre Umgebung hervorgerufen. Als Absorber wurden Chromophore (Jay, 1988) oder metallische Nanopartikel (Hüttmann und Birngruber, 1999) verwendet, die ihre Zielstruktur durch die Kopplung an Antikörper gezielt erreichen können. Durch kurze Laserpulse können die

thermischen Wirkungen räumlich begrenzt werden (Hüttmann *et al.*, 2001). Mit Gold- und Eisenoxidpartikeln konnten nach ns- und ps-Laserbestrahlung selektive Enzym- und Zellinaktivierungen gezeigt werden (Radt, 2002; Pitsillides *et al.*, 2003). Als Inaktivierungsmechanismen werden hier thermische Denaturierung sowie Kavitationsblasenbildung diskutiert. Im Fall der Chromophore führen nicht die Absorptionswärme, sondern chemische Prozesse zu den gewünschten Effekten (Liao *et al.* 1994). Die von Farbstoffen absorbierte Energie führt zur Bildung von freien Radikalen oder Singulett-Sauerstoff, die eine Inaktivierung benachbarter Proteine bewirken. Dieses Prinzip wird zur *Chromophor-assistierten Laserinaktivierung* (CALI) von Proteinen genutzt. Bei CALI werden Fluorochrome in der Regel durch Antikörper selektiv an bestimmten Zielstrukturen angereichert. CALI wurde bereits zur Inaktivierung von verschiedenen Membran- und zytoplasmatischen Proteinen mit dem Ziel einer Funktionsanalyse angewandt (Chang *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2003; Hauptschein *et al.*, 2005). Eine klinische Anwendung findet das Prinzip der Sensibilisierung mit Farbstoffen in der *photodynamischen Therapie* (PDT). PDT wird heute vor allem bei der Therapie von Tumoren und von Neovaskularisierungen der Netzhaut durch die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) eingesetzt (Hamblin *et al.* 1998, Hsi *et al.*, 1999). Die lichtabsorbierenden Stoffe, *sog.* Photosensibilisatoren, akkumulieren in den Zielstrukturen wie Tumorzellen durch ihre speziellen chemischen Eigenschaften (Prasad, 2003).

Ein großer Vorteil von Absorber-vermittelten Effekten gegenüber direkter Beeinflussung durch fokussierte Laserstrahlung ist ihre hohe räumliche Spezifität. Diese wird erstens durch die selektive Anreicherung der Absorber an ihren Zielstrukturen und für thermische Effekte zusätzlich durch eine gepulste Laserbestrahlung erreicht. Thermisch vermittelte Effekte der Nanoabsorber werden durch die erreichte Temperatur, die von der Bestrahlungsstärke (Leistung pro Fläche) abhängt, chemisch vermittelte Effekte von CALI und PDT dagegen durch die Bestrahlung (Energie pro Fläche) bestimmt. Deshalb sind für thermische Effekte hohe Lichtleistungen, die nur durch Laserbestrahlung erreicht werden können, notwendig, während für CALI oder PDT auch konventionelle Lichtquellen geeignet sind. Für einen Einsatz *in vivo*, tierexperimentell oder klinisch, sollten Mikroabsorber ihr Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich geringer Gewebeabsorption und -streuung besitzen, um eine gute Eindringtiefe zu erreichen. Hier bietet sich der langwellige Bereich von ca. 600 nm bis 1200 nm an, da hier so gut wie keine endogenen Farbstoffe mehr absorbieren, und die Wasserabsorption ebenfalls gering ist. Man spricht in diesem Bereich auch vom *optischen Fenster des Gewebes*. Verschiedene Laser, wie Farbstofflaser, Rubinlaser,

Laserdioden, Titan:Saphir Laser und Nd:YAG Laser emittieren in diesem Spektralbereich und können zur Bestrahlung von Partikeln oder Farbstoffmolekülen verwendet werden.



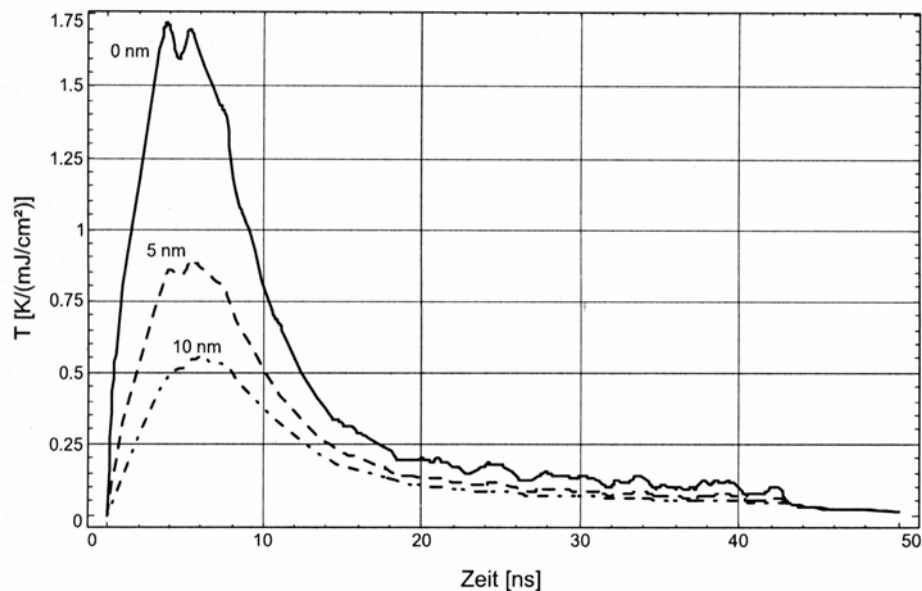
**Abb. 1.1** Absorptionsspektren von Wasser, Melanin, Oxy-Hämoglobin (HbO<sub>2</sub>) und Proteinen der Hornhaut. Der Wellenlängenbereich von 600 bis 1200 nm wird aufgrund verminderter Gewebeabsorption auch als *optisches Fenster von Zellen und Gewebe* bezeichnet (verändert nach Vogel und Venugopalan, 2003).

## 1.2 Zellchirurgie mit Goldnanopartikeln

Goldpartikel eignen sich in besonderer Weise zur Erzeugung thermischer Nanoeffekte, da sie eine hohe Absorption und Photostabilität besitzen und einfach mit Antikörpern oder anderen Proteinen konjugiert werden können. Während metallisches Gold gelb glänzt, zeigen Nanopartikel in Wasser oder eingebettet in Glas eine intensive rote Farbe aufgrund einer starken Absorption im grünen Spektralbereich. Dieser Effekt wurde u. a. zur Herstellung von intensiv rotgefärbtem Glas genutzt. Der physikalische Hintergrund der starken Grünabsorption wurde von Gustav Mie auf der Grundlage der Maxwell'schen Gleichungen erklärt (Mie, 1908). Anschaulich kann der hohe Absorptionsquerschnitt, der ein Mehrfaches des geometrischen Querschnitts erreichen kann, durch einen Resonanzeffekt von kollektiven Schwingungen der Elektronen des Leitungsbandes (Plasmonen) verstanden werden. Die genaue mathematische Beschreibung der optischen Eigenschaften von Nanogoldpartikeln ist Gegenstand einer Reihe von Veröffentlichungen (Papavassiliou, 1979; van de Hulst, 1981;

Bohren und Huffman, 1983; Kreibig und Vollmer, 1995; Mulvaney, 1996; Link und El-Sayed, 2000; Hutter und Fendler, 2004; Liz-Marzán, 2004).

Bestrahlung durch gepulste Laser kann zu signifikanten Temperaturerhöhungen führen (Hüttmann *et al.*, 2002), die aber räumlich lokalisiert bleiben. Bei Bestrahlung mit ns- oder ps-Laserpulsen kann die an Nanoabsorbern entstehende Wärme aufgrund der Kürze der Pulse nur wenige Nanometer diffundieren (Radt, 2002). So beträgt die Temperaturerhöhung zum Beispiel bei 15 nm-Partikeln nach Bestrahlung mit 6 ns-Pulsen in 10 nm Abstand von der Oberfläche weniger als ein Drittel der Temperatur direkt an der Oberfläche (Abb. 1.2). Bei zunehmender Pulsdauer steigt die Wärmediffusion in die Umgebung und somit der Schadensradius.



**Abb. 1.2** Temperaturverlauf an der Oberfläche von 15 nm-Goldpartikeln sowie im Abstand von 5 nm und 10 nm nach Bestrahlung mit 6 ns-Pulsen bei 532 nm (aus Radt, 2002).

Im Gegensatz zu CALI ist bei laserbestrahlten Goldnanopartikeln ein physikalischer Schadensmechanismus durch eine thermische Denaturierung umgebender Proteine (Hüttmann *et al.*, 2001; Radt *et al.*, 2001), oder eine explosionsartige Verdampfung des umgebenden Wassers analog zur Bildung von Kavitationsblasen, die umgebende Strukturen auf mechanische Weise schädigt, wahrscheinlich (Radt, 2002). Der Schadensmechanismus hängt von den an der Oberfläche des Nanoabsorbers auftretenden Temperaturen ab. Verdampfung von Wasser tritt in den erhitzten Nanovolumina erst bei Temperaturen oberhalb des spinodalen Punkts, der bei Wasser bei ca. 300 °C liegt, auf (Radt, 2002; Vogel und Venugopalan, 2003).

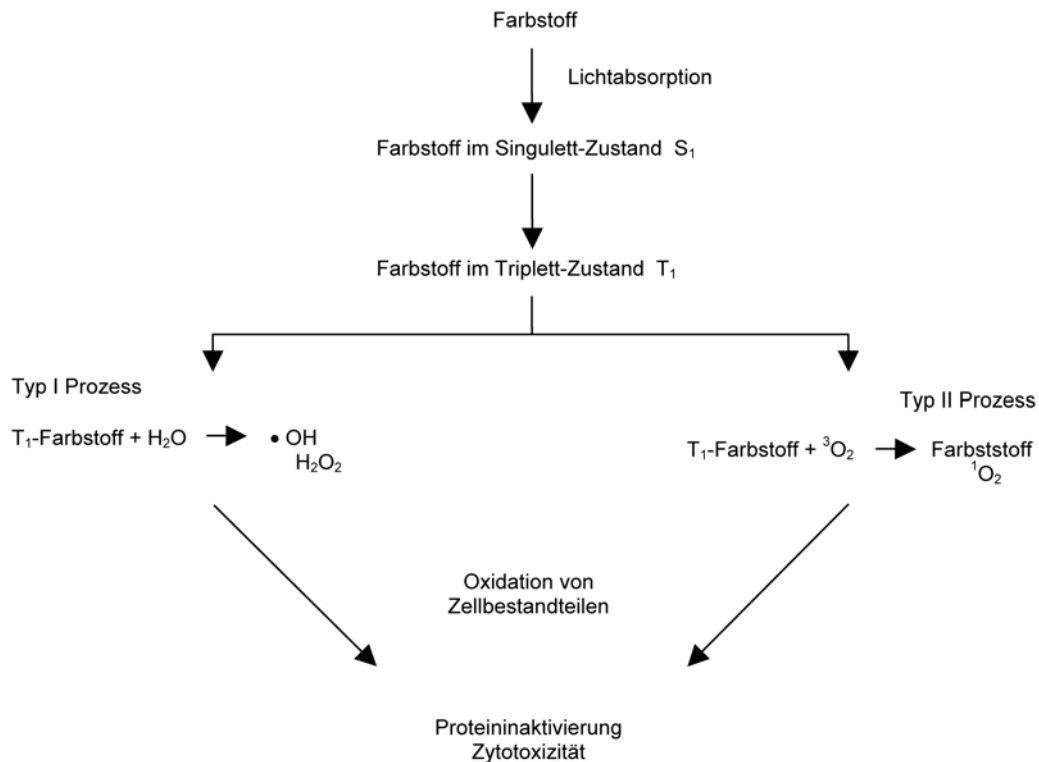
Thermische Denaturierung benötigt abhängig von der Temperatur eine gewisse Zeitspanne, die über das Arrheniusmodell (Johnson *et al.*, 1974; Birngruber, 1980) berechnet werden kann. Obwohl eine Extrapolation der Schädigungsrate, die im Temperaturbereich von 40°C bis 100°C für verschiedene Proteine gemessen wurde, eine thermische Zerstörung innerhalb von Nanosekunden bei Temperaturen unterhalb des spinodalen Punktes von Wasser erwarten ließ (Hüttmann und Birngruber, 1999), zeigte sich experimentell, dass höhere Temperaturen notwendig sind (Radt, 2002). Dies bedeutet, dass bei der Induktion von Proteinschäden mit der Ausbildung von Kavitationsblasen zu rechnen ist und Zellen und Proteine höchstwahrscheinlich mechanisch zerstört werden können.

Das Potenzial der Laserbestrahlung von Goldnanopartikeln wurde von einigen Gruppen bereits vor Beginn dieser Arbeit demonstriert. An die Partikel gekoppelte Enzyme ließen sich unter Bestrahlung mit ns- und ps-Pulsen inaktivieren (Hüttmann *et al.*, 2001; Radt, 2002; Pitsillides *et al.*, 2003). Auch eine effiziente Zerstörung von Zellen, an deren Oberfläche die Partikel gekoppelt waren, wurde bereits für zwei Zelltypen gezeigt. Da Goldpartikel ein einmaliges Werkzeug darstellen, um durch lokalisierte Erzeugung hoher Temperaturen gezielte Modifikationen an Zellen und Gewebe durchzuführen, sollte in dieser Arbeit ihr Potential zur selektiven Zell- und Protein-Inaktivierung näher untersucht werden.

### 1.3 Photochemisch vermittelte Effekte von Absorbern

Photochemische Schäden nach Bestrahlung von Fluoreszenzfarbstoffen werden hauptsächlich durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) ausgelöst. Dabei wird der Farbstoff durch die Absorption vom Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  versetzt und geht anschließend in den stabileren Triplett-Zustand  $T_1$  über. Für die Erzeugung von ROS ist in erster Linie dieser Triplett-Zustand verantwortlich (Prasad, 2003, S. 435). Zur Generierung der ROS sind zwei Reaktionswege möglich (Ochsner, 1997) (Abb. 1.2). Im Typ I-Reaktionsweg reagieren die angeregten Farbstoffe mit Wasser oder umgebenden Biomolekülen. Es entstehen Radikale wie das Hydroxylradikal ( $\bullet$ OH), Peroxid ( $H_2O_2$ ) und Superoxid ( $O_2^-$ ). Im Typ II-Reaktionsweg kommt es zu einer Energieübertragung von angeregten Farbstoffen auf den Sauerstoff des Gewebes. Dabei werden die Sauerstoffmoleküle von ihrem normalen Triplett-Zustand in den hoch reaktiven Singulett-Zustand ( $^1O_2$ ) überführt. Allgemein wird für die Wirkung von Farbstoffen oder Photosensibilisatoren auf Biomoleküle der Typ II - Reaktionsweg als der wichtigere

angesehen (Prasad, 2003, S. 436). Die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs in Zellen ist mit weniger als 40 ns sehr kurz und somit bleibt auch der Aktionsradius der Radikale auf unter 20 nm beschränkt (Moan und Berg, 1991). Dies bedeutet, dass die Bestrahlungseffekte räumlich sehr eng an den Ort der Absorption gebunden sind.



**Abb. 1.3** Mechanismen der Photooxidation wie sie für PDT und CALI vorgeschlagen werden (verändert nach Prasad, 2003).

Die PDT stellt das bekannteste Beispiel für eine lokal begrenzte Wirkung von photochemisch aktiven Substanzen auf biologisches Gewebe dar. Die eingesetzten Photosensibilisatoren werden Patienten entweder intravenös injiziert oder lokal appliziert und reichern sich selektiv in malignem Gewebe an (Prasad, 2003). Die Mechanismen, welche die selektive Anreicherung von Photosensibilisatoren in Tumorgewebe bewirken, sind abhängig vom eingesetzten Farbstoff und für die verschiedenen Sensibilisatoren noch nicht vollständig verstanden. Wahrscheinlich tragen spezielle Eigenschaften von Tumorgewebe, wie das Vorhandensein von Makrophagen, das vermehrte Auftreten von Protein-Rezeptoren auf den Zellmembranen, sowie ein niedriger pH-Wert zu dieser selektiven Anreicherung bei

(Dougherty *et al.*, 1998). Weitere Anomalien von malignem Gewebe, welche die Aufnahme der Sensibilisatoren begünstigen, sind große Interstitialräume sowie ein verzweigtes und undichtes Vaskularsystem. Häufig weisen Tumorzellen auch einen hohen Anteil an neusynthetisiertem Kollagen auf, an das bestimmte Porphyrine, die als Photosensibilisatoren eingesetzt werden können, binden (Musser *et al.*, 1980; Dvorak *et al.*, 1979). Eine gezielte Anreicherung von Photosensibilisatoren durch Antikörper konnte bisher nicht in eine erfolgreiche klinische Anwendung der PDT umgesetzt werden.

CALI, 1988 von D. G. Jay etabliert, nutzt dagegen nicht eine farbstoffspezifische Anreicherung aus, sondern bedient sich Fluorochromen, die an Antikörper gekoppelt an ihre Zielstrukturen binden. Im Gegensatz zur PDT wird CALI bisher nicht zur therapeutischen Zerstörung malignen Gewebes eingesetzt, sondern zur Funktionsanalyse von Proteinen durch gezielte Inaktivierung mit hoher örtlicher und temporärer Auflösung. Mit Hilfe von CALI konnten Funktionen zahlreicher Membranproteine und zytoplasmatischer Proteine bis hin zu nukleären Transkriptionsfaktoren untersucht werden (Liao *et al.*, 1995; Schröder *et al.*, 1996; Castelo und Jay, 1999; Wong *et al.*, 2003; Hauptschein *et al.*, 2005). So konnten zum Beispiel Takei *et al.* (1999) mittels CALI die Rolle der Proteine L1 und NCAM-180 beim Wachstum von Nervenzellen näher beleuchten. Die Inaktivierung des L1 führte zum Rückzug von Axonen ohne direkt die Ausläufer der Wachstumskegel zu beeinflussen. Die Axone wuchsen daraufhin in eine andere Richtung, die nicht bestrahlt wurde. Im Gegensatz hierzu hatte die Inaktivierung von NCAM-180 keinen Rückzug der Axone zur Folge, sondern führte lediglich zu einer Rückbildung der Ausläufer der Wachstumskegel. Ebenfalls auf dem Gebiet des Nervenwachstums konnten Wong *et al.* (2003) durch CALI des *Myelin-associated glycoprotein* (MAG) dessen Rolle für die Steigerung der Regeneration optischer Nerven demonstrieren. CALI wurde nicht nur in Organismen angewandt, für die genetische Techniken zur Proteinausschaltung kaum etabliert sind, wie für Heuschrecke, Reismehlkäfer, oder Huhn (Jay und Keshishian, 1990; Chang *et al.*, 1995; Schröder *et al.*, 1999), sondern auch im Modellsystem *Drosophila*, wo eine Inaktivierung von Proteinen mittels CALI direkt mit Funktionsverlustmutanten verglichen werden konnte. Dies wurde u. a. durch Inaktivierung der Segmentpolaritätsgene *patched* und *even skipped* gezeigt (Schmucker *et al.*, 1994; Schröder *et al.*, 1999).

Ursprünglich wurde angenommen, dass thermische Denaturierung für die Inaktivierung der Proteine verantwortlich ist (Jay, 1988). Aus diesem Grunde wurden die Bestrahlungen zunächst mit gepulsten Lasern durchgeführt, um die Wärmediffusion möglichst gering zu halten und Inaktivierungsprozesse dadurch lokal zu begrenzen. Liao *et al.* zeigten 1994, dass

es sich bei CALI nicht um einen photothermischen Effekt handelt, sondern dass vielmehr freie Radikale für die Effekte verantwortlich sind. Für das damals als CALI-Fluorophor gebräuchliche Malachitgrün (MG) wurde eine zwei-Photonen-Absorption mit Entstehung eines Hydroxylradikals aus Wasser postuliert. Der Inaktivierungsradius der Radikale wurde experimentell auf 1,5 nm bestimmt. Später zeigte sich, dass sich Fluorescein ebenfalls als CALI-Fluorophor eignet und Proteininaktivierung auch mit kontinuierlicher Bestrahlung sowohl eines Lasers als auch mit dem Licht einer Quecksilberdampflampe durchgeführt werden kann (Surrey *et al.*, 1998). CALI mit Fluorescein zeigte vergleichbare Effekte wie Malachitgrün, jedoch schon bei wesentlich geringerer Bestrahlungsleistung. Für die Proteininaktivierung bei FITC-CALI (in einigen Publikationen später auch FALI genannt für *Fluorophore assisted light inactivation*) scheint Singulett-Sauerstoff verantwortlich zu sein, wie mittels Substitution von Wasser durch D<sub>2</sub>O demonstriert werden konnte (Beck *et al.*, 2002). Diese Substitution führte zu einer Verstärkung der FITC-CALI Effekte, was mit einer längeren Lebenszeit von Singulett-Sauerstoff in D<sub>2</sub>O im Vergleich zu leichtem Wasser in Einklang steht (Ogilby und Foote, 1982). Horstkotte *et al.* (2005) bestätigten dies und zeigen außerdem, dass der Vorgang des Ausbleichens des Fluoresceins wahrscheinlich von der Produktion freier ROS unabhängig ist. Dies könnte zur Entdeckung von Chromophor-Klassen führen, die für eine Inaktivierung mittels CALI noch geeigneter sind als Fluorescein (Horstkotte *et al.*, 2005). Die Möglichkeit CALI mit dem *Grün fluoreszierenden Protein* (GFP) durchzuführen wurde bereits 1998 von Surrey *et al.* demonstriert. Ein Problem bei GFP-CALI war allerdings die Notwendigkeit einer sehr hohen, für Zellen schädlichen Bestrahlung. Andere Studien (Rajfur *et al.*, 2002) zeigten dennoch eine erfolgreiche Inaktivierung von endogen exprimierten GFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen ohne nennenswerte toxische Effekte auf die Zellen. Durch Bestrahlung von Fibroblasten, die EGFP- $\alpha$ -Actinin exprimierten, konnte hier eine Ablösung der Stressfasern von fokalen Adhäsionsplaques demonstriert werden. Die Spezifität dieser Inaktivierung zeigte sich durch CALI-Bestrahlung von EGFP-*focal adhesion kinase* (FAK), die ebenfalls in den fokalen Adhäsionsplaques lokalisiert, welche keine Ablösung der Stressfasern zur Folge hatte.

Ein Nachteil der CALI-Technologie ist, dass zunächst für die zu untersuchenden Proteine Antikörper vorhanden sein müssen, die an ihr Ziel mit hoher Affinität und Spezifität binden (Eustace *et al.*, 2002). Diese Antikörper sollten ferner die Aktivität der Proteine nicht von sich aus blockieren.

Aus diesen Gründen wurden in den letzten Jahren Technologien entwickelt, die die mit monoklonalen Antikörpern durchgeführte klassische CALI erweitern. Darunter zum einen die

bereits zitierte Arbeit von Rajfur *et al.* (2002) zur Bestrahlung von GFP-Fusionsproteinen. Des Weiteren konnte CALI mit Fusionsproteinen durchgeführt werden, die eine Peptidsequenz besitzen, die in der Lage ist, bestimmte Farbstoffe selektiv zu binden, welche durch die Zellmembran diffundieren können. Dies wurde für den Farbstoff ReAsH (Tour *et al.* 2003) sowie synthetisch hergestellte Liganden gezeigt (Marks *et al.*, 2004).

#### 1.4 Das Ki-67-Protein

Das nukleäre Ki-67-Protein (pKi-67) diente in der vorliegenden Arbeit als Zielstruktur für Versuche zur Inaktivierung mit Hilfe von Goldnanopartikeln und Chromophor-markierten Antikörpern. Für die Inaktivierungsstudien erscheint pKi-67, das stark mit der Zellproliferation assoziiert ist, interessant, da die Funktion dieses Proteins bisher ungeklärt ist, obwohl es einige klare Ansatzpunkte für die physiologische Rolle gibt. Darüber hinaus sind seit der ersten Beschreibung des pKi-67 (Gerdes *et al.*, 1983) dessen Struktur und Lokalisation in zahlreichen Studien gut untersucht worden, und es existieren spezifische Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des Proteins. Die Lage der Epitope der in dieser Arbeit verwendeten pKi-67-Antikörper ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt, und die Antikörper sind in Kapitel 2.2.1 näher beschrieben.

Das Ki-67-Protein ist in den Kernen proliferierender Zellen während der G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase, sowie während der Mitose präsent (Gerdes *et al.*, 1984). In nicht-prolierierenden Zellen (G<sub>0</sub>-Phase) kommt es zu einer strikten Herabregulation der pKi-67-mRNA- und -Proteinexpression. Aufgrund dieser starken Assoziation mit allen aktiven Phasen des Zellzyklus' und der starken Abnahme während der G<sub>0</sub>-Phase kann in Neoplasien mit Hilfe von Antikörpern gegen pKi-67 die Population sich aktiv vermehrender Zellen, die sogenannte Wachstumsfraktion, bestimmt werden. Aufgrund dieser Eigenschaften, hat es sich als Standardmarker in der Tumordiagnostik etabliert (Scholzen und Gerdes, 2000). Dabei werden pKi-67-Antikörper zur Bestimmung der Wachstumsfraktion verschiedenster Tumore eingesetzt, so etwa bei malignen Lymphomen, Melanomen, Brust- oder Prostatakrebs (Übersicht bei Brown und Gatter, 2002). Aktuell listet die *Medline*-Datenbank der *National Institutes of Health* über 9000 Publikationen, die auf pKi-67 oder Antikörper gegen pKi-67 Bezug nehmen.

Das Protein wird durch einen 30 000 Basenpaare langen Genomabschnitt kodiert, der 15 transkribierte Exons enthält, wobei Exon 1 nicht translatiert wird. Es wurden zwei alternativ

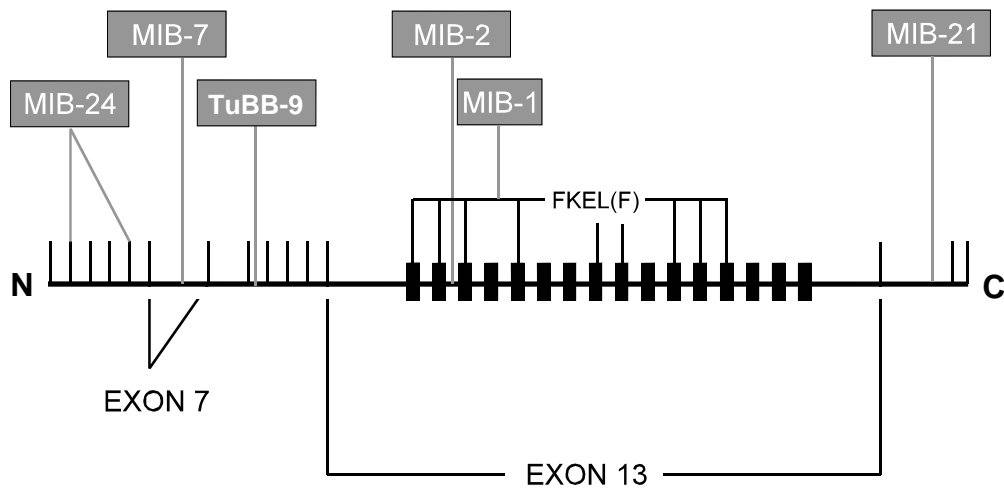
gespleisste mRNA-Isoformen beschrieben, die für 2896 bzw. 3256 Aminosäuren kodieren. Diese Isoformen haben ein berechnetes Molekulargewicht von 320 bzw. 359 kDa (Schlüter *et al.*, 1993). Der kleineren Isoform fehlt dabei die von Exon 7 kodierte Region. Es sind eine Reihe von Merkmalen der Proteinstruktur bekannt. Auffällig sind dabei die 16 Sequenzwiederholungen mit je ungefähr 122 Aminosäuren. Viele dieser *Ki-67-Wiederholungen* enthalten eine hoch konservierte Region, das sogenannte *Ki-67-Motiv* mit der Aminosäuresequenz F K E L (Scholzen und Gerdes, 2000). Das Ki-67-Motiv wird u. a. von dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper MIB-1 erkannt. Die Ki-67-Wiederholungen werden vom zentralen Exon 13 kodiert, das mit einer Länge von 6845 bp mehr als zwei Drittel des gesamten transkribierten Bereiches von pKi-67 ausmacht. Mit einem Molekulargewicht von 320 bzw. 359 kDa ist pKi-67 ein sehr großes Protein. Vergleiche der Primärstruktur zeigten keine offensichtliche Homologie mit anderen Proteinen. Eine Ausnahme ist die sogenannte *Forkhead-associated (FHA) - domain* am N-Terminus des pKi-67 (Hofman und Bucher, 1995). Dieses Sequenzmotiv findet sich in einer Reihe von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen wieder (Byeon *et al.*, 2005), darunter auch viele Zellzyklus-regulierende Proteine. Die genaue Funktion dieses Motivs ist aber unbekannt. FHA-Domänen sind in der Lage Phosphoproteine zu binden (Durocher und Jackson, 2002). So bindet die FHA-Domäne von pKi-67 an eine phosphorylierte Form des NIFK (*nucleolar protein interacting with the FHA domain of pKi-67*), dessen Funktion ebenfalls ungeklärt ist (Takagi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Byeon *et al.*, 2005). Das zweite bekannte Protein, welches an die pKi-67-FHA-Domäne bindet, ist Hklp2 (*human kinesin-like protein 2*). Das homologe Protein Xklp2 wird im Krallenfrosch *Xenopus* für den korrekten Ablauf der Mitose benötigt (Sueishi *et al.*, 2000). Neben zahlreichen potentiellen Phosphorylierungsstellen sowie einer ATP/GTP-Bindungsstelle konnte am C-Terminus eine Fähigkeit des pKi-67 zur DNA-Bindung nachgewiesen werden. (McCallum und Hall, 2000). Es zeigte sich eine bevorzugte Bindung an AT-reiche DNA-Regionen vor allem superspiralisierter DNA. Ein hierfür verantwortliches eindeutiges Sequenz-Motiv konnte jedoch nicht bestimmt werden. Für den C-Terminus konnte außerdem eine Bindung an Mitglieder der *heterochromatin protein 1 (HP1)* - Familie gezeigt werden. HP1-Proteine sind an der Regulation der Chromatinstruktur und somit der Genaktivität beteiligt (Jones *et al.*, 2000; Scholzen *et al.*, 2002).

Lokalisationsstudien haben eine große Dynamik des pKi-67 während der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus gezeigt (Verheijen *et al.*, 1989 a+b). Während der G1-Phase kommt pKi-67 in distinkten Punkten im sich neu bildenden Zellkern vor und ist hier mit Regionen assoziiert die centromerische und telomerische Satelliten-DNA enthalten (Bridger *et al.*,

1998). Im weiteren Verlauf der Interphase färben die bisher etablierten Antikörper gegen pKi-67 hauptsächlich den äußeren Bereich der Nukleoli (van Dierendonck *et al.*, 1989; Verheijen *et al.*, 1989a). Mit Beginn der Mitose kommt es zu einer ausgeprägten Umverteilung des pKi-67, das nun in erster Linie in der perichoromosomal Schicht an der Oberfläche der Chromosomen lokalisiert (Braun *et al.*, 1988; Verheijen *et al.*, 1989b; Starborg *et al.*, 1996).

Im Gegensatz hierzu färbt der kürzlich entwickelte Antikörper TuBB-9 während der gesamten Interphase distinkte Punkte innerhalb der Nukleoli und lokalisiert an kondensierten Chromosomen in wenigen, größeren punktförmigen Strukturen (Bullwinkel *et al.*, 2006). Das unterschiedliche Lokalisationsmuster von TuBB-9 im Vergleich zu bisher verwendeten Antikörpern gegen pKi-67 wird mit dem Phänomen der sogenannten Epitopmaskierung begründet. Verantwortlich hierfür sind unterschiedliche Bindungspartner des Proteins in unterschiedlichen funktionalen Stadien, die dabei die Epitope für den jeweils anderen Antikörper verdecken.

Die bisherigen Erkenntnisse legen eine Rolle des Ki-67-Proteins während der Zellproliferation nahe. Untersuchungen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen pKi-67-mRNA (Schlüter *et al.*, 1993; Kausch *et al.*, 2003; Kausch *et al.*, 2004), die Einbringung von siRNA (Zheng *et al.*, 2006) oder die Injektion von Antikörpern (Starborg *et al.*, 1996; Heyden, 1997) führten zu einer Reduzierung der DNA-Synthese und Verlangsamung des Zellzyklus. Hypothesen über die Funktion von pKi-67 reichen von strukturellen Aufgaben zum Schutz der Chromosomen während der Mitose (Yasuda und Maul, 1990; Hernandez-Verdun und Gautier, 1994) über Aufgaben bei der Regulation der Chromatinstruktur (Scholzen *et al.*, 2002) bis hin zu Aufgaben bei der rRNA-Prozessierung und Ribosomen-Synthese (McCallum und Hall, 2000; Bullwinkel, 2005). Letztere Hypothese konnte durch Untersuchungen mit dem TuBB-9-Antikörper erhärtet werden. Bullwinkel *et al.* (2006) zeigten eine bevorzugte Assoziation des pKi-67 mit den Promotorbereichen der rRNA-Gene. Darüber hinaus konnte in der Interphase eine Kollokalisierung des TuBB-9-Antikörpers mit Proteinen der rRNA-Transkriptionsmaschinerie gezeigt werden. Dies sollte den Ansatzpunkt für die in dieser Arbeit zu untersuchende pKi-67-Inaktivierung bilden. Dabei bietet sich durch die Anwendung von CALI und NALI die Möglichkeit, die Inaktivierung mit unterschiedlichen Antikörpern zu untersuchen. Vor allem nach Inaktivierung mit dem neuen TuBB-9-Antikörper sollen mögliche Auswirkungen auf die RNA-Synthese untersucht werden.



**Abb. 1.4** Schematische Darstellung der Bindungsstellen verschiedener anti-pKi-67-Antikörper. Die Grenzen der Exons, die für die entsprechenden Proteinregionen kodieren, sind durch dünne vertikale Striche markiert. Die 16 pKi-67-Wiederholungen im zentralen, durch Exon 13 kodierten, Bereich sind durch schwarze Rechtecke wiedergegeben.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die Methoden der *Nanopartikel-assistierten Laserinaktivierung* (NALI) sowie der *Chromophor-assistierten Laserinaktivierung* (CALI) etabliert bzw. auf ihr Potential hin untersucht werden, Proteine selektiv zu inaktivieren sowie die Selektivität einer Schädigung von Zellen zu untersuchen. Die Zellschädigung sollte dabei an unterschiedlichen Tumorzelllinien verifiziert werden. Als Zielstruktur für die Proteinaktivierung diene das proliferationsassoziierte Protein pKi-67. Die Funktion dieses Proteins, das als Proliferationsmarker breite Anwendung in der Tumordiagnostik findet, ist weitestgehend unverstanden. Neuere Ergebnisse weisen jedoch auf eine mögliche Rolle von pKi-67 in dem für die Zelle essentiellen Prozess der Ribosomen-Synthese hin. Eine solche Rolle sollte durch Funktionsstudien mittels NALI und CALI untersucht werden, wobei für die Inaktivierung unterschiedliche Antikörper gegen pKi-67 zum Einsatz kommen und Folgen auf die Synthese der rRNA beobachtet werden sollten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Standardpuffer und Lösungen

PBS:                    150 mM NaCl  
                             8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                             2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                             auf pH 7,5 mit HCl eingestellt

TBS, pH 7,5:            150 mM NaCl  
                             10 mM Tris/HCl

TBS-T, pH 8:           0,1 M Tris/HCl (pH 8)  
                             150 mM NaCl  
                             0,05 % (v/v) Tween 20

### 2.2 Zelllinien und Zellkultur

#### 2.2.1 Zelllinien

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien zeigt Tabelle 2.1.

**Tab. 2.1:** Übersicht der verwendeten Zelllinien. Angegeben sind neben Referenz, Zelltyp und Kulturmedium die für diese Arbeit relevanten Oberflächenmarker der Suspensionszelllinien.

Zelllinie	Akzessionsnummer / Referenz	Zelltyp	Kulturmedium	Oberflächenmarker
<b>L-428</b>	DSMZ Nr.: ACC 197 Schaadt <i>et al.</i> , 1980	humane Hodgkin-Lymphomlinie, Suspensionszellen	RPMI	CD13 - CD25 - CD30 +
<b>Karpas-299</b>	DSMZ Nr.: ACC 31 Fisher <i>et al.</i> , 1988	humane T-Zell-Lymphomlinie, Suspensionszellen	RPMI	CD13 - CD25 + CD30 +
<b>KG-1</b>	DSMZ Nr.: ACC 14 Koeffler <i>et al.</i> , 1978	Humane akute myeloische, leukämische Knochenmarkszelllinie, Suspensionszellen	RPMI	CD13 + CD25 - CD30 -
<b>HEp-2</b>	ATCC Nr.: CCL-23 Moore <i>et al.</i> , 1955	humane Zervixkarzinomlinie, adhärent Sublinie von HeLa S3	DMEM	

### 2.2.2 Kulturmedien und Lösungen

**RPMI-1640:** Rohmedium, flüssig (Sigma, München, Dtl.), zugesetzt wurden: 20 % (v/v) FCS (Biochrom, Berlin, Dtl.), 0,5 % (w/v) Glucose (Sigma, München, Dtl.), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, kurz vor Gebrauch wurden 2 mM L-Glutamin (PAA, Cölbe, Dtl.) hinzugegeben und das Medium anschließend max. drei Wochen verwendet.

**DMEM:** Rohmedium, flüssig (Sigma, München, Dtl.), zugesetzt wurden: 10 % (v/v) FCS (Biochrom, Berlin, Dtl.), 0,5 % (w/v) Glucose (Sigma, München, Dtl.), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, kurz vor Gebrauch wurden 2 mM L-Glutamin (PAA, Cölbe, Dtl.) hinzugegeben und das Medium anschließend max. drei Wochen verwendet.

**Einfriermedium:** Zum Einfrieren der Zellen wurden dem Komplettmedium weitere 10 % FCS zugesetzt, sowie 10 % (v/v) DMSO (Serva, Heidelberg, Dtl.).

