

Spezifisch bindende magnetische Nanopartikel als Signalgeber in magnetischen Relaxationsmessungen

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

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

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

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

Des Weiteren wurden verschiedene magnetische Festphasen-Relaxationsimmunoassays (MARIAs) durchgeführt. In Hinblick auf die *In vivo*-Anwendbarkeit der Magnetrelaxometrie war die Untersuchung zur spezifischen Detektion der gebundenen Sonde in Anwesenheit der ungebundenen Sonde von besonderem Interesse, da dies die Grundvoraussetzung für eine spezifische Detektion der gebundenen magnetischen Nanopartikel *in vivo* darstellt. Die Bindungsspezifität der Magnetrelaxometrie konnte hier wieder erfolgreich bestätigt werden.

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

Als ein weiterer Schritt hin zur *In vivo*-Diagnostik wurden mit der Magnetrelaxometrie auch magnetisch markierte Zellen vermessen. Es wurde sowohl die Bindung der Sonden an die Zellen direkt verfolgt als auch magnetisch separierte Zellen untersucht. Allerdings konnte in

keinem Fall ein bindungsspezifisches Signal detektiert werden. Da die Bindung der magnetischen Nanopartikel an die Zelloberfläche sowohl elektronenmikroskopisch als auch mittels magnetischer Zellseparationen nachgewiesen werden konnte, ist als Ursache für die fehlenden Signale bei der magnetischen Relaxationsmessung ein zu geringer Markierungsgrad der Zellen anzunehmen.

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

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

Julia Lange, 2001