**Trypsin/EDTA:** Fertigprodukt (PAA, Cölbe, Dtl.), enthält: 0,5 % (w/v) Trypsin, 0,2 % (w/v) EDTA

### 2.2.3 Kulturbedingungen

Die verwendeten Suspensionszelllinien (L-428, Karpas-299, KG-1) wurden in 10 ml RPMI-Komplettmedium in T25-Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, Dtl.) in einem mit 5 % CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank (Heraeus, Hanau, Dtl.) kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 in frischem Medium ausgesät.

Die verwendeten adhärennten Zelllinien (HEp-2) wurden in 6 ml DMEM-Komplettmedium in T25-Zellkulturflaschen in einem mit 10 % CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und im Verhältnis 1:12 in frischem Medium ausgesät.

### 2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl, wurden die Zellen zunächst im Verhältnis 1:10 in Trypanblau (Biochrom, Berlin, Dtl.) aufgenommen und anschließend 10 µl in einer 0,0025 mm<sup>2</sup> Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Dtl.) gezählt.

### 2.2.5 Langfristige Lagerung von Zellen

Für die langfristige Lagerung der Zellen wurden diese bei 300 g abzentrifugiert und  $1 \cdot 10^7$  Zellen in 1 ml eisgekühltem Einfriermedium in ebenfalls vorgekühlte Einfrierröhrchen aufgenommen. Zunächst wurden die Zellen bei -70 °C für 1-2 Tage gefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen vorsichtig in gekühltem Komplett-Medium aufgenommen, das 10 % zusätzliches FCS enthielt und anschließend in einer Verdünnungsreihe in einer 48-well-Platte (Nunc, Wiesbaden, Dtl.) ausgesät. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen aus gut bewachsenen Vertiefungen der Platte in Zellkulturflaschen in Komplett-Medium überführt.

### 2.2.6 Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Für ein Zytozentrifugenpräparat wurden  $4-5 \cdot 10^4$  Zellen in 100 µl sterilfiltriertem 10 % BSA/PBS aufgenommen und in einer Cytospin-3-Zentrifuge der Firma Shandon (Pittsburgh, PA, USA) 4 min bei 75 g auf einen Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die Präparate 4 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und dann bei -70 °C gelagert.

### 2.2.7 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Humane mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMNZ) wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Vollblut gesunder Spender aus dem Forschungszentrum Borstel wurde zunächst mit Heparin (20 IE/ml) versetzt und im Verhältnis 1:1 mit Hanks' balanced salt solution (HBSS) verdünnt. Anschließend wurden 6 ml Ficoll (Pharmacia, Freiburg, Dtl.) mit 20 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei 400 g und RT ist das Blut aufgetrennt in die Fraktion der Erythrozyten, die Interphase mit den mononukleären Zellen sowie den Überstand mit Thrombozyten und Blutplasma. Die Interphase wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und zweimal in HBSS gewaschen (10 min, 300 g, 4 °C). Für die anschließende Elutriation (Abschnitt 2.1.8) wurden die Zellen in HBSS mit 1 % BSA aufgenommen und die Zellzahl mit einem Zählgerät bestimmt (Sysmex Platelet Counter PL-100, Digitana, Hamburg, Dtl.).

### 2.2.8 Isolierung humaner Lymphozyten durch Elutriation

Bei der Gegenstrom-Zentrifugationselutriation (modifizierte Methode nach Contreras *et al.* 1980) werden die PBMNZ nach Größe und Dichte aufgetrennt. Dabei wirken auf die Zellen einerseits die Zentrifugalkraft des Elutriationsrotors (JE-6B, Beckman, München, Dtl.) und in entgegengesetzter Richtung die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums im Rotor. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 25 ml/min befinden sich die Zellen im Gleichgewicht zwischen beiden Kräften und verbleiben in der Kammer des Rotors. Wird die Fließgeschwindigkeit kontinuierlich erhöht, können Fraktionen unterschiedlicher Zellpopulationen aufgefangen werden. Zunächst wurde das System mit Ethanol (70 %) und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Nach der Äquilibrierung mit 0,25 l 0,1 % BSA/HBSS werden die Zellen bei laufendem Rotor (3500 upm, 12°C) mit einer Fließgeschwindigkeit von 25 ml/min eingeladen. Um die Qualität der Trennung zu gewährleisten, wurden Zellkonzentrationen von höchstens  $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml verwendet. Nach Erhöhung der Fließgeschwindigkeit auf 33 bis 38 ml/min konnten die Fraktionen der Lymphozyten in 50 ml-Reaktionsgefäßen isoliert werden. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 350 g, RT), in RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl im Zählgerät bestimmt.

### 2.2.9 Mikroinjektion von HEp-2-Zellen

Für die Mikroinjektion wurden jeweils  $2-4 \cdot 10^5$  Zellen der adhären wachsenden Zelllinie HEp-2 in 35-mm-Glasboden-Schälchen der Firma MatTek (Ashland, MA, USA) ausgesät und mindestens 6-8 Stunden, meist über Nacht, kultiviert. Der Glasboden besaß eine Stärke von 0,16-0,19 mm und eignet sich für Aufnahmen am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop. Insbesondere ermöglicht der Glasboden eine Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser. Kunststoffböden sind aufgrund ihrer Restabsorption gerade bei hoher Laser-Energie ungeeignet. Die Mikroinjektion wurde an einer Anlage der Firma Eppendorf (Hamburg, Dtl.) bestehend aus Mikromanipulator 5171 und Transjector 5246 durchgeführt. Für die Injektion

der fluoreszenzmarkierten Antikörper für die CALI Experimente wurden dabei Glasinjektionsspitzen (Femtotips II, Eppendorf) eingesetzt. Für die Mikroinjektion der Goldkonjugate wurden die Injektionsspitzen am Puller P-87 der Firma Sutter Instrument Co. (Novato, CA, USA) hergestellt. Dazu wurden Glaskanülen mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm der Firma Science Products GmbH (Hofheim, Dtl.) verwendet. Der Injektionsdruck betrug 70-100 hPa.

Die fluoreszenzmarkierten Antikörper sowie die Antikörper-Goldkonjugate wurden zur Injektion mit sterilem PBS (pH 7,5) im Verhältnis 1:3 bis 1:6 verdünnt.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Verwendete Antikörper

#### Primärantikörper und Seren:

MIB-1

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Ki-67-Motiv aus Exon 13 von pKi-67, Herstellung nach Cattoretti *et al.* (1992) und Key *et al.* (1993)

MIB-2

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen die von Exon 13 kodierte Region von pKi-67, Key *et al.* (1993)

MIB-7

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen die von Exon 7 kodierte Region von pKi-67, Becker (1993)

MIB-24

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen die von Exon 2 bis 4 kodierte Region von pKi-67, Gerlach *et al.* (1998)

TuBB-9

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen die von Exon 9 kodierte Region von pKi-67, Bullwinkel *et al.* (2006)

BerH2

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen CD30 (transmembranenes Glykoprotein, Mitglied der TNFR-Familie) Schwarting *et al.* (1989)

ACT-1

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen CD25 (Interleukin-2-Rezeptor, IL-2-R), Schwarting *et al.* (1987)

## Tük-1

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen CD13 (Aminopetidase N)  
Uchanska-Ziegler, Leukocyte Typing IV, (1989)

## Anti-Mcm3

Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG1) gegen das *Minichromosome maintenance protein 3*, Endl *et al.* (2001)

## Anti-BrdU

Monoklonaler Ratte-Antikörper, Subklasse IgG2  
(ab6326 von Abcam, Cambridge, GB), der kreuzreaktiv  
mit 5-Fluoruridin ist. Konzentration: 1 mg/ml

## Anti-Fibrillarin

Polyklonaler Ratte-Antikörper gegen Fibrillarin,  
(ab6326 von Abcam, Cambridge, GB),  
Konzentration: 0,2 mg/ml

## Anti-UBF-Serum (6'2)

Kaninchen-Serum gegen den *upstream binding factor*, UBF (Bolivar *et al.*, 1999), zur Verfügung gestellt von  
Prof. Dr. Manuel M. Valdivia (Universität Cádiz, Spanien)

## Anti-NOR-Serum

Humanes Autoimmunsrum, welches hauptsächlich gegen UBF  
gerichtet ist, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Manuel M. Valdivia  
(Universität Cádiz, Spanien)

## Maus-Normalserum

Proteinkonzentration 50 mg/ml, Dianova (Hamburg, Dtl.).

**Sekundärantikörper:**

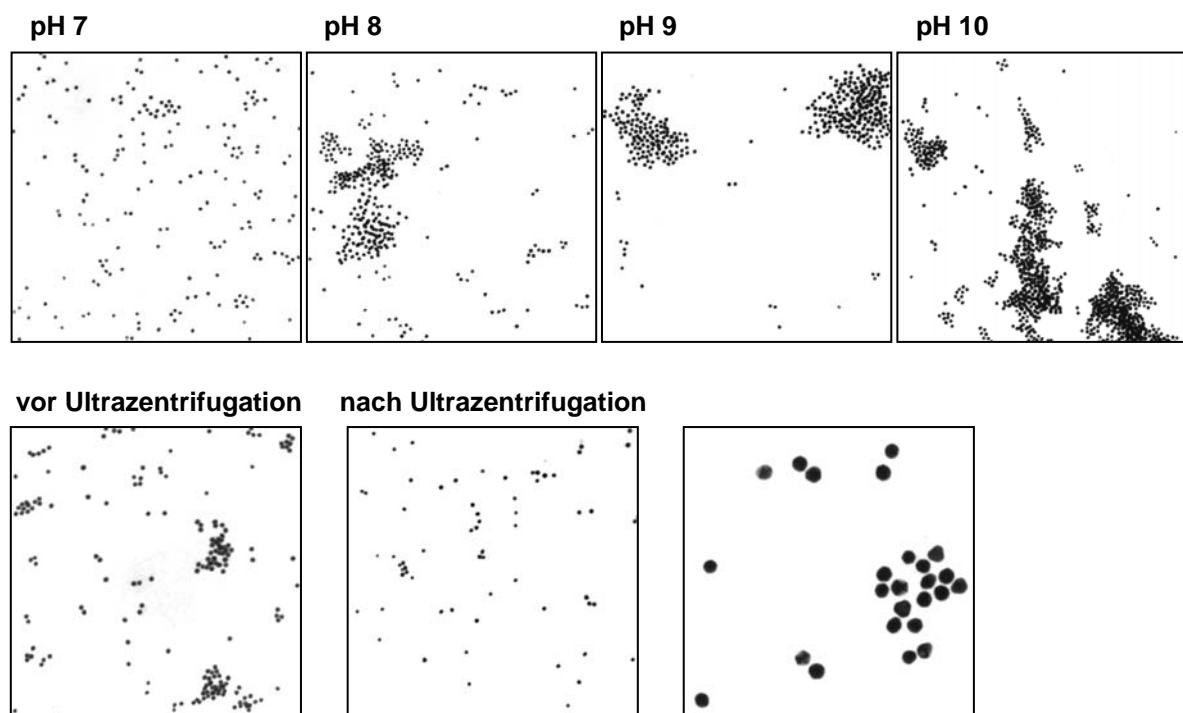
Ziege-anti-Maus-Alexa 488 IgG (H+L)	Die mit Alexa Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörper wurden von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) bezogen. Konzentration: 2 mg/ml. Der Markierungsgrad beträgt ca. 7 Mol Farbstoff/Mol Antikörper.
Ziege-anti-Maus-Alexa 647 IgG (H+L)	
Ziege-anti-Maus-Alexa 633 IgG (H+L)	
Ziege-anti-Ratte-Alexa 546 IgG (H+L)	

Ziege-Anti-Maus-AP IgG (H+L),	IgG-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment, Dianova (Hamburg, Dtl.)
Ziege-Anti-Human-AP IgG+IgM (H+L),	IgG-Gesamt-molekül, „ „
Ziege-Anti-Maus-PO IgG (H+L),	IgG-Gesamt-molekül, „ „

### 2.3.2 Konjugation von Antikörpern mit Goldnanopartikeln

Zur Herstellung der Antikörper-Goldkonjugate wurden Goldnanopartikel der Größen 6 nm, 15 nm und 30 nm der Firma Aurion (Wageningen, Niederlande) verwendet. In vorliegender Arbeit werden Konjugate die beispielsweise aus 6 nm Goldpartikeln und dem Antikörper MIB-1 bestehen als 6Au-MIB-1 bezeichnet, Konjugate mit 15-nm-Goldpartikeln dementsprechend 15Au-MIB-1.

Für alle verwendeten Antikörper wurde zunächst die optimale Proteinkonzentration für die Konjugation ermittelt. Bei zu geringer Antikörperkonzentration sind die Goldpartikel nicht vollständig beschichtet und es kommt zu Aggregationen und damit zu veränderten optischen Eigenschaften. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurden die Antikörper in einer 96-well-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Dtl.) in abnehmender Konzentration in 50  $\mu$ l Goldlösung für 10 min inkubiert. Die Anfangskonzentration lag bei den verschiedenen Antikörpern meist zwischen 160 und 240  $\mu$ g/ml. Anschließend wurden pro well 10  $\mu$ l NaCl-Lösung (10 %) zugegeben. Die Zugabe von Salzionen führt bei nicht vollständig bedeckten Goldpartikeln zu Aggregationen und damit zu einem Farbumschlag der Lösung ins Blaue. Die Verdünnung vor dem Blauumschlag wurde für die Konjugation eingesetzt. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Konjugation ist der pH-Wert. Die Proteine binden nahe an ihrem isoelektrischen Punkt an die Goldpartikel. Aus diesem Grunde wurde die Titrationsreihe für die pH-Werte 7, 8, 9 und 10 durchgeführt. Der pH-Wert der Goldpartikel-Lösung wurde mit 100 mM  $K_2CO_3$  eingestellt.



**Abb. 2.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Gold-Antikörperkonjugate. Obere Reihe: 15Au-BerH2-Konjugate in 25000-facher Vergrößerung. Die Konjugation erfolgte bei den angegebenen pH-Werten. Untere Reihe: 30Au-MIB-1 vor und nach Ultrazentrifugation. Vergrößerung: 12500. Unten rechts: 30Au-MIB-1: in 50000-facher Vergrößerung.

Zur Herstellung der Konjugate wurden 5 ml der jeweiligen Goldpartikel-Lösung verwendet und der zuvor ermittelte optimale pH-Wert eingestellt. Nach Zugabe des entsprechenden Antikörpers in der Konzentration 10-30 µg/ml wurde 10 min auf einem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurden 500 µl 10 % BSA/TBS zugegeben, um eventuell nicht vollständig bedeckte Partikel abzusättigen. Die Lösung wurde auf 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt und 60 min bei 1600 g und RT abzentrifugiert. Es entstehen durch die Zentrifugation zwei Pellets. Ein hartes Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes, das aus unkonjugierten Goldpartikeln besteht, sowie ein weiches Pellet an der Wand des Reaktionsgefäßes, welches die Antikörper-Goldkonjugate enthält. Ungebundene Antikörper befinden sich im Überstand. Die weichen Pellets (je ca. 50 µl) wurden mit der Pipette aufgesogen und in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Nach 45 min Ultrazentrifugation bei 45000 g wurde erneut das weiche Pellet in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In EM-Aufnahmen der Konjugate (Abb. 2.1) sind vor Ultrazentrifugation noch größere Aggregationen zu erkennen. Nach Ultrazentrifugation liegen die Konjugate weitestgehend vereinzelt vor, gelegentlich sind noch Zusammenschlüsse von 2 - 3 Partikeln zu erkennen. Zur Kontrolle der Ausbeute der Konjugation wurde die OD einer 1:100 Verdünnung bei 520 nm bestimmt. Gegebenenfalls wurde die Lösung mit 1 % BSA/TBS (pH 8,2) verdünnt, um eine OD der 1:100 Verdünnung zwischen 0.2 bis 0.6 zu erreichen.

Zur Bestimmung der Partikelanzahl in Lösung wurden für die unterschiedlichen Durchmesser der Goldpartikel folgende Formeln verwendet (Quelle: Aurion):

$$6 \text{ nm: } OD 1 \cong 2,4 \cdot 10^{13} \frac{\text{Partikel}}{\text{ml}}$$

$$15 \text{ nm: } OD 1 \cong 1,5 \cdot 10^{12} \frac{\text{Partikel}}{\text{ml}}$$

$$30 \text{ nm: } OD 1 \cong 2 \cdot 10^{11} \frac{\text{Partikel}}{\text{ml}}$$

### 2.3.3 Markierung von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen

#### Markierung von Antikörpern mit Alexa Fluoreszenzfarbstoffen

Das „Protein Labelling“-Kit von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) wurde verwendet, um Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 und Alexa 546 direkt zu markieren. Es wurden 2 mg Antikörper eingesetzt und nach dem Protokoll der Herstellerfirma verfahren. Wurden die direktmarkierten Antikörper für die Mikroinjektion lebender Zellen verwendet, musste das Natriumazid aus dem Lagerungspuffer entfernt werden. Hierfür wurden die Antikörper 20 min in Microcon YM-30-Filterröhrchen (Millipore, Bedford/MA, USA) bei 1100 g abzentrifugiert und mit TBS (pH 7,4) von der Filtermembran gelöst.

### Markierung von Antikörpern mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC)

Die Antikörper wurden zunächst in einer Konzentration von 1 mg/ml in 200  $\mu$ l Natriumcarbonatpuffer (pH 9,3) aufgenommen und mit 10  $\mu$ l FITC-Lösung versetzt (1 mg/ml FITC in DMSO). Nach zwei Stunden Inkubation bei RT im Dunkeln auf einem Rollinkubator wurde die Probe mit 600  $\mu$ l TBS (pH 7,4) verdünnt und auf eine mit 3 ml TBS (pH 8,2) äquilibrierten NAP-5-Sepadex-Säule (Amersham, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Mit 1 ml TBS (pH 8,2) wurden die Antikörper-FITC-Konjugate eluiert und zur Volumen-Einengung 20 min in Microcon YM-30-Filterröhrchen bei 1100 g abzentrifugiert. Anschließend wurde der markierte Antikörper mit TBS (pH 7,4) von der Filtermembran gelöst.

Natriumcarbonatpuffer, pH 9,3	160 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 333 mM NaHCO <sub>3</sub> .
-------------------------------	---

### 2.3.4 Quantifizierung der Antikörper-Fluorochrom-Konjugation

Für die CALI-Experimente wurde neben der Proteinkonzentration der Antikörper-Farbstoff-Konjugate ebenfalls der Markierungsgrad der Antikörper am Spektralphotometer Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bestimmt. Aus der optischen Dichte  $A(\lambda)$  bei der Wellenlänge  $\lambda$  wurde die Proteinkonzentration  $c_{prot}$  und die mittlere Zahl  $\eta$  der Farbstoffmoleküle pro Antikörper nach folgenden Formeln berechnet (Quelle: Molecular Probes):

#### Alexa 488-Konjugate:

$$c_{prot} = \frac{A(280 \text{ nm}) - 0,11 \cdot A(494 \text{ nm})}{203000} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

$$\eta = \frac{A(494 \text{ nm})}{71000 \cdot c_{prot}}$$

#### FITC-Konjugate:

$$c_{prot} = \frac{A(280 \text{ nm})}{0,37} \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$\eta = \frac{3,1 \cdot A(495 \text{ nm})}{A(280 \text{ nm}) - 0,31 \cdot A(495 \text{ nm})}$$

### 2.3.5 Herstellung von Zelllysate

Zur Herstellung von Zelllysate wurden HEp-2-Zellen in 2 ml-Reaktionsgefäßen 10 min bei 300 g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in Citrat-Lysepuffer aufgenommen ( $2 \cdot 10^7$  Zellen in 1 ml Citratpuffer). Nach Inkubation für 20 min auf Eis wurde der Zellaufschluss bei 1600 g 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals auf gleiche Weise zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und für die Versuche verwendet oder bei -70 °C eingefroren.

Citrat-Lysepuffer, pH 7,5	1 % (v/v) NP-40 100 mM Na-Citrat vor Verwendung Zugabe von DTT (Endkonzentration: 1mM) und Proteaseinhibitor (Complete Mini, EDTA free, Roche, Mannheim, Dtl.)
---------------------------	---

### 2.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinproben in SDS-Puffer 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf ein 3 %iges Sammelgel aufgetragen. Für die Auftrennung wurden 5 - 10 %ige Trenngele verwendet (Acrylamid/Bisacrylamid (1:29)-Lösung Sigma, München, Dtl.) Die Auftrennung erfolgte in einem vertikalen System von BioRad (München, Dtl.) bei Stromstärken von 20-25 mA. Als Größenstandart diente der „Precision Plus Protein Standard All Blue“ von BioRad (Hercules, CA, USA).

SDS-Puffer, pH 6,8	25 mM Tris/HCl 50 mM DTT 10 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) BPB
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

### 2.3.7 Westernblot und Immunfärbung der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel, Dtl.) erfolgte über Nacht in einer mit Transferpuffer gefüllten Mini Protean II-Blotapparatur von BioRad (München, Dtl.) bei einer Stromstärke von 50 mA. Nach Kontrolle des Transfers mittels Ponceau-Färbung für 3 min wurde die Membran für die Immundetektion der Proteine zunächst 45 min in 4 % Fischgelatine/TBS-T geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 0,5 % Fischgelatine/TBS-T für 45 min und daraufhin für ebenfalls 45 min die Inkubation mit dem Alkalische Phosphatase(AP)-gekoppelten Sekundärantikörper. Als AP-Substrat wurde in AP-Puffer verdünntes NBT/BCIP von Promega (Madison, WI, USA) verwendet. Die Reaktion wurde nach Färbung der Proteinbanden mit Wasser gestoppt. Alternativ zur Fischgelatine wurde für den Nachweis mit dem anti-NOR-Serum Milchpulver verwendet.

Transferpuffer, pH 8,3	20 mM Tris 15 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
AP-Puffer, pH 9,5	1 M Tris/HCl 1 M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Ponceau-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 0,2 % (v/v) Essigsäure

## 2.4 Färbemethoden für Zellen und Proteine

### 2.4.1 Markierung von Zellen für die Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrischen Messungen wurden am Gerät FACS Calibur von BD Biosciences (Bedford, MA, USA) durchgeführt. Zellen nach BCECF/PI-Lebend-/Tot-Färbung (Abschnitt 2.3.6) sowie nach den Versuchen zur Zellmembran-Permeabilisierung (Abschnitt 3.3) wurden direkt nach PI-Zugabe gemessen. Für die Färbung mit Primär- und Sekundärantikörpern, wurden 0,5 bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen in FACS-Reaktionsgefäßen (BD Biosciences, Heidelberg, Dtl.) aufgenommen und für 30 min bei 4 °C mit den Primärantikörpern bzw. Antikörper-Goldkonjugaten inkubiert. Dabei wurden die Antikörper in den Konzentrationen 1-5 µg/ml eingesetzt und in 1 % FCS/PBS verdünnt. Um die Hintergrundsignale durch die Bindung des Sekundärantikörpers an den konstanten Teil der Antikörper zu überprüfen, wurde ebenfalls mit einem IgG-Fragment in der Konzentration 1 µg/ml inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml PBS und Zentrifugation bei 300 g für 5 min bei 4 °C wurden die Proben 30 min mit den Sekundärantikörpern (4 µg/ml) bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl PBS gelöst und die Proben mit dem FACS Calibur gemessen.

### 2.4.2 Pulsmarkierung der RNA-Synthese

Für die Pulsmarkierung neusynthetisierter RNA wurde den Zellen 5-Fluoruridin (FU) der Firma Sigma in einer Endkonzentration von 2 mM in das Medium zugegeben. FU wird nach intrazellulärer Phosphorylierung als Basenalogon anstelle von Uridin in die RNA eingebaut (Boisvert *et al.*, 2000). Die Ansätze wurden 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend das Medium durch 8 °C kaltes PBS ersetzt. Der Nachweis des FU erfolgte mit Hilfe eines kreuzreaktiven anti-BrdU-Antikörpers von Abcam (Cambridge, GB) in der Immunfluoreszenzfärbung (Abschnitt 2.4.3).

### 2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Untersuchung der Proteinlokalisierung wurde zunächst das Medium aus den Kulturschälchen abgenommen und die Zellen in 2 % Formalin/PBS 10 min fixiert und anschließend für 10 min in 0,25 % Triton-X-100/PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS (pH 7,4) erfolgte für 30 min die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser wurde in 10 % BSA/TBS verdünnt. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Sekundärantikörpern für 30 min. Als Sekundärantikörper wurden mit Alexa Farbstoffen markierte Antikörper von Molecular Probes verwendet und in der Konzentration 7 µg/ml in 10 % BSA/TBS eingesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper ist in Abschnitt 2.2.1 gegeben. Wurden die Ansätze zusätzlich mit direktmarkierten Antikörpern gefärbt, wurde zuvor für 30 min mit dem entsprechenden Normalserum (1 % in TBS) inkubiert, um Bindungen an die bereits eingesetzten Sekundärantikörper zu vermeiden. Abschließend wurden die Färbungen mit 2 % Formalin/PBS nachfixiert.

Bei den Fluoreszenzfärbungen zur Lokalisation der Antikörper-Goldkonjugate handelt es sich um Vitalfärbungen. Hier wurden die Suspensionszellen wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben mit den Goldkonjugaten inkubiert und anschließend die entsprechenden Sekundärantikörper in der Konzentration von 10 µg/ml hinzugegeben. Um kein *Capping* der Membranproteine hervorzurufen, wurde maximal 10 min bei 37 °C inkubiert. 10 µl der Zellen wurden anschließend direkt auf einen Objektträger pipetiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte direkt im Anschluss.

### Dokumentation der Fluoreszenzfärbungen

Aufnahmen der Fluoreszenzfärbungen erfolgten mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop DM IRBE/TCS SP der Firma Leica Microsystems (Heidelberg, Germany). Das System enthält einen Argon-Laser der Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert und zwei Helium-Neon-Laser die bei 543 nm und 633 nm emittieren. Durch den sequentiellen Scan-Vorgang werden die einzelnen Farbkanäle nacheinander angeregt und aufgenommen. Die Proben wurden mit einem 63x-Öl-Immersion-Objektiv (numerische Apertur 1,32) mit Hilfe der Software Leica TCS NT aufgenommen. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop 6.0 vorgenommen.

#### 2.4.4 Nachweis der Antikörper-Goldkonjugate mittels Peroxidase(PO)-Färbung

Die Zytozentrifugenpräparate der mit den Antikörper-Goldkonjugaten inkubierten Zellen wurden zunächst für jeweils 10 min in Aceton und Chloroform fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger für 30 min mit den PO-markierten Sekundärantikörpern (Dianova, Hamburg, Dtl.) in der Verdünnung 1:50 in 10 % FCS/TBS in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS (pH 7,4) wurden die Ansätze 10 min mit dem PO-Substrat Diaminobenzidin (DAB; Sigma) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte für 2 min die Inkubation mit dem Kernfarbstoff Hämalaun und wiederum ein Waschschrift in TBS. Die Proben wurden mit Kaisers Glyceringelatine und einem Deckglas überschichtet. Die Dokumentation erfolgte am Lichtmikroskop Olympus Vanox AH-2 mit der Polaroid Digitalkamera PDMC-3. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop 6.0 vorgenommen.

Hämalaun (nach Mayer, 1891)

5 g Hämatoxylin  
1 g Natriumjodat ( $\text{NaIO}_3$ )  
250 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat  
( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ )

in 1000 ml Aqua tridest lösen

danach hinzufügen:           250 g Chloralhydrat  
                                      5 g Citronensäure-Monohydrat

auf 5 l auffüllen

über Nacht im Dunkeln rühren

filtrieren und vor Gebrauch 6 bis 8 Wochen bei RT lagern

#### 2.4.5 Silberfärbung zum Nachweis der Lokalisation der Goldnanopartikel

Mit dem Silberverstärkungs-Kit von BBIInternational (Cardiff, GB) können Goldnanopartikel für das Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. In Anwesenheit von Gold werden die Silbernitrationen der Lösung zu freiem Silber reduziert und setzen sich an der Goldoberfläche ab. So kommt es je nach Inkubationsdauer zu einer 10 - 100-fachen Vergrößerung der Partikel.

Für den Nachweis der Goldpartikel auf Zytozentrifugen-Präparaten der mit den Antikörper-Goldkonjugaten inkubierten Zellen wurden diese zunächst für 10 min in 2 % Formalin/PBS fixiert. Nach dem Waschen mit TBS-T und mit TBS (pH 7,4) wurden die Objektträger für 5-7 min mit dem Silberverstärkungsreagenz inkubiert und die Reaktion durch einen erneuten Waschschrift in TBS-T abgestoppt. Nach der Kernfärbung mit Hämalaun (s. Abschnitt 2.4.4) für 3 min wurden die Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine und einem Deckglas überschichtet. Die Dokumentation erfolgte am Lichtmikroskop Olympus Vanox AH-2 mit der

Polaroid-Digitalkamera PDMC-3. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop 6.0 vorgenommen.

Da sich mit Hilfe der Silberfärbung die Goldpartikel der Antikörper-Goldkonjugate, nicht aber die Antikörper nachweisen lassen, wurden Letztere durch Immunfluoreszenzfärbungen (Abschnitt 2.4.3) nachgewiesen. Da das Silberverstärkungsreagenz jedoch zum raschen Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe führt, wurde die Silberfärbung erst im Anschluss an die Dokumentation der Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Aufgrund der Fluoreszenzfärbung waren die Zellen bereits fixiert und permeabilisiert und das Silberverstärkungsreagenz konnte direkt zu den Zellen gegeben werden. Die Umsetzung des Silberverstärkungsreagenz wurde am konfokalen Laserscan-Mikroskop im Durchlicht beobachtet und nach 5-10 min dokumentiert. Details zur Dokumentation sind in Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

#### **2.4.6 Vitalitätsfärbung mittels PI und BCECF**

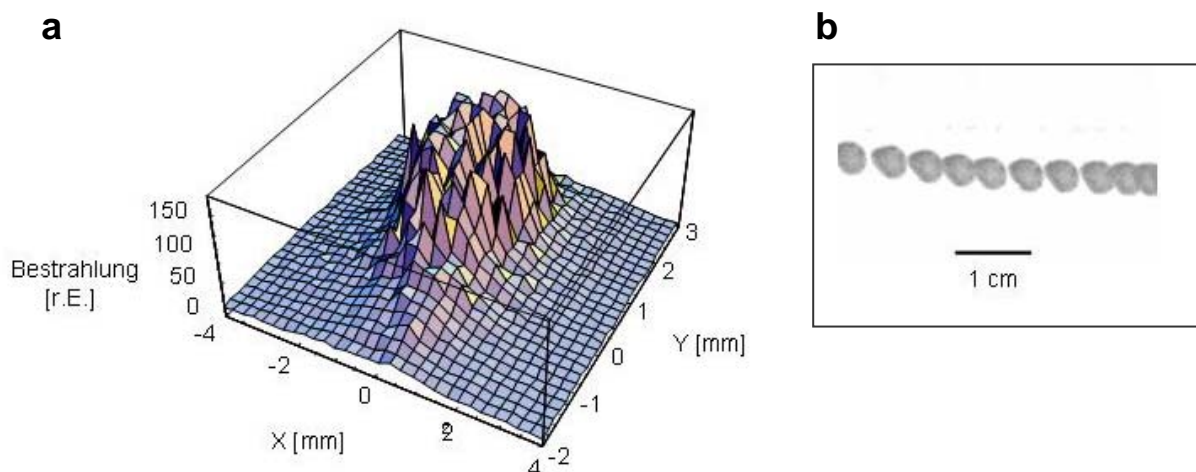
Um die Vitalität der Zellen messen zu können, wurde eine Lebend-/Tot-Färbung mit dem Kernfarbstoff Propidiumjodid (PI) und dem Esterasesubstrat BCECF durchgeführt. Dabei dient PI zur Untersuchung der Membranintegrität und BCECF zur Überprüfung der physiologischen Aktivität der Zellen (Barnett und Evans, 1986; Kolber *et al.*, 1988). PI diffundiert nicht durch intakte Zellmembranen, doch schon bei kleinen Störungen der Membranintegrität gelangt es in die Zelle und bindet hier an Nukleinsäuren. Durch diese Bindung steigert sich die Fluoreszenzintensität des PI, dessen Emissionsmaximum bei 617 nm liegt. BCECF diffundiert als ungeladenes Molekül durch die intakte Membran der Zellen und wird in lebenden Zellen von Esterasen hydrolysiert. Hierdurch kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Als nun geladenes Molekül kann es nicht mehr durch die Membran diffundieren und verbleibt in der Zelle. Die Fluoreszenzemission des BCECF ist pH-abhängig. Das Maximum befindet sich bei physiologischem pH-Wert bei ungefähr 530 nm. Für die Lebend-/Tot-Färbung wurden Suspensionszellen in 500µl PBS in FACS-Reaktionsgefäßen von BD Biosciences (Bedford, MA, USA) aufgenommen und mit 0,1 µg/ml Endkonzentration BCECF, AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein, Acetoxymethylester, Molecular Probes) versetzt. Nach 15 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde Propidiumjodid in der Endkonzentration 1 µg/ml hinzugegeben und die Proben im Durchflusszytometer gemessen.

## 2.5 Methoden der Nanopartikel- und CALI- Zellmanipulation

### 2.5.1 Lasersysteme

#### Nanosekundenpuls Nd:YAG-Laser

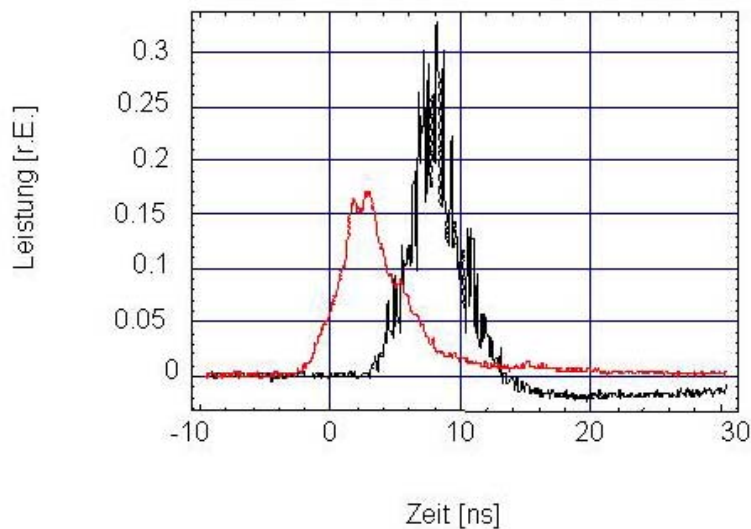
Die Bestrahlungen der Antikörper-Goldkonjugate wurden mit einem gütegeschalteten Nd:YAG-Laser mit 6 ns Pulslänge durchgeführt (Surelite I-20, Continuum, Santa Clara, CA, USA). Nach Frequenzverdopplung wurde die 532-nm-Strahlung mit zwei dichroitischen Spiegeln von der Grundwellenlänge getrennt. Die Energie der Laserpulse konnte mit Hilfe eines drehbaren  $\lambda/2$ -Plättchens und eines Polarisators stufenlos eingestellt werden. In der Bestrahlungsebene standen Pulsenergien von einigen hundert Mikrojoule bis ca. 110 mJ pro Puls zur Verfügung. Die Energiebestimmung der Pulse erfolgte über einen pyroelektrischen Detektor (PE25-SH, Ophir Optronics, Jerusalem, Israel), der oberhalb der Probe in ca. 50 cm Abstand positioniert war, und der Software USBI 1.11 (Ophir Optronics). Mittels einer Zerstreuungslinse mit einer Brennweite von 40 mm wurde die Messfläche vollständig ausgeleuchtet. Die Proben wurden mit einem nicht fokussierten oder aufgeweiteten Laserstrahl von ca. 3 mm bestrahlt. Das Strahlprofil war leicht elliptisch (2,5 mm x 3 mm) und variierte etwas zwischen den einzelnen Pulsen. Zur Bestimmung der Bestrahlung wurden sowohl Brandflecken auf Photopapier, als auch Aufnahmen des Strahlprofils mit einer Mattscheibe und einer CCD-Kamera verwendet (Abb. 2.2). Hieraus wurde zur Berechnung der Bestrahlung eine effektive Strahlfläche von  $0,059 \text{ cm}^2$  abgeschätzt, durch die die gemessenen Pulsenergien geteilt wurden.



**Abb. 2.2** Strahlprofil des Lasers gemessen in der Bestrahlungsebene des Mikroskops. (a) Bestrahlung einer Mattscheibe und Abbildung auf eine Kamera. (b) Brandfleck auf Photopapier.

Die zeitliche Länge der einzelnen Pulse betrug 6 ns. Allerdings war der Puls durch die Interferenz der einzelnen longitudinalen Lasermoden sehr stark moduliert (Abb. 2.3). Die

Leistungsspitzen, die zufällig verteilt auftreten, führen bei 15-nm-Goldpartikeln zur Temperaturspitzen von 50 % verglichen mit einer glatten Pulsform.



**Abb. 2.3** Messung der Pulsform des Laser bei 532 nm mit zwei verschiedenen Zeitauflösungen. Die starken Fluktuation der Spitzenleistung wurden mit einem Detektor mit 3 GHz Bandbreite aufgelöst (schwarze Kurve). Die rote Kurve der gemittelten Pulsform ergibt sich, wenn der Laserpuls mit einer Bandbreite von unter einem GHz vermessen wird.

## Argonlaser

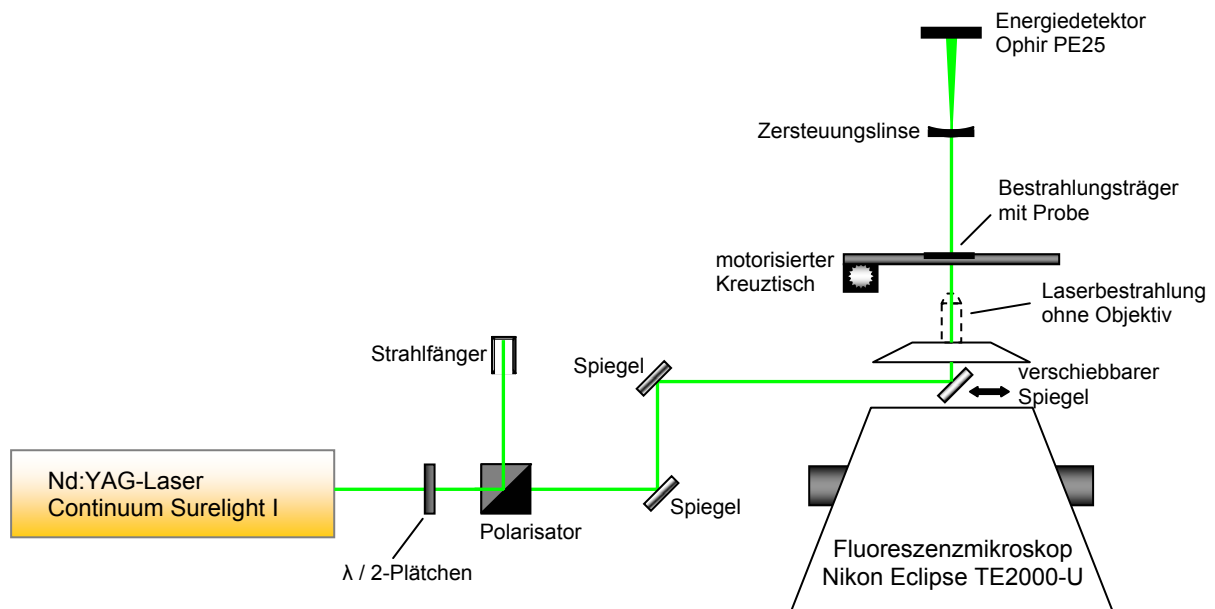
Für die Bestrahlungen der CALI-Experimente wurde neben einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Argonlaser 270 Exciter der Firma Spectra Physics (Mountain View, CA, USA) bei 488 nm verwendet. Die Strahlung wurde durch eine 500- $\mu\text{m}$ -Quarzfaser zur Probe geleitet. Dort wurde das Faserende stark vergrößert auf die Küvette mit dem Zelllysate oder den Antikörperkonjugaten abgebildet. Durch die Abbildung des Faserendes in die Küvette kann eine kreisförmige homogene Bestrahlungsstärke erreicht werden. Die Bestrahlungsstärke wurde in der Bestrahlungsebene mit einer definierten Messblende und einem bolometrischen Leistungsmessgerät (Mentor MA10, Scientech Inc., Boulder, Co, USA) gemessen. Die Bestrahlungszeiten wurden mit einer Stoppuhr bestimmt.

## Fluoreszenzmikroskop für die CALI-Experimente

Bestandteil des Bestrahlungsaufbaus für die Bestrahlungen der Goldkonjugate wie auch für die CALI-Experimente war das inverse Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-U (Nikon, Tokio, Japan) mit einem in x-, y-Achse motorisierten Kreuztisch (Scann IM 120x100, Märzhäuser, Wetzlar, Dtl.). Als Lichtquelle für die Fluoreszenzanregung diente eine

Quecksilberdampfampe. Der Filterblock (Typ B-2E/C), der für die Anregung der FITC- wie auch der Alexa 488-Konjugate eingesetzt wurde, ließ Licht der Wellenlänge 465 bis 495 nm passieren. Als Kompromiss zwischen einem möglichst weiten Strahl und somit einem möglichst großem bestrahlten Areal einerseits und hoher Energiedichte andererseits wurden die Bestrahlungen der Fluoreszenzfarbstoffkonjugate mit dem 20-fach Objektiv (Plan Fluor, numerische Apertur 0,45) durchgeführt. Hiermit betrug die Bestrahlungsstärke ca.  $570 \text{ mW/cm}^2$ .

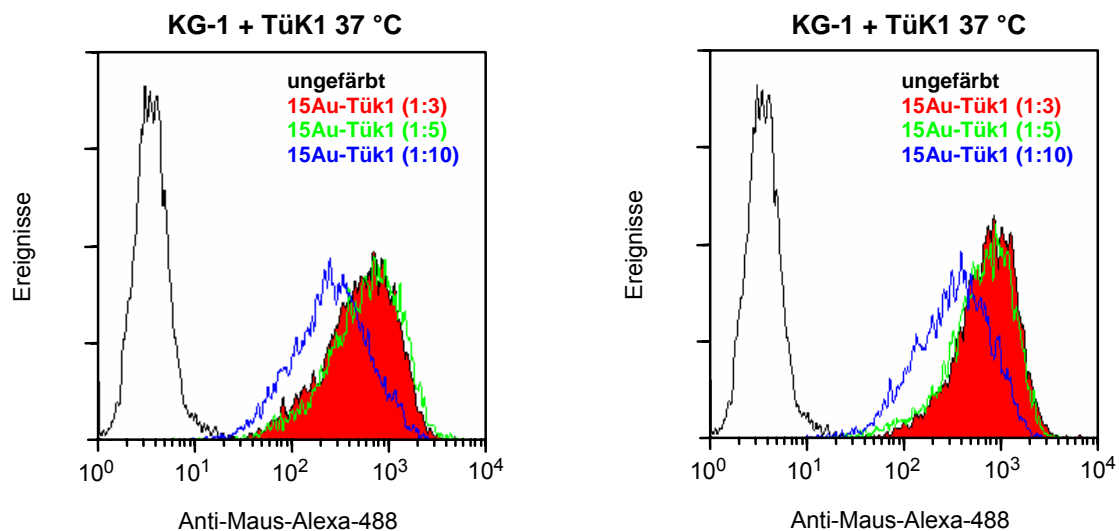
Der Kreuztisch mit Universaleinlegeboden erlaubte die Verwendung von Glas-Objektträgern aller gängigen Größen wie auch der runden 35-mm-Mikroinjektions-Schälchen. Über die Software WIN-Commander 4.2 wurde der Tisch vom Computer mit einer Genauigkeit von  $3 \mu\text{m}$  angesteuert.



**Abb. 2.4:** Schematische Übersicht des Bestrahlungsaufbaus, der für die Laserbestrahlung der Goldnanopartikel und für die Fluoreszenzbestrahlung der Fluoreszenz-Antikörperkonjugate entwickelt wurde.

### 2.5.2 Inkubation der Zellen mit Goldnanopartikeln

Die Inkubation der Suspensionszellen mit den Antikörper-Goldkonjugaten vor der Laserbestrahlung erfolgte nach Zentrifugation der Zellen (5 min, 300 g, RT). Für jeden Ansatz wurden die Zellen in 10  $\mu$ l PBS (pH 7,5) in der Konzentration  $10^5$  Zellen/ $\mu$ l aufgenommen. Bei dieser Konzentration waren die Vertiefungen des Bestrahlungsträgers (s. Abschnitt 2.5.4) mit höchstens 1-2 Zellschichten bedeckt. Je 10  $\mu$ l Zellsuspension wurden nun mit 2  $\mu$ l der Antikörper-Goldkonjugate versetzt und für 20 min inkubiert. Inkubationen bei 4 °C und 37 °C zeigten in Bezug auf die Bindung der Konjugate keinen Unterschied (Abb. 2.4). Somit wurden die weiteren Inkubationen bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde auf 20 min begrenzt, um eine etwaige Aufnahme der Konjugate durch die Zellen zu vermeiden. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Zellen für die Bestrahlungsexperimente eingesetzt.



**Abb. 2.5:** Bindung von 15Au-Tük1-Konjugaten an KG-1-Zellen nach Inkubation bei 37 °C und 4 °C.

### 2.5.3 Nanosekundenpuls-Laserbestrahlung von Zellen

Die Laserbestrahlung von Suspensionszellen erfolgte in einem hierfür angefertigten Glas-Bestrahlungsträger (Hellma, Müllheim, Dtl.). Die 18 Probengefäße des Bestrahlungsträgers wurden zunächst mit PBS benetzt um eine gleichmäßige Verteilung der Proben ohne Blaseneinschlüsse zu erreichen. Anschließend wurden pro Gefäß 4  $\mu$ l Zellsuspension pipettiert (Zellkonzentration:  $10^5$  Zellen/ $\mu$ l) und der Träger mit einem Glasdeckel abgedeckt. Der Bestrahlungsträger besaß die Ausmaße eines Mikroskopie-Objekträgers und konnte in den Einsatz des motorisierten Kreuztisches der Bestrahlungseinheit eingelegt werden. Bei eingeschaltetem Laser mit niedriger Energie (100-400  $\mu$ J/Puls) wurde der Tisch manuell so eingestellt, dass der Laserstrahl ein leeres Probengefäß bestrahlte. Die Ansteuerung der weiteren Probengefäße erfolgte über den Computer mit der Software WIN-Commander 4.2.

#### 2.5.4 Durchführung der CALI-Experimente

Für die CALI-Bestrahlung von Zelllysate wurde das Lysat mit den Antikörper-Farbstoffkonjugaten für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden je Probe 4 µl in den Glasbestrahlungsträger pipettiert und die Bestrahlung mit dem Argonlaser durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss wurden die Proben für die spätere Auswertung mittels SDS-PAGE und Westernblot in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Dabei wurde für eine Bahn in der SDS-PAGE 1 µl Probe in 8 µl SDS-Puffer sowie 0,5 µl DTT aufgenommen. Bis zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Für die CALI-Bestrahlung zur *in vivo* Proteininaktivierung wurden die Zellen nach Mikroinjektion der Antikörper-Farbstoffkonjugate eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um die Lokalisation der Konjugate an ihren Zielproteinen zu gewährleisten. Die Bestrahlung erfolgte an dem in Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Fluoreszenzmikroskop mit dem 20-fach Objektiv. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 20 min erneut im Brutschrank inkubiert und die Markierung neu synthetisierter RNA durchgeführt (Abschnitt 2.4.2). Im Anschluss erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung zur Proteinlokalisierung (Abschnitt 2.4.3).

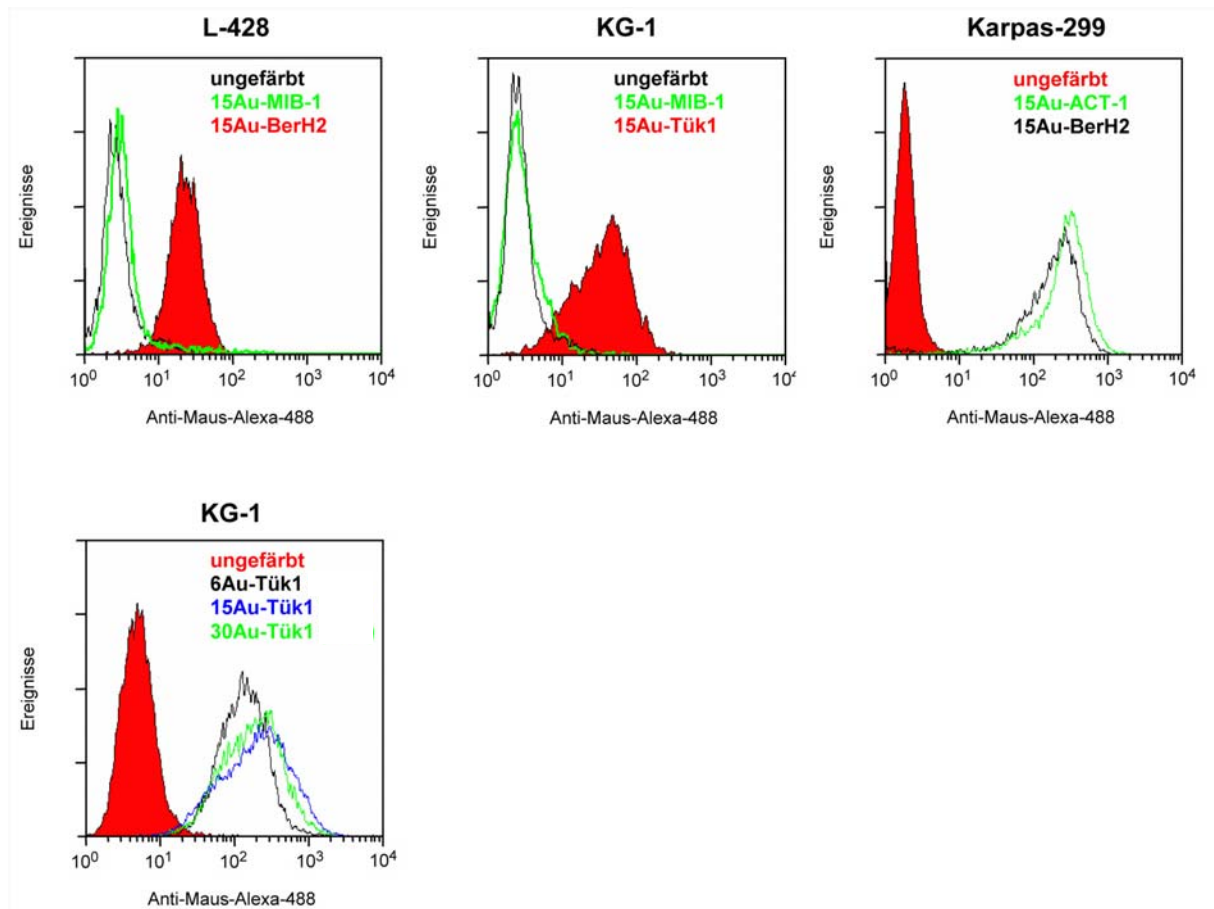
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Selektive Zellschädigung durch Laserinaktivierung

#### 3.1.1 Selektive Zellschädigung mit Hilfe von Nanopartikel-assistierter Laserinaktivierung (NALI)

Um die Möglichkeit selektiver Schädigung von Zellen durch Antikörper-Goldkonjugate zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien ausgewählt, die sich durch charakteristische Oberflächenmarker auszeichnen (s. Abschnitt 2.1.1). Für die verwendeten Konjugate konnte eine spezifische Bindung an die jeweiligen Zielzellen gezeigt werden (Abb. 3.1). Durchflusszytometrische Messungen zeigten den Nachweis der Bindung der gegen CD30 gerichteten 15Au-BerH2-Konjugate an die Zelllinie L-428 sowie die Bindung der gegen CD13 gerichteten 15Au-Tük1-Konjugate an die Zelllinie KG-1. Das gegen das Kernprotein pKi-67 gerichtete Konjugat 15Au-MIB-1 zeigte keine spezifische Bindung an den Zellmembranen. Die Zelllinie Karpas-299 ist positiv für CD25 und CD30. Für diese Zelllinie wurden sowohl 15Au-ACT1- und 15Au-BerH2- Konjugate verwendet. Antikörper-Goldkonjugate wurden aus Goldpartikeln mit Durchmessern von 6 nm, 15 nm und 30 nm hergestellt. Die Konjugate aller Größen zeigten ein ähnliches Bindungsverhalten an ihren Zielzellen, wie in Abbildung 3.1 beispielhaft für 15Au-Tük1-Konjugate gezeigt.

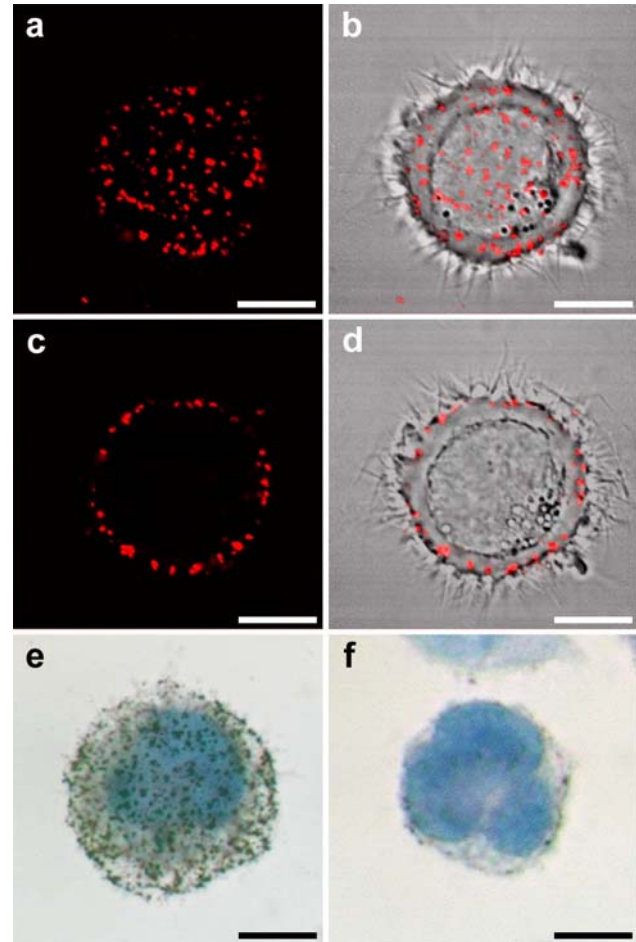
Aufgrund der geringen Größe der Konjugate ist eine direkte lichtmikroskopische Überprüfung ihrer Lokalisation an Zellen nicht möglich. Aus diesem Grunde wurden die Antikörper der Konjugate mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern, sowie die Goldpartikel der Konjugate mit einem Silberverstärkungsreagenz nachgewiesen. Die membrangebundenen Konjugate weisen ein granuläres Muster auf der Zellmembran auf und sind über die gesamte Membran verteilt, Abbildung 3.2 zeigt dies am Beispiel von L-428-Zellen, die zuvor mit 15Au-BerH2-Konjugaten inkubiert wurden.



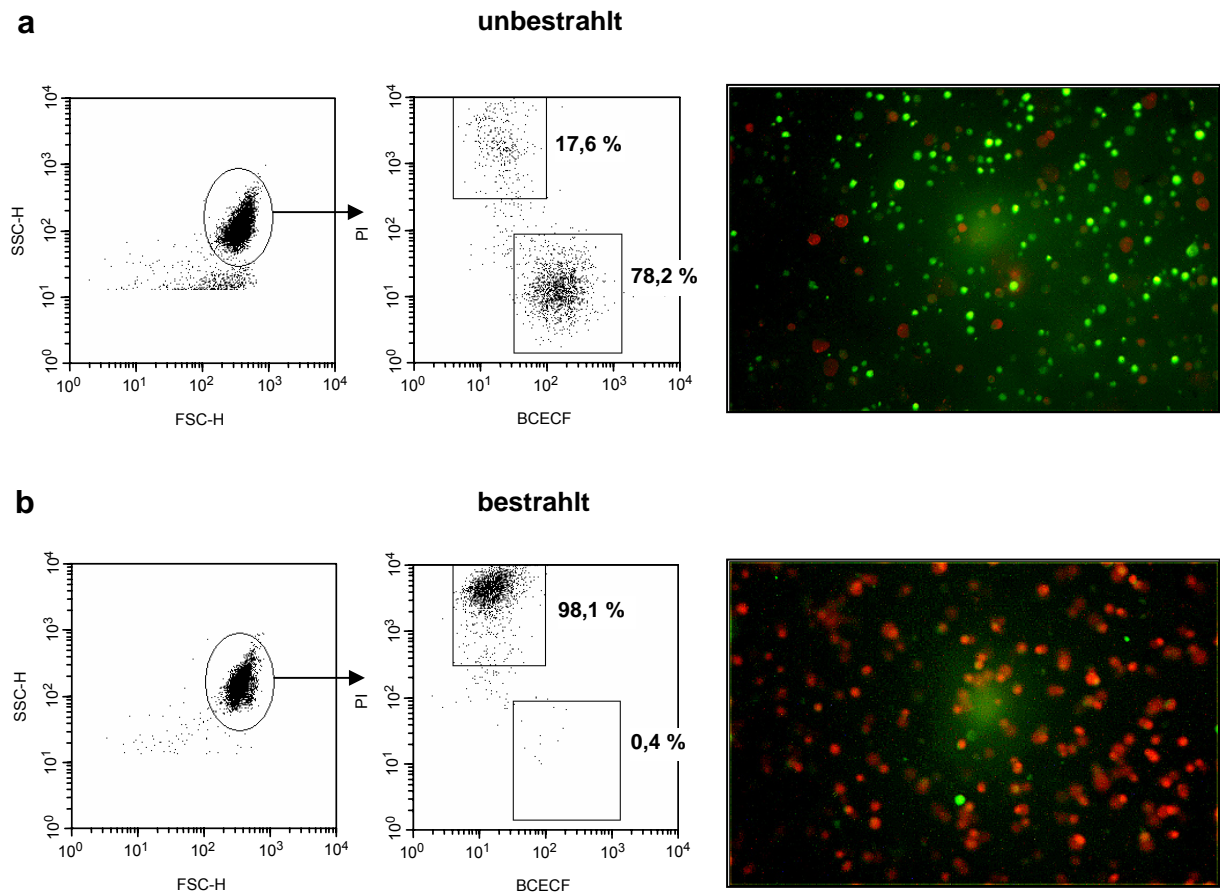
**Abb. 3.1** Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindungsspezifität der unterschiedlichen Antikörper-Goldkonjugate. Angegeben sind die jeweiligen Zelllinien, sowie die verwendeten Konjugate.

**Abb. 3.2** Detektion der Antikörper-Goldkonjugate an ihren Zielzellen. **a-d**: 15Au-BerH2 wurde auf der Membran von L-428-Zellen mit Hilfe des anti-Maus-Alexa 546-Sekundärantikörpers nachgewiesen. Es handelt sich um Laserscan-Aufnahmen lebender Zellen. Dabei sind **a-d** Aufnahmen derselben Zelle, wobei die Scanebene in **a** durch die Zelloberfläche und in **c** durch die Zellmitte verläuft. **b** und **d**: Überlagerung der Fluoreszenz mit DIK-Aufnahmen.

**e-f**: Nachweis der Antikörper-Goldkonjugate mit Silberverstärkungsreagenz auf Zytocentrifugen-Präparaten. L-428-Zellen wurden in **e** mit 15Au-BerH2 inkubiert und in **f** mit 15Au-MIB-1 als Negativkontrolle. Balken 10 µm.

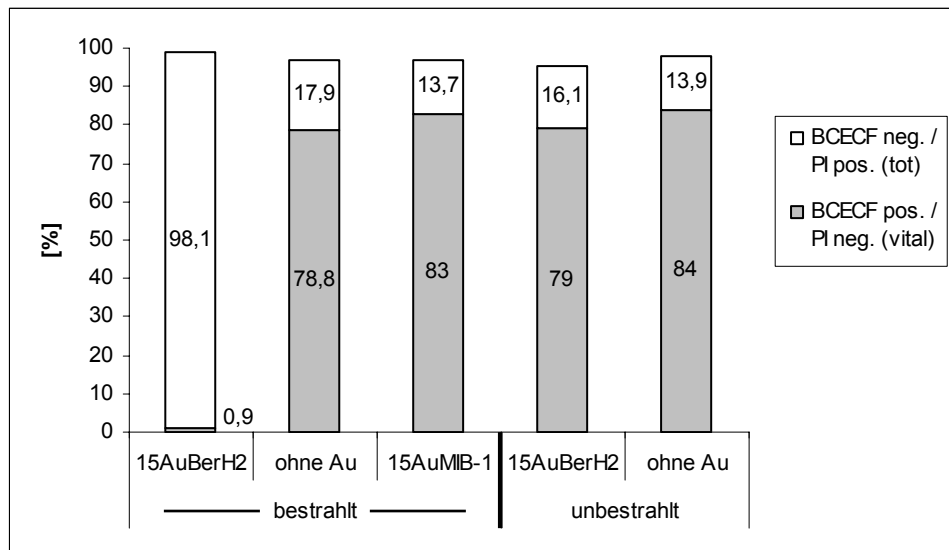


Versuche zur Schädigung von Zellen mit Hilfe von Goldnanopartikel-Konjugaten wurden zunächst mit der Lymphomzelllinie L-428 durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen mit 15Au-BerH2-Konjugaten wurden die Zellen mit einem ns-Laserpuls mit  $1,7 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Um die Vitalität der Zellen bestimmen zu können, wurde eine Lebend-/Tot-Färbung mit dem Kernfarbstoff Propidiumjodid (PI) und dem Esterasesubstrat BCECF durchgeführt. PI-negative, aber BCECF-positive Zellen wurden als lebend und PI-positive, aber BCECF-negative Zellen als tot gewertet (s. Abschnitt 2.4.6). In allen durchflusszytometrischen Auswertungen wurden zunächst die Signale von Zelltrümmern abgestorbener Zellen über Vorwärts- und Seitwärtsstreuung ausgeschlossen. Die Auftragung von PI gegen BCECF in Abbildung 3.3 lässt erkennen, dass in der unbestrahlten Kontrolle der Anteil der eindeutig toten Zellen bereits 17,6 % und der Anteil vitaler Zellen 78,2 % betrug. Die Zellkultur der Lymphomzelllinie L-428 wies im Allgemeinen einen Anteil toter Zellen zwischen 10 % und 30 % auf. Nach Laserbestrahlung betrug der Anteil eindeutig toter Zellen mehr als 98 % gegenüber nur noch 0,4 % an vitalen Zellen (Abb. 3.3 b).



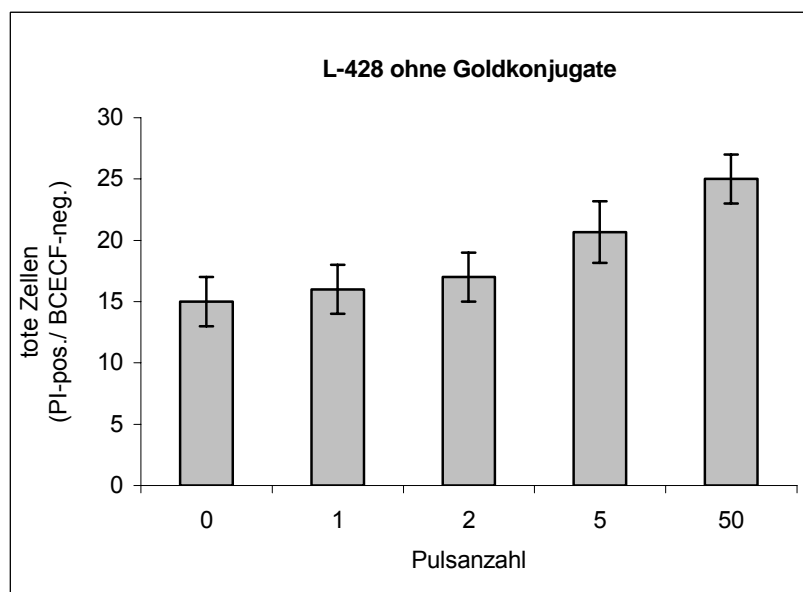
**Abb. 3.3** PI/BCECF-Färbung von L-428-Zellen vor (a) und nach (b) Laserbestrahlung. Die Zellen wurden zuvor mit <sup>15</sup>Au-BerH2 inkubiert und in b mit einem ns-Laserpuls der Energie 1,7 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Fluoreszenzaufnahmen auf der rechten Seite der Abbildung zeigen die mit BCECF (grün) und PI (rot) gefärbten Zellen.

Die Spezifität der Behandlung wurde in verschiedenen Ansätzen überprüft (Abb. 3.4). Die Bestrahlung der Zellen mit gleicher Laserenergie in Abwesenheit der Goldkonjugate zeigte keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Ebenso führt eine Bestrahlung nach Inkubation der Zellen mit nicht membranspezifischen Konjugaten wie <sup>15</sup>Au-MIB-1, das gegen das Kernprotein pKi-67 gerichtet ist, nicht zum Verlust an Zellvitalität. Auch die Inkubation der Zellen ohne anschließende Laserbestrahlung bleibt ohne Folgen auf die Zellvitalität.



**Abb. 3.4** Zellschädigung nach Inkubation mit Goldnanopartikeln und Laserbestrahlung. L-428-Zellen wurden mit den angegebenen Konjugaten inkubiert und mit Einzelpulsen von  $1,7 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt bzw. blieben unbestrahlt. Die Ansätze zeigen die Spezifität der Behandlung. Ausschließlich die Inkubation mit den zellmembranbindenden 15Au-BerH2-Konjugaten und anschließende Laserbestrahlung führte zu einer Schädigung von über 98 % der Zellen.

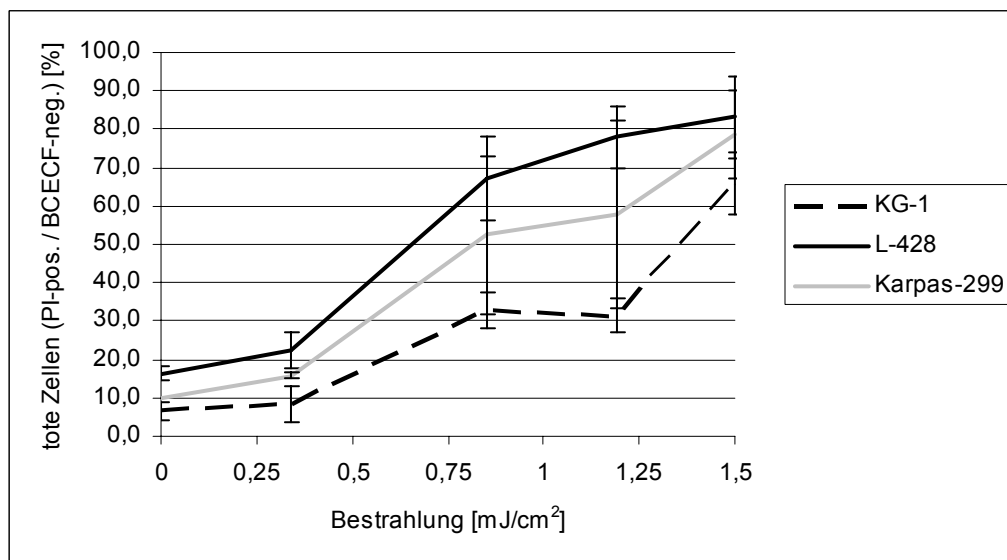
Laserbestrahlung von Zellen in Abwesenheit von Antikörper-Goldkonjugaten zeigte erst bei hohen Pulszahlen einen Einfluss auf die Vitalität (Abb. 3.5). Für die Versuche zur Zellschädigung mit Hilfe der Goldkonjugate wurden ein bis zwei Einzelpulse mit der Energie  $1,7 \text{ J/cm}^2$  verwendet. Bei dieser Energie liegt der Anstieg an toten Zellen noch im Bereich des Messfehlers. Erst bei sehr starker Bestrahlung von 50 Pulsen zeigte sich eine Zunahme an toten Zellen von ca. 15 % auf ca. 25 %.



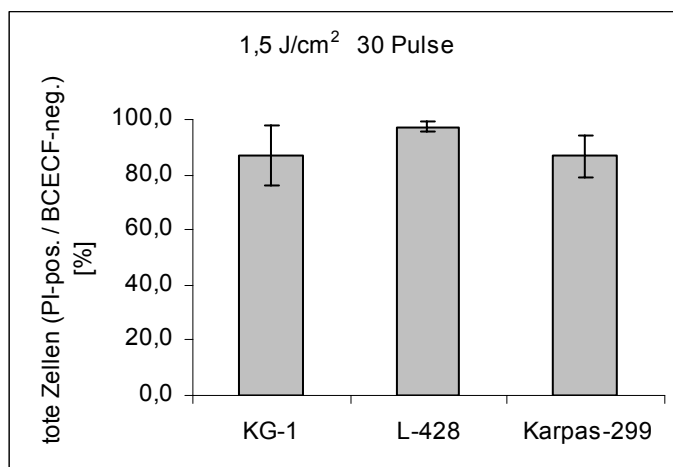
**Abb. 3.5** Einfluss der Laserbestrahlung auf die Zellvitalität in Abwesenheit von Goldkonjugaten. L-428-Zellen wurden mit unterschiedlicher Zahl von Pulsen der Energie  $1,7 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt und die Vitalität der Zellen mittels BCECF- und PI-Färbung bestimmt.

Die Bestrahlung unterschiedlicher Zelllinien nach Inkubation mit jeweils membranbindenden Goldkonjugaten zeigte die Anwendbarkeit der selektiven Zellschädigung auf verschiedene Zelllinien (Abb. 3.6). Nach Inkubation von L-428-Zellen mit 15Au-BerH2-Konjugaten, KG-1-Zellen mit 15Au-Tük1-Konjugaten und Karpas-299-Zellen mit 15Au-ACT-1-Konjugaten konnten die drei Zelllinien durch Laserbestrahlung zu einem hohen Anteil geschädigt werden. Bei gleicher Bestrahlungsenergie variierte der Anteil toter Zellen zwischen den Zelllinien. Ein Puls der Energie  $1,5 \text{ J/cm}^2$  führte im Mittel bei 83 % der L-428-Zellen zum Verlust der Vitalität, unter den Karpas-299-Zellen betrug der Anteil 79 % und bei den KG-1-Zellen 66 %.

a)

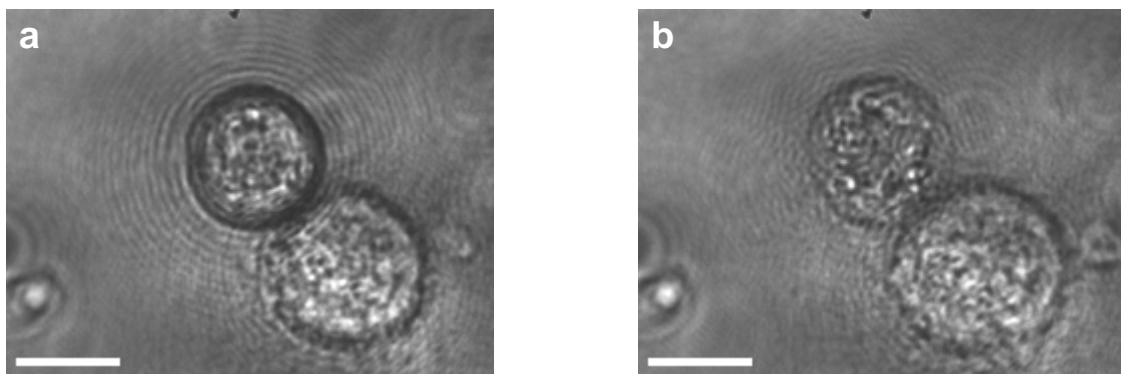


b)



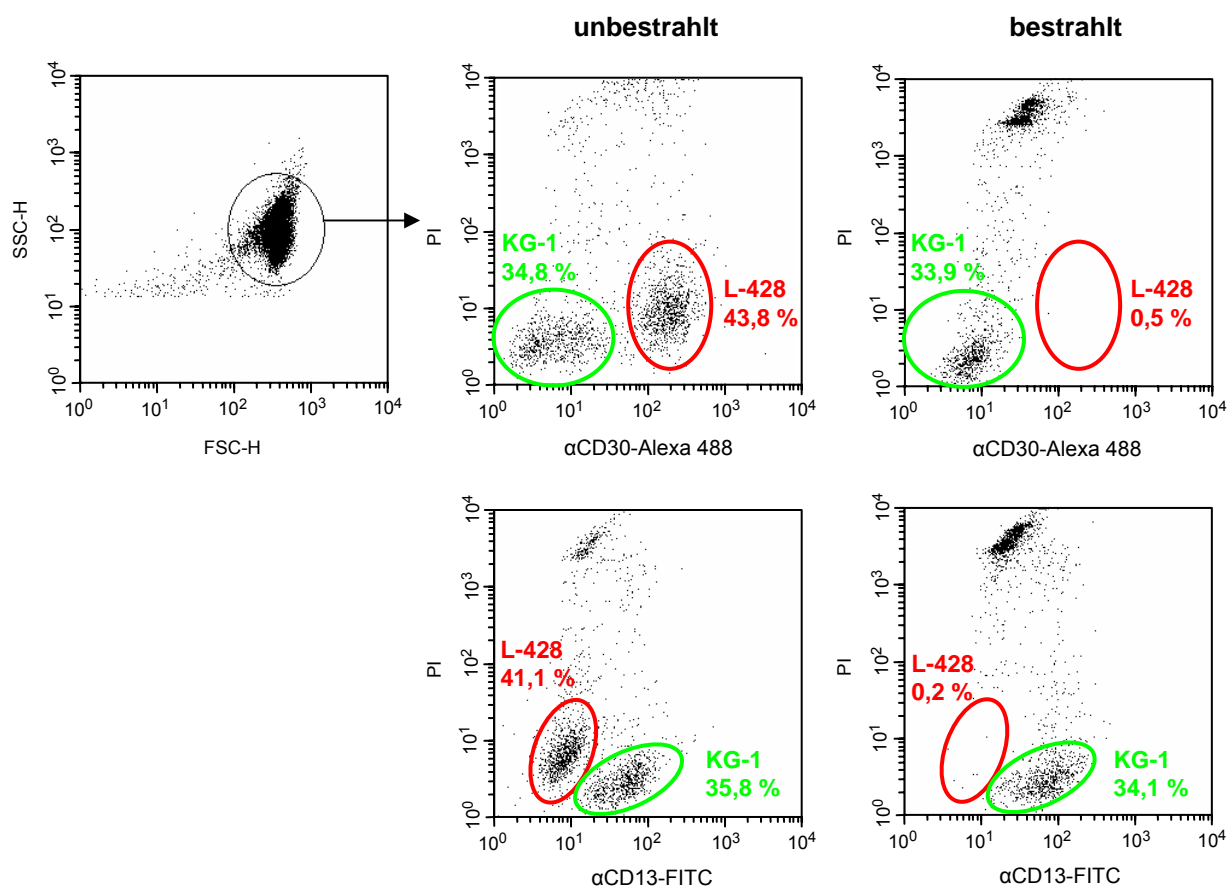
**Abb. 3.6** Abhängigkeit der Zellschädigung von der Bestrahlung. Vor der Bestrahlung wurden KG-1-Zellen mit 15Au-Tük1, L-428-Zellen mit 15Au-BerH2 und Karpas-299-Zellen mit 15Au-ACT-1-Konjugaten inkubiert. **a)** Bestrahlung mit Einzelpulsen bis  $1,5 \text{ J/cm}^2$ . **b)** Bestrahlung mit je 30 Pulsen der Energie  $1,5 \text{ J/cm}^2$ .

Nach Bestrahlung der Zellen mit je 30 Pulsen der Energie  $1,5 \text{ J/cm}^2$  betrug der Anteil eindeutig toter Zellen bei den L-428-Zellen im Mittel 97,4 %, bei den Karpas-299-Zellen 86,7 % und bei den KG-1-Zellen 86,9 %. Einzelne Versuche zeigten dabei bei den L-428-Zellen einen Anteil von über 98 % toter Zellen. Um eventuell auftretende Kavitationsblasen nachzuweisen, wurden kurzzeitfotografische Aufnahmen mit  $0,5 \mu\text{m}$  Auflösung am Institut für biomedizinische Optik durchgeführt. Es ließen sich direkt keine Blasen nachweisen (Abb. 3.7). Zu erkennen ist jedoch bei der oberen Zelle, die sich in der Fokusebene befindet, eine Veränderung der Zellmembran nach einer Bestrahlung mit 300 Pulsen.



**Abb. 3.7** Kurzzeitfotografische Aufnahmen von L-428-Zellen mit  $^{15}\text{Au}$ -BerH2 Konjugaten 35 ns nach Bestrahlung mit  $1,4 \text{ J/cm}^2$ . (a) nach wenigen Pulsen (b) nach 300 Pulsen. Balken  $10 \mu\text{m}$ .

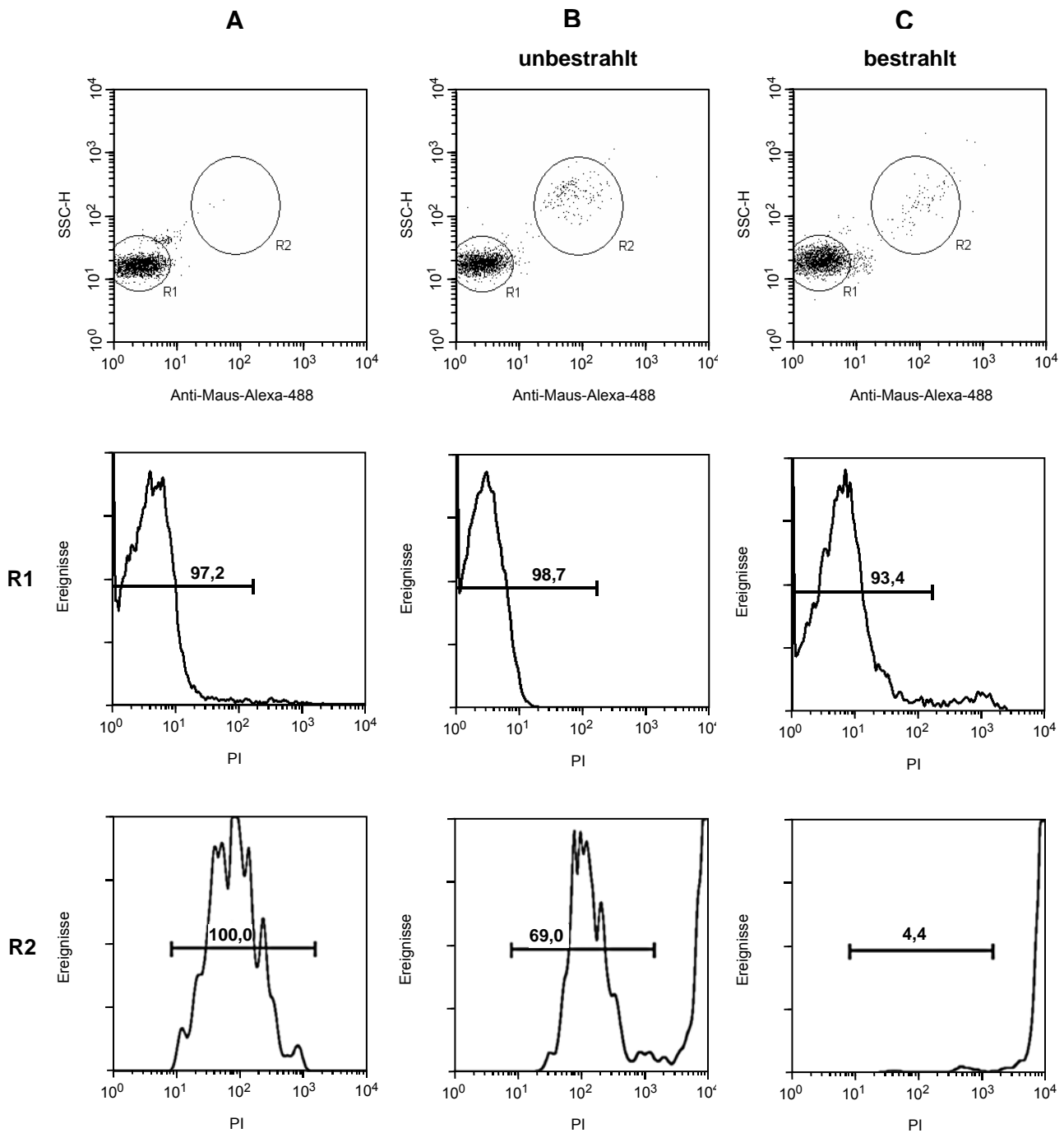
Um die Spezifität der Laserinaktivierung weiter zu untersuchen, wurde versucht in einer gemischten Zellpopulation selektiv eine Zelllinie mit Hilfe der Goldkonjugate zu schädigen. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien L-428 und KG-1 miteinander gemischt. L-428-Zellen tragen das Oberflächen-Antigen CD30, während KG-1 negativ für CD30 sind. Andererseits sind die KG-1-Zellen positiv für CD13, das wiederum auf der Membran der L-428-Zellen nicht vorhanden ist. Aufgrund dieser Differenzierbarkeit können die L-428-Zellen mit Hilfe der gegen CD30 gerichteten  $^{15}\text{Au}$ -BerH<sub>2</sub>-Goldkonjugate gezielt angegriffen werden.



**Abb. 3.8** Spezifität der Zellschädigung: Eine Mischkultur von CD30-positiven Zellen (L-428) und CD30-negativen Zellen (KG-1) wurde mit  $^{15}\text{Au}$ -BerH<sub>2</sub>-Konjugaten inkubiert und mit zwei Laserpulsen mit je  $1,5 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Zur Differenzierung zwischen den Zelllinien wurden diese mit direktmarkierten Antikörpern gegen CD30 und CD13 gefärbt. Geschädigte Zellen wurden mit Hilfe von Propidiumjodid (PI) nachgewiesen. Farblich markiert sind die Regionen der eindeutig als vital bestimmbaren Zellpopulationen. Die Prozentangaben geben den Anteil an der gesamten Mischkultur wieder. Nach der Bestrahlung liegt der Anteil der vitalen L-428-Zellen nur noch bei 0,5 % bzw. 0,2 % der Gesamtkultur, während die KG-1-Zellen kaum beeinflusst wurden. 20 Stunden nach der Bestrahlung zeigte sich letztere Zellpopulation in der PI-Färbung weiterhin negativ. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung betrug die Zelldichte ca.  $10^5$  Zellen/ $\mu\text{l}$ .

In den durchflusszytometrischen Messungen wurden die als eindeutig vital bestimmbaren Zellen ausgewertet, da unter den toten, PI-positiven, Zellen nicht eindeutig zwischen den Zelllinien differenziert werden konnte (Abb. 3.8). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die bestrahlten Zellen in ihrer Struktur derart zerstört wurden, dass sie sich nicht mehr in der mit Hilfe der Seitwärts- und Vorwärtsstreuung erfolgten Auswahl vollständiger Zellen befinden. Wie in der Färbung der Mischkultur mit dem Alexa 488-markierten BerH2-Antikörper gegen CD30 zu erkennen, bestand die Mischkultur vor Laserbestrahlung zu 43,8 % aus PI-negativen L-428 Zellen und zu 34,8 % aus PI-negativen KG-1-Zellen. Der Anteil der PI-negativen L-428 sank nach der Bestrahlung auf 0,5 % der Gesamtzellzahl in der Mischkultur. Dies entspricht 1,1 % der L-428-Zellen. Die L-428-Zellen konnten demnach also zu 98,9 % eliminiert werden. Färbungen gegen CD13 zeigten einen ähnlichen Rückgang der vitalen L-428-Zellen von 41,1 % auf 0,2 % der Gesamtzellzahl. In beiden Färbungen ist erkennbar, dass die KG-1-Zellen durch die Bestrahlung kaum beeinflusst wurden. Der Anteil eindeutig vitaler KG-1-Zellen sank von 34,8 % vor der Bestrahlung auf 33,9 % nach Laserbestrahlung bzw. von 35,8 % auf 34,1 % in der Färbung gegen CD13. Auch nach 24 Stunden zeigten sich die KG-1-Zellen in Bezug auf die PI-Aufnahme nahezu unverändert.

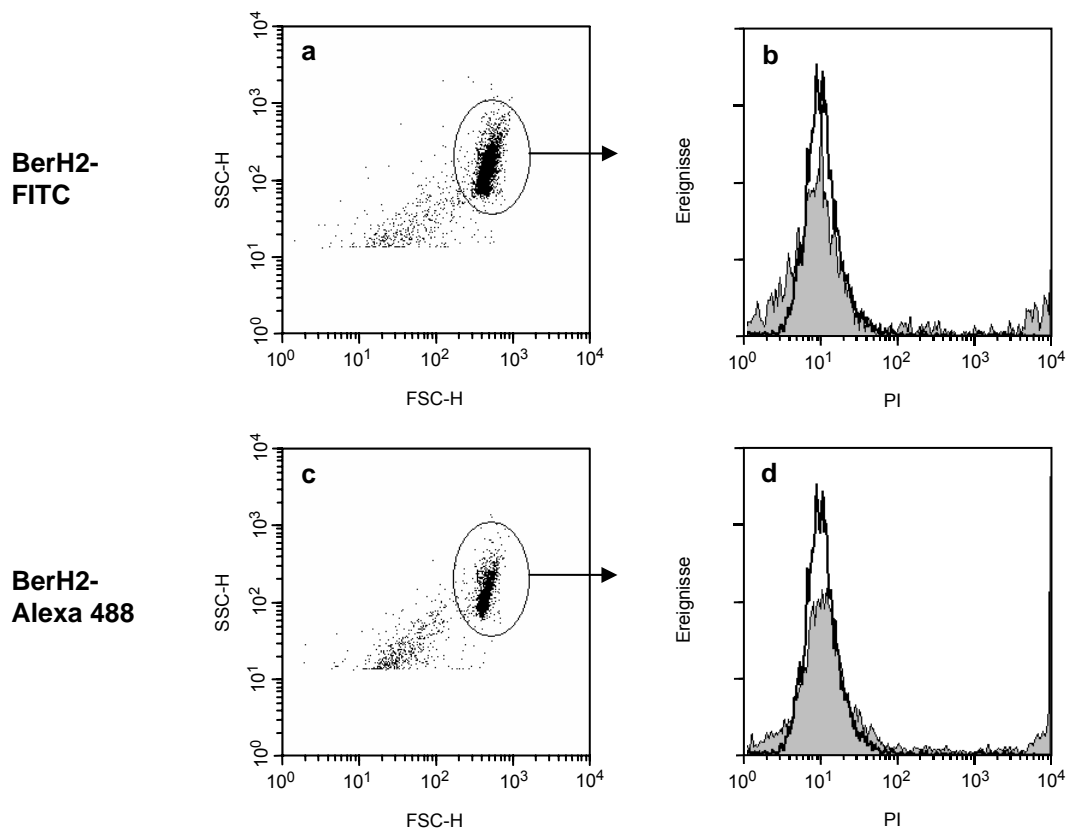
Um die Möglichkeit einer späteren Umsetzung dieser Methode im klinischen Bereich zur spezifischen Schädigung eines bestimmten Zelltyps zu untersuchen, sollte diese in einem Modellsystem überprüft werden, das einer *in vivo* Situation näher kommt. Dazu wurden aus menschlichem Blut isolierten peripheren Lymphozyten, Zellen der Lymphomzelllinie L-428 zugesetzt. Da sich Lymphomzellen von Hodgkin-Lymphom-Patienten durch das Oberflächenantigen CD30 auszeichnen, sollte untersucht werden inwieweit es möglich ist, die CD30-positiven Zellen nach Inkubation mit 15Au-BerH2-Konjugaten durch Bestrahlung mit ns-Laserpulsen selektiv zu schädigen. Abbildung 3.9 zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Versuche. Mit Hilfe des Sekundärantikörpers Ziege-anti-Maus-Alexa 488 konnten nach Auftragung des Seitwärtsstreulichts gegen die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers zunächst die Areale der Lymphozytenpopulation und der L-428-Zellen differenziert werden. Nach PI-Zugabe ist zu erkennen, dass die unbestrahlte Lymphozytenpopulation zu 98,7 % negativ für PI, also vital, ist (Abb. 3.9, mittlere Reihe). In der bestrahlten Probe nimmt der Anteil vitaler Zellen geringfügig auf 93,4 % ab. Anders verhält sich die PI-Fluoreszenz der L-428-Zellen. Hier betrug der Anteil PI-negativer Zellen vor Bestrahlung 69 % (Abb. 3.9, untere Reihe). Nach Laserbestrahlung beträgt der Anteil PI-negativer L-428-Zellen nur noch 4,4 %. Nach 24 Stunden sind keine CD30-positiven Zellen mehr detektierbar.



**Abb. 3.9** Schädigung von L-428-Lymphomzellen aus einer Lymphozytenpopulation. Aus menschlichem Blut isolierten Lymphozyten wurden 5% L-428-Zellen zugesetzt und mit 15Au-BerH2 inkubiert. Anschließend wurde mit dem Nanosekundenlaser bestrahlt ( $1,7 \text{ J/cm}^2$ , 20 Pulse) und die geschädigten Zellen mit PI gefärbt. Zur Identifizierung der L-428-Zellen wurden die 15Au-BerH2-Konjugate mit einem anti-Maus-Alexa-488-Sekundärantikörper nachgewiesen. Dabei sind in Reihe **A** nur die Lymphozyten, in Reihe **B** die Lymphozyten mit L-428 vor Laserbestrahlung und in Reihe **C** Lymphozyten mit L-428 nach Laserbestrahlung dargestellt. Die Diagramme der oberen Zeile zeigen die Seitwärtsstreuung gegen die Fluoreszenz des anti-Maus-Alexa-488-Antikörpers, Region **R1** markiert die Lymphozyten, Region **R2** die L-428-Zellen. Nur ein geringer Prozentsatz der Lymphozyten nimmt nach Bestrahlung PI auf (mittlere Reihe). Unter den L-428-Zellen hingegen zeigen sich nach Bestrahlung nur noch 4,4 % negativ für PI (untere Reihe). Aufgrund der stärkeren Autofluoreszenz der L-428-Zellen im PI-Kanal weisen hier die Peaks höhere Fluoreszenzintensitäten auf.

### 3.1.2 Versuche zur selektiven Zellschädigung mit Hilfe von Chromophor-assistierter Laserinaktivierung (CALI)

Die Anregung von Chromophoren markierter Antikörper führt zur Bildung von Radikalen und Singulett-Sauerstoff. Analog zu den Versuchen aus Abschnitt 3.1.1 mit membrangebundenen Goldnanopartikeln sollte im Folgenden untersucht werden, inwieweit diese Radikalbildung membrangebundener Fluoreszenzkonjugate unter Laserbestrahlung Einfluss auf die Vitalität von Zellen hat. Durch die selektive Bindung der Chromophor-Antikörperkonjugate an spezifische Oberflächenmarker ist hier ebenfalls wie im Fall der Goldkonjugate die Selektivität für bestimmte Zelllinien gegeben.



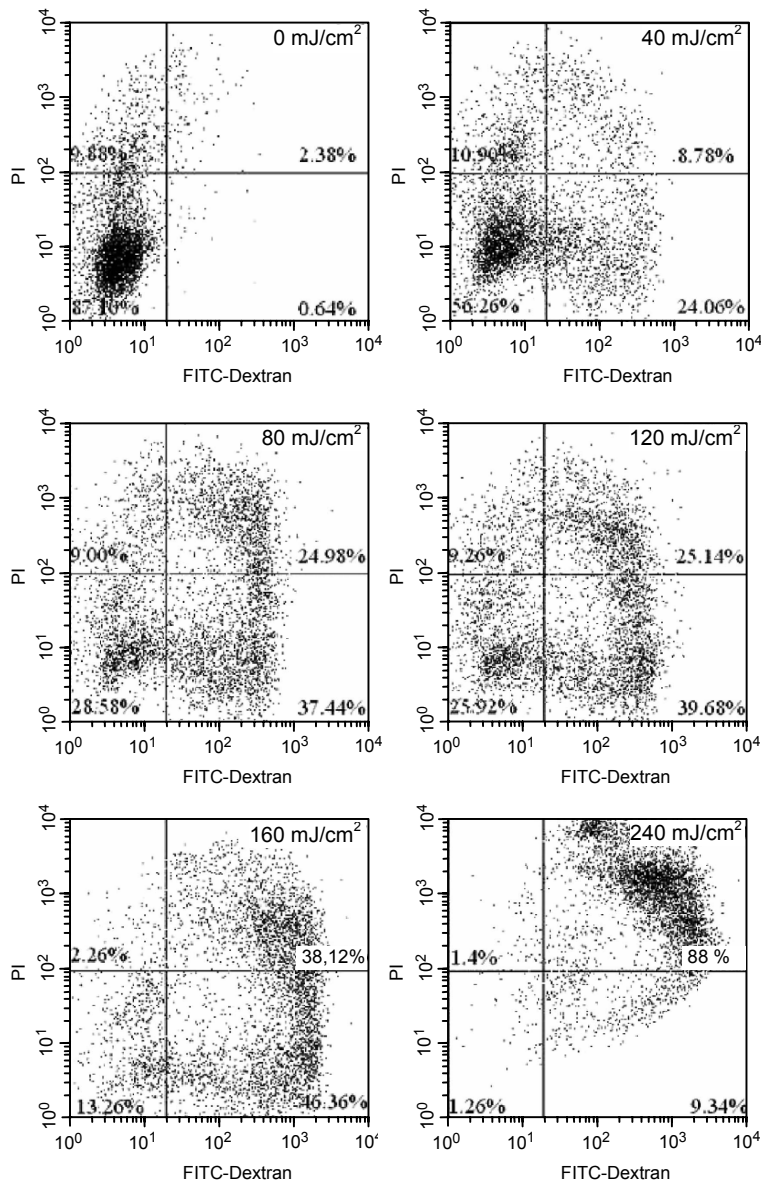
**Abb. 3.10** CALI an dem membranständigen Protein CD30 zeigt keinen unmittelbaren Effekt auf die Vitalität der Zellen. CD30-positive Zellen (L-428) wurden mit FITC- (a, b) oder Alexa 488- (c, d) markierten Antikörpern gegen CD30 (BerH2) inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Argonlaser bei einer Bestrahlungsstärke von 500 mW/cm<sup>2</sup> für 30 min bestrahlt und mit PI gefärbt. Die PI-Fluoreszenz der L-428-Zellen ist in den Histogrammen in b und d dargestellt. Der Graph mit schwarzer Kontur zeigt die unbestrahlte Kontrolle, der grau unterlegte Graph jeweils die bestrahlten Zellen. Nach Bestrahlung kommt es nur zu einem geringfügigen Anstieg der PI-positiven Zellen, das geometrische Mittel der PI-Fluoreszenz beträgt bei der unbestrahlten Kontrolle 11,7, bei den FITC-markierten Zellen nach Bestrahlung 16,9 und bei den Alexa 488-markierten Zellen nach Bestrahlung 24,0.

---

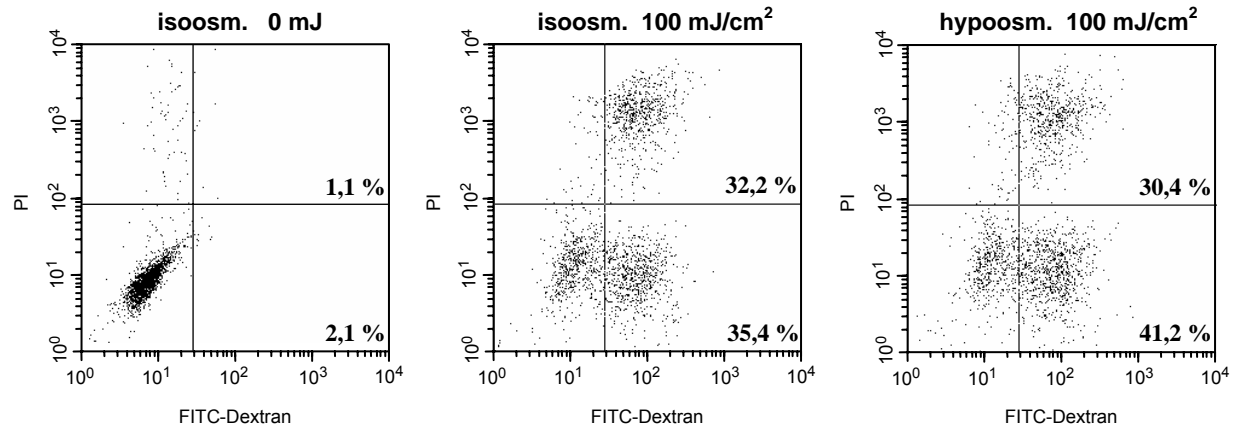
Der gegen das membranständige CD30 gerichtete Antikörper BerH2 wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC oder Alexa 488 markiert und CD30-positive Zellen (L-428) mit diesen Konjugaten inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte mit dem Argonlaser bei  $500 \text{ mW/cm}^2$ . Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden die Zellen mit PI inkubiert und durchflusszytometrisch ausgewertet. Nach einer Bestrahlungsdauer von 30 min ist mit beiden Antikörperkonjugaten nur ein äußerst geringer Anstieg des Anteils der PI-positiven Zellen erkennbar (Abb. 3.10). Unmittelbare Einflüsse auf die Vitalität, wie nach Behandlung und Bestrahlung mit den Goldnanopartikeln in Abschnitt 3.1.1, waren sowohl bei den FITC- als auch bei den Alexa Fluor 488-Konjugaten nicht festzustellen.

### 3.2 Zellmembran-Permeabilisierung mit Hilfe von Goldnanopartikeln

Laserbestrahlung von membrangebundenen Antikörper-Goldkonjugaten führt wahrscheinlich primär über eine Schädigung der Zytoplasmamembran zum Zelltod (s. Abschnitt 3.1.1). Bei reduzierter Bestrahlung wurde eine temporäre Permeabilisierung der Zellmembran beobachtet (Radt, 2002), die genutzt werden könnte, um Moleküle wie DNA oder Antikörper in Zellen einzubringen. Zur experimentellen Verifizierung wurde zunächst versucht, FITC-markiertes Dextran mit einem Molekulargewicht von 10 kDa in lebende Zellen einzubringen. Dieses Molekül ist wesentlich kleiner als ein Antikörper und wurde den Zellen kurz vor der Bestrahlung zugegeben. 30 min nach Bestrahlung erfolgte die Zugabe von PI, um dauerhaft geschädigte Zellen zu identifizieren. Die Verzögerung der PI-Zugabe war notwendig, da sich herausstellte, dass die Membran diese Zeit zur vollständigen Wiederherstellung der Integrität benötigte. Für die Versuche wurden die Bestrahlungsenergien so gewählt, dass sie zunächst unter der Grenze lagen, bei der die Zellen absterben. Die Bestrahlung von Karpas-299-Zellen nach Inkubation mit den gegen CD30 gerichteten 30Au-BerH2-Konjugaten zeigte in der durchflusszytometrischen Auswertung eine Aufnahme von FITC-Dextran (Abb. 3.11). Bei zunehmender Energie der Einzelpulse erhöhte sich die Anzahl der FITC-Dextran-aufnehmenden Zellen. Gleichzeitig nahm jedoch auch der Anteil der PI-positiven Zellen mit irreversiblen Membranschädigungen zu. Die Karpas-299-Zellen zeigten bei einer Bestrahlung mit einem Puls von  $160 \text{ mJ/cm}^2$  einen Anteil von 46,4 % FITC-Dextran-positiver Zellen die kein PI aufnehmen. Bei einer Bestrahlungsenergie von  $240 \text{ mJ/cm}^2$  betrug dieser Anteil nur noch 9,3 %, gegenüber 88,0 % der Zellen, die zusätzlich positiv für PI waren (Abb. 3.11). Der Einfluss verschiedene Parameter wie Pulsanzahl, die Pulsenergie und die Größe der Goldpartikel auf die Permeabilisierung wurde systematisch untersucht (Yao *et al.*, 2005). Dabei zeigte sowohl bei den 15-nm als auch bei den 30-nm-Partikeln eine Pulsanzahl von fünf Pulsen die höchste Permeabilisierungsrate. Bei den 30-nm-Partikeln wurden insgesamt niedrigere Bestrahlungsenergien benötigt, um Membranpermeabilisierung hervorzurufen. Eine Verbesserung der Transfektionsrate ließ sich unter Verwendung von hyperosmolarem Elektroporationspuffer (Nr. 4308 070.501, Eppendorf, Hamburg, Dtl.) erreichen. Bei der Bestrahlung von L-428-Zellen die mit 30Au-BerH2-Konjugaten inkubiert wurden, zeigte sich in isoosmalarem Puffer ( $90 \text{ mOsmol/kg}$ ) eine maximale Permeabilisierungsrate bei  $100 \text{ mJ/cm}^2$  von 34,7 % und in hyperosmolarem Puffer ( $280 \text{ mOsmol/kg}$ ) eine Permeabilisierungsrate von 41,2 % (Abb. 3.12).



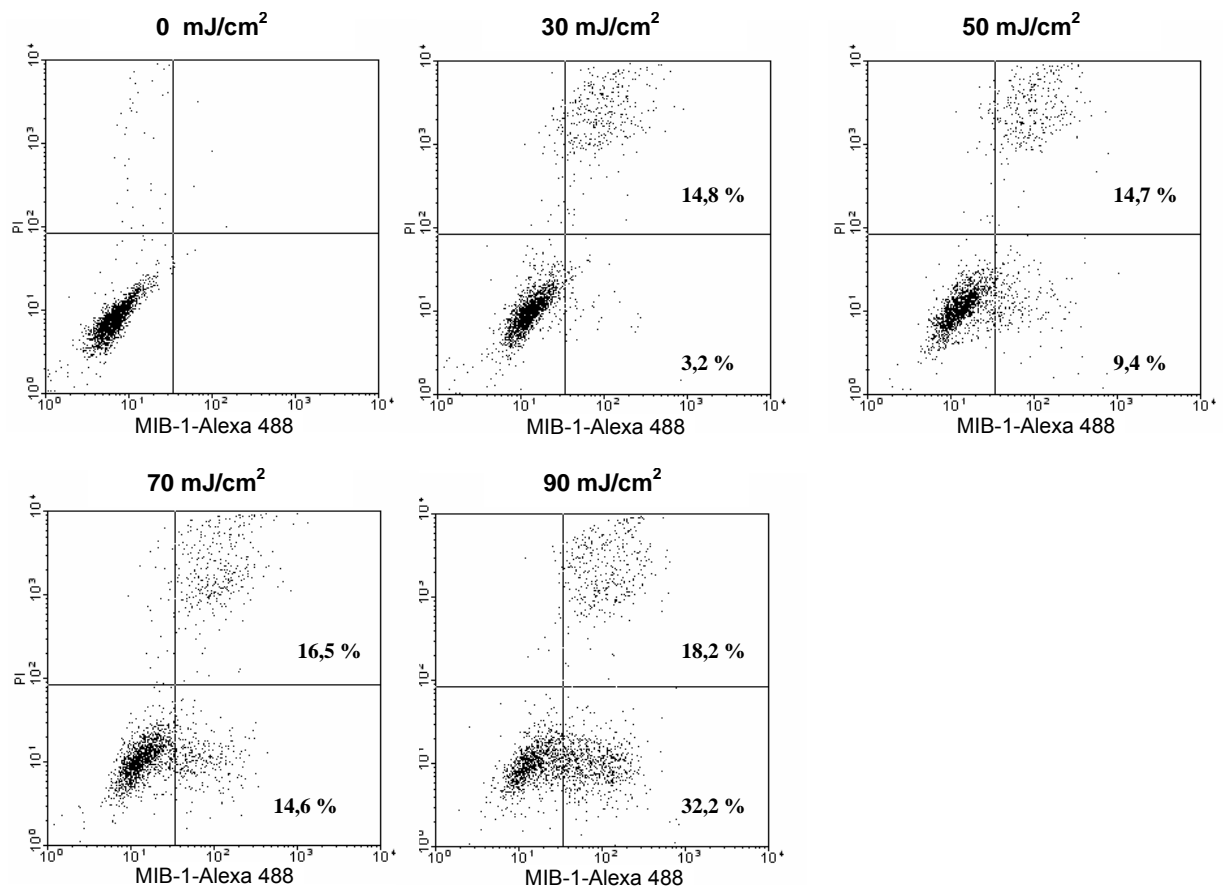
**Abb. 3.11** Aufnahme von FITC-Dextran nach Membranpermeabilisierung durch Laserbestrahlung. Karpas-299-Zellen wurden mit 30Au-BerH2-Konjugaten inkubiert und nach Zugabe von FITC-Dextran mit Einzelpulsen der angegebenen Energien bestrahlt.



**Abb. 3.12** Vergleich der Membranpermeabilisierung durch Laserbestrahlung in iso- und hypoosmolarem Elektroporationspuffer. L-428-Zellen wurden mit 30Au-BerH2-Konjugaten inkubiert und nach Zugabe von FITC-Dextran mit Einzelpulsen der angegebenen Energien bestrahlt.

Zum Transfer von Antikörpern in die Zellen, wurden L-428-Zellen mit 30Au-BerH2-Konjugaten inkubiert und in hypoosmolarem Elektroporationspuffer aufgenommen. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde ein mit Alexa 488 direktmarkierter MIB-1-Antikörper hinzugegeben. Um unter den Antikörper-aufnehmenden Zellen eine deutlichere Trennung zwischen den überlebenden und dauerhaft geschädigten Zellen zu erreichen, erfolgte die Zugabe von PI sowie die durchflusszytometrische Auswertung erst nach 20 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C. Mit ansteigender Bestrahlungsenergie stieg auch der Anteil der permeabilisierten Zellen. Die beste Permeabilisierungsrate wurde mit einer Bestrahlung von 90 mJ/cm<sup>2</sup> erreicht. Hier waren 32,2 % der Zellen positiv für MIB-1-Alexa 488 ohne für PI permeabel zu sein. Der Anteil der permeabilisierten und PI-positiven Zellen lag hier bei 18,2 % (Abb. 3.13).

Es gelang nicht, durch Permeabilisierung GFP-Plasmide in die Zellen einzubringen. Als Plasmide wurden das 4,7 kb große pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA, USA) sowie das 3,6 kb große pmaxGFP (Amaya, Köln, Dtl.) verwendet. Auch nach 30 Stunden konnte keine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden.



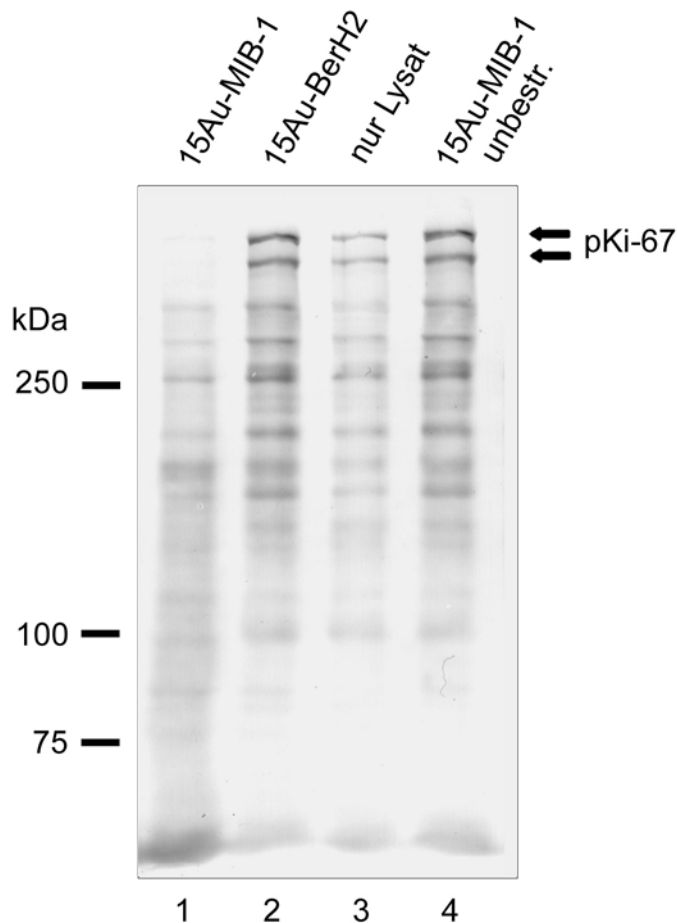
**Abb. 3.13** Zelluläre Aufnahme von Alexa 488-markiertem MIB-1-Antikörper durch Membranpermeabilisierung nach Laserbestrahlung. L-428-Zellen wurden mit 30Au-BerH2-Konjugaten inkubiert und nach Zugabe von MIB-1-Alexa 488 mit Einzelpulsen der angegebenen Energien bestrahlt. Die PI-Zugabe und Auswertung im Durchflusszytometer erfolgte nach 20 Stunden.

### 3.3 Proteininaktivierung mit Hilfe von Nanopartikel-assistierter Laserinaktivierung (NALI)

#### 3.3.1 Proteininaktivierung *in vitro*

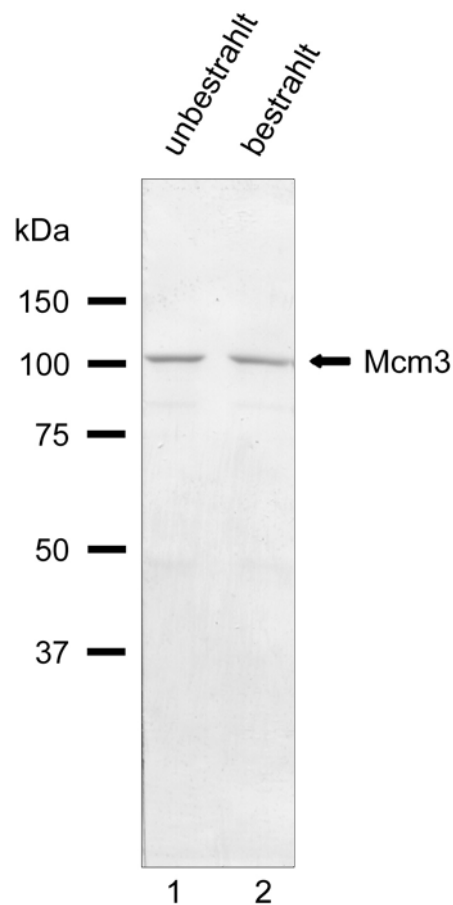
Die Auswirkung der Laserbestrahlung von Antikörper-Goldkonjugaten auf ihr Zielprotein sowie auf Kontroll-Proteine wurden zunächst im Zelllysate untersucht. Als Zielprotein diente das im Zellkern lokalisierte pKi-67. Goldpartikel mit einem Durchmesser von 15 nm wurden mit dem gegen das Ki-67-Protein gerichteten MIB-1-Antikörper konjugiert und mit Zelllysate der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HEp-2 inkubiert. Nach Bestrahlung mit 10 Pulsen von je  $1,5 \text{ J/cm}^2$  wurden die Effekte mittels SDS-PAGE und darauffolgendem Westernblot analysiert. Die Immundetektion des Ki-67-Proteins zeigt eine starke Abnahme der für pKi-67 charakteristischen Doppelbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 315/350 kDa (Abb. 3.14, Spur 1), wenn das Lysat mit 15Au-MIB-1-Konjugaten inkubiert und anschließend bestrahlt wurde. Ferner ist in im Bereich unterhalb von ca. 100 kDa eine Zunahme an Reaktivität im niedermolekularen Bereich zu erkennen.

Die Kontroll-Ansätze zeigen dagegen deutlich die für pKi-67 charakteristischen Doppelbanden (Abb. 3.14, Spuren 2 bis 4). Weder die Inkubation mit Goldpartikeln ohne Laserbestrahlung, noch die Laserbestrahlung ohne vorherige Inkubation des Lysates mit den entsprechenden Goldkonjugaten (Spuren 3 und 4), zeigen einen Einfluss auf die pKi-67-Banden. Unter den Kontrollen ist vor allem der Ansatz hervorzuheben, indem das Lysat mit anti-CD30-Goldpartikeln inkubiert und anschließend bestrahlt wurde. In Spur 2 ist kein Einfluss auf die pKi-67-Doppelbande zu erkennen.

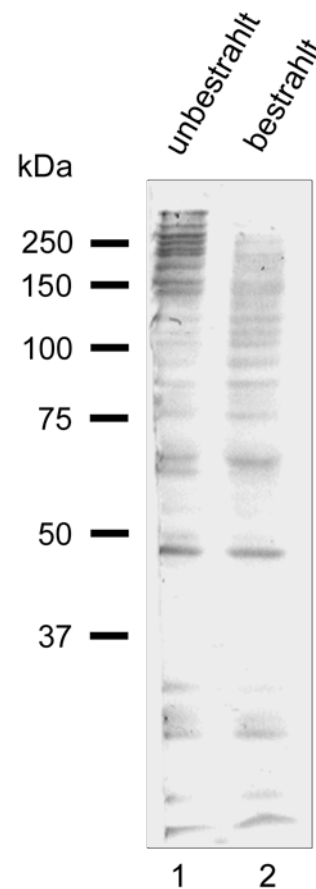


**Abb. 3.14** Nach Laserbestrahlung von Zelllysate (HEP-2), das zuvor mit  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1 inkubiert wurde, können die pKi-67-Hauptbanden bei 315 und 350 kDa nicht mehr nachgewiesen werden. Es kommt zu einer Zunahme an Reaktivität im niedermolekularen Bereich. Die Proben wurden behandelt wie oberhalb der Bahnen angegeben und mit 10 Pulsen der Energie  $1,5 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Immunoblot nach SDS-PAGE (5% Gel), Nachweis mit dem MIB-1-Antikörper. Doppelpfeile markieren die charakteristischen pKi-67-Hauptbanden. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Positionen der Größenstandards an.

Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität, wurde auf einem weiteren Immunoblot ebenfalls das nukleäre Protein *Mini chromosome maintenance 3* (Mcm3; Alexandrow, 2002) nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.15 zu erkennen, erschien dabei die Mcm3-Bande bei 105 kDa auch nach Laserbestrahlung unverändert. Um durch die Bestrahlung eventuell entstandene Fragmente definierter Größe des Ki-67-Proteins nachzuweisen, wurden die Proben erneut im Westernblot analysiert, der diesmal mit dem MIB-2-Antikörper entwickelt wurde, der im Gegensatz zu MIB-1 nur ein Epitop im Ki-67-Protein erkennt (Abb. 3.16). Wie beim Nachweis mit MIB-1 verschwanden auch hier die pKi-67-Hauptbanden nach Bestrahlung, die Lauffront erscheint leicht stärker, jedoch erscheinen keine zusätzlichen definierten Banden. Auch durch den Nachweis des pKi-67 mit den Antikörpern MIB-7, MIB-21 und MIB-24 ließen sich nach Laserbestrahlung keine zusätzlichen Banden detektieren.

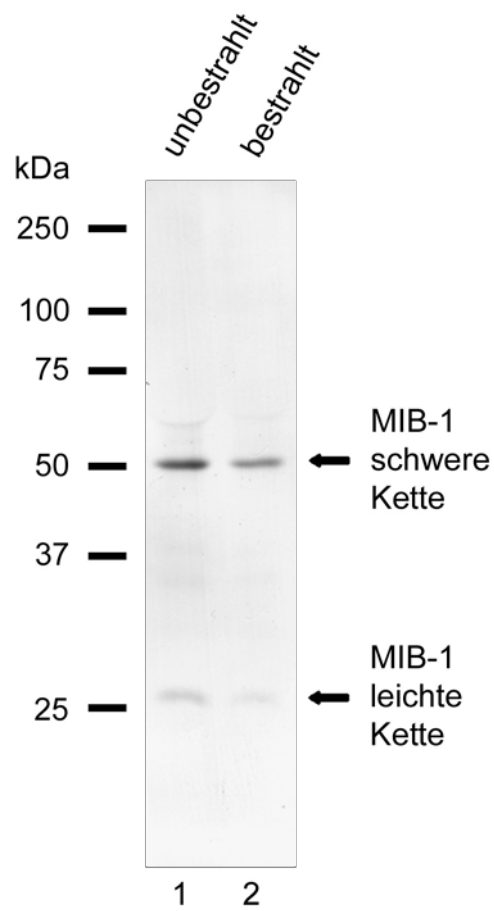


**Abb. 3.15** Laserbestrahlung von Zelllysat ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ , 10 Pulse) nach Inkubation mit  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1. Die Mcm3-Bande bei 105 kDa wird durch die Laserbestrahlung nicht beeinflusst. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Positionen der Größenstandards an.



**Abb. 3.16** Laserbestrahlung von Zelllysat ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ , 10 Pulse) nach Inkubation mit  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1. Der Nachweis der Banden erfolgte mit MIB-2. Die hochmolekularen pKi-67-Banden verschwinden nach Laserbestrahlung, es sind hier jedoch keine neu entstandenen Fragmente erkennbar. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Positionen der Größenstandards an.

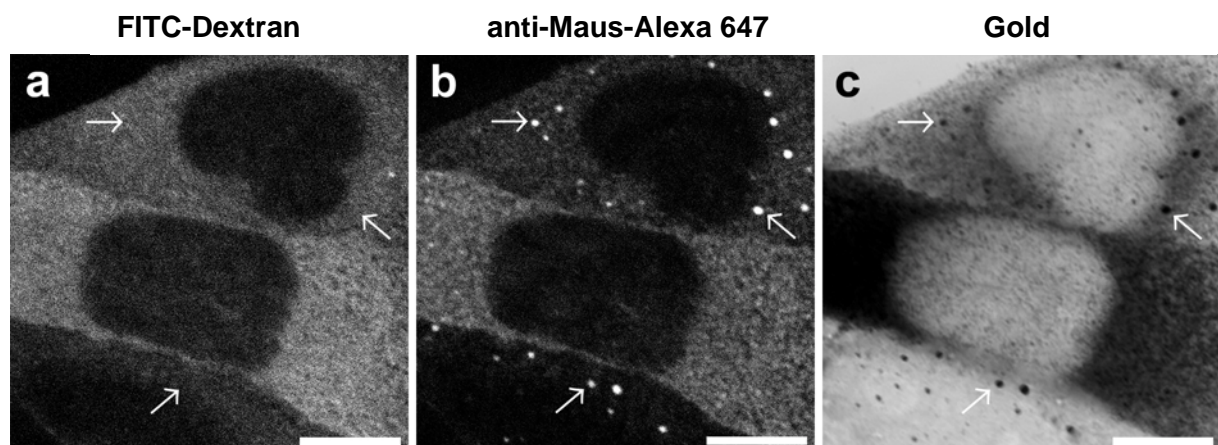
Um den Einfluss der Bestrahlung auf die Antikörper zu untersuchen, wurden  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1-Konjugate ohne Lysat bestrahlt, anschließend geblottet und der Blot wurde mit anti-Maus-Sekundärantikörpern inkubiert. Abbildung 3.17 zeigt, dass die Intensitäten der Banden der schweren (50 kDa) und leichten Ketten (25 kDa) nach Bestrahlung abnehmen, diese aber nicht vollständig verschwinden.



**Abb. 3.17** Nach Laserbestrahlung ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ , 10 Pulse) erscheinen die Banden der leichten und schweren Ketten der  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1-Konjugate schwächer. Der Nachweis des MIB-1-Antikörpers erfolgte durch einen Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Positionen der Größenstandards an.

### 3.3.2 Proteininaktivierung in lebenden Zellen

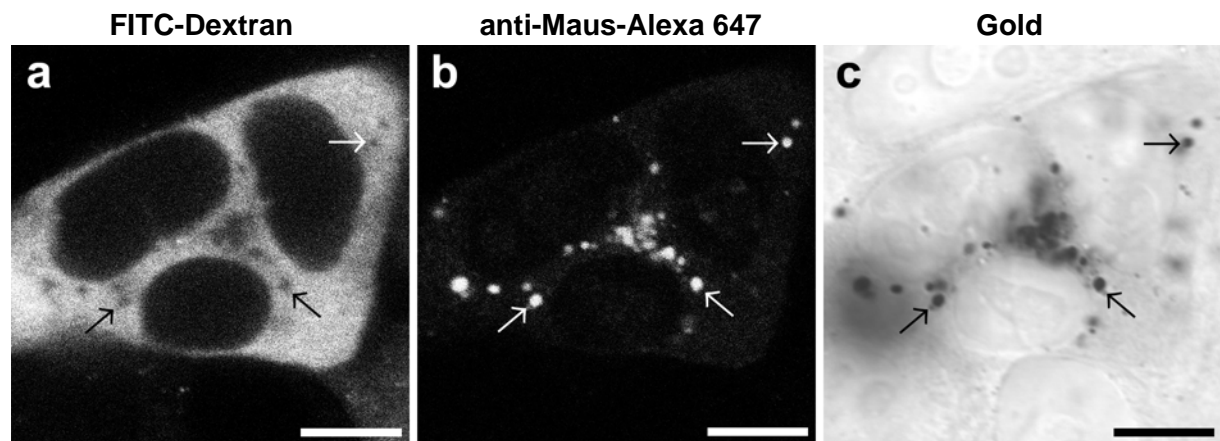
Nach *in vitro*-Versuchen zur Proteininaktivierung mit Antikörper-gekoppelten Goldnanopartikeln, sollte nun ihr Potential zur selektiven Beeinflussung von Proteinen in lebenden Zellen untersucht werden. Hierzu wurden sowohl 6-nm- als auch 15-nm-Goldpartikel mit den Antikörpern TuBB-9 und MIB-1 gegen pKi-67 gekoppelt. Um die Lokalisation der Konjugate in lebenden HEp-2-Zellen zu überprüfen, wurden die Konjugate in das Zytoplasma der Zellen mikroinjiziert. Es wurde in früheren Studien gezeigt, dass anti-pKi-67-Antikörper vom Zytoplasma in den Zellkern wandern und dort die pKi-67-Lokalisation aufweisen (Heyden, 1997; Bullwinkel, 2005). Zur späteren Identifizierung der injizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop, wurden die Konjugate zusammen mit FITC-markiertem Dextran injiziert. Nach Injektion von 6Au-TuBB-9, verblieb der Antikörper auch nach mehreren Stunden Inkubation im Zytoplasma und wandert in den meisten Zellen nicht in die Nukleoli (Abb. 3.18 **b**, Pfeile). Im Zytoplasma der injizierten Zellen waren neben



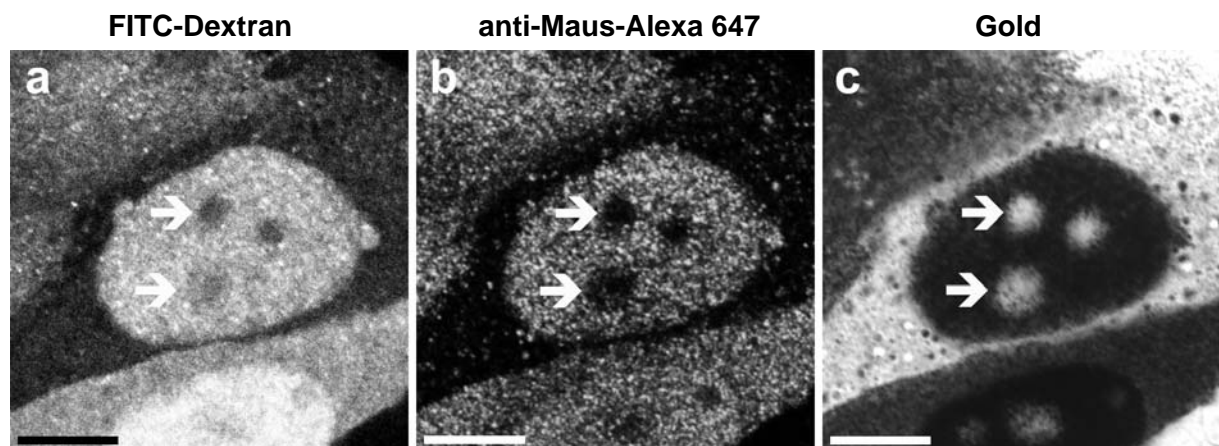
**Abb. 3.18** Lokalisation von 6Au-TuBB-9-Konjugaten nach Zytoplasma-Mikroinjektion in HEp-2-Zellen. FITC-Dextran (**a**) wurde als Kontrolle für die Mikroinjektion zusammen mit 6Au-TuBB-9 injiziert. Der Antikörper TuBB-9 lässt sich mittels eines Ziege-anti-Maus-Alexa 647-Sekundärantikörpers nachweisen (**b**). TuBB-9 verbleibt nach Injektion im Zytoplasma und zeigt neben einer diffusen Verteilung eine Lokalisation in großen punktförmigen Strukturen (Pfeile). Die Färbung der Goldpartikel mit Silberverstärkungsreagenz lässt erkennen, dass die Goldpartikel ebenfalls im Zytoplasma verbleiben und in denselben Spots kolokalisieren (**c**, Pfeile). Die Lage der Nuklei wurde nach differentiellen Interferenzkontrast (DIK)-Aufnahmen bestimmt. Balken 10  $\mu\text{m}$ .

einer diffusen Verteilung auch viele größere punktförmige Strukturen zu erkennen. Die Goldpartikel verblieben ebenfalls im Zytoplasma und kolokalisierten hier mit dem TuBB-9-Antikörper in denselben Strukturen (Abb. 3.18 **c**, Pfeile). Auch 24 Stunden nach Mikroinjektion war kein Transport der Konjugate in den Zellkern zu beobachten. Im Gegenteil nimmt die Größe der punktförmigen Strukturen zu, an denen die Konjugate lokalisieren, und die diffuse Verteilung im Zytoplasma geht zurück (Abb. 3.19). Da der

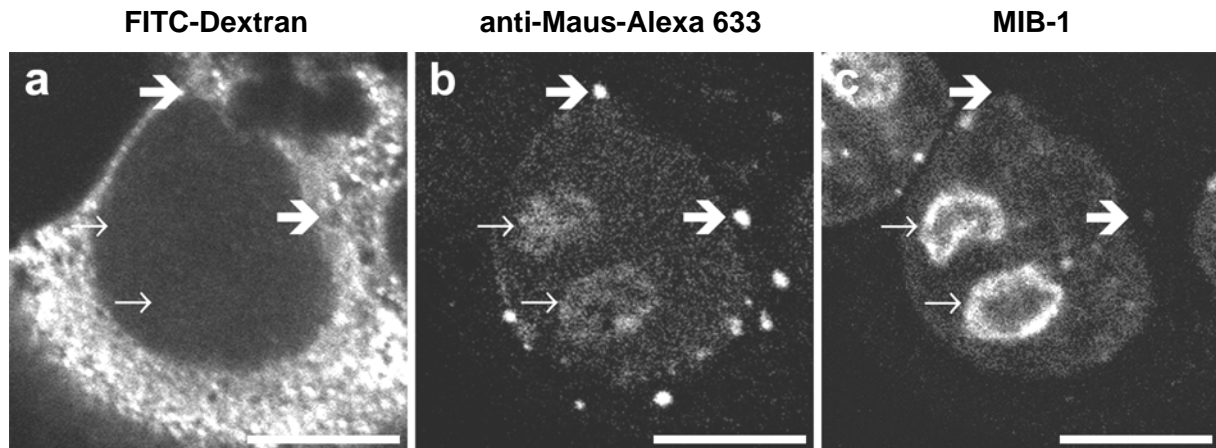
Transport der Konjugate durch die Kernmembran nicht gelang, wurden die Konjugate direkt in die Zellkerne der Zellen injiziert (Abb. 3.20). Doch auch hier zeigte sich, dass der TuBB-9 Antikörper diffus im Kern verteilt blieb und bis auf einige wenige Zellen nicht in den Nukleoli lokalisierte. Auch die Goldpartikel zeigten eine diffuse Verteilung im Zellkern und lokalisierten ebenfalls nicht in den Nukleoli (Abb. 3.20 c).



**Abb. 3.19** Lokalisation von 6Au-TuBB-9-Konjugaten in HEp-2 Zellen 24 Stunden nach Mikroinjektion in das Zytoplasma. FITC-Dextran (a) wurde als Kontrolle für die Mikroinjektion zusammen mit 6Au-TuBB-9 injiziert. Der Antikörper TuBB-9 lässt sich mittels eines Ziege-anti-Maus-Alexa 647-Sekundäranantikörpers nachweisen (b). TuBB-9 verbleibt nach Injektion im Zytoplasma und lokalisiert in großen punktförmigen Strukturen (Pfeile). Nach Färbung der Goldpartikel mit Silberverstärkungsreagenz ist zu erkennen, dass diese ebenfalls im Zytoplasma verbleiben und in denselben Spots kolokalisieren (c, Pfeile). Die Lage der Nuklei wurde nach DIK-Aufnahmen bestimmt. Balken 10  $\mu$ m.

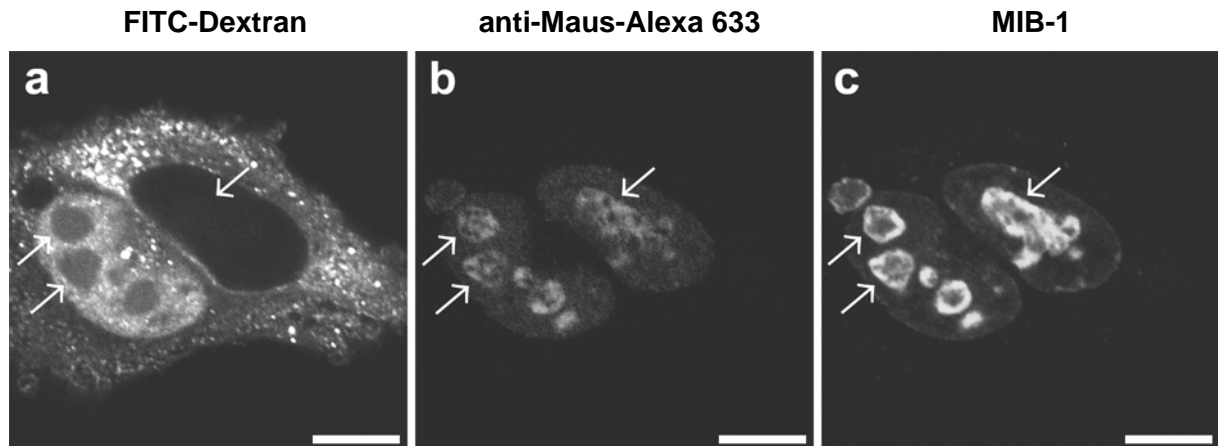


**Abb. 3.20** Lokalisation von 6Au-TuBB-9-Konjugaten nach Kern-Mikroinjektion in HEp-2-Zellen. FITC-Dextran (a) wurde als Kontrolle für die Mikroinjektion zusammen mit 6Au-TuBB-9 injiziert. Der Antikörper TuBB-9 lässt sich mittels eines Ziege-anti-Maus-Alexa 647-Sekundäranantikörpers nachweisen (b). TuBB-9 bleibt nach Injektion diffus im Kern verteilt und lokalisiert nicht in den Nukleoli (Pfeile). Nach Färbung der Goldpartikel mit Silberverstärkungsreagenz ist zu erkennen, dass diese ebenfalls diffus im Kern verteilt bleiben und nicht in den Nukleoli lokalisieren (c, Pfeile), die mit Silberverstärkungsreagenz gefärbten Goldpartikel erscheinen im Interferenzkontrast schwarz. Die Lage der Nukleoli wurde nach DIK-Aufnahmen bestimmt. Balken 10  $\mu$ m.



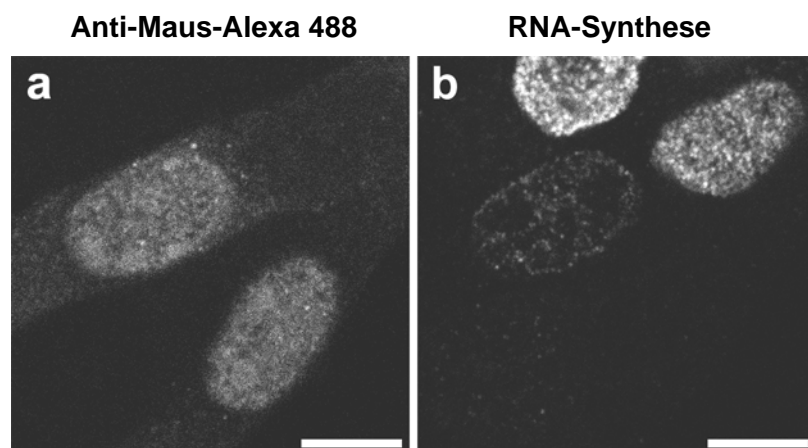
**Abb. 3.21** Lokalisation von  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1-Konjugaten nach Zytoplasma-Mikroinjektion in HEP-2-Zellen. FITC-Dextran (**a**) wurde als Kontrolle für die Mikroinjektion zusammen mit  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1 in das Zytoplasma injiziert. Der Antikörper MIB-1 lässt sich mit einem Ziege-anti-Maus-Alexa 633-Antikörper schwach in den Nukleoli nachweisen (**b**, dünne Pfeile). Vor allem befindet sich der MIB-1-Antikörper jedoch in großen punktförmigen Strukturen außerhalb des Zellkerns (dicke Pfeile). Die Färbung mit einem direktmarkierten MIB-1-Alexa 546-Antikörper (**c**) zeigt die Lokalisation des pKi-67 im Randbereich der Nukleoli und diffus im Zellkern verteilt. Balken 10  $\mu\text{m}$ .

Mit MIB-1-Goldkonjugaten konnte nach Mikroinjektion ebenfalls keine Lokalisation an den Zielstrukturen beobachtet werden. Wurden die Konjugate in das Zytoplasma der Zellen mikroinjiziert, verblieben der MIB-1-Antikörper (Abb. 3.21) sowie die Goldpartikel im Zytoplasma und kolokalisierten hier ebenfalls in den meisten Zellen in punktförmigen Strukturen. MIB-1 ließ sich jedoch zusätzlich auch schwach in den Nukleoli nachweisen. Nach Bestrahlung mit dem Nanosekundenlaser (20 Pulse mit je  $1,5 \text{ J/cm}^2$ ), waren die punktförmigen Strukturen im Zytoplasma nicht mehr zu erkennen, die Färbung in den Nukleoli blieb jedoch erhalten (Abb. 3.22). Dies spricht wie die Färbung der Goldpartikel mit Silberverstärkungsreagenz dafür, dass der in den Nukleoli lokalisierte Antikörper vom Gold losgelöst vorliegt. Die Versuche wurden für beide Antikörper mit 6-nm- und 15-nm-Goldpartikeln durchgeführt und führten zu vergleichbaren Ergebnissen.



**Abb. 3.22** Mit  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1-Konjugaten mikroinjizierte HEP-2-Zellen nach Laserbestrahlung ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ , 20 Pulse). Die Verteilung des FITC-Dextran (**a**) lässt erkennen, dass es sich bei der linken Zelle um eine Kern- und bei der rechten Zelle um eine Zytoplasma-injizierte Zelle handelt. Der Antikörper MIB-1 der injizierten  $^{15}\text{Au}$ -MIB-1 Konjugate lässt sich mit einem Ziege-anti-Maus-Alexa 633-Antikörper auch nach Bestrahlung schwach in den Nukleoli nachweisen (**b**, Pfeile). MIB-1 kommt jedoch nicht mehr in den großen punktförmigen Strukturen außerhalb des Zellkerns vor. Die Färbung mit einem direktmarkierten MIB-1-Alexa 546-Antikörper (**c**) zeigt die Lokalisation des pKi-67 im Randbereich der Nukleoli. Balken  $10 \mu\text{m}$ .

Um eine mögliche Rolle des pKi-67 bei der Synthese der ribosomalen RNA (rRNA) in den Nukleoli zu untersuchen, wurde in den mikroinjizierten und bestrahlten Zellen die RNA-Synthese nachgewiesen. Dabei konnte bei schwächerer Bestrahlung ( $0,5$  bis  $1 \text{ J/cm}^2$ ) kein Einfluss festgestellt werden. Ab einer Bestrahlungsdosis von  $1,5 \text{ J/cm}^2$  wurde die RNA-Synthese im gesamten Zellkern inhibiert (Abb. 3.23 **b**). Es konnte jedoch keine spezifische Inhibierung der rRNA-Synthese in den Nukleoli beobachtet werden.



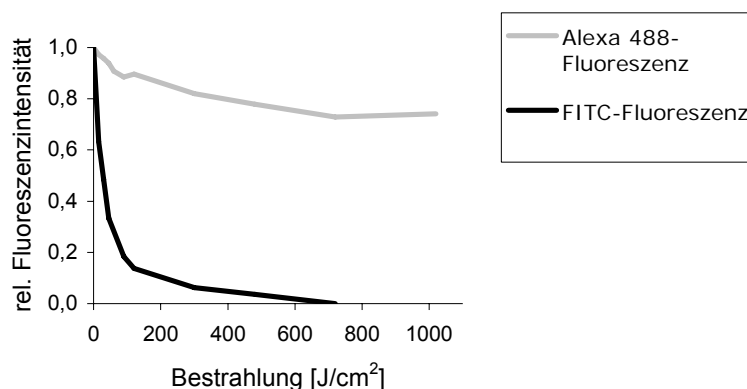
**Abb. 3.23** Laserbestrahlung von HEP-2-Zellen nach Mikroinjektion der  $^{6}\text{Au}$ -TuBB-9-Konjugate, führt zu Inhibierung der RNA-Synthese. Der mit einem Ziege-anti-Maus-Alexa 488 nachgewiesene TuBB-9-Antikörper ist nach ns-Laserbestrahlung von  $1,5 \text{ J/cm}^2$  diffus im Zellkern verteilt (**a**). Die Färbung der RNA-Synthese (**b**) lässt erkennen, dass in den mikroinjizierten Zellen die RNA-Synthese nach Laserbestrahlung im gesamten Zellkern inhibiert ist. Balken  $10 \mu\text{m}$ .

### 3.4 Proteininaktivierung mit Hilfe von Chromophor-assistierter Laserinaktivierung (CALI)

#### 3.4.1 Proteininaktivierung *in vitro*

Wie mit den Goldnanopartikeln wurden die Untersuchungen zur selektiven Proteininaktivierung mit Hilfe von CALI zunächst in HEP-2-Zellessat durchgeführt. Die gegen pKi-67 gerichteten Antikörper MIB-1 und TuBB-9 wurden jeweils mit dem Fluoresceinderivat FITC, sowie dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 konjugiert. Um die Ergebnisse mit den verschiedenen Antikörperkonjugaten auch quantitativ mit einander vergleichen zu können, wurden Antikörper mit ähnlicher Anzahl von Fluoreszenzmolekülen verwendet.

Die Fluoreszenzfarbstoffe FITC und Alexa 488 unterscheiden sich stark in ihrer Photostabilität (Abbildung 3.24). Schon nach einer Bestrahlung von  $150 \text{ J/cm}^2$  (Bestrahlungsdauer 5 min) ging die Fluoreszenzintensität des FITC auf 15 % des Ausgangswertes zurück. Danach fiel sie allmählich gegen Null. Bei der Alexa Fluoreszenz war im Gegensatz dazu eine weitaus langsamere Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Auch bei einer Bestrahlungsdosis von  $1020 \text{ J/cm}^2$  (Bestrahlungsdauer 34 min) betrug diese noch 75 % des Ausgangswertes.



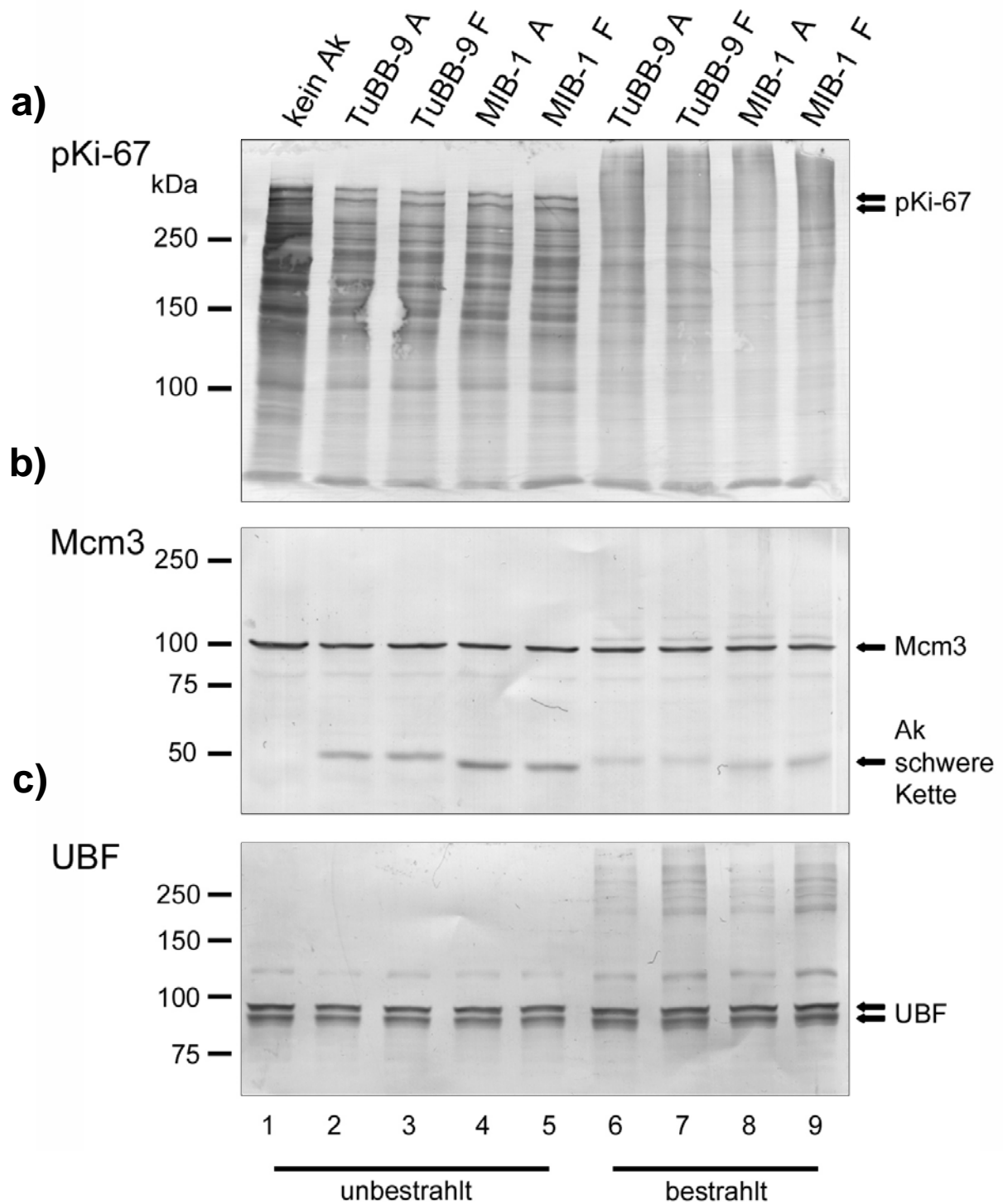
**Abb. 3.24** Rückgang der Fluoreszenzintensität bei 488 nm der Fluoreszenz-Antikörper-konjugate TuBB-9-FITC und TuBB-9-Alexa 488 nach Bestrahlung mit dem Argonlaser bei  $500 \text{ mW/cm}^2$ .

Die fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden mit Zelllysate der Zelllinie HEp-2 inkubiert und anschließend mit dem cw-Argonlaser bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  für 15 min bestrahlt. In den unbestrahlten Ansätzen zeigte der Westernblot deutlich die für pKi-67 charakteristische Doppelbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 315/350 kDa (Abb. 3.25, Spuren 1 bis 5).

Nach Bestrahlung war die ursprüngliche pKi-67-Doppelbande nicht mehr erkennbar (Spuren 6-9). Es war jedoch eine zusätzliche Reaktivität im höhermolekularen Bereich sichtbar, einschließlich zweier, schwacher distinkter Banden, die in Abbildung 3.25 durch Sternchen am rechten Bildrand markiert sind. Im Westernblot sind kaum Unterschiede zwischen den mit TuBB-9 und den mit MIB-1 inkubierten Proben erkennbar (vgl. Spuren 6, 7 mit Spuren 8, 9). Die beschriebenen Effekte nach Laserbestrahlung traten, trotz der unterschiedlichen Photostabilität, in ähnlicher Weise sowohl mit den FITC-, als auch mit den Alexa Fluor 488 konjugierten Antikörpern auf.

Zur Kontrolle für die Spezifität dieser Effekte wurden in den Proben darüber hinaus die nukleären Proteine *Mini-chromosome maintenance 3* (Mcm3) und *upstream binding factor* (UBF) nachgewiesen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Mcm3-Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 105 kDa nach der Bestrahlung erhalten bleibt. In den bestrahlten Proben war jedoch zusätzlich eine schwache Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 115 kDa nachweisbar (Abb. 3.25, Spuren 6 bis 9).

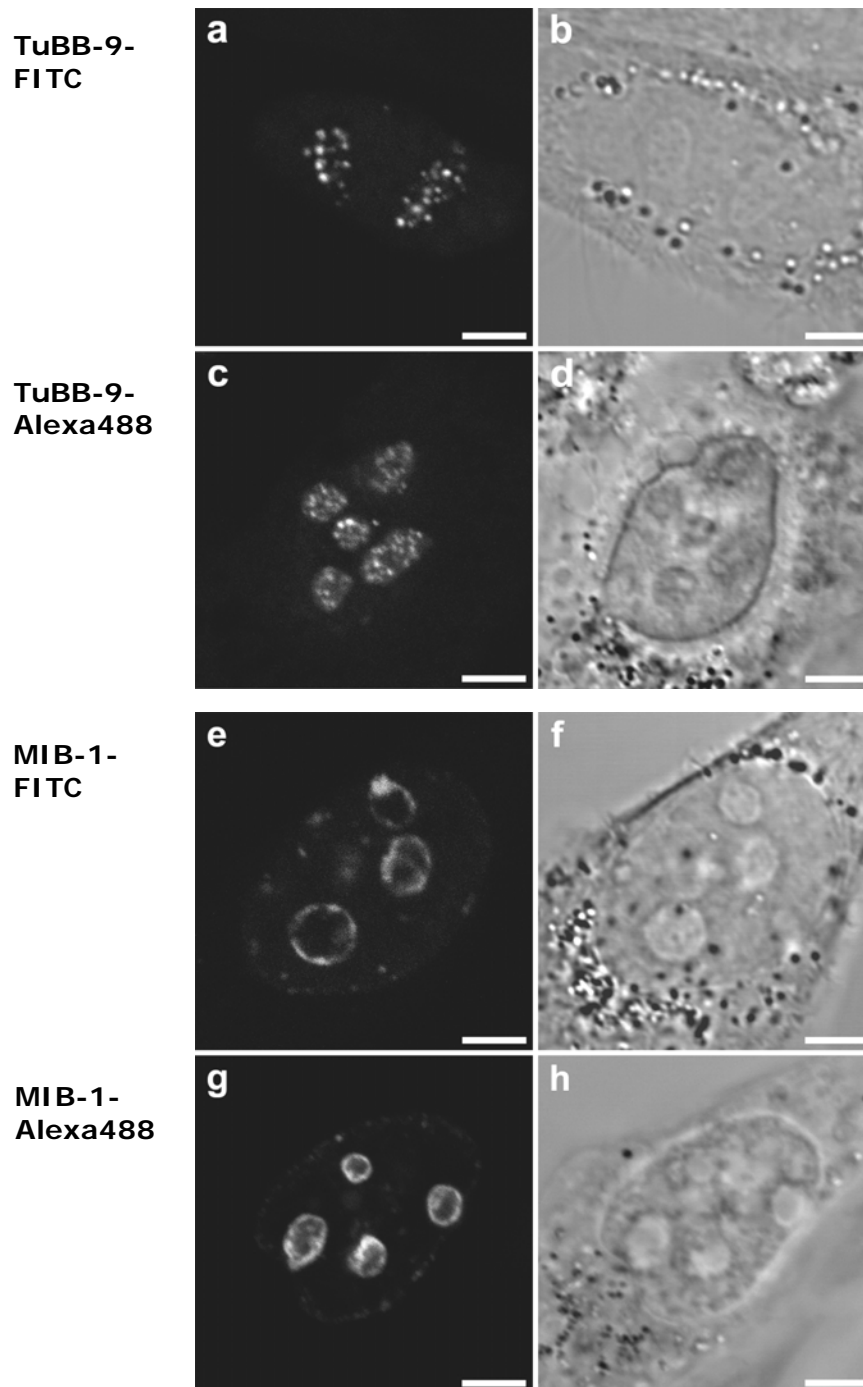
Der für den Blot verwendete Sekundärantikörper erkannte außer dem Mcm3-Primärantikörper auch die ursprünglich für die CALI Behandlung eingesetzten MIB-1- und TuBB-9-Antikörper. In Abbildung 3.25 sind bei ca. 50 kDa die schweren Ketten dieser Antikörper zu erkennen. In den bestrahlten Proben erschienen diese Banden schwächer (Spuren 6 bis 9). Das zweite Kontrollprotein, UBF, ist ein Transkriptionsfaktor für die RNA Polymerase I (RNA Pol I) und notwendig für die Transkription der ribosomalen RNA Gene (rDNA) (Bell *et al.*, 1988). Wie Mcm3, blieb auch die charakteristische UBF-Doppelbande bei 94 und 97 kDa nach der CALI-Behandlung gegen pKi-67 erhalten. Die bestrahlten Proben zeigten zusätzlich aber eine Reaktivität im Bereich oberhalb von 150 kDa.



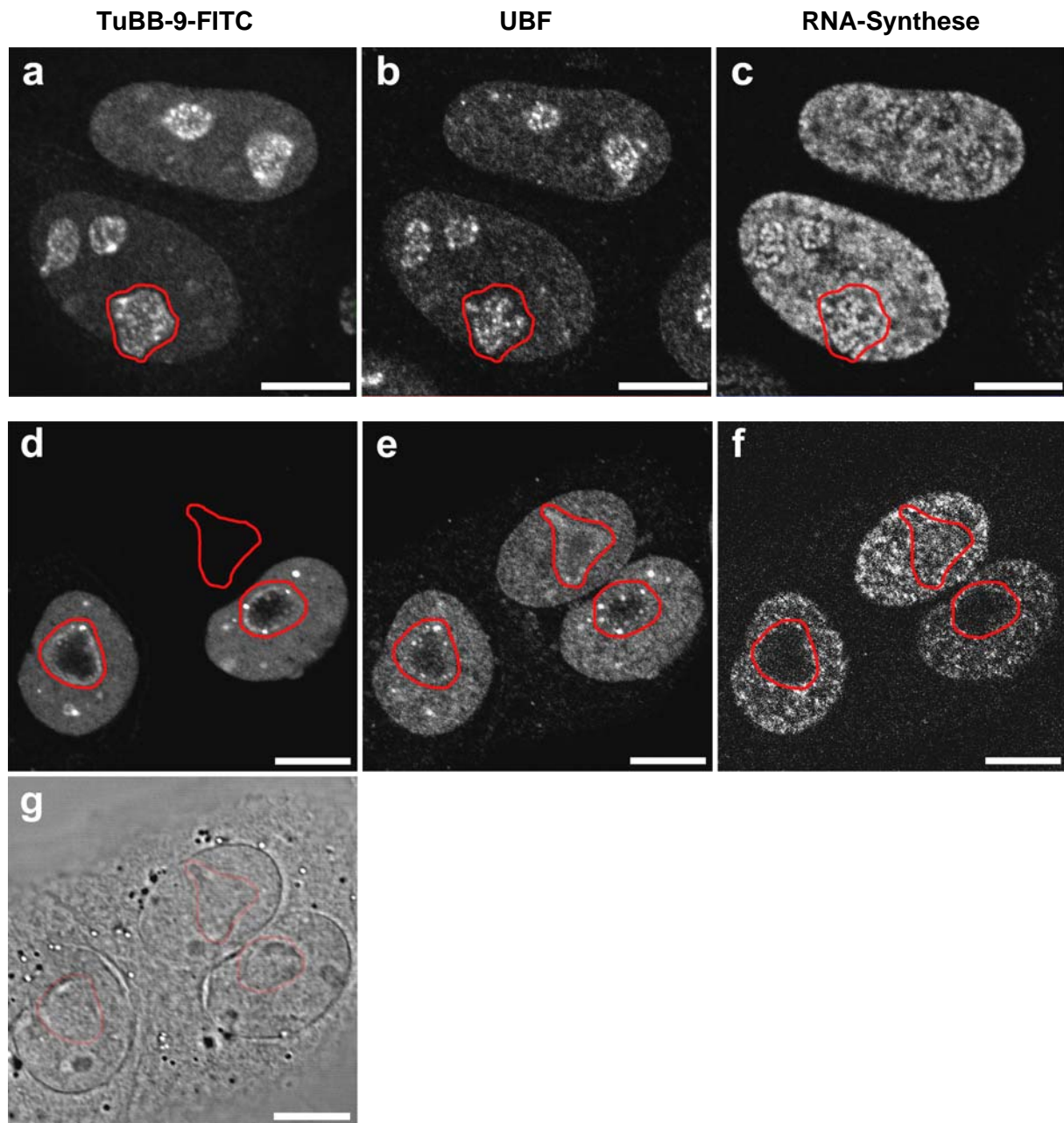
**Abb. 3.25** CALI-Effekte *in vitro*. HEp-2-Zelllysat wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert wie oberhalb der Bahnen angegeben (A: Alexa 488-markiert; F: FITC-markiert) und im Immunoblot analysiert vor (Spuren 1-5) und nach (Spuren 6-9) Bestrahlung mit dem Argonlaser bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  für 15 min. **(a)** Nachweis von pKi-67 mit dem MIB-1-Antikörper, **(b)** Nachweis des Mcm3-Proteins, **(c)** Nachweis von UBF. Die Zahlen am linken Bildrand geben die Positionen der Größenstandards an. Doppelpfeile markieren die charakteristischen pKi-67-Hauptbanden und die UBF-Doppelbande. Nach Bestrahlung ist für pKi-67 und UBF eine Reaktivität im höhermolekularen Bereich erkennbar. Die Hauptbanden von Mcm3 und UBF sind nach CALI gegen pKi-67 noch deutlich erkennbar.

### 3.4.2 Proteininaktivierung in lebenden Zellen

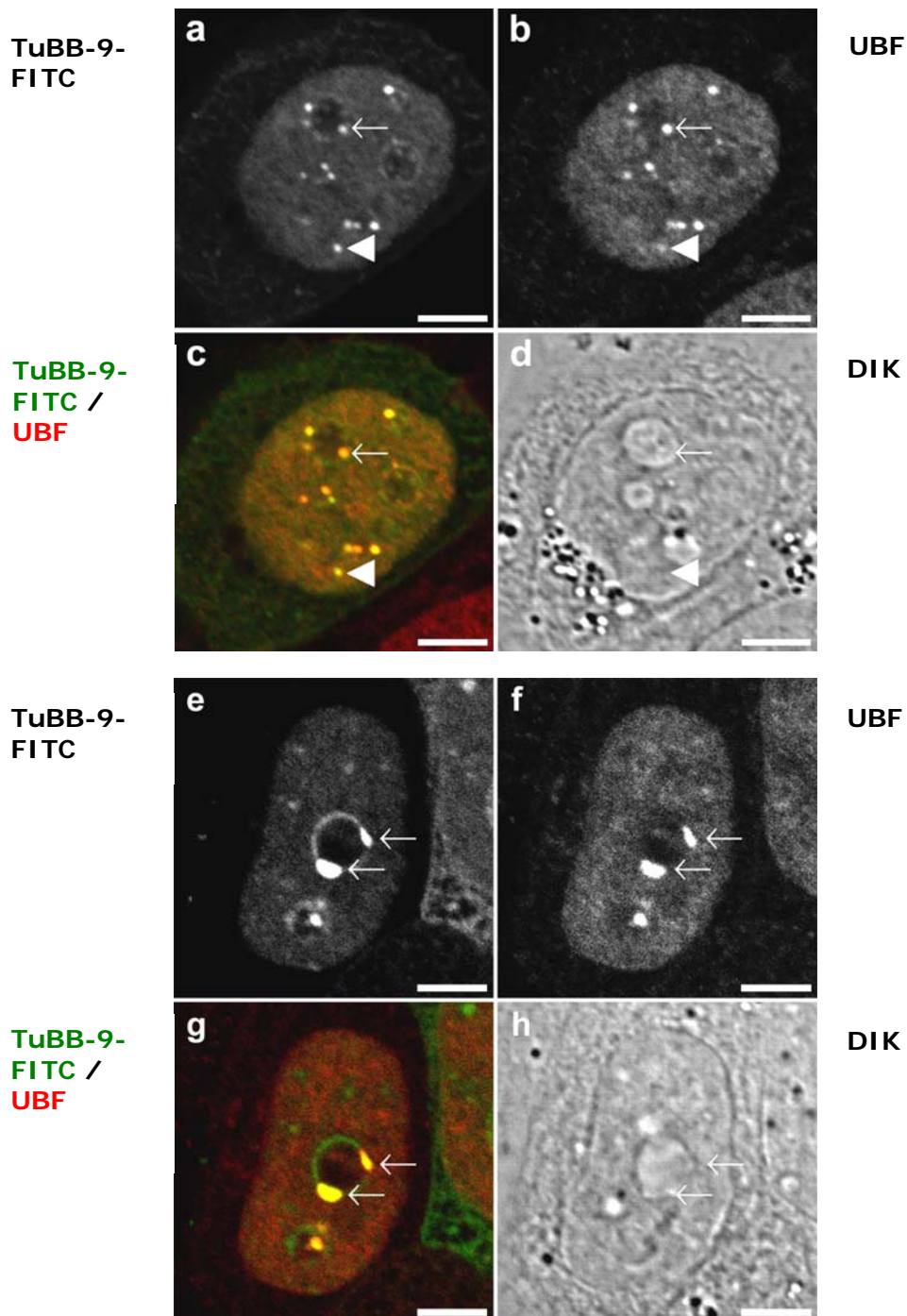
Um die Wirkung der Fluoreszenz-Antikörperkonjugate auf ihre Zielproteine nach Bestrahlung in lebenden Zellen untersuchen zu können, wurden die Konjugate in HEp-2- Zellkerne mikroinjiziert. Wie auch in den *in vitro* Versuchen wurden die beiden anti-pKi-67 Antikörper TuBB-9 und MIB-1 verwendet, jeweils mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und Alexa Fluor 488 konjugiert. Abbildung 3.26 zeigt die Lokalisation der Antikörperkonjugate eine Stunde nach Kernmikroinjektion. Der MIB-1-Antikörper färbte in den Zellen den Rand der Nukleoli, während TuBB-9 in der Mehrzahl der Zellen in Punkten innerhalb der Nukleoli lokalisierte. Diese Verteilung entspricht im Wesentlichen den zuvor beschriebenen Färbemustern des Ki-67-Proteins mit den entsprechenden Antikörpern (Heyden, 1997; Bullwinkel, 2005). Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die mikroinjizierten Antikörper in lebenden Zellen an ihr Antigen binden und dessen räumliche Verteilung nicht entscheidend verändern. Nach Bestrahlung mit Fluoreszenzlicht am Mikroskop kam es in den meisten Zellen zu einer ausgeprägten Umverteilung des Ki-67-Proteins. Der FITC-markierte TuBB-9-Antikörper lokalisierte nach einer Bestrahlung von 90 s in ca. 70% der Zellen in punktförmigen Strukturen am Rande der Nukleoli und teilweise auch im Nukleoplasma. Der Vergleich zwischen unbestrahlten (Abb. 3.27 a) und bestrahlten Zellen (Abb. 3.27 d) zeigte dies deutlich. Auch bei UBF kam es nach Bestrahlung zu einer Umverteilung in dieselben punktförmigen Strukturen wie pKi-67 (vgl. Abb. 3.27 b mit e). Interessanterweise zeigt der Nachweis der RNA-Synthese mit 5'-FU, dass nach Bestrahlung die in den Nukleoli stattfindende rRNA-Synthese in den mikroinjizierten Zellen inhibiert ist, während die RNA-Synthese außerhalb der Nukleoli kaum beeinflusst wurde (Abb. 3.27 f). Die rRNA-Synthese nicht injizierter Zellen wurde durch die Bestrahlung nicht beeinträchtigt (vergl. Abb. 3.27 f mit d).



**Abb. 3.26** Lokalisation der Fluoreszenz-Antikörperkonjugate in lebenden Zellen (HEp-2) 1 h nach Kern-Mikroinjektion. TuBB-9-FITC (**a**) und TuBB-9-Alexa 488 (**c**) färben punktförmige Strukturen innerhalb der Nukleoli. MIB-1-FITC (**e**) und MIB-1-Alexa 488 (**g**) färben den äußeren Bereich der Nukleoli. **b**, **d**, **f**, **h** zeigen jeweils die entsprechenden DIK-Aufnahmen, in denen die Lage des Zellkerns und der Nukleoli zu erkennen ist. Balken 5  $\mu\text{m}$ .



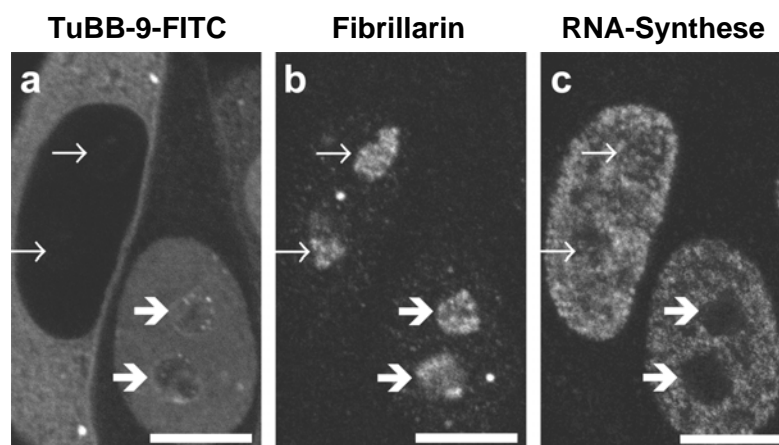
**Abb. 3.27** CALI mit FITC-markiertem TuBB-9-Antikörper gegen pKi-67 führt zur Umverteilung von nukleolären Proteinen und zur Inhibierung der nukleolären rRNA-Synthese. In unbestrahlten HEp-2-Kontroll-Zellen (**a-c**) lagert sich der mikroinjizierte TuBB-9-FITC-Antikörper (**a**) in punktförmigen Strukturen innerhalb der Nukleoli an (ein Nukleolus rot umrandet in **a-f**) und kolokalisiert hier mit UBF (**b**). Im Gegensatz hierzu zeigen Zellen die 90 s mit 570 mW/cm<sup>2</sup> bestrahlt wurden (**d-f**), eine deutlich erkennbare Umverteilung des mikroinjizierten Antikörpers zu größeren Punkten innerhalb des Kerns (**d**). Auch UBF kolokalisiert nach Bestrahlung vollständig in diesen Strukturen (**e**). Während Kontroll-Zellen eine ausgeprägte RNA-Synthese sowohl im Nukleoplasma als auch in den Nukleoli zeigen (**c**), führt die Bestrahlung von mikroinjizierten Zellen zu einer vollständigen Inhibierung der nukleolären rRNA-Synthese, während die RNA-Synthese im Nukleoplasma weitgehend unbeeinträchtigt bleibt (**f**). In der DIK-Aufnahme (**g**) ist die Lage der Zellkerne und der Nukleoli in den bestrahlten Zellen zu erkennen. Balken 10  $\mu$ m.



**Abb. 3.28** Umverteilung des mikroinjizierten TuBB-9-FITC und von UBF nach einer Bestrahlung von 90s ( $570 \text{ mJ/cm}^2$ ). Der Antikörper TuBB-9-FITC lokalisiert in Punkten am Rande der Nukleoli (**a**, Pfeil) oder im Nukleoplasma (Pfeilkopf); oft formen sich größere Komplexe (**e**, Pfeile). UBF kolokalisiert nach Bestrahlung in denselben Strukturen (**b**, **f**). Dies wird besonders deutlich in der Überlagerung von TuBB-9-FITC (grün) und UBF (rot) (**c**, **g**), wobei kolokalisierende Bereiche gelb erscheinen. Balken  $5 \mu\text{m}$ .

Abbildung 3.28 zeigt die Umverteilung und Kolokalisation von pKi-67 und UBF nach Bestrahlung in höherer Vergrößerung. Zu erkennen ist die Lokalisation von pKi-67 und UBF in punktförmigen Strukturen am Rande der Nukleoli (Pfeile, Abb. 3.28 **a-d**) und im Nukleoplasma (Pfeilköpfe, **a-d**). In einigen Zellen kam es zur Umverteilung in größere Komplexe am Rande der Nukleoli (Pfeile, **e-h**).

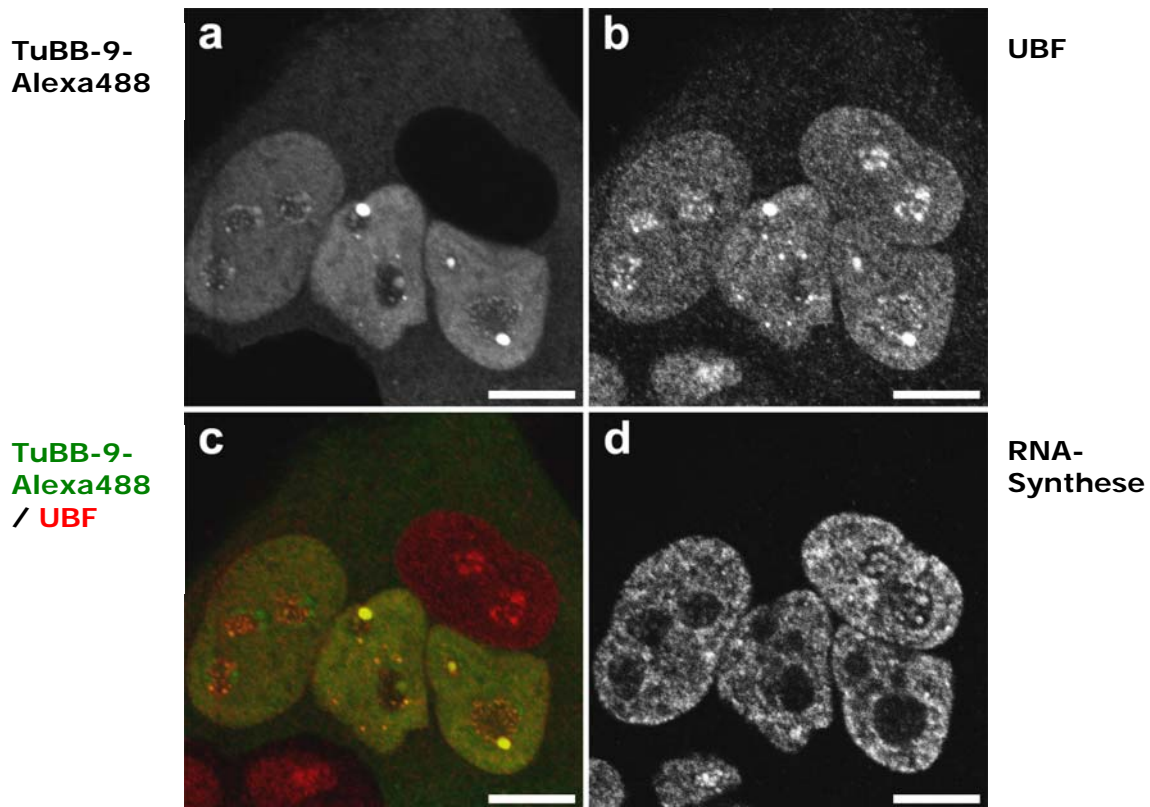
Um zu überprüfen, ob es nach CALI zu einer generellen Umverteilung nukleolärer Proteine kommt, wurde in den bestrahlten Zellen die Lokalisation des Fibrillarins untersucht. Fibrillarin befindet sich in den sogenannten. *dense fibrillar components* (DFC) der Nukleoli und ist an der frühen rRNA-Prozessierung beteiligt (Ochs *et al.*, 1985, Biggiogera *et al.*, 2001, Hernandez-Verdun und Roussel, 2003). Abb. 3.29 zeigt, dass CALI mit dem TuBB-9-Antikörper unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Fibrillarin-Lokalisation hat, während die RNA-Synthese in den Nukleoli spezifisch gehemmt ist.



**Abb. 3.29** Nach CALI mit FITC-markiertem TuBB-9-Antikörper bleibt in den Nukleoli die Fibrillarin-Lokalisation erhalten (**b**) während hier die RNA-Synthese gehemmt ist (**c**). Der Zelle am linken Bildrand wurde in das Zytoplasma injiziert, TuBB-9-FITC lokalisiert hier nicht in den Nukleoli (**a**, dünne Pfeile). Die Zelle zeigt die nukleoläre Fibrillarin-Lokalisation (**b**). Die RNA-Synthese findet in dieser Zelle im gesamten Kern statt (**c**). Der Zelle am rechten Bildrand wurde in den Zellkern injiziert, TuBB-9-FITC zeigt die typische Lokalisation nach CALI in punktförmigen Strukturen am Rande der Nukleoli (**a**, dicke Pfeile). Auch hier bleibt die Fibrillarin-Lokalisation erhalten (**b**), während die RNA-Synthese in den Nukleoli gehemmt ist (**c**). Bestrahlung 15 min bei 570 mJ/cm<sup>2</sup>. Balken 10 µm.

Wurde der TuBB-9-Antikörper mit Alexa Fluor 488 konjugiert, konnte in entsprechenden Experimenten ebenfalls eine spezifische Inhibierung der rRNA-Synthese in den Nukleoli erreicht werden (Abb. 3.30). Die Bestrahlungsdauer musste bei den Alexa-Konjugaten jedoch 10- bis 15-fach erhöht werden, um die gleichen Effekte wie bei den FITC-Konjugaten hervorzurufen. Auch hier kam es in der Mehrzahl der Zellen zu einer Umverteilung von pKi-67 und auch UBF in punktförmige Strukturen am Rande der Nukleoli, deren

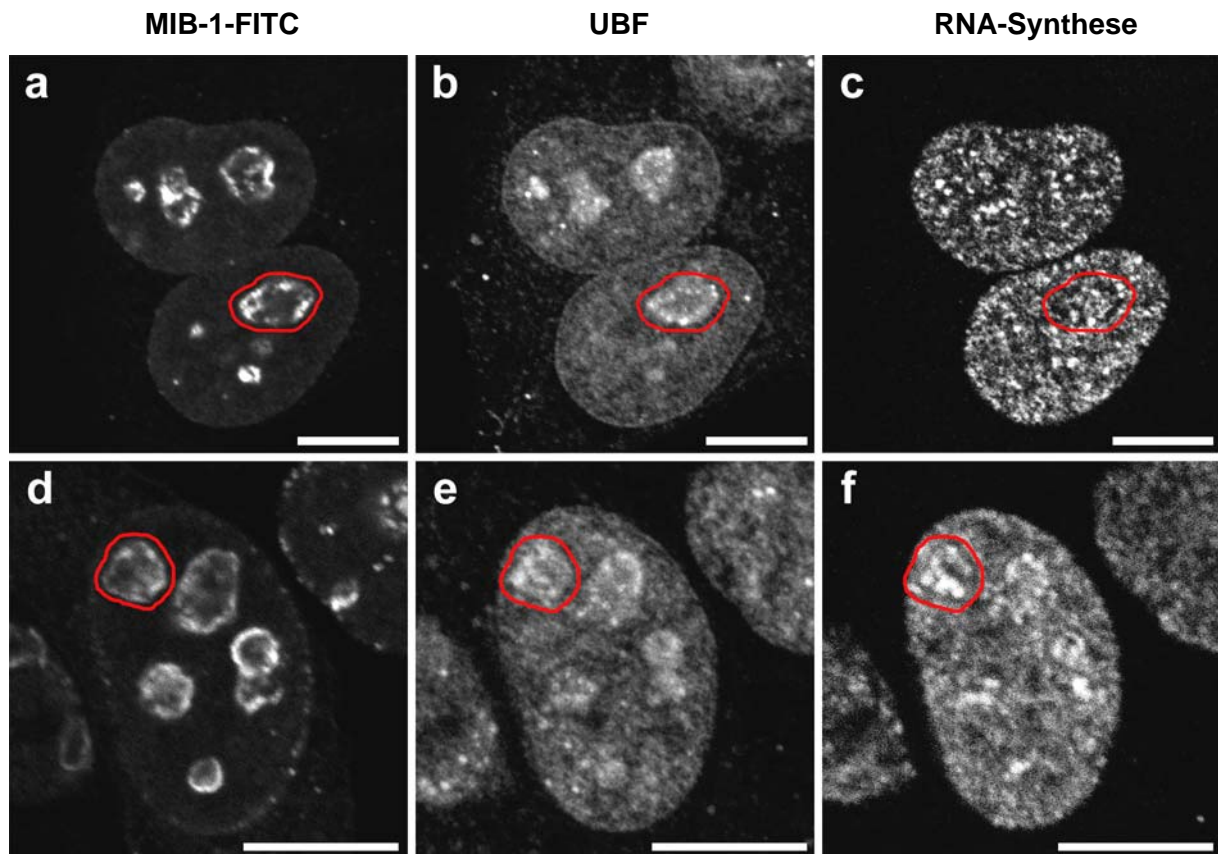
Kolokalisation gut in der Überlagerung der Färbungen in Abbildung 3.30 c zu erkennen ist. Mit den Alexa-Konjugaten konnte wie mit den FITC-Konjugaten eine Inhibierung der rRNA-Synthese in den Nukleoli beobachtet werden, während die RNA-Synthese im umgebenden Nukleoplasma kaum beeinträchtigt wurde (Abb. 3.30 d).



**Abb. 3.30** Nach einer Bestrahlung von 15 min am Fluoreszenzmikroskop ( $570 \text{ mJ/cm}^2$ ) zeigt auch der mikroinjizierte TuBB-9-Alexa488 eine Umverteilung in große punktförmige Strukturen am Randbereich der Nukleoli (a). UBF zeigt ebenfalls diese Umverteilung und kolokalisiert nach Bestrahlung in denselben Strukturen (b). Dies wird insbesondere an der Gelb-Färbung in der Überlagerung der Aufnahmen deutlich (c), TuBB-9-Alexa 488 ist hier grün und UBF rot dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die rRNA-Synthese in den Nukleoli der mikroinjizierten Zellen inhibiert wurde, während die RNA-Synthese im umgebenden Nukleoplasma kaum beeinträchtigt ist (d). Balken  $10 \mu\text{m}$ .

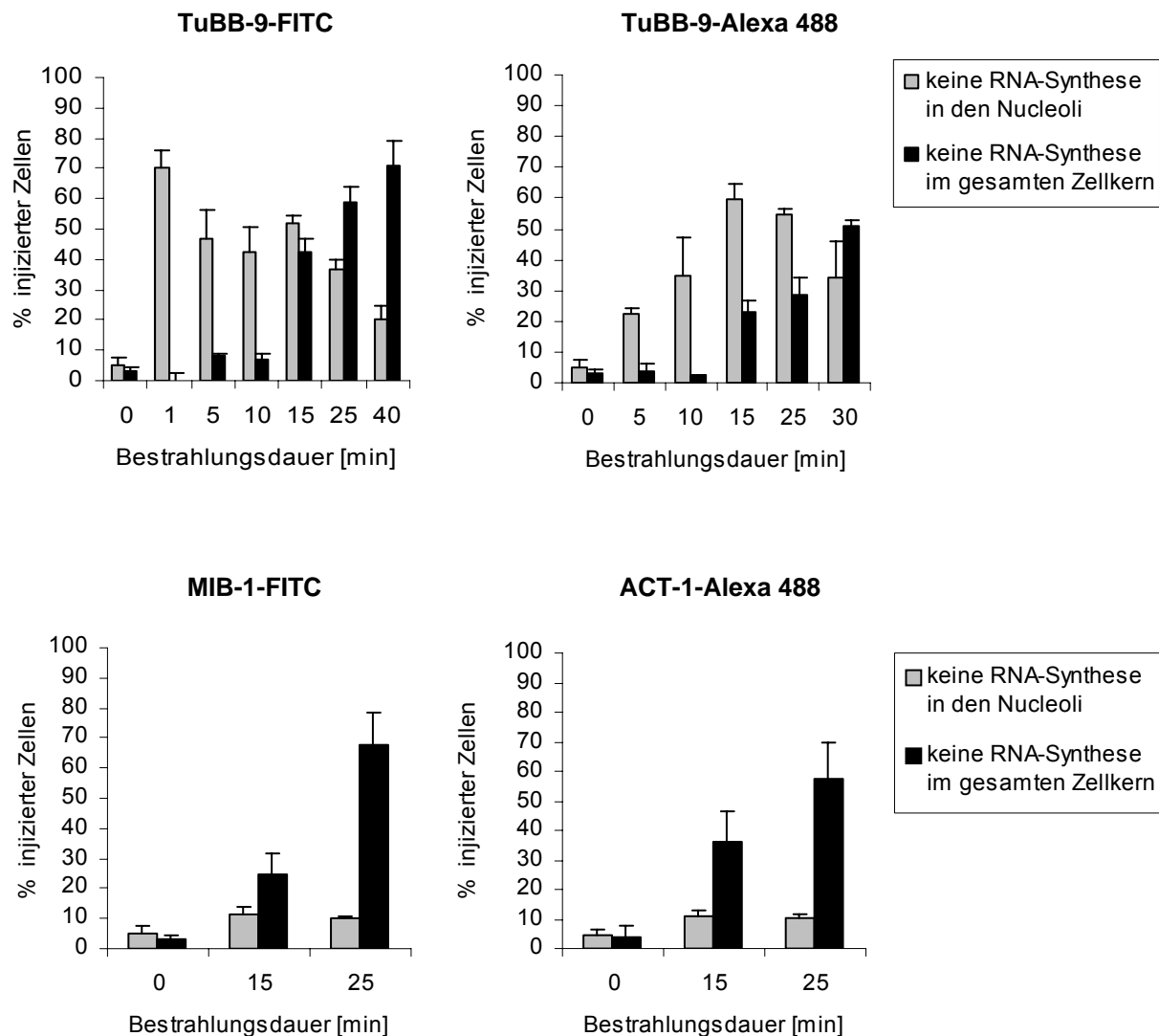
Der MIB-1-Antikörper wurde ebenfalls sowohl an FITC als auch an Alexa Fluor 488 gekoppelt und in den Kern von HEP-2-Zellen mikroinjiziert. Weder mit den FITC noch mit den Alexa Fluor 488-Konjugaten kam es zu einer spezifischen Inhibierung der nukleolären rRNA-Synthese unter den entsprechenden Bestrahlungsbedingungen. Abbildung 3.31 a zeigt unbestrahlte Zellen nach MIB-1-FITC-Kerninjektion. Zu erkennen ist die für MIB-1 typische Lokalisation am Rande der Nukleoli, UBF liegt in punktförmigen Strukturen innerhalb der Nukleoli vor und die RNA-Synthese findet im gesamten Zellkern statt (Abb. 3.31 a-c). Nach Bestrahlung erschien das MIB-1-Muster unverändert. Im Gegensatz zu TuBB-9-vermittelter

CALI zeigte hier UBF keine Umverteilung und die RNA-Synthese innerhalb der Nukleoli wurde nicht beeinträchtigt (Abb. 3.31 d-f).



**Abb. 3.31** CALI mit FITC-markiertem MIB-1-Antikörper führt nicht zu einer Umverteilung des Antikörpers und hat keinen Einfluss auf die rRNA-Synthese. In unbestrahlten HEP-2-Kontroll-Zellen (**a-c**) lagert sich der mikroinjizierte Antikörper (**a**) vor allem in den Randbereichen der Nukleoli an (ein Nukleolusbereich ist rot umrandet in **a-f**), UBF liegt in punktförmigen Strukturen innerhalb der Nukleoli vor (**b**) und die RNA-Synthese findet im gesamten Nukleus statt (**c**). Nach einer Bestrahlung von 90 s am Fluoreszenzmikroskop ( $570 \text{ mJ/cm}^2$ ) ist keine Umverteilung von MIB-1-FITC (**d**) und UBF (**e**) oder ein Einfluss auf die rRNA-Synthese (**f**) erkennbar. Balken  $10 \mu\text{m}$ .

Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurden die Färbemuster von mikroinjizierten und bestrahlten Zellen nach Färbung der RNA-Synthese von zwei Personen unabhängig voneinander ausgezählt. Dabei wurde unter den kerninjizierten Zellen einerseits der Anteil der Zellen ermittelt, bei dem die RNA-Synthese in den Nukleoli unterdrückt war, die Synthese im umgebenden Nukleoplasma jedoch erhalten blieb und andererseits der Anteil der Zellen, der im gesamten Kern keine RNA-Synthese zeigte. Zur Kontrolle wurden die Antikörperkonjugate MIB-1-FITC und ACT-1-Alexa 488 in HEP-2-Zellen mikroinjiziert und derselben CALI-Behandlung unterzogen. Die Mittelwerte der jeweils drei Auszählungen sind in Abbildung 3.32 dargestellt. Eine Bestrahlungsdosis von  $30 \text{ J/cm}^2$  - dies entspricht einer



**Abb. 3.32** Hemmung der RNA-Synthese nach CALI-Behandlung. In die Zellkerne von HEp-2 Zellen wurden die angegebenen Fluoreszenzkonjugate injiziert. Bei der Erfassung der RNA-Synthese wurde zwischen Hemmung der RNA-Synthese in den Nucleoli und Hemmung im gesamten Kern unterschieden.

Bestrahlungszeit von einer Minute mit dem 20-fach Objektiv - reichte bei den TuBB-9-FITC-Konjugaten (Abb. 3.32 a) bereits aus, um bei ca. 70 % der Zellen die RNA-Synthese in den Nucleoli zu inhibieren. Der Anteil der Zellen ohne RNA-Synthese im gesamten Kern lag hier bei unter einem Prozent. Bei einer Erhöhung der Bestrahlungsdosis nahm der Anteil der Zellen ab, bei dem ausschließlich die rRNA-Synthese der Nucleoli inhibiert wurde, während der Anteil der Zellen mit einer Hemmung der RNA-Synthese im gesamten Kern stark zunahm.

Entsprechende Experimente mit den TuBB-9-Alexa 488-Konjugaten (Abb. 3.32 b) zeigten bei einer Bestrahlungsdauer von 5 min (Bestrahlungsdosis  $150 \text{ J/cm}^2$ ) einen Anteil von über

---

20 % der Zellen ohne rRNA-Synthese in den Nukleoli. Dieser Wert stieg bei Erhöhung der Bestrahlungsdauer auf 15 min ( $450 \text{ J/cm}^2$ ) auf ca. 60 % an. Gleichzeitig kam es jedoch auch hier zu einem Anstieg der Zellen mit vollständigem Verlust der RNA-Synthese auf über 20 %. Wie bei den FITC-Konjugaten führte eine weitere Erhöhung der Bestrahlungsdosis zu einer Abnahme des Anteils der Zellen mit ausschließlicher Hemmung der nukleolären rRNA-Synthese, während die Hemmung der RNA-Synthese im gesamten Nukleus weiter anstieg.

Die Kontrollen MIB-1-FITC und ACT-1-Alexa 488 zeigten mit steigender Bestrahlungsdosis eine mit den jeweiligen TuBB-9-Konjugaten vergleichbare Zunahme der Zellen mit inhibierter RNA-Synthese im gesamten Kern. Eine kennzeichnende Zunahme der nur auf die Nukleoli bezogenen Hemmung der RNA-Synthese war hier nicht zu beobachten.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich zwischen Nanopartikel- und Chromophor-vermittelten Effekten unter Bestrahlung auf Zellen und Proteine. Dabei sollte die Verwendungsmöglichkeit für eine Funktionsanalyse des Ki-67-Proteins untersucht werden. Die Ergebnisse der Nanopartikel-vermittelten Effekte werden in den Kapiteln 4.1 bis 4.3 und die der Chromophor-vermittelten Effekte in den Kapiteln 4.4 bis 4.7 diskutiert.

### 4.1 Wirkung von NALI auf Proteine *in vitro*

Die Versuche zur Proteininaktivierung mit Hilfe von Antikörper-Goldkonjugaten im Zelllysat zeigten nach Laserbestrahlung deutlich eine Fragmentierung des Zielproteins Ki-67 in kleinere Bruchstücke. NALI mit 15Au-MIB-1 führte nicht nur zu einer Zerstörung des MIB-1-Epitops, wie der Verlust der pKi-67-Hauptbanden auch im Nachweis mit verschiedenen Antikörpern in Immunoblots nach Lyastbestrahlung zeigte. Dabei wurden Antikörper verwendet, die Epitope an unterschiedlichsten Stellen des Ki-67-Proteins erkennen. Es konnte für die Fragmentierung keine Präferenz für Proteinbruchstücke bestimmter Größen festgestellt werden. Eine derartige Zerstörung der Proteinstruktur lässt weniger auf thermische Denaturierung, sondern vielmehr auf mechanische Zerstörung durch Kavitationsblasen als Ursache schließen. Die eingesetzten Bestrahlungen von  $1,5 \text{ J/cm}^2$  lassen Temperaturerhöhungen von über 2000 K auf der Partikeloberfläche erwarten (Radt, 2002). Demzufolge wird schon während des Pulses eine Temperatur oberhalb des spinodalen Punktes von Wasser erreicht. Dies führt zu explosiver Verdampfung und der Bildung von rasch expandierenden Blasen, die nach Abkühlung wieder in sich zusammenfallen. Derartige Phänomene wurden auch um laserbestrahlte, einige Mikrometer große Melanosomen mit Hilfe von Kurzzeitphotographie beobachtet (Neumann und Brinkmann, 2005), ließen sich

aber bei Nanopartikeln wegen mangelnder Auflösung nicht direkt nachweisen. Ein indirekter Nachweis war jedoch mit thermischer Mikroskopie (Lapotko und Lukianova, 2005) oder zeitaufgelöster Röntgenstreuung möglich. Die erzeugten Blasen besitzen einen Durchmesser im Nanometerbereich (Kotaidis und Plech, 2005; Kotaidis *et al.* 2006). Das Entstehen der Blase während des Laserpulses führt zu einer Entkopplung des erhitzten Partikels von der umgebenden Flüssigkeit. Dies begrenzt wahrscheinlich die Blasengröße, wie Experimente mit Mikrometerpartikeln nahe legen (Neumann und Brinkmann, 2006). Deshalb sind selbst bei hohen Bestrahlungen die Blasen kleiner als die mit ca. 500 nm begrenzte Auflösung der kurzzeitphotographischen Aufnahmen dieser Arbeit. Die geringe Größe dieser Blasen hat auch eine enge Beschränkung der Schadensreichweite zur Folge. Der Wirkradius scheint für eine selektive Proteininaktivierung ausreichend lokal begrenzt zu sein. Dies zeigt auch der Nachweis des pKi-67 im Zelllysate, das vor der Bestrahlung mit 15Au-Berh2-Konjugaten inkubiert wurde. NALI mit 15Au-Berh2-Konjugaten zeigte keine Beeinflussung der pKi-67-Hauptbanden im Immunoblot. Die Konzentration der 15Au-BerH2-Konjugate ( $1,26 \cdot 10^{13}$  Partikel/ml Lysat) war mit der der 15Au-MIB-1-Konjugate ( $1,47 \cdot 10^{13}$  Partikel/ml Lysat) vergleichbar. Der mittlere Abstand der Konjugate betrug bei diesen Konzentration ca. 400 nm, d.h. dass die Präzision der Effekte deutlich unter diesem Wert liegt. Die Spezifität der NALI-Effekte konnte auch durch den Nachweis des nicht zerstörten Mcm3-Proteins im bestrahlten Zelllysate nach pKi-67-NALI demonstriert werden. In derselben Versuchsreihe zeigt der Nachweis des MIB-1-Antikörpers, der an die Goldpartikel konjugiert war, nach Bestrahlung eine Schwächung der Banden im Immunoblot. Die Tatsache, dass die Antikörperbanden nicht vollständig verschwinden, ist sehr wahrscheinlich auf freie MIB-1 Antikörper zurückzuführen, die sich von den Goldpartikeln abgelöst haben. Eine gewisse Ablösung von Proteinen von der Goldpartikeloberfläche konnte für Alkalische-Phosphatase-(AP)-Goldkonjugate in anderen Experimenten nach Bestimmung der AP-Aktivität im Überstand zentrifugierter Konjugatlösung nachgewiesen werden (Dr. Gereon Hüttmann, Institut für biomedizinische Optik, Universität Lübeck, persönliche Mitteilung). Versuche zum Wirkradius laserbestrahlter Goldpartikel, in denen Enzyme mit Antikörpern in einem gewissen Abstand von der Oberfläche an Goldpartikel gebunden wurden, zeigten mit zunehmendem Abstand zu den Goldpartikeln einen schnellen Abfall der Wirkung auf Proteine (Radt, 2002; Pitsillides *et al.*, 2003). Auch die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass laserbestrahlte Goldpartikel prinzipiell in der Lage sind, Proteine mit hoher Selektivität zu inaktivieren. Besonders große Proteine wie pKi-67 können dabei komplett zerstört werden.

## 4.2 Selektive Zellschädigung mit Hilfe von NALI

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten nach Laserbestrahlung von Goldnanopartikeln eine Schädigung von Zellen mit hoher Selektivität. Die Möglichkeit laserbestrahlte Goldpartikel zur Zellinaktivierung einsetzen zu können, wurde zuerst von Radt (2002) gezeigt. Mit Antikörper-Goldkonjugaten von 15 nm Durchmesser konnten selektiv Tumorzellen geschädigt werden. Pitsillides *et al.* (2003) zeigten Zellschädigung mit Antikörper-konjugierten 0,83- $\mu\text{m}$ -Eisenoxidpartikeln sowie mit 30-nm-Goldpartikeln. Mit Hilfe der Eisenoxidpartikel konnten bis zu 80 % der Zellen zerstört werden. Die Goldpartikelkonjugate führten bei Bestrahlungen von 100 Laserpulsen ( $0,5 \text{ J/cm}^2$ ) bei 95 % der Zellen zum Verlust der Vitalität. Zharov *et al.* (2005) zeigten die Eliminierung von Bakterien (*Staphylococcus aureus*) mit 40-nm-Antikörper-Goldkonjugaten. Dabei konnte die 30-40 nm dicke Zellwand der Bakterien mit Clustern aus mehreren Partikeln zerstört werden.

In vorliegender Arbeit konnte die Selektivität der Zellschädigung mit verschiedenen Zelllinien und unterschiedlichen Zielproteinen zur Goldkonjugatbindung demonstriert werden. Primäres Ziel bei den durchgeführten Experimenten war die Zellmembran, an die die Nanopartikel gebunden wurden. Bei der zur Schädigung notwendigen Bestrahlung ist mit der Bildung von Kavitationsblasen, die eine mechanische Zerstörung der Zellmembranen bewirken können, zu rechnen. Hierfür spricht auch die unmittelbar nach Bestrahlung einsetzende Permeabilisierung.

Die Selektivität Nanopartikel-vermittelter Zellschädigung wurde in Mischkulturexperimenten gezeigt, bei denen der theoretische Abstand zwischen den Zellen  $21,5 \mu\text{m}$  vom Mittelpunkt einer Zelle zum Mittelpunkt der Benachbarten betrug. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Zellen während des Verfahrens, das insgesamt mehrere Minuten dauerte, am Boden des Bestrahlungsträgers sedimentierten und sich aufgrund dessen in direktem Kontakt befanden. Für die Vermeidung unspezifischer Zellschädigung war eine Entfernung ungebundener Konjugate durch Zentrifugation nicht notwendig. Die Versuche mit Lymphozyten (Konzentration:  $10^5$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ), denen 5 % L-428-Zellen zugesetzt wurden, zeigten die Möglichkeit auch kleine Sub-Zellpopulationen mit Hilfe von laserbestrahlten Nanopartikeln zu schädigen. Unter den CD30-positiven Zellen waren nach Bestrahlung noch 4 % nicht eindeutig als tot bestimmbar. Die Abnahme vitaler CD30-negativer Zellen von 98,7 % auf 93,4 % ist wahrscheinlich auf die hohe Bestrahlung mit 20 Pulsen zurückzuführen. L-428-Zellen zeigten in Abwesenheit von Goldkonjugaten bei Erhöhung der Pulsanzahl ebenfalls

eine Zunahme geschädigter Zellen. Für eine Schonung benachbarter Zellen bei gleichzeitiger effektiver Schädigung der Zielzellen ist eine mehrmalige NALI-Behandlung bei niedrigerer Energie daher wahrscheinlich vorteilhaft.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit einer kürzlich erschienenen Publikation von Lapotko *et al.* (2006), die ebenfalls eine sehr selektive Goldnanopartikel-vermittelte Zellschädigung zeigen. Hierdurch konnte eine Tumorzelllinie nach Inkubation mit 30-nm-Goldpartikeln und anschließender Bestrahlung mit  $5 \text{ J/cm}^2$  vollständig geschädigt werden. Lymphoblasten in einer Mischkultur mit Stammzellen konnten selektiv geschädigt werden, wobei der lebend-Anteil der umgebenden Zellen um 16 % abnahm.

Durch die Möglichkeit Zellen mit großer Selektivität zu eliminieren und dabei umgebende Zellen nicht gravierend zu beeinflussen, erscheint die Frage nach einer Anwendung im wissenschaftlichen oder klinischen Bereich interessant.

Eine Anwendung der selektiven Zelleliminierung ist u.a. bei der Aufreinigung von Zellkulturen von aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) hervorgegangenen Vorläuferzellen denkbar. Bei der Differenzierung von ES-Zellen z.B. zu neuronalen Vorläuferzellen können verbleibende pluripotente Zellen auch zu anderen Vorläuferzellen differenzieren und die Kultur verunreinigen. Dies könnte durch eine gezielte Negativ-Selektion der pluripotenten Zellen über Antikörper-Goldkonjugate gegen Oberflächenmarker verhindert werden.

Eine Anwendung im klinischen Bereich wäre bei der autologen Knochenmarkspende denkbar, die bei der Behandlung von Leukämien oder malignen Lymphomen eingesetzt wird. Eigenes Knochenmark des Patienten könnte *ex vivo* mit Hilfe von laserbestrahlten Antikörper-Goldkonjugaten von Tumorzellen befreit werden und dem Patienten nach erfolgter Chemotherapie zurücktransplantiert werden. Dies würde als Alternative zur Fremdspende das Problem der Gewebeabstoßung und die hiermit verbundene Schwierigkeit der Ausfindung eines geeigneten Spenders erübrigen. Bei einer Anwendung der Goldpartikel im lebenden Organismus stellen sich eine Vielzahl weiterer Fragen zur Toxizität oder der Lokalisation der Partikel im Körper, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sein sollen. Erste Erfahrungen in klinischen Studien über den Einsatz von eisenoxidhaltigen Nanopartikeln zur thermischen Zerstörung von Tumorgewebe mit Hilfe eines magnetischen Wechselfeldes sind in diesem Zusammenhang äußerst interessant (Jordan *et al.*, 1996; Johannsen *et al.*, 2005; Plotkin *et al.*, 2006).

Unterhalb der Schwelle für komplette Zellschädigung wurde eine transiente Permeabilisierung der Zellmembran beobachtet. Diese ermöglichte sowohl das Einschleusen von 10-kDa-FITC-Dextran, als auch die Aufnahme von Antikörperkonjugaten. In über 30 % der L-428-Zellen konnten fluoreszenzmarkierte Antikörper eingebracht werden. Interessant wäre eine Einbringung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern für eine anschließende CALI-Bestrahlung. So könnten die in den Abschnitten 4.4 bis 4.7 beschriebenen CALI-Versuche *in vivo* in einer großen Anzahl von Zellen durchgeführt werden, da die Quantität injizierter Zellen bisher aufgrund der Mikroinjektionstechnik limitiert blieb. In späteren Versuchen müsste insbesondere untersucht werden, ob die Menge der eingebrachten Antikörper für eine CALI-Behandlung ausreicht. Für die Einbringung von Plasmiden würde eine Einschleusung von wenigen Kopien genügen, um ein Protein in großer Menge zu exprimieren. Die Einbringung von Plasmiden konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Größe der Plasmide, die ein Molekulargewicht von 3 MDa (4,7 kb, pEGFP-C1) bzw. 2,3 MDa (3,6 kb, pmaxGFP) aufwiesen. Das relativ kleine FITC-Dextran-Molekül mit einem Molekulargewicht von 10 kDa konnte in bis zu 68 % der Zellen eingebracht werden, 150 kDa große Antikörper in bis zu 32 % der Zellen. Die Versuche zeigten die beste Permeabilisierung mit den größten verwendeten Goldpartikeln von 30 nm Durchmesser. Dies impliziert für zukünftige Versuche die Verwendung von größeren Partikeln. Pitsillides *et al.* (2003) zeigten ebenfalls die Einbringung von 10-kDa-FITC-Dextran in Zellen. Sie berichteten von besserer Permeabilisierung mit Hilfe von 20-nm- als mit 30-nm-Goldpartikeln. Allerdings wurden hier die Zellen zunächst mit einem Primäantikörper inkubiert und anschließend Sekundäantikörper-gekoppelte Goldpartikel hinzugegeben, so dass zwischen Zellen und Goldpartikeln ein größerer Abstand bestand. Eine weitere Überprüfung dieser Methode und Optimierung verschiedener Parameter wie Partikelgröße, Abstand der Partikel zur Zelle sowie Stärke der Bestrahlung erscheint sinnvoll, um schließlich genetisches Material oder andere Substanzen in lebende Zellen einbringen zu können.

### 4.3 Inaktivierung intrazellulärer Proteine mit Hilfe von NALI

Ziel der Proteininaktivierung in lebenden Zellen mit Hilfe von Laserbestrahlung von Goldnanopartikeln sollte das Kernprotein pKi-67 sein. An die Antikörper MIB-1 oder TuBB-9 gekoppelte Goldnanopartikel der Größen 6 nm, 15 nm sowie 30 nm wurden den Zellen mikroinjiziert. Während der Mikroinjektion waren Aggregationen der Konjugate und infolgedessen eine Verstopfung der Injektionskanüle problematisch. Erst die Verwendung selbst hergestellter Glaskanülen und ausreichende Verdünnung der Konjugate ( $2,25 \cdot 10^{13}$  bis  $3 \cdot 10^{13}$  Partikel/ml) ermöglichten eine Injektion. Es konnte anschließend jedoch nicht die erwartete Lokalisation der Konjugate in den Nukleoli beobachtet werden. Zytoplasmainjektion führte zu Aggregationen der Konjugate im Zytoplasma, nach Kerninjektion verblieben die Konjugate diffus im Zellkern verteilt. Da mit Hilfe von Sekundärantikörpern teilweise Fluoreszenz an den Zielstrukturen nachgewiesen werden konnte, jedoch mit Hilfe von Silberverstärkungsreagenz kein Gold, spricht dies für eine Ablösung der Antikörper von den Goldpartikeln. Denkbar ist auch ein Austauschprozess von Antikörpern gegen andere zelluläre Proteine. Eine stabilere Kopplung der Antikörper an die Goldpartikel ist durch kovalente Bindungen möglich und wäre für weitere Untersuchungen zur intrazellulären Proteininaktivierung sinnvoll. In Studien, die den Einsatz von Goldnanopartikeln zur intrazellulären Einzelmolekül-Verfolgung untersuchen, werden die Proteine meist ebenfalls kovalent an die Goldpartikel gebunden. So berichteten Shenoy *et al.* (2006) von der Verwendung des Polymers Polyethylenglykol (PEG) als Verbindungsmolekül zwischen Gold und einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen.

Bei DNA-konjugierten Goldpartikeln wurden die Nukleotidstränge über Thiolverbindungen an die Goldpartikel gekoppelt (Csáki *et al.*, 2002). Rosi *et al.* (2006) zeigten mit Hilfe von 13-nm-Antisense(AS)-DNA-Goldkonjugaten über Bindung an intrazelluläre GFP-mRNA eine Herabregulierung der GFP-Expression. Dies impliziert eine grundsätzliche intrazelluläre Adressierbarkeit für Goldkonjugate, auch wenn DNA-beschichtete Partikel nicht direkt mit Protein-konjugierten vergleichbar sind. Es konnte in erwähnter Publikation eine Reduktion der GFP-Expression um bis zu 20 % gemessen werden. Mit konventioneller AS-Behandlung wurde hier nur eine Reduktion um 6 bis 7 % erreicht. Dabei beruhte die Wirkung der Partikel nicht auf Laserbestrahlung, sondern auf einer Stabilisierung der AS-Stränge gegen den Abbau durch DNase. Interessant wäre hier eine Untersuchung, ob durch Laserbestrahlung eine zusätzliche Inaktivierung von mRNA erreicht werden kann.

Neben der Möglichkeit einer kovalenten Immobilisierung der Antikörper auf der Goldoberfläche wäre zur Proteininaktivierung mit Hilfe von Antikörper-Goldkonjugaten möglicherweise ebenfalls eine Verwendung kleinerer Goldpartikel sinnvoll. Im Durchschnitt sind die kleinsten verwendeten 6 nm-Partikel nach Angaben der Herstellerfirma Aurion noch mit vier IgG-Molekülen konjugiert. Dies würde einer Proteinmasse von über 600 kDa entsprechen. Im Gegensatz hierzu lagern sich im Schnitt drei Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1 nm an ein IgG-Molekül an, so dass hier z.B. etwaige sterische Behinderungen bei der Lokalisation an der Zielstruktur vermindert werden könnten. Allerdings benötigen kleinere Partikel höhere Bestrahlungsenergien, um vergleichbare Schäden hervorrufen zu können.

Aufgrund der nicht korrekten Lokalisation der Antikörper-Goldkonjugate und daraus folgenden unspezifischen Effekten unter Bestrahlung wurde NALI für eine Inaktivierung von pKi-67 nicht weiterfolgt.

#### **4.4 CALI-induzierte Quervernetzung von Proteinen**

Trotz vielseitiger Anwendung als etabliertes Verfahren zur Inaktivierung von Proteinen ist der genaue Wirkmechanismus von CALI bisher nicht aufgeklärt. Dabei vollzog sich die Entwicklung von CALI auf empirischer Grundlage, beginnend von der Laserbestrahlung von Malachitgrün-(MG)-Antikörperkonjugaten über die Laserbestrahlung von FITC-markierten Antikörpern bis hin zur Bestrahlung mit konventionellen Lichtquellen wie Quecksilberdampf-Lampen in Fluoreszenzmikroskopen. Die Involvierung von Hydroxylradikalen unter MG-CALI und von Singulett-Sauerstoff bei der Proteininaktivierung mit FITC-CALI, konnte in mehreren Publikationen gezeigt werden (Liao *et al.*, 1994; Surrey *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 2002). Doch in welcher Weise diese reaktiven Molekülspezies zur Inaktivierung führen, ist nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu Aggregationen von Proteinen führt, die höchstwahrscheinlich auf kovalente Verbindungen zurückzuführen sind. Zelllysate, das mit FITC- oder Alexa 488-markierten pKi-67-Antikörpern inkubiert und anschließend bestrahlt wurde, zeigt für pKi-67 im Westernblot Reaktivität im höhermolekularen Bereich. Aufgrund denaturierender Bedingungen während der SDS-PAGE sollten am ehesten kovalente Quervernetzungen für diese Reaktivität verantwortlich sein. Bereits 1978 zeigten Lepock *et*

*al.* dass FITC-markierte Membranproteine unter Bestrahlung mit einem Argonlaser bei 488 nm quervernetzt werden. An der Ausbildung dieser Quervernetzungen ist Singulett-Sauerstoff beteiligt, wie die Inhibierung dieser Vernetzungen nach Zugabe des Singulett-Sauerstoff-Fängers Natriumazid verdeutlichte. Für den Inaktivierungsmechanismus unter MG-CALI wurde von Liao *et al.* (1994) eine Quervernetzung von Proteinen infolge von Radikalbildung jedoch ausgeschlossen. In einer Reihe von Arbeiten, welche die Rolle von Singulett-Sauerstoff bei FITC-CALI beschrieben, wurden eventuell entstehende Quervernetzungen nicht untersucht (Surrey *et al.*, 1998; Horstkotte *et al.*, 2005). Die Ergebnisse vorliegender Arbeit weisen jedoch eindeutig auf eine Quervernetzung von Proteinen unter Bestrahlung hin. Diese Quervernetzung scheint spezifisch das adressierte pKi-67 zu betreffen, das ebenfalls nukleäre Protein Mcm3 bleibt hiervon unbeeinträchtigt. Mcm-Proteine spielen eine wichtige Rolle während der Initiation und Elongation der DNA-Replikation (Alexandrow *et al.*, 2002) und sind wahrscheinlich funktionell von pKi-67 unabhängig. Im Gegensatz hierzu wurde für UBF, einen Transkriptionsfaktor der rDNA-Gene, kürzlich eine Kolokalisation in den Nukleoli mit pKi-67 nachgewiesen (Bullwinkel *et al.*, 2006). CALI gegen pKi-67 zeigt kaum Einfluss auf die UBF-Hauptbanden im Westernblot, jedoch ist deutlich eine schwächere Reaktivität im höhermolekularen Bereich erkennbar. Dies weist auf eine bisher unbekannte Beteiligung einer Sub-Fraktion des UBF an der CALI-induzierten Quervernetzung hin. In Folge dieser Versuche wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt, die ebenfalls zeigten, dass eine kleine Fraktion des UBF im Zelllysate Komplexe mit pKi-67 bildet (Dr. Thomas Scholzen, Forschungszentrum Borstel, persönliche Mitteilung). Neben pKi-67 und UBF scheinen auch die fluoreszenzmarkierten Antikörper an diesen Quervernetzungen beteiligt zu sein, da die Intensität der Banden der schweren Ketten der für die CALI-Behandlung eingesetzten Antikörper nach Bestrahlung reduziert ist (Abb. 3.25 b). Die vorstehend dargestellten Ergebnisse wurden für beide verwendeten anti-pKi-67-Antikörper TuBB-9 und MIB-1 beobachtet. CALI mit beiden Antikörpern führt zu den gleichen distinkten Banden im Bereich der höher molekularen Reaktivität, und dies sowohl für den Nachweis von pKi-67 als auch für UBF. Auch unterscheiden sich die Ergebnisse zwischen FITC- und Alexa 488-markierten Antikörpern ausschließlich in der Ausprägung nicht aber in der Art der beobachteten Effekte. Diese erscheinen mit FITC etwas ausgeprägter als mit Alexa 488.

In der Literatur wurde der Aktionsradius von FITC-CALI zunächst von Surrey *et al.* (1998) auf unter 30 nm bestimmt, und später von Beck *et al.* (2002) ein Radius von 4 nm, in dem 50 % Inaktivierung auftritt, ermittelt. Dies erklärt die hohe räumliche Restriktion der von

FITC-CALI induzierten Effekte. Bei einer ungefähren räumlichen Ausdehnung eines IgG-Moleküls von  $10,5 \cdot 8,5$  nm und der Annahme, dass die FITC-Moleküle an der Außenseite der IgG-Moleküle sitzen, ist es wahrscheinlich, dass nur Proteine von FITC-CALI-Effekten betroffen sind, die sich in sehr enger räumlicher Nachbarschaft befinden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, dass nur Proteine die miteinander interagieren von Quervernetzungen betroffen sind. Diese Interaktionen betreffen hier Antikörper-Antigen-Bindungen sowie eine vermutete Interaktion von pKi-67 mit UBF. Dieser äußerst limitierte Aktionsradius könnte auch erklären, warum sich die Reaktivität im höhermolekularen Bereich über mehrere Hundert kDa erstreckt und jeweils die gleichen distinkten Banden sichtbar sind. Denn es ist wahrscheinlich, dass nicht immer ein Antikörper-Molekül mit pKi-67 oder UBF vernetzt wird, sondern z.B. eine der leichten Ketten der Antikörper mit pKi-67, oder beide schweren Ketten mit UBF, abhängig auch von der Lage und Anzahl der FITC-Moleküle pro Antikörper. Diese unterschiedlich großen Aggregationen würden sich in einer Vielzahl von Banden im Westernblot niederschlagen.

Jüngst wurde auch von Yan *et al.* (2006) eine Proteinquervernetzung unter CALI am Beispiel von Calmodulin gezeigt. Die Bestrahlung des mit einem Fluorescein-Derivat markierten Calmodulin führte über die Generierung von Singulett-Sauerstoff zur Oxidation von Methionin-Seitenketten zu Methionin-Schwefeloxid. Darüber hinaus wurden auch reaktive Histidin-Zwischenprodukte identifiziert. Der genaue Ablauf der Formation von Quervernetzungen in diesen Experimenten ist nicht geklärt. Di-Tyrosin-Quervernetzungen, wie sie bei Calmodulin z.B. nach Bestrahlung mit UV-Licht auftreten (Malencik und Anderson, 2003) wurden jedoch ausgeschlossen. Nach Bestrahlung konnten intermolekulare Quervernetzungen von Calmodulin mit den Bindungspartnern *Myosin light chain kinase* (MLCK), der membranständigen Ca-ATPase *C28W* und dem *calcium release channel RyR* gezeigt werden. Intramolekulare Quervernetzungen konnten nicht identifiziert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen in vorliegender Arbeit, dass miteinander interagierende Proteine durch FITC-CALI quervernetzt werden können.

Frühere Untersuchungen zum Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf Proteine zeigten bereits eine Reaktivität von Histidin-, Methionin- und Tyrosin-Seitenketten (Michaeli und Feitelson, 1994; Davies, 2004). Diese Oxidationen der Aminosäuren-Seitenketten könnten auch zu einer Entfaltung, Konformationsänderung, Anstieg der Hydrophobizität und Veränderungen im Bindungsverhalten für Kofaktoren und Metallionen führen. Für den CALI-Wirkmechanismus zur Proteininaktivierung stellen Quervernetzungen vielleicht nicht die einzige Ursache dar, eine Beteiligung ist jedoch zu erwarten.

Die in vorliegender Arbeit beschriebene Quervernetzung unter CALI könnte dazu beitragen, eine über die reine Funktionsinhibierung hinausgehende Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu ermöglichen.

#### **4.5 Wirkung von CALI auf Zellen**

Mit Hinblick auf die bisher bekannten Wirkmechanismen von CALI, die sich v.a. auf MG- und FITC-CALI beziehen, erscheint verständlich, dass diese Methode ein effektives Werkzeug zur Proteininaktivierung darstellt. Die Verwendung von CALI zur selektiven Schädigung von Zellen scheint dagegen fraglich. Der relativ geringe Aktionsradius von Singulett-Sauerstoff von wenigen Nanometern lässt es unwahrscheinlich erscheinen Zellmembranen mit letaler Folge für die Zellen zu schädigen. So konnte auch im Rahmen dieser Arbeit mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen das Membranprotein CD30 gerichtet waren, kein direkter Zelltod durch Bestrahlung festgestellt werden. Dabei wurden BerH2-Antikörper sowohl mit FITC als auch mit Alexa 488 gekoppelt. Ein Antikörper-Molekül war im Schnitt mit drei bis vier Fluoreszenz-Molekülen markiert, die Zellen wurden in hohen Konzentrationen mit den Antikörpern inkubiert, und die Bestrahlung wurde mit einem Argonlaser bei  $0,5 \text{ W/cm}^2$  für 30 Minuten durchgeführt. Diese Parameter müssten eine möglichst effektive CALI-Bestrahlung gewährleisten.

Die Unterschiede im Vergleich zur PDT, mit deren Hilfe eine Zellschädigung sehr wohl möglich ist, liegen in erster Linie in der Art und vor allem in den Konzentrationen der verwendeten Farbstoffe. Des Weiteren häufen sich die in der PDT verwendeten Sensibilisatoren meist intrazellulär an (Prasad, 2003). Die bei CALI durchgeführte Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe über Antikörper an die Zellmembran scheint für eine gezielte Zellschädigung nicht auszureichen.

#### 4.6 CALI des Ki-67-Proteins – methodische Aspekte

Aufgrund der beschriebenen *in vitro* Experimente zur Proteininaktivierung in Zelllysate und Versuche zur Zellschädigung mit Hilfe von CALI erschien es vielversprechender CALI in Richtung Proteininaktivierung voranzutreiben und die Inaktivierung von pKi-67 auch in lebenden Zellen zu untersuchen. Mit Hilfe von CALI konnte in lebenden Zellen nach Inaktivierung von pKi-67 zum ersten Mal eine Hemmung der rRNA-Synthese gezeigt werden. Darüber hinaus kam es zu einer Umverteilung von pKi-67 und dem Transkriptionsfaktor UBF in Komplexe am Rande der Nukleoli. Die Bedeutung dieser Beobachtungen für die Funktion von pKi-67 werden im nächsten Abschnitt behandelt. An dieser Stelle sollen zunächst die Erkenntnisse, die aus diesen Experimenten für die CALI-Methode gewonnen werden können, diskutiert werden. Die Inaktivierung von pKi-67 zeigt die Möglichkeit, FITC-CALI zur Funktionsanalyse von Proteinen auf sub-nukleärer Ebene einsetzen zu können. Dies wurde bisher nur mit Malachitgrün unter gepulster Bestrahlung für einen Typ I-Mechanismus an den Transkriptionsfaktoren *even skipped* und *engrailed* in *Drosophila*-Embryos, sowie für *even skipped* in Reismehlkäfer- (*Tribolium*)-Embryos gezeigt (Schröder *et al.*, 1996, 1999).

Die in vorliegender Arbeit durchgeführte Inaktivierung mit FITC über einen Typ II-Mechanismus fand in den Nukleoli der Zellkerne statt, und hier wahrscheinlich in den dicht gepackten *fibrillar centre* (FC) oder den *dense fibrillar components* (DFC) – den Orten der rRNA-Transkription und ihrer beginnenden Prozessierung. Darüber hinaus führte die Inaktivierung mit zwei verschiedenen Antikörpern, die jeweils unterschiedliche Epitope des Ki-67 Proteins erkennen, zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Synthese der rRNA. Diese kam nur durch TuBB-9-vermittelte CALI zum Erliegen, während MIB-1-vermittelte CALI hier keinen Einfluss zeigte. Auch die Umverteilung von pKi-67 und UBF wurde mit MIB-1-CALI nicht beobachtet. Diese Ergebnisse stellen auch eine Kontrolle für die spezifische Wirkung von CALI dar. Die Generierung freier Radikale oder Singulett-Sauerstoffs durch Bestrahlung der CALI-Chromophore führt nicht zu unspezifischen Inaktivierungen oder Quervernetzungen innerhalb des Zellkerns. Auch die Färbung des Fibrillarins bestätigt die Spezifität der CALI-Inaktivierung. Fibrillarins ist Bestandteil der DFC der Nukleoli und an der rRNA-Prozessierung, nicht aber an der Transkription der rRNA-Gene beteiligt (Politz *et al.*, 2005). Weder MIB-1- noch TuBB-9-vermittelte CALI zeigten einen Einfluss auf das nukleäre Färbemuster des Fibrillarins.

Es wurde in dieser Arbeit erstmalig CALI auch mit dem relativ photostabilen Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 demonstriert. Horstkotte *et al.* (2005) zeigten, dass das Ausbleichen der Farbstoffe ein von der Proteininaktivierung unabhängiger Prozess sein kann. Die quantitative Auswertung der Versuche zur Inhibierung der rRNA-Synthese lässt Aussagen über den Wirkungsgrad und unspezifische Inaktivierung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FITC und Alexa 488 für CALI zu. Als spezifische Wirkung kann die Inhibierung der rRNA-Synthese in den Nukleoli ohne Beeinflussung der mRNA-Synthese im Nukleoplasma nach Bestrahlung der TuBB-9-Konjugate angesehen werden. Zeigen Zellen auch eine Inhibierung der mRNA-Synthese kann dies als unspezifische Wirkung aufgefasst werden, da auch nicht-bindende Konjugate wie ACT-1-Alexa 488 diesen Effekt zeigten. Eine spezifische Inaktivierung der rRNA-Synthese konnte mit den TuBB-9-FITC-Konjugaten schon nach einer Bestrahlungszeit von 1 min bei ca. 70 % der Zellen beobachtet werden. Mit der gleichen Lichtintensität ( $570 \text{ J/cm}^2$ ) mussten die TuBB-9-Alexa 488-Konjugate ca. 15 min bestrahlt werden um eine Inaktivierung bei über 60 % der Zellen zu erreichen. Bei dieser Bestrahlungsenergie stiegen jedoch die unspezifischen Effekte bereits auf über 20 %. Bei FITC-CALI scheint der maximal erreichbare Effekt durch das Ausbleichen des Farbstoffs begrenzt zu sein. Photostabilere Farbstoffe könnten eine stärkere Wirkung erzielen, wenn die Stabilität vor allem auf einer Resistenz gegen ROS und nicht einer geringeren Effizienz ihrer Erzeugung beruht. Die Notwendigkeit deutlich höherer Lichtdosen bei CALI mit Alexa 488, lässt als Grund für die erhöhte Photostabilität eine geringere ROS-Produktion als wahrscheinlich erscheinen. Die Verwendung von Alexa 488 als CALI-Chromophor ist grundsätzlich möglich, ist jedoch mit relativ hohen unspezifischen Effekten verbunden. Die Ursache dieser unspezifischen Effekte scheint nicht völlig geklärt. Sie können nicht auf die alleinige Bestrahlung durch die Quecksilberdampf-Lampe zurückzuführen sein, da nur Zellen denen Fluoreszenzkonjugate mikroinjiziert wurden, diese Effekte zeigen. Zellen die nicht mikroinjiziert sind, zeigen bei den verwendeten Bestrahlungsintensitäten keinen Einfluss auf rRNA- oder mRNA-Synthese. Bemerkenswert erscheint ferner, dass in allen Versuchsansätzen - sowohl die der FITC- als auch die der Alexa 488-Konjugate - die unspezifische Inhibierung der mRNA-Synthese nach ca. 15 min einsetzt und die Anzahl der betroffenen Zellen in ähnlichem Maße ansteigt. Dies trifft ebenso auf die Kontrollansätze der nicht-bindenden ACT-1-Alexa 488-Konjugate zu, die zu keinem Zeitpunkt spezifische Effekte aufweisen. Unter Berücksichtigung des äußerst unterschiedlichen Ausbleichsverhalten von FITC und Alexa 488 scheinen die spezifischen Effekte hiermit vereinbar zu sein, die unspezifischen Effekte scheinen jedoch vom Ausbleichen der Farbstoffe unabhängig.

Vielmehr scheint denkbar, dass neben den Ausbleichprozessen der Fluoreszenzgruppen weitere lichtabhängige Prozesse stattfinden, die für die Zelle schädlich sind. Denkbar ist auch eine Generierung schwachreaktiver Moleküle, die größere Diffusionsradien besitzen und deren Schädigungseffekt nicht sofort eintritt.

Die Unterschiede zwischen MIB-1 und TuBB-9 bezüglich der CALI-vermittelten Effekte bei der Inhibierung der rRNA-Synthese sowie der Umverteilung nukleärer Proteine demonstrieren ferner die Möglichkeit, mit Hilfe von CALI Proteine in unterschiedlichen funktionalen Stadien zu adressieren. Dies bietet Möglichkeiten zur differenziellen Funktionsanalyse vor allem von solchen Proteinen, bei denen Antikörper gegen unterschiedliche funktionale Domänen zur Verfügung stehen. Für zahlreiche Proteine existieren unterschiedliche Antikörper gegen verschiedene Epitope, darunter ungezählte gegen das Zellzyklus-abhängige Protein p53 (Wade-Evans und Jenkins, 1985; Pospisilova *et al.*, 2000; Voeltzel *et al.*, 2004) oder gegen diverse Proteine des Hepatitis-C-Virus (HCV; Mancini *et al.*, 2006). Viele dieser Antikörper, jedoch längst nicht alle, besitzen auch schon ohne zusätzliche Inaktivierung wie etwa durch CALI-Behandlung antigeninhibierende Eigenschaften. Eine differentielle Inaktivierung mittels CALI ist vor allem mit Antikörpern interessant, mit denen das Antigen differentiell lokalisiert werden kann. So liegt z.B. das Phänomen der Epitopmaskierung, wie es auch für MIB-1 und TuBB-9 vermutet wird (s. Abschnitt 1.4), darin begründet, dass ein Epitop für den jeweils anderen Antikörper von einem Bindungspartner von pKi-67 verdeckt wird. Ein weiteres Beispiel für Epitopmaskierung liefert das *zinc-finger protein 1* (ZPR1). Mit unterschiedlichen Antikörpern kann dieses Protein in verschiedenen zellulären Strukturen lokalisiert werden. So z.B. in den Nukleoli mit dem Antikörper LG18 oder in den Cajal bodies mit den Antikörpern LG1, LG3 und LG5. Dies impliziert ein Vorkommen von ZPR1 in verschiedenen Protein-Komplexen, was zu einer Verdeckung der Epitope für die jeweils anderen Antikörper führt (Gangwani *et al.*, 2001).

In Fällen wie diesen, in denen unterschiedliche Antikörper nicht nur das Antigen in unterschiedlichen funktionalen Stadien erkennen, sondern dieses möglicherweise auch mit jeweils unterschiedlichen Bindungspartnern interagiert, könnte CALI neben einer differentielle Inaktivierung der Proteine in unterschiedlichen Stadien auch über die in Abschnitt 4.5 diskutierten Quervernetzungen zu einer Identifizierung der jeweiligen Bindungsproteine beitragen.

#### 4.7 CALI des Ki-67-Proteins

##### – Schlussfolgerungen für die physiologische Rolle von pKi-67

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des pKi-67 mittels CALI, zu einer spezifischen Inhibierung der ribosomalen RNA-Synthese führt. Diese Ergebnisse stellen die ersten funktionalen Erkenntnisse zur physiologischen Rolle des Ki-67-Proteins dar und liefern experimentelle Belege für bisherige Annahmen über die Rolle von pKi-67 während der rRNA-Transkription. So zeigen Bullwinkel *et al.* (2006) eine Kolo-kalisation der von TuBB-9 erkannten pKi-67-Fraktion mit der Polymerase I-Transkriptionsmaschinerie und eine bevorzugte Assoziation dieser Fraktion mit der Promotorregion der rDNA-Gene. Die daraus abgeleitete Hypothese zu einer funktionalen Rolle von pKi-67 bei der rRNA-Synthese konnte hier nun erstmals durch Versuche an lebenden Zellen unterstützt werden.

Die Hemmung der rRNA-Synthese und die parallel auftretende Umverteilung von pKi-67 und UBF in punktförmige Strukturen am Rand der Nukleoli wurde nur nach CALI mit dem Antikörper TuBB-9, nicht jedoch mit MIB-1 beobachtet. Interessanter Weise wiesen die *in vitro* Untersuchungen im Zelllysate keinen Unterschied zwischen CALI mit TuBB-9 und MIB-1 bezüglich der Induktion von UBF-Quervernetzungen auf. Dies deutet darauf hin, dass das Phänomen der Epitopmaskierung im Zelllysate nicht auftritt und beide Antikörper hier dieselbe pKi-67-Fraktion erkennen.

Die Tatsache, dass die Inaktivierung von pKi-67 in lebenden Zellen zu einer vollständigen Inhibierung der rRNA-Synthese führt, wirft allerdings die Frage auf, weshalb ruhende Zellen in Abwesenheit von pKi-67 dennoch eine rRNA-Neusynthese aufweisen. McCallum und Hall (2000) stellten die Hypothese auf, dass pKi-67 in proliferierenden Zellen lediglich zu einer Verstärkung der Ribosomen-Synthese führt, d.h. nicht von essentieller Bedeutung für diesen Prozess ist. Es konnte kürzlich jedoch auch in ruhenden Zellen eine Expression von pKi-67 nachgewiesen werden (Bullwinkel *et al.*, 2006). Diese ist jedoch um ein Vielfaches geringer als in proliferierenden Zellen. Dennoch deutet diese, wenn auch geringe Expression auf eine mögliche essentielle Rolle für pKi-67 bei der rRNA-Synthese hin und steht daher im Einklang mit den Befunden zur vollständigen Inhibition der rRNA-Synthese durch CALI des pKi-67. Auch im Falle einer nicht essentiellen Rolle von pKi-67 bei der rRNA-Synthese wäre eine vollständige Inhibition dieses Prozesses durch pKi-67-CALI denkbar. Dabei könnte der Effekt nicht direkt durch pKi-67-Inhibition vermittelt, sondern durch Beeinträchtigung eines

anderen essentiellen Faktors verursacht werden. Hierbei wäre z.B. an die *in vitro* beobachtete Quervernetzung von UBF zu denken.

Ein weiterer interessanter Effekt von TuBB-9-CALI ist die oben bereits erwähnte vollständige Umverteilung von pKi-67 und UBF in punktförmige Strukturen am Rande der Nukleoli. Hierbei kann nicht direkt geschlossen werden, ob es sich um eine Folge der Inhibition der rRNA-Synthese oder möglicherweise auch um deren Ursache handelt. Komplexbildung als Folge CALI-induzierter Quervernetzungen wäre als Ursache der beobachteten Umverteilungen denkbar. Diese Umverteilungen könnten in der Folge dann auch die Hemmung der rRNA-Synthese herbeigeführt haben. Eine andere Möglichkeit ist die Induktion der Komplexbildung als Folge der Inhibierung der rRNA-Synthese. Die Umverteilung von pKi-67 und UBF nach CALI weist auffallende Ähnlichkeit mit der Umverteilung von UBF und anderen Komponenten der rRNA-Transkriptionsmaschinerie auf, wie sie nach Inhibierung der rRNA-Synthese durch Actinomycin D auftritt (Jordan *et al.*, 1996). Die Inaktivierung der rRNA-Transkription durch Actinomycin D beruht auf einer Interkalierung von Actinomycin D in die DNA und daraus resultierender Behinderung der RNA-Polymerase I (Perry, 1962; Khan und Lindell, 1980). Für pKi-67-CALI wäre eine Inhibierung der rRNA-Synthese einerseits durch die direkte Inaktivierung von pKi-67 vorstellbar, andererseits könnten hier, wie schon erwähnt, auch Beeinträchtigungen von anderen Komponenten des Pol I-Transkriptionsapparates eine Rolle spielen. Aufgrund des sehr geringen Wirkradius von FITC-CALI von etwas über 4 nm (Beck *et al.*, 2002) könnten dabei aber nur sehr eng mit pKi-67 benachbarte Proteine eine Rolle spielen.

Die CALI-Ergebnisse zur Quervernetzung weisen auf UBF als einen direkten Bindungspartner von pKi-67 hin. Diese Interaktion lässt ebenfalls eine Rolle von pKi-67 bei der Regulation der rRNA-Transkription als äußerst wahrscheinlich erscheinen. Für die Initiation der Pol I-abhängigen rRNA-Transkription ist ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen notwendig (Ruggero und Pandolfi, 2003). UBF spielt innerhalb dieses Initiationskomplexes eine entscheidende Rolle. So bindet es an die DNA im Promotorbereich der rDNA-Gene und die differentielle Phosphorylierung des UBF scheint im Fokus einer zellzyklusabhängigen Regulierung der rRNA-Synthese zu stehen (Voit und Grummt, 2001). So hängt u.a. die transkriptionsaktivierende Interaktion von UBF und Pol I auch vom Phosphorylierungsstatus des UBF ab. Die cyclinabhängigen Kinasen Cdk2 und Cdk4 und die Casein-Kinase II (CKII) phosphorylieren UBF zellzyklusabhängig und ermöglichen so eine verstärkte Bindung an SL1. Dies bedingt ebenfalls eine Verstärkung der rRNA-Transkription. Andererseits wird durch die zellzyklusabhängige Interaktion von p53 und Retinoblastom-

---

Protein (RB) mit UBF die Bindung von UBF an SL1 inhibiert und so die rRNA-Synthese gehemmt. Auch die Kinase ERK (*extracellular signal-regulated*) phosphoryliert UBF und wird selbst über Signaltransduktionswege unter anderem von EGF (*epidermal growth factor*) reguliert (Ruggero und Pandolfi, 2003). Viele der mit UBF interagierenden Proteine sind in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert. Obwohl der genaue Wirkmechanismus der rRNA-Syntheseinhibition durch TuBB-9-CALI noch in weiteren Experimenten zu klären ist, legen diese Studien eine wichtige Funktion des Ki-67-Proteins bei der rRNA-Transkription nahe. Eine Assoziation von pKi-67 mit der Promotorregion der rDNA-Gene, eine wahrscheinliche Interaktion mit UBF und nicht zuletzt die Hemmung der rRNA-Synthese nach CALI gegen pKi-67 lassen eine Involvierung von pKi-67 bei der Initiation der Pol I-abhängigen Transkription als äußerst wahrscheinlich erscheinen.

---

## Literaturverzeichnis

- Alexandrow M. G., Ritzi M., Pemov A., Hamlin J. L. (2002) A potential role for mini-chromosome maintenance (MCM) proteins in initiation at the dihydrofolate reductase replication origin. *J. Biol. Chem.* **277**: 2702-2708.
- Amy R. L. und Storb R. (1965) Selective mitochondrial damage by a ruby laser microbeam: an electron microscopic study. *Science* **150**: 756-758.
- Barnett S. C. und Evans C. H. (1986) Leukoregulin-increased plasma membrane permeability and associated ionic fluxes. *Cancer Res.* **46**: 2686-2692.
- Beck S., Sakurai T., Eustace B. K., Beste G., Schier R., Rudert F., Jay D. G. (2002) Fluorophore-assisted light inactivation: a high-throughput tool for direct target validation of proteins. *Proteomics* **2**: 247-255.
- Becker M. H. G. (1993) *Untersuchungen zur Struktur und Funktion des nukleären, proliferationsassoziierten Antigens, das durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 definiert wird*, Dissertation, Universität Lübeck.
- Bell S. P., Learned R. M., Jantzen H. M., Tjian R. (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* **241**: 1192-1197.
- Berns M. W., Aist J., Edwards J., Strahs K., Girton J., McNeill P., Rattner J. B., Kitzes M., Hammer-Wilson M., Liaw L. H., Siemens A., Koonce M., Peterson S., Brenner S., Burt J., Walter R., Bryant P. J., van Dyk D., Coulombe J., Cahill T., Berns G. S. (1981) Laser microsurgery in cell and developmental biology. *Science* **213**: 505-513.
- Bessis M. und Nomarski G. (1960) Irradiation ultra-violette des organites cellulaires avec observation continue en contraste en phase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8**: 777-792.
- Biggiogera M., Malatesta M., Abolhassani-Dadras S., Amalric F., Rothblum L. I., Fakan S. (2001) Revealing the unseen: the organizer region of the nucleolus. *J. Cell Sci.* **114**: 3199-3205.

- Birngruber R. (1980) Thermal modeling in biological tissues. In Hillenkamp F., Pratesi R., und Sacchi C. A., Hrsg., *Lasers in Biology and Medicine 77-97.*, Plenum Press, New York.
- Bohren C. F. und Huffman D. R. (1983) *Absorption and scattering of light by small particles*, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Boisvert F. M., Hendzel M. J., Bazett-Jones D. P. (2000) Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* **148**: 283-292.
- Bolivar J., Iglesias C., Ortiz M., Goenechea L., Torres-Montaner A., Valdivia M. M. (1999) The DNA binding domains of UBF represent major human autoepitopes conserved in vertebrates species. *Cell. Mol. Biol.* **45**: 277-284.
- Braun N., Papadopoulos T., Müller-Hermelink H. K. (1988) Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **56**: 25-33.
- Bridger J. M., Kill I. R., Lichter P. (1998) Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res.* **6**: 13-24.
- Brown D. C. und Gatter K. C. (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* **40**: 2-11.
- Bullwinkel J. (2005) *Untersuchungen zu Funktion und zellulärer Lokalisation des Ki-67-Proteins*, Dissertation, Universität Lübeck.
- Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Lüdemann A., Wohlenberg C., Gerdes J., Scholzen T. (2006) Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* **206**: 624-635.
- Byeon I. J., Li H., Song H., Gronenborn A. M., Tsai M. D. (2005) Sequential phosphorylation and multisite interactions characterize specific target recognition by the FHA domain of Ki67. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 987-993.
- Castelo L. und Jay D. G. (1999) Radixin is involved in lamellipodial stability during nerve growth cone motility. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1511-1520.

- Cattoretti G., Becker M. H., Key G., Duchrow M., Schlüter C., Galle J., Gerdes J. (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* **168**: 357-363.
- Chang H. Y., Takei K., Sydor A. M., Born T., Rusnak F., Jay D. G. (1995) Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature* **376**: 686-690.
- Contreras T. J., Jemionek J. F., Stevenson H. C., Hartwig V. M., Fauci A. S. (1980) An improved technique for the negative selection of large numbers of human lymphocytes and monocytes by counterflow centrifugation-elutriation. *Cell Immunol.* **54**: 215-229.
- Csáki A., Möller R., Fritzsche W. (2002) Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2**: 187-193.
- Davies M. J. (2004) Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**: 17-25.
- Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbélik M., Moan J., Peng Q. (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 889-905.
- Durocher D. und Jackson S. P. (2002) The FHA domain. *FEBS Lett.* **513**: 58-66.
- Dvorak H. F., Orenstein N. S., Carvalho A. C., Churchill W. H., Dvorak A. M., Galli S. J., Feder J., Bitzer A. M., Rypysc J., Giovinco P. (1979) Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J. Immunol.* **122**: 166-174.
- Emmert-Buck M. R., Bonner R. F., Smith P. D., Chuaqui R. F., Zhuang Z., Goldstein S. R., Weiss R. A., Liotta L. A. (1996) Laser capture microdissection. *Science* **274**: 998-1001.
- Endl E., Kausch I., Baack M., Knippers R., Gerdes J., Scholzen T. (2001) The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J. Pathol.* **195**: 457-462.

- Eustace B. K., Buchstaller A., Jay D. G. (2002) Adapting chromophore-assisted laser inactivation for high throughput functional proteomics. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **1**: 257-265.
- Fischer P., Nacheva E., Mason D. Y., Sherrington P. D., Hoyle C., Hayhoe F. G., Karpas A. (1988) A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas-299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood* **72**: 234-240.
- Gangwani L., Mikrut M., Theroux S., Sharma M., Davis R. J. (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat. Cell Biol.* **3**: 376-383.
- Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* **31**: 13-20.
- Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H. H., Schwab U., Stein H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* **133**: 1710-1715.
- Gerlach C., Kubbutat M., Schwab U., Key G., Flad H. D., Gerdes J. (1998) Proliferation-associated Ki-67 protein is a target for autoantibodies in the human autoimmune disease systemic lupus erythematosus. *Lab Invest.* **78**: 129-130.
- Goding J. W. (1976) Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods. *J. Immunol. Methods* **13**: 215-226.
- Hamblin M. R., Bamberg M. P., Miller J. L., Hasan T. (1998) Cationic photoimmunoconjugates between monoclonal antibodies and hematoporphyrin: selective photodestruction of ovarian cancer cells. *Appl. Opt.* **37**: 7184-7192.
- Hauptschein R. S., Sloan K. E., Torella C., Moezzifard R., Giel-Moloney M., Zehetmeier C., Unger C., Ilag L. L., Jay D. G. (2005) Functional proteomic screen identifies a modulating role for CD44 in death receptor-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **65**: 1887-1896.

- 
- Hernandez-Verdun D. und Gautier T. (1994) The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* **16**: 179-185.
- Hernandez-Verdun D. und Roussel P. (2003) Regulators of nucleolar functions. *Prog. Cell Cycle Res.* **5**: 301-308.
- Heyden T. S. (1997) *Zellbiologische Untersuchungen zu intrazellulärem Transport, Funktion und Regulation des proliferations-assoziierten Antigens Ki-67*, Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Hofmann K. und Bucher P. (1995) The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 347-349.
- Horstkotte E., Schröder T., Niewöhner J., Thiel E., Jay D. G., Henning S. W. (2005) Toward understanding the mechanism of chromophore-assisted laser inactivation--evidence for the primary photochemical steps. *Photochem. Photobiol.* **81**: 358-366.
- Hsi R. A., Rosenthal D. I., Glatstein E. (1999) Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs* **57**: 725-734.
- Hutter E. und Fendler J. H. (2004) Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Mater.* **16**: 1685-1706.
- Hüttmann G. und Birngruber R. (1999) On the Possibility of High-Precision Photothermal Microeffects and the Measurement of Fast Thermal Denaturation of Proteins. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **5**: 954-962.
- Hüttmann G., Serbin J., Radt B., Lange B. I., Birngruber R. (2001) Model System for Investigating Laser-Induced Subcellular Microeffects. In Duncan D. D., Jacques S. L., und Johnson P. C., Hrsg., *Laser-Tissue Interaction XII: Photochemical, Photothermal, and Photomechanical*. Proceedings of the SPIE Bd. 4257, 398-409.
- Hüttmann G., Radt B., Serbin J., Lange B. I., Birngruber R. (2002) High Precision Cell Surgery with Nanoparticles? *Med. Laser Appl.* **17**: 9-14.

- Isenberg G., Bielser W., Meier-Ruge W., Remy E. (1976) Cell surgery by laser microdissection: a preparative method. *J. Microsc.* **107**: 19-24.
- Jay D. G. (1988) Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 5454-5458.
- Jay D. G. und Keshishian H. (1990) Laser inactivation of fasciclin I disrupts axon adhesion of grasshopper pioneer neurons. *Nature* **348**: 548-550.
- Johannsen M., Thiesen B., Jordan A., Taymoorian K., Gneveckow U., Waldofner N., Scholz R., Koch M., Lein M., Jung K., Loening S. A. (2005) Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *Prostate.* **64**: 283-292.
- Johnson F. H., Eyring H., Stover B. J. (1974) *The theory of Rate Processes in biology and medicine*, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Jones D. O., Cowell I. G., Singh P. B. (2000) Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* **22**: 124-137.
- Jordan A., Wust P., Scholz R., Tesche B., Fahling H., Mitrovics T., Vogl T., Cervos-Navarro J., Felix R. (1996) Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *Int. J. Hyperthermia* **12**: 705-722.
- Jordan P., Mannervik M., Tora L., Carmo-Fonseca M. (1996) In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J. Cell Biol.* **133**: 225-234.
- Kausch I., Lingnau A., Endl E., Sellmann K., Deinert I., Ratliff T. L., Jocham D., Sczakiel G., Gerdes J., Böhle A. (2003) Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **105**: 710-716.
- Kausch I., Jiang H., Brocks C., Bruderek K., Krüger S., Sczakiel G., Jocham D., Böhle A. (2004) Ki-67-directed antisense therapy in an orthotopic renal cell carcinoma model. *Eur. Urol.* **46**: 118-124.

- Key G., Becker M. H., Baron B., Duchrow M., Schlüter C., Flad H. D., Gerdes J. (1993) New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest.* **68**: 629-636.
- Khan M. M. und Lindell T. J. (1980) Actinomycin D binds with highest affinity to nonribosomal DNA. *J. Biol. Chem.* **255**: 3581-3584.
- Kill I. R. (1996) Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J. Cell Sci.* **109**: 1253-1263.
- Koeffler H. P. und Golde D. W. (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* **200**: 1153-1154.
- Kolber M. A., Quinones R. R., Gress R. E., Henkart P. A. (1988) Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J. Immunol. Methods* **108**: 255-264.
- Kotaidis V. und Plech A. (2005) Cavitation dynamics of nanoscale. *Appl. Phys. Lett.* **87**: 213102.
- Kotaidis V., Dahmen C., von Plessen G., Springer F., Plech A. (2006) Excitation of nanoscale vapor bubbles at the surface of gold nanoparticles in water. *J. Chem. Phys.* **124**: 184702.
- König K., Riemann I., Fritsche W. (2001) Nanodissection of human chromosomes with near infrared femtosecond laser pulses. *Opt. Lett.* **26**: 819-821.
- Kreibig U. und Vollmer M. (1995) *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lapotko D. O. und Lukianova E. Y. (2005) Influence of physiological conditions on laser damage thresholds for blood, heart, and liver cells. *Lasers Surg. Med.* **36**: 13-21.

- 
- Lapotko D. O., Lukianova E., Oraevsky A. A. (2006) Selective laser nano-thermolysis of human leukemia cells with microbubbles generated around clusters of gold nanoparticles. *Lasers Surg. Med.* **38**: 631-642.
- Lepock J. R., Thompson J. E., Kruuv J. (1978) Photoinduced crosslinking of membrane proteins by fluorescein isothiocyanate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**: 344-350.
- Li H., Byeon I. J., Ju Y., Tsai M. D. (2004) Structure of human Ki67 FHA domain and its binding to a phosphoprotein fragment from hNIFK reveal unique recognition sites and new views to the structural basis of FHA domain functions. *J. Mol. Biol.* **335**: 371-381.
- Liang H., Wright W. H., Cheng S., He W., Berns M. W. (1993) Micromanipulation of chromosomes in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical force (optical tweezers). *Exp. Cell Res.* **204**: 110-120.
- Liao J. C., Roeder J., Jay D. G. (1994) Chromophore-assisted laser inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 2659-2663.
- Liao J. C., Berg L. J., Jay D. G. (1995) Chromophore-assisted laser inactivation of subunits of the T-cell receptor in living cells is spatially restricted. *Photochem. Photobiol.* **62**: 923-929.
- Link S. und El Sayed M. A. (2000) Steady-state and time-resolved optical properties of metallic nanoparticles: The surface plasmon absorption as an analytical tool to investigate particle properties. *Int. Rev. Phys. Chem.* **19**: 409-453.
- Liz-Marzán L. M. (2004) Nanometals: formation and color. *materialstoday* **7**: 26-31.
- MacCallum D. E. und Hall P. A. (2000) The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J. Pathol.* **191**: 286-298.
- Malencik D. A. und Anderson S. R. (2003) Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids* **25**: 233-247.

- 
- Mancini N., Carletti S., Perotti M., Romano L., Craxi R. D., Craxi A., Zanetti A. R., Clementi M., Burioni R. (2006) Modulation of epitope-specific anti-hepatitis C virus E2 (anti-HCV/E2) antibodies by anti-viral treatment. *J. Med. Virol.* **78**: 1304-1311.
- Mantoudis E., Podsiadly B. T., Gorgy A., Venkat G., Craft I. L. (2001) A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Hum. Reprod.* **16**: 2182-2186.
- Marks K. M., Braun P. D., Nolan G. P. (2004) A general approach for chemical labeling and rapid, spatially controlled protein inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 9982-9987.
- Mayer P. (1891) Über das Färben mit Hämatoxylin. *Mitt. Zool. Stat. Neapel* **10**: 170-186.  
Zitiert aus Romeis B. (1968) *Mikroskopische Technik*, R. Oldenburg Verlag, München, Wien.
- Michaeli A. und Feitelson J. (1994) Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem. Photobiol.* **59**: 284-289.
- Mie G. (1908) Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik* **25**: 377-445.
- Moan J. und Berg K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **53**: 549-553.
- Moore A. E., Sabachewsky L., Toolan H. W. (1955) Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15**: 598-602.
- Moreno G., Lutz M., Bessis M. (1969) Partial cell irradiation by ultraviolet and visible light: conventional and laser sources. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **7**: 99-137.
- Mulvaney P. (1996) Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir* **12**: 788-800.
- Musser D. A., Wagner J. M., Weber F. J., Datta-Gupta N. (1980) The binding of tumor localizing porphyrins to a fibrin matrix and their effects following photoirradiation. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **28**: 505-525.

- 
- Neumann J. und Brinkmann R. (2005) Boiling nucleation on melanosomes and microbeads transiently heated by nanosecond and microsecond laser pulses. *J. Biomed. Opt.* **10**: 24001.
- Neumann J. und Brinkmann R. (2006) Cell disintegration by laser-induced transient microbubbles and its simultaneous monitoring by interferometry. *J. Biomed. Opt.* **11**: 41112.
- Ochs R. L., Lischwe M. A., Shen E., Carroll R. E., Busch H. (1985) Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* **92**: 330-336.
- Ochsner M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B* **39**: 1-18.
- Ogilby P. R. und Foote C. S. (1982) Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen (1.DELTA.g) luminescence in solution following pulsed laser excitation. Solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 2069-2070.
- Papavassiliou G. C. (1979) Optical properties of small inorganic and organic metal particles. *Progr. Solid State Chem.* **12**: 185-271.
- Perry R. P. (1962) The Cellular Sites of Synthesis of Ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**: 2179-2186.
- Pitsillides C. M., Joe E. K., Wei X., Anderson R. R., Lin C. P. (2003) Selective Cell Targeting with Light-Absorbing Microparticles and Nanoparticles. *Biophys. J.* **84**: 4023-4032.
- Plotkin M., Gneveckow U., Meier-Hauff K., Amthauer H., Feussner A., Denecke T., Gutberlet M., Jordan A., Felix R., Wust P. (2006) 18F-FET PET for planning of thermotherapy using magnetic nanoparticles in recurrent glioblastoma. *Int. J. Hyperthermia* **22**: 319-325.
- Politz J. C., Polena I., Trask I., Bazett-Jones D. P., Pederson T. (2005) A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin. *Mol. Biol. Cell* **16**: 3401-3410.

- Pospisilova S., Brazda V., Amrichova J., Kamermeierova R., Palecek E., Vojtesek B. (2000) Precise characterisation of monoclonal antibodies to the C-terminal region of p53 protein using the PEPSCAN ELISA technique and a new non-radioactive gel shift assay. *J. Immunol. Methods* **237**: 51-64.
- Prasad P. N. (2003) *Introduction to Biophotonics*, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Radt B., Serbin J., Lange B. I., Birngruber R., Hüttmann G. (2001) Laser-generated micro- and nanoeffects: inactivation of proteins coupled to gold nanoparticles with nano- and picosecond pulses. In Birngruber R. und Bergh H., Hrsg., *Laser-Tissue Interactions, Therapeutic Applications, and Photodynamic Therapy*. Proceedings of the SPIE Bd. 4432, 16-24.
- Radt B. (2002) *Inaktivierung von Proteinen und Zellen durch Laserbestrahlung von Mikropartikeln*, Dissertation, Universität Lübeck.
- Rajfur Z., Roy P., Otey C., Romer L., Jacobson K. (2002) Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat. Cell Biol.* **4**: 286-293.
- Rekhter M. D. und Chen J. (2001) Molecular analysis of complex tissues is facilitated by laser capture microdissection: critical role of upstream tissue processing. *Cell Biochem. Biophys.* **35**: 103-113.
- Roberts J. P. (2002) The Cutting Edge in Laser Microdissection. *Biophot. Int.* **9**: 50-53.
- Rosi N. L., Giljohann D. A., Thaxton C. S., Lytton-Jean A. K., Han M. S., Mirkin C. A. (2006) Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* **312**: 1027-1030.
- Ruggero D. und Pandolfi P. P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer* **3**: 179-192.
- Sato S., Higurashi E., Taguchi Y., Inaba H. (1992) Achievement of laser fusion of biological cells using UV pulsed dye laser beams. *Appl. Phys. B* **54**: 531-533.
- Schaadt M., Diehl V., Stein H., Fonatsch C., Kirchner H. H. (1980) Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* **26**: 723-731.

- Schlüter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M. H., Key G., Flad H.-D., Gerdes J. (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* **123**: 513-522.
- Schmucker D., Su A. L., Beermann A., Jackle H., Jay D. G. (1994) Chromophore-assisted laser inactivation of patched protein switches cell fate in the larval visual system of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 2664-2668.
- Scholzen T. und Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* **182**: 311-322.
- Scholzen T., Endl E., Wohlenberg C., van der Sar S., Cowell I. G., Gerdes J., Singh P. B. (2002) The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J. Pathol.* **196**: 135-144.
- Schröder R., Tautz D., Jay D. G. (1996) Chromophore-assisted laser inactivation of even skipped in *Drosophila* phenocopies genetic loss of function. *Dev. Genes. Evol.* **206**: 86-88.
- Schröder R., Jay D. G., Tautz D. (1999) Elimination of EVE protein by CALI in the short germ band insect *Tribolium* suggests a conserved pair-rule function for even skipped. *Mech. Dev.* **80**: 191-195.
- Schütze K. und Clement-Sengewald A. (1994) Catch and move--cut or fuse. *Nature* **368**: 667-669.
- Schütze K. und Lahr G. (1998) Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat. Biotechnol.* **16**: 737-742.
- Schwarting R., Gerdes J., Ziegler A., Stein H. (1987) Immunoprecipitation of the interleukin-2 receptor from Hodgkin's disease derived cell lines by monoclonal antibodies. *Hematol. Oncol.* **5**: 57-64.

- Schwarting R., Gerdes J., Dürkop H., Falini B., Pileri S., Stein H. (1989) BER-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope. *Blood* **74**: 1678-1689.
- Shenoy D., Fu W., Li J., Crasto C., Jones G., Dimarzio C., Sridhar S., Amiji M. (2006) Surface Functionalization of Gold Nanoparticles using Hetero-Bifunctional Poly(Ethylene Glycol) Spacer for Intracellular Tracking and Delivery. *Int. J. Nanomedicine*. **1**: 51-58.
- Starborg M., Gell K., Brundell E., Höög C. (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J. Cell Sci.* **109**: 143-153.
- Sueishi M., Takagi M., Yoneda Y. (2000) The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2. *J. Biol. Chem.* **275**: 28888-28892.
- Surrey T., Elowitz M. B., Wolf P. E., Yang F., Nédélec F., Shokat K., Leibler S. (1998) Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 4293-4298.
- Tadir Y., Wright W. H., Vafa O., Liaw L. H., Asch R., Berns M. W. (1991) Micromanipulation of Gametes Using Laser Microbeams. *Hum. Reprod.* **6**: 1011-1016.
- Takagi M., Matsuoka Y., Kurihara T., Yoneda Y. (1999) Chmadrin: a novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. *J. Cell Sci.* **112**: 2463-2472.
- Takei K., Chan T. A., Wang F. S., Deng H., Rutishauser U., Jay D. G. (1999) The neural cell adhesion molecules L1 and NCAM-180 act in different steps of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* **19**: 9469-9479.
- Tao W., Wilkinson J., Stanbridge E. J., Berns M. W. (1987) Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 4180-4184.

- 
- Tirlapur U. K. und König K. (2002) Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature* **418**: 290-291.
- Tour O., Meijer R. M., Zacharias D. A., Adams S. R., Tsien R. Y. (2003) Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nat. Biotechnol.* **21**: 1505-1508.
- Tschachotin S. (1912) Die mikroskopische Strahlenstichmethode, eine Zelloperationsmethode. *Biol. Zentralbl.* **32**: 623-630.
- Tsukakoshi M., Kurata S., Nomiya Y., Ikawa Y., Kasuya T. (1984) A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. *Appl. Phys. B* **35**: 135-140.
- van de Hulst H. C. (1981) *Light scattering by small particles*, Dover Publications, New York.
- van Dierendonck J. H., Keijzer R., van de Velde C. J., Cornelisse C. J. (1989) Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **49**: 2999-3006.
- van Dierendonck J. H., Wijsman J. H., Keijzer R., van de Velde C. J., Cornelisse C. J. (1991) Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am. J. Pathol.* **138**: 1165-1172.
- Verheijen R., Kuijpers H. J., Schlingemann R. O., Boehmer A. L., van Driel R., Brakenhoff G. J., Ramaekers F. C. (1989a) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J. Cell Sci.* **92**: 123-130.
- Verheijen R., Kuijpers H. J., van Driel R., Beck J. L., van Dierendonck J. H., Brakenhoff G. J., Ramaekers F. C. (1989b) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J. Cell Sci.* **92**: 531-540.
- Voeltzel T., Morel A. P., Rostan M. C., Ji J., Chiodino C., Ponchel F., Vigouroux J., de Fromental C. C., Soussi T., Ozturk M. (2004) A new set of monoclonal antibodies directed to proline-rich and central regions of p53. *Hybrid. Hybridomics* **23**: 287-292.

- 
- Vogel A. und Venugopalan V. (2003) Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem. Rev.* **103**: 577-644.
- Vogel A., Noack J., Hüttmann G., Paltauf G. (2005) Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl. Phys. B* **81**: 1015-1047.
- Voit R. und Grummt I. (2001) Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 13631-13636.
- Wade-Evans A. und Jenkins J. R. (1985) Precise epitope mapping of the murine transformation-associated protein, p53. *EMBO J.* **4**: 699-706.
- Wong E. V., David S., Jacob M. H., Jay D. G. (2003) Inactivation of myelin-associated glycoprotein enhances optic nerve regeneration. *J. Neurosci.* **23**: 3112-3117.
- Yan P., Xiong Y., Chen B., Negash S., Squier T. C., Mayer M. U. (2006) Fluorophore-Assisted Light Inactivation of Calmodulin Involves Singlet-Oxygen Mediated Cross-Linking and Methionine Oxidation. *Biochemistry* **45**: 4736-4748.
- Yao C., Rahmzadeh R., Endl E., Zhang Z., Gerdes J., Hüttmann G. (2005) Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles. *J. Biomed. Opt.* **10**: 64012.
- Yasuda Y. und Maul G. G. (1990) A nucleolar auto-antigen is part of a major chromosomal surface component. *Chromosoma* **99**: 152-160.
- Zharov V. P., Mercer K. E., Galitovskaya E. N., Smeltzer M. S. (2005) Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys. J.* **90**: 619-627.
- Zheng J. N., Ma T. X., Cao J. Y., Sun X. Q., Chen J. C., Li W., Wen R. M., Sun Y. F., Pei D. S. (2006) Knockdown of Ki-67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells. *Life Sci.* **78**: 724-729.

## Abkürzungen

5-FU	5-Fluoruridin
$\alpha$	anti-
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CALI	Chromophor-assistierte Laserinaktivierung
CD	<i>cluster of differentiation</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
cw	<i>continuous wave</i>
Da	Dalton
Dabco	Diazabicyclo[2.2.2]octan
DFC	<i>dense fibrillar component</i>
DIK	Differentieller Interferenzkontrast
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ES	Embryonale Stammzellen
F <sub>ab</sub>	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FALI	<i>fluorophore assisted laser inactivation</i>
FC	<i>fibrillar centre</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
FZB	Forschungszentrum Borstel
FHA	<i>forkhead-associated</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
Ig	Immunglobulin
IR	Infrarot
J	Joule
K	Kelvin
kb	Kilobase(n)
M	mol/L
Mcm	<i>Mini chromosome maintenance</i>
MG	Malachitgrün
MIB	Molekulare Immunologie Borstel
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NALI	Nanopartikel-assistierte Laserinaktivierung

---

NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazolin/5-Brom-4-chlor-3'-indolyl-Phosphat
Nd:YAG	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat
ns	Nanosekunde
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDT	photodynamische Therapie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration
PI	Propidiumjodid
Pol I	RNA Polymerase I
Pol II	RNA Polymerase II
r	als Vorsilbe: ribosomal
r. E.	relative Einheit
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Insitute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
Tris/HCl	Tris-Hydrochlorid
Triton X-100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl-)phenyldecaethylglycolether X-100
TuBB	Tumorbiologie Borstel
UBF	<i>upstream binding factor</i>
UV	ultraviolett
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
W	Watt
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen

Außerdem wurden neben allgemein üblichen Abkürzungen die Einheiten und Vorsatzzeichen des Internationalen Einheitensystems (SI) sowie die Elementsymbole des Periodensystems (nach IUPAC) verwendet.

---

## Zusammenfassung

Die Möglichkeit zur Manipulation biologischer Systeme durch Bestrahlung mittels Laser oder konventioneller Lichtquellen ist vielfach demonstriert worden. Die Verwendung von künstlich eingebrachten Absorbern bietet in diesem Zusammenhang einen Erfolg versprechenden Ansatz, um wirkungsvolle und gleichzeitig lokal eng begrenzte Effekte zu erzielen. Hierbei wird Licht einer bestimmten Wellenlänge von diesen Strukturen stärker absorbiert als von ihrer Umgebung. Dienen dabei Farbstoffmoleküle als Absorber, lassen sich durch photochemische Reaktionen z. B. einzelne Proteine inaktivieren. Dieser Ansatz wird unter dem Namen *Chromophor-assistierte Laserinaktivierung* (CALI) seit einiger Zeit erfolgreich angewandt. Mit stark absorbierenden Goldnanopartikeln ist eine Zerstörung von Zellen und Proteinen über physikalische Mechanismen möglich, dieser Ansatz wird hier als *Nanopartikel-assistierte Laserinaktivierung* (NALI) bezeichnet. Ziel der Arbeit war es beide Ansätze miteinander zu vergleichen und ihr Potential zur selektiven Zellschädigung sowie zur Inaktivierung von Proteinen am Beispiel von pKi-67, einem weit verbreiteten Marker in der Tumordiagnostik, zu untersuchen.

Durch Bestrahlung von Zelllysaten *in vitro* konnten die unterschiedlichen Wirkmechanismen von CALI und NALI analysiert werden. Die Laserbestrahlung von Chromophoren führte dabei über photochemische Effekte zur Proteinvernetzung, wogegen die Bestrahlung von Goldnanopartikeln, vermutlich durch thermische Effekte, eine Fragmentierung des Zielproteins herbeiführte. Mittels CALI gegen pKi-67 konnte anhand der induzierten Quervernetzungen UBF als wahrscheinlicher Bindungspartner von pKi-67 identifiziert werden. Dies könnte zukünftig die Anwendungsmöglichkeiten von CALI zur Ermittlung von Protein-Protein Interaktionen erweitern.

Mit Hilfe von Goldpartikeln konnte durch Kopplung über Antikörper an Zellmembranen in unterschiedlichen Ansätzen eine hoch selektive Zerstörung von Zellen nach Laserbestrahlung gezeigt werden. Die Spezifität der Schädigung wurde anhand von Mischkulturen demonstriert, die sehr hohe Zellkonzentrationen aufwiesen und in denen spezifisch ein Zelltyp zu nahezu 100 % geschädigt werden konnte, während umgebende Zellen nahezu ungeschädigt blieben.

Darüber hinaus konnten membrangebundene Goldnanopartikel erfolgreich für die Permeabilisierung von Zellmembranen eingesetzt werden und so Dextran sowie

Antikörpermoleküle in die Zellen eingebracht werden. Interessant erscheint eine weitere Optimierung dieser Methode zur Transfektion genetischen Materials in Zellen.

Die Inaktivierung intrazellulärer Proteine mit Hilfe von Goldnanopartikeln scheiterte an einer fehlenden selektiven Bindung der Partikel an die Zielstrukturen. Hierfür verantwortlich scheint die Ablösung der Antikörper von den Goldkonjugaten zu sein.

Eine mit NALI vergleichbare Permeabilisierung oder sogar Zerstörung der Zellmembran wurde mit Hilfe Chromophor-markierter Antikörper nicht beobachtet.

Mit Hilfe von CALI konnte jedoch erfolgreich die Inaktivierung des Ki-67-Proteins in lebenden Zellen auf sub-nukleärer Ebene durchgeführt werden.

Die nach Inaktivierung des pKi-67 beobachtete Inhibierung der Polymerase I-abhängigen rRNA-Synthese in den Nukleoli stellt dabei den ersten funktionalen *in vivo* Hinweis für die physiologische Rolle von pKi-67 dar. Diese Studien legen eine wichtige Funktion des Ki-67-Proteins bei der rRNA-Transkription nahe. Über eine Interaktion mit UBF wäre eine regulative Rolle denkbar, die zur Koordination von Ribosomen-Synthese und Zellwachstum beiträgt.

## Summary

The manipulation of biological systems by irradiation with lasers or conventional light sources has been demonstrated in many ways. The assignment of artificially inserted absorbers offers in this context a promising approach to achieve distinct and at the same time locally restricted effects. These structures absorb light of a certain wavelength stronger than the surrounding area. If dye molecules are used as absorbers, single proteins can be inactivated by photochemical reactions. This approach is known as *Chromophore-assisted Laserinactivation* (CALI) and successfully employed for several years. With strongly absorbing gold nanoparticles a destruction of cells and proteins is possible, here this approach is named *Nanoparticle-assisted Laserinactivation* (NALI). Aim of this thesis was to compare both methods with each other and to study their potential for selective cell damage and protein inactivation. Target for protein inactivation studies was the protein Ki-67 (pKi-67), a broadly used proliferation marker in tumor diagnostics.

Irradiation of cell lysates *in vitro* showed the different mechanisms of inactivation of CALI and NALI. Irradiation of chromophors led through photochemical reactions to crosslinking of proteins, whereas laser-irradiation of gold nanoparticles showed fragmentation of the target protein, presumably through thermal effects. At the energy levels used, the formation of cavitation bubbles is expectable and in consequence a mechanical damage to surrounding proteins. With means of CALI-induced crosslinks the transcriptionfactor UBF could be identified as potential binding partner of pKi-67. This could extend the CALI application in future to investigate protein-protein interactions.

With gold particles a highly selective destruction of cells could be demonstrated after laser-irradiation in different experiments by coupling the particles through antibodies to cell membranes. The specificity of the damage was shown with mixed cell cultures with high cell concentrations, where selectively one cell type was damaged to nearly 100 %, whereas surrounding cells were barely affected. Also a small sub-population of lymphoma cells in culture with lymphocytes could be eliminated almost completely, while the surrounding lymphocytes showed only little influence on vitality.

In addition membrane-bound particles could successfully be applied for temporal permabilization of cell membranes and following uptake of FITC-Dextran molecules or antibody molecules by the cells. A further optimization of this method seems interesting for transfection of genetic material into cells.

The inactivation of intracellular proteins with the help of gold nanoparticles failed due to missing selective localization of the particles at the target structures.

With CALI a permeabilization or even destruction of cell membranes as shown for NALI could not be observed.

But with the help of CALI a successful inactivation of the Ki-67 protein could be shown in living cells on sub-nuclear level.

The inhibition of polymerase I-dependant rRNA-synthesis inside the nucleoli represent the first functional evidence for the physiological role of pKi-67 in living cells. These studies suggest an important role for pKi-67 in rRNA-transcription. Through an interaction with UBF a regulative role would be imaginable, which contributes to coordination of ribosome biosynthesis with respect to cell proliferation.

---

## Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Gerdes für seine stetige Hilfsbereitschaft, die Finanzierung meiner Stelle und für die fachliche Unterstützung, sowie für die Fürsorge, dass *gewisse Meilensteine* nicht zu *Stolpersteinen* wurden, bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reginald Birngruber für die wohlwollende Unterstützung dieser interdisziplinären Thematik sowie der Übernahme des Gutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gereon Hüttmann für die hervorragende Betreuung sowie vielseitige Diskussionen, die den Rahmen dieser Arbeit erheblich erweitert haben. Ohne seine umfangreiche Hilfe durch Rat und Tat wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Thomas Scholzen danke ich sehr für seine große Hilfe bei vielen experimentellen Strategien und der kritischen Durchsicht des Manuskripts. Ohne sein differenzierendes Hinterfragen wären viele Details dieser Arbeit nicht beleuchtet worden.

Allen Mitarbeitern der Laborgruppe Tumorbologie danke ich für die Unterstützung und gute Arbeitsatmosphäre, insbesondere möchte ich mich bei Margrit Kernbach für die geduldige Einarbeitung in unterschiedliche Laborabläufe, gute Unterstützung und Erinnerungen an *gewisse Details* bedanken. Ebenso danke ich Dr. Elmar Endl für die Einführung in die Geheimnisse der Durchflusszytometrie und stetige Hilfsbereitschaft. Bei Dr. Jörn Bullwinkel möchte ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken. Nicht zuletzt gilt mein Dank Bettina Baron-Lühr, Anja Lüdemann, Dr. Prim Singh, Tanja Mengden, Anja Nitzsche, Renja Romey und Hélène Kamdem.

Bedanken möchte ich mich in gleichem Maße bei allen Mitarbeitern des Instituts für biomedizinische Optik an der Universität Lübeck für die gute Zusammenarbeit, insbesondere bei Barbara Flucke, Marco Bever, Dr. Verena Horneffer und Reinhard Schulz.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Martin Ernst und Frau Renate Bergmann für die freundliche Hilfe am Durchflusszytometer sowie die Bereitstellung mononukleärer Zellen, Herrn PD Dr. Thorsten Goldmann und Frau Heike Kühl für die Hilfestellung bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Frau Dagmar Rühmann für eine hervorragende Logistik zwischen Borstel und Lübeck, sowie Herrn Prof. Dr. Manuel Martinez Valdivia, Universität Cádiz, Spanien, für die Bereitstellung von Antikörpern.

Gaby danke ich sehr für ihre verständnis- und liebevolle Geduld und Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Meinen Eltern verbleibe ich ganz besonders für jedwede Unterstützung und die aufmerksame Begleitung und auch dafür, dass sie an das gute Gelingen dieser Arbeit immer geglaubt haben, stets dankbar.

---

## Lebenslauf

### RAMTIN RAHMANZADEH

Geburtsdatum: 30. Dezember 1975  
Geburtsort: Bonn  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULAUSBILDUNG

1986 – 1995 Beethoven Gymnasium, Bonn  
Abschluss: Abitur

### BIOLOGIESTUDIUM

1996 – 2002 Diplomstudiengang Biologie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Abschluss: Diplom-Biologe

1999 – 2000 Auslandsstudium an der Universität Helsinki, Finnland.

### TÄTIGKEITEN WÄHREND DES STUDIUMS

2000 - 2002 Werksstudent bei der Bayer AG und Datatrak GmbH.

2001 – 2002 Tutor im biologischen Grundkurs an der Universität Bonn.

### DIPLOMARBEIT

2002 Diplomarbeit in der Abteilung Molekularbiologie des Botanischen Instituts der Universität Bonn bei Prof. Dr. D. Bartels  
Titel: "Molekularbiologische Untersuchungen ausgewählter Lindernieae unter dem Aspekt der Trockentoleranz".

### DOKTORARBEIT

2003-2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Laborgruppe Tumorbologie am Forschungszentrum Borstel bei Prof. Dr. J. Gerdes im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Photonische Techniken zur zellulären Nanochirurgie“  
sowie Beschäftigung am Institut für biomedizinische Optik der Universität Lübeck bei Prof. Dr. R. Birngruber in der Arbeitsgruppe von Dr. G. Hüttmann.

**PUBLIKATIONEN**

Rahmanzadeh R, Müller K, Fischer E, Bartels D, Borsch T  
The Linderniaceae and Gratiolaceae are further lineages distinct from the Scrophulariaceae (Lamiales). *Plant. Biol.* (Stuttg). 2005 Jan; 7(1):67-78

Yao C, Rahmanzadeh R, Endl E, Zhang Z, Gerdes J, Hüttmann G  
Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles. *J. Biomed. Opt.* 2005 Nov-Dec; 10(6):064012

Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T  
Chromophore-assisted laser inactivation of the nuclear protein pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif.* 2007; Im Druck

**KONFERENZEN / POSTER**

Teilnahme und Poster auf der BIOS 2006, Photonics West, San Jose, CA, USA.  
Rahmanzadeh R, Scholzen T, Endl E, Gerdes J, Hüttmann G  
Laser-irradiated gold nanoparticles and chromophore assisted laser inactivation (CALI) as tools for selective protein knock out and cell killing.

Mehrere Vorträge bei Verbundtreffen des BMBF-Verbundes „Photonische Techniken zur zellulären Nanochirurgie“, veranstaltet durch den Projektträger VDI (Verband Deutscher Ingenieure).